

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5845376号
(P5845376)

(45) 発行日 平成28年1月20日 (2016. 1. 20)

(24) 登録日 平成27年11月27日 (2015. 11. 27)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/155 (2006. 01)

A 6 1 K 39/155

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 9 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-500926 (P2015-500926)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)
 (65) 公表番号 特表2015-519295 (P2015-519295A)
 (43) 公表日 平成27年7月9日 (2015. 7. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/055943
 (87) 国際公開番号 W02013/139916
 (87) 国際公開日 平成25年9月26日 (2013. 9. 26)
 審査請求日 平成26年9月22日 (2014. 9. 22)
 (31) 優先権主張番号 61/614, 429
 (32) 優先日 平成24年3月22日 (2012. 3. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 12160682. 6
 (32) 優先日 平成24年3月22日 (2012. 3. 22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 301055549
 クルセル ホランド ベー ヴェー
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデ
 ン アルキメデスウェツハ 4
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100181272
 弁理士 神 絃一郎
 (74) 代理人 100173657
 弁理士 瀬沼 宗一郎
 (72) 発明者 カタリナ ラドシェヴィッチ
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデ
 ン アルキメデスウェツハ 4-6

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R S V に対するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

呼吸器合胞体ウイルス (R S V) に対するワクチンであって、R S V F タンパク質をコードする核酸を含む、血清型 3 5 の組換えヒトアデノウイルスを含むワクチン。

【請求項 2】

前記組換えアデノウイルスが、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む R S V F タンパク質をコードする核酸を含む、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 3】

R S V F タンパク質をコードする前記核酸が、ヒト細胞での発現のためにコドン最適化されている、請求項 1 または 2 に記載のワクチン。

【請求項 4】

R S V F タンパク質をコードする前記核酸が、配列番号 2 の核酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 5】

前記組換えヒトアデノウイルスが、アデノウイルスゲノムの E 1 領域中の欠失、E 3 領域中の欠失、または E 1 および E 3 の両方の領域中の欠失を有している、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 6】

前記組換えアデノウイルスが、その 5' 末端に配列 C T A T C T A T を含むゲノムを有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 7】

R S V F タンパク質をコードする核酸を含む、血清型 3 5 の組換えヒトアデノウイルスを含む、単離された宿主細胞。

【請求項 8】

呼吸器合胞体ウイルス (R S V) に対するワクチンを製造するための方法であって、 R S V F タンパク質をコードする核酸を含む、血清型 3 5 の組換えヒトアデノウイルスを準備するステップと、前記組換えアデノウイルスを宿主細胞の培養物中で増殖させるステップと、前記組換えアデノウイルスを単離および精製するステップと、前記組換えアデノウイルスを薬学的に許容される組成物中に製剤化するステップとを含む方法。

【請求項 9】

R S V F タンパク質をコードする核酸を含む、血清型 3 5 の組換えヒトアデノウイルスのゲノムを形成する単離された組換え核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は医療分野に関する。より具体的には、本発明は R S V に対するワクチンに関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

1 9 5 0 年代に呼吸器合胞体ウイルス (R S V : r e s p i r a t o r y s y n c y t i a l v i r u s) が発見されると、このウイルスは直ぐに、ヒトにおける上下気道感染症に関連した認定病原体になった。世界中で、毎年 6 4 0 0 万件の R S V 感染が発生し、その結果 1 6 0 , 0 0 0 人が死亡している (W H O A c u t e R e s p i r a t o r y I n f e c t i o n s U p d a t e S e p t e m b e r 2 0 0 9) 。最も重篤な疾患が生じるのは、特に未熟児、高齢および免疫無防備状態の個体である。2 年未満の小児では、R S V は、最もよく見られる呼吸器病原体であり、呼吸器感染症による入院の約 5 0 % を占め、入院のピークとなるのは 2 ~ 4 ヶ月齢である。ほとんどすべての小児が 2 歳までに R S V に感染したことが報告されている。生涯にわたり繰り返し感染することは、自然免疫が効果をもたないことに起因する。高齢者における、R S V 疾患の負担、死亡率、および罹患率のレベルは、非パンデミックなインフルエンザ A 型感染症を原因とするものに次ぐものである。

【 0 0 0 3 】

R S V は、肺炎ウイルス亜科に属するパラミクソウイルスである。そのゲノムは、中和抗体の主要な抗原標的である R S V 糖タンパク質 (G) および R S V 融合 (F) タンパク質として知られる膜タンパク質を含む、種々のタンパク質をコードする。融合タンパク質前駆体 (F 0) がタンパク質分解により切断されると、ジスルフィド架橋を介して連結された 2 つのポリペプチド F 1 および F 2 が生じる。F 1 タンパク質の融合媒介部分に対する抗体は、細胞のウイルス取り込みを防止することができ、したがって、中和作用がある。中和抗体の標的であることに加えて、R S V F は、細胞障害性 T 細胞エピトープを含有する (P e m b e r t o n e t a l , 1 9 8 7 , J . G e n . V i r o l . 6 8 : 2 1 7 7 - 2 1 8 2) 。

【 0 0 0 4 】

R S V 感染に対する治療選択肢には、R S V の F タンパク質に対するモノクローナル抗体が挙げられる。そのようなモノクローナル抗体には高いコストが伴うこと、また病院環境での投与が要求されることにより、リスクのある集団に予防のために大規模に使用することは不可能である。したがって、R S V ワクチンの必要性があり、このワクチンは小児集団にも高齢者にも使用できることが好ましい。

【 0 0 0 5 】

5 0 年間の研究にもかかわらず、R S V に対するワクチンはまだ認可されたものがない。ワクチン開発の主要な障害の 1 つは、ホルマリン不活化 (F I : f o r m a l i n - i

10

20

30

40

50

n a c t i v a t e d) R S V ワクチンによる、1960年代の臨床試験において、疾患のワクチン増強があったことが受け継がれていることである。F I - R S V ワクチン接種を受けた小児は、自然感染から防御されず、感染した小児は、ワクチン接種を受けなかった小児よりも、2人の死亡を含む重篤な病気を経験した。この現象は「疾患の増強」と呼ばれる。

【0006】

F I - R S V ワクチンによる試験以来、R S V ワクチンを作製するための種々のアプローチが追求されてきた。試みには、R S V の古典的生弱毒化低温継代株または温度感受性突然変異株、(キメラ)タンパク質サブユニットワクチン、ペプチドワクチン、および組換えウイルスベクターから発現されるR S V タンパク質が含まれる。これらのワクチンの一部は、有望な前臨床データを示したが、安全性の懸念または有効性の欠如により、ヒト使用に対して認可されたワクチンはない。

10

【0007】

アデノウイルスベクターは、R S V 感染に付随する疾患を含む、種々の疾患に対するワクチンの調製のために使用されている。以下の段落に、記載されたことのある、アデノウイルスベクターのR S V 候補ワクチンの例を提供する。

【0008】

1つのアプローチでは、R S V - F は、複製能のあるアデノウイルス4、5、および7型の非必須なE3領域に挿入された。コottonラットにおける免疫処置である、 10^7 p f u の鼻腔内 (i . n .) 適用は、中程度に免疫原性であり、下気道に対しては、R S V チャレンジに対して防御的であったが、上気道R S V チャレンジに対しては防御的でなかった (Connors et al , 1992 , Vaccine 10 : 475 - 484 ; Collins , P . L . , Prince , G . A . , Camargo , E . , Purcell , R . H . , Chanock , R . M . and Murphy , B . R . Evaluation of the protective efficacy of recombinant vaccinia viruses and adenoviruses that express respiratory syncytial virus glycoproteins . In : Vaccines 90 : Modern Approaches to New Vaccines including prevention of AIDS (Eds . Brown , F . , Chanock , R . M . , Ginsberg , H . and Lerner , R . A .) Cold Spring Harbor Laboratory , New York , 1990 , pp 79 - 84) 。その後のチンパンジーの経口免疫処置では、免疫原性が低かった (Hsu et al , 1992 , J Infect Dis . 66 : 769 - 775) 。

20

30

【0009】

他の研究では、(Shao et al , 2009 , Vaccine 27 : 5460 - 71 ; 米国特許出願公開第2011/0014220号明細書) 、膜貫通の短縮型 (r A d - F 0 T M) または完全長型 (r A d - F 0) の R S V - B 1 株 F タンパク質をコードする核酸を担持する、組換え型の複製能がない2つのアデノウイルス5ベクターを操作して作製し、B A L B / c マウスに鼻腔内経路で投与した。動物を 10^7 p f u で初回免疫 (i . n .) し、28日後に同じ用量で追加免疫 (i . n .) した。抗 R S V - B 1 抗体は、R S V - L o n g 株および R S V - A 2 株を中和し、それらと交差反応するが、これらのベクターによる免疫処置は、R S V B 1 チャレンジ複製に対して部分的にのみ防御した。r A d - F 0 T M による (部分的) 防御は、r A d - F 0 よりもわずかに高かった。

40

【0010】

別の研究では、野生型 R S V F (F G - A d - F) を発現する複製能欠損 (A d 5 ベースの) F G - A d アデノウイルスによる 10^{11} 個のウイルス粒子によって、B A L B / c マウスを i . n . 免疫処置すると、肺ウイルス力価が、対照群に比較して、 $1.5 \log 10$ だけ低下することが観察された (Fu et al , 2009 , Biochem

50

. Biophys. Res. Commun. 381:528-532)。

【0011】

さらに別の研究では、RSV A2のFタンパク質のコドン最適化された可溶性F1断片(アミノ酸155~524)を発現する組換え型Ad5ベースの複製能欠損アデノベクターを鼻腔内に適用すると(10^8 PFU)、対照マウスに比較して、BALB/cマウスの肺におけるRSVチャレンジ複製を軽減させることができるが、筋肉内(i.m.)経路により免疫処置されたマウスでは、チャレンジに対する何らの防御も示されないことが観察された(Kim et al, 2010, Vaccine 28:3801-3808)。

【0012】

他の研究では、コドン最適化された完全長RSV F(AdV-F)またはRSF F遺伝子の可溶性形態(AdV-Fsol)を担持するAd5ベースのアデノウイルスを使用して、 1×10^{10} OPUの用量でBALB/cマウスを2回免疫処置した(光学粒子単位: 1×10^{10} OPUの用量は、 2×10^8 GTU(遺伝子形質導入単位)に相当する)。これらのベクターは、i.n免疫処置後には、肺におけるウイルス負荷を強力に低減したが、皮下適用(s.c.)またはi.m.適用の後では、部分的にのみ低減した(Kohlmann et al, 2009, J Virol 83:12601-12610; 米国特許出願公開第2010/0111989号明細書)。

【0013】

さらに他の研究では、RSV A2株の配列決定されたFタンパク質cDNAを発現する組換え型Ad5ベースの複製能欠損アデノベクターを筋肉内に適用すると(10^{10} 粒子単位)、対照マウスに比較して、BALB/cマウスの肺におけるRSVチャレンジ複製を部分的にのみ軽減することができることが観察された(Krause et al, 2011, Virology Journal 8:375-386)。

【0014】

多くの症例において有効性が十分でないことは別として、小児用法についての臨床評価におけるRSVワクチンおよび前臨床評価におけるそのワクチンの大部分は、鼻腔内ワクチンである。鼻腔内法の最も重要な利点は、局所呼吸器免疫の直接刺激およびそれに伴う疾患増強の欠如である。実際、一般に、例えばアデノウイルスベースのRSV候補ワクチンの効力は、筋肉内投与と比較した場合、鼻腔内投与が優れているように見える。しかしながら、鼻腔内ワクチン接種も、6ヶ月未満の幼児において、安全性に懸念が生じている。鼻腔内ワクチンの最もよく見られる有害反応は、すべての年齢において、鼻汁または鼻閉である。新生児は鼻呼吸が必須であり、したがって、鼻を通して呼吸しなければならない。したがって、生まれてから最初の2、3ヶ月における鼻閉は、保育を妨害する可能性があり、まれな症例では、重篤な呼吸障害の原因となることもある。

【0015】

50種を超える、相異なるヒトアデノウイルスの血清型が同定されている。これらの中で、歴史的には、アデノウイルス血清型5(Ad5)が、遺伝子担体としての使用について最も広範囲に研究されている。しかしながら、異なる血清型の組換えアデノウイルスベクターを用いると、免疫応答の誘導および防御に関して異なる結果が得られる可能性がある。例えば、国際公開第2012/021730号パンフレットでは、Fタンパク質をコードするサルアデノウイルスベクター血清型7およびヒトアデノウイルスベクター血清型5が、血清型28のヒトアデノウイルスベクターよりも、RSVに対して優れた防御を提供することが記載されている。加えて、ヒトまたは非ヒトアデノウイルス血清型に基づくベクターについて、免疫原性の差異が観察された(Abbinck et al., 2007, J Virol 81:4654-4663; Colloca et al., 2012, Sci Transl Med 4, 115ra2)。Abbinckらは、試験したまれな血清型のヒトrAdベクターがすべて、抗Ad5免疫のない状態で、rAd5ベクターよりも効力が低かったと結論している。さらに、最近では、エボラウイルス(EBOV)糖タンパク質(gp)導入遺伝子を含むrAd5が非ヒト霊長類を100%防御す

10

20

30

40

50

る一方、EBOV gp 導入遺伝子を含む rAd35 および rAd26 は部分的に防御するのみであり、エボラウイルスチャレンジに対する完全な防御を得るためには、これらのベクターによる異種初回免疫 - 追加免疫法が必要とされることが記載されている (Geisbert et al, 2011, J Virol 85: 4222 - 4233)。したがって、別のアデノウイルス血清型からのデータにのみに基づいて、組換えアデノウイルスワクチンの効力を予測することは、経験的に可能ではない。

【0016】

さらに、RSV ワクチンの場合、ワクチン候補が、鼻腔および肺での RSV の複製を予防するのに十分効果的であり、かつ同時に安全であるか、すなわち、疾患の増強をもたらさないか否かを判定するために、コottonラットなどの適切な疾患モデルでの実験が必要となる。好ましくは、そのような候補ワクチンは、筋肉内投与においても、そのようなモデルで高度に効果的であるべきである。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

したがって、疾患の増強をもたらさない、RSV に対する効果的なワクチンおよびワクチン接種法の必要性が依然として存在する。本発明は、RSV に対するそのようなワクチンおよび安全で効果的にワクチン接種するための方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0018】

20

驚くべきことに、RSV F タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、血清型 35 の組換えアデノウイルス (Ad35) は、確立されたコottonラットモデルにおいて、RSV に対する極めて有効なワクチンであり、また RSV F をコードする Ad5 について以前に記載されたデータと比較して、効力が改善していることが、本発明者らにより見出された。RSV F をコードする Ad35 の単回投与でも、筋肉内投与でも、チャレンジ RSV 複製を完全に防御するのに十分であることが実証される。

【0019】

本発明は、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) に対するワクチンであって、RSV F タンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型 35 の組換えヒトアデノウイルスを含むワクチンを提供する。

30

【0020】

特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む RSV F タンパク質をコードする核酸を含む。

【0021】

特定の実施形態では、RSV F タンパク質をコードする核酸は、ヒト細胞での発現のためにコドン最適化されている。

【0022】

特定の実施形態では、RSV F タンパク質をコードする核酸は、配列番号 2 の核酸配列を含む。

【0023】

40

特定の実施形態では、組換えヒトアデノウイルスは、アデノウイルスゲノムの E1 領域中の欠失、E3 領域中の欠失、または E1 および E3 の両方の領域中の欠失を有している。

【0024】

特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、その 5' 末端に配列 CTATCTAT を含むゲノムを有する。

【0025】

本発明はさらに、RSV に対して被験体にワクチン接種するための方法であって、本発明によるワクチンを被験体に投与することを含む方法を提供する。

【0026】

50

特定の実施形態では、ワクチンは筋肉内投与される。

【0027】

特定の実施形態では、本発明によるワクチンは、被験体に二回以上投与される。

【0028】

特定の実施形態では、ワクチン接種するための方法は、被験体へのワクチンの単回投与からなる。

【0029】

特定の実施形態では、RSVに対して被験体にワクチン接種するための方法は、RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型26の組換えヒトアデノウイルスを含むワクチンを被験体に投与することをさらに含む。

10

【0030】

特定の実施形態では、RSVに対して被験体にワクチン接種する方法は、RSV Fタンパク質（好ましくは、医薬組成物、したがってタンパク質ワクチンとして製剤化される）を被験体に投与することをさらに含む。

【0031】

本発明はまた、被験体の、例えば鼻腔および肺におけるRSVの感染および/または複製を低減するための方法であって、RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型35の組換えヒトアデノウイルスを含む組成物の筋肉内注射によって被験体に投与することを含む方法を提供する。これは、被験体のRSV感染から生じる悪影響を軽減し、したがって、ワクチンの投与により、そのような悪影響から被験体を防御することに寄与することになる。特定の実施形態では、RSV感染の悪影響は、基本的に予防することができる、すなわち、臨床的に重要でないほど低レベルに軽減することができる。組換えアデノウイルスは、上記の実施形態を含む、本発明によるワクチンの形態にすることができる。

20

【0032】

本発明はまた、RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型35の組換えヒトアデノウイルスを含む、単離された宿主細胞を提供する。

【0033】

本発明は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）に対するワクチンを製造するための方法であって、RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型35の組換えヒトアデノウイルスを準備するステップと、前記組換えアデノウイルスを宿主細胞の培養物中で増殖させるステップと、この組換えアデノウイルスを単離および精製するステップと、この組換えアデノウイルスを薬学的に許容される組成物中に製剤化するステップとを含む方法をさらに提供する。この態様の組換えヒトアデノウイルスは、上記の実施形態に記載されるアデノウイルスのいずれであってもよい。

30

【0034】

本発明はまた、RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型35の組換えヒトアデノウイルスのゲノムを形成する単離された組換え核酸を提供する。このアデノウイルスは、上記の実施形態に記載されるアデノウイルスのいずれであってもよい。

40

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1A】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26（A）およびrAd35（B）をベースとするベクターにより免疫処置したときの、免疫処置後2および8週目における、マウスのFのaa1～252にオーバーラップするFペプチドおよびFのaa241～574にオーバーラップするFペプチドに対する細胞性免疫応答を示す。

【図1B】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26（A）およびrAd35（B）をベースとするベクターにより免疫処置したときの、免疫処置後2および8週目における、マウスのFのaa1～252にオーバーラップするFペプチドおよびFのaa241～574にオーバーラップするFペプチドに対する細胞性免疫応答を示す。

50

【図2】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターにより免疫処置したときの、免疫処置後2および8週目における、マウスのRSVに対する抗体応答を示す。

【図3】RSV F遺伝子を包含する、 10^{10} vpのrAd26およびrAd35をベースとするベクターにより免疫処置したときの、免疫処置後8週目における、マウスのRSVに対するIgG2a対IgG1抗体応答比の結果を示す。

【図4】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26(A)およびrAd35(B)をベースとするベクターにより免疫処置したときの、免疫処置後2および8週目における、マウスのRSV Longに対するウイルス中和能を示す。

【図5A】RSV F遺伝子を包含する、rAd26およびrAd35をベースとするベクターにより初回免疫 - 追加免疫処置したときの、初回免疫処置後6および12週目における、マウスの(A)Fのaa1~252にオーバーラップするFペプチドおよび(B)Fのaa241~574にオーバーラップするFペプチドに対する細胞性免疫応答を示す。

10

【図5B】RSV F遺伝子を包含する、rAd26およびrAd35をベースとするベクターにより初回免疫 - 追加免疫処置したときの、初回免疫処置後6および12週目における、マウスの(A)Fのaa1~252にオーバーラップするFペプチドおよび(B)Fのaa241~574にオーバーラップするFペプチドに対する細胞性免疫応答を示す。

【図6】RSV F遺伝子を包含する、rAd26およびrAd35をベースとするベクターにより初回免疫 - 追加免疫処置したときの、初回免疫処置後の種々の時点における、マウスのRSVに対する抗体応答を示す。

20

【図7】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターにより初回免疫 - 追加免疫処置したときの、初回免疫処置後の種々の時点における、マウスのRSV Longに対するウイルス中和能を示す。

【図8】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターにより初回免疫 - 追加免疫処置したときの、初回免疫処置後の種々の時点における、マウスのRSV B1に対するウイルス中和能を示す。

【図9】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターにより初回免疫 - 追加免疫処置した後の、チャレンジ後5日目における、コットンラットのA)RSV肺力価およびB)RSV鼻力価を示す。

30

【図10】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターにより初回免疫 - 追加免疫処置した後の、初回免疫処置後A)28日目およびB)49日目における、ウイルス中和力価の誘導を示す。

【図11】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターにより初回免疫 - 追加免疫処置した後の、屠殺日におけるコットンラット肺の病理組織検査を示す。

【図12】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターによる、異なる経路で投与された単回免疫処置後の、チャレンジ後5日目における、コットンラットのA)RSV肺力価およびB)RSV鼻力価を示す。

40

【図13】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターによる、異なる経路で投与された単回免疫処置後の、初回免疫処置後28および49日目における、ウイルス中和力価の誘導を示す。

【図14】屠殺日におけるRSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26およびrAd35をベースとするベクターにより単回投与免疫処置(i.m.)した後の、屠殺日におけるコットンラット肺の病理組織検査を示す。

【図15】RSV Fをコードする配列を含む、Ad35およびAd26のゲノムの左端を含むプラスミドのマッピング: A.pAdApt35BSU.RSV.F(A2)nat、およびB.pAdApt26.RSV.F(A2)natを示す。

【図16】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd35ベースのベクターによ

50

り0日目または21日目に単回投与免疫処置した後の、コottonラットのA)RSV肺力価およびB)RSV鼻力価を示す。チャレンジは49日目、屠殺は54日目であった。

【図17】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd35により単回投与免疫処置した後の、図16について記載された免疫処置後49日目におけるウイルス中和力価の誘導を示す。

【図18】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd35により単回投与免疫処置した後の、免疫処置後の期間におけるウイルス中和力価の誘導を示す。

【図19】Ad-35RSV Fまたは導入遺伝子なし(Ad-e)の 10^{10} の単回投与で免疫処置したコottonラットからの血清による、RSV LongおよびRSV B washに対する、49日後のVNA力価を示す。PB:初回免疫-追加免疫。

【図20】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd35ベースのベクターにより0日目に単回投与免疫処置した後の、RSV A2またはRSV B15/97によるチャレンジ後5日目における、コottonラットのRSV肺力価を示す。

【図21】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd26ベースのベクターにより0日目に単回投与免疫処置した後の、RSV A2またはRSV B15/97によるチャレンジ後5日目における、コottonラットのRSV鼻力価を示す。

【図22】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd35ベースのベクターにより0日目に単回投与免疫処置した後の、免疫処置後の期間におけるコottonラット血清中のVNA力価を示すグラフである。

【図23】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd35ベースのベクターにより0日目に単回投与免疫処置した後の、標準用量(10^5)または高用量(5×10^5)のRSV A2によるチャレンジ後5日目における、コottonラットのRSV肺力価を示す。

【図24】RSV F遺伝子を包含する、種々の用量のrAd35ベースのベクターにより0日目に単回投与免疫処置した後の、標準用量(10^5)または高用量(5×10^5)のRSV A2によるチャレンジを伴うチャレンジ後5日目における、コottonラットのRSV鼻力価を示す。

【図25】RSV F遺伝子を包含するrAd26(Ad26.RSV.F)による免疫処置およびその後のAd26.RSV.FまたはアジュバントRSV Fタンパク質(post-F)による追加免疫後のウイルス中和力価の誘導を示す。

【図26】Ad26.RSV.Fによる免疫処置およびその後のAd26.RSV.Fによる追加免疫またはアジュバントRSV Fタンパク質(post-F)による追加免疫後のIgG2a抗体およびIgG1抗体の誘導ならびにそれらの比を示す。

【図27】Ad26.RSV.Fによる免疫処置およびその後のAd26.RSV.FまたはアジュバントRSV Fタンパク質(post-F)による追加免疫後の脾細胞によるIFN-gの産生を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

アデノウイルスに対する「組換え」という用語は、本明細書で使用する場合、アデノウイルスが人為的に修飾されたことを意味し、例えば、アデノウイルスは、その中に積極的にクローニングされた改変末端を有し、かつ/または異種遺伝子を含む、すなわち、天然の野生型アデノウイルスではない。

【0037】

本明細書の配列は、当技術分野の慣例どおり、5'から3'の方向で提供される。

【0038】

「アデノウイルスカプシドタンパク質」とは、特定のアデノウイルスの血清型および/またはトロピズムの決定に関与する、アデノウイルスのカプシド上のタンパク質を指す。アデノウイルスカプシドタンパク質は、典型的には、ファイバータンパク質、ペントンタンパク質、および/またはヘキソンタンパク質を含む。本発明による特定の血清型の(「またはそれに基づいた」)アデノウイルスは、典型的には、その特定の血清型のファイバ

10

20

30

40

50

ータンパク質、ペントンタンパク質、および／またはヘキソタンパク質を含み、好ましくは、その特定の血清型のファイバータンパク質、ペントンタンパク質、およびヘキソタンパク質を含む。これらのタンパク質は、典型的には、組換えアデノウイルスのゲノムによりコードされる。特定の血清型の組換えアデノウイルスは、任意選択で、他のアデノウイルス血清型に由来する他のタンパク質を含み、かつ／またはコードすることがある。したがって、非限定例として、Ad35のヘキソン、ペントン、およびファイバーを含む組換えアデノウイルスは、Ad35に基づく組換えアデノウイルスとみなされる。

【0039】

組換えアデノウイルスは、本明細書で使用する場合、少なくとも配列において野生型から誘導されることによって、アデノウイルス「に基づいて」いる。これは、出発物質として野生型ゲノムまたはその一部を使用して、分子クローニングにより達成することができる。また、DNA合成により新たにゲノム（の一部）を生成するために、野生型アデノウイルスゲノムの公知配列を使用することが可能であり、これは、DNA合成および／または分子クローニングの分野でビジネスをしているサービス企業によりルーチン的な手法を使用して実施され得る（例えば、GeneArt, Invitrogen, GenScripts, Eurofins）。

【0040】

数多くの異なるポリヌクレオチドおよび核酸が、遺伝暗号の縮重の結果として同じポリペプチドをコードすることができることは、当業者に理解されている。当業者が、ポリペプチドが発現されることになる、任意の特定の宿主生物のコドン使用頻度を反映するように、そこに記載されるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド配列に影響を及ぼさないヌクレオチド置換を、ルーチン的な手法を使用して行うことができることも理解されている。したがって、特に明記されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重形であって、同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含んでもよい。

【0041】

好ましい実施形態では、RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸は、ヒト細胞などの哺乳類細胞における発現のためにコドン最適化されている。コドン最適化の方法は公知であり、以前に記載されている（例えば、国際公開第96/09378号パンフレット）。RSV Fタンパク質の特定のコドン最適化配列の一例は、欧州特許第2102345B1号明細書の配列番号2に記載されている。

【0042】

一実施形態では、RSV Fタンパク質は、RSV A2株に由来し、配列番号1のアミノ酸配列を有する。特に好ましい実施形態では、RSV Fタンパク質をコードする核酸は、配列番号2の核酸配列を含む。この実施形態は安定な発現をもたらす、この実施形態によるワクチンは、1回の筋肉内投与の後でも鼻腔および肺におけるRSV複製を防御することを本発明者らは見出した。

【0043】

本明細書で使用する「断片」という用語は、アミノ末端および／またはカルボキシ末端および／または内部が欠失しているが、残りのアミノ酸配列が、RSV Fタンパク質の配列、例えばRSV Fタンパク質の完全長配列の中の対応する位置と同一であるペプチドを指す。免疫応答を誘導するためには、さらに一般的には、ワクチン接種の目的のためには、タンパク質は、完全長である必要も、その野生型の機能をすべて有する必要もなく、タンパク質の断片でも同等に有用である。実際、F1またはFsolubleのようなRSV Fタンパク質の断片は、完全長Fのように免疫応答を誘導するのに効果的であることが示されている（Shao et al, 2009, Vaccine 27:5460-71, Kohlmann et al, 2009, J Virol 83:12601-12610）。アミノ酸255～278または412～524に対応するFタンパク質断片を能動免疫処置に組み込むと、中和抗体およびRSVチャレンジに対する一部の

10

20

30

40

50

防御が誘導される (Sing et al, 2007, Virol. Immunol. 20, 261-275; Sing et al, 2007, Vaccine 25, 6211-6223)。

【0044】

本発明による断片は、免疫学的に活性な断片であり、典型的には、RSV Fタンパク質の少なくとも15個のアミノ酸、または少なくとも30個のアミノ酸を含む。特定の実施形態では、それは、RSV Fタンパク質の少なくとも50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、または550個のアミノ酸を含む。

【0045】

当業者はまた、例えばルーチン的な分子生物学手順を使用して、例えばアミノ酸の置換、欠失、付加等よりタンパク質に変化を施すことができることを認識している。一般に、保存的なアミノ酸置換は、ポリペプチドの機能または免疫原性を喪失させることなく施すことができるものである。これは、当業者に周知のルーチン的な手順に従って、容易にチェックすることができる。

【0046】

「ワクチン」という用語は、特定の病原体または疾患に対して被験体に治療レベルの免疫を誘導するのに効果的な活性成分を含有する薬剤または組成物を指す。本発明では、ワクチンは、RSV Fタンパク質またはその抗原性断片をコードする有効量の組換えアデノウイルスを含み、これにより、RSVのFタンパク質に対する免疫応答がもたらされる。これは、入院が必要となる重篤な下気道疾患を予防し、被験体のRSV感染および複製による肺炎および細気管支炎などの合併症の頻度を低減する方法を提供する。したがって、本発明はまた、重篤な下気道疾患の予防もしくは軽減、入院の回避もしくは縮小（例えば、短縮）ならびに／または被験体におけるRSVを原因とする肺炎もしくは細気管支炎の頻度および／もしくは重症度の低減のための方法であって、RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型35の組換えヒトアデノウイルスを含む組成物の筋肉内注射によって被験体に投与することを含む方法を提供する。本発明による「ワクチン」という用語は、それが医薬組成物であり、したがって、典型的には、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含むことを意味する。それは、さらなる活性成分を含んでも、含まなくてもよい。特定の実施形態では、それは、例えばRSVの他のタンパク質および／または他の感染病原体に対する免疫応答を誘導する他の成分をさらに含む組合せワクチンであってもよい。

【0047】

本発明のベクターは、組換えアデノウイルスであり、組換えアデノウイルスベクターとも呼ばれる。組換えアデノウイルスベクターの調製は、当技術分野で周知である。

【0048】

特定の実施形態では、本発明によるアデノウイルスベクターは、E1領域の少なくとも1つの必須遺伝子機能、例えば、ウイルス複製に必要なアデノウイルスゲノムのE1a領域および／またはE1b領域が欠損している。特定の実施形態では、本発明によるアデノウイルスベクターは、非必須なE3領域の少なくとも一部が欠損している。特定の実施形態では、このベクターは、E1領域の少なくとも1つの必須遺伝子機能および非必須なE3領域の少なくとも一部が欠損している。アデノウイルスベクターは、「複合的に欠損している」ことがあり、これは、アデノウイルスベクターが、アデノウイルスゲノムの2つ以上の領域のそれぞれにおいて、1つまたは複数の必須遺伝子機能を欠損していることを意味する。例えば、前述のE1欠損またはE1、E3欠損のアデノウイルスベクターは、E4領域の少なくとも1つの必須遺伝子および／またはE2領域（例えば、E2A領域および／またはE2B領域）の少なくとも1つの必須遺伝子がさらに欠損していることがある。

【0049】

アデノウイルスベクター、その構築のための方法、およびそれを増殖させるための方法

は、当技術分野で周知であり、例えば、米国特許第5,559,099号明細書、同第5,837,511号明細書、同第5,846,782号明細書、同第5,851,806号明細書、同第5,994,106号明細書、同第5,994,128号明細書、同第5,965,541号明細書、同第5,981,225号明細書、同第6,040,174号明細書、同第6,020,191号明細書、および同第6,113,913号明細書、およびThomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M.S. Horwitz, "Adenoviruses", Chapters 67 and 68, respectively, in Virology, B.N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996)、ならびに本明細書に記述された他の参考文献に記載されている。典型的には、アデノウイルスベクターの構築には、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., Recombinant DNA, 2d ed., Scientific American Books (1992), and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY (1995)、および本明細書に記述された他の参考文献に記載されるものなど、標準分子生物学手法の使用が含まれる。

【0050】

本発明によれば、アデノウイルスは血清型35のヒトアデノウイルスである。この血清型に基づく本発明によるワクチンおよびAd26に基づくワクチンは、驚くべきことに、従来技術で記載されるAd5に基づくワクチンよりも効力があるように見える。というのは、Ad5に基づくワクチンは、単回筋肉内投与後のRSVチャレンジ複製に対する防御が完全ではなかったからである(Kim et al., 2010, Vaccine 28:3801-3808; Kohlmann et al., 2009, J Virol 83:12601-12610; Krause et al., 2011, Virology Journal 8:375)。本発明の血清型はさらに、一般に、ヒト母集団において、血清有病率が低く、かつ/または既存の中和抗体価が低い。種々の導入遺伝子を含む、この血清型およびAd26の組換えアデノウイルスベクターは、臨床試験で評価され、これまで、優れた安全性プロファイルを有することが示されている。rAd26ベクターの調製は、例えば、国際公開第2007/104792号パンフレットおよびAbbinck et al., (2007) Virol 81(9):4654-63に記載されている。Ad26の例示的なゲノム配列は、GenBank受入番号EF_153474および国際公開第2007/104792号パンフレットの配列番号1に見られる。rAd35ベクターの調製は、例えば、米国特許第7,270,811号明細書、国際公開第00/70071号パンフレット、およびVogels et al., (2003) J Virol 77(15):8263-71に記載されている。Ad35の例示的なゲノム配列は、GenBank受入番号AC_000019および国際公開第00/70071号パンフレットの図6に見られる。

【0051】

本発明による組換えアデノウイルスは、複製能があっても、複製能が欠損していてもよい。

【0052】

特定の実施形態では、アデノウイルスは、例えばゲノムのE1領域に欠失があるために、複製能が欠損している。当業者には公知であるように、アデノウイルスゲノムから必須領域が欠失している場合には、これらの領域によってコードされる機能は、トランスで、好ましくはプロデューサー細胞により提供されなければならない、すなわち、E1、E2、および/またはE4領域の一部または全部がアデノウイルスから欠失している場合には

、それらはプロデューサー細胞中に、例えば、そのゲノムに組み込まれて、またはいわゆるヘルパーアデノウイルスもしくはヘルパープラスミドの形態で存在しなければならない。アデノウイルスはまた、E 3 領域中に欠失がある場合もあるが、この領域は複製に必ずしも必要ではなく、したがって、このような欠失は補完する必要がない。

【0053】

使用することができるプロデューサー細胞（時として、当技術分野および本明細書において、「パッケージング細胞」または「補完細胞」または「宿主細胞」とも呼ばれる）は、所望のアデノウイルスを増殖させることができる任意のプロデューサー細胞であってよい。例えば、組換えアデノウイルスベクターの増殖は、アデノウイルス中の欠損を補完するプロデューサー細胞中で行われる。このようなプロデューサー細胞は、好ましくは、そのゲノム中に少なくともアデノウイルスE 1 配列を有しており、それによってE 1 領域に欠失がある組換えアデノウイルスを補完することができる。E 1 を補完する任意のプロデューサー細胞、例えば、E 1 により不死化されたヒト網膜細胞、例えば9 1 1 細胞またはPER . C 6 細胞（米国特許第5 , 9 9 4 , 1 2 8 号明細書を参照のこと）、E 1 で形質転換された羊膜細胞（欧州特許第1 2 3 0 3 5 4 号明細書を参照のこと）、E 1 で形質転換されたA 5 4 9 細胞（例えば、国際公開第9 8 / 3 9 4 1 1 号パンフレット、米国特許第5 , 8 9 1 , 6 9 0 号明細書を参照のこと）、GH 3 2 9 : HeLa (Gao et al , 2 0 0 0 , Human Gene Therapy 1 1 : 2 1 3 - 2 1 9)、2 9 3 等を使用することができる。特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、例えば、HEK 2 9 3 細胞、またはPER . C 6 細胞、または9 1 1 細胞、またはIT 2 9 3 SF 細胞等である。

【0054】

Ad 3 5（亜群B）またはAd 2 6（亜群D）など、亜群CでないE 1 欠損アデノウイルスについては、これらの亜群CでないアデノウイルスのE 4 - orf 6 コード配列を、Ad 5 などの亜群CのアデノウイルスのE 4 - orf 6 と交換することが好ましい。これにより、Ad 5 のE 1 遺伝子を発現する、例えば2 9 3 細胞またはPER . C 6 細胞など、周知の補完細胞中でそのようなアデノウイルスが増殖できるようになる（例えば、Havenga et al , 2 0 0 6 , J . Gen . Virol . 8 7 : 2 1 3 5 - 2 1 4 3 ; その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第0 3 / 1 0 4 4 6 7 号パンフレットを参照のこと）。特定の実施形態では、ワクチン組成物中のアデノウイルスは、RSV F タンパク質抗原をコードする核酸がクローニングされている、E 1 領域中の欠失を有し、かつAd 5 のE 4 orf 6 領域を有する、血清型3 5 のヒトアデノウイルスである。特定の実施形態では、使用することのできるアデノウイルスは、RSV F タンパク質抗原をコードする核酸がクローニングされている、E 1 領域中の欠失を有し、かつAd 5 のE 4 orf 6 領域を有する、血清型2 6 のヒトアデノウイルスである。

【0055】

代替実施形態では、アデノウイルスベクター中に異種E 4 orf 6 領域（例えば、Ad 5 の）を配置する必要はないが、その代わり、E 1 欠損の亜群Cでないベクターを、E 1 および適合性のあるE 4 orf 6 の両方を発現する細胞株、例えば、Ad 5 由来のE 1 およびE 4 orf 6 の両方を発現する2 9 3 - ORF 6 細胞株で増殖させる（例えば、2 9 3 - ORF 6 細胞の生成について記載する、Brough et al , 1 9 9 6 , J Virol 7 0 : 6 4 9 7 - 5 0 1 ; それぞれ、このような細胞株を使用する、E 1 欠失の非亜群Cアデノウイルスベクターの生成について記載する、Abrahamsen et al , 1 9 9 7 , J Virol 7 1 : 8 9 4 6 - 5 1 およびNan et al , 2 0 0 3 , Gene Therapy 1 0 : 3 2 6 - 3 6 を参照のこと）。

【0056】

あるいは、増殖させることになる血清型に由来するE 1 を発現する補完細胞を使用することができる（例えば、国際公開第0 0 / 7 0 0 7 1 号パンフレット、国際公開第0 2 / 4 0 6 6 5 号パンフレットを参照のこと）。

【0057】

10

20

30

40

50

E 1 領域中に欠失がある、A d 3 5 などの亜群 B アデノウイルスについては、アデノウイルス中に E 1 B 5 5 K 翻訳領域の 3' 末端、例えば、p I X 開始コドンの直ぐ上流にある 2 4 3 b p 断片など、p I X 翻訳領域またはこれを含む断片の直ぐ上流にある 1 6 6 b p (A d 3 5 ゲノム中の B s u 3 6 I 制限部位により 5' 末端にマークされている) を保持することが好ましい。というのは、p I X 遺伝子のプロモーターがこの領域に一部存在しているため、これがアデノウイルスの安定性を増大させるからである (例えば、H a v e n g a e t a l , 2 0 0 6 , J . G e n . V i r o l . 8 7 : 2 1 3 5 - 2 1 4 3 ; 参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2 0 0 4 / 0 0 1 0 3 2 号パンフレットを参照のこと) 。

【 0 0 5 8 】

本発明のアデノウイルス中の「異種核酸」(本明細書において「導入遺伝子」とも呼ばれる) は、アデノウイルス中に天然には存在しない核酸である。それは、例えば、標準分子生物学手法によりアデノウイルスに導入される。本発明では、異種核酸は R S V F タンパク質またはその断片をコードする。それは、例えば、アデノウイルスベクターの欠失した E 1 または E 3 領域にクローニングすることができる。導入遺伝子は、一般に、発現制御配列に機能的に連結されている。これは、導入遺伝子をコードする核酸をプロモーターの制御下に配置することによって行うことができる。さらなる調節配列を加えることもできる。多くのプロモーターを導入遺伝子の発現に使用することができ、それらは当業者に公知である。真核細胞で発現を得るのに適したプロモーターの非限定例としては、例えば C M V 最初期遺伝子エンハンサー / プロモーター由来の n t . - 7 3 5 ~ + 9 5 を含む、C M V 最初期プロモーターなどの C M V プロモーター (米国特許第 5 , 3 8 5 , 8 3 9 号明細書) が挙げられる。ポリアデニル化シグナル、例えばウシ成長ホルモン p o l y A シグナル (米国特許第 5 , 1 2 2 , 4 5 8 号明細書) を、導入遺伝子の後に存在させることもできる。

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態では、本発明の組換え A d 2 6 または A d 3 5 ベクターは、5' 末端ヌクレオチドとしてヌクレオチド配列 : C T A T C T A T を含む。そのようなベクターは、オリジナル 5' 末端配列 (一般に C A T C A T C A) を有するベクターに比較して、製造工程において複製が改善され、その結果、均一性が改善したアデノウイルスのバッチが得られるため、これらの実施形態は有利になる (その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、C r u c e l l H o l l a n d B . V . の名のもとに 2 0 1 2 年 3 月 1 2 日に出願された「改変末端を有する組換えアデノウイルスのバッチ」と題する特許出願 P C T / E P 2 0 1 3 / 0 5 4 8 4 6 および米国特許第 1 3 / 7 9 4 , 3 1 8 号明細書も参照のこと) 。したがって、本発明はまた、R S V F タンパク質またはその一部をコードする組換えアデノウイルスのバッチであって、このアデノウイルスがヒトアデノウイルス血清型 3 5 であり、かつこのバッチ中のアデノウイルスの基本的にすべて (例えば、少なくとも 9 0 %) が末端ヌクレオチド配列 C T A T C T A T を有するゲノムを含む、組換えアデノウイルスのバッチを提供する。

【 0 0 6 0 】

本発明によれば、R S V の F タンパク質は、好ましくは、A 2 株、L o n g 株、または B 株などのヒト R S V 株に由来する、天然または組換えの R S V の任意の株に由来するものであってよい。さらなる実施形態では、この配列は、複数の R S V F タンパク質のアミノ酸配列に基づいたコンセンサス配列であってよい。本発明の一例では、R S V 株は R S V - A 2 株である。

【 0 0 6 1 】

本発明によれば、R S V の F タンパク質は、R S V の F タンパク質の完全長であっても、その断片であってもよい。本発明の一実施形態では、R S V の F タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸など、R S V (F 0) の F タンパク質の完全長をコードする。本発明の一例では、R S V の F タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する。あるいは、R S V の F タンパク質をコ

10

20

30

40

50

ードする配列は、配列番号2のヌクレオチド配列に対して、少なくとも約80%、好ましくは約90%、より好ましくは少なくとも約95%同一である任意の配列であってよい。他の実施形態では、例えば、国際公開第2012/021730号パンフレットの配列番号2、4、5、または6に示されるものなど、コドン最適化された配列を使用することができる。

【0062】

本発明の別の実施形態では、このヌクレオチド配列は、RSVのFタンパク質の断片を代替的にコードしてもよい。この断片は、アミノ末端の欠失およびカルボキシ末端の欠失のいずれかまたはその両方から生じるものであってよい。欠失の程度は、例えば組換えアデノウイルスが高収率で得られるように、当業者が決定することができる。この断片は、Fタンパク質の免疫学的に活性な断片、すなわち、被験体に免疫応答を生じさせる部分を含むように選択されることになる。これは、当業者にはすべてルーチン的である、*in silico*、*in vitro*、および/または*in vivo*の方法を使用して容易に決定することができる。本発明の一実施形態では、この断片は、RSVの膜貫通コード領域短縮のFタンパク質である(F0-TM、例えば米国特許第20110014220号明細書を参照のこと)。Fタンパク質の断片はまた、Fタンパク質のF1ドメインであっても、F2ドメインであってもよい。Fの断片はまた、中和エпитープおよびT細胞エпитープを含有する断片であってもよい(Sing et al, 2007, *Virology*, 355, 6211-6223)。

【0063】

本開示で使用する、数値に対する「約」という用語は、値±10%を意味する。

【0064】

特定の実施形態では、本発明は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)に対するワクチンを製造するための方法であって、RSV Fタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型35の組換えヒトアデノウイルスを準備するステップと、前記組換えアデノウイルスを宿主細胞の培養物中で増殖させるステップと、この組換えアデノウイルスを単離および精製するステップと、この組換えアデノウイルスを薬学的に許容される組成物中に取り込むステップとを含む方法を提供する。

【0065】

組換えアデノウイルスは、周知の方法に従って、調製し宿主細胞中で増殖させることができるが、これにはアデノウイルスを感染させた宿主細胞の細胞培養が必要となる。細胞培養は、付着細胞、例えば培養容器の表面またはマイクロキャリアに付着した細胞の培養および懸濁培養を含む、いかなるタイプの細胞培養であってもよい。

【0066】

大抵の大規模懸濁培養は、操作およびスケールアップが最も簡単であるため、バッチまたはフェドバッチ工程として操作される。最近では、灌流原理に基づく連続工程がより一般的になりつつあり、また適切にもなっている(例えば、両方とも参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2010/060719号パンフレットおよび国際公開第2011/098592号パンフレットを参照のこと、これらは、大量の組換えアデノウイルスを取得および精製するために適切な方法を記載している)。

【0067】

プロデューサー細胞を培養して、細胞数およびウイルス数、ならびに/またはウイルス力価を増加させる。細胞が代謝および/または増殖および/または分裂および/または本発明による目的ウイルスの産生を行うことが可能になるように、細胞培養を行う。これは、当業者にそれ自体周知の方法により達成することができ、例えば、これに限定されないが、適切な培地中に細胞のための栄養素を供給することを含む。適切な培地は当業者に周知であり、一般に、商用供給源から大量に得ること、または標準プロトコールに従って注文生産することが可能である。培養は、バッチ、フェドバッチ、連続系等を使用して、例えば、ディッシュ、ローラーボトル、またはバイオリアクター中で行うことができる。細

胞培養に適した条件は公知である（例えば、Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), and R. I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9を参照のこと）。

【0068】

典型的には、アデノウイルスを、培養物中で適切なプロデューサー細胞に曝露し、それによってウイルスの取り込みを可能にする。通常、最適な攪拌は、約50～300rpmの間、典型的には100～200、例えば約150であり、典型的なDOは、20～60%

10

の間、例えば40%であり、最適pHは6.7～7.7の間であり、最適温度は30～39の間、例えば34～37であり、また最適MOIは5～1000の間、例えば約50～300である。典型的には、アデノウイルスはプロデューサー細胞に自然に感染し、プロデューサー細胞をrAd粒子と接触させることで、細胞感染には十分である。一般には、アデノウイルスのシードストックを培養物に添加して感染を開始させ、続いてプロデューサー細胞中でアデノウイルスを増殖させる。これはすべて、当業者にはルーチンである。

【0069】

アデノウイルスが感染した後、ウイルスは細胞内部で複製し、それによって増幅する。これは本明細書においてアデノウイルスの増殖と呼ばれるプロセスである。アデノウイルスが感染すると、最終的に感染細胞の溶解が起こる。したがって、アデノウイルスのこの細胞溶解特性により、ウイルス製造の2つの異なる方式が可能になる。第1の方式は、細胞溶解前に、細胞を溶解させる外部因子を使用してウイルスを回収するものである。第2の方式は、生成したウイルスによって（ほとんど）完全に細胞が溶解した後に、ウイルス上清を回収するものである（例えば、外部因子によって宿主細胞を溶解させることなくアデノウイルスを回収することについて記載している、米国特許第6,485,958号明細書を参照のこと）。アデノウイルスの回収を目的として、外部因子を使用して細胞を積極的に溶解させることが好ましい。

20

【0070】

積極的な細胞溶解に使用することができる方法は、当業者に公知であり、例えば、国際公開第98/22588号パンフレット、p.28-35に論じられている。この点に関し有用な方法としては、例えば、凍結融解、固体剪断、高張性および/または低張性溶解、液体剪断、超音波処理、高圧押出、界面活性剤による溶解、上記の組合せ等がある。本発明の一実施形態では、細胞は少なくとも1つの界面活性剤を使用して溶解する。溶解のために界面活性剤を使用することには、それが簡単な方法であり、かつ容易にスケールアップ可能であるという利点がある。

30

【0071】

使用することができる界面活性剤およびそれらの使用法は、当業者に一般に公知である。いくつかの例が、例えば、国際公開第98/22588号パンフレット、p.29-33に論じられている。界面活性剤としては、アニオン性、カチオン性、両性イオン性、および非イオン性の界面活性剤が挙げられる。界面活性剤の濃度は、例えば約0.1%～5% (w/w) の範囲内で変化させることができる。一実施形態では、使用される界面活性剤はTriton X-100である。

40

【0072】

混入している、すなわち大抵はプロデューサー細胞に由来する核酸を除去するために、ヌクレアーゼを使用することができる。本発明で使用するのに適した例示的なヌクレアーゼとしては、Benzonase（登録商標）、Pulmozyme（登録商標）、または当技術分野内で一般に使用される他の任意のDNaseおよび/またはRNaseが挙げられる。好ましい実施形態では、ヌクレアーゼはBenzonase（登録商標）であり、これは、特定のヌクレオチド間の内部リン酸ジエステル結合を加水分解することによ

50

り迅速に核酸を加水分解し、それによって細胞溶解物の粘性を低下させる。Benzonase（登録商標）は、Merck KGaA（コードW214950）から商業的に入手することができる。ヌクレアーゼの使用濃度は、好ましくは1～100単位/mlの範囲内である。代替的にまたはヌクレアーゼ処理に加えて、アデノウイルスの精製中に、ドミフェン臭化物などの選択的な沈澱剤を使用して、アデノウイルス調製物から宿主細胞DNAを選択的に沈殿除去することも可能である（例えば、米国特許第7,326,555号明細書；Goerke et al., 2005, Biotechnology and bioengineering, Vol. 91: 12-21；国際公開第2011/045378号パンフレット；国際公開第2011/045381号パンフレットを参照のこと）。

10

【0073】

プロデューサー細胞の培養物からアデノウイルスを回収するための方法は、国際公開第2005/080556号パンフレットに広範囲にわたって記載されている。

【0074】

特定の実施形態では、回収されたアデノウイルスをさらに精製する。アデノウイルスの精製は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第05/080556号パンフレットに記載されているように、清澄化、限外濾過、ダイアフィルトレーション、またはクロマトグラフィーによる分離を含むいくつかのステップで実施することができる。清澄化は、細胞溶解物から細胞片および他の不純物を除去する濾過ステップにより行うことができる。限外濾過は、ウイルス溶液を濃縮するために使用される。限外濾過器を使用するダイアフィルトレーションまたは緩衝液交換は、塩、糖等を除去および交換するための方法である。当業者は、各精製ステップの最適条件を見つける方法を知っている。また、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第98/22588号パンフレットは、アデノウイルスベクターの製造および精製のための方法について記載している。この方法は、宿主細胞の増殖、アデノウイルスによる宿主細胞の感染、宿主細胞の回収および溶解、粗溶解物の濃縮、粗溶解物の緩衝液交換、ヌクレアーゼによる溶解物の処理、ならびにクロマトグラフィーを使用するウイルスのさらなる精製を含む。

20

【0075】

好ましくは、精製には、例えば国際公開第98/22588号パンフレット、p. 61-70に論じられているように、少なくとも1つのクロマトグラフィーステップが使用される。クロマトグラフィーステップを含む、多くのプロセスがアデノウイルスのさらなる精製のために記載されている。当業者はこれらのプロセスを認識しており、クロマトグラフィーステップを使用するまさにそのやり方を変更して、プロセスを最適化することができる。例えば、アニオンイオン交換クロマトグラフィーステップによりアデノウイルスを精製することが可能であり、例えば、国際公開第2005/080556号パンフレットおよびKonz et al., 2005, Hum Gene Ther 16: 1346-1353を参照されたい。多くの他のアデノウイルス精製法が記載されており、それらは当業者が入手可能な範囲内である。アデノウイルスを製造および精製するためのさらなる方法は、例えば、（国際公開第00/32754号パンフレット；国際公開第04/020971号パンフレット；米国特許第5,837,520号明細書；米国特許第6,261,823号明細書；国際公開第2006/108707号パンフレット；Konz et al., 2008, Methods Mol Biol 434: 13-23；Altaras et al., 2005, Adv Biochem Eng Biotechnol 99: 193-260）に開示されており、これらはすべて、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0076】

ヒトへの投与に対して、本発明は、rAdおよび薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物を使用することができる。本発明との関連において、「薬学的に許容される」という用語は、担体または賦形剤が、その使用される投与量および濃度において、投与されている被験体に何ら望ましくない作用も有害な作用も引き起こさないことを意味

50

する。このような薬学的に許容される担体および賦形剤は、当技術分野で周知である (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; および Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000] を参照のこと)。精製された rAd を製剤化して、無菌溶液として投与することが好ましいが、凍結乾燥調製物を利用することも可能である。無菌溶液は、濾過滅菌または当技術分野でそれ自体公知の他の方法により調製される。次いで、その溶液を凍結乾燥するか、または医薬品投与容器に充填する。溶液の pH は、一般には、pH 3.0 ~ 9.5 の範囲、例えば pH 5.0 ~ 7.5 の範囲である。rAd は、典型的には、適切な薬学的に許容可能な緩衝剤を含む溶液中にあり、rAd のその溶液は塩を含有することもある。任意選択で、アルブミンなどの安定化剤を存在させることもある。特定の実施形態では、界面活性剤を添加する。特定の実施形態では、rAd は注射可能な調製物に製剤化することができる。これらの製剤は、有効量の rAd を含有し、無菌の溶液、懸濁液、または凍結乾燥形態のいずれかであって、任意選択で安定剤または賦形剤を含有する。アデノウイルスワクチンはまた、鼻腔内投与のためにエアゾル化することができる (例えば、国際公開第 2009/117134 号パンフレットを参照のこと)。

【0077】

例えば、アデノウイルスは、Adenovirus World Standard (Hoganson et al, Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing March 2002, p. 43 - 48) にも使用される緩衝液: 20 mM Tris pH 8、25 mM NaCl、2.5 % グリセロール中に保存することができる。ヒトへの投与に適した別の有用な製剤用緩衝液は、20 mM Tris、2 mM MgCl₂、25 mM NaCl、スクロース 10 % w/v、ポリソルベート 80 0.02 % w/v である。言うまでもなく、他の多くの緩衝液を使用することができ、精製された (アデノ) ウイルス調製物の保存および医薬投与に適した製剤のいくつかの例は、例えば、欧州特許第 0853660 号明細書、米国特許第 6,225,289 号明細書、および国際特許出願である国際公開第 99/41416 号パンフレット、国際公開第 99/12568 号パンフレット、国際公開第 00/29024 号パンフレット、国際公開第 01/66137 号パンフレット、国際公開第 03/049763 号パンフレット、国際公開第 03/078592 号パンフレット、国際公開第 03/061708 号パンフレットに見つけることができる。

【0078】

特定の実施形態では、アデノウイルスを含む組成物は 1 つまたは複数のアジュバントをさらに含む。アジュバントは、適用された抗原決定基への免疫応答をさらに増強することが、当技術分野では公知であり、アデノウイルスおよび適切なアジュバントを含む医薬組成物が、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2007/110409 号パンフレットに開示されている。「アジュバント」および「免疫刺激薬」という用語は、本明細書において互換的に使用され、免疫系の刺激の原因となる、1 つまたは複数の物質として定義される。本発明との関連において、アジュバントは本発明のアデノウイルスベクターに対する免疫応答を増強するために使用される。適切なアジュバントの例としては、水酸化アルミニウムおよび/またはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩; 油-エマルジョン組成物 (または水中油型組成物)、例えば、MF59 などのスクアレン-水エマルジョン (例えば、国際公開第 90/14837 号パンフレットを参照のこと); サポニン製剤、例えば QS21 および免疫刺激複合体 (ISCOMS) など (例えば、米国

特許第5,057,540号明細書；国際公開第90/03184号パンフレット、国際公開第96/11711号パンフレット、国際公開第2004/004762号パンフレット、国際公開第2005/002620号パンフレットを参照のこと）；細菌または微生物の派生物（この例には、モノホスホリルリピドA（MPL）、3-O-脱アシル化MPL（3dMPL）、CpG-モチーフ含有オリゴヌクレオチド、ADP-リボシル化細菌毒素またはその突然変異体、例えば大腸菌（*E. coli*）易熱性エンテロトキシンLT、コレラ毒素CT等がある）、が挙げられる。また、例えば、C4-結合タンパク質（C4bp）のオリゴマー化ドメインと目的の抗原との融合物をコードする異種核酸を使用することにより、ベクターにコードされたアジュバントを使用することも可能である（例えば、Solabomiet al, 2008, Infect Immun 76: 3817-23）。特定の実施形態では、本発明の組成物は、アジュバントとしてアルミニウムを、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸アルミニウムカリウム、またはそれらの組合せの形態で、用量当たり0.05~5mg、例えば0.075~1.0mgのアルミニウム含有濃度で含む。

【0079】

他の実施形態では、組成物はアジュバントを含まない。

【0080】

本発明によるワクチンと組み合わせて、さらなる活性成分を投与することも、本発明によれば可能である。そのようなさらなる活性成分は、例えば、他のRSV抗原またはそれらをコードする核酸を含むベクターを含むことができる。そのようなベクターは、非アデノウイルス性であってもアデノウイルス性であってもよく、後者は任意の血清型であってもよい。他のRSV抗原の例には、RSVGタンパク質またはその免疫学的に活性な部分が含まれる。例えば、G糖タンパク質の可溶性コアドメイン（アミノ酸130~230）を発現する、鼻腔内に適用される組換え複製欠損Ad5ベースのアデノベクターrAd/3xGは、マウスモデルにおいて防御的であり（Yuet al, 2008, J Virol 82: 2350-2357）、筋肉内に適用された場合には、それは防御的でないが、RSVGが防御応答の誘導に適した抗原であることはこれらのデータから明らかである。さらなる活性成分はまた、例えばウイルス、細菌、寄生生物などの他の病原体に由来する非RSV抗原を含むことができる。さらなる活性成分の投与は、例えば、別個の投与によって行われても、本発明のワクチンとさらなる活性成分の配合剤を投与することによって行われてもよい。特定の実施形態では、さらなる非アデノウイルス抗原を（RSV-Fに加えて）、本発明のベクターにコードすることができる。特定の実施形態では、したがって、2つ以上のタンパク質を単一アデノウイルスから発現させることが望ましい場合があり、そのような場合には、より多くのコード配列を、例えば、単一発現カセットから単一転写物を形成させようとして連結してもよく、またはアデノウイルスゲノムの異なる部分にクローニングして、2つの別個の発現カセット中に存在させてもよい。

【0081】

アデノウイルス組成物は、被験体、例えばヒト被験体に投与することができる。1回の投与の間に被験体に与えられるアデノウイルスの総用量は、当業者に公知であるように、変動し得るものであり、一般には、 1×10^7 ウイルス粒子（vp）~ 1×10^{12} vpの間、好ましくは 1×10^8 vp ~ 1×10^{11} vpの間、例えば 3×10^8 ~ 5×10^{10} vpの間、例えば 10^9 ~ 3×10^{10} vpの間である。

【0082】

アデノウイルス組成物の投与は、標準投与経路を使用して実施することができる。非限定的実施形態としては、注射、例えば皮内、筋肉内等、または皮下投与、経皮投与、または粘膜投与、例えば鼻腔内、口腔内等によるものなど、非経口投与が挙げられる。鼻腔内投与は、一般に、RSVに対するワクチンの好ましい経路と見なされている。生鼻腔内法の最も重要な利点は、局所呼吸器免疫の直接刺激および付随する疾患増強の欠如である。小児用法のために臨床評価中の唯一のワクチンは、現時点では、生鼻腔内ワクチンである（Collins and Murphy. Vaccines against hum

10

20

30

40

50

an respiratory syncytial virus) . 於: Perspectives in Medical Virology 14: Respiratory Syncytial Virus (Ed. Cane, P.), Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp 233 - 277)。鼻腔内投与は、本発明によれば同様に適切な好ましい経路である。しかしながら、本発明によれば、ワクチンを筋肉内投与することが特に好ましい。というのは、驚くべきことに、他のアデノウイルス血清型に基づく、以前に報告された筋肉内RSVワクチンと異なり、本発明によるワクチンを筋肉内投与すると、コットンラットの鼻および肺におけるRSV複製が防止されることが見出されたからである。筋肉内投与の利点は、それが簡単でかつ確立されており、6ヶ月未満の幼児における鼻腔内適用に関する安全性の懸念を伴わないことである。一実施形態では、組成物は筋肉内注射により、例えば、腕の三角筋または腿の外側股筋に投与される。当業者は、組成物、例えばワクチンを、ワクチン中の抗原に対して免疫応答を誘導するように投与するための種々の実行可能な手段を知っている。

10

【0083】

本明細書で使用する被験体は、好ましくは哺乳動物、例えば、マウス、コットンラットなどのげっ歯類、または非ヒト霊長類、またはヒトである。好ましくは、被験体はヒト被験体である。被験体は、例えば約1ヶ月齢～100歳、例えば約2ヶ月齢～約80歳、例えば約1ヶ月齢～約3歳、約3歳～約50歳、約50歳～約75歳など、いかなる年齢であつてもよい。

【0084】

20

また、本発明の1つまたは複数のアデノウイルスワクチンを1回または複数回追加免疫投与することも可能である。追加免疫ワクチン接種を実施する場合、典型的には、そのような追加免疫ワクチン接種は、最初に被験体に組成物を投与した後（このような場合には、「初回ワクチン接種」と呼ばれる）、1週～1年の間、好ましくは2週～4ヶ月の間の時期に同じ被験体に投与することになる。代替の追加免疫レジメンでは、異なるベクター、例えば、異なる血清型の1つもしくは複数のアデノウイルス、またはMVAなどの他のベクター、またはDNA、またはタンパク質を、初回ワクチン接種の後に、被験体に投与することも可能である。例えば、本発明による組換えアデノウイルスベクターを初回免疫として被験体に投与し、かつRSV Fタンパク質を含む組成物により追加免疫を行うことが可能である。

30

【0085】

特定の実施形態では、投与は初回免疫および少なくとも1回の追加免疫投与を含む。これに関する特定の実施形態では、初回免疫投与は、本発明によるRSV Fタンパク質コードする核酸を含むrAd35（「rAd35-RSV.F」）によるものであり、追加免疫投与は、RSV Fタンパク質をコードする核酸を含むrAd26（「rAd26-RSV.F」）によるものである。これに関する他の実施形態では、初回免疫投与はrAd26-RSV.Fによるものであり、追加免疫投与はrAd35-RSV.Fによるものである。他の実施形態では、初回免疫投与および追加免疫投与は両方とも、rAd35-RSV.Fによるものである。特定の実施形態では、初回免疫投与はrAd35-RSV.Fによるものであり、追加免疫投与はRSV Fタンパク質によるものである。これらのすべての実施形態において、同じまたは他のベクターもしくはタンパク質による、さらなる追加免疫投与を行うことが可能である。RSV Fタンパク質による追加免疫が特に有益となり得る実施形態には、例えば、50歳以上のリスク群（例えば、COPDまたは喘息に罹患）の高齢被験体、または例えば60歳以上または65歳以上の健常被験体が含まれる。

40

【0086】

特定の実施形態では、投与は、本発明による組換えアデノウイルスの単回投与を含み、さらなる（追加免疫）投与は行わない。そのような実施形態は、初回免疫-追加免疫レジメンに比較して、単回投与レジメンで複雑さおよび費用が軽減されることを考慮すると、有利である。本明細書の実施例のコットンラットモデルにおいて、追加免疫投与を行わな

50

くても、本発明の組換えアデノウイルスベクターを単回投与した後に、防御が完全になされることがすでに観察されている。

【0087】

本発明を、以下の実施例においてさらに詳細に説明する。実施例は、本発明を何ら限定するものではない。実施例は、本発明を単に明確にするためのものである。

【実施例】

【0088】

実施例1．アデノウイルスベクターの調製

Ad35およびAd26のE1領域へのRSV F遺伝子のクローニング：

A2株の天然RSV融合(F)タンパク質をコードするRSV.F(A2)nat遺伝子(Genbank AC083301.1)は、ヒト発現のために最適化された遺伝子であり、Geneartにより合成された。コザック配列(5'GCCACC'3)を、ATG開始コドンの直前に含め、2つの停止コドン(5'TGA TAA'3)をRSV.F(A2)natコード配列の末端に付加した。RSV.F(A2)nat遺伝子を、HindIIIおよびXbaI部位を介して、pAdApt35BSUプラスミドおよびpAdApt26プラスミドに挿入した。得られたプラスミドのpAdApt35BSU.RSV.F(A2)natおよびpAdApt26.RSV.F(A2)natを、図15に示す。Fタンパク質のアミノ酸配列およびそのアミノ酸配列をコードするコドン最適化配列をそれぞれ、配列番号1および2として表1に示す。

【0089】

細胞培養：

PER.C6細胞(Fallaux et al., 1998, Hum Gene Ther 9:1909-1917)を、10mM MgCl₂を添加した、10%ウシ胎児血清(FBS)含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で維持した。

【0090】

アデノウイルスの生成、感染、および継代：

アデノウイルスはすべて、以前に記載されたように、単一相同組換えによりPER.C6細胞中に生成し、産生させた。(rAd35については：Havenga et al., 2006, J. Gen. Virol. 87:2135-2143; rAd26については：Abbinck et al., 2007, J. Virol. 81:4654-4663)。手短かに言えば、PER.C6細胞に、製造業者(Life Technologies)が提供する説明書に従い、リポフェクタミンを使用して、Adベクタープラスミドをトランスフェクトした。RSV.F(A2)nat導入遺伝子発現カセットを担持するAd35ベクターのレスキューについては、pAdApt35BSU.RSV.F(A2)natプラスミドおよびpWE/Ad35.pIX-rITR.dE3.5orf6コスミドを使用し、一方、RSV.F(A2)nat導入遺伝子発現カセットを担持するAd26ベクターについては、pAdApt26.RSV.F(A2)natプラスミドおよびpWE.Ad26.dE3.5orf6コスミドを使用した。細胞を、完全なCPEの1日後に回収し、凍結融解し、3,000rpmで5分間遠心分離し、-20℃で保存した。次に、ウイルスをブランク精製し、多重ウェル24組織培養プレートの単一ウェル上で培養したPER.C6中で増幅した。さらなる増幅を、T25組織培養フラスコおよびT175組織培養フラスコを使用して培養したPER.C6中で実施した。T175粗溶解物のうちの3~5mlを使用して、70%コンフルエント層のPER.C6細胞を含有する20xT175三層組織培養フラスコに接種した。ウイルスを、2段階CsCl精製法を使用して精製した。最終的に、ウイルスを一定分量に分割して-85℃に保存した。

【0091】

実施例2．組換えアデノウイルス血清型26および35を使用する、in vivoでのRSV Fに対する免疫の誘導

これは、組換えアデノウイルス血清型(Ad26)および組換えアデノウイルス血清型

35 (Ad35) が BALB/c マウスにおいて RSV の糖タンパク質 F 抗原に対する免疫を誘導する能力を検討する実験である。

【0092】

この試験では、5匹マウスの実験群に動物を分配した。完全長の RSV F 遺伝子を担持する Ad26 もしくは Ad35 (Ad26-RSV.F もしくは Ad35-RSV.F) または導入遺伝子を担持しない Ad26 もしくは Ad35 (Ad26e もしくは Ad35e) の単回投与で動物を免疫処置した。10¹⁰ ~ 10⁸ ウイルス粒子 (vp) の範囲にある、rAd の3つの10倍段階希釈を、筋肉内投与した。対照として、空のベクター Ad26e を3匹の動物からなる1群に投与し、空のベクター Ad35e を1群に投与した。

10

【0093】

脾臓中の F タンパク質特異的な IFN 分泌 T 細胞の相対数を決定するために、ELISPOT アッセイを使用し、基本的に、Radosevic et al. (Clin Vaccine Immunol. 2010; 17(11): 1687-94) に記載されるように行った。ELISPOT アッセイにおける脾細胞の刺激については、RSV F (A2) タンパク質の全体配列にかかって、11個のアミノ酸がオーバーラップする15アミノ酸長のペプチドからなる2つのペプチドプールを使用した。10⁶ 細胞当たりのスポット形成単位 (SFU) の数を算出する。

【0094】

抗体価を測定するために、ELISA アッセイを使用した。このために、ELISA プレート (Thermo Scientific) を、25 µg/ml の RSV Long 全体不活化抗原 (Virion Serion、カタログ番号 BA113VS) でコーティングした。希釈した血清試料をプレートに添加し、RSV に対する IgG 抗体を、ビオチン標識抗マウス IgG (DAKO、カタログ番号 E0413) を使用し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (PO) - コンジュゲートストレプトアビジン (SA) による検出を使用して測定した。力価は、50倍希釈ナイーブ血清に由来する1.5 x OD シグナルをカットオフとして使用して、一次補間により算出した。マウス血清における、RSV 特異的な IgG1 および IgG2a 抗体の力価を、PO 標識抗マウス IgG1 および PO 標識抗マウス IgG2a (Southern Biotechnology Associates、カタログ番号 1070-05 および 1080-05) を使用して測定した。これらの抗体はサブクラスを定量するために使用した。

20

30

【0095】

抗体のウイルス中和活性 (VNA) は、マイクロ中和アッセイにより測定し、基本的に、Johnson et al. (J Infect Dis. 1999 Jul; 180(1): 35-40) によって記載されるように行った。RSV 感受性 VERO 細胞を、感染1日前に96ウェル細胞培養プレートに播種した。感染日に、段階希釈した血清および対照を、1200 pfu の RSV (Long または B1) と混合し、37 °C で1時間インキュベートした。続いて、ウイルス/抗体混合物を、VERO 細胞単層を含有する96ウェルプレートに移した。3日後に、単層を80%氷冷アセトンで固定し、RSV 抗原を抗 F モノクローナル抗体により測定した。中和力価は、ウイルスのみの対照ウェルからの OD450 を50%減少させる血清希釈度 (log₂) (IC₅₀) として表す。

40

【0096】

初回免疫後2週目および8週目に、動物を屠殺し、細胞性応答および体液性応答を上記に記載するようにモニターした。

【0097】

図1は、Ad26-RSV.F (図1A) および Ad35-RSV.F (図1B) のすべての用量が良好な細胞性免疫応答を誘導するのに効果的であり、またこの応答が時間を通して安定であったことを示す。Ad26-RSV.F または Ad35-RSV.F のいずれかによる T 細胞応答に対して、ベクター用量による有意差は観察されなかった。

【0098】

50

図2は、上記と同じ実験における抗体価を示す。両方のベクターとも、極めて明確な時間および用量依存的なE L I S A力価の増加を誘導した(図2)。抗F力価は、2週目から8週目にかけて明らかに増加し、 10^{10} 用量の場合には有意であった。8週目には、A d 2 6 - R S V . Fベクター間またはA d 3 5 - R S V . Fベクター間の力価に差はなかった。

【0099】

F特異的I g Gのサブクラス分布(I g G 1対I g G 2 a)を、T h 1対T h 2応答のバランスを評価するために測定した。歪んだT h 2 / T h 1応答は、ホルマリン不活化R S Vで見られるように、R S V疾患のワクチン増強を発現させる素因を動物に与える。図3に示すように、A d 2 6 - R S V . FおよびA d 3 5 - R S V . Fの両方について、I g G 2 a / I g G 1比は1以上である。これにより、アデノベクターA d 2 6 - R S V . FおよびA d 3 5 - R S V . Fは、T h 2タイプの応答よりもT h 1タイプの応答を示すことが強く示される。

【0100】

図4は、抗体価に使用したのと同じ血清のウイルス中和力価(V N A)を示す。A d 2 6 - R S V . Fおよびr A d 3 5 - R S V . Fによる免疫処置により、中和抗体価が誘導された。V N A力価は、 10^{10} v pを投与されたマウスにおいて、初回免疫後2週目から8週目の間に顕著に増加した。8週目では、 10^{10} v pを投与されたマウスにおいて、A d 2 6 - R S V . FベクターとA d 3 5 - R S V . Fベクターとの間に力価の差はなかった。

【0101】

これらの免疫処置実験から、R S V . F導入遺伝子を包含するA d 3 5ベクターおよびA d 2 6ベクターは、R S V . Fに対して強力な細胞性応答および体液性応答を誘導することが明らかである。

【0102】

実施例3 . R S V . Fをコードする組換えアデノウイルスベクターを使用する異種初回免疫 - 追加免疫後のR S V . Fに対する免疫

この試験は、2つの異なる血清型に由来するアデノウイルスベクターに基づく初回免疫 - 追加免疫レジメンがR S V . Fに対する免疫を誘導する能力を検討するように計画した。

【0103】

この試験には、8匹マウスの実験群に分配されたB A L B / cマウスが含まれた。R S V A 2に基づく/由来するR S V . F遺伝子の野生型配列を担持する(A d - R S V . FまたはA d 3 5 - R S V . F)か、または導入遺伝子を担持しない(A d 2 6 eまたはA d 3 5 e) 10^{10} v pによる筋肉内注射によって、動物を免疫処置した。動物の1群は、ある週にA d 2 6 - R S V . Fにより初回免疫し、4週目にA d 3 5 R S V . FまたはA d 3 5 eにより追加免疫した。動物の別の群は、A d 3 5 - R S V . Fにより初回免疫し、4週目にA d 2 6 - R S V . FまたはA d 2 6 eにより追加免疫した。動物の対照群は、A d 3 5 eにより初回免疫し、4週目にA d 2 6 eにより追加免疫した。初回免疫後6週目および12週目の各時点で、8匹の動物を屠殺し、細胞性応答および体液性応答を、当業者に周知され、上記に記載される免疫学的アッセイによりモニターした。

【0104】

図5は、初回免疫処置後6および12週目の細胞性応答を示す。初回免疫後6週目(および追加免疫後2週目)に、T細胞応答に対するA d 2 6 - R S V . FおよびA d 3 5 - R S V . Fの両方による顕著な追加免疫効果が測定され、T細胞応答の大きさは、初回免疫 - 追加免疫における、A d 2 6 - R S V . FまたはA d 3 5 - R S V . Fによる免疫処置の順序には依存しなかった。初回免疫後12週目(および追加免疫後8週目)に、A d 2 6 - R S V . Fで初回免疫されたマウスは、r A d 3 5 - R S V . Fで初回免疫された動物に匹敵して、初回免疫のみおよび初回免疫 - 追加免疫された動物のいずれにおいても、F特異的T細胞のレベルを高く維持していた。全体として、F特異的リンパ球(S F U

10

20

30

40

50

) の数は、r A d 2 6 - R S V . F または r A d 3 5 - R S V . F (初回免疫 / または初回免疫 - 追加免疫) のいずれかで免疫処置されたすべての動物において、少なくとも 1 2 週間高くかつ安定であった。

【 0 1 0 5 】

図 6 は、アデノウイルスベクターによる初回免疫 - 追加免疫ワクチン接種後の種々の時点における体液性応答を示す。A d 3 5 . R S V . F および A d 2 6 . R S V . F は、同等によく抗原刺激し、B 細胞応答に対する、A d 2 6 . R S V . F または r A d 3 5 . R S V . F のいずれかによる顕著な追加免疫効果が誘導されることが示された。さらに、異種初回免疫 - 追加免疫における B 細胞応答の大きさは、A d 3 5 . R S V . F および A d 2 6 . R S V . F による免疫処置の順序には依存せず、追加免疫後、E L I S A 力価は 1 2 週間安定していた。

10

【 0 1 0 6 】

図 7 は、初回免疫 - 追加免疫処置後の種々の時点におけるウイルス中和抗体価を示す。A d 3 5 . R S V . F ベクターおよび A d 2 6 . R S V . F ベクターは両方とも、E L I S A 力価について観察されるように、同等によく抗原刺激した。また、異種初回免疫 - 追加免疫後の V N A 力価の増加は、A d 3 5 . R S V . F および A d 2 6 . R S V . F による免疫処置の順序に依存しなかった。V N A 力価に対する、A d 2 6 . R S V . F または A d 3 5 . R S V . F のいずれかによる追加免疫効果は、いずれの時点でも顕著であり、6 週目ですでに最大であった。A d . R S V . F による初回免疫のみを受けた群は、6 週目に比較して、1 2 週目で V N A 力価が増大していた。アデノウイルスベクター構築物における R S V F 配列は、R S V A 2 分離株に由来するものである。本出願に記載する中和アッセイは、R S V 亜群 A に属する R S V L o n g 株に基づくものであり、F (A 2) により誘導された抗体は、異なる R S V A 株亜型を交差中和可能であることが実証される。

20

【 0 1 0 7 】

R S V F タンパク質は R S V 分離株中によく保存されているので、A d - R S V . F ベクターにより免疫処置された動物に由来する血清が、原型の R S V B 株分離株である R S V B 1 を交差中和することができるか否かを試験した。図 8 に示すように、免疫処置されたマウスの血清は、B 1 株も交差中和することができた。R S V B 1 を交差中和する能力は、初回免疫のみの群で使用されたベクターにも、A d 2 6 . R S V . F ベクターおよび A d 3 5 . R S V . F ベクターによる初回免疫 - 追加免疫処置の順序にも依存しなかった。

30

【 0 1 0 8 】

まとめると、これらのデータから、初回免疫 - 追加免疫レジメンでは、A d 2 6 . R S V . F および A d 3 5 . R S V . F による免疫処置を逐次的に行うと、強力な体液性応答および細胞性応答が誘導されること、またこの体液性免疫応答には R S V A および B 型の両方の分離株を中和する能力が含まれることがわかる。

【 0 1 0 9 】

実施例 4 . コットンラットモデルにおける、i n v i v o での組換えアデノウイルスベクターを使用する、R S V 感染に対する防御の誘導

40

この実験は、2 つの異なる血清型に由来するアデノウイルスに基づく初回免疫 - 追加免疫レジメンが、コットンラットにおいて、R S V チャレンジ複製に対する防御を誘導する能力を検討するために行った。コットンラット (S i g m o d o n h i s p i d u s) は、R S V による上気道および下気道の感染を両方とも受けやすく、マウス系統よりも少なくとも 5 0 倍許容性があることが見出されていた (N i e w i e s k e t a l , 2 0 0 2 , L a b . A n i m . 3 6 (4) : 3 5 7 - 7 2) 。さらに、コットンラットは、R S V 候補ワクチン、抗ウイルス薬、および抗体の効力および安全性を評価する主要なモデルになっている。コットンラットモデルにおいて作成された前臨床データにより、2 つの抗体製剤 (R e s p i G a m (登録商標) および S y n a g i s (登録商標)) の開発が、非ヒト霊長類における中間試験を必要とすることなく、臨床試験に進んだ。

50

【0110】

この試験では、8匹コットンラットの実験群それぞれにコットンラットを登録した。完全長のRSV F (A2) 遺伝子を担持する (Ad26・RSV・FまたはAd35・RSV・F) か、または導入遺伝子を担持しない (Ad26eまたはAd35e) アデノウイルスベクターを 10^9 ウイルス粒子 (vp) または 10^{10} vp 筋肉内注射することにより、動物を免疫処置した。28日後に、同じベクター (同種初回免疫 - 追加免疫) または他のアデノウイルス血清型 (異種初回免疫 - 追加免疫) のいずれかによって、同じvp用量で動物を追加免疫し; 対照群は、1用量 (10^{10}) のみを適用したこと以外は準じて、Ad-eベクターにより免疫処置した。対照群は6匹の動物からなった。RSVウイルスによる一次感染が、二次チャレンジ複製を防御することが知られているので、RSV A2 (10^4 プラーク形成単位 (pfu)) を鼻腔内に感染させた動物を、チャレンジ複製に対する防御の陽性対照として使用した (Prince・Lab Invest 1999, 79: 1385-1392)。さらに、ホルマリン不活化RSV (FI-RSV) を、組織病理学的疾患のワクチン増強に対する対照とした。2回目の免疫処置 (追加免疫) の3週間後に、コットンラットに、プラーク精製された 1×10^5 pfuのRSV A2を鼻腔内チャレンジした。対照として、コットンラットの1群では、免疫処置は行わないが、チャレンジウイルスは投与し、別の対照群では、免疫処置もチャレンジも行わなかった。RSVチャレンジウイルスの力価がピークに達する時点である感染後5日目に (Prince・Lab Invest 1999, 79: 1385-1392)、コットンラットを屠殺し、肺および鼻のRSV力価をウイルスプラーク力価測定により決定した (Prince et al. 1978, Am J Pathology 93, 711-791)。

【0111】

図9は、肺および鼻において高いRSVウイルス力価、それぞれ $5.3 \pm 0.13 \log_{10}$ pfu / グラムおよび $5.4 \pm 0.35 \log_{10}$ pfuが、非免疫処置対照および導入遺伝子のないアデノウイルスベクターを投与された動物で観察されたことを示す。これに対して、Ad26・RSV・Fベクターおよび/またはAd35・RSV・Fベクターによる初回免疫 - 追加免疫処置を受けた動物からの肺および鼻の組織には、用量にもレジメンにも依存することなく、チャレンジウイルスを検出することができなかった。

【0112】

これらのデータから、Ad35ベースのベクターおよびAd26ベースのベクターが、コットンラットモデルにおいて、RSVチャレンジ複製に対して完全な防御を与えることが明確に実証される。これは驚くべきことである。というのは、RSV FをコードするAd5ベースのアデノウイルスベクターは、筋肉内投与後に動物モデルにおいて完全な防御を誘導することができないことが知られているからである。

【0113】

実験の過程において、血液試料を、免疫処置前 (0日目)、追加免疫処置前 (28日目)、チャレンジ日 (49日目)、および屠殺日 (54日目) に採取した。Prince (Prince et al. 1978, Am J Pathology 93, 711-791) により記載されるように、全身性RSV特異的中和抗体の誘導に関する、プラークアッセイベースの中和アッセイ (VNA) で、血清を試験した。中和力価は、ウイルスのみの対照ウェルからのものと比較して、プラークを50%減少させる血清希釈度 (\log_2) として表す。

【0114】

図10は、対照動物が28日目および49日目にウイルス中和抗体を有していないこと、一方Ad26・RSV・FベクターまたはAd35・RSV・Fベクターにより動物が初回免疫された後、高いVNA力価が誘導されることを示す。VNA力価の穏やかな増加が追加免疫処置後に観察される。RSV A2ウイルスによる一次感染では、時間につれて徐々に増加するかなり穏やかなVNA力価がもたらされた。

【0115】

Ad26・RSV・FワクチンまたはAd35・RSV・FワクチンがRSV A2によるチャレンジ後に、疾患を悪化させる可能性があるか否かを評価するために、肺の組織病理学的分析を感染後5日目に実施した。肺を摘出し、ホルマリンで灌流し、切片化し、組織学的検査のためにヘマトキシリン・エオジンで染色した。組織病理学スコアは、Prince (Prince et al. Lab Invest 1999, 79: 1385 - 1392) により公開された基準に従って、盲検化して評価し、以下のパラメーター：細気管支周囲炎、血管周囲炎、間質性肺炎、および肺炎についてスコア化した。図11は、この実験の肺病理のスコアリングを示す。RSVチャレンジの後、FI-RSVで免疫処置された動物は、mockで免疫処置されチャレンジされた動物と比較して、検査したすべての組織病理学的パラメーターに関して、組織病理の亢進を示した。これは以前に公開された研究 (Prince et al. Lab Invest 1999, 79: 1385 - 1392) に基づくと予測されることであった。Ad26・RSV・FおよびAd35・RSV・Fで免疫処置された動物の組織病理学的スコアは、rAd-eまたはmockで免疫処置された動物と比較して、同様であったが、rAd-RSV・Fで免疫処置された動物の血管周囲炎はわずかに低いように見えた。したがって、Ad26・RSV・FワクチンおよびAd35・RSV・Fワクチンは、FI-RSVワクチンと異なり、疾患の増強をもたらさなかった。

10

【0116】

すべてのワクチン接種法は、RSVチャレンジ複製に対して完全な防御をもたらし、強力なウイルス中和抗体を誘導し、しかも病理の増強は観察されなかった。

20

【0117】

実施例5．単回免疫処置後における、種々の投与経路を使用するrAdベクターの防御効果

この試験は、RSV・FをコードするAd26ベクターまたはAd35ベクターにより誘導される防御効果に対する投与経路の影響を検討するものである。ワクチンは、筋肉内または鼻腔内に投与した。

【0118】

導入遺伝子としてRSV・Fを担持する(Ad26・RSV・FまたはAd35・RSV・F)か、または導入遺伝子を担持しない(Ad26-eまたはAd35-e) Ad26またはAd35の 1×10^9 または 1×10^{10} ウイルス粒子(vp)により0日目に単回免疫処置を受けたコottonラットを、49日目に 10^5 RSV pfuでチャレンジし、54日目に屠殺した。

30

【0119】

図12は、肺および鼻のチャレンジウイルスを測定した実験結果を示す。免疫処置されなかったか、または導入遺伝子を含まないアデノウイルスで免疫処置されたラットからの肺および鼻に、それぞれ $4.9 \pm 0.22 \log_{10}$ pfu/グラムおよび $5.4 \pm 0.16 \log_{10}$ pfuの高いRSVウイルス力価を検出した。これに対して、Ad35 RSV・FまたはAd26-RSV・Fのいずれかを投与された動物からの肺および鼻では、投与経路および用量に依存することなく、チャレンジウイルスの複製はなかった。

40

【0120】

これらのデータから、驚くべきことに、RSV・Fタンパク質をコードするAd26ベースのベクターおよびAd35ベースのベクターのそれぞれが、ベクターの投与経路に依存することなく、コottonラットチャレンジ実験において、完全な防御を与えることが実証される。このことは、他の血清型に基づいた、公開されたアデノウイルスベースのRSVワクチンの中で、筋肉内ワクチン接種後に完全な防御が実証されたものはないので、予測されることではなかった。

【0121】

この実験期間中、免疫処置前(0日目)、免疫処置後4週目(28日目)、およびチャ

50

レンジ日（４９日目）に血液試料を採取した。この血清を、ＲＳＶ特異的抗体の誘導に関する中和テストで試験した（図１３）。免疫処置前には、ウイルス中和抗体はいずれのコットンラットにも検出されなかった。すべてのアデノウイルスベクター免疫処置法により、投与経路に依存することなく、高いＶＮＡ力価が明らかに誘導され、時間を通して安定に存在した。これらのデータから、驚くべきことに、ＲＳＶ Ｆタンパク質をコードするＡｄ２６ベースのベクターおよびＡｄ３５ベースのベクターのそれぞれが、ベクターの投与経路に依存することなく、コットンラット免疫処置実験において、ウイルス中和抗体の高い力価を与えることが実証される。

【０１２２】

Ａｄ２６・ＲＳＶ・ＦワクチンまたはＡｄ３５・ＲＳＶ・Ｆワクチンの単回免疫処置により、ＲＳＶ Ａ２によるチャレンジ後に、ワクチンが疾患を増強させる可能性があるかを評価するために、肺の組織病理学的分析を感染後５日目に実施した（図１４）。上記の初回免疫・追加免疫処置実験で観察されたように、ｒＡｄ２６・ＲＳＶ・ＦまたはｒＡｄ３５・ＲＳＶ・Ｆによる単回免疫処置では、ｒＡｄ－ｅまたはｍｏｃｋで免疫処置された動物に比較して、ｒＡｄ２６・ＲＳＶ・ＦまたはｒＡｄ３５・ＲＳＶ・Ｆで免疫処置された動物に同様の免疫病理学的スコアがもたらされた。明らかに、ＦＩ－ＲＳＶで初回免疫された動物とは対照的に、疾患の悪化は観察されなかった。ｒＡｄベクターで免疫処置された動物の組織病理学的スコアは、ｍｏｃｋ感染動物と同等であった。

【０１２３】

結論として、すべての単回投与ワクチン接種法が、ＲＳＶチャレンジ複製に対する完全な防御をもたらし、強力なウイルス中和抗体を誘導し、しかも病理の増強を示さなかった。

【０１２４】

実施例６・ＲＳＶ Ｆの断片などの変種を含むベクター、または代替プロモーターを含むベクターが、同様の免疫原性を示す

上記の実施例は、野生型ＲＳＶ Ｆを発現するベクターによって行われたものである。他のＦの短縮形態または修飾形態をｒＡｄ３５中に構築し、アデノウイルスベクター中にＲＳＶ Ｆの断片がある実施形態を提供する。これらのＦの短縮形態または修飾形態には、細胞質ドメインおよび細胞膜貫通領域が欠損している（すなわち、外部ドメイン断片のみが残存している）ＲＳＶ－Ｆの短縮形態、ならびに細胞質ドメインおよび細胞膜貫通領域の短縮と、外部ドメイン中のさらなる内部欠失と、三量体形成ドメインの付加とを含むＲＳＶ－Ｆの断片形態が含まれる。これらのベクターは、完全長のＦタンパク質を含むｒＡｄ３５・ＲＳＶ・Ｆを超えて応答を改善することはなかった。

【０１２５】

加えて、野生型ＲＳＶ Ｆの発現を駆動する種々の代替プロモーターを含む他のｒＡｄ３５ベクターを構築した。

【０１２６】

ＲＳＶ・Ｆの修飾形態およびプロモーター変種の免疫原性をマウスモデルで比較し、野生型Ｆを発現するＡｄ３５・ＲＳＶ・Ｆと比較した。これらのＦ変種またはプロモーター変種を包含するすべてのＡｄ３５ベクターは、Ａｄ３５・ＲＳＶ・Ｆと同じ桁の大きさの応答を示した。

【０１２７】

実施例７・コットンラットモデルにおける、*in vivo*での組換えアデノウイルスベクター免疫処置後の、ＲＳＶ感染に対する短期間防御

この実験は、コットンラットモデルにおいて、ＲＳＶ－Ｆタンパク質を発現するアデノウイルスベクターによる防御が迅速に開始する可能性を判定するものである。この目的のために、完全長のＲＳＶ Ｆ（Ａ２）遺伝子を担持する（Ａｄ３５・ＲＳＶ・Ｆ）か、導入遺伝子を担持しない（Ａｄ２６－ｅ）アデノウイルスベクターを 10^7 、 10^8 、または 10^9 ウイルス粒子（*vp*）で単回筋肉内注射することにより、０日目または２１日目に、８匹コットンラットの実験群それぞれのコットンラットを免疫処置した。ＲＳＶウイル

スによる一次感染が、二次的なチャレンジ複製を防御することが知られているので、RSV A2 (10^4 プラーク形成単位 (p f u)) を鼻腔内に感染させた動物を、チャレンジ複製に対する防御の陽性対照として使用した (Prince, Lab Invest 1999, 79: 1385-1392)。免疫処置後49日目、7週目、または4週目に、コットンラットに、プラーク精製された 1×10^5 p f u の RSV A を鼻腔内チャレンジした。RSV チャレンジウイルスの力価がピークに達する時点である感染後5日目に、コットンラットを屠殺し (Prince, Lab Invest 1999, 79: 1385-1392)、肺および鼻の RSV 力価をウイルスプラーク力価測定により決定した (Prince et al., 1978, Am J Pathology 93, 711-791)。図16は、肺および鼻において高い RSV ウイルス力価、それぞれ $4.8 \pm 0.11 \log_{10}$ p f u / グラムおよび $5.1 \pm 0.32 \log_{10}$ p f u / g が、導入遺伝子のないアデノウイルスベクターを投与された動物で観察されたことを示す。これに対して、高用量 (10^9 v p) の Ad35, RSV, F ベクターによる免疫処置を受けたすべての動物において、肺および鼻における RSV 力価が、免疫処置後7週目に完全に防御され、免疫処置後4週目にほぼ完全に防御された。低用量の Ad35, RSV, F ベクターでは、免疫処置後4および7週目に、肺の RSV 力価が完全に防御され、鼻の力価が部分的に防御された。血液試料をチャレンジ日 (49日目) に採取した。この血清を、RSV 特異的抗体の誘導に関する中和テストで試験した (図17)。Ad ベクターによる免疫処置は、用量依存的な VNA 力価を誘導した。図18は、対照動物が実験期間中にウイルス中和抗体を有していないこと、一方、 $10^7 \sim 10^9$ Ad35, RSV, F v p による免疫処置後28日目または49日目に、動物に高い VNA 力価が誘導されることを示す。免疫処置前には、ウイルス中和抗体はいずれのコットンラットにも検出されなかった。アデノウイルスベクターによる免疫処置によって、一次 i. n. RSV 感染により生成した中和力価より高いかまたはそれと同等の用量依存的な VNA 力価が誘導された。この実験から、RSV - F を発現する Ad35 による、チャレンジウイルス複製に対する防御が迅速に開始されることが明確に示される。

【0128】

実施例8. コットンラットモデルにおける、i n v i v o での組換えアデノウイルスベクター免疫処置後の、RSV 亜群Aおよび亜群B感染に対する防御

RSV 株は、2つの亜群、すなわちA亜群およびB亜群に分けることができる。この亜群分類は、高度に可変なG糖タンパク質の抗原性の差に基づいている。Fタンパク質の配列は、高度に保存されているが、同様に、同じA亜群およびB亜群に分類することができる。特許出願第0200EO P O O 号明細書では、Ad - RSV, F ベクターで免疫処置されたマウスの血清が、i n v i t r o においてB1株も交差中和できることが記載された。図19は、Ad35, RSV - F_{A2} で免疫処置されたコットンラットに由来するコットンラット血清が、免疫処置後49日目に、RSV Long (亜群A) および B wash (亜群B, ATCC # 1540) に対して高い VNA 力価を示すことを明確に示す。亜群AまたはBチャレンジのいずれかに対する i n v i v o 防御を、 10^7 および 10^8 v p の低用量アデノウイルスを使用して、コットンラットで測定した。この目的のために、コットンラットを、8匹コットンラットの実験群それぞれに分配した。完全長の RSV F (A2) 遺伝子を担持する (Ad35, RSV, F) か、または導入遺伝子を担持しない (Ad26e) アデノウイルスベクターを 10^7 または 10^8 ウイルス粒子 (v p) で筋肉内注射することにより、0日目に動物を免疫処置した。RSV A2 (10^4 プラーク形成単位 (p f u)) により鼻腔内感染させた動物を、チャレンジ複製に対する防御の陽性対照として使用した。49日目に、 10^5 p f u の RSV - A2、RSV - A 亜群または RSV - B 15/97、RSV - B 株のいずれかで、動物に i. n. チャレンジした。

【0129】

図20は、肺において高い RSV ウイルス力価が、導入遺伝子を含まないアデノウイルスベクターを投与された動物で観察されたことを示す。これに対して、Ad35, RSV

10

20

30

40

50

、Fベクターによる免疫処置を受けた動物からの肺および鼻組織には、チャレンジウイルスを検出することができなかった。RSV-A2またはRSV-B 15/97のいずれかでチャレンジされた場合、防御に関する差は観察されなかった。Ad35・RSV・F_{A2}は、 10^7 および 10^8 vpにおいて肺チャレンジ複製に対して完全な防御を示した。図21は、鼻において高いRSVウイルス力価が、導入遺伝子を含まないアデノウイルスベクターを投与された動物で観察されたことを示す。Ad35・RSV・F_{A2}は、 10^8 vpにおいて鼻チャレンジウイルス複製に対して部分的な防御を示した。RSV-A2またはRSV-B 15/97のいずれかでチャレンジされた場合、防御に関する差は観察されなかった。実験期間中、血液試料を28日目およびチャレンジ日(49日目)に採取した。この血清を、RSV特異的抗体の誘導に関する中和テストで試験した。図22は、実験経過中のウイルス中和力価を示し、対照動物が実験期間中にウイルス中和抗体を有していないことを示す。 10^8 または 10^7 Ad35・RSV・F_{vp}による免疫処置後28日目に、高いVNA力価が動物に誘導されている。

【0130】

実施例9．コットンラットモデルにおける、in vivoでの組換えアデノウイルスベクター免疫処置後の、RSV-A2の高チャレンジ用量に対する防御

この実施例では、 1×10^5 pfu RSV-A2の標準用量に比較して、 5×10^5 pfuの高チャレンジ用量に対する防御について判定する。この試験では、8匹コットンラットの実験群それぞれにコットンラットを登録した。完全長のRSV F(A2)遺伝子を担持する(Ad35・RSV・F)か、または導入遺伝子を担持しない(Ad26e)アデノウイルスベクターを、 10^7 または 10^8 ウイルス粒子(vp)の低用量で筋肉内注射することにより、0日目に動物を免疫処置した。RSV A2(10^4 プラーク形成単位(pfu))により鼻腔内感染させた動物を、チャレンジ複製に対する防御の陽性対照として使用した。コットンラットを感染後5日目に屠殺し、肺および鼻のRSV力価をウイルスプラーク力価測定により決定した。図23は、標準チャレンジ用量に比較して、より高いチャレンジ用量により、導入遺伝子を含まないアデノウイルスベクターを投与された動物において、より高い肺ウイルス負荷が誘導されることを示す。 10^8 vpのAd35・RSV・Fベクターによる免疫処置を受けた動物では、肺において、標準RSVチャレンジ力価および高RSVチャレンジ力価に対する防御が完全であった。図24は、 10^8 または 10^7 vpのAd35・RSV・Fベクターにより免疫処置を受けた動物では、鼻において、標準RSVチャレンジ力価および高RSVチャレンジ力価に対する防御が部分的であったことを示す。

【0131】

実施例10．Ad26・RSV・F初回免疫が組換えFタンパク質により追加免疫されると、マウスモデルにおいてTh1に歪んだ応答がもたらされる

この実施例では、Ad26・RSV・F初回免疫に対する免疫応答が、アジュバント組換えRSV Fタンパク質による追加免疫によって増強され得るか否かを検討した。この目的のために、マウスを、7匹マウスの実験群それぞれに分配した。完全長のRSV F(A2)遺伝子を担持する、 10^{10} ウイルス粒子(vp)アデノウイルスベクター(Ad26・RSV・F)またはPBSを筋肉内注射することにより、0日目に動物を免疫処置した。28日目に、同じ用量の同じベクター、またはアジュバントRSV Fタンパク質(完全長; 融合後構造: post-F)(2用量: $5 \mu\text{g}$ および $0.5 \mu\text{g}$)のいずれかで、動物をi.m.追加免疫した。図25は、Ad26・RSV F_{A2}で免疫処置され、アジュバントRSV Fで追加免疫されたマウスからの血清が、免疫処置後12週目に、RSV-A Long(亜群A)に対して高いVNA力価を示すことを明確に示す。図26は、Ad26・RSV F_{A2}で免疫処置され、アジュバントRSV Fタンパク質で追加免疫されたマウスの血清のIgG2a/IgG1比を示す。高い比は、Th1バランス応答を表し、一方低い比は、Th2に歪んだ応答を示す。明らかに、Ad26・RSV・Fで免疫処置された動物では、Ad26・RSV・FまたはRSV Fタンパク質のいずれかで追加免疫されると、高いIgG2a/IgG1比がもたらされるが、FI-RS

VまたはRSV Fタンパク質で免疫処置された対照マウス（アデノウイルスベクターとの関連においてではない）では、低い比が誘導される。チャレンジの際の疾患の増強を回避するために、RSVワクチンでは、Th1に歪んだ応答が強く所望されるので、Ad26・RSV・F初回免疫を適用する場合、タンパク質免疫処置によるTh2に歪んだ応答を、Th1応答の方に向けることができる。図27は、Ad26・RSV F_{A2}で免疫処置され、アジュバントRSV Fタンパク質で追加免疫されたマウスに由来する脾臓の細胞性応答を示す。アジュバントRSV Fタンパク質で追加免疫すると、細胞性応答も同様に強力に亢進されることが明確に観察することができる。上記の実施例に記載された初期の実験に基づくと、Ad26をAd35に置き換えても同様な結果が得られると予測される。

10

【0132】

表1. 配列

配列番号1: RSV融合タンパク質 (Genbank AC083301.1) アミノ酸配列:

【化1】

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVI
 TIELSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRF
 MNYTLNNAKKTNTVTLKKRKRRLGFLLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNKIKSAL
 LSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNN
 RLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS
 YSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDGRWY
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSK
 TDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTL
 YYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
 HNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI
 AFSN

20

配列番号2: RSV融合タンパク質をコードする、コドン最適化RSV・F(A2)n
 at遺伝子

【化 2】

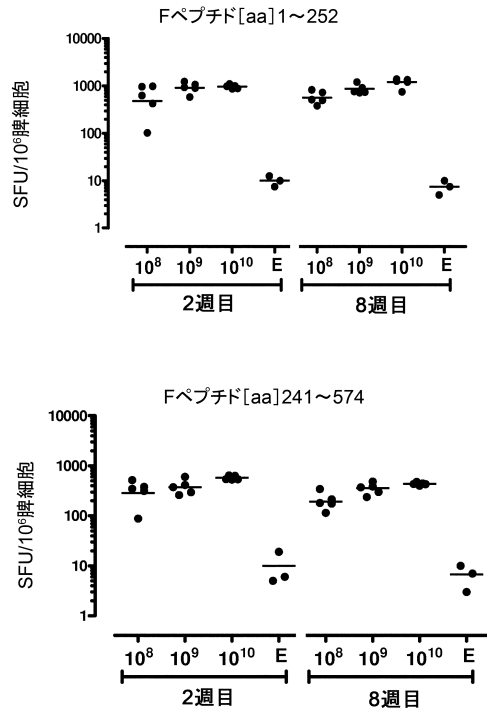
ATGGAAC T GCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACC
TTCTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGC
GCCGTGTCCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGCGGACCGGCTGGTACACCAGCGTGATC
ACCATCGAGCTGAGCAACATCAAAAAGAACAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAAATC
AAGCTGATCAAGCAGGAAC TGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTG
CTGATGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGACGGGAGCTGCCCCGGTTC
ATGAACTACACCCTGAACAACGCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGG
AAGCGGCGGTTTCTGGGCTTCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATTGCTAGCGGAGTG
GCTGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAAGTCCGCCCTG
CTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGC
AAGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAG
CAGAGCTGCAGCATCAGCAACATCGAGACAGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAAC
CGGCTGCTGGAATCACC CGGAGTT CAGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCCGTG
TCCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATC
ACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCGGCAGCAGAGC
TACTCCATCATGTCCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCC
CTGTACGGCGTGATCGACACCCCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACC
ACCAACACCAAAGAGGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGGACCGACCGGGGCTGGTAC
TGCGATAATGCCGGCAGCGTGT CATTCTTTCCACAAGCCGAGACATGCAAGGTGCAG
AGCAACCGGGTGTTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCAGCGAGGTGAAC
CTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAG
ACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTGTCTCTGCTACGGC
AAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAAC
GGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGCGTGGACACCGTGTCCGTGGGCAACACCCTG
TACTACGTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATC
AACTTCTACGACCCCCTGGTGTTC CCCCAGCGACGAGTT CGACGCCAGCATCAGCCAG
GTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTG
CACAATGTGAATGCCGTGAAGTCCACCACCAATATCATGATCACCACAATCATCATC
GTGATCATCGTCATCCTGCTGTCCCTGATCGCCGTGGGCCTGCTGCTGTACTGCAAG
GCCCCGTCCACCCCCTGTGACCCTGTCCAAGGACCAGCTGAGCGGCATCAACAATATC
GCCTTCTCCAAC

10

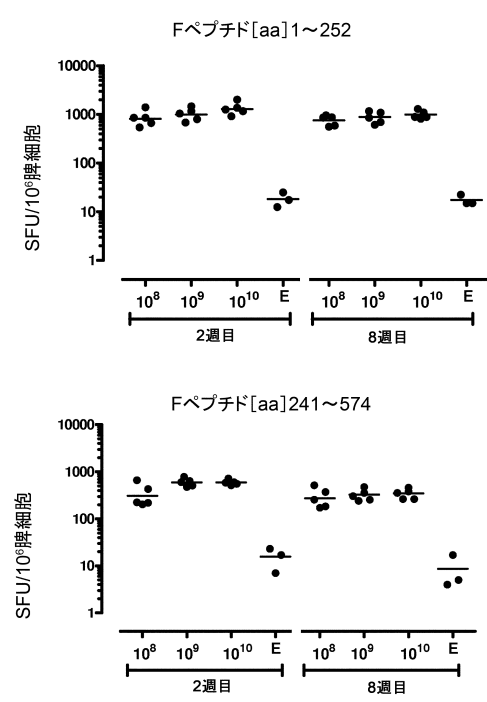
20

30

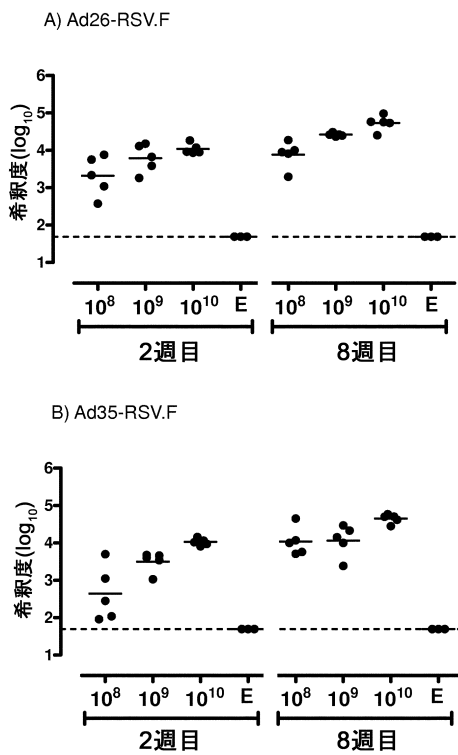
【図 1 A】



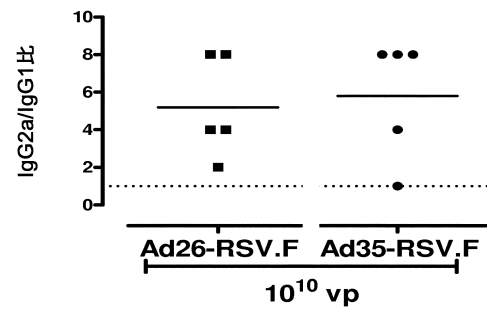
【図 1 B】



【図 2】

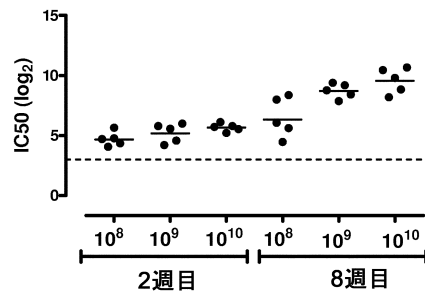


【図 3】

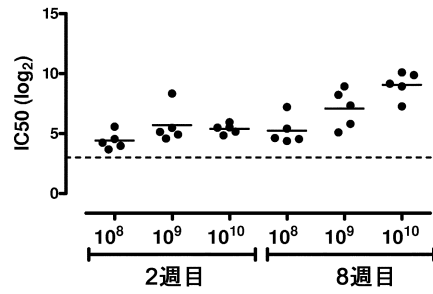


【図 4】

A) Ad26-RSV.F

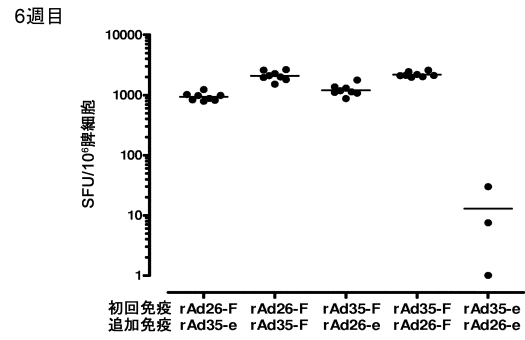


B) Ad35-RSV.F

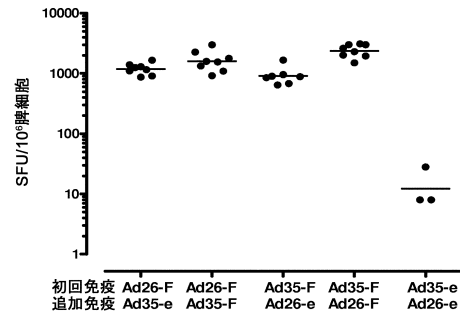


【図 5 A】

Fペプチド[aa]1~252

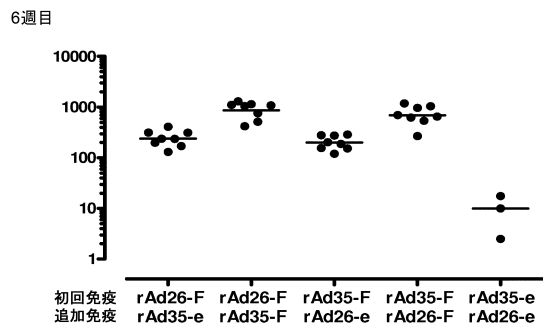


12週目

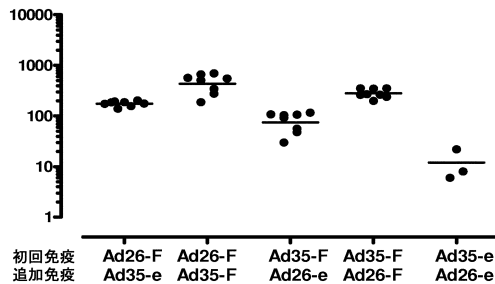


【図 5 B】

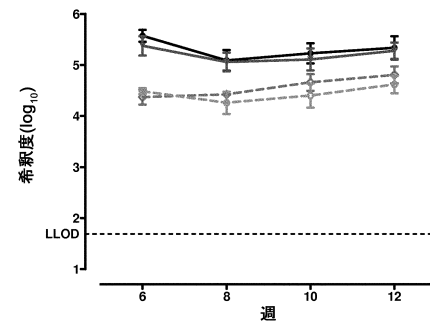
Fペプチド[aa]241~574



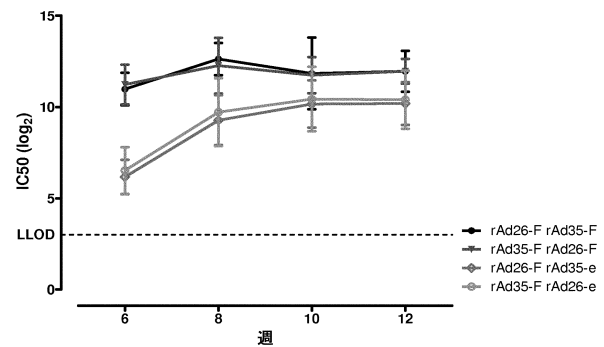
12週目



【図 6】

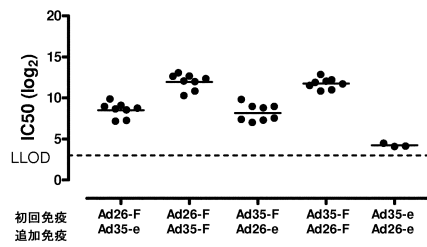


【図 7】

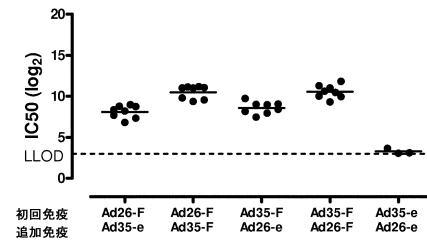


【図 8】

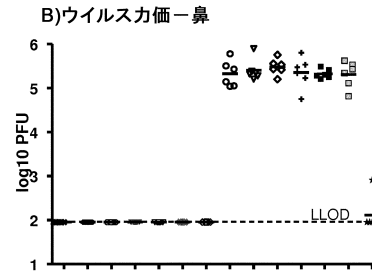
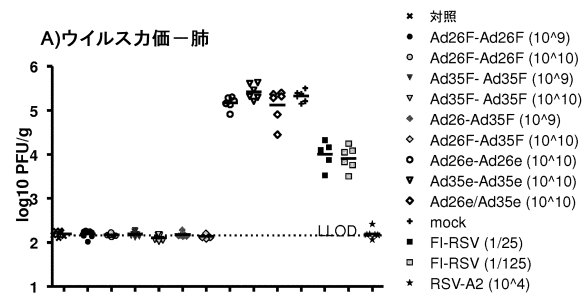
6週目



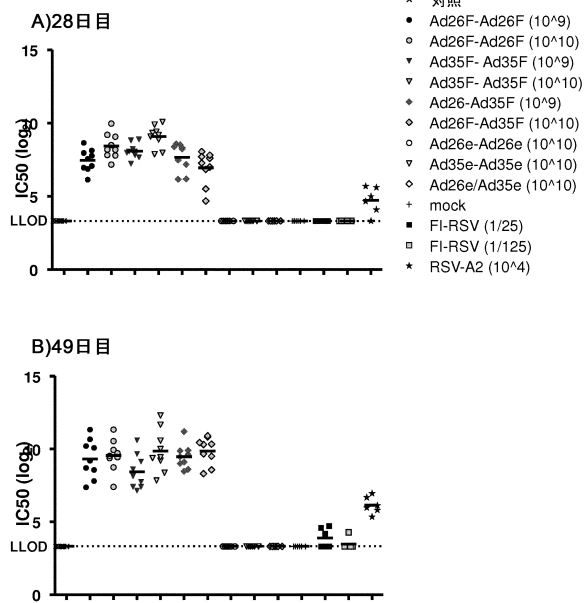
12週目



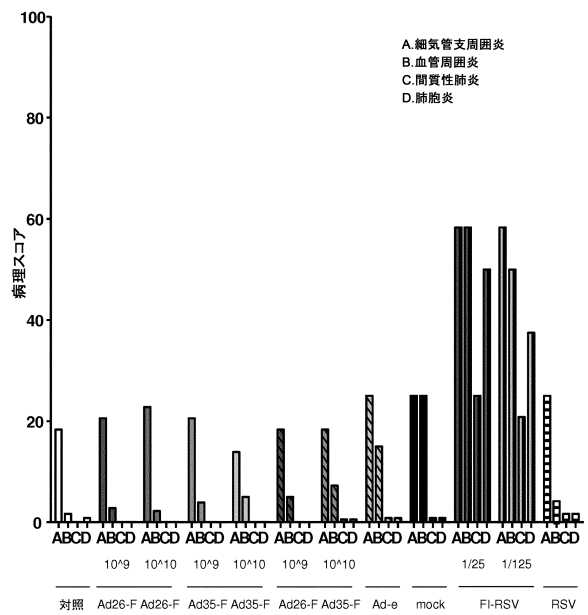
【図 9】



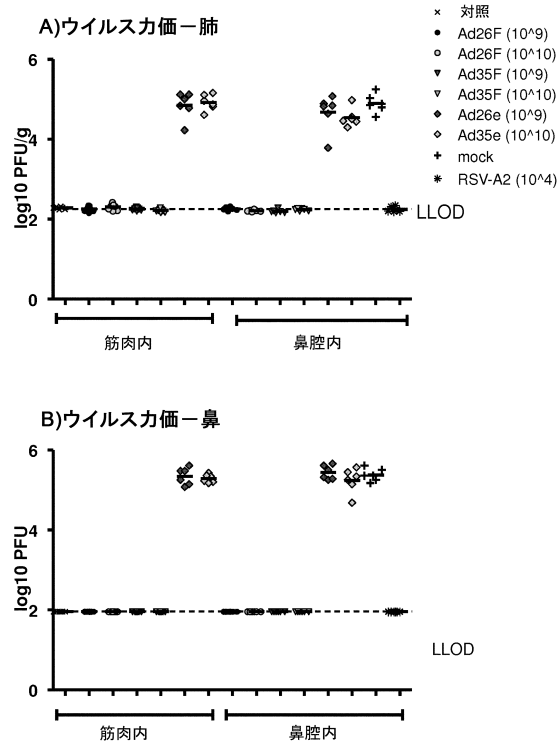
【図 10】



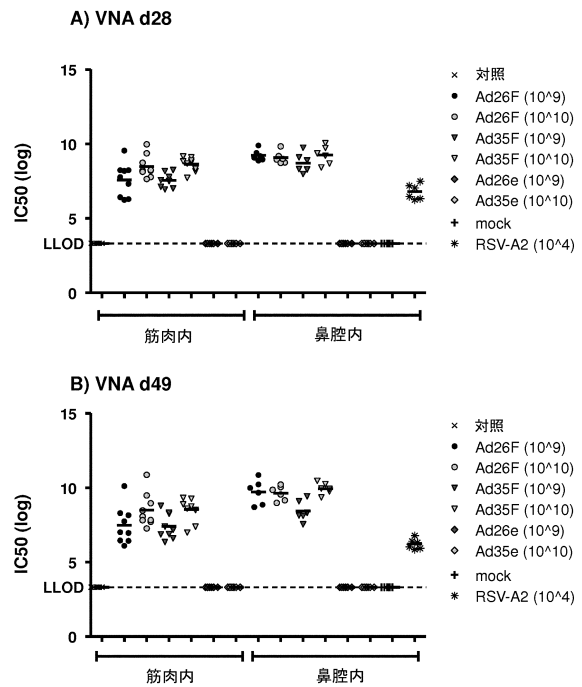
【図 11】



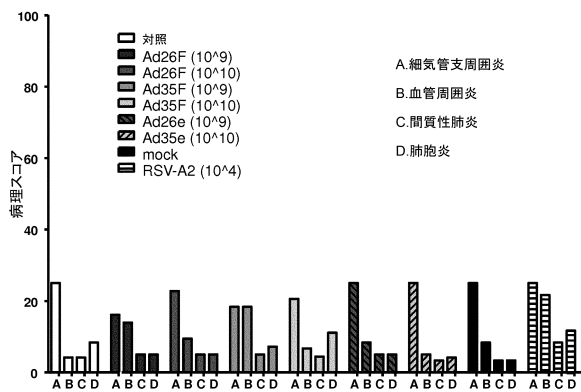
【図 1 2】



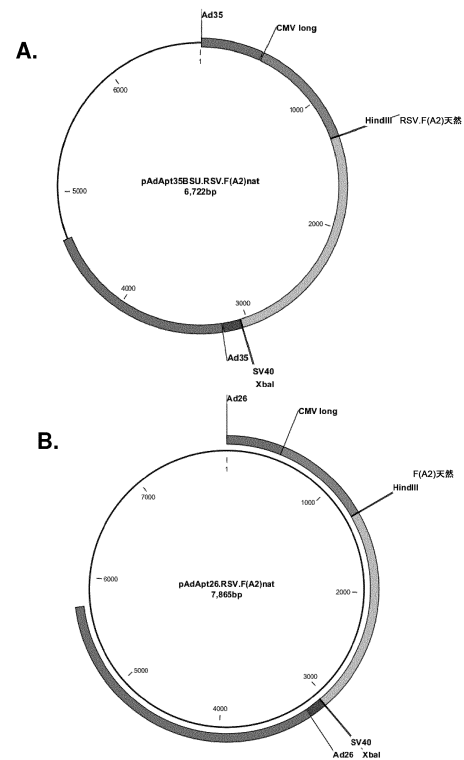
【図 1 3】



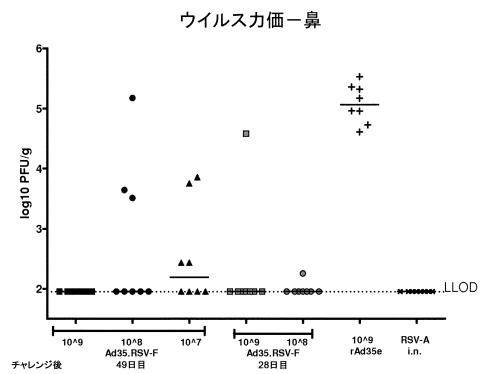
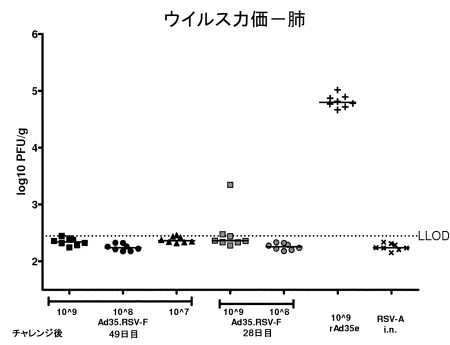
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 16】



【図 17】

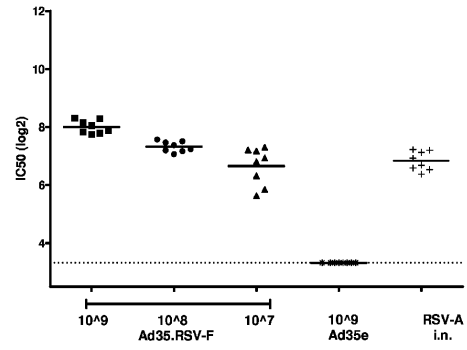
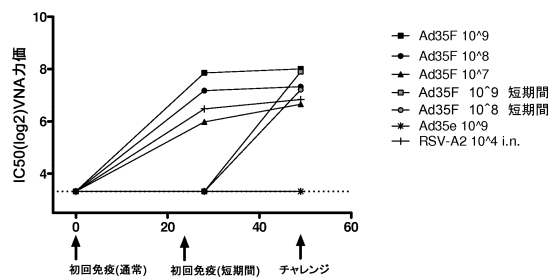


Fig. 17

【図 18】



【図 19】

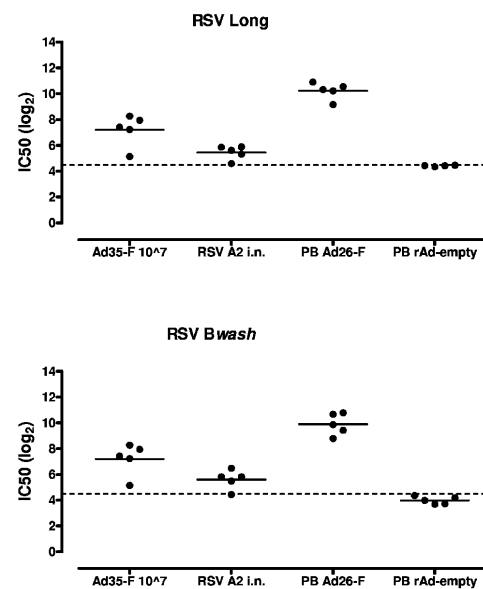
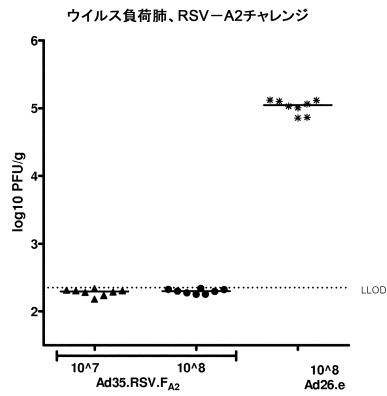
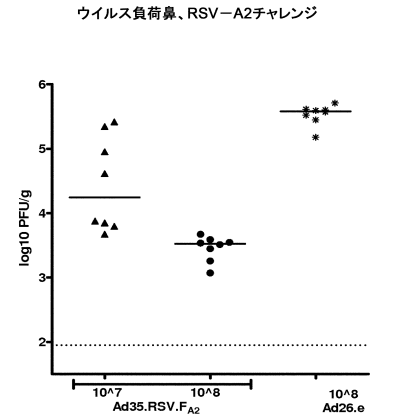


Fig. 19

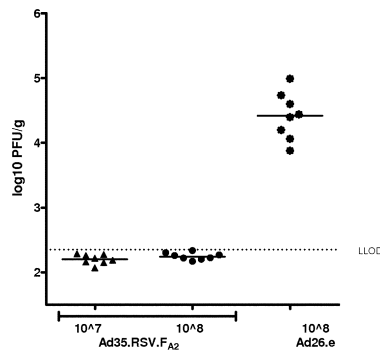
【図 20】



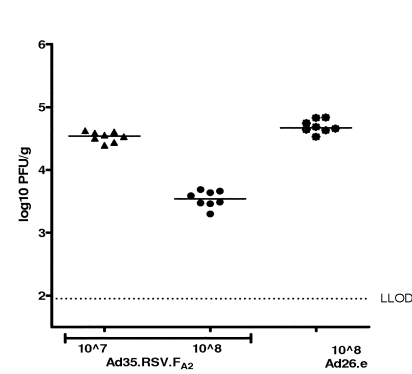
【図 21】



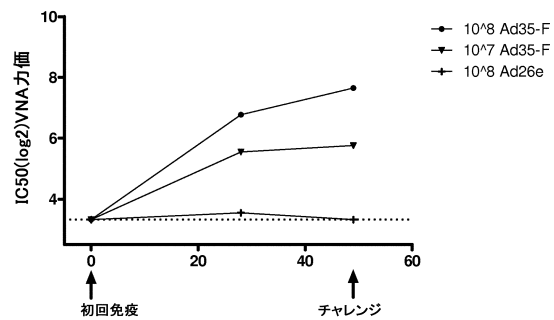
ウイルス負荷肺、RSV-B15/97チャレンジ



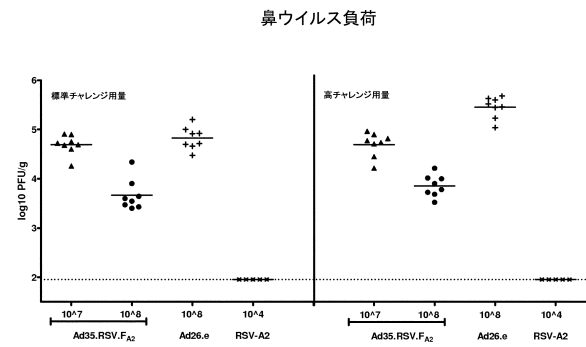
ウイルス負荷鼻、RSV-B15/97チャレンジ



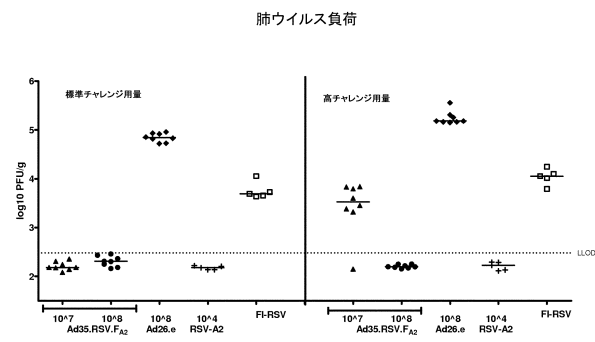
【図 22】



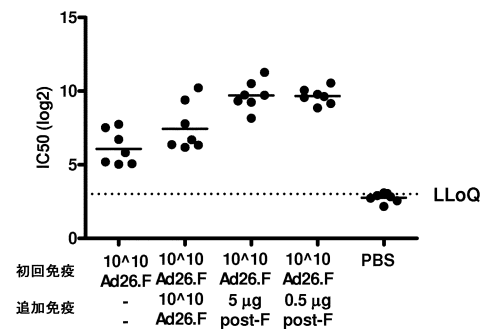
【図 24】



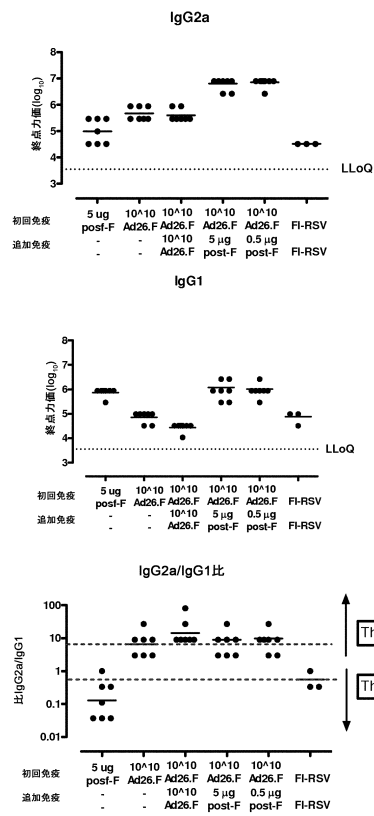
【図 23】



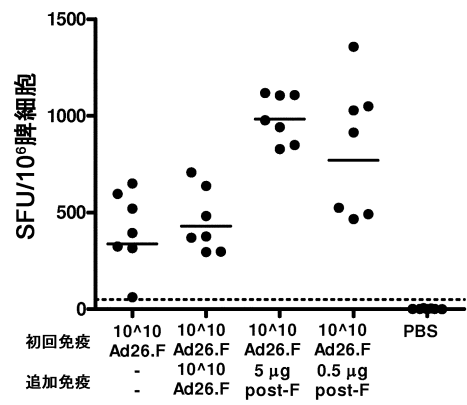
【図 25】



【図 26】



【図 27】



【配列表】

0005845376000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
C 1 2 N	7/02 (2006.01)	C 1 2 N	7/02
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
C 0 7 K	14/115 (2006.01)	C 0 7 K	14/115

(72)発明者 ジェローム エイチエイチヴィ カスターズ
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6

(72)発明者 ジョルト ヴェリンガ
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6

(72)発明者 マイラ エヌ ウィドジョジョアトモドジョ
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデン アルキメデスウェツハ 4 - 6

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 1 7 3 0 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 8 - 5 0 0 0 5 1 (J P , A)
 The Journal of Immunology , 2 0 0 4 年 , Vol.172 , p.6290-6297
 Journal of Virology , 2 0 1 1 年 , Vol.85, No.9 , p.4222-4233
 The Journal of Infectious Diseases , 1 9 9 8 年 , Vol.177 , p.467-469

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 A 6 1 K 3 9 / 1 5 5
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)