

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-506926

(P2010-506926A)

(43) 公表日 平成22年3月4日(2010.3.4)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 39/39 (2006.01)</b>	A 61 K 39/39	4 C 085
<b>A61K 39/02 (2006.01)</b>	A 61 K 39/02	4 H 045
<b>A61K 39/12 (2006.01)</b>	A 61 K 39/12	
<b>A61K 39/00 (2006.01)</b>	A 61 K 39/00	A
<b>A61K 39/145 (2006.01)</b>	A 61 K 39/145	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号	特願2009-533371 (P2009-533371)	(71) 出願人 501224039 アンティジエン・エクスプレス・インコ ポーレーテッド アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0160 5-4306ウスター・ワンイノベーショ ンドライブ
(86) (22) 出願日	平成19年10月18日 (2007.10.18)	(74) 代理人 110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成21年2月13日 (2009.2.13)	(72) 発明者 ロバート・ハンフリーズ アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0219 9ボストン・ビーオー ボックス990423
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/022230	
(87) 国際公開番号	W02008/060385	
(87) 国際公開日	平成20年5月22日 (2008.5.22)	
(31) 優先権主張番号	11/582,596	
(32) 優先日	平成18年10月18日 (2006.10.18)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 I i - K e y 増強ワクチンの効力

## (57) 【要約】

目的の病原体のためのワクチンを被験体がその後受領する前に被験体の免疫系を I i - K e y ハイブリッドペプチド構築物で最初に予備刺激する、ワクチンの効力の増大方法が開示される。該ワクチンは病原体のゲノムによりコードされるタンパク質若しくはその一部分から構成される。該ワクチンは病原体のタンパク質をコードする D N A から構成される D N A ワクチンでもまたありうる。I i - K e y ハイブリッドペプチド構築物は、I i - K e y タンパク質の L R M K 残基、およびワクチンに使用されるタンパク質若しくはその一部分の M H C クラス I I エピトープを包含する。I i - K e y 構築物は I i - K e y ハイブリッドペプチドをコードする核酸構築物の形態で投与しうる。I i - K e y ペプチドでのプライミングは r H A タンパク質ならびに H A および H I V D N A ワクチンの免疫原性を高める。病原体が H I V 若しくは H 5 N 1 を包含する A 型インフルエンザである、ワクチンプロトコルでの I i - K e y ハイブリッド構築物の使用に関する方法が記述される。I i - K e y ハイブリッドの M H C クラス I I エピトープが A 型インフルエンザによりコードされる赤血球凝集素若しくは H I V によりコードされる G a g タンパク質である方法および組成物が記述される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体における目的の病原体に向けられるワクチンの効力の増大方法であって、該方法は

a) ワクチンを提供することであって、該ワクチンは病原体のゲノムによりコードされるエピトープ含有タンパク質若しくはその一部分、またはそれをコードするDNAを含んでなり；

b) i) Ii-keyタンパク質のLRMK残基；および

i) 段階a)のタンパク質若しくはその部分内に含有されるMHCクラスIIエピトープ

10

または

i) およびii)のエレメントをコードするDNA

を含んでなるIi-keyハイブリッド構築物を提供すること。

c) 被験体における免疫応答の刺激に適切な条件下で段階b)のIi-key構築物を投与することにより被験体の免疫系を予備刺激すること；

d) 段階c)の免疫応答を追加免疫するのに適切な条件下で段階a)のワクチンを投与して、それにより予備刺激されない投与に関してワクチンの効力を増大させることを含んでなる、上記方法。

**【請求項 2】**

段階a)のタンパク質が組換えDNA技術により製造される、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 3】**

ワクチンがDNAワクチンであり、かつ、コドン使用頻度が被験体のコドンの優先性に一致するように最適化されている、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

病原体がウイルスである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

病原体が細菌である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

被験体が哺乳動物である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

被験体がヒトである、請求項1に記載の方法。

30

**【請求項 8】**

被験体がトリである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

トリが家禽である、請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

病原体がA型インフルエンザである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

段階a)のタンパク質が赤血球凝集素である、請求項10に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

段階a)のタンパク質がノイラミニダーゼである、請求項10に記載の方法。

**【請求項 13】**

A型インフルエンザ病原体が株H5N1である、請求項10に記載の方法。

**【請求項 14】**

段階a)のタンパク質が赤血球凝集素である、請求項13に記載の方法。

**【請求項 15】**

段階a)のタンパク質がノイラミニダーゼである、請求項13に記載の方法。

**【請求項 16】**

MHCクラスIIエピトープが残基GLSLWMCSNを含んでなる、請求項14に記載の方法。

50

**【請求項 17】**

MHC クラス II エピトープが残基 F R N V I W L I K を含んでなる、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 18】**

MHC クラス II エピトープが残基 S G R M E F F W T を含んでなる、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 19】**

病原体が H I V である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 20】**

段階 a ) のタンパク質が g a g である、請求項 19 に記載の方法。

10

**【請求項 21】**

MHC クラス II エピトープが残基 D R F Y K T L R A を含んでなる、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 22】**

段階 c ) と d ) の間に、 I i - K e y タンパク質の L R M K 残基および MHC クラス I エピトープ g a g 1 9 8 を含んでなる I i - k e y ハイブリッドで被験体を再刺激することをさらに含んでなる、請求項 21 に記載の方法。

**【請求項 23】**

段階 c ) と d ) の間に、 MHC クラス II エピトープが残基 D R F Y K T L R A を含んでなる段階 b ) の I i - k e y ハイブリッドで被験体を再刺激することをさらに含んでなる、請求項 21 に記載の方法。

20

**【請求項 24】**

目的の病原体に向けられるワクチンの予備刺激における使用のための組成物であって、該組成物は製薬学的に許容できる担体中に I i - k e y ハイブリッド構築物を含んでなり、該 I i - k e y ハイブリッド構築物が

a ) I i - k e y タンパク質の L R M K 残基；および

b ) A 型インフルエンザの H 5 N 1 株によりコードされる赤血球凝集素 MHC クラス II エピトープ；

若しくは a ) および b ) のエレメントをコードする DNA

を含んでなる、上記組成物。

30

**【請求項 25】**

MHC クラス II エピトープが残基 G L S L W M C S N を含んでなる、請求項 24 に記載の組成物。

**【請求項 26】**

MHC クラス II エピトープが残基 F R N V I W L I K を含んでなる、請求項 24 に記載の組成物。

**【請求項 27】**

MHC クラス II エピトープが残基 S G R M E F F W T を含んでなる、請求項 24 に記載の組成物。

**【請求項 28】**

I i - k e y ハイブリッド構築物が a ) および b ) のエレメントをコードする DNA を含んでなり、ならびに、コドン使用頻度が被験体の優先性に一致するように最適化されている、請求項 24 に記載の組成物。

40

**【請求項 29】**

目的の病原体に向けられる DNA ワクチンの予備刺激における使用のための組成物であって、該組成物は製薬学的に許容できる担体中に I i - k e y ハイブリッド構築物を含んでなり、該 I i - k e y ハイブリッド構築物が

a ) I i - k e y タンパク質の L R M K 残基；および

b ) H I V によりコードされる g a g MHC クラス II エピトープ；

若しくは a ) および b ) のエレメントをコードする DNA

50

を含んでなる、上記組成物。

【請求項 30】

MHC クラス II エピトープが残基 D R F Y K T L R A を含んでなる、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

MHC クラス II エピトープが残基 M Q M L K E T I N を含んでなる、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 32】

Ii - key ハイブリッド構築物が a ) および b ) のエレメントをコードする DNA を含んでなり、ならびに、コドン使用頻度が被験体の優先性に一致するように最適化されている、請求項 29 に記載の組成物。 10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

免疫系は「外来」若しくは「異常」構造を抗原として認識することにより外来病原体、腫瘍細胞、アレルゲン、自己免疫疾患誘発過程および移植片に応答する。大部分の抗原は宿主細胞若しくは病原体のいずれかにより合成されるタンパク質である。こうした抗原はペプチドフラグメントにプロセシング（タンパク質分解性消化）される。該フラグメントはその後抗原提示細胞（APC）の表面上のペプチド提示構造中で提示される。これらのペプチド提示構造は主要組織適合複合体（MHC）分子と呼ばれる（それらが最初 MHC 遺伝子群に属する多形遺伝子の産物として認識されたためそのように命名された）。MHC 遺伝子は、移植片拒絶および特異的キラー T リンパ球による病原体感染細胞の死滅のような免疫細胞の多くの活動を制御する。 20

【0002】

特異的抗原に対する免疫応答は、抗原のフラグメントが APC の表面上に提示される場合に応答する T リンパ球により媒介される。APC 内で、タンパク質分解性にプロセシングされた抗原のペプチドフラグメントは MHC 分子の抗原ペプチド結合部位に結合されるようになる。これらのペプチド - MHC 分子複合体がその後、応答性 T 細胞リンパ球上の T 細胞受容体により（外来ペプチドおよび提示分子の隣接表面双方の）認識のため細胞表面に輸送される。この抗原特異的認識事象が免疫応答力スケードを開始し、防御免疫応答をもたらし、若しくは自己免疫過程の場合には有害な免疫応答に至る。 30

【0003】

2 クラスの MHC 分子すなわち MHC クラス I および MHC クラス II が存在する。MHC クラス I 分子は小胞体で合成される。それらはウイルスからのような内因性に合成されるタンパク質からペプチドを独占的に受領し、そしてそれらを CD8+ 細胞傷害性 T リンパ球（CTL）に提示し、CTL はその後活性化されたようになりかつ抗原提示細胞を直接死滅させ得る。MHC クラス II 分子もまた小胞体で合成される。合成される場合、これらの抗原ペプチド結合部位はインバリアント鎖（Ii）タンパク質により阻害される。Ii タンパク質は、MHC クラス II 分子が、細胞質中で形成されかつ小胞体に輸送された内因性抗原性ペプチドを結合することを予防する。MHC クラス II 分子および Ii タンパク質の複合体は小胞体からポストゴルジ（post-Golgi）区画に輸送され、そこで Ii がタンパク質分解により遊離され、その後特異的抗原ペプチドが MHC クラス II 分子に結合する。MHC クラス II 分子はエンドサイトーシスを介して内部に取り入れられた外因性抗原のみ結合する。MHC クラス II 分子は CD4+ ヘルパー T リンパ球（T ヘルパー細胞）に抗原を提示する。一旦活性化されれば T ヘルパー細胞は細胞傷害性 T リンパ球（キラー T 細胞）および B リンパ球を活性化するのを助ける。（非特許文献 1；非特許文献 2；非特許文献 3；非特許文献 4；非特許文献 5；非特許文献 6 および非特許文献 7）。 40

【0004】

R. Humphrey の特許文献 1 および Humphrey らの特許文献 2 は Ii タン

10

20

30

40

50

パク質が切断される機構を示し、そこでは切断の過程で遊離されるフラグメントがMHCクラスII分子の抗原ペプチド結合部位内の抗原ペプチドの結合および固定を調節することを継続する（非特許文献8；非特許文献9；および非特許文献10）。参照される特許はさらに、この初期の調節性の抗原ペプチド認識事象を制御するための新規治療的化合物および方法を開示した。これらの機構の同定は治療的介入の新たな途を拓いた。

【0005】

特許文献3および特許文献4は免疫系の調節に関して有用なハイブリッドペプチドを開示する。該開示は、適切な介在化学構造により哺乳動物Ii-K<sub>ey</sub>ペプチドに共有結合されてハイブリッドポリペプチドを形成するMHCクラスII拘束性抗原エピトープが、前駆体抗原エピトープがそうであるより有意により高い効力を伴い抗原提示細胞によりTリンパ球に提示されるという発見に基づく。特許文献3および特許文献4の開示は引用することにより本明細書に組み込まれる。

10

【0006】

現在関心の高い2種の顕著な病原体はHIVおよびインフルエンザウイルスとりわけH5N1トリインフルエンザウイルスである。HIVは世界中で何百万もの人々を感染させ、そしてH5N1がそうするであろうことを多くが恐れている。H5N1はヒト、トリおよび数種の他の動物種に対する致命的ウイルスである。H5N1若しくは他の流行の場合、医療提供者はワクチン供給量の大きな不足に直面するであろう。米国で約2億の人々が感染したようになり、200万までが死亡する（非特許文献11）。パンデミックを終止させるのに10億用量を超えるワクチンが必要とされうる。季節性インフルエンザの卵をベースとするワクチンはH5N1に対する交差防御を提供することがありそうにない。2006年時点で、臨床試験されている30以上のH5N1ワクチン候補が存在し（非特許文献11）、多くは卵をベースとする製法を使用する。H5N1の高病原性により、有胚鶏卵を使用するH5N1ワクチンの製造は典型的に低ウイルス力価を生じる。現在評価されている他のH5N1ワクチンは、アデノウイルスに運搬される（vectorized）抗原（非特許文献12）、DNAワクチン（非特許文献13、非特許文献14）、および細胞培養物に基づくアプローチを使用するワクチンを包含する。研究は、既知のH5N1ワクチンの免疫原性が乏しく、季節性インフルエンザワクチンより12倍までより多い用量を必要とすることを示している（非特許文献15；非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18）。

20

【0007】

研究は、免疫系の双方のアーム（arm）を活性化することが、通常CD4+T細胞の作用に大きく頼る最も効果的な抗ウイルス応答を提供することを示した。活性化されたCD4+T細胞から遊離されるサイトカインは、メモリーBおよびT細胞の誘導のための不可欠の支援を提供しつつB細胞およびCD8+T細胞を間接的に補助する（非特許文献19；非特許文献20）。CD4+T細胞は、インフルエンザ特異的細胞溶解活性に影響を及ぼすこと（非特許文献21；非特許文献22）を包含するウイルス感染の制御で直接的役割を有する（非特許文献23；非特許文献24）。H5N1感染に対しヒトを防御することにおける各細胞型の寄与は不明であるため、免疫系の複数のアームを誘導しつつ広範な免疫を生成するよう設計されたワクチンが、ありそうにはH5N1パンデミックに対し最も効果的であることができる。

30

【0008】

インフルエンザウイルスに対する広範囲にわたる免疫の誘導のためのペプチドワクチンの応用は以前に検討された。研究は、ペプチドワクチンとしてのB、TヘルパーおよびCTLインフルエンザ由来エピトープの包含が強い免疫およびウイルス攻撃からの防御を刺激し得ることを示した（非特許文献25；非特許文献26；非特許文献27；非特許文献28；非特許文献29；非特許文献30；非特許文献31）。他の研究は、高度に保存されたエピトープを包含することにより防御および系統間免疫（cross-strain immunity）を誘導し得ることを示した（非特許文献32；非特許文献33）。

40

【0009】

50

抗原特異的 CD4+ T 細胞刺激を目的としたペプチドワクチンは血清学的に異なるウイルス株に対し防御する潜在能力を有する。インフルエンザワクチン開発の焦点は古典的に抗体中和の誘導にあった。この技術は、ワクチンを生成するのに使用されるものと異なる系統が出現する場合に有効であることがありそうにない。いくつかのマウス研究は、有効な抗ウイルス免疫応答の組織化において CD4+ 細胞が役立つことを示した（非特許文献 19；非特許文献 20）。Swain らは、同系宿主への PR8 インフルエンザ特異的 Th1 極性化エフェクター細胞の養子移入が、致死的攻撃からマウスを防御し得る一方、予備刺激した CD4+ 細胞を受領しないマウスは全部が死に屈したことを示した（非特許文献 20）。これらの実験はウイルス感染の制御における CD4+ T 細胞の重要性を強調する。

10

## 【0010】

現在の H5N1 ワクチンの不備のいくつかを取り扱い、本明細書に記述される新たな方法および組成物は、現在のワクチン供給量を限界まで引き伸ばしかつ集団にワクチン接種するのに必要とされる投薬量を低下させる見込みを提供する。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0011】

【特許文献 1】 R. Humphrey (1996) 米国特許第 5,559,028 号

【特許文献 2】 Humphrey ら (1999) 米国特許第 5,919,639 号

【特許文献 3】 米国特許出願第 09/396,813 号（現在米国特許第 6,432,409 号）

20

【特許文献 4】 米国特許出願第 11/033,039 号

## 【非特許文献】

## 【0012】

【非特許文献 1】 Blum ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3975 (1988)

【非特許文献 2】 Riberdy ら、Nature 360: 474 (1992)

【非特許文献 3】 Daibata ら、Mol. Immunol. 31: 255 (1994)

30

【非特許文献 4】 Xu ら、Mol. Immunol. 31: 723 (1994)

【非特許文献 5】 Xu ら、Antigen Processing and Presentation, Academic Press, NY p227 (1994)

【非特許文献 6】 Kropshofer ら、Science 270: 1357 (1995)

【非特許文献 7】 Urbanc ら、J. Exp. Med. 180: 751 (1994)

【非特許文献 8】 Adams ら、Eur. J. Immunol. 25: 1693 (1995)

【非特許文献 9】 Adams ら、Arzneim. Forsch. / Drug Researc h 47: 1069 (1997)

【非特許文献 10】 Xu ら、Arzneim. Forsch. / Drug Researc h、投稿中 (1999)

40

【非特許文献 11】 Poland, G. A., N Engl J Med 354: 141 (2006)

【非特許文献 12】 Gao, W. ら、J. Virol. 80: 1959 (2006)

【非特許文献 13】 Bright, R. A. ら、Virology 308: 270 (2003)

50

【非特許文献 14】 Epstein, S. L. ら、Emerg Infect Dis 8: 796 (2002)

【非特許文献 15】 Bresson, J. L. ら、Lancet 367: 1657 (2006)

【非特許文献16】Treanor, J. J. ら、*N Engl J Med* 354: 1343 (2006)

【非特許文献17】Treanor, J. J. ら、*Vaccine* 19: 1732 (2001)

【非特許文献18】Stephenson, I. ら、*J Infect Dis* 191: 1210 (2005)

【非特許文献19】Brown, D. M. ら、*Semin Immunol* 16: 171 (2004)

【非特許文献20】Swain, S. L. ら、*Immunol Rev* 211: 8 (2006)

10

【非特許文献21】Graham, M. B. ら、*J Exp Med* 180: 1273 (1994)

【非特許文献22】Graham, M. B. と T. J. Braciale, *J Exp Med* 186: 2063 (1997)

【非特許文献23】Hogan, R. J. ら、*J Exp Med* 193: 981 (2001)

【非特許文献24】Paludan, C. ら、*J Immunol* 169: 1593 (2002)

【非特許文献25】Horvath, A. ら、*Immunol Lett* 60: 127 (1998)

20

【非特許文献26】Westerveld, N. と R. Zurbriggen, *J Pept Sci* 11: 707 (2005)

【非特許文献27】Bianchi, E. ら、*J Virol* 79: 7380 (2005)

【非特許文献28】Ninomiya, A. ら、*Vaccine* 20: 3123 (2002)

【非特許文献29】Brumeanu, T. D. ら、*J Virol* 71: 5473 (1997)

【非特許文献30】Jeon, S. H. ら、*Vaccine* 20: 2772 (2002)

30

【非特許文献31】Simeckova-Rosenberg, J. ら、*Vaccine* 13: 927 (1995)

【非特許文献32】Levi, R. と R. Arnon, *Vaccine* 14: 85 (1996)

【非特許文献33】Ben-Yedidya, T. ら、*Mol Immunol* 39: 323 (2002)

### 【発明の概要】

#### 【0013】

一局面において、本発明は、目的の抗原のMHCクラスIIに提示されるエピトープを含有するDNAおよびペプチドワクチンの効力の改良方法に関する。本発明は、その後投与されるDNA若しくはペプチドワクチンの効力が増強されるようなIi-Keyハイブリッドペプチドで被験体の免疫系を予備刺激することを必要とする。Ii-Key構築物はIi-Keyハイブリッドペプチドをコードする核酸構築物の形態で投与してもよい。

#### 【0014】

2つの例は、HIVおよびA型インフルエンザとりわけH5N1に対して防御するためのワクチン接種プロトコルでのIi-Key抗原エピトープハイブリッドの使用である。Ii-Key、およびHAタンパク質由来の高度に保存されたMHCクラスIIエピトープから構成されるハイブリッドタンパク質でナイーブなTヘルパー細胞を最初に予備刺激することにより、H5N1の予防および処置に使用される臨床で試験されたrHAワクチンに対する免疫学的応答が改良される。DNA若しくはタンパク質ワクチンで追加免疫す

40

50

る前にこれらのハイブリッドペプチドで被験体の免疫系を予備刺激することにより、ワクチンの制限された供給量を拡大し得る。

【0015】

別の局面において、本発明は、被験体の免疫応答を予備刺激することによりDNAおよびペプチドワクチンの効力を増大させるのに使用される組成物に関する。該組成物はIi-Keyタンパク質のLRMKアミノ酸残基およびMHCクラスIIエピトープから構成されるハイブリッドペプチドであり、該エピトープはA型インフルエンザのH5N1株によりコードされる赤血球凝集素若しくはHIVによりコードされるGagタンパク質である。

【0016】

〔発明の詳細な記述〕

本発明は、MHCクラスII Ii-Keyハイブリッドペプチドワクチンで免疫系を予備刺激すること、次いでDNA若しくはペプチドワクチン追加免疫が、被験体のT細胞応答を増大させるという発見に関する。最初にIi-Keyハイブリッドで予備刺激すること、次いでDNAワクチン追加免疫により、被験体の結果として生じるT細胞応答が2~3回のDNAワクチン接種のものに同等となる。より強いT細胞応答がウイルス感染からの増大された防御と相関し、そして長期の免疫学的記憶に寄与する。Ii-Keyハイブリッドで予備刺激しかつTrHAタンパク質ワクチンで追加免疫したマウスは、1用量のタンパク質ワクチンを受領するマウスより20倍以上より高いIFN- $\gamma$ 応答を表した。DNA若しくはペプチドワクチンシリーズの用量のいくつかの代わりにIi-Keyハイブリッドペプチドワクチンを使用することにより、ワクチン供給量不足を回避し得る。

【0017】

定義：

以下の太字の用語は本文書を通じて以下の関連する意味で使用される。

【0018】

抗原提示細胞（APC）：MHC分子と複合体形成した外来抗原をその表面上に表示する細胞。

【0019】

BALB/c：多くの異なる研究分野でしかし最もしばしばモノクローナル抗体の製造で使用される一般的近交系マウス系統。BALB/cマウスは白色種でありかつ大きさが小さい。BALB/c(H-2<sup>d</sup>)マウスはH-2<sup>d</sup>アレル（MHC複合体のアレル）だけBALB/c系統と異なる。

【0020】

傍観者（ bystander ）効果：それに対し寛容が既に確立されている第二の抗原の存在下で1抗原が提示される場合に起こる、1抗原に対する免疫応答の抑制若しくは増強。

【0021】

CFA：フロイントの完全アジュバント。

【0022】

コドン最適化：その宿主の発現系のものと一致させるための外来タンパク質のコドン使用頻度の調節。数種の生物体種は他の同義コドンよりある種のコドンを好む。標的生物体により好まれるコドンを使用することにより翻訳がより効率的に行われ得る。

【0023】

CTL：細胞傷害性Tリンパ球。キラーTリンパ球若しくは細胞。

【0024】

サイトカイン：細胞間シグナル。別の細胞の挙動に影響を及ぼす1細胞から遊離されるペプチド。

【0025】

エリスロット：サイトカイン特異的抗体で被覆したマイクロタイターウェル中にTリンパ球を置くELISA様アッセイ。サンプル中の抗原特異的T細胞の数を測定するのに最

もしばしば使用される。CD4応答はIL-4捕捉およびIFN-捕捉により測定する。

## 【0026】

IFA：フロイントの不完全アジュバント。

## 【0027】

II-Key：IIタンパク質内の免疫調節モチーフ。

## 【0028】

インターフェロン(IFN)：外来作用物質による攻撃に応答して大部分の動物の免疫系の細胞により產生される糖タンパク質。サイトカイン。

## 【0029】

インターロイキン(IL)：リンパ球の増殖／分化を誘導するマクロファージおよびTリンパ球により分泌されるタンパク質。サイトカイン。

## 【0030】

リンパ球：白血球の1タイプ。リンパ球はB細胞若しくはT細胞でありうる。

## 【0031】

主要組織適合複合体(MHC)：免疫系で重要な役割を演じる、大部分の脊椎動物で見出される大きな遺伝子ファミリー。

## 【0032】

pcDNA：Invitrogen<sup>TM</sup>により製造されるプラスミドに基づくクローニングおよび発現ベクター。

## 【0033】

乱交雑ペプチド：1種以上のヒト白血球抗原多様性(antigen-diversity)領域アレルにより提示されるペプチド。

## 【0034】

RIBI：モノホスホリルリピドAおよびトレハロースジコリノミコール酸から構成される水中油型乳剤。RIBIはフロイントのアジュバントに対する代替として使用し得る。

## 【0035】

Syn-：合成(synthetic)。

## 【0036】

態様

背景の節で論考されたとおり、ワクチン供給量不足は米国および海外で多数の犠牲者をもたらしうる。集団を防御しかつ既存のワクチンの効力を増大するのに必要とされる投薬量の低減方法が必要とされる。数種の病原性生物体の有効な免疫化は組換え製造タンパク質若しくはなお合成ペプチドでの免疫化により達成し得るとは言え、他者については、ウイルスそれ自身を製造すること、ウイルスを単離すること、および熱死滅若しくは化学的不活性化形態の該ウイルスを使用して免疫することが必要であった。これは例えはインフルエンザウイルスに関して真実である。以下の論考の多くはインフルエンザウイルスにとりわけ関するとは言え、論考される原理はウイルスに広範におよび一般に病原体に応用可能である。

## 【0037】

季節性インフルエンザウイルスに向けられるワクチンは、典型的には有胚鶏卵に接種することおよびウイルスを増殖させることにより製造する。尿膜(alignant)液をその後卵から収集し、そして免疫化前にウイルスを熱で死滅若しくは化学的に不活性化する。季節性インフルエンザワクチンと対照的に、H5N1パンデミックインフルエンザ株は、典型的には、主として該ウイルスの高病原性により有胚鶏卵を使用して低ウイルス力価を生じる。(はるかにより多い用量を必要とする)該ワクチンの通常低い免疫原性と相まって、パンデミックと闘うのに必要とされるとみられるよりもはるかにより少ないワクチン用量がこの手段を使用して生成され得ることが予期される。米国で2億の人々が感染されたようになる可能性があり、9千万人が臨床的疾患となり、そして200万人までが

10

20

30

40

50

死亡すると推定されている (Poland, N. Engl. J. Med. 354: 1411 (2006)).

#### 【0038】

何百万ものワクチン用量を備蓄することはワクチンの半減期により制限された有用性を有し、かつ、抗原ドリフトによる突然変異株の潜在的出現のためほとんど意味を持たず、こうしたワクチンを無効にする。逆遺伝学ワクチンが鶏卵中のウイルス増殖の効率を向上させかつ攻撃後の防御を誘導し得るとは言え、それらの臨床評価は規制の問題により遅れている。アデノウイルスに運搬される抗原、DNAワクチン、および細胞培養物に基づくアプローチを使用するワクチンを包含する開発中の他のH5N1ワクチンが評価中であるが、しかし診察室へのそれらの導入は遅れている。

10

#### 【0039】

数種の異なるワクチン候補が診察室で試験されている一方、該結果は変動的かつしばしば期待はずれであった。最近、組換えの不活化スプリットビリオン (split-virion) ワクチンが試験され、参加者にアルムアジュバントを伴う若しくは伴わない1.5、15若しくは30mg/用量の赤血球凝集素を注入した。赤血球凝集阻害 (HI) およびマイクロ中和試験分析に基づき、最高用量を受領するワクチン受領者は最高の応答を生じた一方、より低用量は最適以下の力価をもたらした。類似の一研究で、変動する用量の卵に基づくアジュバント添加しない組み換えH5ウイルス (rgA/Vietnam/1203/2004×A/PR/8/34) でワクチン受領者を免疫した。その研究で、2用量の90μgで免疫した人々の56%が免疫前力価を最低4倍超えたHI力価を有し、該ワクチンが乏しく免疫原性であったことを意味した (Treanorら、N. Engl. J. Med. 354: 1343 (2006))。類似の知見がバキュロウイルス由来H5N1赤血球凝集素をワクチン候補として使用した研究で観察された (Treanorら、Vaccine 19: 1732 (2001))。わずかな免疫原性を誘導するこうした高用量 (季節性インフルエンザワクチンより12倍までより多い) はパンデミックの場合に十分な防御を提供しないかもしれません、十分な集団の包括のための十分なワクチンを迅速に製造することを困難にする。加えて、他のH5N1株に対しこれらの組換えワクチンにより提供される交差防御 (あれば) のレベルは確認されていない。にもかかわらずこれらの研究はこうしたワクチンの安全性および有効性についての重要な情報を提供する。

20

#### 【0040】

インフルエンザ感染およびワクチン開発はマウスモデル系で最も徹底的に検討されている。研究は、マウスでのB細胞の欠如がウイルス攻撃後の増大された死亡率につながり得ることを示しており (Mozdzanowskaら、Virology 239: 217 (1997)；Mozdzanowskaら、J. Virol. 79: 5943 (2005))、強い抗ウイルス体液性免疫を有することの重要性を意味しているとは言え、CD8+エフェクター応答の誘導もまたウイルスの消失および回収に寄与する (Tophamら、J. Immunol. 159: 5197 (1997))。免疫系の双方のアームの活性化が最も効果的な抗ウイルス応答を生じ、そして大部分の場合にCD4+T細胞の補助に大きく頼ることが示されている。活性化CD4+T細胞から遊離されるサイトカイン環境はB細胞およびCD8+T細胞に間接的「ヘルプ」を提供し、ならびにメモリーBおよびT細胞の誘導に不可欠な支援を提供する (Brownら、Semin. Immunol. 16: 171 (2004)；Swainら、Immunol. Rev. 211: 8 (2006))。付加的なエフェクター機能が、インフルエンザ特異的細胞溶解活性を包含するウイルス感染の直接制御におけるCD4+T細胞について記述されている。研究はまた、CD4枯渇マウスが高度に致死的なマウスインフルエンザPR8ウイルスを消失し得ることも示したとは言え、CD4+、CD8+およびB細胞の組合せが増大されたウイルス消失およびマウスでの生存と関連することが示されており、三叉誘導が防御に最も効率的であることを示唆する。H5N1感染に対しヒトを防御することにおける各細胞型の寄与は現在不明であり、そして循環株の病原性および全体的毒性に主に依存しうる。一緒にすれば、免疫系の複数のアームを誘導しあつ広範な免疫を生成するよう設計された

30

40

50

H 5 N 1 ワクチンは、ありそうには H 5 N 1 パンデミックに対し最も効果的であろう。

#### 【 0 0 4 1 】

現在の H 5 N 1 ワクチンの欠点のいくつかを取り扱うため、免疫原性を向上し得かつ他の H 5 N 1 ワクチンとともに使用される場合に用量節約を見込み得る新規 H 5 N 1 インフルエンザワクチンを開発した。高度に保存されたクラス I I エピトープを使用してナイーブな T ヘルパー細胞を予備刺激するこのアプローチは臨床で試験した r H A ワクチンに対する免疫学的応答を向上させることができた。H L A 拘束性クラス I I エピトープの選択を見込む S Y F P E I T H I プログラム ( R a m m e n s e e ら、 I m m u n o g e n e t i c s 5 0 : 2 1 3 ( 1 9 9 9 ) ) を使用して、最も一般的なヒト H L A - D R アレルの 6 種と相互作用することが累積的に予測される H A タンパク質配列に由来する 2 4 種の M H C クラス I I エピトープを同定した。ペプチドの細胞外 M H C クラス I I 負荷を可能にする免疫調節性 I i タンパク質 ( I i - K e y と命名される ) の 1 セグメントを包含してそれにより外因性のプロセシングおよび提示に対する必要性を迂回するようにこれらのエピトープを改変した。こうした I i - K e y ペプチドは、開発中の数種のワクチンに対する *in vitro* の T 細胞応答 ( A d a m s ら、 E u r . J . I m m u n o l . 2 5 : 1 6 9 3 ( 1 9 9 5 ) ) ならびに *in vivo* の T および B 細胞応答 ( K a l l i n t e r i s ら、 V a c c i n e 2 1 : 4 1 2 8 ( 2 0 0 3 ) ; K a l l i n t e r i s ら、 J . I m m u n o t h e r . 2 8 : 3 5 2 ( 2 0 0 5 ) ; K a l l i n t e r i s ら、 F r o n t i e r s i n B i o s c i e n c e : 4 6 ( 2 0 0 6 ) ) を高める。細胞外ペプチド負荷はまた他者 ( B o t ら、 J . I m m u n o l 1 5 7 : 3 4 3 6 ( 1 9 9 6 ) ) により示されるとおりナイーブな T 細胞もより迅速に活性化しうる。 H e r 2 / n e u タンパク質からの M H C クラス I I エピトープを使用して生成される 1 種のこうしたワクチンが現在臨床試験中であり、そして患者で確実な T ヘルパー細胞応答を生成する能力を示した ( M i t t e n d o r f ら、 J o u r n a l o f C l i n i c a l O n c o l o g y 、 2 0 0 6 A S C O A n n u a l M e e t i n g P r o c e d i n g s P a r t I . 2 4 : 2 5 3 2 ( 2 0 0 6 ) ) 。 I i - K e y ペプチドワクチンは H 5 N 1 に対し「独立型 ( s t a n d - a l o n e ) 」として部分的防御を提供しうるとは言え、それらは、強い免疫を誘導するのに必要とされる用量を同時に低減しつつこの試験で使用される r H A のような他のワクチンに対する応答を増強することを主に意図している。従って、ペプチドでのプライミングは、 r H A を包含する他のワクチン型の潜在的に制限される供給量を拡大することを合理的に期待し得る。ペプチドを使用する C D 4 T 細胞のプライミングはタンパク質ワクチン接種に対する免疫応答を増大させることができが以前に示されている ( H o s m a l i n ら、 J . I m m u n o l 1 4 6 : 1 6 6 7 ( 1 9 9 1 ) ) 。それらの研究では、アカゲザルを H I V g p 1 2 0 および g p 4 1 由来の 3 種の T 細胞エピトープで予備刺激し、次いで組換え g p 1 6 0 タンパク質で追加免疫した。ペプチドで予備刺激しなかった対照動物に比較して、ペプチド誘導性の T ヘルパー活性を暗示する T 細胞増殖および抗体応答双方の有意の改善が存在した。他の研究もまたペプチドプライミング後の改良された免疫原性を観察した ( V a s l i n ら、 A I D S R e s . H u m . R e t r o v i r u s e s 1 0 : 1 2 4 1 ( 1 9 9 4 ) ) 。改変 H 5 N 1 クラス I I エピトープでマウスを予備刺激すること、次いで r H A で追加免疫することは、 r H A 単独と比較して T および B 細胞応答を向上させると仮説を立てた。後に続く例示の節で示されるとおり、該結果は、 I i - K e y / H A エピトープハイブリッドで予備刺激することが r H A の免疫原性を向上させることを示し、また、開発中の他の H 5 N 1 ワクチンの用量節約戦略としてこれらの型のペプチドの役割を示す。

#### 【 0 0 4 2 】

従って、一局面において、本発明は被験体において目的の病原体に向けられるワクチンの効力を増大させるための用量節約方法に関する。ワクチンはこの方法とともに提供される。該ワクチンは例えば伝統的な熱死滅若しくは化学的不活化ウイルスを包含し得る。あるいは、ワクチンは目的の病原体からの単離されたタンパク質若しくはそのフラグメントを包含し得る。該ワクチンは組換え D N A 技術により製造されたタンパク質若しくはペプ

チドまたは合成ペプチドもまた包含し得る。本発明は目的の病原体がウイルス若しくは細菌であるワクチン効力の増大方法を包含する。より具体的には、本発明は病原体がHIV若しくはインフルエンザのH5N1株を包含するインフルエンザウイルスである方法を包含する。上で論考されたとおりこのワクチン材料はしばしば供給量が限られるため、限られた供給量が可能な限り多くの個体の免疫化に有効であるようにワクチンの効力を増大させることが望ましい。

#### 【0043】

本明細書に開示される結果は、ワクチンの投与前に被験体の免疫系を予備刺激するための*I i - k e y*ハイブリッド構築物の使用が予備刺激されない投与に関するワクチンの効力の増大において驚くほど効果的であることを示す。*I i - k e y*配列は本明細書および従来技術に記述されている。本発明で利用される*I i - k e y*構築物は、上で論考されたハイブリッド構築物内に見出されるMHCクラスIIエピトープにリンカーにより結合された*I i - k e y*配列のLRMK残基を少なくとも包含する。該リンカーは、免疫応答の最大の増強をもたらす*I i - k e y*エレメントとMHCクラスIIエピトープの間のスペーシングを提供する大きさにされる。一般的に言って、このスペーサーは、15~25アミノ酸残基のアミノ酸配列により提供されるとみられるスペーシングに近いこれらのエレメント間のスペーシングを提供する。該リンカーはアミノ酸から構成される必要はないとは言えこの組成はハイブリッド構築物の製造を単純化しない。アミノ酸リンカー部分に対する代替は従来技術に記述されている。

10

#### 【0044】

被験体の免疫系は上述された型の*I i - k e y*構築物を使用して予備刺激する。一般的に言って*I i - k e y*ハイブリッド構築物は注入のため処方する。この製剤は生理学的に適合性の緩衝剤および場合によってはアジュバントを包含する。多くのアジュバントが当該技術分野で既知であり、そして別のものに優先する1アジュバントの選択は慣例の実験の問題である。典型的には、*I i - k e y*構築物製剤の投与は筋肉内若しくは皮下注入による。

20

#### 【0045】

生物体の免疫系が*I i - k e y*ハイブリッド投与に応答するのに十分な時間の後にワクチン組成物を投与する。*I i - k e y*製剤のように、ワクチン組成物は典型的にはアジュバントを含む若しくは含まない生理学的に適合性の緩衝液中で投与する。下に示される結果は、*I i - k e y*ハイブリッド構築物でのプライミング後のインフルエンザおよびHIVワクチン組成物の効力の顕著な増強を示す。例示の節のインフルエンザDNAワクチン実験に詳述される結果は、*I i - K e y*ハイブリッドで予備刺激し次いでDNAワクチンで追加免疫したマウスでT細胞活性が2DNAワクチン用量を与えられたマウスにより大きかったことを示す。同様に、例示に詳述されるHIV DNAワクチン実験の結果は、*I i - K e y*ハイブリッドで予備刺激しかつDNAワクチンで追加免疫したマウスが、DNAワクチンで予備刺激および追加免疫したマウスの約2倍のT細胞活性を表したことを示す。該データは*I i - K e y*ハイブリッドがDNAワクチンの1用量を置き換えることを示す。例示の下位節「*I i - K e y*ペプチドを予備刺激することはrHAでのT細胞応答を増強する」にもまた記述されるとおり、*I i - K e y*ペプチドで予備刺激しかつrHAで追加免疫したマウスは、1若しくは2用量のrHAを与えられたマウスより有意により強い応答を表した(図5B)。事実、1ハイブリッド(*I i - K e y* 160)でのプライミングは対照のものより20倍高いIFN-応答を誘導した。該結果は*I i - K e y*ハイブリッドが1用量のタンパク質ワクチンもまた置き換えることを示す。

30

#### 【0046】

*I i - k e y*ハイブリッド構築物若しくはワクチン組成物いずれもアミノ酸に基づくワクチン若しくは*I i - k e y*構築物をコードする核酸構築物の形態で投与しうることが当業者により認識されるであろう。DNAワクチンは被験体のコドンの好みに一致するよう最適化したコドンでありうる。文献はコードされる産物で免疫応答を刺激する目的上のDNA構築物の投与のための構築物および方法の記述が豊富である。多くのこうした構築物

40

50

はウイルスに基づくとは言え、機械的導入方法（例えば遺伝子銃技術）を使用し得る。

【0047】

H5N1はA型インフルエンザウイルスの1サブタイプである。H5N1のH5は数種の既知の型のHA（インフルエンザウイルスの表面上に見出される抗原性糖タンパク質）の第五を示す。HAは感染されている細胞に該ウイルスを結合する。その名称は赤血球と一緒に凝集させるその能力に由来する。N1は数種の既知の型のノイラミニダーゼ（またインフルエンザウイルスの表面上に見出される抗原性のグリコシル化された酵素）の第一を示す。赤血球凝集素およびノイラミニダーゼは抗ウイルス薬および抗体の最も医学上適切な標的であり、そして従ってA型インフルエンザの多様なサブタイプを命名するための根拠として使用される。本発明は、LRMK残基および赤血球凝集素若しくはノイラミニダーゼタンパク質内に含有される1エピトープから構成されるIi-Keyハイブリッドペプチドで被験体を予備刺激すること、次いでA型インフルエンザワクチンで追加免疫することによるA型インフルエンザワクチン応答の増強方法を包含する。

10

【0048】

例示の節に詳述される結果は、HA DNAワクチンで追加免疫される前に3種のH5N1赤血球凝集素クラスII Ii-Keyペプチドの1種で最初に予備刺激したマウスが、HA DNAで予備刺激および追加免疫したマウスより大きいT細胞応答を表したことを示す。試験した3種のハイブリッドペプチドはペプチド551、160および239であった。これらのハイブリッドペプチドのいずれか1種でのプライミングはその後のHA DNAワクチンの効力を高める。同様に、IFN-応答およびT細胞応答は、rHAペプチドワクチンの追加免疫を受領する前のペプチド551、160、239若しくは該3者の組合せで予備刺激したマウスでより強かった。例示に詳述されるとおり、Ii-Key 160でマウスを予備刺激することおよびそれらをrHAで追加免疫することは、2用量のrHAを受領するマウスでよりも20倍以上より大きいIi-Key 160に対するIFN-応答を誘導する。これらのハイブリッドのいずれか1種若しくは組合せでのプライミングはその後のrHAワクチンの効力を高める。従って、本発明は、Ii-Keyハイブリッドで使用されるMHCクラスIIエピトープがHA 551、HA 160若しくはHA 239を含んでなるH5N1インフルエンザDNA若しくはペプチドワクチンの効力の増大方法を包含する。（配列については表1を参照されたい。）該データは1用量のDNA若しくはrHAワクチンをIi-Keyペプチドにより置き換えることを示す。

20

【0049】

背景の節で論考されたとおり、H5N1のような病原体は複数の動物種を苦しめる。本明細書で使用されるところの「哺乳動物」という用語は、ヒト種ならびに全部の他の哺乳動物種を包含することを意味している。本発明の化合物および方法は、全部の哺乳動物およびトリ（家禽および家禽以外）種の被験体で起こる疾患および状態の処置で適用しうる。本明細書で使用されるところの「被験体」という用語はヒト種を包含するいずれかの哺乳動物若しくはトリ種の1種を指す。ヒトで発生しかつて本明細書で挙げられる疾患および状態は、同一の生物体若しくは発症過程により引き起こされるにせよ、関連する生物体若しくは発症過程により引き起こされるにせよ、未知の若しくは他の既知の生物体および/若しくは発症過程により引き起こされるにせよ、別の種で発生する比較可能な疾患若しくは状態を包含する。

30

【0050】

別の態様において、本発明はHIV DNAワクチンの効力の増大方法に関する。例示の節に記述されるHIV DNAワクチン実験の結果は、HIVエピトープを含んでなるIi-Keyハイブリッドでの追加免疫が後に投与されるHIV DNAワクチンのT細胞応答を増大させることを示す。該研究は、pcDNA/SynGag追加免疫を受領する前にIi-KeyのLRMK残基およびHIV病原体のGagタンパク質エピトープから構成されるハイブリッド構築物で最初に予備刺激したマウスが、DNAワクチンで予備刺激および追加免疫したマウスのものの2倍のT細胞応答を表したことを示す。本発明は

40

50

、プライミング段階で使用されるMHCクラスIIエピトープがGagエピトープであるHIV DNAワクチンの効力の増強方法を包含する。より具体的には、プライミング段階で使用されるMHCクラスIIエピトープがGag298であるHIV DNAワクチンの効力の増強方法を包含する。

【0051】

本発明はさらに、Ii-KeyのLRMK残基およびGag298エピトープのハイブリッド構築物で被験体を予備刺激すること、次いでDNAワクチンで追加免疫すること、およびその後MHCクラスIIエピトープがGag198若しくはGag298の残基を含んでなるIi-Keyハイブリッドで被験体を再刺激することによる、HIV DNAワクチンの増強方法を含んでなる。(配列については表1を参照されたい。)例示の節に詳述されるHIV実験の結果は、Ii-Key/Gag298ハイブリッドで予備刺激し、pCDNA/SynGagで追加免疫したマウスが、2若しくは3用量のDNAを与えたマウスの2倍くらい強いT細胞活性を表したことを示す。

10

【0052】

本発明は目的の病原体に向けられるDNA若しくはペプチドワクチンのプライミングでの使用のための組成物もまた提供する。該組成物は製薬学的に許容できる担体中にIi-Keyハイブリッド構築物を含んでなり、該構築物はIi-Keyタンパク質のLRMK残基およびA型インフルエンザのH5N1株によりコードされる赤血球凝集素MHCクラスIIエピトープから構成される。より具体的には、本発明は、ハイブリッド構築物がエピトープHA 551、HA 160若しくはHA 239を包含する組成物を包含する。例示の節のインフルエンザDNAおよびrHAワクチン実験の結果は、H5N1によりコードされるエピトープ(具体的にはHA 551、HA 160若しくはHA 239)から構成されるIi-Keyハイブリッドで予備刺激したマウスが、HA DNAワクチンで予備刺激したマウスより高いCD4 T細胞活性を表すことを示す。

20

【0053】

別の態様において、本発明は、製薬学的に許容できる担体中にIi-Keyハイブリッド構築物を含んでなる組成物を提供し、該構築物は、Ii-Keyタンパク質のLRMK残基およびHIVによりコードされるGag MHCクラスIIエピトープから構成される。より具体的には、本発明は、ハイブリッド構築物がエピトープGag198若しくはGag298を包含する組成物を包含する。例示の節のHIV実験の結果は、HIVによりコードされるエピトープ(具体的にはGag298)から構成されるIi-Keyハイブリッドで予備刺激したマウスが、Gag DNAワクチンで予備刺激したマウスより高いCD4 T細胞活性を表すことを示す。さらに、Ii-Key/Gag298ハイブリッドで予備刺激し、Gag DNAで追加免疫し、そしてその後Ii-Key/Gag198ハイブリッドで再刺激したマウスは、3用量のDNAを受領するマウスと同等のT細胞応答を表す。本発明は、Ii-Keyハイブリッドペプチドを、免疫応答を再刺激するにもまた使用しうる方法を包含する。

30

【0054】

当業者は、慣例の実験法を使用して、ハイブリッドペプチド中のそれぞれの残基位置で多様な天然の若しくは非天然のアミノ酸を置換し得る。置換しうる分子のいくつかの例は、ペプチド模倣構造、D-異性体アミノ酸、N-メチルアミノ酸、L-異性体アミノ酸、修飾L-異性体アミノ酸および環化誘導体である。

40

【0055】

データは、Ii-Keyハイブリッドが最低1用量のDNAを置き換え得、それによりH5N1インフルエンザのような病原体の潜在的なFDAに承認されるDNAワクチンの利用可能性を増大させることを示す。より重要には、より強いT細胞応答はより迅速、より大きい、およびより長期間持続する防御に寄与しうる。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】ワクチン接種後のin vitro IFN- $\gamma$ およびIL-4エリススポット応

50

答。BALB/cマウス(5/群)を、RIBIアジュバント中に乳化したIi-Keyペプチド(100μg)で皮下若しくはHA-DNAワクチン(50μg)で筋肉内のいずれかで第0週に免疫化した。2週後にマウスをHA-DNAで追加免疫した。追加免疫12日後にマウスを屠殺しそして脾を無菌的に取り出した。プールした脾細胞はX軸に示されるIi-Keyペプチドを用いるin vitroペプチド再刺激アッセイで使用した。対照マウスは無関係のDNAワクチン(B5R)若しくはRIBI/PBSを受領した。結果は3検体でアッセイしたサンプルの幾何平均を示す。

【図2】ワクチン接種後のin vitro IFN-エリスポット応答。BALB/cマウス(4/群)を、CFAアジュバント中に乳化した100μgのIi-Keyペプチド(Gag298若しくはGag198)で皮下またはpcDNA/SynGagワクチン(50μg)で筋肉内のいずれかで第0週に免疫化した。9日後に全マウスにpcDNA/SynGagで追加免疫した。マウスの1群は第16日に2回目に追加免疫した。追加免疫11日後にマウスを屠殺しそして脾細胞を無菌的に取り出した。プールした脾細胞を、X軸に示されるIi-Keyペプチドを用いるin vitroペプチド再刺激アッセイで使用した。結果は3検体でアッセイしたサンプルの幾何平均を示す。

【図3】rHA免疫化後のIFN-/IL-4応答。マウスをCFAアジュバント中に乳化した10μgのrHAで第0日に皮下で免疫した。第14日にマウスに追加免疫し、次いで追加免疫2週後にin vitroで脾細胞を再刺激した(72時間)。データは3検体でアッセイしたペプチドの平均±SEMを表す。

【図4】DNA免疫化後のIFN-/IL-4応答。マウスを50μgのpcDNA/HAで第0日に筋肉内で免疫化し、そして第14日に追加免疫し、次いで追加免疫10日後にin vitroで脾細胞を再刺激した(72時間)。データは3検体でアッセイしたペプチドの平均±SEMを表す。

【図5A】相同なIi-Keyハイブリッドペプチドでの免疫化後のIFN-エリスポット応答。マウスをRIBIアジュバント中に乳化した100μgのIi-Keyペプチドで第0日に皮下で免疫した。マウスを第14日に追加免疫し、次いで追加免疫2週後にin vitroで脾細胞を再刺激した(72時間)。再刺激で使用したIi-KeyペプチドをX軸上に示す。データは3検体でアッセイしたペプチドの平均±SEMを表す。

【図5B】異種免疫化後のIFN-エリスポット応答。マウスを、RIBIアジュバント中に乳化した100μgのIi-Keyペプチド、33μg/ペプチド(黒棒)のIi-Keyペプチド若しくは10μgのrHAで第0日に皮下で免疫し、次いで第21日に10μgのrHAで追加免疫した。in vitro再刺激(72時間)を追加免疫2週後に実施した。再刺激で使用したIi-KeyペプチドをX軸上に示す。データは3検体でアッセイしたペプチドの平均±SEMを表す。\*RIBI/rHAおよびrHA/rHAに比較してP<0.001、\*\*RIBI/rHAおよびrHA/rHAに比較してP<0.05。AEO=抗原エピトープ単独。

【図6】異種免疫化およびCD4+枯渇後のIFN-エリスポット応答。マウスを、RIBIアジュバント中に乳化した100μgのIi-Keyペプチド、33μg/ペプチド(黒棒)のIi-Keyペプチド若しくは10μgのrHAいずれかで第0日に皮下で免疫し、次いで第21日に10μgのrHAで追加免疫した。in vitro再刺激(48時間)を追加免疫2週後に実施した。再刺激で使用したIi-KeyペプチドをX軸上に示す。データは3検体でアッセイしたペプチドの平均±SEMを表す。

【図7】マウスIgG抗HA応答。マウスを図5Bに記述したとおり免疫し、屠殺時点での血清を収集した。間接的ELISAでrHAに対し抗血清を試験することにより終点滴定を実施した。結果は2検体で試験したサンプルの平均±SEMを表す。\*全部の他の群と比較してP<0.001。

【実施例】

【0057】

例示

Ii-Key技術は、インフルエンザH5N1およびHIVワクチンを包含するDNA

10

20

30

40

50

ワクチンの免疫原性を増強し得る。2件の本DNAワクチン研究は、*I i - K ey*ハイブリッドペプチドで免疫系を予備刺激すること、次いでDNAワクチンで追加免疫することが、ワクチン接種した生物体で全体的なT細胞応答を増強し得ることを示した。現在記述される組換えペプチドワクチン実験は、*I i - K ey*ハイブリッドペプチドで免疫系を予備刺激することがペプチドワクチンの効力もまた増強し得ることを示す。ワクチン接種のためのこうした異種予備刺激／追加免疫方法を使用することは、病原性感染症からの長期の防御を提供するはずである。

## 【0058】

## I i - K eyペプチド / DNA免疫化

全部のワクチン接種実験に使用したマウスは、マサチューセッツ大学メディカルセンター（University of Massachusetts Medical Center）の動物施設にて特定病原体除去（SPF）条件下に収容した近交系BALB/c(H-2<sup>d</sup>)系統（Charles River Laboratories、マサチューセッツ州ウイルミントン）の6～8週齢の雌性であった。全処置はIACUCのプロトコルに従って実施した。ワクチンの投与および免疫化時間は各図の解説に定義する。一般に、マウスを最後の免疫化の約2週後に屠殺した。それらの脾を無菌的に収集しそして均質化まで無菌培地中に置いた。血清サンプルは後眼窩叢を介して収集しつつ分析まで-20で凍結した。

## 【0059】

## エリスポット

IFN- $\alpha$ およびIL-4エリスポットサイトカインキット（BD Biosciences、カリフォルニア州サンディエゴ）を使用してDNA若しくはタンパク質での免疫化後の免疫学的応答を評価した。エリスポットプレートは無菌PBSで希釈した5 $\mu$ g/mlの抗IFN- $\alpha$ 若しくは抗IL-4抗体（100 $\mu$ l/ウェル）で被覆し、そして4で一夜インキュベートした。プレートを200 $\mu$ l/ウェルのプロッキング緩衝液（RPMI 1640/10% FBS/1%ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン）で1回洗浄し、次いでプロッキング緩衝液（200 $\mu$ l/ウェル）を添加しつつ室温で2時間インキュベートした。

## 【0060】

バルク脾細胞調製物は、Dounceホモジナイザー（Wheaton Sciences Products、ニュージャージー州ミルビル）を使用する2%完全培地（RPMI 1640/2% FBS/1%ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン）中の脾の均質化、次いで70 $\mu$ m細胞濾過器（BD Biosciences、ニュージャージー州フランクリンレイクス）での濾過により調製した。細胞の凝集を予防するため、脾細胞をDnアーゼI（EMD Biosciences、カリフォルニア州サンディエゴ）で短時間処理し、遠心分離し、そして赤血球溶解緩衝液（Red Cell Lysis Buffer）（Sigma、ミズーリ州セントルイス）の添加によりRBCを溶解した。2%完全培地を添加してさらなる溶解を阻害し、次いで遠心分離した。生じる細胞ペレットを5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml（インフルエンザ実験）若しくは1 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml（HIV実験）の濃度で2%完全培地に再懸濁した。

## 【0061】

プロッキング後にプレートを2%完全培地で1回洗浄しつつデカントした。ペプチドを2%完全培地に再懸濁しそして5 $\mu$ g/ウェルの濃度で添加した（100 $\mu$ l/ウェル）。バルク脾細胞を、2%完全培地中100 $\mu$ l/ウェルで1 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/ウェル（HIV実験）若しくは5 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ウェル（インフルエンザ実験）の濃度で3検体でプレーティングした。陰性対照は培地のみおよび未刺激の脾細胞から構成した一方、植物性血球凝集素/イオノマイシンで刺激した細胞が陽性対照としてはたらいた。エリスポットプレートを5%CO<sub>2</sub>を含む37で72時間インキュベートした。

## 【0062】

プレートをPBS/0.5%Tween（PBST）で2回洗浄し、次いでPBS/1

10

20

30

40

50

0 % F B S で希釈したビオチニル化抗マウス I F N - 若しくは抗マウス I L - 4 抗体 (2  $\mu$  g / ml) を添加した。2 時間インキュベーション後にプレートを P B S T で 3 回洗浄し、次いで P B S / 10 % F B S で希釈したストレプトアビシン / H R P (1 : 100) を添加した。室温で 1 時間インキュベートした後にプレートを P B S T で 3 回洗浄し、次いで P B S で 2 回洗浄した。十分なスポット形成が起こるまでの A E C 基質 (B D B i o s c i e n c e s、カリフォルニア州サンディエゴ) の添加によりアッセイの発色を実施し、次いで dd H<sub>2</sub>O ですすいだ。エリスピットプレートを走査のため C T L A n a l y z e r s (オハイオ州クリーブランド) に送り、次いで I m m u n o s p o t ソフトウェア (C T L A n a l y z e r s、オハイオ州クリーブランド) を使用してデータを解析した。データは 3 検体で試験した各 I i - K e y ペプチドの幾何平均 (図 1 ~ 2) 10 若しくは平均  $\pm$  平均の標準誤差 (S E M) (図 3 ~ 7) を表す。

#### 【 0 0 6 3 】

バルク脾細胞調製物の C D 4 + 枯渇は、製造元の指示 (M i l t e n y i B i o t e c、カリフォルニア州オーバーン) に従って M A C S (R) 細胞分離カラムを使用する陰性選択により実施した。枯渇させた細胞集団をプレーティングしそして上述されたと同一に再刺激した。

#### 【 0 0 6 4 】

##### インフルエンザ D N A ワクチン実験

第 0 週に、マウス (5 / 群) を 5 5 1、1 6 0 若しくは 2 3 9 と呼称される 3 種の H 5 N 1 赤血球凝集素 (H A) クラス I I I i - K e y ペプチドの 1 種で予備刺激し、次いで第 2 週に H A D N A ワクチンで追加免疫した (図 1)。対照マウスは無関係の D N A ワクチン (B 5 R) 若しくは R I B I のいずれか、次いで P B S で予備刺激および追加免疫した。マウスを 1 2 日後に屠殺しそして各処置群の脾細胞をプールした。上の 3 種の I i - K e y ペプチドを使用する i n v i t r o ペプチド再刺激アッセイをその後脾細胞の各プールで実施した。該結果は、C D 4 T 細胞活性のマーカーである全体的 I F N -

応答が、5 5 1、1 6 0 若しくは 2 3 9 ペプチドのいずれかでマウスを予備刺激した場合に 2 用量の D N A ワクチンを受領したマウスに比較して最も顕著であったことを示した。ペプチド 1 6 0 で予備刺激しかつ H A D N A で追加免疫したマウスでのインターロイキン (I L) - 4 (C D 4 T 細胞活性化の尺度) は脾細胞を 1 6 0 ハイブリッドペプチドで再刺激した場合に最も強かった。2 用量の D N A を受領したマウスは検出可能な I L - 4 応答を誘導しなかった。該データは I i - K e y ハイブリッドが 1 用量の D N A を置き換えることを示唆する。

#### 【 0 0 6 5 】

##### H I V D N A ワクチン実験

G a g は H I V - 1 ウィルス粒子の集成に関するタンパク質である。第 0 週にマウスを p c D N A / S y n G a g、H I V G a g 2 9 8 若しくは G a g 1 9 8 I i - K e y ペプチドいずれかで予備刺激し、次いで第 9 日に p c D N A / S y n G a g ワクチンで追加免疫した (図 2)。p c D N A / S y n G a g で予備刺激および追加免疫したマウスの 1 群を第 1 6 日に p c D N A / S y n G a g で 2 回目に追加免疫した。マウスを追加免疫 1 1 日後に屠殺しそして各処置群の脾細胞をプールした。I i - K e y ペプチドを使用する i n v i t r o ペプチド再刺激アッセイを脾細胞の各プールで実施した。I F N -

応答は T 細胞応答が I i - K e y ペプチドで予備刺激することによりさらに向上され得ることを示す。G a g 1 9 8 でのプライミングの利益が D N A で免疫したマウスに関して存在しないようであるとは言え、G a g 2 9 8 で予備刺激しかつ G a g 1 9 8 で i n v i t r o で再刺激したマウスが合計 3 用量の D N A を受領するマウスと同じくらい強かった T 細胞応答を生じたという予期されない知見が存在した。これは、G a g 2 9 8 が非常に有望なクラス I I エピトープであること、および / 若しくは G a g 2 9 8 が免疫学的「傍観者」活性を有することを示唆する。G a g 2 9 8 で予備刺激しかつ D N A ワクチンで追加免疫し次いで培養物中で G a g 2 9 8 で再刺激したマウスは、D N A ワクチンレジメン (1 追加免疫若しくは 2 追加免疫) のいずれよりもおよそ 2 倍強かった I F N - 応答

10

20

30

40

50

を示した。HIV 感染個体における IFN- $\gamma$  応答は疾患の進行をモニターするのに使用される数種のパラメータの 1 種にすぎず、また、感染の初期段階で重要であることが示されている。加えて、ウイルス複製の制御における CD4+ T 細胞の重要性は誇張され得ず、そして、であるから Ii-Key ハイブリッドを HIV DNA ワクチンとともに使用することは T 細胞免疫の頻度、持続期間および強度を向上させるはずである。

## 【0066】

## 組換えペプチドワクチン実験

## Ii-Key ペプチド / rHA 免疫化

マウス (4 / 群) を 100  $\mu$ g の Ii-Key ペプチド若しくは 33  $\mu$ g / ペプチド (組合せで) で個別に免疫し、次いで第 21 日に 10  $\mu$ g の rHA (Protein Sciences、コネチカット州メリデン) で追加免疫した。双方のワクチン成分は、rHA を CFA / IFA 中で乳化した 1 実験を除き RIBI アジュバント (Sigma、ミズーリ州セントルイス) 中で乳化しそして尾底部に皮下注入した (図 3)。DNA で免疫したマウスは筋肉内送達される 50  $\mu$ g の pCDNA / HA を受領し、次いで第 14 日に追加免疫した。

## 【0067】

## ペプチドの設計および合成

H5N1 HA クラス II エピトープの好ましい同定方法は、目的の抗原に以前に曝露した個体から末梢血単核細胞 (PBMC) を得、そして予測される若しくは重なるエピトープに対しそれらをスクリーニングすることである。H5N1 ウィルス若しくは開発中の H5N1 ワクチンに曝露した個体からの PBMC は得ることが非常に困難であるため、潜在的なヒトに認識される MHC クラス II エピトープを同定する代替戦略を使用した。

## 【0068】

SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) は MHC クラス I および II 分子を結合することが既知の 450 超のペプチド配列のデータベースを管理し、ならびにエピトープを予測するのに有用なアルゴリズムを提供している。H5N1 A / Duck / Anyang / AVL-1 / 2001 アミノ酸配列 (GenBank; 受託番号 AF468837) から有望な HA エピトープを同定する見込みを最大にするために SYFPEITHI アルゴリズムを使用した。エピトープを HLA-DRB 1 アレル (DRB1\*0101、DRB1\*0301、DRB1\*0401、DRB1\*0701、DRB1\*1101 および DRB1\*1501) について予測した。40 種のトップスコアの予測されるエピトープを、示されるアレルについて SYFPEITHI プログラムから報告されたスコアに従い累積的に等級付けした。付加的な基準および制限を上位 40 位の点数のペプチドに適用することは試験するための 24 種のクラス II エピトープのより小さい一団をもたらした。該選択基準はより詳細に以前に記述されている (http://www.pharmadd.com/archives/May%2016%20%202006/BN%20Tech%20Brief.asp)。

## 【0069】

ペプチドを合成し (NeomPS、カリフォルニア州サンディエゴ) そして Ii-Key モチーフ (LRMK) を組み込むよう改変した。このモチーフはリンカー配列 (5-アミノペンタン酸、ava) を介して各エピトープの N 末端に共有結合した。以前の実験は 1 個の ava リンカーが T 細胞誘導に最適であることを示している (Kallinteris, N. L. ら、Frontiers in Bioscience: 46 (2006))。ペプチドを 20% DMSO に溶解しあつて -80 $^{\circ}$ C で凍結した。

## 【0070】

ヒトにおいて確実な抗原特異的 CD4+ 刺激を誘導する有望な HER-2/neu エピトープの Ii-Key ハイブリッドを使用する以前の研究もまた BALB/c マウスでの強い CD4+ 活性化を示し (未発表の観察結果)、この動物モデルが有望な H5N1 HA エピトープの Ii-Key ハイブリッドを特徴付けするためにもまたはたらきうることを示した。最も一般的なヒトアレルの 6 種と相互作用することが累積的に予測される 24

10

20

30

40

50

種の r HA エピトープのうち、免疫した B A L B / c マウスからの C D 4 + 細胞により認識された 3 種を見出した。

【 0 0 7 1 】

E L I S A 分析

抗体応答を間接的 E L I S A アッセイにより測定した。Maxisorp プレート ( Nunc 、ニューヨーク州ロチェスター ) をコーティング緩衝液中 1  $\mu$ g / ml の r HA 精製タンパク質 ( Protein Sciences 、コネチカット州メリデン ) 若しくは B S A いずれかで被覆した。プレートを 4  $^{\circ}$  で一夜インキュベートし、その後 Well wash 4 M k 2 プレート洗浄機 ( Thermo Labsystems 、マサチューセツ州ウォルサム ) を使用して P B S T で 3 回洗浄し、次いで室温で 1 時間ブロッキングした ( P B S 、 3 % B S A 、 0 . 0 1 % チメロサール ) 。血清サンプル ( 6 種の 1 0 g <sub>2</sub> 希釈 ) を希釈液 ( P B S 、 0 . 1 % Tween 20 、 0 . 1 % B S A 、 0 . 0 1 % チメロサール ) で希釈し、室温で 2 時間ブレーティングしそして 3 回洗浄した。ヤギ抗マウス全 I g G ( Vector Labs 、カリフォルニア州バーリングーム ) を 8 , 0 0 0 倍希釈したか、または 2  $\mu$ g / ml のラット抗マウス I g G I 若しくは I g G 2 a ( BD Biosciences 、カリフォルニア州サンノゼ ) をビオチニル化し、そして室温で 1 時間ブレーティングし、次いで洗浄しあつ 2 , 0 0 0 倍希釈したストレプトアビジン / H R P ( Vector Labs 、カリフォルニア州バーリングーム ) を添加した。3 0 分インキュベートした後にプレートを 4 回洗浄し、次いで T M B 基質溶液 ( BD Biosciences 、カリフォルニア州サンノゼ ) を添加した。十分な発色が一旦起これば 2 N H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> を添加して反応を停止した。L D 4 0 0 E L I S A プレートリーダー ( Beckman Coulter 、カリフォルニア州フラートン ) を使用してシグナル強度を測定した。O D <sub>4 5 0</sub> nm が 0 . 2 以上の O D <sub>4 5 0</sub> nm を生じる希釈でナイーブな動物の血清のものの 2 倍以上である非線形回帰分析 ( Graphpad Prism 、カリフォルニア州サンディエゴ ) を使用することにより終点滴定を測定した。

【 0 0 7 2 】

r HA 免疫マウスを用いるヒトの予測される M H C クラス I I エピトープのスクリーニング

r HA で免疫することはクラス I I エピトープの天然のプロセシングおよび提示を可能にする。A P C / M H C クラス I I 提示は、S Y F P E I T H I エピトープ予測プログラムにより同定される 2 4 種の候補ペプチドのいくつかを認識しうる T 細胞の誘導をもたらす。B A L B / c H - 2 <sup>d</sup> アレルによる認識のためのヒトの予測される M H C クラス I I エピトープをスクリーニングするため、B A L B / c H - 2 <sup>d</sup> マウスを C F A 中で乳化した 1 0  $\mu$ g の r HA でまず免疫し、そしてその後 I F A 中で乳化した 1 0  $\mu$ g の r H A で 2 週後に追加免疫した。免疫原性について若しくは r HA の情況で各ペプチドを個別に試験するよりもむしろ、マウスを最初に r HA で免疫し、2 4 種のペプチドのそれぞれでバルク脾細胞を再刺激し、そしてどのペプチドが認識されたかを決定することがより実際的であった。I i - K ey ペプチド 1 6 0 、 5 5 1 および 2 3 9 での再刺激は、一団中の他のペプチドに関して観察されるより低いがしかし検出可能な応答を伴い、最も強い I F N - および I L - 4 応答を生じた ( 図 3 ) 。全部のペプチドが数種のヒト多様性領域 ( D i v e r s i t y R e g i o n ) ( D R ) アレルを結合することが予測されたため、2 4 種のうち 3 種のみが強い非経口アジュvant の存在下の r HA での免疫化後に B A L B / c マウス脾細胞により認識されたことは驚くべきことでなかった。クラス I I グループ ( g r o o v e ) のペプチドのいくつかの低親和性が最適以下の T 細胞活性化を誘導することが示唆されており ( Gregers , T . F . ら、 I n t I mmunol 1 5 : 1 2 9 1 ( 2 0 0 3 ) ) 、そして低下された認識頻度を引き起こしていたとみられる。

【 0 0 7 3 】

D N A で免疫したマウスを用いるヒトの予測される M H C クラス I I エピトープのスクリーニング

10

20

30

40

50

I i - K e y / エピトープハイブリッド 1 6 0 、 5 5 1 および 2 3 9 の免疫原性活性をさらに実証するために、 p c D N A / H A で免疫した B A L B / c マウスで T 細胞応答を測定した。このプラスミドワクチンは完全長 H A ( A / D u c k / A n y a n g / A V L - 1 / 2 0 0 1 由来の配列) を発現し、そしてマウスで認識されるエピトープのさらなる特徴付けを見込むとみられる。マウスを第 0 日および第 1 4 日に 5 0  $\mu$  g の D N A で筋肉内で免疫し、次いで *in vitro* でペプチドで再刺激した。 I i - K e y ペプチド 1 6 0 、 5 5 1 および 2 3 9 は再度最も頻繁に認識されかつ最も強い応答を誘導したと言え、 I L - 4 応答に適度に歪められた (skewed) ( 図 4 )。同一ペプチドが D N A および r H A 双方でならびに免疫マウスで強く認識された ( 図 3 ) ため、ペプチド 1 6 0 、 5 5 1 および 2 3 9 は、ありそには r H A での後の予備刺激 / 追加免疫研究を実施するため最も免疫原性であるとみられることが確認された。

10

## 【 0 0 7 4 】

I i - K e y ペプチドでの免疫化は I F N - 応答を誘導する

C F A 乳化は高価でありかつより多い r H A の使用を必要とするため R I B I アジュバント系をその後使用した。 R I B I はワクチン製造の間にはるかにより少ない r H A を必要とし、そして C F A より少なく毒性である。同定されたエピトープの免疫原性を確認するため、 B A L B / c マウスを、 R I B I 中で個別に乳化した 1 0 0  $\mu$  g の I i - K e y ペプチド 1 6 0 、 5 5 1 若しくは 2 3 9 で第 0 日に皮下で免疫し、そして第 1 4 日に追加免疫した。 2 用量の I i - K e y ペプチド 5 5 1 若しくは 1 6 0 いずれかで免疫し次いで同一ペプチドで再刺激したマウスは中程度の I F N - 応答を誘導し、 1 6 0 に対する応答が最も顕著であった ( 図 5 A )。 I i - K e y ペプチド 2 3 9 での免疫化は、 2 3 9 ペプチドでの再刺激の間に弱いがしかし検出可能なレベルの I F N - のみ誘導した。しかしながら、 I i - K e y 2 3 9 免疫動物の T 細胞での I i - K e y 1 6 0 ペプチドに対する交差認識が存在するようであった。この群のマウスは I i - K e y 1 6 0 ペプチドで再刺激した場合に適度の応答を表した ( おそらく I i - K e y 1 6 0 ペプチドと交差反応する拡大された T 細胞サブセットから )。 R I B I / R I B I レジメンで免疫したマウスからの検出可能な I L - 4 応答は存在しなかった。マウスを第 0 日に追加免疫で 1 回免疫したのみの研究もまた実施した。 1 用量の I i - K e y 1 6 0 ペプチドは 2 用量の I i - K e y 1 6 0 に関して低下されたレベルの I F N - をもたらした。 1 用量の 5 5 1 若しくは 2 3 9 のいずれも検出不可能なレベルの I F N - をもたらした ( データは示されない )。該結果は少なくとも I i - K e y 1 6 0 が 1 回のみの免疫化後に免疫原性であることを示す。

20

## 【 0 0 7 5 】

I i - K e y ペプチドでのプライミングは r H A に対する T 細胞応答を増強する

臨床研究は、これらの研究で使用した同一の r H A が 2 回の 9 0  $\mu$  g 用量の r H A を受領する個体においてさえ乏しく免疫原性であったことを示した ( T r e a n o r , J . J . ら、 V a c c i n e 1 9 : 1 7 3 2 ( 2 0 0 1 ) )。クラス I I エピトープでのプライミングが r H A に対する T 細胞免疫原性を高めるかどうかを評価するための検討を実施した。第一の研究で、第 0 日にマウスを 1 0 0  $\mu$  g の I i - K e y ペプチド 2 3 9 、 5 5 1 若しくは 1 6 0 で個別にまたは組合せの各ペプチド 3 3  $\mu$  g で予備刺激し、次いで第 2 1 日に R I B I アジュバント中で乳化した 1 0  $\mu$  g の r H A で追加免疫した。対照マウスは R I B I アジュバント次いで r H A で予備刺激した。 *in vitro* 再刺激は、免疫化に使用した I i - K e y ペプチド若しくは抗原エピトープ単独 ( A E O 、 I i - K e y 部分を含まないクラス I I エピトープ) いずれかを用いて追加免疫 2 週後に実施した。ハイブリッドおよび A E O ペプチドは再刺激 4 8 時間後に強い I F N - 応答を誘導した ( 図 3 B )。一般に、 I i - K e y ペプチドで予備刺激した全群は少なくとも I i - K e y 1 6 0 ペプチドに対する T 細胞応答を誘導した。それらは 1 6 0 A E O に対する応答もまた誘導し、該応答が 1 6 0 エピトープに主に向けられかつ結合された I i - K e y 領域若しくは潜在的接合部エピトープに向けられなかつことを示した。

30

R I B I / r H A および r H A / r H A レジメンで免疫したマウスに関して、最も強くかつ最も大きい応答は

40

50

、 I i - K e y 1 6 0 ペプチドで予備刺激しかつ r H A で追加免疫した動物 ( 1 6 0 / r H A 、  $P < 0 . 0 0 1$  ) で観察され、次いで組合せで使用したペプチド ( 2 3 9 、 5 5 1 、 1 6 0 / r H A 、  $P < 0 . 0 0 1$  ) そしてその後 2 3 9 / r H A (  $P < 0 . 0 5$  ) および 5 5 1 / r H A (  $P > 0 . 0 5$  ) であった。再度、 I i - K e y 2 3 9 で予備刺激しかつ I i - K e y 1 6 0 で再刺激したマウスは、配列の相同性が該 2 エピトープ間に存在しないとは言え以前に観察されたところの 1 6 0 エピトープと交差反応した T 細胞を有するようであった ( 図 3 A ) 。 R I B I / r H A レジメンに関して I F N - の有意の誘導は、 T 細胞応答を予備刺激する I i - K e y ペプチドすなわち 1 6 0 および組合せで使用したもの的能力を確認した。検出可能なレベルの I L - 4 はいずれの群でも測定されず、 T h 2 細胞の最適以下のプライミング若しくはおそらく 4 8 時間ペプチド再刺激後の検出可能な I L - 4 の欠如が存在したことを示唆した。組合せの全 3 種のペプチドで予備刺激したマウスでの低下された応答は、ありそうには、全部の他の実験群の 1 0 0  $\mu$  g / ペプチドと対照的に 3 3  $\mu$  g / ペプチドのみを受領するマウスによる。 2 3 9 若しくは 5 5 1 いずれかでの in vitro 再刺激に対する応答は異種予備刺激 / 追加免疫レジメンに關係なく弱い若しくは検出不可能な応答のみ誘導した。

10

## 【 0 0 7 6 】

第二の研究の目的は、 I i - K e y ペプチド / r H A ワクチン接種レジメンを受領するマウスの T 細胞応答を 2 用量の r H A ( r H A / r H A ) を受領するものと比較することであった。 R I B I アジュvant 中で乳化した r H A の 2 回の 1 0  $\mu$  g 用量で免疫したマウスは、 in vitro 再刺激条件下で試験した全部のペプチドに対し検出不可能ないし低い I F N - 応答を生じた。該結果は 1 ( R I B I / r H A ) 若しくは 2 用量 ( r H A / r H A ) の r H A を受領したマウスで同一であった。これは、 C F A / I F A 中で乳化した r H A でマウスを免疫した場合に観察されるはるかにより強い応答とよい対照をなし ( 図 1 ) 、より少なく強力な R I B I アジュvant が最適以下の T 細胞応答を誘導していたかもしれないことを示唆する。 I i - K e y 1 6 0 で予備刺激し、 r H A で追加免疫そして I i - K e y 1 6 0 で再刺激したマウスは、 2 用量の r H A を受領するマウスより 2 0 倍以上より高い I F N - 応答を表した。

20

## 【 0 0 7 7 】

r H A 追加免疫が重要であったかどうかを確認するため、および 1 6 0 / r H A レジメンにより誘導される驚くべき応答が I i - K e y 1 6 0 プライミング段階のみによったという可能性を排除するために、 r H A 追加免疫を伴わず I i - K e y 1 6 0 ペプチドでマウスを予備刺激した研究を実施した。低下されたしかし検出可能な I F N - 応答 ( データは示されない ) が生じた。これは、異種免疫化の情況において r H A 追加免疫が全体的 T 細胞応答に寄与すること、しかし r H A 免疫化単独は乏しい T 細胞免疫原性をもたらすことを示唆する。 1 0 0  $\mu$  g の I i - K e y 1 6 0 でのプライミングから生じるエピトープのより高いモル量は、 r H A での追加免疫により増強し得る抗原特異的 T 細胞応答を開始するのに十分な M H C クラス I I 負荷を提供すること、および r H A 単独はより少なく効率的なプライミングをもたらすはるかにより少ない M H C クラス I I / ペプチド複合体を提供することが可能である。天然のプロセシングおよび提示により生成される 1 6 0 エピトープは、アルゴリズム予測される 1 6 0 I i - K e y ペプチドに配列が完全に同一でないこともまたありそうである。これらの潜在的差違が、エピトープに対する T 細胞の親和性および T 細胞応答のその後の誘導の双方に対する影響を有しうる。しかしながら、実験は、 1 6 0 / r H A レジメンで免疫しかつ r H A で再刺激したマウスからのバルク脾細胞が、 2 用量の r H A を受領したマウスに比較してより高頻度の I F N - 分泌性 T ヘルパー細胞を有したことを示しており、天然にプロセシングかつ提示された 1 6 0 を天然のタンパク質から見分ける応答を誘導する I i - K e y 1 6 0 ペプチドの能力を確認する ( データは示されない ) 。これらのデータは、 1 用量の r H A を I i - K e y / エピトープハイブリッドペプチドワクチンでのプライミングにより ( 2 用量レジメンで ) 置き換えること、および r H A 若しくは他のワクチンの制限された供給量を従ってパンデミックの間に増大させ得るという概念を裏付ける。

30

40

50

## 【0078】

複数の H L A アレルを高親和性で結合することが予測される高度に保存された M H C クラス II H 5 N 1 H A エピトープが I i - K e y を包含するように改変されている。この改変は、M H C クラス II 分子の細胞外負荷 ( l o a d i n g ) および装填 ( c h a r g i n g ) 、次いで C D 4 + T 細胞の直接刺激を可能にする。「独立型」ワクチンとして、I i - K e y ペプチドはナイーブな T 細胞を予備刺激するのに使用し得、それはウイルス感染の経過および重篤度を変えるのに十分な既存の免疫を感染後に提供しうる。その後の実験は、I i - K e y / H 5 ハイブリッド単独でのマウスの免疫化が強い T 細胞応答に至ることを示した。最大レベルの防御免疫の誘導は、もっともありそうには、他のサブユニット若しくは既に開発中の不活性ウイルスワクチンとともに I i - K e y ペプチドの利用から生じるであろう。I i - K e y ハイブリッドでのプライミングは、高度に特異的であるのみならずしかしながらサイトカイン誘導による広範な T 細胞ヘルプおよび他の H 5 バリアントに対するヘテロサブタイプ免疫を誘導する潜在能力もまた提供する強い T 細胞応答を提供する。従って、I i - K e y ハイブリッドにより刺激した C D 4 + T 細胞は、別の方法で存在しないとみられる新興 H 5 N 1 株に対する何らかのレベルの免疫を提供するであろうと期待される。最後に、ペプチドワクチンの使用は、比較的長い貯蔵寿命、製造の容易さおよび臨床試験での良好な安全性プロファイルを包含する、伝統的なワクチンを上回るいくつかの利点を有する。

10

## 【0079】

I F N - 応答は C D 4 + T ヘルパー細胞に依存する

20

I i - K e y ペプチドは A P C の表面に M H C クラス II 分子を装填しあつナイーブな T ヘルパー細胞を活性化すると考えられる。サイトカイン I F N - は T h 1 、 N K および C D 8 + 細胞を包含する多様な細胞型から分泌され得る。上述された *in vitro* 再刺激アッセイで I F N - の供給源を確かめるため実験を実施した。I F N - 分泌の大部分が T ヘルパー細胞に由来したことが期待された。従って、脾細胞を C D 4 + T 細胞を枯渇させ、次いで各ペプチドで再刺激した。48 時間再刺激後に全群の I F N - のレベルは C D 4 + T 細胞の非存在下で大きく低下し(図 6 )、このサイトカインの主供給源が T 細胞由来( T h 1 )であったことを確認したが、とは言え低レベルの N K 若しくは C D 8 + T 細胞活性の可能性は排除し得ない。

30

## 【0080】

赤血球凝集素阻害( H I )測定

V N H 5 N 1 - P R 8 / C D C - r g ウィルスを使用する H I 分析を S o u t h e r n Research Institute ( アラバマ州バーリングーム ) により実施した。希釈した血清サンプルを R D E ( デンカ生研、日本 ) で 37 度一夜処理し、次いで 56 度 30 分間不活性化した。血清サンプルをその後連続希釈し、次いで V N H 5 N 1 - P R 8 / C D C - r g ウィルス ( 4 H A U / ウェル ) を添加した。室温で 30 分インキュベーション後に 1 % ウマ赤血球( R B C )を添加し、次いで追加の 1 時間インキュベートした。H I 力価を目視分析により測定し、そしてペレットにした R B C を含有した反復希釈( r e c i p r o c a l d i l u t i o n )として報告した。

40

## 【0081】

I i - K e y ペプチドでの異種免疫化は体液性応答を増強し得かつ H I 活性を誘導し得る。ウイルスを中和することが可能な高力価のウイルス特異的抗体の存在は、H 5 N 1 感染症( K a t z , J . M . ら、 J I n f e c t D i s 1 8 0 : 1 7 6 3 ( 1 9 9 9 ) )および他の A 型インフルエンザ感染症( M o z d z a n o w s k a , K . ら、 J V i r o l 7 9 : 5 9 4 3 ( 2 0 0 5 ) )を生き残った個体で決定的に重要な役割を演じている。研究は、組換えタンパク質免疫化前の高度に保存された T ヘルパーエピトープでのプライミングがタンパク質ワクチンに対する抗体応答を高め得ることを示した( H o s m a l i n , A . , P . ら、 J I mm u n o l 1 4 6 : 1 6 6 7 ( 1 9 9 1 ) ; V a s l i n , B . ら、 A I D S R e s H u m R e t r o v i r u s e s 1 0 : 1 2 4 1 ( 1 9 9 4 ) )。本発明に関する研究は、I i - K e y M H C クラス II ペプチドで

50

のプライミングが B 細胞応答を増強し、また、T 細胞ヘルプを介する高められた抗体応答を誘導することを示す。マウスを I i - K e y ペプチド 2 3 9、5 5 1 若しくは 1 6 0 または R I B I ( 対照 ) いずれかで別個に予備刺激し、次いで r H A で追加免疫した。 I i - K e y ハイブリッド / r H A レジメンは、対照マウスに関して r H A に対する全 I g G の適度のしかし有意でない増大 ( 力値  $5 \times 10^4$  ) をもたらした ( 図 7 )。マウスはまた、3 種のペプチドの組合せの相乗効果が存在したかどうかを決定するために組合せたペプチド乳化 ( 3 3  $\mu$  g / ペプチド ) でも第 0 日に免疫しそして第 2 1 日に r H A で追加免疫した。興味深いことに、各 I i - K e y ペプチドで個別に予備刺激することに関して全体的 I g G 力値の増大が存在し、該 3 種のペプチドの組合せの可能な相乗効果を示唆した。 10 2 用量のアジュvant 添加した ( a d j u v a n t e d ) r H A を受領するマウスは、他の類似の研究 ( H o e l s c h e r , M . A . ら、 L a n c e t I ) ) O I : 1 0 . 1 0 1 6 / S 0 1 4 0 - 6 7 3 6 ( 0 6 ) : 6 8 0 7 6 ( 2 0 0 6 ) と矛盾しない非常に強い I g G 応答を生じた。大用量の r H A を与えることは、 H A タンパク質の表面露出された B 細胞エピトープを認識する低親和性 B 細胞のみの動員につながるとみられる。ペプチドで予備刺激することによりより強力な T 細胞クローンを誘導することができ、それらは順により低濃度の r H A を認識する表面免疫グロブリンで B 細胞を刺激してより高親和性の抗体に潜在的に至る。

#### 【 0 0 8 2 】

I i - K e y ペプチドでのプライミングが抗体応答を T h 1 ( I g G 2 a ) 若しくは T h 2 ( I g G I ) 型応答に歪ませうるかどうかを確認するため、血清サンプルを抗 H A I g G I および I g G 2 a 抗体の存在について試験した。 I F N - 応答のみが R I B I - アジュvant 添加した実験で検出された上述されたエリススポット分析での結果のため、 T h 1 極性化応答を暗示するより高力値の I g G 2 a が期待された。期待に反して大部分のサンプルは T h 2 様応答を導き出し、より高い I g G I 抗 H A 力値を生じた ( 表 3 )。興味深いことに、5 5 1 若しくは 1 6 0 いずれのペプチドで予備刺激したマウスも R I B I / r H A に関して抑制された I g G 2 a 応答を有するようであった。しかしながら 2 3 9 / r H A で予備刺激したマウスはより大きい I g G 2 a 力値を有し、2 3 9 が 2 3 9 / r H A 免疫化後に強い T 細胞由来 I F N - 応答を誘導することが観察されなかった場合であっても 2 3 9 が B 細胞レベルで何らかの免疫調節活性を有しうることを意味した。プライミング戦略として全 3 種のペプチドを組合せることは、類似のレベルの双方のアイソタイプを誘導し、また、一般にペプチドで予備刺激した力値の最高のもの ( 全 I g G 終点力値と一致した ) を誘導した。血清アイソタイプ応答は T 細胞応答と相關しなかったという事実は R I B I アジュvant の使用により影響されるとみられる。他の研究は R I B I の存在下での I g G 1 の増大されたレベルを示し ( F o g g , C . ら、 V i r o l 7 8 : 1 0 2 3 0 ( 2 0 0 4 ) ) 、そしてこれはここで観察された不一致を部分的に説明しうる。 30

#### 【 0 0 8 3 】

抗体応答の機能性をより完全に検査するために血清サンプルを H I 活性について試験した ( S R I で実施した )。受容体破壊酵素を含む抗血清でサンプルを処理し、そしてその後不活化 V N H 5 N 1 - P R 8 / C D C - r g 代理ウイルスとのインキュベーション後にウマ赤血球の凝集を予防する能力について試験した。このウイルスは V i e t n a m 株 ( A / V N / 1 2 0 1 / 0 3 ) に抗原性が同一であるがしかし非病原性である。最も高い I g G 終点力値を有する群は、全 I g G 分析でなされた観察結果と一致する最も強い H I 力値もまた有するであろうと期待された。組合せ I i - K e y ペプチドレジメン予備刺激したマウスは、わずかな H I 活性 [ 5 0 ] を生じた対照群より 6 倍以上より高かった [ 幾何平均 3 2 0 ] H I 力値を誘導した ( 表 2 )。 I i - K e y 2 3 9、5 5 1 若しくは 1 6 0 で個別に予備刺激することはそれぞれ 2 0 2、1 0 1 および 2 0 2 の力値を誘導した。 40 2 用量の r H A を受領するマウスは最も高い H I 力値 [ 2 0 3 2 ] を生じたとは言え、 R I B I / r H A 群に関して 1 r H A 用量がはるかにより低い力値 [ 5 0 ] を誘導し、 1 r H A 用量が B 細胞誘導に最適以下であることを示唆することに注目することは興味深かつ

10

20

30

40

50

た。ヒトでの40以上のH1力価はH5N1に感染したおよび未感染のヒトで実施した血清学的調査に基づき防御的であると考えられる(Katz, J. M. ら、J. Infect Dis 180: 1763 (1999))とは言え、より高力価をもつ人々は症候性感染症を有し得るためこうした力価は防御を保証しない(Poland, G. A. 、N Engl J Med 354: 141 (2006))。

#### 【0084】

現在のワクチンを取り巻く不十分な免疫原性および供給量の問題を克服するため、われわれは、プライミング戦略として、改変MHCクラスIIエピトープワクチンの利用がrHAおよびおそらく他の慣習的若しくは開発中の代替ワクチンに対するTおよびB細胞応答を増大させ得ることを示した。ワクチン接種へのこうしたアプローチは伝統的なワクチンの製造(例えば卵に基づく)に対する制約を減少させることができ、それらの有効性を向上させかつ利用可能なワクチン用量の数を増大させうる。本研究は、MHCクラスIIエピトープでのプライミングによりT細胞応答が1若しくは2用量のrHAを上回って顕著に向上されることを示す。エリスボット分析は、Th1極性化応答を示唆する検出可能なレベルのIL-4を伴わずにTh1由来IFN- $\gamma$ の優越を示した。CD8 $+$ 細胞からのIFN- $\gamma$ 分泌は肺組織損傷に対し防御することが示された(Wiley, J. A. ら、Am J Pathol 158: 119 (2001))一方、Th2誘導は組織破壊を悪化させた。加えて、研究は、Th2細胞が致死的攻撃に対しマウスを防御しないことを示している(Graham, M. B. ら、J. Exp. Med. 180: 1273 (1994))。従って、Th1に極性化された応答を誘導するrHAとともにのIi-Keyペプチドは、肺組織損傷を最小限度にしつつ感染の処置に有利でありうる。

#### 【0085】

逆に、これらの研究からの抗体応答はT細胞応答と完全には相關しなかった。160/rHAおよび551/rHAワクチンレジメンを受領するマウスは、エリスボット分析の間に検出可能なIL-4の非存在が存在した場合であってもTh2応答を暗示するより高レベルのIgG1を誘導した一方、該研究の残存する群はより均一に分布されたIgG1/IgG2a力価をもたらした。2用量のrHAははるかにより高いIgG終点およびH1力価を生じたとは言え1用量はかなりより低い全血清力価を生じ、高力価(high-titered)抗体応答の誘導が高用量の抗原を必要とすることを示唆した。全3種のIi-Keyペプチドの組合せでのプライミングは1rHA用量に関してrHAに対するB細胞活性を増強した。該結果は、1rHA用量をIi-Keyハイブリッドペプチドにより置き換えてそれによりワクチン供給量を増大させ得ることを示す。この知見は、Tヘルパーエピトープの組合せが、他者(Horvath, A. ら、Immunol Lett 60: 127 (1998); Ninomiya, A. ら、Vaccine 20: 3123 (2002))により示唆されているとおり抗体の産生のためB細胞にヘルプを非特異的に提供する付加的なCD4 $+$ 活性を誘導することもまた示唆する。

#### 【0086】

##### 統計学

統計学的解析は適切な場合はGraphPad Prism、v. 4.03(GraphPad、カリフォルニア州サンディエゴ)を用いて実施した。データはANOVA解析およびNewman-Keuls多重比較検定を使用して解析した。群間の差違はP < 0.05の場合に有意とみなした。

#### 【0087】

ここで提示される研究は、免疫系を予備刺激しつつそれによりHIV若しくはインフルエンザワクチンおよび/またはウイルスそれ自体に対する免疫学的応答性を増大させるための手段としてのIi-Key/エピトープハイブリッドペプチドワクチンの潜在的利用性を示す。

#### 【0088】

【表1】

表1. 免疫化に使用される H5N1 HA および HIV Gag II - Key ペプチド

ペプチド	リンカー <sup>α</sup>	配列 <sup>ψ</sup>
Ii-Key HA239	LRMK-ava	<b>GQSGRMEFFWTIL</b>
Ii-Key HA551	LRMK-ava	<b>VAGLSLWMCSNGS</b>
Ii-Key HA160	LRMK-ava	<b>SFFRNVIWLIKKN</b>
Ii-Key Gag198	LRMK-ava	<b>AAMQMLKETINEE</b>
Ii-Key Gag298	LRMK-ava	<b>YVDRFYKTLRAEQ</b>

α Ii-Key ( LRMK ) は ava ( 5 - アミノペンタン酸 ) スペーサーを介してペプチド配列の N 末端に  
共有結合されている。

ψ コア配列を太字で示す。

10

【0089】

【表2】

表2. VNH5N1-PR8/CDC-rg に対するヘマグルチニン阻害力値

20

HAI 力値<sup>α</sup>(検体 #)

ワクチン <sup>ψ</sup>	1	2	3	GMT
RIBI/rHA	80	40	40	50
239/rHA	320	160	160	202
551/rHA	160	80	80	101
160/rHA	160	160	320	202
239,551,160 / rHA	320	320	320	320
rHA/rHA	2560	2560	1280	2032

30

40

Pos >2560 (CDC 参照 H5N1 抗血清)

Neg 10 (ヒト H5N1 陰性血清)

α 相互 HAI 希釈

ψ マウスは、RIBI アジュバント中で乳化した 100 μg、33 μg / ペプチド若しくは 10 μg rHA で第 0 日に皮下に免疫し、次いで第 21 日に 10 μg HA で追加免疫した。追加免疫 2 週間後に抗血清を収集し、そして VNH5N1-PR8/CDC-rg に対する HI 活性についてアッセイした (Southern Research Institute で実施した)。

【0090】

【表3】

表3. 免疫化後のマウス血清抗 HA アイソタイプ応答

アイソタイプ終点力値<sup>α</sup>

ワクチン <sup>ψ</sup>	IgG2a	IgG1	(IgG2a/IgG1)
RIBI/rHA	37,000 ± 9,000	41,000 ± 13,000	0.90
239/rHA	82,000 ± 14,000	128,000 ± 51,000	0.64
551/rHA	8,000 ± 3,000	41,000 ± 20,000	0.20
160/rHA	13,000 ± 4,000	75,000 ± 22,000	0.17
239,551,160 / rHA	116,000 ± 16,000	116,000 ± 14,000	1.00
rHA/rHA	707,000 ± 140,000	1,100,000 ± 284,000	0.64

10

20

<sup>α</sup> データは平均 ± SEM を表す。

<sup>ψ</sup> マウスは、RIBI アジュバント中で乳化した 100 μg、33 μg / ペプチド若しくは 10 μg rHA で第 0 日に皮下で免疫し、次いで第 21 日に 10 μg rHA で追加免疫した。追加免疫 2 週後に抗血清を収集し、抗 HA IgG2a 若しくは IgG1 抗体応答についてアッセイした。

【図1】

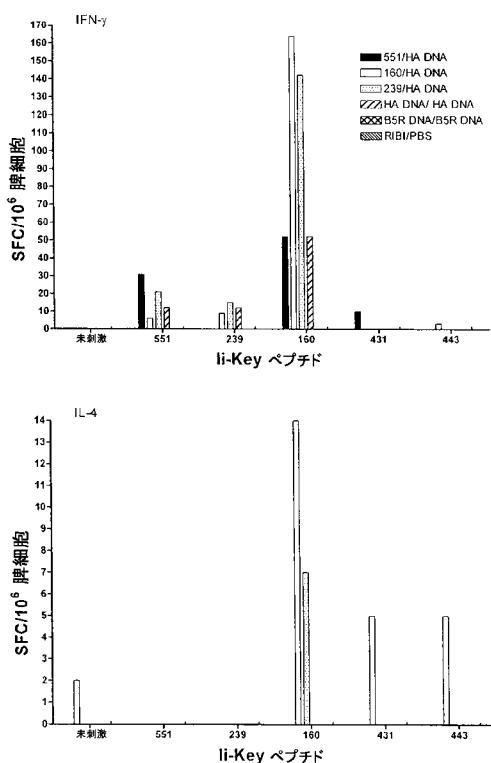


Fig. 1

【図2】

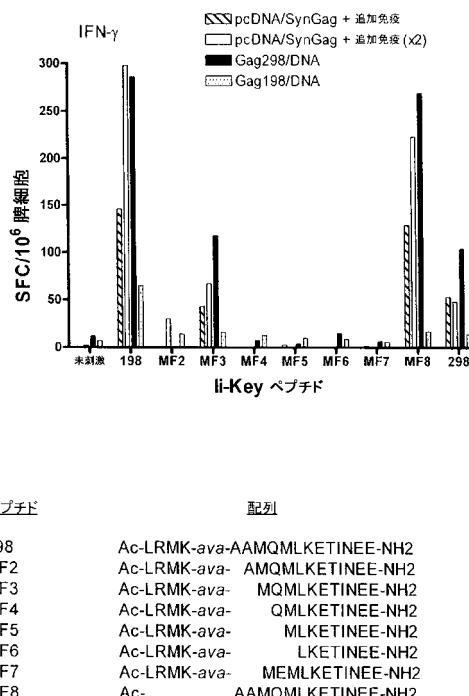


Fig. 2

【図3】

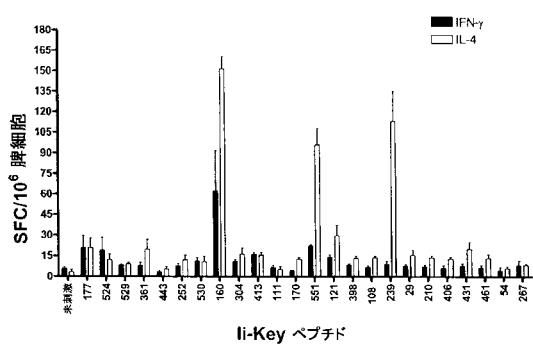


Fig. 3

【図5 A】

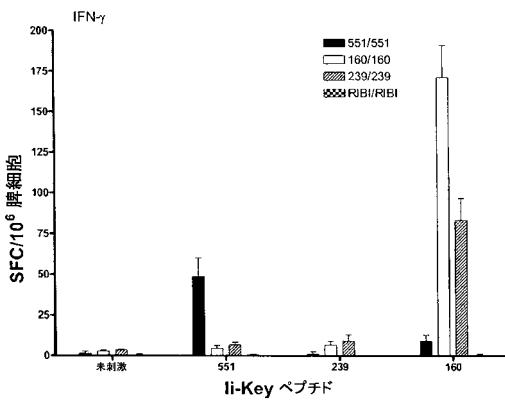


Fig. 5A

【図4】

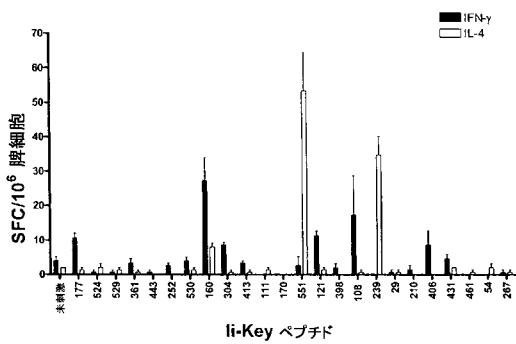


Fig. 4

【図5 B】

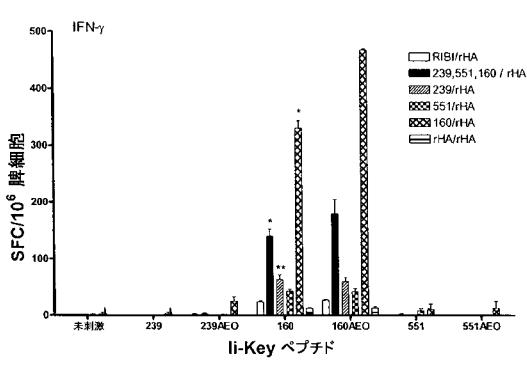


Fig. 5B

【図6】

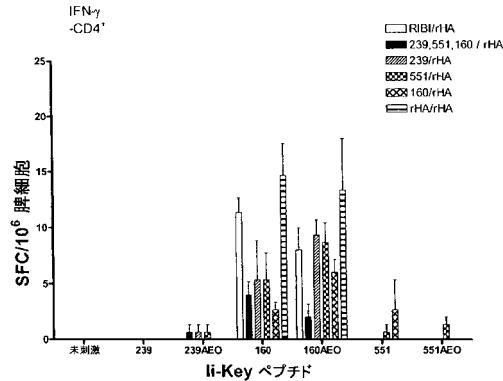


Fig. 6

【図7】

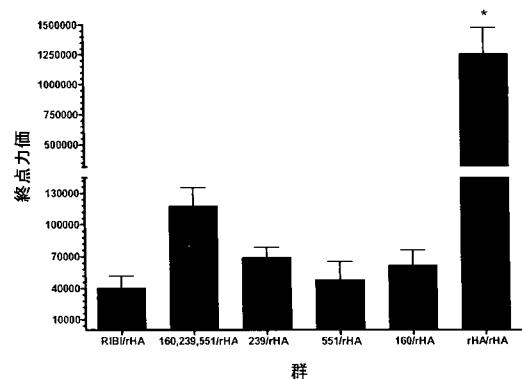
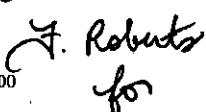


Fig. 7

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/22230
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: A61K 39/00( 2006.01)		
USPC: 424/184.1,192.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/184.1, 192.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0002947 A1 (HUMPHREYS et al.) 5 January 2006 (05.01.2006), entire document.	1-27 and 29-31
Y		28 and 32
X	KALLINTERIS et al., II-Key/MHC class II epitope hybrid peptide vaccines for HIV, Vaccine, 2003, Vol. 21, pages 4128-4132, entire document.	29
Y	KOTSOPOULOU et al., A Rev-Independent Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Based Vector That Exploits a Codon-Optimized HIV-1 gag-pol Gene, Journal of Virology, May 2000, Vol. 74, No. 10, pages 4839-4852.	28 and 32
A	US 6,432,409 B1 (HUMPHREYS et al.) 13 August 2002 (13.08.2002), entire document.	1-32
A	KALLINTERIS et al., Linkage of II-Key segment to gp100(46-58) epitope enhances the production of epitope-specific antibodies, Vaccine, 2005, 23:2336-2338, entire document.	1-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 03 July 2008 (03.07.2008)	Date of mailing of the international search report 12 AUG 2008	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer NICOLE KINSEY WHITE  Telephone No. (571) 272-1600	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. PCT/US07/22230
---

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
Dialog (medline, embase, scisearch, biosis)  
In-house patent database  
Search terms: VACCINE, II-KEY, HEMAGGLUTININ, NEURAMINIDASE, GAG

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 31/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
<b>A 6 1 P 31/04</b> (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
<b>A 6 1 P 31/12</b> (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
<b>A 6 1 P 31/16</b> (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
<b>C 0 7 K 14/11</b> (2006.01)	C 0 7 K 14/11	Z N A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, K, P, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 パウエル, ダグラス・マクミラン

アメリカ合衆国マサチュセツ州 0 1 4 6 0 リトルトン・グ里斯  
ード 6 2 トミルロ

(72)発明者 ジヨン, ジンクグラフ

アメリカ合衆国マサチュセツ州 0 1 5 6 6 スターブリッジ・ニ  
トンロード 3 1 1 ユーボス

F ターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BA07 BA51 BA55 CC07 CC08 DD62 EE06 FF13

FF17

4H045 AA11 BA13 BA15 CA01 CA40 DA86 EA22 FA20 FA74