

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号  
**特開2023-156458**  
(P2023-156458A)

(43)公開日 令和5年10月24日(2023.10.24)

(51) 國際特許分類

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A
C 1 2 N	15/49 (2006.01)	C 1 2 N	15/49	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	

審査請求 有 請求項の数 36 O L 外国語出願 (全40頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-132911(P2023-132911)
(22)出願日	令和5年8月17日(2023.8.17)
(62)分割の表示	特願2020-524049(P2020-524049 の分割)
原出願日	平成30年10月31日(2018.10.31)
(31)優先権主張番号	62/580,038
(32)優先日	平成29年11月1日(2017.11.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(54)【発明の名称】 新規足場HIV-1ワクチン免疫原	(7)
	(7)

(71)出願人	501244222 ザ スクリプス リサーチ インスティテ ュート アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニ ア州ラ・ホヤ、ノース・トーリー・パイ ンズ・ロード 1 0 5 5 0
(74)代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(74)代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(74)代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(74)代理人	100129713 弁理士 重森 一輝
(74)代理人	100137213

最終頁に続く

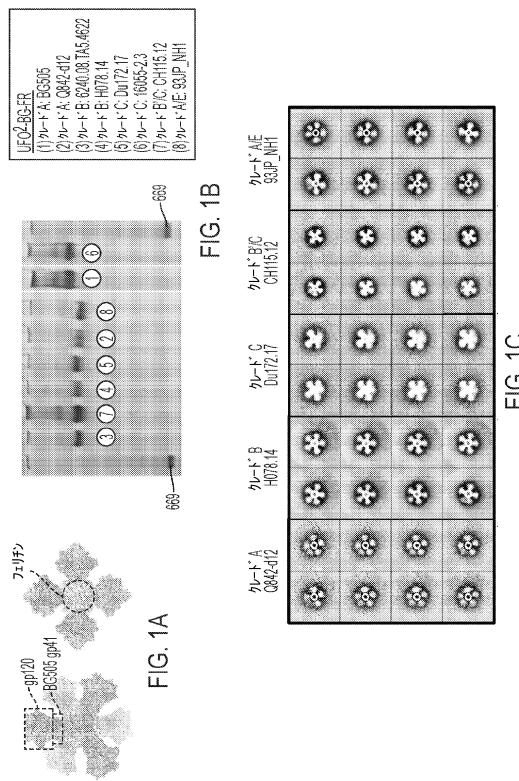
(37) 【要約】 (修正有) 【課題】新規目標以てM-15

## 【課題】新規足場HIV-Tリクチン免疫原を提供する

○

【解決手段】足場免疫原のいくつかは、ナノ粒子サブユニットのN末端に結合された可溶性gp140三量体と、短いペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットのC末端に融合されたTヘルパーエピトープとを含む。本発明のいくつかの他の免疫原は、Tヘルパーエピトープである短いペプチドスペーサーを介して安定なナノ粒子に結合された可溶性gp140三量体タンパク質を含む。足場免疫原のいくつかは、I3-01タンパク質、E2p、またはタンパク質1VLWの変異体によって形成されたナノ粒子プラットフォーム上に提示されるgp140三量体免疫原を含む。本発明はさらに、HIV感染を予防または治療するための足場HIV-1ワクチン免疫原を使用する方法を提供する。

### 【選択図】図 1 - 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

自己集合ナノ粒子上に提示される H I V - 1 E n v 由来三量体タンパク質を含み、 T ヘルパーエピトープ配列が、 ( a ) 前記ナノ粒子サブユニットの前記 C 末端に融合されるのに対して、前記 H I V - 1 三量体タンパク質サブユニットが前記ナノ粒子サブユニットの前記 N 末端に融合されるか、 ( b ) 前記ナノ粒子サブユニットの N 末端に前記 H I V - 1 三量体タンパク質を結合する、 H I V - 1 ワクチン免疫原。

**【請求項 2】**

前記 T ヘルパーエピトープ配列が、配列番号 1 ~ 3 のいずれか 1 つに示される配列、その保存的に改変された変異体または実質的に同一の配列を含む、請求項 1 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。 10

**【請求項 3】**

前記ナノ粒子サブユニットの前記 C 末端が、短いペプチドスペーサーを介して前記 T ヘルパーエピトープの前記 N 末端に融合される、請求項 1 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。

**【請求項 4】**

前記 H I V - 1 三量体タンパク質サブユニットが、第 2 のペプチドスペーサーを介して前記ナノ粒子サブユニットの前記 N 末端に融合される、請求項 3 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。 20

**【請求項 5】**

前記 T ヘルパーエピトープ配列が前記ナノ粒子内に封入される、請求項 3 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。

**【請求項 6】**

前記自己集合ナノ粒子が三量体配列を含む、請求項 1 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。 30

**【請求項 7】**

前記自己集合ナノ粒子のサブユニットが、 ( a ) 配列番号 1 ~ 8 に示されるポリペプチド、その保存的に改変された変異体もしくは実質的に同一の配列、 ( b ) 配列番号 5 ~ 17 のいずれか 1 つに示されるポリペプチド、その保存的に改変された変異体もしくは実質的に同一の配列、 ( c ) E 2 p または ( d ) フェリチンである、請求項 1 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。 30

**【請求項 8】**

前記 H I V - 1 E n v 由来三量体タンパク質が g p 1 4 0 である、請求項 1 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。

**【請求項 9】**

前記 H I V - 1 E n v 由来三量体タンパク質が、未切断融合前最適化 ( U F O ) g p 1 4 0 三量体である、請求項 1 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。

**【請求項 10】**

前記 U F O g p 1 4 0 三量体が、 H I V - 1 株 B G 5 0 5 由来の改変された g p 4 1 E C T O ドメインを含むキメラ三量体である、請求項 9 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。 40

**【請求項 11】**

前記 H I V - 1 E n v 由来三量体が U F O g p 1 4 0 三量体であり、前記自己集合ナノ粒子が、配列番号 1 ~ 8 および 5 ~ 17 のいずれか 1 つに示されるサブユニット配列を用いて生成され、前記 T ヘルパーエピトープが、配列番号 1 に示される配列を含む、請求項 9 に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原。

**【請求項 12】**

自己集合ナノ粒子上に提示される H I V - 1 E n v 由来三量体タンパク質を含み、前記自己集合ナノ粒子のサブユニットが、配列番号 1 ~ 8 および 5 ~ 17 のいずれか 1 つに示されるポリペプチド、その保存的に改変された変異体または実質的に同一の配列を含み、 50

リンカー配列が、(a)前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合されるのに対して、前記HIV-1三量体タンパク質サブユニットが前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に融合されるか、(b)前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に前記HIV-1三量体タンパク質を結合する、HIV-1ワクチン免疫原。

**【請求項13】**

前記HIV-1 Envelope由来三量体タンパク質が、未切断融合前最適化(UFO)g p 140三量体である、請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原。

**【請求項14】**

前記UFO g p 140三量体が、HIV-1株BG505由来の改変されたg p 41 ECToドメインを含むキメラ三量体である、請求項13に記載のHIV-1ワクチン免疫原。  
10

**【請求項15】**

前記リンカー配列が、Tヘルパーエピトープ配列もしくはグリシン-セリンリンカーまたはその両方を含む、請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原。

**【請求項16】**

前記リンカー配列が、配列番号1～3のいずれか1つに示される配列、その保存的に改変された変異体または実質的に同一の配列を含む、請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原。

**【請求項17】**

前記リンカー配列が、GGGGS(配列番号4)またはGSGSG(配列番号19)の1～5個のタンデム反復を含む、請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原。  
20

**【請求項18】**

前記リンカー配列が、短いペプチドスペーサーを介して前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合され、第2のペプチドスペーサーが、前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に前記HIV-1三量体タンパク質サブユニットを結合する、請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原。

**【請求項19】**

請求項1に記載のHIV-1ワクチン免疫原をコードする単離または組換えポリヌクレオチド。

**【請求項20】**

請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原をコードする単離または組換えポリヌクレオチド。  
30

**【請求項21】**

請求項1に記載のHIV-1ワクチン免疫原と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

**【請求項22】**

アジュvantをさらに含む、請求項21に記載の医薬組成物。

**【請求項23】**

請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。  
40

**【請求項24】**

アジュvantをさらに含む、請求項23に記載の医薬組成物。

**【請求項25】**

対象のHIV-1感染を予防する方法であって、請求項1に記載のHIV-1ワクチン免疫原の治療有効量を前記対象に投与し、それにより前記対象のHIV-1感染を予防することを含む方法。

**【請求項26】**

HIV-1ワクチン免疫原が、UFO g p 140三量体と、配列番号18および5～17のいずれか1つに示されるサブユニット配列を用いて生成された自己集合ナノ粒子と、配列番号1に示される配列を含むTヘルパーエピトープ配列とを含み、前記Tヘルパー

エピトープ配列が、(a) 短いペプチドスペーサーを介して前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合されるのに対して、前記UFO gp 140三量体サブユニットが前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に融合されるか、(b) 前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に前記UFO gp 140三量体サブユニットをそのC末端で共有結合する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合された前記Tヘルパーエピトープ配列が、前記ナノ粒子の自己集合時に前記ナノ粒子内に封入される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

対象のHIV-1感染を予防する方法であって、請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原の治療有効量を前記対象に投与し、それにより前記対象のHIV-1感染を予防することを含む方法。 10

【請求項29】

HIV-1ワクチン免疫原が、UFO gp 140三量体と、配列番号18および5～17のいずれか1つに示されるサブユニット配列を用いて生成された自己集合ナノ粒子と、配列番号1に示される配列を含むTヘルパーエピトープ配列とを含み、前記Tヘルパーエピトープ配列が、(a) 短いペプチドスペーサーを介して前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合されるのに対して、前記UFO gp 140三量体サブユニットが前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に融合されるか、(b) 前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に前記UFO gp 140三量体をそのC末端で共有結合する、請求項28に記載の方法。 20

【請求項30】

前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合された前記Tヘルパーエピトープ配列が、前記ナノ粒子の自己集合時に前記ナノ粒子内に封入される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

対象のHIV-1感染を治療するか、対象にHIV-1に対する免疫応答を誘発する方法であって、請求項1に記載のHIV-1ワクチン免疫原の治療有効量を含む医薬組成物を前記対象に投与し、それにより前記対象のHIV-1感染を治療するか、前記対象にHIV-1に対する免疫応答を誘発することを含む方法。

【請求項32】

HIV-1ワクチン免疫原が、UFO gp 140三量体と、配列番号18および5～17のいずれか1つに示されるサブユニット配列を用いて生成された自己集合ナノ粒子と、配列番号1に示される配列を含むTヘルパーエピトープ配列とを含み、前記Tヘルパーエピトープ配列が、(a) 短いペプチドスペーサーを介して前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合されるのに対して、前記UFO gp 140三量体サブユニットが前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に融合されるか、(b) 前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に前記UFO gp 140三量体をそのC末端で共有結合する、請求項31に記載の方法。 30

【請求項33】

前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合された前記Tヘルパーエピトープ配列が、前記ナノ粒子の自己集合時に前記ナノ粒子内に封入される、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

対象のHIV-1感染を治療するか、対象にHIV-1に対する免疫応答を誘発する方法であって、請求項12に記載のHIV-1ワクチン免疫原の治療有効量を含む医薬組成物を前記対象に投与し、それにより前記対象のHIV-1感染を治療するか、前記対象にHIV-1に対する免疫応答を誘発することを含む方法。

【請求項35】

HIV-1ワクチン免疫原が、UFO gp 140三量体と、配列番号18および5～17のいずれか1つに示されるサブユニット配列を用いて生成された自己集合ナノ粒子と、配列番号1に示される配列を含むTヘルパーエピトープ配列とを含み、前記Tヘルパー 40

エピトープ配列が、(a) 短いペプチドスペーサーを介して前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合されるのに対して、前記UFO gp140三量体サブユニットが前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に融合されるか、(b) 前記ナノ粒子サブユニットの前記N末端に前記UFO gp140三量体をそのC末端で共有結合する、請求項34に記載の方法。

#### 【請求項36】

前記ナノ粒子サブユニットの前記C末端に融合された前記Tヘルパーエピトープ配列が、前記ナノ粒子の自己集合時に前記ナノ粒子内に封入される、請求項35に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0001】

###### 関連出願の相互参照

本特許出願は、米国仮特許出願第62/580,038号(2017年11月1日出願；現在係属中)に対する優先権の利益を主張する。優先出願の完全な開示は、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

##### 【0002】

###### 政府支援の記載

本発明は、米国国立衛生研究所によって付与された助成金番号A1129698、A1125078およびA1124337、ならびに米国エネルギー省によって付与された助成金番号DE-AC02-76F00515の下、政府の支援を受けて行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

##### 【背景技術】

##### 【0003】

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の主な原因である。HIV-1は、A、B、C、D、E、F、G、H、JおよびKなどのいくつかの異なるクレードに分けることができ、これらは世界中で罹患率が異なる。各クレードは、遺伝的類似性に基づいてグループ化されたHIV-1の異なる株から構成される。HIV-1のエンベロープ糖タンパク質(Env)は、広域中和抗体(bNAb)のエピトープを有し、ワクチン設計の唯一の標的である。切断され成熟したEnvは、各々が(共)受容体結合タンパク質gp120と、ウイルス膜に三量体スパイクを固定し、細胞時に融合過程を促進する膜貫通タンパク質gp41とを含む、ヘテロ二量体の準安定三量体としてHIV-1ビリオン表面に提示される。不安定な性質、および表面グリカンの密な層のため、Envの構造決定は長い間困難であり、三量体に基づくワクチンへの取り組みを妨げてきた。

##### 【0004】

天然様Env三量体は、近年、BG505 SOSIP.664三量体によって達成された有望な成功のため、望ましいワクチンプラットフォームと考えられている。SOSIPに加えて、一本鎖gp140(sc gp140)三量体、天然柔軟性結合(NFL)三量体(native flexibility linked NFL trimers)および未切断融合前最適化(UFO)三量体(unclaved prefusion-optimalized UFO trimers)など、天然様Env三量体を生成した他の三量体設計プラットフォームも提案された。ただし、粒子表面に抗原の密なアレイを提示し、ワクチン接種時に強力で長期間持続する免疫応答を誘発するサブユニットワクチンは、ウイルス様粒子(VLP)よりも免疫原性が低いことが多いため、gp140三量体はHIV-1ワクチンの最適な型ではない可能性がある。

##### 【発明の概要】

##### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0005】

bNAb誘発におけるVLPワクチンの利点に対する認識の高まりにもかかわらず、天然様三量体を提示する担体としてのナノ粒子の有用性はHIV-1ワクチン開発では厳密

10

20

30

40

50

には検討されていない。安全で効果的なHIV-1ワクチンに対する未だ満たされていない医学的必要性が残っている。本発明は、当技術分野におけるこの必要性および他の必要性に対処する。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0006】

一態様では、本発明は、HIV-1ワクチン免疫原を提供する。本発明の新規HIV-1ワクチン免疫原は、自己集合ナノ粒子上に提示されるHIV-1 Env由来三量体タンパク質と、Tヘルパーエピトープ配列とを含む。いくつかの実施形態では、Tヘルパーエピトープは、ナノ粒子サブユニットのN末端にHIV-1三量体タンパク質サブユニットのC末端を結合する。いくつかの他の実施形態では、Tヘルパーエピトープ配列がナノ粒子サブユニットのC末端に融合されるのに対して、HIV-1三量体タンパク質のC末端がナノ粒子サブユニットのN末端に融合される。後者の実施形態のいくつかでは、短いペプチドスペーサーを使用して、ナノ粒子サブユニットにTヘルパーエピトープを融合する。これにより、ナノ粒子内部の疎水性コアの形成が可能になり、これは、ナノ粒子構造を安定化させ、融合免疫原のT細胞認識を促進するように機能する。これらの実施形態のいくつかでは、使用される短いペプチドスペーサーは、例えば、GGGGS(配列番号4)もしくはGSGS(配列番号19)の1~5個のタンデム反復、または本質的に構造的に柔軟な任意の他のペプチド配列であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、追加の短いペプチドセグメントまたはスペーサーを使用して、ナノ粒子サブユニットのN末端、例えば、1Gリンカー、または本明細書に記載の他の短いペプチドスペーサーのいずれかにHIV-1タンパク質を融合することができる。いくつかの実施形態では、Tヘルパーエピトープ配列は、配列番号1~3のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、その保存的に改変された変異体または実質的に同一の配列を含む。

##### 【0007】

典型的には、HIV-1ワクチン免疫原の自己集合ナノ粒子は、三量体タンパク質配列を用いて生成される。いくつかの実施形態では、自己集合ナノ粒子のサブユニットは、(1)配列番号18に示されるポリペプチド、その保存的に改変された変異体もしくは実質的に同一の配列、(2)配列番号5~17のいずれか1つに示されるポリペプチド、その保存的に改変された変異体もしくは実質的に同一の配列、(3)E2pまたは(4)フェリチンである。

##### 【0008】

様々な実施形態では、本発明のワクチン免疫原中のHIV-1 Env由来三量体タンパク質は、gp140三量体である。いくつかの実施形態では、使用されるHIV-1 Env由来三量体タンパク質は、未切断融合前最適化(UFO)gp140三量体である。これらの実施形態のいくつかでは、UFO gp140三量体は、HIV-1株BG505由来の改変されたgp41ECTODメインを含むキメラ三量体である。本発明のいくつかのHIV-1ワクチン免疫原は、UFO gp140三量体であるHIV-1 Env由来三量体と、配列番号5~18のいずれか1つに示されるサブユニット配列を用いて生成される自己集合ナノ粒子と、配列番号1に示される配列を含むTヘルパーエピトープとを含む。

##### 【0009】

別の態様では、本発明は、配列番号5~18のいずれか1つに示されるサブユニットポリペプチド、その保存的に改変された変異体または実質的に同一の配列により形成される自己集合ナノ粒子上に提示されるHIV-1 Env由来三量体タンパク質を含むHIV-1ワクチン免疫原を提供する。いくつかの実施形態では、使用されるHIV-1 Env由来三量体タンパク質は、未切断融合前最適化(UFO)gp140三量体である。これらの実施形態のいくつかでは、UFO gp140三量体は、HIV-1株BG505由来の改変されたgp41ECTODメインを含むキメラ三量体である。いくつかの実施形態では、HIV-1ワクチン免疫原中のHIV-1三量体タンパク質は、そのC末端で、リンカー配列を介してナノ粒子のN末端に結合される。いくつかの他の実施形態では、

10

20

30

40

50

リンカー配列は、短いペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットのC末端に融合されて、ナノ粒子内部に疎水性コアを形成するのに対し、UFO g p 1 4 0三量体サブユニットは、ナノ粒子サブユニットのN末端に融合される。これは、ナノ粒子構造を安定化させ、三量体免疫原のT細胞認識を促進するように機能する。これらの実施形態のいくつかでは、使用される短いペプチドスペーサーは、例えば、G G G G S (配列番号4)、G S G S G (配列番号19)、または本質的に構造的に柔軟な任意の他のペプチドであり得る。様々な実施形態では、使用されるリンカー配列は、Tヘルパーエピトープ配列またはグリシン・セリンリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、配列番号1～3のいずれか1つに示されるペプチド配列、その保存的に改変された変異体または実質的に同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、G G G G S (配列番号4)またはG S G S G (配列番号19)の1～5個のタンデム反復(例えば、1または2個の反復)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に例示されるように、追加の短いペプチドスペーサーまたはセグメントを使用して、ナノ粒子サブユニットのN末端にHIV-1タンパク質を融合することができる。

10

20

30

40

## 【0010】

関連する態様では、本発明は、本明細書に記載の新規足場HIV-1ワクチン免疫原のうちの1つを含有する医薬組成物を提供する。医薬組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体も含有する。いくつかの実施形態では、医薬組成物はアジュバントをさらに含有する。別の関連する態様では、本発明は、本明細書に記載のHIV-1ワクチン免疫原をコードする単離または組換えポリヌクレオチドと、そのようなポリヌクレオチド配列を有するクローニングおよび発現ベクターと、核酸またはベクターが導入されているか組み込まれている宿主細胞とを提供する。

20

## 【0011】

別の態様では、本発明は、対象のHIV-1感染を予防するか、対象にHIV-1に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。これらの方法は、本明細書に記載の新規足場HIV-1ワクチン免疫原のうちの1つの治療有効量を対象に投与することを伴う。典型的には、HIV-1ワクチン免疫原は、医薬組成物を介して対象に投与される。いくつかの実施形態では、投与されるHIV-1ワクチン免疫原は、UFO g p 1 4 0三量体と、配列番号18に示されるサブユニット配列を用いて生成された自己集合ナノ粒子と、配列番号1に示されるTヘルパーエピトープ配列とを含む。これらの実施形態では、Tヘルパーエピトープ配列は、ナノ粒子サブユニットのN末端にUFO g p 1 4 0三量体をそのC末端で共有結合するように機能する。あるいは、Tヘルパーエピトープ配列は、短いペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットのC末端に融合されるのに対して、UFO g p 1 4 0三量体サブユニットは、ナノ粒子サブユニットのN末端に融合される。

30

## 【0012】

別の態様では、本発明は、対象のHIV-1感染を治療するか、対象にHIV-1に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。概方法は、本明細書に記載の治療有効量のHIV-1ワクチン免疫原を含有する医薬組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与されるHIV-1ワクチン免疫原は、UFO g p 1 4 0三量体と、配列番号18に示されるサブユニット配列を用いて生成された自己集合ナノ粒子と、配列番号1に示されるTヘルパーエピトープ配列とを含む。これらの方法では、Tヘルパーエピトープ配列は、ナノ粒子サブユニットのN末端にUFO g p 1 4 0三量体をそのC末端で共有結合するように機能する。あるいは、Tヘルパーエピトープ配列は、短いペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットのC末端に融合されるのに対して、UFO g p 1 4 0三量体サブユニットは、ナノ粒子サブユニットのN末端に融合される。

40

## 【0013】

本発明の性質および利点のさらなる理解は、明細書の残りの部分および特許請求の範囲を参照することによって実現され得る。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0014】

50

【図1】多様なUFO<sup>2</sup>-BG三量体と、Tヘルプシグナルが組み込まれたI3-01ベースgp140ナノ粒子とを提示するフェリチンナノ粒子を示す。(A) gp120、UFO設計のBG505 gp41ECTO、およびgp140 FR画像上で点線によって囲まれ、矢印により表示されたフェリチンを伴うUFO<sup>2</sup> BG gp140 フェリチン (FR) ナノ粒子の表面モデル。(B) シングルステップ2G12抗体アフィニティー精製後の8つのUFO<sup>2</sup>-BG-FRナノ粒子のBN-PAGE。(C) 5つの代表的なUFO<sup>2</sup>-BG-FRナノ粒子のネガティブ染色EMから導き出された無参照2Dクラス平均。(D) 6つのbNAbおよび4つの非NAbの小さなパネルに対する5つの代表的なUFO<sup>2</sup>-BG-FRナノ粒子の抗原プロファイル。6つの濃度(2倍希釈により35nMから開始)の抗原滴定系列を使用して、Octet RED96からセンサーグラムを取得した。最高濃度でのピーク値をマトリックスに要約し、6つのbNAbおよび4つの非NAbがそれぞれ上下のパネルに示されている。灰色の濃淡の強度が高いほど、Octetにより測定された結合シグナルが大きいことを示す。(E) I3-01ナノ粒子(薄い灰色)の表面モデルを左に示す。前面の5回軸を囲むサブユニットは濃い灰色で強調表示され、3回軸を形成する3つのサブユニットは黒い点線の三角形で示される。3回軸を囲む3つのI3-01サブユニットのN末端間の間隔(上面図)と、柔軟なリンカーによる3つのI3-01サブユニットへのgp140三量体の固定(黒い点線により示される)とを中央に示す。gp140およびTヘルパーエピトープの両方を含むI3-01ナノ粒子構築物の概略図を右に示し、このような3つのTヘルパーエピトープ、PADRE、DおよびTpD(それぞれ配列番号1~3)について配列を列挙する。(F) リンカーとして異なるTヘルパーエピトープを有するHR1再設計BG505 gp140三量体を提示する3つのI3-01ナノ粒子のSECプロファイル。(G) シングルステップ2G12アフィニティー抗体精製後の上記の3つのI3-01ナノ粒子のBN-PAGE。(H) リンカーとして使用されるPADREを有するHR1再設計BG505 gp140三量体を提示するI3-01ナノ粒子のネガティブ染色EMから導き出された無参照2Dクラス平均。(I) 6つのbNAbおよび4つの非NAbの小さなパネルに対するgp140-PADRE-I3-01ナノ粒子の抗原プロファイル。6つの濃度(2倍希釈により14nMから開始)の抗原滴定系列を使用して、Octet RED96からセンサーグラムを取得した。右側のPGT151結合プロファイルの隣に、10の抗体プロファイルの各々の上から下までの6つのラインにそれぞれ対応する6つの抗原濃度を示す。

【図2】三量体提示ナノ粒子による効果的なB細胞活性化を示す。(A) PGT145、(B) PGT121および(C) VRC01受容体を運ぶB細胞トランスフェクタントにおけるCa<sup>2+</sup>動員。10 μg ml<sup>-1</sup>の濃度の抗BCR抗体または示された抗原(抗ヒトIg鎖F(ab')<sub>2</sub>; 抗マウスIgM; クレードA、B、C、B/CもしくはA/E株に由来するUFO<sup>2</sup>-BG-FRナノ粒子、またはgp41ECTO内に再設計されたHR1ペンドを含むBG505 gp140-PADRE-I3-01ナノ粒子)により、ドキシサイクリン誘導型のbNAb B細胞受容体(BCR)を発現するWEHI231細胞を刺激した。

【図3】マウス免疫化における三量体およびナノ粒子に対する初期中和抗体反応を示す。(A) マウス免疫化プロトコルの概略図を左に示し、製剤化および免疫化の主要パラメーターを中央に、血清IgG精製プロトコルを右に列挙する。(B) BG505三量体に基づく免疫原の試験、ならびに3つのHIV-1抗原(BG505 UFO三量体、N332足場を提示するフェリチンナノ粒子(1GUT\_A\_ES\_FR)または別のN332足場を提示するI3-01ナノ粒子(1KIG\_L\_ES\_2\_I3-01)、およびクレードC V1V2 フェリチンナノ粒子(V1V2 FR))に対する精製マウス血清IgGのELISA結合。最も高いOD<sub>450</sub>値が0.1未満である場合、または曖昧なデータフィッティングの場合を除いて、全ELISAプロットについてEC<sub>50</sub>値を表示する。(C) 精製マウス血清IgGによるHIV-1中和。IC<sub>50</sub>値は灰色の濃淡で示す。灰色の濃淡の強度が高いほど、中和が強力であることを示す。(D) 足場三量体群

10

20

30

40

50

(S1G5) から得られた、群複合マウス血清 IgG の中和プロファイル。(E) フェリチンナノ粒子群 (S2G1) から得られた、群複合マウス血清 IgG およびマウス A 血清 IgG の中和プロファイル。(F) I3-01 ナノ粒子群 (S2G5) から得られた、群複合マウス血清 IgG、マウス A およびマウス D 血清 IgG の中和プロファイル。比較のために MLV を含めて、2 つの HIV-1 偽ウイルス、クレード A tier 2 BG505 およびクレード B tier 1 SF162 を試験した。群複合マウス血清 IgG の中和プロファイルの隣に、足場 gp140 三量体、フェリチンナノ粒子および I3-01 ナノ粒子の構造モデルを示す。

【図 4】ナノ粒子サブユニットの C 末端に融合された T ヘルパーエピトープを有する HIV-1 gp140 三量体提示ナノ粒子の設計概念、SEC プロファイルおよびネガティブ染色 EM 画像を示す。(A) ナノ粒子サブユニットの C 末端に融合された全反応性 (pan-reactive) T ヘルパーエピトープを有する E2p および I3-01 ナノ粒子設計の概略図。(B) 2G12 抗体アフィニティーカラムを使用して精製した後、Superose 6 10/300 GL カラムから得られた BG505 gp140 三量体提示 E2p および I3-01 ナノ粒子の SEC プロファイル。(C) ネガティブ染色 EM から得られた BG505 gp140 三量体提示 E2p および I3-01 ナノ粒子の生の顕微鏡写真。

【発明を実施するための形態】

### 【0015】

#### I. 概要

本発明は、本発明者らによる新規 HIV-1 gp140 ナノ粒子免疫原の開発に一部基づいている。本明細書の実施例に詳述されるように、本発明者らは、gp140 と提示ナノ粒子足場との間のリンカーとして作用するだけでなく、堅牢な T 細胞応答を誘発し、bNAb に向けて B 細胞の発達を導くための組み込まれた T ヘルプシグナルとしても作用する T ヘルパーエピトープを利用した。本発明者らはさらに、以前は利用されなかったタンパク質 (1VLW) を検討して、HIV-1 gp140 三量体の提示に、安定なナノ粒子足場を提供した。様々な足場 HIV-1 gp140 免疫原は、アフィニティーカラムおよびサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製すると、優れた純度および均一性を示す。本明細書に記載の新規 HIV-1 gp140 ナノ粒子は、bNAb および非 NAb を用いて評価すると、他の公知の HIV-1 gp140 ナノ粒子では観察されなかった強力な PG16 結合を有する極めて優れた抗原プロファイルを示す。さらに例示として、マウスを免疫し、マウスから単離された IgG の HIV-1 中和活性を評価することによって、BG505 gp140 三量体を提示するナノ粒子の免疫原性を検討した。本明細書に開示される 2 つの HIV-1 gp140 ナノ粒子 (S2G5 および S2G6)、ならびに対照 HIV-1 免疫原 (足場 gp140.681 三量体 (S1G5) およびフェリチンナノ粒子 (S2G1)) については、自己 tier-2 BG505.N332 HIV-1 ウィルスの中和が観察された。重要なことに、本明細書に記載の新規 HIV-1 gp140 ナノ粒子免疫原は、免疫化のわずか 8 週間後に tier-2 NAb の急速な発現を示す IC50 値をもたらし、バランスのとれた T および B 細胞応答を示す、これまでに同定された最も優れた HIV-1 ワクチン候補を提示した。

### 【0016】

したがって、本発明は、本明細書に例示されるように、T ヘルパーエピトープを有する新規足場 HIV-1 ワクチン免疫原を提供する。本発明では、1VLW 変異体により形成された安定なナノ粒子を含む足場 HIV-1 ワクチン免疫原も提供される。本発明はさらに、HIV-1 感染の治療または予防に対するこれらの新規足場 HIV-1 免疫原の治療用途および予防用途を提供する。

### 【0017】

本明細書で別段の指定がない限り、本発明のワクチン免疫原、コードポリヌクレオチド、発現ベクターおよび宿主細胞、ならびに関連する治療用途はいずれも、本明細書に例示される手順または当技術分野で周知のルーチンに実施される方法に従って生成または実施

10

20

30

40

50

することができる。例えば、Methods in Enzymology, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis, J N Abelson, M I Simon, G B Fields (Editors), Academic Press; 1st edition (1997) (ISBN-13: 978-0121821906); 米国特許第4,965,343号および米国特許第5,849,954号; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc (ringbou ed., 2003); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc, New York, USA (1986); またはMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol 152, S L Berger and A R Kimmerl Eds, Academic Press Inc, San Diego, USA (1987); Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E Coligan, et. al., ed, John Wiley and Sons, Inc), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc)、ならびにCulture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol 57, Jennifer P Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998)を参照されたい。以下の節は、本発明の組成物および方法を実施するための追加的指針を提供する。

#### 【0018】

##### I I . 定義

他に定義されない限り、本明細書で使用されるあらゆる技術用語および科学用語は、本発明が関係する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。以下の参考文献は、本発明で使用される用語の多くの一般的な定義を当業者に提供する: Academic Press Dictionary of Science and Technology, Morris (Ed), Academic Press (1st ed, 1992); Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith et al. (Eds), Oxford University Press (revised ed, 2000); Encyclopaedic Dictionary of Chemistry, Kumar (Ed), Anmol Publications Pvt Ltd (2002); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton et al. (Eds), John Wiley & Sons (3rd ed, 2002); Dictionary of Chemistry, Hunt (Ed), Routledge (1st ed, 1999); Dictionary of Pharmaceutical Medicine, Nahler (Ed), Springer-Verlag Telos (1994); Dictionary of Organic Chemistry, Kumar and Anand (Eds), Anmol Publications Pvt Ltd (2002); およびA Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin and Hine (Eds), Ox 30 40 50

ford University Press (4<sup>th</sup> ed, 2000)。本発明に特に適用されるこれらの用語のいくつかのさらなる明確化が本明細書に提供される。

#### 【0019】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、単数および複数の両方を指す。例えば、「En<sub>n</sub>由来三量体」は、単数または複数のEn<sub>n</sub>由来三量体分子の両方を指すことができ、語句「少なくとも1つのEn<sub>n</sub>由来三量体」と等価であると考えることができる。

#### 【0020】

特に明記しない限り、用語「抗原」および「免疫原」は、対象に免疫応答を誘発することができる物質、典型的にはタンパク質を指すために区別なく使用される。この用語はまた、対象に一度投与されると（直接的に、またはタンパク質をコードするヌクレオチド配列もしくはペクターを対象に投与することにより）、そのタンパク質に対して向けられる液性および/または細胞型の免疫応答を引き起こすことができるという意味で、免疫学的に活性なタンパク質を指す。したがって、いくつかの実施形態では、用語「免疫原」は、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質抗原をコードするポリヌクレオチドを広く包含することができる。

#### 【0021】

用語「保存的に改変された変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された変異体とは、同一もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝暗号の縮重のために、多数の機能的に同一の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。ポリペプチド配列について、「保存的に改変された変異体」は、保存的アミノ酸置換（類似の電荷を有する側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換されたアミノ酸残基）を有する変異体を指す。同様の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。

#### 【0022】

エピトープとは抗原決定基を指す。これらは、特異的な免疫応答を誘発するように抗原性である分子上の特定の化学基またはペプチド配列であり、例えば、エピトープは、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原の領域である。エピトープは、タンパク質の三次フォールディングによって並置された連続アミノ酸または非連続アミノ酸の両方から形成され得る。

#### 【0023】

AIDSなどの状態または疾患の徵候または症状を低減または排除するなど、望ましい応答をもたらすのに十分なワクチンまたは他の薬剤の有効量。例えば、これは、ウイルス複製を阻害するか、HIV-1感染の場合のT細胞数の増加などのウイルス感染の表立った症状を測定可能な程度に変化させるのに必要な量であり得る。一般に、この量は、ウイルス（例えばHIV）の複製または感染性を測定可能な程度に阻害するのに十分である。対象に投与される場合、ウイルス複製のインピトロ阻害を達成することが示されている（例えば、リンパ球中の）標的組織濃度を達成するであろう投与量が一般に使用される。いくつかの例では、「有効量」は、例えばHIVを治療するために、障害または疾患のいずれかの1つ以上の症状および/または根本的な原因を治療（予防を含む）する量である。一例では、有効量とは治療有効量である。一例では、有効量は、AIDSに関連する1つ以上の徵候または症状など、特定の疾患または状態の1つ以上の徵候または症状が発症す

10

20

30

40

50

るのを予防する量である。

【0024】

フェリチンは、あらゆる動物、細菌および植物に見出される球状タンパク質である。フェリチンは、主に、水和鉄イオンおよびプロトンのミネラル化コアへのおよびミネラル化コアからの輸送を通して多核  $\text{Fe}(\text{III})_2\text{O}_3$  形成の速度および位置を制御するよう に作用する。球状形態のフェリチンは、約 17 ~ 20 kDa の分子量を有するポリペプチドである単量体サブユニットタンパク質（単量体フェリチンサブユニットとも呼ばれる）から構成される。

【0025】

本明細書で使用される場合、融合タンパク質とは、ペプチド結合を介して互いに連結されて単一のタンパク質を形成している少なくとも 2 つの無関係のタンパク質由来のアミノ酸配列を含む組換えタンパク質である。無関係のアミノ酸配列は、互いに直接連結され得るか、リンカー配列を使用して連結され得る。本明細書で使用される場合、タンパク質のアミノ酸配列がそれらの（1 または複数の）天然環境（例えば、細胞内）ではペプチド結合を介して互いに連結された状態で通常見出されなければ、タンパク質は無関係である。例えば、フェリチンを構成する単量体サブユニットのアミノ酸配列、および HIV-1 gp 120 または gp 41 糖タンパク質のアミノ酸配列は、通常、ペプチド結合を介して互いに連結された状態では見出されない。

【0026】

HIV-1 エンベロープタンパク質 (Env) は、gp 160 と呼ばれる、845 ~ 870 アミノ酸の比較的長い前駆体タンパク質として最初に合成される。gp 160 はホモ三量体を形成し、ゴルジ体内でグリコシル化を受ける。インビボでは、gp 160 糖タンパク質は、エンドタンパク質分解によって成熟エンベロープ糖タンパク質 gp 120 および gp 41 に処理され、成熟エンベロープ糖タンパク質 gp 120 および gp 41 は、ウイルスの表面上で複合体として非共有結合によって互いに結合する。gp 120 表面タンパク質は、HIV の主要受容体であるヒト CD4 に対する、ならびにケモカイン受容体 CCR5 および CXCR4 などの融合共受容体と相互作用するドメインに対する高親和性結合部位を含む。gp 41 タンパク質はウイルス膜にわたって広がり、そのアミノ末端に、ウイルス膜と細胞膜との融合に重要なアミノ酸配列を含む。HIV-1 エンベロープ糖タンパク質複合体の天然融合許容形態は、3 つの gp 120 サブユニットおよび 3 つの gp 41 サブユニットから構成される三量体構造である。受容体結合 (CD4 および共受容体) 部位は gp 120 部分に位置するのに対して、融合ペプチドは gp 41 成分に位置する。野生型 gp 160 ポリペプチドの典型的な配列は、例えば、アクセシション番号 AAB05604 および AAD12142 の下に GenBank に示されている。

【0027】

gp 140 とは、gp 120 および全 gp 41 外部ドメインをいずれも含む HIV エンベロープタンパク質のオリゴマー形態を指す。本明細書で使用される場合、HIV-1 gp 140 三量体免疫原は、典型的には、gp 140 ドメインと、gp 140 の改変または再設計された外部ドメイン (gp 41 ecto) とを含む。

【0028】

gp 120 は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のエンベロープタンパク質である。gp 120 は、HIV エンベロープ糖タンパク質複合体の外部表面露出ドメインの大部分を含み、細胞 CD4 受容体および細胞ケモカイン受容体 (CCR5 など) の両方に結合するのは gp 120 である。成熟 gp 120 野生型ポリペプチドは、一次配列内に約 500 個のアミノ酸を有する。gp 120 は高度に N-グリコシル化されており、120 kDa の見かけの分子量を有する。このポリペプチドは、5 つの保存領域 (C1 ~ C5) および 5 つの高可変性領域 (V1 ~ V5) から構成される。gp 120 糖タンパク質は、その三次構造では、3 つの主要構造ドメイン（外部ドメイン、内部ドメインおよび架橋シート）および可変ループから構成される。例えば、Wyatt et al., Nature 393, 705 - 711, 1998 および Kwong et al., Nature 393

10

20

30

40

50

, 649-59, 1998 を参照されたい。内部ドメインは gp41 エンベロープ糖タンパク質と相互作用すると考えられているのに対して、外部ドメインは、集合したエンベロープ糖タンパク質三量体上に露出している。

#### 【0029】

gp120 の可変領域 1 および可変領域 2 (V1 / V2 ドメイン) は、HIV-1 の最も可変性の部分のうちの 2 つ (V1 ループおよび V2 ループ) を含む約 50 ~ 90 残基から構成され、V1 / V2 ドメインの 10 残基のうちの 1 つは N-グリコシル化されている。

#### 【0030】

gp41 は、前駆体 HIV エンベロープタンパク質のタンパク質分解産物である。gp41 は、N 末端融合ペプチド (FP) 、膜貫通ドメイン、および融合ペプチドと膜貫通ドメインとを結合する外部ドメインを含む。gp41 は三量体立体配置のままであり、非共有結合的に gp120 と相互作用する。例示的な gp41 のアミノ酸配列は、アクセシション番号 CAD20975 の下に GenBank に示されている。

#### 【0031】

BG505 SOSIP.664 gp140 は、クレード A 株 BG505 由来の gp140 三量体を用いて開発された HIV-1 Env 免疫原である。これは、切断された gp120 と gp41 ECTO との間に、操作されたジスルフィド結合 (SOS と呼ばれる) による共有結合を含む。さらに、これは、gp41 融合後コンホメーションを不安定化させる I559P 変異 (IP と呼ばれる) と、残基 664 に可溶性を改善する膜近位外部領域 (MPER) のトランケート化とを有する。この HIV-1 免疫原は、極めて優れた抗原プロファイルと、天然スパイクの優れた構造擬態とを有する。選別プローブとして SOSIP 三量体を使用して、新規 bNAb を同定し、特性評価した。SOSIP の設計は他の HIV-1 株にも拡張されており、追加的な安定化変異の組込みを可能にしている。近年、ウサギおよび非ヒト霊長類における SOSIP 三量体の免疫原性が報告され、ヒトのワクチン試験への道が開かれた。

#### 【0032】

免疫応答とは、刺激に対する B 細胞、T 細胞または単球などの免疫系細胞の応答を指す。いくつかの実施形態では、応答は特定の抗原に特異的である (「抗原特異的応答」)。いくつかの実施形態では、免疫応答は、CD4+ 応答または CD8+ 応答などの T 細胞応答である。いくつかの他の実施形態では、応答は B 細胞応答であり、特異的抗体の産生をもたらす。

#### 【0033】

免疫原性組成物とは、免疫原性ポリペプチドを発現するウイルスに対して測定可能な CTL 応答を誘発するか、免疫原性ポリペプチドに対して測定可能な B 細胞応答 (抗体の産生など) を誘発する免疫原性ポリペプチドを含む組成物を指す。

#### 【0034】

2 つ以上の核酸配列間または 2 つ以上のアミノ酸配列間の配列同一性または類似性は、その配列間の同一性または類似性に関して表される。配列同一性は同一性の割合として測定可能であり、割合が高いほど配列の同一性は高くなる。2 つの配列が、特定の割合の同一のアミノ酸残基またはヌクレオチド (すなわち、特定の領域にわたる、または特定されない場合、配列全体にわたる 60 % の同一性、場合により、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % または 99 % の同一性) を有する場合、比較ウインドウにわたる最大一致について比較およびアライメントすると、または以下の配列比較アルゴリズムのうちの 1 つを使用して、もしくは手動アライメントおよび目視検査によって測定されるように領域を指定すると、2 つの配列は「実質的に同一」である。同一性は、少なくとも約 50 ヌクレオチド (または 10 アミノ酸) の長さの領域にわたって、またはさらに好ましくは 100 ~ 500 もしくは 1000 以上のヌクレオチド (または 20、50、200 もしくはそれ以上のアミノ酸) の長さの領域にわたって存在してもよい。

#### 【0035】

10

20

30

40

50

核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準的な方法を使用してアライメントされた場合、比較的高い度合の配列同一性 / 類似性を有する。比較のために配列をアライメントする方法は、当技術分野で周知である。様々なプログラムおよびアライメントアルゴリズムが、Smith & Waterman, Adv Appl Math 2: 482, 1981; Needleman & Wunsch, J Mol Biol 48: 443, 1970; Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85: 2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73: 237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151-3, 1989; Corpet et al., Nuc Acids Res 16: 10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appl. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; および Pearson et al., Meth Mol Bio 24: 307-31, 1994 に記載されている。Altschul et al., J Mol Biol 215: 403-10 1990 は、配列アライメント法およびホモロジー計算の詳細な考察を提示している。

#### 【0036】

用語「対象」は、哺乳動物、例えば、ヒトおよび非ヒト哺乳動物として分類される任意の動物を指す。非ヒト動物の例には、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどが挙げられる。特に明記しない限り、用語「患者」または「対象」は、本明細書では区別なく使用される。好ましくは、対象はヒトである。

20

#### 【0037】

用語「治療する」または「緩和する」は、疾患（例えば、HIV感染）の症状、合併症もしくは生化学的兆候の発生を予防するか遅延させるために対象に化合物もしくは薬剤を投与すること、症状を緩和すること、または疾患、状態もしくは障害がさらに進行するのを阻止または阻害することを含む。治療を必要とする対象には、疾患または障害に既に罹患している対象、および障害を発症するリスクがある対象が含まれる。治療は、予防的抑制（疾患の発症を防止もしくは遅延するため、またはその臨床的もしくは亜臨床的症状の発現を防止するため）、または疾患の発現後の症状の治療的抑制もしくは緩和であり得る。

30

#### 【0038】

未切断融合前最適化（UFO）三量体とは、gp120タンパク質と、再設計されたgp41ECTOドメインとにより形成され、さらに安定なHIV-1 gp140三量体になるHIV-1 gp140三量体タンパク質を指す。再設計されたgp41ECTOドメインは、プロトタイプHIV-1株BG505（およびプロトタイプgp140三量体BG505 SOSIP 664 gp140）に基づいており、野生型BG505 gp41ECTO配列に対して1つ以上の改変を含む。これらの改変には、（1）融合前gp140構造を安定化するための比較的短いループ配列によるHR1の21残基N末端の置換（残基548～568）と、（2）GGGGS（配列番号4）モチーフのタンデム反復のような柔軟なリンカー配列によるgp120とgp41との間のフューリン切断部位の置換（残基508～511）とが含まれる。いくつかの実施形態では、UFO三量体は、gp120とgp41との間の操作されたジスルフィド結合および/またはgp41における安定化変異をさらに含み得る。例えば、HIV-1株BG505に基づくUFO三量体は、残基A501CとT605Cの間の操作されたジスルフィド結合および/または安定化変異I559Pを含むことができる。UFO三量体の詳細な説明は、例えば、Kong et al., Nat Comm 7: 12040, 2016に記載されている。BG505株配列に基づくUFO三量体に加えて、操作されたgp41ECTOドメインを使用して、多くの異なるHIV-1株またはサブタイプ由来のgp120ポリペプチドと対合して、「キメラ」gp140三量体を形成することができる。そのようなキメラ三量体は、本明細書に例示されるように「UFO-BG」または「UFO<sup>2</sup>-BG」と呼ばれる。

40

50

## 【0039】

ワクチンとは、対象に予防的または治療的免疫応答を誘発する医薬組成物を指す。場合によっては、免疫応答は防御免疫応答である。典型的には、ワクチンは、病原体、例えばウイルス性病原体の抗原、または病的状態と相關する細胞成分に対する抗原特異的免疫応答を誘発する。ワクチンは、ポリヌクレオチド（開示された抗原をコードする核酸など）、ペプチドもしくはポリペプチド（開示された抗原など）、ウイルス、細胞または1つ以上の細胞成分を含み得る。

## 【0040】

ウイルス様粒子（VLP）は、いくつかのウイルスのいずれかに由来する非複製性ウイルス殻を指す。VLPは一般に、1つ以上のウイルスタンパク質、例えば、限定するものではないが、キャプシド、コート、殻、表面および／またはエンベロープタンパク質と呼ばれるタンパク質、またはこれらのタンパク質に由来する粒子形成ポリペプチドから構成される。VLPは、適切な発現系でのタンパク質の組換え発現時に自発的に形成することができる。特定のVLPを生成する方法は、当技術分野で公知である。ウイルスタンパク質の組換え発現後のVLPの存在は、当技術分野で公知の従来の技術を使用して、例えば、電子顕微鏡法、生物物理学的特性評価などによって検出することができる。例えば、Baker et al (1991) Biophys J 60: 1445-1456およびHagensee et al (1994) J Virol 68: 4503-4505を参照されたい。例えば、VLPは密度勾配遠心分離によって単離され得、および／または特徴的密度バンディングによって同定され得る。あるいは、問題のVLP調製物のガラス化水性試料に対して低温電子顕微鏡法を実施し、適切な曝露条件下で画像を記録することができる。

10

20

30

40

50

## 【0041】

## III. 新規足場HIV-1三量体免疫原

本発明は、三量体HIV-1 Env由来タンパク質（例えば、gp140三量体）およびTヘルパーまたはリンカー配列を提示または組み込む異種足場を含むHIV-1免疫原を提供する。いくつかの実施形態では、異種提示足場は、自己集合ナノ粒子である。いくつかの他の実施形態では、異種提示足場は、バクテリオファージQ-VLPなどのウイルス様粒子（VLP）である。いくつかの実施形態では（本明細書の実施例1に例示されるように）、三量体HIV-1タンパク質のサブユニットは、本明細書に記載のリンカー配列、例えば、融合免疫原のT細胞認識を促進するようにも機能するTヘルパーエピトープポリペプチドを介して、提示足場（例えば、ナノ粒子）のサブユニットのN末端に結合される。いくつかの他の実施形態では（本明細書の実施例7に例示されるように）、HIV-1三量体タンパク質のサブユニットは、提示足場のサブユニットのN末端に接続（例えば、共有結合）され、Tヘルパーまたはリンカーエピトープは、提示足場（例えば、ナノ粒子）のサブユニットのC末端に融合される。後者の実施形態では、Tヘルパーエピトープは、短いペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットに融合され得る。これにより、ナノ粒子内部の疎水性コアの形成が可能になり、これは、ナノ粒子構造を安定化させ、融合免疫原のT細胞認識を促進するように機能する。様々な実施形態では、短いペプチドスペーサーは、例えば、GGGGGS（配列番号4）、GSGSG（配列番号19）の1～5個の反復、または本質的に構造的に柔軟な任意のペプチドであり得る。例示として、5-aaaGGGGGSスペーサーを用いて、E2pおよびI3-01のサブユニットのC末端にTヘルパーエピトープPADREを融合することができる（実施例7）。短いペプチドスペーサーを使用してナノ粒子サブユニットのC末端にTヘルパーエピトープを融合することに加えて、第2のペプチドスペーサーまたはセグメントを使用して、ナノ粒子サブユニットのN末端にHIV-1三量体を融合することができる。例えば、HIV-1タンパク質は、例えば、本明細書に例示される単一のグリシン残基（「1Gリンカー」）または10-aaaGGGGSGGGGS（配列番号20）スペーサーを介して、提示ナノ粒子サブユニットのN末端に融合され得る（実施例7）。

## 【0042】

ナノ粒子提示ワクチン組成物に、任意の Env 由来 HIV - 1 三量体タンパク質を使用することができる。Env 由来三量体タンパク質は、様々な HIV - 1 株から得ることができる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、HIV - 1 Env に基づく糖タンパク質またはドメイン、例えば、gp140、gp120 または V1V2 ドメインの天然の三量体形態を提示する。いくつかの実施形態では、Env 由来三量体は、HIV - 1 株 BG505、例えば、BG505.SOSIP664 gp140 三量体に由来する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、改変された gp140 三量体免疫原、例えば、Kong et al. , Nat Comm 7, 12040, 2016 に記載されている HR1 改変 gp140 三量体（「UFO 三量体」）を提示する。いくつかの実施形態では、本発明で使用される HIV - 1 三量体免疫原は、本明細書に例示される UFO<sup>2</sup> - BG 三量体である。UFO<sup>2</sup> - BG 三量体は、（1）再設計された HR1 N 末端ペンドと切断部位 リンカー（Kong et al. , Nat Comm 7, 12040, 2016 に記載されている）とを有する BG505 gp41 ドメインと、（2）他の多様な HIV - 1 株またはサブタイプのうちの 1 つに由来する gp120 タンパク質とを含むキメラ gp140 三量体である。BG505 株由来の再設計された gp41<sub>ECTO</sub> ドメインに加えて、本発明に適したキメラ gp140 三量体中の gp41 ドメインはまた、HIV - 1 配列データベースに由来するコンセンサス gp41<sub>ECTO</sub> ドメインであり得る。

10

## 【0043】

様々な実施形態では、これらの HIV - 1 Env 由来免疫原のいずれかを提示するナノ粒子は、ナノ粒子のサブユニット（例えば、I3 - 01、1VLW 由来ポリペプチド配列またはフェリチンサブユニット）に三量体免疫原を融合することによって構築することができる。これらのナノ粒子に基づく HIV - 1 免疫原の抗原性および構造的完全性は、標準的なアッセイ、例えば、抗体結合アッセイおよびネガティブ染色電子顕微鏡法（EM）を介して容易に分析することができる。本明細書に例示されるように、様々な融合分子はいずれも、Env 由来三量体（例えば、gp140）の免疫原性エピトープを提示するナノ粒子に自己集合することができる。これらのナノ粒子は、堅牢な三量体特異的 bNAb を誘発することによって、広範囲の HIV - 1 ウィルスに対する個体のワクチン接種に有用である。

20

## 【0044】

いくつかの実施形態では、本発明の足場 gp140 三量体免疫原は、ナノ粒子足場に gp140 三量体を接続するためのリンカーとして機能する T ヘルパーエピトープを含む。いくつかの他の実施形態では、T ヘルパーエピトープは、短いペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットの C 末端に融合され、ナノ粒子足場内部に封入される。これらの実施形態で使用することができる短いペプチドスペーサーは、例えば、GGGGS、GS GSG、または本質的に構造的に柔軟な任意の他のペプチドであり得る。T ヘルパーエピトープは、足場免疫原の構造要素としての役割に加えて、堅牢な T 細胞応答を誘発し、bNAb に向けて B 細胞の発達を導くための組み込まれた T ヘルプシグナルも提供する。本発明の実施には、当技術分野で公知の任意の T ヘルパーエピトープ配列またはペプチドが使用され得る。それらは、MHC クラス II エピトープを含み、免疫化時にヘルパー T 細胞を効果的に活性化することができる任意のポリペプチド配列を含む。例えば、Alexander et al. , Immunity 1, 751 - 761, 1994; Ahlers et al. , J. Clin. Invest. 108: 1677 - 1685, 2001; Fraser et al. , Vaccine 32, 2896 - 2903, 2014; De Groot et al. , Immunol. Cell Biol. 8: 255 - 269, 2002; および Gene Ther. 21: 225 - 232, 2014 を参照されたい。いくつかの好ましい実施形態では、使用される T ヘルパーエピトープは、一般的な pan DR エピトープペプチド（PADRE）である。これらの実施形態のいくつかでは、リンカーは、配列 AKFVAAWTLKAAA（配列番号 1）、その保存的に改変された変異体または実質的に同一（例えば、少なくとも 90%、95% または 99% 同一）の配列を含む。いくつかの他の実施形態では、使用される T ヘルパーエピト

30

40

50

ープは、D Tヘルパーエピトープ Q S I A L S S L M V A Q A I P (配列番号 2) または T p D エピトープ I L M Q Y I K A N S K F I G I P M G L P Q S I A L S S L M V A Q (配列番号 3) である。様々な実施形態では、リンカーは、配列番号 2 もしくは配列番号 3 に示される配列、その実質的に同一 (例えば、少なくとも 90%、95% または 99% 同一) の配列または保存的に置換された配列を含み得る。

#### 【0045】

上記のように、三量体 H I V - 1 タンパク質を提示するための異種足場は、好ましくはナノ粒子である。本発明のワクチン組成物を生成する際に、様々なナノ粒子プラットフォームを使用することができる。一般に、本発明に使用されるナノ粒子は、単一のサブユニットの複数のコピーによって形成される必要がある。追加的または代替的に、粒子サブユニットのアミノ末端は 3 回軸に近接して露出していなければならず、3 つのアミノ末端の間隔は、様々な H I V - 1 三量体成分のカルボキシル末端の間隔と厳密に一致していなければならぬ。いくつかの好ましい実施形態では、免疫原は、約 20 nm 以下の直径 (通常、12、24 または 60 サブユニットから集合した) と粒子表面上の 3 回軸とを有する自己集合ナノ粒子を含む。そのようなナノ粒子は、多価 H I V - 1 三量体ワクチンを生成するための好適な粒子プラットフォームを提供する。

#### 【0046】

いくつかの実施形態では、本発明の足場 g p 140 三量体免疫原は、超安定ナノ粒子足場を用いて構築される。例えば、自己集合ナノ粒子は、Hsia et al. (Nature 535, 136-139, 2016) に記載されている I 3 - 01 タンパク質を用いて生成することができる。このタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 18 に示されている。いくつかの他の実施形態では、超安定ナノ粒子足場は、保存的に改変された変異体、または実質的に同一 (例えば、少なくとも 90%、95% または 99% 同一) の配列を有するものを含め、Hsia et al. (上記) に記載されている I 3 - 01 の変異体に基づき得る。いくつかの実施形態では、I 3 - 01 由来ナノ粒子プラットフォームに g p 140 三量体を接続するためのリンカー配列は、上記のように T ヘルパーエピトープを含む。いくつかの他の実施形態では、グリシン - セリンポリペプチドが、I 3 - 01 由来ナノ粒子プラットフォームに g p 140 三量体を接続するための第 2 のペプチドスペーサーとして使用され、T ヘルパーエピトープが、短いペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットの C 末端に融合される。このような構造設計により、ナノ粒子内部に疎水性コアが作成され、これにより、ナノ粒子表面に提示される g p 140 三量体の T 細胞認識が強化される。様々な実施形態では、ナノ粒子サブユニットの C 末端に T ヘルパーエピトープを結合するための短いペプチドスペーサーは、例えば、G G G G S、G S G S G、または本質的に構造的に柔軟な任意の他のペプチドであり得る。

#### 【0047】

I 3 - 01 配列 (配列番号 18) :

M H H H H H H G G S G G S G G S M K M E E L F K K H K I V A V L R A N S  
V E E A K K K A L A V F L G G V H L I E I T F T V P D A D T V I K E L S F L K E  
M G A I I G A G T V T S V E Q C R K A V E S G A E F I V S P H L D E E I S Q F C  
K E K G V F Y M P G V M T P T E L V K A M K L G H T I L K L F P G E V V G P Q F  
V K A M K G P F P N V K F V P T G G V N L D N V C E W F K A G V L A V G V G S A  
L V K G T P V E V A E K A K A F V E K I R G C T E

いくつかの実施形態では、本発明の足場 g p 140 三量体免疫原中の超安定ナノ粒子は、ヘリコバクターピロリ (Helicobacter pylori) 由来の天然ナノ粒子であるフェリチンを用いて構築される。例えば、足場 g p 140 三量体免疫原は、フェリチンに結合されフェリチン上に提示される U F O 2 - B G 三量体を含むことができる。これらの実施形態のいくつかでは、U F O 2 - B G 三量体は、本明細書に例示されるように、リンカー配列を用いることなくフェリチンサブユニットに直接接続される。いくつかの他の実施形態では、T ヘルパーエピトープまたは単純なグリシン - セリンリンカーなどのリンカー配列を使用してもよい。これらの実施形態のいくつかでは、短いペプチドスペ

10

20

30

40

50

ーサーを介してナノ粒子サブユニットのC末端にTヘルパーエピトープを融合することができ、これにより、ナノ粒子足場内に疎水性コアが形成される。本明細書に記載されるように、これらの実施形態で使用される短いペプチドスペーサーは、例えば、G G G G S、G S G S G、または本質的に構造的に柔軟な任意の他のペプチドであり得る。フェリチンは、あらゆる動物、細菌および植物に見出される球状タンパク質である。球状形態のフェリチンは、約17～20kDaの分子量を有するポリペプチドである単量体サブユニットタンパク質（単量体フェリチンサブユニットとも呼ばれる）から構成される。本発明で使用される単量体フェリチンサブユニットは、単量体フェリチンサブユニットの自己集合を球状形態のタンパク質に導くことができる、フェリチンタンパク質の全長の単一ポリペプチドまたはその任意の部分である。単量体フェリチンサブユニットが、その表面にHIV-1エピトープを提示するナノ粒子に自己集合することができる限り、任意の公知のフェリチンタンパク質の単量体フェリチンサブユニット由来のアミノ酸配列を使用して本発明の融合タンパク質を生成することができる。フェリチンに加えて、本発明はまた、同様の分子特性を有する他の多くの自己集合ナノ粒子を使用することができる。これらには、例えば、以下のPDB IDを有する分子、すなわち、1JIG（バチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）由来の12量体D1p-2）、1UVH（マイコバクテリウム・スメグマチス（*Mycobacterium Smegmatis*）由来の12量体DPS）、2YGD（24量体眼レンズシャペロンB-クリスタリン）、3CS0（24量体DegP24）、3MH6および3MH7（24量体HtrAプロテアーゼ）、3PV2（12量体HtrAホモログDegQ WT）、4A8C（E.コリ（*E. coli*）由来の12量体DegQ）、4A9G（E.コリ由来の24量体DegQ）、4EVE（ヘリコバクターピロリ株YS29由来の12量体HP-NAP）ならびに4GQU（マイコバクテリウム・ツベルクローシス（*Mycobacterium tuberculosis*）由来の24量体HisB）が含まれる。

#### 【0048】

いくつかの実施形態では、本発明の足場gp140三量体免疫原は、本明細書に例示されるように、タンパク質1VLW（配列番号5）またはその変異体（配列番号6～17）に由来するナノ粒子足場を用いて構築することができる。様々な実施形態では、本発明の足場gp140免疫原を構築するためのナノ粒子プラットフォームは、保存的に改変された変異体であるポリペプチド配列、または配列番号5～18のいずれか1つの実質的に同一の配列を用いて生成することができる。いくつかの実施形態では、1VLW由来ナノ粒子プラットフォームにgp140三量体を接続するためのリンカー配列は、上記のようにTヘルパーエピトープを含む。いくつかの他の実施形態では、1VLW由来ナノ粒子プラットフォームにgp140三量体を接続するためのリンカーは、単純なペプチド配列を含む。例えば、足場免疫原は、グリシン-セリンリンカー、例えば、GGGGS（配列番号4）またはGSGSG（配列番号19）の1～5個の反復（例えば、1または2個の反復）を含むリンカーを用いて構築することができる。いくつかの他の実施形態では、短いペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットのC末端にTヘルパーエピトープを融合して、ナノ粒子内部に疎水性コアを形成することができる。様々な実施形態では、使用される短いペプチドスペーサーは、例えば、GGGGS、GSGSG、または本質的に構造的に柔軟な任意の他のペプチドであり得る。

#### 【0049】

いくつかの他の実施形態では、HIV-1三量体免疫原を提示するためのナノ粒子足場は、バチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）由来のジヒドロリポイルアシルトランスフェラーゼ（E2p）の再設計された変異体である。E2pは、23.2nmの直径と、粒子表面上の3回軸頂点（threefold vertex）を分離する12個の大きな開口とを有する熱安定性60量体ナノ粒子である。本発明の足場HIV-1三量体免疫原を構築するための再設計されたE2p変異体により形成されたナノ粒子は、野生型E2pナノ粒子と比較して安定性が強化されている。いくつかの実施形態では、上記のTヘルパーエピトープを含むリンカー

10

20

30

40

50

を用いて、E 2 p ナノ粒子に H I V - 1 g p 1 4 0 三量体を接続することができる。いくつかの他の実施形態では、完全に集合した E 2 p ナノ粒子が、T ヘルパーエピトープによって形成された疎水性コアを封入するように、短いペプチドスペーサーを介して E 2 p サブユニットの C 末端に T ヘルパーエピトープを融合することができる。疎水性コアはまた、E 2 p ナノ粒子表面上の g p 1 4 0 三量体の T 細胞認識を強化するように機能する。E 2 p および T ヘルパーエピトープを結合するための、これらの実施形態に使用するのに適した短いペプチドスペーサーは、例えば、G G G G S 、 G S G S G 、または本質的に構造的に柔軟な任意の他のペプチドであり得る。

#### 【 0 0 5 0 】

本発明の足場 H I V - 1 三量体免疫原は、本明細書に記載のプロトコル（例えば、実施例 1 ~ 7 ）および／または当技術分野で記載されている他の方法、例えば、He et al. , Nat Comm 7 , 1 2 0 4 1 , 2 0 1 6 ；および Kong et al. , Nat Comm 7 , 1 2 0 4 0 , 2 0 1 6 に従って構築することができる。

#### 【 0 0 5 1 】

##### I V . H I V - 1 ワクチン免疫原を発現させるためのベクターおよび宿主細胞

本発明は、本明細書に記載の H I V - 1 ワクチン免疫原および関連ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、ポリヌクレオチド配列を有する発現ベクター、ならびにポリヌクレオチドまたは発現構築物を有する宿主細胞を提供する。細胞は、例えば、真核細胞または原核細胞、例えば、動物細胞、植物細胞、細菌または酵母であり得る。様々な発現ベクター／宿主系が、本発明の融合ポリペプチドを発現させるのに適している。例には、例えば、微生物、例えば、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミド D N A 発現ベクターにより形質転換された細菌；酵母発現ベクターにより形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、C a M V ；タバコモザイクウイルス、T M V ）によりトランスフェクトされたか、細菌発現ベクター（例えば、T i または p B R 3 2 2 プラスミド）により形質転換された植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。

#### 【 0 0 5 2 】

本発明に有用なベクターは、好ましくは、コードポリヌクレオチド配列の転写および翻訳を可能にする融合ポリペプチドコード配列に作動可能に結合された配列を含む。結合された融合ポリペプチドコード配列の転写を可能にする配列は、プロモーターを含み、結合された配列の強力な発現を可能にする 1 または複数のエンハンサー要素も含んでもよい。用語「転写調節配列」は、プロモーターと、作動可能に結合された核酸配列に所望の発現特性（例えば、高レベル発現、誘導性発現、組織または細胞型特異的発現）を付与する任意の追加の配列との組合せを指す。プロモーター配列は、構成的または誘導性であり得る。構成的ウイルスプロモーターの例には、H S V 、 T K 、 R S V 、 S V 4 0 および C M V プロモーターが挙げられる。好適な誘導性プロモーターの例には、シトクロム P 4 5 0 遺伝子、熱ショックタンパク質遺伝子、メタロチオネイン遺伝子、エストロゲン遺伝子プロモーターなどのホルモン誘導性遺伝子などの遺伝子由来のプロモーターが挙げられる。

#### 【 0 0 5 3 】

プロモーター／エンハンサー要素に加えて、本発明の発現ベクターは、好適なターミネーターをさらに含み得る。そのようなターミネーターには、例えば、ヒト成長ホルモンターミネーター、または酵母もしくは真菌宿主の場合、T P I 1 ( A l b e r & K a w a s a k i , J M o l A p p l G e n e t 1 : 4 1 9 - 3 4 , 1 9 8 2 ) もしくは A D H 3 ターミネーター ( M c K n i g h t et al. , 1 9 8 5 , E M B O J 4 : 2 0 9 3 - 2 0 9 9 ) が含まれる。本発明に有用なベクターはまた、ポリアデニル化配列（例えば、S V 4 0 または A d 5 E 1 b ポリ ( A ) 配列）、および翻訳エンハンサー配列（例えば、アデノウイルス V A R N A 由来のもの）を含み得る。さらに、本発明に有用なベクターは、融合ポリペプチドを特定の細胞区画に導くシグナル配列をコードしてもよいか、あるいは、融合ポリペプチドの分泌を導くシグナルをコードしてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0054】

いくつかの好ましい実施形態では、本発明のワクチン免疫原を発現するベクターは、哺乳動物発現用のウイルスベクターである。一般に、本発明の融合HIV免疫原をコードする配列の導入および発現を可能にする任意のウイルスベクターが、本発明に許容可能である。様々な実施形態では、アデノウイルスベクター、pSVおよびpCMV系列のプラスミドベクター、ワクシニアおよびレトロウイルスベクター、ならびにバキュロウイルスを含む哺乳動物発現ベクターを本発明の実施に使用することができる。例えば、本発明のHIV-1ワクチン免疫原は、ウイルスベクター-phCMV3から発現させることができる。

## 【0055】

融合ポリペプチドを発現させるために使用される特定のベクターに応じて、様々な公知の細胞または細胞株を本発明の実施に使用することができる。宿主細胞は、本発明の融合HIV免疫原を保有する組換えベクターが導入され得、ベクターが融合ポリペプチドの発現を促進することを可能にされる場合、本発明に有用な任意の細胞であり得る。宿主細胞は、多数の細菌株のいずれかなどの原核細胞であってよい、酵母もしくは他の真菌細胞、昆虫細胞もしくは両生類細胞、または例えば齧歯類細胞、類人猿細胞もしくはヒト細胞を含む哺乳動物細胞などの真核細胞であってよい。本発明の融合ポリペプチドを発現する細胞は、初代培養細胞、例えば、初代ヒト線維芽細胞またはケラチノサイトであってよい、NIH3T3、HEK293、HEK293T HeLa、MDCK、WI38またはCHO細胞などの確立された細胞株であってよい。いくつかの実施形態では、本発明のHIV-1ワクチン免疫原を発現するための宿主細胞は、本明細書に例示されるように、ExpiCHO細胞またはHEK293F細胞であり得る。当業者であれば、本発明の融合ワクチン免疫原を発現する選択された宿主細胞型を培養時に容易に確立および維持することができる。融合ポリペプチドの発現に使用することができる好適な細胞株の他の多くの特定の例は、当技術分野で説明されている。例えば、Smith et al., 1983., J. Virol. 46: 584; Engelhard, et al., 1994, Proc Nat Acad Sci 91: 3224; Logan and Sheink, 1984, Proc Natl Acad Sci, 81: 3655; Scharf, et al., 1994, Results Probl Cell Differ, 20: 125; Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol, 153: 516; Van Heeke & Schuster, 1989, J Biol Chem 264: 5503; Grant et al., 1987, Methods in Enzymology 153: 516; Brisson et al., 1984, Nature 310: 511; Takamatsu et al., 1987, EMBO J 6: 307; Coruzzi et al., 1984, EMBO J 3: 1671; Broglie et al., 1984, Science, 224: 838; Winter J and Sinibaldi RM, 1991, Results Probl Cell Differ., 17: 85; Hobbs S or Murry L E in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill New York N.Y., pp 191-196またはWeissbach and Weissbach (1988) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, New York, pp 421-463を参照されたい。

## 【0056】

融合ポリペプチド発現ベクターは、当業者に公知の多くの好適な方法のいずれかによって、選択された宿主細胞に導入され得る。融合ポリペプチドをコードするベクターを哺乳動物細胞に導入するために使用される方法は、ベクターの形態に依存する。プラスミドベクターの場合、例えば、脂質媒介性トランスフェクション（「リポフェクション」）、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーションまたはリン

10

20

30

40

50

酸カルシウム沈殿を含む多くのトランスフェクション法のいずれかによって、融合ポリペプチド配列をコードするDNAが導入され得る。これらの方は、例えば、上記のBrent et al.に詳述されている。多種多様な形質転換細胞および非形質転換細胞または初代細胞の一過性トランスフェクションに適したリポフェクション試薬および方法が広く利用可能であり、これにより、リポフェクションが、真核細胞、特に培養時の哺乳動物細胞に構築物を導入する魅力的な方法になる。例えば、LipofectAMINE(商標)(Life Technologies)またはLipotaxi(商標)(Stratagene)キットが利用可能である。リポフェクション用の試薬および方法を提供する他の企業には、Bio-Rad Laboratories、CLONTECH、Glen Research、In Vitrogen、JBL Scientific、MBI Fermentas、PanVera、Promega、Quantum Biotechnologies、Sigma-AldrichおよびWako Chemicals USAが含まれる。

10

20

#### 【0057】

組換え融合ポリペプチドの長期にわたる高収率の生成のためには、安定な発現が好ましい。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現制御要素(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)および選択可能なマーカーによって制御される融合ポリペプチドコード配列を用いて、宿主細胞を形質転換することができる。組換えベクター中の選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がそれらの染色体にベクターを安定に組み込むことを可能にする。一般的に使用される選択可能なマーカーには、アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo(Colberre-Garapin, et al., J. Mol. Biol., 150: 1, 1981)、およびハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygro(Santerre, et al., Gene, 30: 147, 1984)が含まれる。適切な選択により、トランスフェクトされた細胞は、融合ポリペプチドコード配列の組み込まれたコピーを含むことができる。

20

30

#### 【0058】

##### V. 医薬組成物および治療用途

本発明は、HIV-1感染を予防および治療するために、本明細書に記載のワクチンポリペプチドをコードする足場HIV-1免疫原ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを使用する医薬組成物および関連方法を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される免疫原は、医薬組成物に含まれる。医薬組成物は、治療用製剤または予防用製剤のいずれかであり得る。典型的には、組成物は、1つ以上の薬学的に許容されるビヒクルさらに含み、他の治療成分(例えば、抗生物質または抗ウイルス薬)をさらに含んでもよい。様々な薬学的に許容される添加剤も組成物に使用することができる。

30

40

#### 【0059】

本発明の医薬組成物のいくつかはワクチンである。ワクチン組成物については、適切なアジュバントをさらに含めることができる。好適なアジュバントの例には、例えば、水酸化アルミニウム、レシチン、フロイントアジュバント、MPL(商標)およびIL-12が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される足場HIV-1免疫原は、制御放出製剤または時間放出製剤として製剤化することができる。これは、徐放性ポリマーを含有する組成物中で、またはマイクロカプセル化送達系もしくは生体接着性ゲルを介して達成することができる。様々な医薬組成物は、当技術分野で周知の標準的な手順に従って調製することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19. sup. th Ed, Mack Publishing Company, Easton Pa, 1995; Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J R Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc, New York, 1978);米国特許第4,652,441号および米国特許第4,917,893号;米国特許第4,677,191号および米国特許第4,728,721号;な

50

らびに米国特許第4,675,189号を参照されたい。

#### 【0060】

本発明の医薬組成物は、対象のHIV-1感染を治療するため、または対象にHIV-1に対する免疫応答を誘発するための様々な治療用途または予防用途に容易に使用することができる。例えば、組成物を対象に投与して、HIV-1に対する免疫応答を誘発する、例えば、HIV-1に対する広域中和抗体の産生を誘導することができる。HIV感染を発症するリスクがある対象に対して、本発明のワクチン組成物を投与して、ウイルス感染に対する予防的保護を提供することができる。特定の対象および状態に応じて、本発明の医薬組成物は、当業者に公知の様々な投与方法、例えば、筋肉内、皮下、静脈内、動脈内、関節内、腹腔内または非経口経路により対象に投与することができる。一般に、医薬組成物は、そのような治療を必要とする対象に、選択された疾患もしくは状態またはその1つ以上の症状を予防、阻害および/または改善するのに十分な時間にわたり、およびそれらのために十分な条件下で投与される。免疫原性組成物は、HIV-1に対する免疫応答を誘発するのに十分な量で投与される。治療用途では、組成物は、本明細書に記載の治療有効量の足場HIV-1免疫原を含有するべきである。予防用途では、組成物は、本明細書に記載の予防的有効量の足場HIV-1免疫原を含有するべきである。免疫原の適切な量は、治療または予防される特定の疾患または状態、重症度、対象の年齢、および特定の対象の他の個人的属性（例えば、対象の健康の全般的状態および対象の免疫系の堅牢性）に基づいて決定することができる。効果的な投与量の決定はさらに、動物モデル試験、およびそれに続くヒトの臨床試験により導かれ、対象の標的疾患症状または状態の発生または重症度を顕著に低減する投与プロトコルにより導かれる。

10

20

30

40

50

#### 【0061】

予防用途では、免疫原性組成物は、何らかの症状の前に、例えば感染の前に提供される。免疫原性組成物の予防投与は、その後の何らかの感染を予防または改善するのに役立つ。したがって、いくつかの実施形態では、治療される対象とは、例えばHIVに対する曝露または曝露の可能性のために、HIV感染を有するか、HIV感染を発症するリスクがある対象である。開示された治療用組成物の治療有効量の投与後、対象は、HIV-1感染、HIV-1感染に関連する症状またはその両方に關してモニターされ得る。

#### 【0062】

治療用途では、免疫原性組成物は、疾患または感染の症状の発症時または発症後、例えば、HIV-1感染の症状の発現後、またはHIV-1感染の診断後に提供される。したがって、免疫原性組成物は、感染および/または関連する疾患症状の予測される重症度、持続時間または程度を低減するために、予測されるHIVウイルスに対する曝露の前に、ウイルスに対する曝露もしくはウイルスに対する曝露が疑われた後、または感染の実際の開始後に提供することができる。

#### 【0063】

本発明の医薬組成物は、HIV感染を治療または予防するために当技術分野で公知の他の薬剤と組み合わせることができる。これらには、例えば、抗体または他の抗ウイルス剤、例えば、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、例えば、アバカビル、AZT、ジダノシン、エムトリシタビン、ラミブジン、スタブジン、テノホビル、ザルシタビン、ジドブジンなど、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、例えば、デラビルジン、エファビレンツ、ネビラピン、プロテアーゼ阻害剤、例えば、アンブレナビル、アタザナビル、インジナビル、ロピナビル、ネルフィナビル、オサムプレナビル（osamprenavir）、リトナビル、サキナビル、チプラナビルなど、および融合タンパク質阻害剤、例えば、エンフビルチドなどが含まれる。医薬組成物および公知の抗HIV剤の投与は、同時または連続的のいずれかであり得る。

#### 【0064】

本発明のHIV-1ワクチン免疫原または医薬組成物は、キットの構成要素として提供され得る。そのようなキットは、追加の構成要素、例えばパッケージング、説明、ならびに様々な他の試薬、例えば、緩衝液、基質、抗体またはリガンド、例えば、対照抗体また

はリガンドおよび検出試薬を含んでもよい。キットには、任意の説明書をさらに提供することができる。

### 【0065】

#### [実施例]

以下の実施例は、本発明を例示するために提供されるが、本発明を限定するものではない。

### 【0066】

#### [実施例1]

##### UFO<sup>2</sup>-BG三量体の設計および特性評価

現在の三量体設計が直面する主要な障害は、それらが一度 BG505 から他の株に拡張されると、収率、純度および安定性が劣化することである。これまでに提案された解決策には、(1) bNAb アフィニティーカラム、ネガティブ選択、マルチサイクル SEC、および複合クロマトグラフィー法 (combined chromatographic approach) など、ミスフォールド Env タンパク質から天然様三量体を分離することを目的とした精製法、ならびに(2) 原子構造から情報を得るか、ライプラリースクリーニングから導き出される補助変異が含まれる。しかし、これらの解決策は本質的に経験的であり、三量体収率の低下、および Env 特性の予想外の変化などの最適でない結果をもたらすことが多い。本発明者らは、以前に、Env 準安定性の主因として HR1 ベンド (残基 547 ~ 569) を同定した (Kong et al., Nat Comm 7, 12040, 2016)。gp41 ECTO 中のこの構造的に歪んだ領域の合理的な再設計は、複数の HIV 1 株の三量体収率および純度を顕著に改善したが、依然としてミスフォールド Env の量が変化し、HR1 以外の他の領域も Env 準安定性に寄与することが示唆された。したがって、これらの「準安定性の二次因子」の源を明らかにすることが三量体設計にとって重要であることが証明される可能性がある。

### 【0067】

Env 準安定性のあらゆる因子が gp41 ECTO 内にコード化され、UFO 設計の BG505 gp41 ECTO (UFO<sup>2</sup>-BG と呼ばれる) を使用して多様な HIV 1 Env を安定化することができると仮定した。この仮説を検討するために、HIV 1 偽ウイルスの大規模パネルまたは利用可能なデータベース (https://www.hiv.lanl.gov) のいずれかから 5 つのクレード起源 (A, B, C, B/C および A/E) の 10 の Env を選択し、本発明者らの以前の試験で試験した 3 つの Env も含めた (Kong et al., Nat Comm 7, 12040, 2016)。注目すべきことに、ここで試験した 10 の Env のうち 7 つが、三量体安定化に対して重要な課題を提起している tier-2/3 分離株に由来した。各 Env について、SOSIP、UFO および UFO<sup>2</sup> BG 設計の gp140 構築物を Exp CHO 細胞内に一過性に発現させ、SOSIP 構築物に対してフューリンを同時トランスフェクトした。GNL 精製に続いて、比較のために Superdex 200 16/600 カラムから 30 の gp140 の SEC プロファイルを作成した。BG505 を除いて、SOSIP はいずれも凝集体の顕著な割合 (40 ~ 50 mol) を示し、これには極端に低い収率と、時に三量体ピークの欠如とが伴った。UFO は、クレード A/E 以外の三量体の収率および純度を著しく改善し、クレード C では最も目に見える改善が観察された。UFO<sup>2</sup> BG は、二量体および単量体の手掛けりを用いず、またはそれらのわずかな手掛けりを用いて 10 株のうち 8 株で極めて優れた三量体の純度および収率を示し、7 つの tier-2/3 分離株をいずれもカバーした。次いで、BN PAGE により 30 の gp140 構築物をいずれも特性評価した。全体的に、UFO<sup>2</sup> BG は SOSIP および UFO に関して二量体および単量体の含有量を劇的に減少させ、SEC 画分全体で三量体バンドを示したが、低分子量のかすかなバンドを時折示した。この発見に基づいて、GNL カラムから得られた総 Env タンパク質と、その後の SEC、および BN PAGE による画分分析後の三量体部分とを比較した。驚くべきことに、GNL 精製の簡単な工程は、tier-2 クレード B 株および tier-3 クレード B/C 株に由来する 2 つの UFO<sup>2</sup> BG 三量体を

10

20

30

40

50

除くいすれにも同等の純度をもたらした。次に、示差走査熱量測定 (DSC) により、8つの精製UFO<sup>2</sup>-BG三量体の熱安定性を評価した。特に、DSCプロファイルは、60.9~68.4の範囲の熱変性中点 (T<sub>m</sub>) を有するクレードノ株特異的パターンを示した。試験した8つの三量体のうち、UFO<sup>2</sup>-BGがUFOと同等であるBG505は、最も高いT<sub>m</sub> (68.4) をもたらし、2つのクレードC三量体 (65.2~66.2) がそれに続いた。追加の空洞充填変異体およびジスルフィド結合の非存在下では、DSCデータは大部分がWT Envの熱安定性を反映した。注目すべきことに、ここで試験したCN54 UFOおよびUFO<sup>2</sup>-BG構築物は14の変異体 (CN54M14) を含み、これにより、293F産生三量体の凝集体が減少する。さらに、293F細胞での発現、およびSEC精製のために、クレードB、CおよびB/Cの4つのUFO<sup>2</sup>-BG三量体を選択した。結果は、使用した細胞株に関係なくUFO<sup>2</sup>-BGは三量体特性を改善することができるが、Exp CHO系と併用した場合にのみ最高純度に達することを示し、BG505に対する本発明者らの発見と一致している。

#### 【0068】

したがって、結果から、gp41ECTOがEnv準安定性の唯一の源であり、UFO設計のBG505 gp41ECTOが多様なHIV-1 Envを安定化することができるという本発明者らの仮説が確認される。SEC精製の前後でほぼ同一の三量体純度は、UFO<sup>2</sup>-BG三量体のための単純で堅牢かつ費用効果の高い製造プロセスを示唆する。固有の三量体純度はまた、UFO<sup>2</sup>-BG三量体を発現する核酸ワクチンの開発および臨床試験を促進する。

10

20

#### 【0069】

##### [実施例2]

##### 多様なサブタイプからのUFO<sup>2</sup>-BG三量体のナノ粒子提示

本発明者らは、以前に報告した設計戦略 (He et al., Nat Comm 7, 12041, 2016) に従って、多様なHIV-1株に由来するUFO<sup>2</sup>-BG三量体が24量体フェリチン (FR) ナノ粒子上に提示され得るかどうかを検討した。本発明者らは、UFO設計のBG505 gp41ECTOが、gp140三量化およびナノ粒子集合の両方を促進することができるとの仮定する (図1A)。この仮説を試験するために、フェリチンサブユニットのN末端 (Asp5) に融合したgp41ECTO (残基664) のC末端を有する8つのUFO<sup>2</sup>-BG-FR構築物を設計した。得られた融合構築物をExp CHO細胞内に一過性に発現させた後、2G12アフィニティーカラムを使用して簡単に精製した。BN-PAGEは、試験した8つの株いすれについても、良好に形成されたUFO<sup>2</sup>-BG-FRナノ粒子に対応する高分子量の特徴的なバンドを示した。表面から突出したgp140三量体の規則的なアレイにより修飾した可視粒子コアを示すネガティブ染色EMによって、ナノ粒子集合を一定して確認した。DSC分析は、5つの全サブタイプに由来するUFO<sup>2</sup>-BG-FRナノ粒子の高い熱安定性を示し、T<sub>m</sub>は68~70の範囲であった。6つのbNAbおよび4つの非NAbのパネルを使用して、5つの代表的な設計についてUFO<sup>2</sup>-BG-FRナノ粒子の抗原性を評価した。全体的に、多価ディスプレイは天然様三量体抗原性を保持し、場合によってはそれを増強し、エピトープおよびサブタイプに特異的なパターンを示した。V2 apexでは、5つのナノ粒子がいすれもPGDM1400に結合し、個々の三量体と同等であるか、それよりも著しく高い親和性を示し、ナノ粒子表面に提示された三量体が天然様の閉じたコンホーメーションをとることが確認された。H078.14では、復元したbNAb結合はナノ粒子表面上の隣接三量体による影響を受けた立体配座平衡のシフトによって説明することができたが、Du172.17および93JP\_NH1では、親和性の増大は結合活性効果の結果であると考えられた。対照的に、別のapex bNAb、PG16に対するナノ粒子結合にはほとんど改善が見られなかった。N332超部位 (supersite) 超部位およびCD4bsでは、多価ディスプレイはH078.14 UFO<sup>2</sup>-BG三量体に対してさらに好ましい効果を示した。gp120 gp41界面部位では、UFO<sup>2</sup>-BG-FRナノ粒子はいすれも、2つの隣接したgp140プロトマーの要素を補充する

30

40

50

P G T 1 5 1への三量体結合を保持したが、1つのプロトマーのみと相互作用する3 5 0 2 2では、結合シグナルの交差クレード減少が観察された。非N A bでは、ナノ粒子は三量体に似た結合プロファイルを示した。

#### 【0 0 7 0】

次に、天然様E n v三量体の多価ディスプレイのための6 0 ユニット超安定ナノ粒子、I 3 0 1 (H s i a e t a l . , N a t u r e 5 3 5 , 1 3 6 - 1 3 9 , 2 0 1 6 )の有用性を検討した。対称性(12面体)およびサイズ(2 5 n m)に関して、I 3 0 1は本発明者らの以前の試験で試験した6 0 量体E 2 pナノ粒子に酷似しているが、それよりも安定性が高い(図1 E、左)。ただし、I 3 - 0 1サブユニットのN末端間の距離が約5 0 . 5 と大きいため、g p 1 4 0三量体のC末端に接続するには長いリンカーが必要である(図1 E、中央)。Tヘルパーエピトープは、g p 1 4 0とI 3 - 0 1サブユニット間のリンカーとしてだけでなく、組み込まれたTヘルプシグナルとしても使用され、堅牢なT細胞応答を誘発し、b N A bに向けてB細胞の発達を導くと仮定する。この仮説を試験するために、P a n D Rエピトープペプチド(P A D R E)、A K F V A A W T L K A A A(配列番号1)(A l e x a n d e r e t a l . , I m m u n i t y 1 , 7 5 1 - 7 6 1 , 1 9 9 4)ならびに2つの最近報告されたTヘルパーエピトープ、DおよびT p D(F r a s e r e t a l . , V a c c i n e 3 2 , 2 8 9 6 - 2 9 0 3 , 2 0 1 4)を選択して評価した(図1 E、右)。H R 1再設計B G 5 0 5 g p 1 4 0(K o n g e t a l . , N a t C o m m 7 , 1 2 0 4 0 , 2 0 1 6)、TヘルパーエピトープおよびI 3 - 0 1サブユニットを含む3つの融合構築物を設計した。E x p i C H O細胞内のフューリンの同時発現に続いて、2 G 1 2精製物質をS E Cによって特性評価した(図1 F)。驚くべきことに、B N - P A G E(図1 G)およびネガティブ染色E M(図1 h)によってさらに確認されるように、P A D R Eを含むI 3 - 0 1構築物は高純度のナノ粒子を生成した。b N A bおよび非N A bの同じパネルを使用して評価すると、このナノ粒子は、これまでに試験したいずれのナノ粒子にも観察されなかった強力なP G 1 6結合を有する極めて優れた抗原プロファイルを示した(図1 I)。

#### 【0 0 7 1】

要約すると、本発明者らの結果は、多様なH I V - 1株のU F O <sup>2</sup> - B G三量体がフェリチンナノ粒子上に提示され得ることを示している。さらに、I 3 - 0 1およびTヘルパーエピトープなどの超安定ナノ粒子を使用することにより、さらにバランスのとれたTおよびB細胞応答を有する多価H I V - 1ワクチンを開発するための新規プラットフォームを提供する。

#### 【0 0 7 2】

##### [実施例3]

###### ナノ粒子はb N A bを発現するB細胞を強力に活性化する

本発明者らは、以前に、様々なB G 5 0 5 g p 1 2 0およびg p 1 4 0ナノ粒子が、同種のV R C 0 1受容体を発現するB細胞に関与する可能性があることを示した(H e e t a l . , 2 0 1 6)。この試験では、個々の三量体に関して、5つのU F O <sup>2</sup> - B G - F Rナノ粒子およびB G 5 0 5 g p 1 4 0 - P A D R E - I 3 - 0 1ナノ粒子によるB細胞活性化を評価した(図2)。アッセイでは、b N A b P G T 1 4 5、V R C 0 1およびP G T 1 2 1(O t a e t a l . , J . I m m u n o l . 1 8 9 , 4 8 1 6 - 4 8 2 4 , 2 0 1 2)を発現するB細胞を使用した。全体的に、三量体提示ナノ粒子は、個々の三量体よりも効果的にb N A b発現B細胞を刺激することができ、ピークシグナルはイオノマイシンによる最大活性化に近づいた。ただし、この結果から、検討したエピトープに関連するパターンも明らかにされた。N 3 3 2超部位を認識するP G T 1 2 1を発現するB細胞を用いて試験すると、一部の三量体およびあらゆるナノ粒子が、検出可能なC a <sup>2</sup> + フラックスシグナルを示した。対照的に、V 2 a p e xおよびC D 4 b sをそれぞれ標的とするP G T 1 4 5およびV R C 0 1を発現するB細胞を活性化した三量体はほとんどなかった。注目すべきことに、H 0 7 8 . 1 4 U F O <sup>2</sup> - B G - F Rナノ粒子によるP G T 1 4 5発現B細胞の刺激は、a p e xがV 2変異を伴わず多価ディスプレイ

10

20

30

40

50

イによって復元され得るという追加の証拠を提供し、これはBLIデータと一致する（図1D）。同様の効果は、BLIにより、PGT121に弱くしか結合しないが、PGT121発現B細胞内で可視的で長期間持続するCa<sup>2+</sup>フラックスシグナルを誘導するクレードA/E 93JP\_NH1\_UFO<sup>2</sup> BG FRナノ粒子にも観察され、細胞表面上のB細胞受容体（BCR）の架橋が、固有の低親和性を克服するためにさらに役立ち得ることが示唆された。合わせて、生化学的、構造的および抗原的アプローチとB細胞活性化アッセイとを組み合わせることにより、インビボでのそれらのワクチン潜在力の検討を可能にするgp140ナノ粒子のパネルを確立した。

## 【0073】

## [実施例4]

10

野生型マウスを対象とした自己中和抗体の誘導

様々な形態の天然様Env三量体について、免疫原性が評価されてきた。SOSIP三量体により野生型マウスを免疫した場合、BG505.N332に対する自己tier-2 NAb反応は18週間にわたって観察されなかった（Hu et al., J Virol 89, 10383-10398, 2015）。良好に形成されたEnv三量体のグリカンシールドは、それらの短い重鎖相補性決定領域3（HCDR3）ループのため、マウス抗体に対して不透過性であるとの結論が下された。それにもかかわらず、ノックインbNAb前駆体を有するマウスでは、改変されたBG505 SOSIP三量体によってtier-2 NAbが誘発されることが報告された。6ヶ月から1年に及ぶワクチン接種レジメンを使用すると、天然様三量体が、ウサギでは自己tier-2 NAb反応を誘発し、マカクではさらに弱いそのような反応を誘発することも報告された（de Taeyle et al., 2015; Klasse et al., 2016; Martinez-Murillo et al., 2017; Pauthner et al., 2017; Sanders et al., 2015）。したがって、tier-2 NAbの誘導は、特にWTマウスモデルでは、依然としてHIV-1ワクチン開発に対する重要な課題である。

20

## 【0074】

ここでは、本発明者らは、UFO設計（Kong et al., 2016a）の中核であるHR1再設計を含むBG505 gp140三量体およびナノ粒子により、単純な6週間レジメンと血清IgG精製手順とを使用してWT BALB/cマウスを免疫して、非特異的抗ウイルス活性を排除した（図3A）。第1相狂犬病ワクチン試験（Wijaya et al., 2017）でT細胞応答および抗体反応の増強を示したヒトアジュvantであるPIKAを使用して、ヒト適合ワクチン製剤を得た。合計8つの三量体および4つのナノ粒子を試験し（図3B、上部）、ELISAによって抗原結合について群複合血清IgGを評価した（図3B、下部）。1つのV1V2プローブと2つのN332ナノ粒子プローブとを利用して、それぞれapexおよびN332超部位に対するB細胞応答を測定した（Morriss et al., 2017）。最初に、293 F産生プローブに対して特異的結合を示す293 FおよびExpICHO産生三量体（S1G3およびS1G4）によって誘発されたマウスIgGを検討し、グリコシル化およびB細胞応答の細胞株特異的パターンを確認した（図1Dおよび図1E）。3つの足場gp140.681三量体は、本発明者らの以前の報告（Morriss et al., 2017）と一致して、比較的低いEC50値（S1G5、S1G6およびS1G7）によって示されるように、マウスでは強力なIgG反応を誘発した。フェリチンナノ粒子（S2G1）は、N332超部位に対して比較的強力な抗体反応を誘発するように思われ、多価ディスプレイの正の効果が示唆された。3つのgp140-T-エピトープ-I3-01ナノ粒子（S2G5、S2G6およびS2G7）はいずれも、C末端（S1G8、S1G9およびS1G10）にPADRE、DおよびTpDエピトープを含むそれらのそれぞれの三量体よりも性能が優れていた。最後に、最初のスクリーニングでは、3~8mg/mlのIgG濃度でHIV-1中和について12の免疫群から得られた血清IgGを試験し、ナイーブ群を対照として含めた（S1G10）（図3C）。以前の陰性報告（Hu et al.

30

40

40

50

・、上記)とは対照的に、足場 g p 1 4 0 . 6 8 1 三量体 ( S 1 G 5 ) 、フェリチンナノ粒子 ( S 2 G 1 ) および 2 つの I 3 0 1 ナノ粒子 ( S 2 G 5 および S 2 G 6 ) について、自己 tier - 2 B G 5 0 5 . N 3 3 2 の中和が観察された。比較的低い I g G 濃度 ( 1 mg / ml ) で試験した場合、 S 1 G 5 は閾値直下でボーダーライン中和を示したが ( 図 3 D ) 、 S 2 G 1 の 1 例の対象 ( 図 3 E ) および S 2 G 5 の 2 例の対象 ( 図 3 F ) は、自己 tier - 2 B G 5 0 5 . N 3 3 2 に対して N A b を発現したように思われた。特に、 g p 1 4 0 - P A D R E - I 3 - 0 1 ナノ粒子は、極めて優れた純度、構造均一性および抗原性を示しただけでなく ( 図 1 、 図 1 E ~ 図 1 I ) 、わずか 8 週間後に tier - 2 N A b の急速な発現を示す I C 5 0 値をもたらした。これらのデータは、 g p 1 4 0 - P A D R E - I 3 - 0 1 ナノ粒子による免疫化が、ウサギ、 N H P およびヒトに対して、現在の三量体ワクチンよりも強力な tier - 2 N A b 反応を誘発し、範囲も改善される可能性が高いことを示唆している。

10

## 【 0 0 7 5 】

## [ 実施例 5 ]

H I V - 1 g p 1 4 0 三量体を提示するための他の超安定ナノ粒子

I 3 - 0 1 ナノ粒子に加えて、本明細書に記載の g p 1 4 0 - T ヘルパーエピトープナノ粒子プラットフォーム H I V - 1 ワクチン免疫原を構築するための他の安定なナノ粒子も検討した。具体的には、 2 . 3 0 分解能結晶構造を有するタンパク質「サーモトガ・マリティマ ( T h e r m o t o g a M a r i t i m a ) 由来の 2 - デヒドロ 3 デオキシホスホグルコン酸アルドラーーゼ 4 ヒドロキシ 2 オキソグルタル酸アルドラーーゼ ( T m 0 0 6 6 ) 」 ( P D B I D : 1 V L W ) を試験した。 1 V L W をコードする遺伝子配列を基礎として使用し、 2 . 3 0 分解能結晶構造を骨格として使用して、 I 3 0 1 よりも望ましい特性を有する 6 0 量体ナノ粒子に自動的に集合し得るタンパク質を設計した。集合に基づくタンパク質設計、または目視検査に続く手動設計に、 1 V L W 配列 ( 配列番号 5 ) 内の 1 1 個のアミノ酸を供した。 1 2 の設計された 1 V L W 変異体を合成した ( 配列番号 6 ~ 1 7 ) 。 g p 1 4 0 - P A D R E - I 3 - 0 1 ナノ粒子免疫原について上述したものと同じプロトコルを用いて、これらの配列のナノ粒子上に提示される g p 1 4 0 三量体の構築、ナノ粒子免疫原の発現、およびそれらの免疫原性を検討する。

20

## 【 0 0 7 6 】

1 V L W 野生型アミノ酸配列 ( 配列番号 5 ) ( 再設計に供される残基には下線が引かれている ) :

M K M E E L F K K H K I V A V L R A N S V E E A K E K A L A V F E G G V H L I  
E I T F T V P D A D T V I K E L S F L K E K G A I I G A G T V T S V E Q C R K A  
V E S G A E F I V S P H L D E E I S Q F C K E K G V F Y M P G V M T P T E L V K  
A M K L G H T I L K L F P G E V V G P Q F V K A M K G P F P N V K F V P T G G V  
N L D N V C E W F K A G V L A V G V G S A L V K G T P D E V R E K A K A F V E K  
I R G C T E

30

g p 1 4 0 三量体を提示するために再設計された 1 V L W 変異体 ( 配列番号 6 ~ 1 7 ) ( 改変された残基には二重下線が引かれている ) :

40

> 1 V L W - S S 1 ( 配列番号 6 )

M K M E E L F K K H K I V A V L R A N S V E E A K K K A L A V F L G G V H L I  
E I T F T V P D A D T V I K E L S F L K E M G A I I G A G T V T S V E Q C R K A  
V E S G A E F I V S P H L D E E I S Q F C K E K G V F Y M P G V M T P T E L V K  
A M K L G H T I L K L F P G E V V G P Q F V K A M K G P F P N V K F V P T G G V  
N L D N V C E W F K A G V L A V G V G S A L V K G T P C E V A C K A K A F V E K  
I R G C T E

> 1 V L W - M U T ( 配列番号 7 )

M K M E E L F K K H K I V A V L R A N S V E E A K W K A L A V F I G G V H L I  
E I T F T V P D A D T V I K E L S F L K E L G A I I G A G T V T S V E Q C R K A  
V E S G A E F I V S P H L D E E I S Q F C K E K G V F Y M P G V M T P T E L V K

50

AMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGV  
 NLDNVC EWFKAGVLA VGVGSALVKGTPAEVVEKAKAFV  
 IRGCTE

> 1VLW - JZ1 (配列番号 8 )

MKMEELFKKHKIVAVL RANSVEEAKMKALHVFSGGVHL  
 EITFTVPDADTVIKEL SFLKEQGAIIGAGTVTSVEQCRK  
 VESGAEFI VSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTELVK  
 AMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGV  
 NLDNVC EWFKAGVLA VGVGSALVKGTWDEVSRKAKAFV  
 IRGCTE

10

> 1VLW - JZ2 (配列番号 9 )

MKMEELFKKHKIVAVL RANSVEEAKWKALHVFTGGVHL  
 EITFTVPDADTVIKEL SFLKEQGAIIGAGTVTSVEQCRK  
 VESGAEFI VSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTELVK  
 AMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGV  
 NLDNVC EWFKAGVLA VGVGSALVKGTWHEVAAKAKAFV  
 IRGCTE

> 1VLW - JZ3 (配列番号 10 )

MKMEELFKKHKIVAVL RANSVEEAKMKALHVFTGGVHL  
 EITFTVPDADTVIKEL SFLKEWGAIIGAGTVTSVEQCRK  
 VESGAEFI VSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTELVK  
 AMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGV  
 NLDNVC EWFKAGVLA VGVGSALVKGTWDEVAAKAKAFV  
 IRGCTE

20

> 1VLW - JZ4 (配列番号 11 )

MKMEELFKKHKIVAVL RANSVEEAKKKKALAVFLAGVHL  
 EITFTVPDADTVIKEL SFLKEMGAIIGAGTVTSVEQCRK  
 VESGAEFI VSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTELVK  
 AMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGV  
 NLDNVC EWFKAGVLA VGVGSALVKGTVVEVAAKAAFV  
 IRGCTE

30

> 1VLW - JZ5 (配列番号 12 )

MKMEELFKKHKIVAVL RANSVEEAKKKKALAVFLGGVHL  
 EITFTVPDADTVIKEL SFLKEMGAIIGAGTVTSVEQCRK  
 VESGAEFI VSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTELVK  
 AMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGV  
 NLDNVC EWFKAGVLA VGVGSALVKGTIVEVAAKAAFV  
 IRGCTE

> 1VLW - JZ6 (配列番号 13 )

MKMEELFKKHKIVAVL RANSVEEAKKKKALAVFLGGVHL  
 EITFTVPDADTVIKEL SFLKEMGAIIGAGTVTSVEQCRK  
 VESGAEFI VSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTELVK  
 AMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGV  
 NLDNVC EWFKAGVLA VGVGSALVKGTWVEVAAKAAFV  
 IRGCTE

40

> 1VLW - JZ7 (配列番号 14 )

MKMEELFKKHKIVAVL RANSVEEAKMKALQVFVGGVHL  
 EITFTVPDADTVIKEL SFLKEAGAIIGAGTVTSVEQCRK  
 VESGAEFI VSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTELVK  
 AMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGV

50

N L D N V C E W F K A G V L A V G V G S A L V K G T L A E V A A K A E A F V E K  
I R G C T E

> 1 V L W - J Z 8 (配列番号 15)

M K M E E L F K K H K I V A V L R A N S V E E A K W K A L H V F V G G V H L I  
E I T F T V P D A D T V I K E L S F L K E A G A I I G A G T V T S V E Q C R K A  
V E S G A E F I V S P H L D E E I S Q F C K E K G V F Y M P G V M T P T E L V K  
A M K L G H T I L K L F P G E V V G P Q F V K A M K G P F P N V K F V P T G G V  
N L D N V C E W F K A G V L A V G V G S A L V K G T W A E V A A K A K A F V E K  
I R G C T E

> 1 V L W - J Z 9 (配列番号 16)

M K M E E L F K K H K I V A V L R A N S V E E A K M K A L A V F V G G V H L I  
E I T F T V P D A D T V I K E L S F L K E L G A I I G A G T V T S V E Q C R K A  
V E S G A E F I V S P H L D E E I S Q F C K E K G V F Y M P G V M T P T E L V K  
A M K L G H T I L K L F P G E V V G P Q F V K A M K G P F P N V K F V P T G G V  
N L D N V C E W F K A G V L A V G V G S A L V K G T I A E V A A K A A A F V E K  
I R G C T E

> 1 V L W - J Z 1 0 (配列番号 17)

M K M E E L F K K H K I V A V L R A N S V E E A K M K A L A V F Y G G V H L I  
E I T F T V P D A D T V I K E L S F L K E A G A I I G A G T V T S V E Q C R K A  
V E S G A E F I V S P H L D E E I S Q F C K E K G V F Y M P G V M T P T E L V K  
A M K L G H T I L K L F P G E V V G P Q F V K A M K G P F P N V K F V P T G G V  
N L D N V C E W F K A G V L A V G V G S A L V K G T F V E V A A K A A A F V E K  
I R G C T E

[実施例 6]

いくつかの例示的な実験手順

抗体 : b N A b および非N A b のパネルを利用して、様々な天然様三量体およびg p 1 40 ナノ粒子の抗原性を特性評価した。S c r i p p s R e s e a r c h I n s t i t u t e 内で得られたb N A b P G D M 1 4 0 0 、 P G T 1 4 5 、 P G T 1 2 1 および P G T 1 5 1 ならびに非N A b 1 9 b を除き、抗体はN I H A I D S R e a g e n t P r o g r a m ( <https://www.aidsreagent.org/> ) から要請された。

【0 0 7 7】

H I V - 1 E n v 三量体およびナノ粒子の発現および精製 : 結晶学的分析に使用される材料を除いて、H E K 2 9 3 F またはE x p i C H O 細胞 ( T h e r m o F i s h e r ) 内に三量体を一時的に発現させた。H E K 2 9 3 F 細胞内の三量体生成に使用されるプロトコルは以前に記載されている ( K o n g e t a l . , 上記 ; M o r r i s e t a l . , m B i o 8 , e 0 0 0 3 6 - 0 0 0 1 7 , 2 0 1 7 ) 。切断されたH R 1 再設計三量体では、トランスフェクション時にフューリンプラスミドを加えた。E x p i C H O 細胞内の三量体およびナノ粒子の生成に使用されるプロトコルは以下の通りである。要約すると、E x p i C H O 細胞を解凍し、3 7 、 1 3 5 r p m および 8 % C O 2 でシェーカーインキュベーター内で、E x p i C H O ( 商標 ) 発現培地 ( T h e r m o F i s h e r ) とともにインキュベートした。細胞が  $1 0 \times 1 0^6$  m l  $^{-1}$  の密度に達した際に、E x p i C H O ( 商標 ) 発現培地を加えて、トランスフェクションのために細胞密度を  $6 \times 1 0^6$  m l  $^{-1}$  に低下させた。製造元の指示に従って、E x p i C H O 細胞での 2 0 0 m l トランスフェクション用にE x p i F e c t a m i n e ( 商標 ) C H O / プラスミドD N A 複合体を調製した。S O S I P およびH R 1 再設計三量体、ならびにB G 5 0 5 H R 1 再設計三量体を提示するI 3 - 0 1 ナノ粒子では、1 5 . 4 m l の冷O p t i P R O ( 商標 ) 培地 ( T h e r m o F i s h e r ) 中で 1 6 0  $\mu$  g の抗原プラスミド、6 0  $\mu$  g のフューリンプラスミドおよび 6 4 0  $\mu$  l のE x p i F e c t a m i n e ( 商標 ) C H O 試薬を混合したのに対して、U F O およびU F O <sup>2</sup> 三量体ならびにU F O

10

20

30

40

50

<sup>2</sup> - B G - F R ナノ粒子では、フューリンを用いることなく 200  $\mu$ g の抗原プラスミドを使用した。1日目の最初のフィード後、Max Titer プロトコル (Thermo Fisher) に従って、32、120 rpm および 8% CO<sub>2</sub> でシェーカーインキュベーター内で ExpiCHO 細胞を培養し、5日目に追加のフィードを行った。トランスフェクションの 13 ~ 14 日後に培養上清を採取し、4000 rpm で 20 分間遠心分離することにより清澄化し、0.45  $\mu$ m フィルター (Thermo Fisher) を使用して濾過した。三量体では、ガランツス・ニバリス (Galanthus nivalis) レクチン (GNL) カラム (Vector Labs) を使用して上清から Endo v タンパク質を抽出したが、ナノ粒子では、2G12 アフィニティーカラムを使用して Endo v 融合タンパク質を精製した。Superdex 200 Increase 10/300 GL カラムまたは HiLoad 16/600 Superdex 200 PG カラム (GE Healthcare) を用いたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって、三量体をさらに精製してもよい。Superose 6 10/300 GL カラムを用いた SEC によって、I3-03 ナノ粒子の純度を特性評価した。三量体およびナノ粒子の両方について、理論吸光係数とともに UV<sub>280</sub> 吸光度を使用してタンパク質濃度を決定した。

#### 【0078】

総および部位特異的グリコシル化プロファイルの分析：HILIC - UPLC によって、ExpiCHO および 293 F 生成三量体の総グリカンプロファイルを作製した。ペプチド - N - グリコシダーゼ F (PNGase F) によるゲル内消化を介してエンベロープ糖タンパク質から N - 結合型グリカンを酵素的に放出させ、続いて 2 - アミノ安息香酸 (2-AA) を用いて蛍光標識し、HILIC - UPLC によって分析した。Endo H による放出されたグリカンの消化により、オリゴマンノース型グリカンの定量が可能になった。イオン移動度 MS を使用して PNGase F 消化によって三量体から放出されたグリカンを分析することによって、グリカンの組成を決定した。ナノエレクトロスプレーイオン源を備えた Waters Synapt G2 Si 質量分析計 (Waters Corp.) を用いて、陰イオン質量、衝突誘起解離 (CID) およびイオン移動度スペクトルを記録した。Waters Driftscope (バージョン 2.8) ソフトウェアおよび MassLynx (商標) (バージョン 4.1) をデータの取得および処理に使用した。以前に記載されているようにスペクトルを解釈した (Harvey et al., Anal Biochem 376, 44 - 60, 2008)。得られた結果を試料特異的グリカンライブラリーの作製の基礎とし、これをその後の部位特異的 N グリコシル化分析に使用した。部位特異的 N グリコシル化分析では、消化前に、三量体を変性させ、6 M 尿素および 5 mM ジチオトレイトール (DTT) を含有する 50 mM Tris / HCl、pH 8.0 緩衝液中で室温 (RT) で 1 時間インキュベートし、その後、20 mM ヨードアセトアミド (IAA) を加えて RT でさらに 1 時間暗所でインキュベートし、次いで DTT (20 mM) を加えてさらに 1 時間インキュベートすることによりアルキル化させて、残留 IAA を除去した。Vivaspin カラムを使用して、アルキル化三量体を pH 8.0 の 50 mM Tris / HCl 中に緩衝交換し、トリプシンおよびキモトリプシン (質量分析グレード、Promega) を用いて 1:30 (w/w) の比で別個に消化した。Proteo Extract Glycopeptide Enrichment キット (Merck Millipore) を使用して、プロテアーゼにより消化された試料から糖ペプチドを選択した。高エネルギー衝突解離 (HCD) フラグメンテーションを使用して、Orbitrap 融合質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて LC ESI MS によって濃縮糖ペプチドを分析した。Byonic (商標) (バージョン 2.7) および Byologic (商標) ソフトウェア (バージョン 2.3; Protein Metrics Inc.) を使用して、データ分析および糖ペプチド同定を行った。

#### 【0079】

) によって En v タンパク質およびナノ粒子を分析し、クーマシープルーザーを用いて染色した。タンパク質試料を G 2 5 0 ローディング色素と混合し、4 ~ 1 2 % Bi s - Tri s N u P A G E ゲル (Life Technologies) に加えた。製造元の指示に従って、Native PAGE (商標) ランニングバッファー (Life Technologies) を使用して、BN - PAGE ゲルを 1 5 0 V で 2.5 時間泳動させた。

#### 【0080】

示差走査熱量測定 (DSC) : 20 ~ 120 、 90 h<sup>-1</sup> の走査速度で PBS 緩衝液中で MicroCal VP キャピラリー熱量計 (Malvern) を使用して、UFO<sup>2</sup> - BG 三量体、UFO<sup>2</sup> - U 三量体および三量体提示ナノ粒子の熱安定性を測定した。VP キャピラリー DSC 自動データ分析ソフトウェアを使用してデータを分析した。

10

#### 【0081】

結晶化のためのタンパク質の生成および精製 : FreeStyle 293 S 細胞内にクレード B tier - 3 H 0 7 8 . 1 4 UFO<sup>2</sup> - BG 三量体を発現させ、2 G 12 結合アフィニティーマトリックス、続いてサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用して培養上清から精製した。Fab PGT 1 2 4 および 3 5 0 2 2 を哺乳動物 FreeStyle 293 F 細胞 (Invitrogen) に一過性にトランスフェクトし、LC - 捕捉選択カラムを使用して精製した後、Superdex 200 16 / 60 カラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーおよび SEC によってさらに精製した。H 0 7 8 . 1 4 UFO<sup>2</sup> - BG 三量体タンパク質と PGT 1 2 4 および 3 5 0 2 2 を 1 : 3 : 2 のモル比で室温で 30 分間混合することによって、三量体複合体を調製した。三量体複合体の不均一性を低減するために、エンドグリコシダーゼ H (New England Biolabs) を用いて、293 S 細胞内で生成された H 0 7 8 . 1 4 UFO<sup>2</sup> - BG . 6 6 4 に対して一晩 4 で脱グリコシル化を行った。SEC によって複合体をさらに精製した後に、三量体複合体を結晶試験に供した。

20

#### 【0082】

タンパク質の結晶化およびデータ収集 : SEC により精製した H 0 7 8 . 1 4 UFO<sup>2</sup> - BG 三量体複合体を約 5 mg / ml に濃縮した後、4 および 20 の両方で大規模な結晶化試験に供した。0.1 M 酢酸カルシウム、0.1 M MES (pH 6.0) 、1 5 % (v / v) PEG 4 0 0 から、UFO<sup>2</sup> - BG 三量体に結合した Fab PGT 1 2 4 および 3 5 0 2 2 を含むタンパク質複合体の結晶を得、これを採取し、25 % グリセロールを用いて凍結保護した後、液体窒素中で直ちにフラッシュ冷却した。現状では、最良の結晶は 6.20 の分解能で回折され、スタンフォードシンクロトロン放射光源のビームライン 1 2 2 でデータを収集し、HKL 2 0 0 0 を用いて処理し、単位格子定数 a = b = 1 2 9 . 3 、c = 3 1 4 . 5 で 9 9 . 7 % 完全な空間群 P 6 3 で索引付けした。

30

#### 【0083】

構造決定および精密化 : 3 5 0 2 2 : BG 5 0 5 SOSIP . 6 6 4 構造 (PDB : 5CEZ) の 1 つのプロトマーと PGT 1 2 4 Fab 構造 (PDB : 4R26) とを有する Phaser を使用した分子置換 (MR) によって、PGT 1 2 4 および 3 5 0 2 2 に結合した H 0 7 8 . 1 4 UFO<sup>2</sup> - BG 三量体構造を解いた。Phenix を使用して構造を精密化し、Coot をモデル構築に、MolProbity を構造検証に用いた。データセットの分解能が限られているため、残基精密化当たり 2 つの B 因子群を使用した。さらに、拘束の参照モデルセットを使用して、位置座標の精密化を行った。複合体構造の最終的な R<sub>c</sub> 値および R<sub>free</sub> 値は 25.0 % および 31.4 % である。PyMol および Chimera により図を作製した。結晶構造では、残基は Fab について Kabant 定義に従って、gp140 については HXBc2 システムに従って番号付けした。

40

#### 【0084】

ネガティブ染色電子顕微鏡法 : ネガティブ染色 EM によって UFO<sup>2</sup> - BG 三量体および三量体提示ナノ粒子を分析した。約 0.01 mg ml<sup>-1</sup> の三量体またはナノ粒子を

50

含有する  $3 \mu L$  アリコートを、 $20 \text{ mA}$  で  $30$  秒間グロー放電させた炭素被覆  $400 \text{ Cu}$  メッシュグリッド上に  $15$  秒間適用し、次いで  $2\%$  (w/v) ギ酸ウラニルを用いて  $30$  秒間ネガティブ染色した。検体面上で  $2.05$  のピクセルサイズをもたらす約  $25 \text{ e}^{-} \cdot \text{nm}^2$  の電子線量および  $52,000$  倍の倍率を用いて  $120 \text{ kV}$  で作動する FEI Tecnai Spirit 電子顕微鏡を使用してデータを収集した。 $1500 \text{ nm}$  の公称焦点ずれ (nominal defocus) と Legi onon パッケージとを使用して、Tietz 4k  $\times$  4k TemCam-F416 CMOS カメラを用いて画像を得た。Dog Picker を使用して生の顕微鏡写真から UFO<sup>2</sup>-BG 三量体粒子を自動的に選択させ、Appion Manual Picker を使用して三量体提示ナノ粒子を手動で選択した。ソフトウェアパッケージを使用して両方を粒子スタック内に入れた。反復多変量統計分析 (MSA) / 多参照アライメント (MRA) により 2 つの瓶に分割され、クラスにソートされた粒子を使用して、無参照 2 次元 (2D) クラス平均を計算した。三量体の質を分析するために (天然様および非天然)、以前に記載されたように (de Taeye et al., Cell 163, 1702-1715, 2015) 無参照 2D クラス平均を目視検査した。

#### 【0085】

バイオレイヤー干渉法 (BLI) : Octet Red96 装置 (forteBio, Pall Life Sciences) を使用して、bNAb および非NAb に対する三量体およびナノ粒子の結合の動態を測定した。アッセイはいずれも、ForteBio  $1 \times$  動態バッファー中で  $1000 \text{ rpm}$  に設定した攪拌により行った。すべての溶液の最終容量は  $200 \mu L$  / ウェルであった。アッセイは、固体黒色 96 ウェルプレート (Geiger Bio-One) で  $30$  で行った。抗ヒトFc捕捉バイオセンサー (AHC) の表面に、 $1 \times$  動態バッファー中の  $5 \mu \text{g mL}^{-1}$  の抗体を  $300$  秒間ローディングした。 $60$  秒間のバイオセンサーベースライン工程を適用してから、溶液中のバイオセンサー上の抗体と抗原との結合を  $200$  秒間にわたり分析した。サイズに応じて、三量体では  $200 \text{ nM}$ 、ナノ粒子では  $14 \sim 35 \text{ nM}$  から開始する抗原の 2 倍濃度勾配を 6 滴定系列に使用した。相互作用の解離を  $300$  秒間追跡した。抗体がローディングされたが抗原とともにインキュベートされなかったセンサー、および抗体を含まないが抗原とともにインキュベートされたセンサーに関して記録された平均シフトを差し引くことによって、ベースライン変動の補正を行った。forteBio のデータ取得ソフトウェア v.8.1 によって Octet データを処理した。注目すべきことに、apex 指向 bNAb では、 $2:1$  相互作用を表す結合方程式を用いて実験データを適合させて、最適適合結果を達成した。

#### 【0086】

B 細胞活性化アッセイ : PGT121、PGT145 または VRC01 を発現する K46 B 細胞株の生成は以前に記載されている (Ota et al., J. Immunol. 189, 4816-4824 2012)。要約すると、 $10\%$  FCS、Pen/Strep 抗生物質、および  $2 \mu \text{g mL}^{-1}$  ピューロマイシン (Gibco) を補充した advanced DMEM (Gibco) 中に、ドキシサイクリン誘導型の bNAb B 細胞受容体 (BCR) を発現する K46 細胞を維持した。細胞を  $1 \mu \text{g mL}^{-1}$  ドキシサイクリン (Clontech) 中で一晩処理して、ヒト BCR 発現を誘導した。 $37$  で  $1 \mu \text{M}$  の Indo-1 (Molecular Probes) を  $1$  時間ローディングした後、 $10 \mu \text{g mL}^{-1}$  の濃度の示された薬剤、すなわち、抗マウス IgM (Jackson Immuno Research)；C 末端に融合された T ヘルパーエピトープ (PADERE) を有する UFO<sup>2</sup>-BG または HR1 再設計 gp140 三量体；HR1 再設計 gp140 三量体を提示する UFO<sup>2</sup>-BG-FR または I301 ナノ粒子を用いて、洗浄した細胞を刺激した。LSR II フローサイトメーター (BD) を用いてカルシウム動員を評価した。各操作では、未刺激 B 細胞を最初に  $60$  秒間記録し、試験用免疫原を加え、十分に混合し、 $180$  秒間記録した後、 $1 \mu \text{g mL}^{-1}$  イオノマイシン (Sigma)  $1 \mu \text{L}$  を加え、さらに  $60$  秒間記録して indo のローディングを確認した。

10

20

30

40

50

## 【0087】

マウスの免疫化および血清 IgG 精製：Jackson Laboratory から 7 週齢の BALB/c マウスを購入した。承認された IACUC プロトコルおよび AAALAC ガイドラインに準拠して、TSRI の環境制御室内の換気ケージにマウスを収容した。製造元の指示に従って、0 週目に、腹腔内 (i.p.) 経路を介して、50 μg の抗原および 100 μl の Addavax アジュvant (Invivogen) または 50 μl の PIKA アジュvant (Yisheng Biopharma) を含有する 200 μl の抗原 / アジュvant 混合物を用いて、各マウスを免疫した。3 週目および 6 週目に、Addavax または PIKA アジュvant に配合された 50 μg の抗原を用いて動物を追加免疫した。8 週目に、ヘパリン処理した毛細管を使用して、眼窩後膜 (retro orbital membrane) を通して動物を最終的に採血した。試料を等量の PBS で希釈し、次いで 15 ml の SepMate チューブ (StemCell) 内で 4.5 ml の Ficoll / Histopaque 上に重層し、1200 RPM で 20 分で 10 分間遠心して、血漿および細胞を分離した。血漿を 56 度で 1 時間加熱不活化し、1200 RPM で 10 分間遠心し、滅菌濾過した。細胞を PBS で 1 回洗浄した後、1 ml の ACK 赤血球溶解緩衝液 (Lonza) に再懸濁した。PBS で 2 回洗浄した後、PBMC を 2 ml の Bambanker Freezing Media (Lymphotec Inc.) に再懸濁した。脾臓も採取し、40 μm のセルストレーナー (BD Falcon) に接地して細胞懸濁液に脾細胞を放出した。細胞を遠心分離し、PBS で洗浄し、次いで製造元の仕様に従って 10 ml の RBC 溶解緩衝液を用いて処理し、細胞凍結のために Bambanker Freezing Media に再懸濁した。製造元の指示に従って 0.2 ml プロテイン G スピンキット (Thermo Scientific) を使用して、マウス 1 匹当たりの全血清の 1/3、すなわち血清 600 μl を精製した。ELISA および HIV-1 中和アッセイによる特性評価のために、各群内のマウス 4 匹から得られた精製血清 IgG を組み合わせた。

## 【0088】

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)：まず、0.2 μg の適切な抗原を含有する 50 μl の PBS を用いて、Costar (商標) 96 ウェルアッセイプレート (Corning) の各ウェルをコーティングした。プレートを 4 度で一晩インキュベートし、次いで、PBS および 0.05% (v/v) Tween 20 を含有する洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。次いで、PBS、20 mg ml⁻¹ プロッティンググレードプロッカー (Bio-Rad) および 5% (v/v) FBS からなる 150 μl のプロッキング緩衝液を用いて、各ウェルをコーティングした。プロッキング緩衝液とともにプレートを室温で 1 時間インキュベートし、次いで、洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。精製されたマウス IgG をプロッキング緩衝液中で最大濃度 100 μg ml⁻¹ に希釈し、その後 10 倍希釈系列を作製した。各抗体希釈液について、合計 50 μl の容量を適切なウェルに加えた。各プレートを室温で 1 時間インキュベートした後、洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。次いで、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) により標識されたヤギ抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories) の 1:2000 希釈液を洗浄緩衝液中で作製し、この希釈した二次抗体 50 μl を各ウェルに加えた。二次抗体とともにプレートを室温で 1 時間インキュベートし、次いで洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。最後に、50 μl の TMB (Life Sciences) を用いて 3~5 分間ウェルを反応させた後、50 μl の 2N 硫酸を用いて反応を停止させた。得られたプレートの読み取り値を 450 nm の波長で測定した。

## 【0089】

偽ウイルスの生成および中和アッセイ：前述のように、HIV-1 Env 発現プラスミドおよび Env 欠損ゲノム骨格プラスミド (pSG3 Env) により 293 T 細胞をトランスフェクションすることにより、偽ウイルスを生成した。中和アッセイに使用するために、トランスフェクションの 72 時間後に偽ウイルスを採取した。前述のように、1 回の複製偽ウイルスアッセイおよび TZM-bl 標的細胞を使用して、精製マウス血清

10

20

30

40

50

IgGの中和活性を評価した。要約すると、TZM-b1細胞を96ウェル平底プレートに播種した。このプレートに偽ウイルスを加え、これをマウス血清IgGの連続希釈液とともに37℃で1時間プレインキュベートした。溶解、およびBright-Glo(商標)ルシフェラーゼ基質(Prromega)の添加により、感染72時間後にルシフェラーゼレポーター遺伝子発現を定量した。IC50値を決定するために、非線形回帰により用量反応曲線を適合させた。

#### 【0090】

マウスレバートリーシーケンシングおよびバイオインフォマティクス分析：前述のように、マウスB細胞レバートリーのアンバイアストシーケンシング(unbiased sequencing)のために5'-RACEプロトコルを開発した。要約すると、RNeasy Miniキット(Qiagen)を用いて、各マウスの総PBMCから30μlの水にRNA(mRNAを含む)を抽出した。SMARTer RACE cDNA増幅キット(ClonTech)を用いて5'-RACEを行った。総容量50μlのPlatinum Taq High-Fidelity DNAポリメラーゼ(Life Technologies)、鑄型として5μlのcDNA、1μlの5'-RACEプライマー、および1μlの10μMリバースプライマーを用いて免疫グロブリンPCRを設定した。5'-RACEプライマーにはPGM/S5P1アダプターを含め、リバースプライマーにはPGM/S5Aアダプターを含めた。重鎖の5'-RACE PCR処理用のリバースプライマーとして、マウスの3'-C1-3および3'-C<sub>μ</sub>インナープライマーを適合させた。合計25サイクルのPCRを行い、予測されるPCR産物(500~600bp)をゲル精製した(Qiagen)。Ion S5システムを用いてNGSを行った。要約すると、Qubit(登録商標)dsDNA HSアッセイキットとともにQubit(登録商標)2.0蛍光光度計を使用して、同一群から得られた重鎖ライブラリーを定量し、次いで、シーケンシングのために1:1:1:1の比を使用して混合した。Ion 520/530 Extキットを使用してIon Chefを用いて鑄型調製(Ion 520)およびチップローディングを行い、続いてデフォルト設定のIon S5システムを用いてシーケンシングを行った。マウスアンチボディオミクスピライpline(mouse antibodyomics pipeline)を使用して、生データを処理し、重鎖生殖細胞系遺伝子利用の分布を決定した。

#### 【0091】

##### [実施例7]

###### Tヘルパーエピトープを封入したナノ粒子

HIV-1 gp140とナノ粒子骨格とを接続するリンカーとしてのTヘルパーエピトープの使用は、望ましい抗原性および免疫原性特性を有するHIV-1三量体提示ナノ粒子を生成したが(図1~図3)、このようなナノ粒子の集合はナノ粒子表面に露出した疎水性Tヘルパーエピトープの影響を受けるように思われた。ナノ粒子集合および純度を改善するために、T細胞ヘルパーエピトープをナノ粒子ワクチンの設計に組み込むための代替戦略を検討した。外側表面上の抗原とナノ粒子骨格との間にTヘルパーエピトープを挿入する代わりに、短い柔軟なペプチドスペーサーを介してナノ粒子サブユニットのC末端に、このTヘルパーエピトープを遺伝的に融合した。予測される結果は、外側表面上に提示された20のHIV-1 gp140三量体、およびナノ粒子シェル内に封入された60の疎水性Tヘルパーエピトープを有するナノ粒子ワクチンである(図4A)。この設計は、E2pおよびI3-01の両方が中空内部を有する大きな60量体ナノケージであり、ほとんどすべてのタンパク質が溶液中での安定性を達成するために疎水性コアと荷電/親水性表面とを好むという観察に基づいて考案された。

#### 【0092】

全反応性TヘルパーエピトープPADEREを用いて、この戦略を試験した。構築物設定では、いずれもスペーサーの前に酵素部位(AS)を含む1Gスペーサー(E2pの場合)または10aaaGGGGSGGGGSスペーサー(I3-01の場合)を用いて、ナノ粒子サブユニットのN末端にHIV-1 BG505 gp140のC末端を融合し、

10

20

30

40

50

次いで、5 a a G G G G Sスペーサーを用いて、ナノ粒子サブユニットのC末端にP A D R EのN末端を融合した。得られた2つの融合構築物を25m1のE x p i C H O細胞内に一過性に発現させ、2G12抗体アフィニティーカラムを使用して精製した。S u p e r o s e 6 1 0 / 3 0 0 G Lカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィー( S E C )によって、得られたタンパク質を分析した。両構築物について、良好に形成されたナノ粒子に対応する6~7mLのピークが観察された(図4B)。比較的小規模なトランスフェクション(図1Fの25m1対100m1)を考慮すると、実際のナノ粒子の収率は、Tヘルパー-エピトープがナノ粒子の外部のリンクマーとして使用される設計と比較して著しく改善された。ネガティブ染色EMによって、2G12により精製されたナノ粒子をさらに分析した。表面にスパイクを有する完全に集合したナノ粒子は、ネガティブ染色EMから得られた生の顕微鏡写真から認識することができる(図4C)。まとめると、S E CおよびEMデータから、Tヘルパー-エピトープ封入が、T細胞ヘルプを組み込んだH I V-1ナノ粒子ワクチンを設計するための有効な戦略を提示する可能性があることが確認された。

10

20

30

#### 【0093】

短いペプチドスペーサーを介して、自己集合ナノ粒子のサブユニットのC末端にTヘルパー-エピトープを融合することができる。上記のナノ粒子のサブユニットのN末端にH I V-1 g p 1 4 0のC末端を融合することができる。これらの融合サブユニットがナノ粒子に集合すると、ナノ粒子の外側表面上に8個または24個のH I V-1 g p 1 4 0三量体が提示され、ナノ粒子シェル内部に24個または60個のTヘルパー-エピトープが封入される。ナノ粒子の外側表面上のH I V-1 g p 1 4 0三量体は抗H I V-1 B細胞応答を誘発し、ナノ粒子内部のTヘルパー-エピトープの高密度クラスターはナノ粒子タンパク質の消化時に広範囲な反応性T細胞応答を誘発する。

#### 【0094】

このように、本発明は広範囲に開示され、上記の代表的な実施形態を参照して例示されている。本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明に様々な変更を加えることができることが理解される。

#### 【0095】

さらに、本明細書に引用されているすべての刊行物、配列アクセション番号、特許および特許出願は、それぞれが個々にそのように示されているかのように、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれることに留意されたい。参照により本明細書に組み込まれる本文に含まれる定義は、本開示における定義と矛盾する場合には除外される。

40

50

## 【図面】

## 【図 1 - 1】

UFO-BG-ER	1) n-r-A_BG05	2) n-r-A_98450	3) n-r-B_62403815	4) n-r-E_H0784	5) n-r-C_D017217	6) n-r-C_C_605523	7) n-r-BIG_CH1612	8) n-r-AM_93IP_NH
-----------	---------------	----------------	-------------------	----------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------

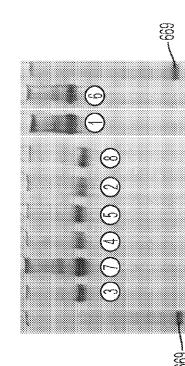


FIG. 1B

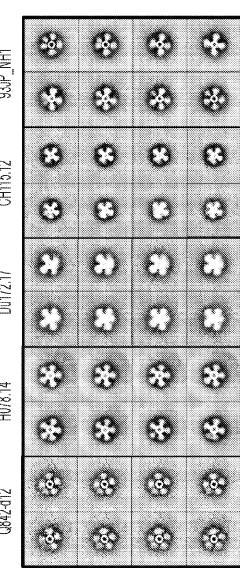


FIG. 1C

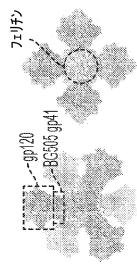


FIG. 1A

## 【図 1 - 3】

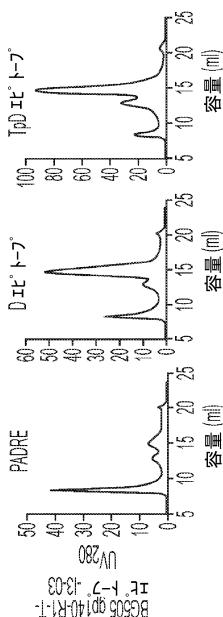


FIG. 1F

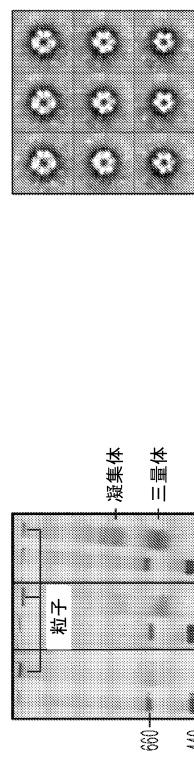


FIG. 1H

## 【図 1 - 4】

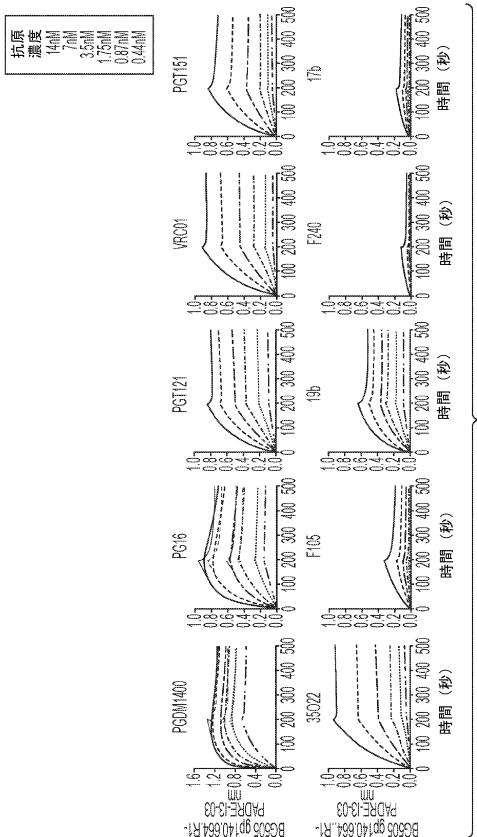


FIG. 1I

40

FIG. 1G

## 【図 1 - 4】

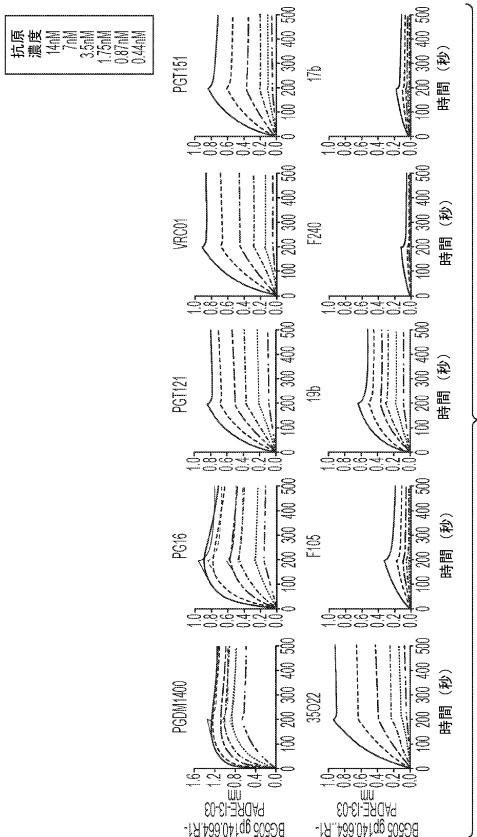


FIG. 1I

30

## 【図 1 - 2】

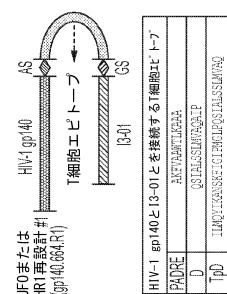


FIG. 1D

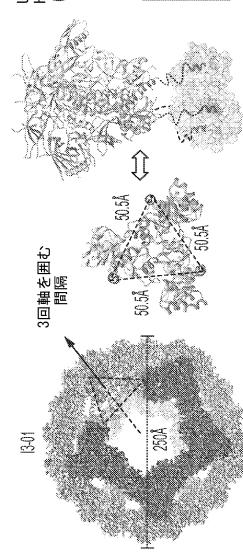


FIG. 1E

10

20

【図 2-1】

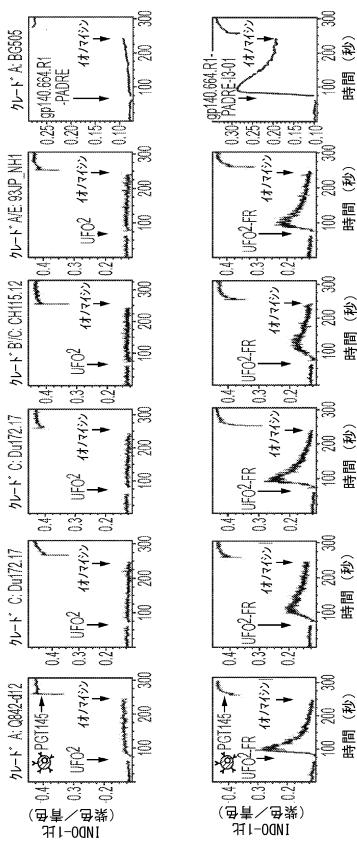


FIG. 2A

【図 2-3】

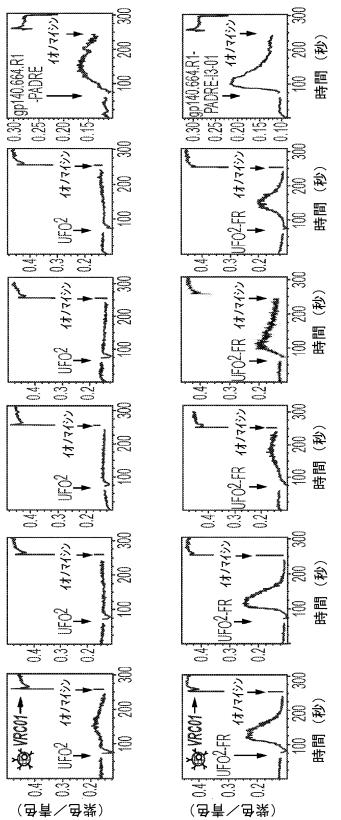


FIG. 2C

【図 2-2】

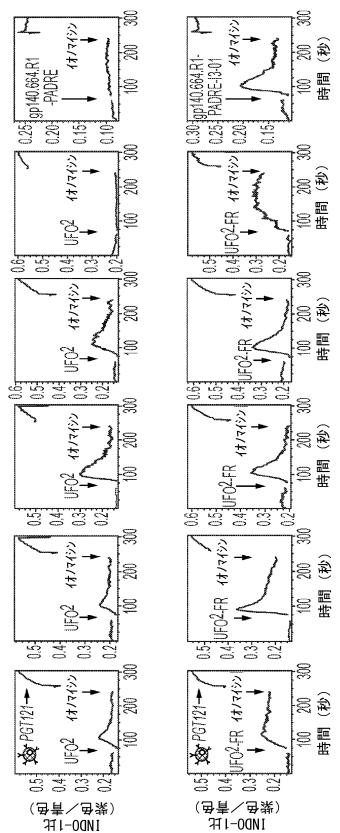


FIG. 2B

【図 3-1】

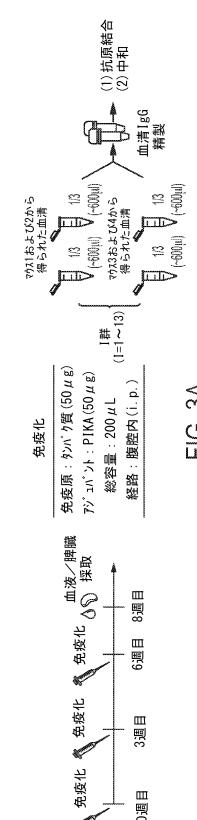


FIG. 3A

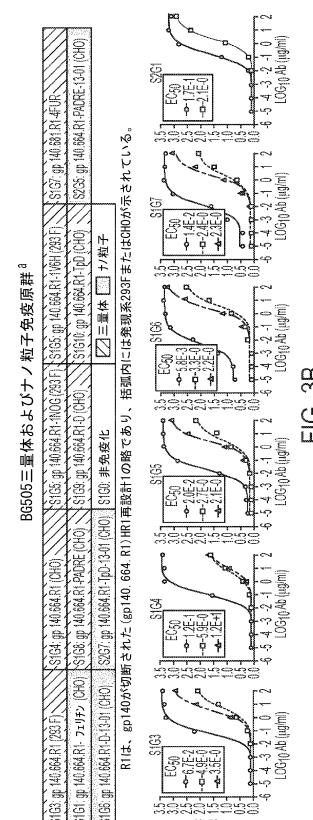
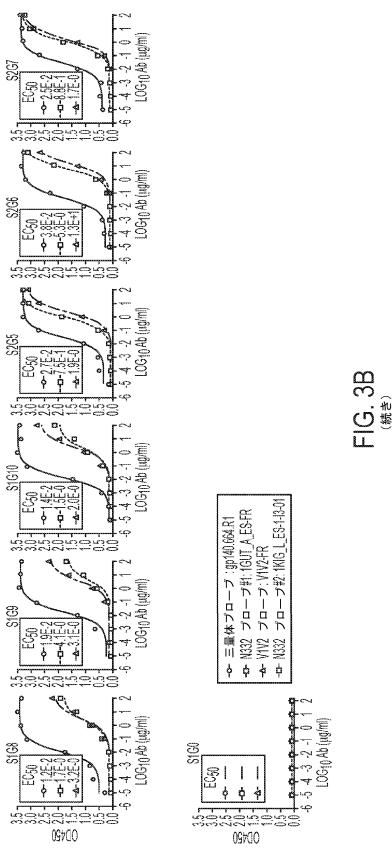
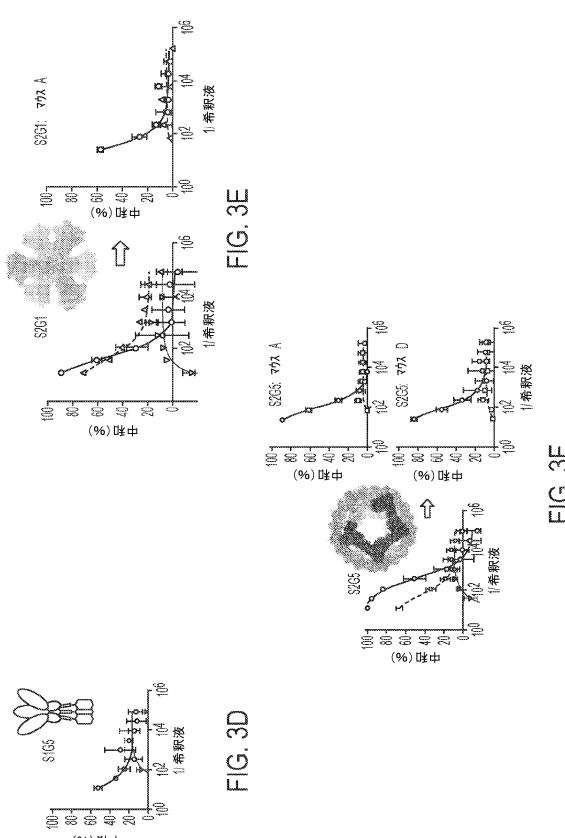


FIG. 3B

【図3-2】

FIG. 3B  
(続き)

【図3-4】



【図3-3】

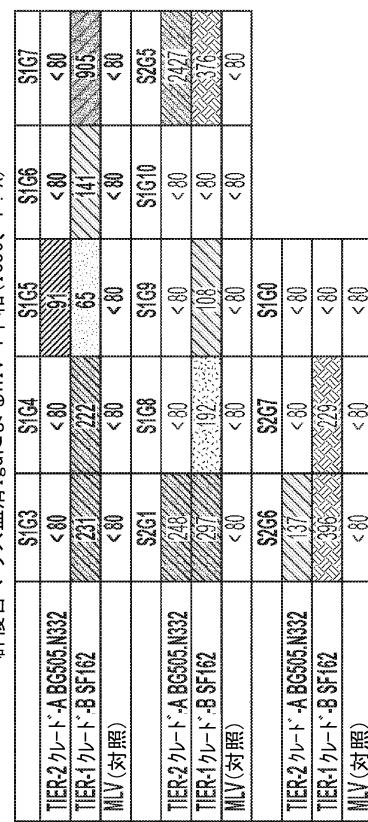


FIG. 3C

【図4】

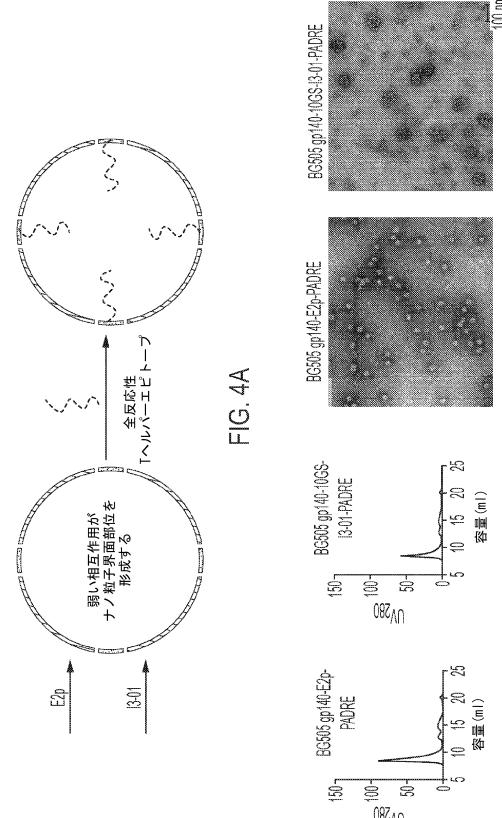


FIG. 4B

FIG. 4C

【配列表】

2023156458000001.app

【外国語明細書】

2023156458000014.pdf

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F	I
C 07 K	14/16	(2006.01)
A 61 K	39/21	(2006.01)
A 61 P	31/18	(2006.01)
A 61 P	37/04	(2006.01)
A 61 K	39/39	(2006.01)
A 61 K	9/14	(2006.01)

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ジュー, ジャン

アメリカ合衆国、カリフォルニア、サン・ディエゴ、ロビンズ・ストリート・4267

(72)発明者 ホー, リンリン

アメリカ合衆国、カリフォルニア、サン・ディエゴ、ロビンズ・ストリート・4267