

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6483033号
(P6483033)

(45) 発行日 平成31年3月13日 (2019. 3. 13)

(24) 登録日 平成31年2月22日 (2019. 2. 22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/869 (2006. 01)	C 1 2 N 15/869 Z N A Z
C 1 2 N 15/33 (2006. 01)	C 1 2 N 15/33
C O 7 K 14/045 (2006. 01)	C O 7 K 14/045
A 6 1 K 35/76 (2015. 01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 P 37/02 (2006. 01)	A 6 1 P 37/02

請求項の数 23 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-561593 (P2015-561593)	(73) 特許権者	503364445
(86) (22) 出願日	平成26年3月5日 (2014. 3. 5)		オレゴン・ヘルス・アンド・サイエンス・
(65) 公表番号	特表2016-513960 (P2016-513960A)		ユニバーシティ
(43) 公表日	平成28年5月19日 (2016. 5. 19)		Oregon Health & Sci
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/020690		ence University
(87) 国際公開番号	W02014/138209		アメリカ合衆国97239オレゴン州ポー
(87) 国際公開日	平成26年9月12日 (2014. 9. 12)		トランド、サウスウエスト・バンクプロト
審査請求日	平成29年3月3日 (2017. 3. 3)		・ストリート0690番
(31) 優先権主張番号	61/772, 962	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成25年3月5日 (2013. 3. 5)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞ターゲティングを調節することができるサイトメガロウイルスベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

異種タンパク質抗原をコードする第1の核酸配列；

U L 1 2 8 またはそのオルソログをコードする第2の核酸配列；および

U L 1 3 1 またはそのオルソログをコードする第3の核酸配列

を含む、ヒトまたは動物のサイトメガロウイルスベクターであって、

活性な U L 1 3 0 タンパク質を発現しない、前記ベクター。

【請求項 2】

異種タンパク質抗原をコードする第1の核酸配列；

U L 1 3 0 またはそのオルソログをコードする第2の核酸配列；および

U L 1 3 1 またはそのオルソログをコードする第3の核酸配列

を含む、ヒトまたは動物のサイトメガロウイルスベクターであって、

活性な U L 1 2 8 タンパク質を発現しない、前記ベクター。

【請求項 3】

点変異、フレームシフト変異、または U L 1 2 8 もしくは U L 1 3 0 の全てもしくは全
て未満の欠失から選択される、U L 1 2 8 または U L 1 3 0 における変異を含む、請求項
1 または 2 に記載のベクター。

【請求項 4】

第4の核酸配列をさらに含み、前記第4の核酸配列が U L 1 2 8 または U L 1 3 0 の発
現を阻害するアンチセンス配列または R N A i 配列を含む、請求項 1 または 2 に記載のベ

10

20

クター。

【請求項5】

異種抗原が病原体特異的抗原を含む、請求項1～4のいずれかに記載のベクター。

【請求項6】

病原体特異的抗原が、ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、または *Mycobacterium tuberculosis* に由来する、請求項5に記載のベクター。

【請求項7】

被験体において異種抗原に対するCD8+T細胞応答を生成する医薬組成物であって、
第1の異種抗原をコードする第1の核酸配列および活性なUL131タンパク質をコードする第2の核酸配列を含む、有効量の第1のサイトメガロウイルス(CMV)ベクターを含み、

10

ここで、第1のCMVベクターが活性なUL128タンパク質をコードしないか、活性なUL130タンパク質をコードせず、そして異種抗原に対する少なくとも10%の前記CD8+T細胞応答がMHCクラスIIによって提示されたエピトープに指向する、医薬組成物。

【請求項8】

第1のCMVベクターが活性なUL128タンパク質をコードせず、且つ活性なUL130タンパク質をコードしない、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

20

前記応答が少なくとも50%のクラスII拘束性CD8+エピトープを含む、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項10】

第1の異種抗原が病原体特異的抗原を含む、請求項7～9のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項11】

病原体特異的抗原が、ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、または *Mycobacterium tuberculosis* に由来する、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

30

被験体が事前にCMVに暴露されている、請求項7～11のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項13】

被験体がヒトまたは非ヒト霊長類である、請求項7～12のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項14】

静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、または経口投与のための、請求項7～13のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項15】

第2の異種抗原をコードする第3の核酸配列を含む第2のCMVベクターをさらに含む、請求項7に記載の医薬組成物。

40

【請求項16】

第2のCMVベクターが、活性なUL128タンパク質および活性なUL130タンパク質をコードする、請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】

第1の異種抗原および前記第2の異種抗原が同一の抗原である、請求項15または16に記載の医薬組成物。

【請求項18】

被験者において異種タンパク質抗原に対するCD8+T細胞応答を誘発するために使用される、請求項7～17のいずれかに記載の医薬組成物。

50

【請求項 19】

被験者が事前にCMVに暴露されている、請求項18に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

被験体がヒトまたは非ヒト霊長類である、請求項18または19に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

被験者において異種タンパク質抗原に対するCD8⁺T細胞応答を誘発するために使用される医薬を製造するための、請求項1～6のいずれかに記載のベクターの使用。

【請求項 22】

被験者が事前にCMVに暴露されている、請求項21に記載の使用。

【請求項 23】

被験体がヒトまたは非ヒト霊長類である、請求項21または22に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府支援の承認

本発明を、国立衛生研究所によって提出された助成金番号P01 A I 0 9 4 4 1 7の合衆国政府の支援を得て実施した。合衆国政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

CD8⁺T細胞は、クラスI MHCタンパク質(MHC-I)および精巧な細胞内ペプチドのサンプリングおよび輸送システムによって、選択され、細胞表面に輸送された病原体由来短鎖ペプチドのT細胞受容体(TCR)媒介認識によって細胞内病原体を検出する(非特許文献1;本明細書中で参考として援用される)。病原体がCD8⁺T細胞認識に適切な長さの何千もの異なるペプチドを潜在的に生成し得るにもかかわらず、タンパク質プロセッシング、ペプチド輸送、利用可能なMHC-I異形への結合、およびTCRレパートリーマッチングの必要性、ならびにあまり理解されていない免疫調節機構により、これらの候補のうちで抗病原体エフェクターおよびメモリー応答を含むCD8⁺T細胞の標的としての機能を実際に果たすペプチドエピトープは相対的に少数まで絞られる(非特許文献2;非特許文献3;非特許文献4)。過程の複雑さにもかかわらず、MHC-I対立遺伝子を共有する個体によって開始される病原体特異的CD8⁺T細胞応答は、いわゆる免疫優性エピトープの重複セットを認識する傾向がある(非特許文献2;非特許文献3、非特許文献5;本明細書中で参考として援用される)。病原体の大部分について、かかる免疫優性エピトープをターゲティングするCD8⁺T細胞応答は、病原体感染細胞を認識して、有効な抗病原体エフェクターおよびメモリー応答を開始することができる。しかし、これはヒト免疫不全ウイルス(HIV)およびそのサル対応物SIVのような効率的な免疫回避能力を有する因子に当てはまらない。これらのウイルスの多数の複製により、高速変異および機能適応性を組み合わせて、ほとんどのCD8⁺T細胞応答から逃避することが可能である(非特許文献6、本明細書中で参考として援用される)。実際に、これらのウイルスが感染した大部分の被験体におけるCD8⁺T細胞応答は、保存された機能的に極めて重要なウイルス配列を含むエピトープをターゲティングできず、ウイルス複製を有効に調節しない(非特許文献7;本明細書中で参考として援用される)。これらのウイルスに対するワクチン接種は感染後のCD8⁺T細胞応答の規模を著しく増大させることができる一方で、これらのより大きな応答は非ワクチン接種被験体の感染と同一の免疫優性エピトープを多数ターゲティングし、したがって、依然として免疫エスケープが起こる(非特許文献6;非特許文献8;非特許文献9;その全てが本明細書中で参考として援用される)。AIDSワクチン分野において(認識幅の増大または保存配列に対する応答の着目のいずれかによって)多様なMHC-Iハプロタイプにわたって「脆弱な」エピトープをターゲティングするHIV/SIV特異的CD8⁺T細胞応答を誘発することができる戦略を開発する努力がなされているにもかかわらず、この努力は、これまでのところ、CD8⁺T細胞の免疫優性ヒエラルキーを実質的に改変することができるストラ

10

20

30

40

50

テジーを得るに至っておらず、大部分の個体において防御CD8⁺T細胞応答を確立するという目的に到達もしていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Neefjies MLら, Nat Rev Immunol 11, 823 (2011)

【非特許文献2】Yewdell JWら, Immunity 25, 533 (2006)

【非特許文献3】Irvine Kら, Expert Rev Clin Immunol 2, 135 (2006) 10

【非特許文献4】Assarsson Eら, J Immunol 178, 7890 (2007)

【非特許文献5】Goulder PJ and Watkins DI, Nat Rev Immunol 8, 619 (2008)

【非特許文献6】Picker LJら, Ann Rev Med 63, 95 (2012)

【非特許文献7】McMichael AJら, Nat Rev Immunol 10, 11 (2010)

【非特許文献8】Barouch DHら, J Virol 77, 7367 (2003) 20

【非特許文献9】Mudd PAら, Nature 491, 129 (2012)

【発明の概要】

【0004】

効率的な免疫回避に必要なウイルス増幅の前に、HIV感染を阻止すると考えられるHIV特異的エフェクターメモリーT細胞応答を生成および維持するための持続性ベクターとして、HIVタンパク質を発現する組み換えサイトメガロウイルス(CMV)を使用したHIV/AIDSワクチンストラテジーが開発されている(Picker, 2012前出)。このアプローチは感染を防止するようにデザインされていなかったが、HIV/AIDSの動物モデルにおいて非常に成功し、高病原性SIVでチャレンジしたCMV/SIVベクターをワクチン接種したアカゲザル(RM)の約50%が即時で厳密な耐久性のあるウイルス制御を示すことが証明された(Hansen, 2011以下)。

【0005】

これらの一連の研究中に、CMV/SIVベクターが、十分に特徴づけられたMamu-A1*001:01(A*01)MHC-Iタンパク質によって提示されたSIVペプチドに対して、典型的な免疫優性CD8⁺T細胞応答を誘発しないことが認められ、CMVベクターがこれらの有効な応答によってターゲティングされた新規のT細胞エピトープを誘導すること、およびこれらの新規の応答がワクチン有効性に寄与することが示唆された。

【0006】

異種抗原(サイトメガロウイルスベクターによって発現されたウイルスおよび細菌の異種抗原など)が、全ての他の公知のベクターによって誘導されたT細胞免疫優性プロフィールと基本的に異なるT細胞免疫優性プロフィールを誘導することを、本明細書中に開示する。SIV抗原を保有するアカゲザルCMV(RhCMV)を感染させたアカゲザル(RM)をヒトCMVの動物モデルとして使用することにより、RhCMV/gagベクターによって誘発されたSIVgag特異的CD8⁺応答が他のワクチンによるSIV感染の際に誘発されたgag特異的CD8⁺T細胞応答の範囲が3倍であることを示す。他のワクチンと比較して、CMV誘発T細胞は、クラスII MHC(MHC-II)によって提示されたエピトープを高率で含む全く異なるエピトープをターゲティングすることをさらに示す。かかる応答は、任意の他の感染性因子またはワクチンに対するCD8⁺T

10

20

30

40

50

細胞応答で認められることはあっても稀である。免疫優性プロフィールがCMVの遺伝的調節下にあることをさらに開示する。具体的には、CMV遺伝子であるUL128およびUL130がこの応答の誘導を防止することを証明する。UL128およびUL130がCMVベクター中に存在する場合、T細胞応答は制限されたエピトープセットに集中するのに対して、MHC-I I拘束性CD8⁺T細胞はUL128またはUL130のいずれかを欠くベクターによって誘導される。これらの所見により、ワクチンベクターが異なるCD8⁺T細胞エピトープパターンを認識するように遺伝子操作する能力が最初に認められた。

【0007】

異種タンパク質抗原、活性なUL131タンパク質（またはそのオルソログ）、活性なUL128タンパク質（またはそのオルソログ）を含むが、活性なUL130タンパク質を欠くCMVベクターを本明細書中に開示する。異種タンパク質抗原、活性なUL131タンパク質（またはそのオルソログ）、活性なUL130タンパク質（またはそのオルソログ）を含むが、活性なUL128タンパク質を欠くCMVベクターも本明細書中に開示する。

【0008】

被験体において異種抗原に対するCD8⁺T細胞応答を生成する方法も本明細書中に開示する。本方法は、有効量のCMVベクターを被験体に投与する工程を含む。CMVベクターは、異種抗原を有し、活性なUL131タンパク質を有するが、活性なUL128タンパク質を持たないか活性なUL130タンパク質を持たないこと、または活性なUL128を持たず、且つ活性なUL130タンパク質を持たないことによって特徴づけられる。応答は、少なくとも10%のCD8⁺T細胞がMHCクラスI Iによって提示されたエピトープに指向することによって特徴づけられる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

本明細書中に含まれるいくつかのグラフおよびプロットについて、色を用いて理解を深めることができるが、特許出願公開では色は利用できない。出願人は、全ての最初に開示した画像およびグラフが（カラーであるかどうかと無関係に）最初の開示の一部であると見なし、今後の手続きにおいて本明細書中に記載の図面のカラーグラフおよびプロットに対する権利を留保する。

【図1A】図1Aは、示した通りに処置したRMにおけるペプチドに対するCD8⁺T細胞応答のエピトープマップである。SIV gagに対するCD8⁺T細胞応答を、RhCMV/gagベクター（n=14）でワクチン接種したアカゲザル（RM）における125の連続する15mer gagペプチド（各連続ペプチド間で11アミノ酸の重複）の認識を検出するためのフローサイトメトリー細胞内サイトカイン染色（ICS）を使用してエピトープマッピングした。これらの実験で使用したRhCMV/gagベクターは、遺伝子欠失のためにUL128およびUL130のRhCMVホモログを発現しない68.1株に由来した。細菌人工染色体（BAC）由来RhCMV/gag（*）は、非BAC由来RhCMV/gag（L）（**）でインタクトなUL36の機能的ホモログをさらに欠く。さらに、エレクトロポレーションを行ったDNA/gag+IL-12ベクター（n=4）、Ad5/gagベクター（n=3）、およびMVA/gagベクター（n=3）をワクチン接種したか、SIV（n=5；血漿ウイルス量50,000コピー/ml未満）を感染させたRMを分析した。バックグラウンドを超えるCD8⁺T細胞応答が得られたペプチドをカラーボックスによって示し、各RMにおけるこれらの陽性応答の総数およびこれらの反応性ペプチド内に潜在的に含まれる独立したエピトープの最小数を右側に示す（後者は、単一のエピトープを隣接する15mer中に示すことができるという事実を考慮した計算を使用する）。被験体あたりの陽性ペプチド数および異なるエピトープの最小数の両方は、両側ウィルコクソン順位和検定を使用して、他の群を統合したRMよりRhCMV/gagワクチン接種RMにおいて有意に高い（p<.0001）。

【図1B】図1Bは、各セットが68.1株RhCMV/gagワクチン接種RMに由来

10

20

30

40

50

するCD8⁺T細胞によってターゲティングされた2つの選択した15merペプチドのコアCD8⁺エпитオプの決定をまとめたペプチドのリストおよび2つの棒グラフからなる2セットである。これらのエпитオプを、ペプチドリスト中に示した短縮ペプチドに対するCD8⁺T細胞応答のフローサイトメトリーICS分析によって決定した。図は、以下の短縮ペプチドセットを使用して認められた2つの応答パターンの代表例を示す：タイプ1（赤色）（ピーク応答性の急激な消失および9merコアエпитオプ）およびタイプ2（青色）（ピーク応答性の漸減および12merコアエпитオプ）。

【図1C】図1Cは、図1Bに示す15mer由来のコアペプチドと比較した親15merペプチドに対するCD8⁺T細胞応答頻度を示す7つのプロットセットである。応答を、各応答について9匹のRMにおけるフローサイトメトリーICSによって比較した。

【図1D】図1Dは、選択されたSIVgagコアエпитオプ（青色および赤色）および選択されたさらなるSIVgag15mer（灰色）に対するCD8⁺T細胞応答を示す2つの棒グラフセットである。CD8⁺応答を、UL128およびUL130が欠損した68.1株RhCMV/gagベクターでワクチン接種した42匹のRMにおけるフローサイトメトリーICSによって評価した。CMVワクチン接種RMを左側のパネルに、40匹のSIV感染RMを右側のパネルに、これらのペプチドに対する検出可能な応答を有する各カテゴリーにおけるRMの比率として示す。

【図2A】図2Aは、示したペプチド（Gag₂₁₁₋₂₂₂、Gag₂₇₆₋₂₈₄、Gag₂₉₀₋₃₀₁、Gag₄₈₂₋₄₉₀、Gag₄₉₅₋₅₀₆についてはn=8；Gag₄₁₋₅₂、Gag₂₅₉₋₂₆₇についてはn=5）を使用した68.1株RhCMV/gagワクチン接種RM由来のPBM Cの刺激の結果を示す棒グラフである。細胞を、無関係のアイソタイプコントロールmAb（IgG1-クローンX40+IgG2a-クローンX39；各10μg）、抗MHC-I mAb（w6-32；10μg）、抗MHC-II mAb（G46-6；10μg）、またはCLIPペプチド（MHC-I I関連インバリエント鎖、アミノ酸89~100；2μg）の存在下にて、示したSIVgagコアエпитオプ（前に図1Bに示すコアエпитオプの長さによってタイプ1対タイプ2に分類）で刺激した。応答頻度を、アイソタイプコントロール処置培養物中の応答頻度に対して正規化し、各処置についてのこれらの正規化応答頻度の平均+SEMを示す。タイプ1に分類された3エпитオプに対する応答のみが抗MHC-I mAbを使用して遮断され、クラス2として分類された4エпитオプのみが抗MHC-II mAbおよびCLIPペプチドを使用して遮断されたことに留意のこと。

【図2B】図2Bは、X軸上に示すように免疫したRMに起因する、示したタイプ（MHC-I遮断、MHC-II遮断、または不確定）のRMあたりのSIVgagエпитオプ数のプロットである。図2Aに記載のSIVgag15merペプチド応答を、MHC-I（mAb w6-32）遮断対MHC-II（mAb G46-6）遮断に供し、MHC-I遮断、MHC-II遮断、または不確定に分類した。各RMについて、ワクチンタイプによって分類した各カテゴリー中の平均ペプチド特異的応答数を示す。

【図2C】図2Cは、応答がMHC-I遮断またはMHC-II遮断によって阻害されるかどうかにしたがって配置された68.1株RhCMV/gagワクチン接種RM由来のCD8⁺T細胞応答のエピトープマップである。MHC-I（赤色ボックス）遮断対MHC-II（青色ボックス）遮断（オープンボックスは不確定を示す）に対する11匹の68.1株RhCMV/gagワクチン接種RMにおける各SIVgagペプチド応答の感受性を示し、MHC-I関連カテゴリーおよびMHC-II関連カテゴリー中の独立エピトープの最小数を右側に示す。

【図3A】図3Aは、RhCMV/gagワクチン接種RM（Rh22034）由来のPBM CのFACSプロットセットである。異なるMHC対立遺伝子によって提示される同一ペプチド（「スーパートープ」）を認識するT細胞を誘導するCMVベクターを、SIVgagペプチドパルス（および洗浄）RM3細胞（MHC-IIヌル親細胞株）対単一のMamuDR分子を発現するRM3トランスフェクタントとインキュベートし、次いで、IFN-γ産生および/またはTNF-α産生（応答頻度を各象限中に示す）の誘導を

10

20

30

40

50

検出するためのフローサイトメトリー I C S を使用してペプチド特異的 C D 8 + T 細胞認識について評価した。試験した M a m u D R 分子は、R h 2 2 0 3 4 によって発現される 4 種 (D R B 1 * 0 3 0 9、D R B 1 * 0 4 0 6、D R B 5 * 0 3 0 1、および D R B * w 2 0 1) および発現されない 1 種 (D R B * w 4 : 0 1) を含んでいた。試験した S I V g a g 1 5 m e r ペプチドは、この R M において、M H C - I 遮断され、したがって、ネガティブコントロールとして使用した G a g 2 7 3 - 2 8 7 (1 5 m e r 番号 6 9) を除き、公知の M H C - I I 遮断 C D 8 + T 細胞エピトープに対応していた。

【図 3 B】図 3 B は、自己 B リンパ芽球様細胞、M H C - I I ヌル親細胞、および単一の M H C - I I トランスフェクタントによる R h 2 2 0 3 4 および R h 2 1 8 3 6 由来の C D 8 + T 細胞に対する G a g 1 4 1 - 1 5 5 (1 5 m e r 番号 3 6) の提示の (図 3 A 10 に) 類似の分析の F A C S プロットセットであり、これらの 2 匹の R M によって相互発現された M a m u - D R B 対立遺伝子 (発現した対立遺伝子を赤色で示し、非発現性対立遺伝子を黒色で示す) に対応している。

【図 4 A】図 4 A は、試験あたり 2 μ g の標準ペプチド濃度から開始した 4 つのコア (最適) S I V g a g ペプチド (2 つがそれぞれ M H C - I 拘束および M H C - I I 拘束) の連続希釈倍率の常用対数を示すプロットである。ペプチドを使用して 6 8 . 1 株 R h C M V / g a g ワクチン接種 R M (n = 5) 由来の P B M C を刺激し、各ペプチド希釈物に対する応答を、フローサイトメトリー I C S によって決定した。各希釈度の対応する C D 8 + T 細胞 (T N F - α および / または I F N - γ 陽性) の頻度を、標準ペプチド濃度での 20 応答に正規化した。図は、各エピトープについての正規化応答の平均 + S E M を示す。

【図 4 B】図 4 B は、総 S I V g a g 1 5 m e r 混合物および 4 つのコア (最適) S I V g a g スーパートープペプチド (2 つがそれぞれ M H C - I 拘束および M H C - I I 拘束) に対する、末梢血 C D 8 + T 細胞応答を示すプロットである。6 8 . 1 株 R h C M V / g a g ワクチン接種 (平均 + S E M ; n = 2 4) 後のフローサイトメトリー I C S によって 25 応答を定量して、M H C - I 拘束対 M H C - I I 拘束のスーパートープ応答誘導の相対動態を証明した。

【図 4 C】図 4 C は、2 種の M H C - I 拘束コア (最適) S I V g a g スーパートープペプチドに対する、C D 8 + T 細胞応答を示す棒グラフである。6 8 . 1 株 R h C M V / g a g ベクターワクチン接種 R M (平均 + S E M ; n = 4) の剖検で示された組織由来の、単核球調製物におけるフローサイトメトリー I C S によって 30 応答を定量した。

【図 4 D】図 4 D は、2 種の M H C - I I 拘束コア (最適) S I V g a g スーパートープペプチドに対する、C D 8 + T 細胞応答を示す棒グラフである。6 8 . 1 株 R h C M V / g a g ベクターワクチン接種 R M (平均 + S E M ; n = 4) の剖検で示された組織由来の、単核球調製物におけるフローサイトメトリー I C S によって 35 応答を定量した。

【図 4 E】図 4 E は、6 8 . 1 株 R h C M V / g a g ワクチン接種 R M (n = 1 4) 由来の P B M C の C D 8 + T 細胞応答の棒グラフである。細胞を、示した総 S I V g a g 1 5 m e r 混合物または M H C - I 拘束対 M H C - I I 拘束のコア (最適) S I V g a g スーパートープペプチドで刺激し、対応する細胞 (T N F - α および / または I F N - γ 陽性) 上での C D 2 8 対 C C R 7 の発現を、フローサイトメトリー I C S によって決定し、それにより、示した T C M / T E M 1 / T E M 2 表現型を示す対応細胞の平均 (± S E M) 40 比率が示された。

【図 4 F】図 4 F は、6 8 . 1 株 R h C M V / g a g ワクチン接種 R M (n = 1 4) 由来の P B M C の C D 8 + T 細胞応答の棒グラフである。細胞を、示した総 S I V g a g 1 5 m e r 混合物または M H C - I 拘束対 M H C - I I 拘束のコア (最適) S I V g a g スーパートープペプチド (対ペプチドなし) で刺激し、示したサイトカインを産生するか、脱顆粒 (C D 1 0 7 外在化) を示す C D 8 + メモリー区画内の細胞の頻度を決定した。図は、バックグラウンド減算後のこれらの応答頻度の平均 (± S E M) を示す。

【図 5 A】図 5 A は、アイソタイプコントロール対遮断抗 M H C - I m A b 対遮断抗 M H C - I I m A b の存在下での R h C M V I E 1 タンパク質を含む連続 1 5 m e r ペプチド (1 1 アミノ酸重複) に対する、ワクチン接種していない天然に R h C M V 感染させた 50

RM (コロニー流行株) 応答対 68. 1株RhCMV/SIVベクターワクチン接種RM 応答由来のPBMCにおける、CD8⁺T細胞の代表的なフローサイトメトリープロフィールセットである。

【図5B】図5Bは、抗MHC-I mAb対抗MHC-II mAbを用いた遮断に対する天然にRhCMV感染させたRMまたは68. 1株RhCMV/SIVベクターワクチン接種RM (n=4/群) 由来のIE1特異的CD4⁺細胞およびCD8⁺T細胞の感受性を比較した棒グラフである。

【図5C】図5Cは、天然にRhCMV感染させたRMおよび68. 1株RhCMV/SIVベクターワクチン接種RM (各n=4) におけるRhCMV IE1に対するCD8⁺T細胞応答のエピトープマップである。応答をエピトープマッピングして137の連続する15mer IE1ペプチドの認識を決定し、次いで、各応答のMHC関連をMHC-I遮断対MHC-II遮断によって分類した。

【図5D】図5Dは、全SIV gag 15mer混合物 (それぞれ5つのユニバーサルRhCMV/gagベクター関連スーパートップ) および2つのMamuA*01+RM (示した基準SIV gag エピトープはそれぞれこの対立遺伝子によって制限される) に対する血中のピーク急性期CD8⁺T細胞応答を示す棒グラフセットである。68. 1株RhCMV/gagベクターをワクチン接種した6匹のRMにおける応答を示し、前記ベクターは、HCMV UL130-128遺伝子のRhCMVオルソログ (Rh157. 4および157. 5) の発現が修復されていた (修復されたRhCMV/gagは、Lilja AE and Shenk T, Proc Natl Acad Sci USA 105, 19950-19955 (2008) (本明細書中で参考として援用される) に記載のようにRhCMV-68-1. 2に由来していた)。

【図5E】図5Eは、抗MHC-I mAb対抗MHC-II mAbでの遮断に対する元の68. 1株RhCMV/SIVベクター対Rh157. 4-5 (UL128-130) 修復RhCMV/gagベクターでワクチン接種したRM (n=6/群) 由来のSIV gag 特異的CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の感受性の比較である。

【図5F】図5Fは、Rh157. 4-5 (UL130-128) 修復RhCMV/gagベクターをワクチン接種した3匹のRMにおけるSIV gagに対するCD8⁺T細胞応答の比較である。応答をエピトープマッピングし、次いで、各応答のMHC関連を、MHC-I遮断対MHC-II遮断によって分類した。MHC-II遮断応答は検出されなかった。

【図6】図6は、UL128を欠くが活性なUL130およびUL131を有するベクター (左) ; UL130を欠くが活性なUL128およびUL131を有するベクター (中央) ; および活性なUL128および活性なUL130を有するが活性なUL131を欠くベクター (右) でワクチン接種した2匹のRMについてのメモリーT細胞サブセット中の、SIV gag 特異的CD8⁺T細胞応答パーセントを示す3つのプロットセットである。UL131を欠くがUL128およびUL130を有するベクターは、いかなるCD8⁺免疫応答も得られなかった (図6、右)。

【図7】図7は、UL128を欠く (しかし活性なUL130およびUL131を有する) RhCMV gag ベクターまたはUL130を欠く (しかし活性なUL128およびUL131を有する) RhCMV gag ベクターでワクチン接種した2匹のRM由来のPBMC中のSIV gag のアミノ末端部分に対応する、約25の重複15merセット内の個別のペプチドに対するCD8⁺T細胞応答を示す上記図1A、2C、および5Cに類似の2つのエピトープマップセットである。ペプチドがMHCクラスIまたはMHCクラスIIによって提示されたかどうかを決定するために、MHC-I特異的抗体またはMHC-I特異的抗体の存在下でT細胞を刺激した。MHC-I特異的抗体またはMHC-II特異的抗体によって阻害されたCD8⁺T細胞応答を、それぞれ赤色および青色で示す。これらの結果は、UL128またはUL130のいずれかを欠くベクターが、MHC-II拘束性CD8⁺T細胞を誘導することを示す。

【図8】図8は、Mycobacterium tuberculosis 抗原であるA

10

20

30

40

50

g 8 5 BおよびE S A T-6を含むΔU L 1 2 8-U L 1 3 0 (6 8-1) R h C M Vベクターで免疫した3匹のR M由来のP B M C中のA g 8 5 Bに対応する7 5の重複1 5 m e rペプチドおよびE S A T-6に対応する2 2の重複1 5 m e rのセット内の個別のペプチドに対する、M H C-I遮断抗体またはM H C-I I遮断抗体の存在下でのC D 8+T細胞応答を示す2つのエピトープマップセットである。結果は、R h C M Vベクターが細菌抗原に対してM H C-I I拘束性C D 8+T細胞を誘導することができることを示す。

【図9】図9は、U L 1 2 8およびU L 1 3 0を欠くR h C M V/g a gベクター(6 8-1)および活性なU L 1 2 8およびU L 1 3 0を含む修復R h C M V/g a gベクター(6 8-1. 2)での連続接種により、異種抗原(S I V g a g)のエピトープ範囲が増大することを証明している。上のパネルは、以前に(1年前未満)R h C M V/S I V g a g(6 8-1)をワクチン接種し、1日目にR h C M V/S I V g a g(6 8-1)をワクチン接種し、次いで、2 3 7日目にR h C M V/S I V g a g(6 8-1. 2)をワクチン接種した2匹のR MのT細胞メモリープール中に存在する、S I V g a g特異的C D 8+T細胞の頻度、経過時間を示す。S I V g a g特異的応答を、重複1 5 m e rペプチドのプール(緑色ライン)または個別のペプチド(赤色ライン)を使用したI C Sのフローサイトメトリーによって測定した。S I V g a gに対する総C D 8+T細胞応答が6 8-1由来ベクターおよび6 8-1. 2由来ベクターの両方での再ワクチン接種の際に増大したのに対して、個別のペプチドに対するC D 8+T細胞応答が6 8-1. 2由来ベクターによって強化されず、これは、総応答の増加が新規のS I V g a gペプチドに対する6 8-1. 2ベクター誘発T細胞に起因することを示していたことに留意のこと。この結論は、下のパネル中に示す結果によって支持される。R h C M V/S I V g a g(6 8-1)での第1のワクチン接種後、R h C M V/S I V g a g(6 8-1)での再ワクチン接種後、およびR h C M V/S I V g a g(6 8-1. 2)でのワクチン接種後のいずれかでR h C M V/S I V g a gを接種した2匹の各R M由来のT細胞によって認識されるS I V g a g配列に沿った個別の1 5 m e rペプチドの位置を示す。各ワクチン接種は、以前の免疫応答を維持しながらT細胞をさらに誘発して新規のエピトープを認識した: 6 8-1由来ベクターでの再ワクチン接種後にT細胞によって認識される新規のエピトープを青色で示すのに対して、6 8-1. 2由来ベクターでのワクチン接種後に認識される新規のエピトープを緑色で示す。これらのT細胞応答が付加的であるので、1 2 5のうちの5 2および4 5の重複ペプチドに対するT細胞応答を連続ワクチン接種の際に測定し、したがって、単一ワクチン接種と比較してT細胞によるS I V g a g由来ペプチドの範囲がほぼ倍になった。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 0】

詳細な説明

生物に反復して感染させることができるヒトまたは動物のサイトメガロウイルス(C M V)ベクターを本明細書中に開示する。C M Vベクターは、異種タンパク質抗原をコードする核酸配列および活性なU L 1 3 1タンパク質をコードする核酸配列を含む。1つの例では、C M Vベクターは、活性なU L 1 2 8タンパク質を発現するが活性なU L 1 3 0タンパク質を発現しない核酸配列を含む。別の例では、C M Vベクターは、活性なU L 1 3 0タンパク質をコードするが、活性なU L 1 2 8タンパク質を発現しない。

【0 0 1 1】

いくつかの例では、ベクターは、動物C M V中のU L 1 2 8もしくはU L 1 3 0またはそのオルソログス遺伝子をコードする核酸配列の有害変異の存在によって、活性なU L 1 2 8タンパク質またはU L 1 3 0タンパク質を発現しない。変異は、活性なU L 1 2 8タンパク質またはU L 1 3 0タンパク質の発現を欠如させる任意の有害変異であり得る。かかる変異には、点変異、フレームシフト変異、タンパク質をコードする全配列未満の欠失(短縮変異)、またはタンパク質をコードする全核酸配列の欠失、または任意の他の変異が含まれ得る。

10

20

30

40

50

【0012】

さらなる例では、ベクターは、UL128タンパク質またはUL130タンパク質の発現を阻害するアンチセンスまたはRNAi配列（siRNAまたはmiRNA）を含むベクター中の核酸配列の存在に起因して、活性なUL128タンパク質またはUL130タンパク質を発現しない。

【0013】

被験体における異種抗原に対するCD8+T細胞応答の生成方法も本明細書中に開示する。本方法は、有効量のCMVベクターを被験体に投与する工程を含む。CMVベクターは、異種抗原をコードする核酸配列および活性なUL131タンパク質をコードする核酸配列を有することを特徴とする。CMVベクターは、さらに、活性なUL128タンパク質または活性なUL130タンパク質をコードしないか、活性なUL128タンパク質および活性なUL130タンパク質のいずれもコードしないことによって特徴づけられる。CD8+T細胞応答は、さらに、MHCクラスIIによって提示されたエピトープに指向する少なくとも10%のCD8+T細胞を有することによって特徴づけられる。さらなる例では、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または60%を超えるCD8+T細胞は、MHCクラスIIによって提示されたエピトープに指向する。

【0014】

さらなる例では、本方法は、有効量の第2のCMVベクター（この第2のCMVベクターは異種抗原をコードする核酸配列を含む）を被験体に投与する工程を含む。この第2のベクターは、任意のCMVベクター（活性なUL128タンパク質および活性なUL130タンパク質を有するCMVベクターが含まれる）であり得る。第2のCMVベクターは、異なる免疫応答を得るための当該分野で公知のさらなる欠失（US11欠失または任意の他の欠失など）を含むことができる。第2の異種抗原は、任意の異種抗原（第1のCMVベクター中の異種抗原と同一の異種抗原が含まれる）であり得る。第2のCMVベクターを、第1のCMVベクターの投与に対して任意の時間（第1のCMVベクターの投与前、同時、または投与後が含まれる）に投与することができる。これは、第1のベクターの投与前または投与後から数カ月、数日、数時間、数分、または数秒での第2のベクターの投与を含む。

【0015】

ヒトまたは動物のCMVベクターは、発現ベクターとして使用する場合、ヒトなどの選択された被験体において本質的に非病原性であるか、選択された被験体において非病原性になるように改変されている。例えば、複製欠損アデノウイルスおよびアルファウイルスは周知であり、遺伝子送達ベクターとして使用することができる。

【0016】

異種抗原は、CMVに由来しない任意のタンパク質またはそのフラグメント（癌抗原、病原体特異的抗原、モデル抗原（リゾチームまたはオボアルブミンなど）、または任意の他の抗原が含まれる）であり得る。

【0017】

病原体特異的抗原は、任意のヒトまたは動物の病原体に由来し得る。病原体はウイルス病原体であってよく、抗原はウイルス病原体由来タンパク質であってよい。ウイルスには、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス、単純ヘルペスウイルスタイプ1、単純ヘルペスウイルスタイプ2、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、カポジ肉腫ヘルペスウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルスタイプ8、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、黄熱病ウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパピローマウイルス、狂犬病ウイルス、風疹ウイルス、ヒトボカウイルス、およびパルボウイルスB19が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0018】

病原体は細菌病原体であってよく、抗原は細菌病原体由来のタンパク質であってよい。病原性細菌には、*Bordetella pertussis*、*Borrelia burgdorferi*、*Brucella abortus*、*Brucella canis*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Campylobacter jejuni*、*Chlamydia pneumoniae*、*Chlamydia trachomatis*、*Chlamydophila psittaci*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*、*Escherichia coli*、*Francisella tularensis*、*Haemophilus influenzae*、*Helicobacter pylori*、*Legionella pneumophila*、*Leptospira interrogans*、*Listeria monocytogenes*、*Mycobacterium leprae*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycobacterium ulcerans*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Rickettsia rickettsii*、*Salmonella typhi*、*Salmonella typhimurium*、*Shigella sonnei*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus saprophyticus*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Treponema pallidum*、*Vibrio cholera*、および*Yersinia pestis*が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0019】

病原体は寄生虫であってよく、抗原は寄生虫病原体に由来するタンパク質であってよい。寄生虫は、原生動物または疾患（アカントアメーバ、バベシア症、バランチジウム症、ブラストシスチス症、コクシジウム垂綱、二核アメーバ症、アメーバ症、ジアルジア、イソスポーラ症、リーシュマニア症、原発性アメーバ性髄膜脳炎（PAM）、マラリア、リノスポリジウム症、トキソプラズマ症—寄生性肺炎、トリコモナス症、眠り病、およびシャーガス病などであるが、これらに限定されない）を引き起こす原生動物であり得る。寄生虫は蠕虫類または蠕虫または蠕虫類に原因する疾患（鉤虫症／鉤虫、アニサキス症、回虫—寄生性肺炎、回虫—ベイリスアスカリス症、条虫—条虫症、肝吸虫症、*Diocotylphyme renalis*感染、裂頭条虫症—条虫、ギニア虫—メジナ虫症、エキノコックス症—条虫、蟯虫—蟯虫症、肝吸虫—肝蛭症、肥大吸虫症—腸管寄生吸虫、顎口虫症、模様条虫症、ロア糸状虫フィラリア症、カラバル腫脹、マンソネラ症、フィラリア症、メタゴニムス症—腸管寄生吸虫、河川盲目症、中国肝吸虫、肺吸虫症、肺吸虫、住血吸虫症—ビルハルジア属、ビルハルツ住血吸虫症または巻貝熱（全タイプ）、腸住血吸虫症、尿路住血吸虫症、*Schistosoma japonicum*による住血吸虫症、アジア腸住血吸虫症、孤虫症、糞線虫症—寄生肺炎、無鉤条虫、有鉤条虫、トキソカラ症、旋毛虫症、水泳性痒疹、鞭虫、およびリンパ性フィラリア性象皮症などであるが、これらに限定されない）であってよい。寄生虫は、生物または生物に原因する疾患（寄生蠕虫、ヘルザン症候群、ハエ幼虫症、スナノミ、ヒトヒフバエ、およびカンジルーなどであるが、これらに限定されない）であってよい。寄生虫は、外寄生生物または外寄生生物に原因する疾患（トコジラミ、アタマジラミ—シラミ寄生症、コロモジラミ—シラミ寄生症、ケジラミ—シラミ寄生症、ニキビダニ属—毛嚢虫症、疥癬、スクリューワーム、およびコクリオミイ属などであるが、これらに限定されない）であってよい。

30

40

50

【0020】

抗原は、癌由来のタンパク質であってよい。癌には、急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄白血病；副腎皮質癌；A I D S 関連癌；A I D S 関連リンパ腫；肛門癌；虫垂癌；星状細胞腫（小児期の小脳癌または大脳癌）；基底細胞癌；胆管癌（肝外）；膀胱癌；骨の癌（骨肉腫／悪性線維性組織球腫）；脳幹部神経膠腫；脳腫瘍；脳腫瘍（小脳星状細胞腫）；脳腫瘍（大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫）；脳腫瘍（上衣腫）；脳腫瘍（髄芽腫）；脳腫瘍（テント上原始神経外胚葉腫瘍）；脳腫瘍（視覚路および視床下部の膠腫）；乳癌；気管支腺腫／カルチノイド；バーキットリンパ腫；カルチノイド腫瘍（小児期）；カルチノイド腫瘍（消化管）；原発巣不明の癌腫；中枢神経系リンパ腫（原発性）；小脳星状細胞腫（小児期）；大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫（小児期）；子宮頸癌；小児癌；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性障害；結腸癌；皮膚T細胞リンパ腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；子宮内膜癌；上衣腫；食道癌；ユーイング腫瘍ファミリーにおけるユーイング肉腫；頭蓋外胚細胞腫瘍（小児期）；性腺外胚細胞腫瘍；肝外胆管癌；眼球の癌（眼球内黒色腫）；眼球の癌（網膜芽細胞腫）；胆嚢癌；胃がん（胃癌）；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質腫瘍（G I S T）；胚細胞腫瘍：頭蓋外、性腺外、または卵巣；妊娠性絨毛性腫瘍；脳幹神経膠腫；神経膠腫（小児大脳星状細胞腫）；神経膠腫（小児期の視覚路および視床下部）；胃カルチノイド；毛様細胞白血病；頭頸部癌；心臓癌；肝細胞（肝）癌；ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；視床下部および視覚路の神経膠腫（小児期）；眼球内黒色腫；島細胞癌（膵内分泌部）；カボジ肉腫；腎臓癌（腎臓細胞癌）；喉頭癌；白血病；白血病（急性リンパ芽球性（急性リンパ球性白血病とも呼ばれる））；白血病（急性骨髄性（急性骨髄性白血病とも呼ばれる））；白血病（慢性リンパ球性（慢性リンパ球性白血病とも呼ばれる））；白血病（慢性骨髄性（慢性骨髄性白血病とも呼ばれる））；白血病（毛様細胞性）；口唇および口腔の癌；肝臓癌（原発性）；肺癌（非小細胞）；肺癌（小細胞）；リンパ腫；リンパ腫（A I D S 関連）；リンパ腫（バーキット）；リンパ腫（皮膚T細胞）；リンパ腫（ホジキン）；リンパ腫（非ホジキン（ホジキンリンパ腫を除く全リンパ腫の古い分類））；リンパ腫（原発性中枢神経系）；マーカスホイットル（致死性疾患）；マクログロブリン血症（ワルデンシュトレーム）；骨の悪性線維性組織球腫／骨肉腫；髄芽腫（小児期）；黒色腫；黒色腫（眼内（眼球））；メルケル細胞癌；中皮腫（成人悪性）；中皮腫（小児期）；原発巣不明の転移性頸部扁平上皮癌；口腔の癌；多発性内分泌腫瘍症候群（小児期）；多発性骨髄腫／形質細胞新生物；菌状息肉症；骨髄異形成症候群；骨髄異形成疾患／骨髄増殖性疾患；骨髄性白血病（慢性）；骨髄性白血病（成人急性）；骨髄性白血病（小児急性）；骨髄腫（多発性）（骨髄の癌）；骨髄増殖性障害（慢性）；鼻腔および副鼻腔の癌；鼻咽癌；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌；口腔がん；口腔咽頭癌；骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫；卵巣癌；卵巣上皮癌（被蓋上皮一間質性腫瘍）；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度腫瘍；膵臓癌；膵臓癌（島細胞）；副鼻腔および鼻腔の癌；副甲状腺癌；陰茎癌；咽頭癌；クロム親和性細胞腫；松果体星状細胞腫；松果体胚細胞腫；松果体芽細胞腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍（小児期）；下垂体腺腫；形質細胞新形成／多発性骨髄腫；胸膜肺芽腫；原発性中枢神経系リンパ腫；前立腺癌；直腸癌；腎細胞癌（腎臓癌）；腎盂および尿管の移行細胞癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫（小児期）；唾液腺癌；肉腫（ユーイング腫瘍ファミリー）；肉腫（カボジ）；肉腫（軟部組織）；肉腫（子宮）；セザリー症候群；皮膚癌（非黒色腫）；皮膚癌（黒色腫）；皮膚癌腫（メルケル細胞）；小細胞肺癌；小腸癌；軟部組織肉腫；扁平上皮癌（皮膚癌（非黒色腫）を参照のこと）；原発巣不明の扁平上皮頸部癌（転移性）；胃癌；テント上原始神経外胚葉腫瘍（小児期）；T細胞リンパ腫（皮膚）（菌状息肉症およびセザリー症候群）；睾丸癌；咽頭癌；胸腺腫（小児期）；胸腺腫および胸腺癌；甲状腺癌；甲状腺癌（小児期）；腎盂および尿管の移行細胞癌；絨毛性腫瘍（妊娠性）；原発部位不明の癌腫（成人）；原発部位不明の癌（小児期）；尿管および腎盂（移行細胞癌）；尿道癌；子宮癌（子宮内膜）；子宮肉腫；陰癌；視覚路および視床下部の膠腫（小児期）；外陰癌；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、およびウィルムス腫瘍（腎臓癌）が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0021】

本明細書中に記載のCMVベクターにより、組換えヒトまたは動物CMVを含む異種DNAのクローニングまたは発現のためのベクターが得られる。異種DNAは、目的のエピトープ、生物学的応答モジュレーター、成長因子、認識配列、治療遺伝子、または融合タンパク質を含む発現産物をコードすることができる。

【0022】

本明細書中に開示のCMVベクターを、組換えCMVウイルスまたはベクターおよび薬学的に許容され得るキャリアまたは希釈剤を含む免疫原性組成物、免疫学的組成物、またはワクチン組成物として使用することができる。組換えCMVウイルスまたはベクター（またはその発現産物）を含む免疫学的組成物は、免疫学的応答（局所または全身）を誘発する。応答は、防御的であり得るが、その必要はない。組換えCMVウイルスまたはベクター（またはその発現産物）を含む免疫原性組成物は、同様に、防御的であり得るが、その必要はない局所または全身の免疫学的応答を誘発する。ワクチン組成物は、局所または全身の防御応答を誘発する。したがって、用語「免疫学的組成物」および「免疫原性組成物」には「ワクチン組成物」が含まれる（前者の2つの用語が防御的組成物であり得る場合）。

10

【0023】

本明細書中に開示のCMVベクターにより、被験体において免疫学的応答を誘導する方法であって、組換えCMVウイルスまたはベクターおよび薬学的に許容され得るキャリアまたは希釈剤を含む免疫原性組成物、免疫学的組成物、またはワクチン組成物を前記被験体に投与する工程を含む、方法が得られる。本明細書の目的のために、用語「被験体」には全ての動物（非ヒト霊長類およびヒトが含まれる）が含まれ、一方、「動物」にはヒト以外の全ての脊椎動物種が含まれ、「脊椎動物」には全ての脊椎動物（動物（「動物」を本明細書中で使用する場合）およびヒトが含まれる）が含まれる。勿論、「動物」のサブセットは「哺乳動物」であり、本明細書の目的のために、ヒト以外の全ての哺乳動物が含まれる。

20

【0024】

本明細書中に開示のCMVベクターを、組換えCMVウイルスまたはベクターおよび薬学的に許容され得るキャリアまたは希釈剤を含む治療組成物中で使用することができる。治療組成物は、本発明の遺伝子療法および免疫療法における実施形態（例えば、宿主に組成物を投与する工程を含む遺伝情報を必要とする動物またはヒトに遺伝情報を伝達する方法）で有用であり、したがって、本発明は、遺伝情報の伝達方法を含む。

30

【0025】

本明細書中に開示のCMVベクターを、タンパク質または遺伝子産物または発現産物を発現する方法であって、*in vitro*にて細胞を本発明の組換えCMVウイルスまたはベクターで感染またはトランスフェクトする工程、および、任意選択的に、細胞から前記タンパク質、遺伝子産物、発現産物、またはDNAを抽出、精製、または単離する工程を含む、方法で使用することができる。さらに、本発明は、異種DNA配列をクローニングまたは複製する方法であって、*in vitro*または*in vivo*にて細胞を本発明の組換えCMVウイルスまたはベクターで感染またはトランスフェクトする工程、および、任意選択的に、細胞または子孫ウイルスから前記DNAを抽出、精製、または単離する工程を含む、方法を提供する。

40

【0026】

本明細書中に開示のCMVベクターを、異種抗原をコードする配列を含むDNAをCMVゲノムの非必須領域に挿入することによって調製することができる。本方法は、CMVゲノム由来の1つ以上の領域を欠失する工程をさらに含むことができる。本方法は、*in vivo*組換えを含むことができる。したがって、本方法は、CMVゲノムの一部と相同なDNA配列に隣接する異種DNAを含むドナーDNAの存在下で細胞適合培地中にて細胞をCMV DNAでトランスフェクトし、それにより、異種DNAがCMVゲノムに導入される工程、および、任意選択的に、次いで*in vivo*組換えによって改変され

50

たCMVを回収する工程を含むことができる。本方法はまた、CMV DNAを切断して切断CMV DNAを得る工程、異種DNAを切断されたCMV DNAにライゲートしてハイブリッドCMV-異種DNAを得る工程、細胞をハイブリッドCMV-異種DNAでトランスフェクトする工程、および、任意選択的に、異種DNAの存在によって改変されたCMVを回収する工程を含むことができる。in vivo組換えを包含するので、本方法により、CMVとは無関係のポリペプチドをコードするCMV中に天然に存在しないドナーDNAを含むプラスミドも得られ、前記ドナーDNAは、CMV DNAのセグメント内に存在し、そうでなければ、CMVの非必須領域由来のDNAがドナーDNAに隣接するようにCMVゲノムの非必須領域と同一線上に存在するであろう。異種DNAをCMVに挿入して前記DNAが安定に組み込まれる任意の配置で組換えCMVを生成し、必要に応じて、発現させることができる。

10

【0027】

組換えCMVベクター中の異種抗原をコードするDNAは、プロモーターを含むこともできる。プロモーターは、ヘルペスウイルスなどの任意の供給源に由来し得る（ヒトCMV（HCMV）、アカゲザルCMV（RhCMV）、マウス、または他のCMVプロモーターなどの内因性サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターが含まれる）。プロモーターはまた、EF1αプロモーターなどの非ウイルスプロモーターであり得る。プロモーターは、ウイルスによって提供されたトランス活性化タンパク質を使用してトランス活性化される領域および短縮転写活性プロモーターが由来する全長プロモーターの最小プロモーター領域を含む短縮転写活性プロモーターであり得る。本明細書の目的のために、プロモーターは、最小プロモーターに対応するDNA配列および上流調節配列の会合物から構成される。最小プロモーターは、CAP部位+TATAボックス（基本的レベルの転写のための最小配列；無制御レベルの転写）から構成され、「上流調節配列」は、上流エレメントおよびエンハンサー配列から構成される。さらに、用語「短縮された」は、全長プロモーターが完全な状態で存在しないこと（すなわち、全長プロモーターのいくつかの部分除去されていること）を示す。さらに、短縮プロモーターは、MCMVまたはHCMV（例えば、HCMV-IEまたはMCMV-IE）などのヘルペスウイルスに由来し得る。

20

【0028】

前述のプロモーターのように、本発明のプロモーターは、ヘルペスウイルス（例えば、MCMV-IEプロモーターまたはHCMV-IEプロモーターなどのMCMVまたはHCMV）であってよく、塩基対に基づいて、全長プロモーターの40%まで、さらに90%までサイズを小さくすることができる。プロモーターはまた、改変非ウイルスプロモーターであり得る。

30

【0029】

短縮転写活性プロモーターを含む組換えウイルスまたはプラスミドに挿入することができる発現カセットも開示する。発現カセットは、さらに、機能的な短縮ポリアデニル化シグナル（例えば、短縮されているが、依然として機能的なSV40ポリアデニル化シグナル）を含むことができる。本来はより大きなシグナルであることを考慮すると、短縮ポリアデニル化シグナルが機能的であり、且つ短縮ポリアデニル化シグナルがCMVなどの組換えウイルスのインサートサイズ制限の問題に対応することは実際に驚くべきことである。発現カセットは挿入されるウイルスまたは系に関して異種のDNAを含むこともでき、このDNAは本明細書中に記載の異種DNAであり得る。

40

【0030】

より特異的態様では、本発明は、CMV、ウイルスプロモーターまたは非ウイルスプロモーターを含む組換え体、およびこれら由来の短縮プロモーターを含む。本発明は、さらに、本発明の組成物および／または組換え体によって誘発される抗体およびかかる抗体の使用を包含する。抗体、抗体を誘発する生成物（目的のエピトープ）、または前記抗体由来のモノクローナル抗体を、結合アッセイ、結合試験、または結合キットで使用する抗原または抗体の有無を決定することができる。

50

【0031】

本発明で使用される隣接DNAは、挿入部位または挿入部位に隣接するゲノム部分（ここで、「隣接する」には、連続した配列（例えば、コドン）およびその前に介在挿入部位が存在する配列（例えば、コドン）が含まれる）に由来し得る。

【0032】

ワクチン組成物または免疫学的組成物で用いる抗原に関しては、Stedman's Medical Dictionary 24th edition, 1982（例えば、ワクチンの定義（ワクチン処方で使用される抗原のリストについて；かかる抗原または抗原由来の目的のエピトープを、本発明において、本発明の組換えウイルスの発現産物としてか、本発明の組換えウイルスまたは本発明の組換えウイルスに由来する発現産物を含む多価組成物中のいずれかで使用することができる）も参照のこと。

10

【0033】

異種抗原に関して、当業者は、異種抗原およびそのコードDNAを、過度に実験することなく、アミノ酸およびペプチドまたはポリペプチドの対応するDNA配列の知識ならびに特定のアミノ酸の性質（例えば、サイズ、電荷など）およびコドンディクショナリーから選択することができる。

【0034】

配列に関して、DNA配列は、少なくとも抗体応答またはT細胞応答、特にCD8⁺T細胞応答を生じる抗原の領域をコードすることが好ましい。T細胞エピトープおよびB細胞エピトープを決定するための1つの方法は、エピトープマッピングを含む。異種抗原のオーバーラッピングペプチドを、オリゴペプチド合成によって生成する。次いで、個別のペプチドを、未変性タンパク質によって誘発される抗体に結合するか、T細胞活性化またはB細胞活性化を誘導する能力について試験する。T細胞がMHC分子と複合体化した短い直鎖ペプチドを認識するので、このアプローチは、T細胞エピトープのマッピングで特に有用であった。

20

【0035】

異種抗原に対する免疫応答は、一般に、以下のように生成される：タンパク質がより小さなペプチドに切断され、別の細胞表面上に存在する「主要組織適合性遺伝子複合体（major histocompatibility complex）（MHC）」と呼ばれる複合体中に提示される場合に限り、T細胞はタンパク質を認識する。MHC複合体には2つのクラス（クラスIおよびクラスII）が存在し、各クラスは多数の異なる対立遺伝子で構成されている。異なる種および個別の被験体は異なるMHC複合体対立遺伝子タイプを有し、これらのタイプを、異なるHLAタイプを有するという。

30

【0036】

異種抗原をコードする配列を含むDNA自体がCMVベクター中での発現の駆動のためのプロモーターを含むことができるか、DNAを異種抗原のコードDNAに制限することができることに留意する。この構築物を、内因性CMVプロモーターに関して、前記構築物が前記プロモーターに作動可能に連結され、それにより、発現されるように配置することができる。さらに、発現を増幅または増加させるために、異種抗原をコードする複数のDNAコピーまたは強力プロモーターもしくは初期プロモーターまたは初期プロモーターもしくは後期プロモーター、あるいはその組み合わせを使用することができる。したがって、異種抗原をコードするDNAをCMV内因性プロモーターに関して適切に配置することができるか、これらのプロモーターを、異種抗原をコードするDNAと共に別の位置に挿入されるように移動させることができる。1つを超える異種抗原をコードする核酸を、CMVベクター中にパッケージングすることができる。

40

【0037】

開示のCMVベクターを含む薬学的組成物および他の組成物をさらに開示する。かかる薬学的組成物および他の組成物を、当該分野で公知の任意の投与手順で 사용되는ように処方することができる。かかる薬学的組成物は、非経口経路（皮内、筋肉内、皮下、または静脈内など）を介することができる。投与はまた、粘膜経路（例えば、経口、鼻腔、生

50

殖器など)を介し得る。

【0038】

開示の薬学的組成物を、薬学分野の当業者に周知の標準的な技術にしたがって調製することができる。かかる組成物を、特定の患者の種族または種、年齢、性別、体重、および容態、ならびに投与経路などの要因を考慮して、医学分野の当業者に周知の投薬量および技術によって投与することができる。組成物を、単独で投与することができるか、他のCMVベクターまたは他の免疫学的組成物、抗原性組成物、ワクチン組成物、もしくは治療組成物を用いて同時または連続的に投与することができる。かかる他の組成物は、精製された未変性の抗原もしくはエピトープまたは組換えCMVもしくは他のベクター系による発現由来の抗原もしくはエピトープを含むことができ、この組成物を、前述の要因を考慮して投与する。

10

【0039】

本発明の組成物の例には、開口部(例えば、経口、鼻腔、肛門、生殖器(例えば、膣など))への投与のための液体調製物(懸濁液、シロップ、またはエリキシルなど)および非経口、皮下、皮内、筋肉内、または静脈内への投与(例えば、注射による投与)のための調製物(滅菌懸濁液または乳濁液など)が含まれる。かかる組成物では、組換え体は、適切なキャリア、希釈剤、または賦形剤(滅菌水、生理食塩水、またはグルコースなど)との混合物で存在し得る。

【0040】

抗原性組成物、免疫原性組成物、またはワクチン組成物は、典型的には、アジュバントおよび所望の応答が誘発される量のCMVベクターまたは発現産物を含むことができる。ヒトへの適用において、ミョウバン(リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム)は典型的なアジュバントである。研究および動物に適用するために使用されるサポニンおよびその精製成分であるQuil A、フロイント完全アジュバントおよび他のアジュバントは、ヒトワクチンでの使用可能性を制限する毒性を有する。ムラミルジペプチド、モノホスホリルリピドA、リン脂質抱合体などの化学的に定義された調製物(Goodman-Snitkoffら, J. Immunol. 147: 410-415 (1991)に記載のものなど)、Millerら, J. Exp. Med. 176: 1739-1744 (1992)に記載のプロテオリポソーム内へのタンパク質のカプセル化、およびNovasome脂質小胞などの脂質小胞中へのタンパク質のカプセル化(Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, N. H.)も使用することができる。

20

30

【0041】

組成物を、非経口(すなわち、筋肉内、皮内、または皮下)投与または開口部投与(例えば、舌下(例えば、経口)、胃内、粘膜(口腔内、肛門内、および膣内への投与などが含まれる)による免疫のための単回投薬形態にパッケージングすることができる。また、有効な投薬量および投与経路を、組成物の性質、発現産物の性質、組換えCMVを直接使用する場合の発現レベル、および公知の要因(宿主の種族または種、年齢、性別、体重、容態、および性質など)、ならびにLD₅₀および公知であり且つ過度の実験を必要としない他のスクリーニング手順によって決定する。発現産物の投薬量は、数μgから数百μgまでの範囲であり得る(例えば、5~500μg)。CMVベクターを、これらの投薬量レベルで発現させるのに適切な任意の量で投与することができる。制限されない例では、CMVベクターを少なくとも10² pfuの量で投与することができる、したがって、CMVベクターを少なくともこの量で投与することができるか、約10² pfu~約10⁷ pfuの範囲で投与することができる。他の適切なキャリアまたは希釈剤は、防腐剤と含むか含まない水または緩衝化生理食塩水であり得る。CMVベクターを投与時の再懸濁のために凍結乾燥させることができるか、溶液の形態であり得る。

40

【0042】

キャリアはまた、ポリマー遅延放出系であり得る。合成ポリマーは、制御放出する組成物の処方にて特に有用である。これの初期の例は、Kreuter, J., Microca

50

psules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology, M. Donbrow (Ed). CRC Press, p. 125-148で報告されたいわゆるナノ粒子を形成するための直径が1ミクロン未満の球体へのメチルメタクリラートの重合であった。

【0043】

マイクロカプセル化は、制御放出を得るためにマイクロカプセル化した医薬品の注射に適用されている。マイクロカプセル化のための特定のポリマーの選択に多数の要因が寄与する。ポリマー合成およびマイクロカプセル化過程の再現性、マイクロカプセル化の材料および過程の費用、毒性プロフィール、ポリマーの変動する放出動態および物理化学的適合性の要件、ならびに抗原は全て、考慮しなければならない要因である。有用なポリマーの例は、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリウレタン、ポリオルソエステル、およびポリアミド、特に生分解性のものである。

10

【0044】

医薬品、より最近では抗原のためのキャリアは、ポリ(d, l-ラクチド-コグリコリド) (PLGA) が頻繁に選択される。これは、浸食性縫合糸、骨板、および他の一過性プロテアーゼにおける医学的使用歴が長く、いかなる毒性も示していない生分解性ポリエステルである。広範な種々の医薬品（ペプチドおよび抗原が含まれる）が、PLGAマイクロカプセルに処方されている。抗原の制御放出のためのPLGAの適応に関して多数のデータが蓄積されており、例えば、Eldridge, J. H. ら, Current Topics in Microbiology and Immunology. 1989, 146: 59-66によって概説されている。直径1~10ミクロンのPLGAミクロスフィアへの抗原の捕捉は、経口投与した場合に顕著なアジュバント効果を有することが示されている。PLGAマイクロカプセル化過程は、油中水型乳濁液の相分離を使用する。目的の化合物を水溶液として調製し、PLGAを塩化メチレンおよび酢酸エチルなどの適切な有機溶媒に溶解する。これら2つの不混和性溶液を、高速攪拌によって同時乳化する。次いで、ポリマーのための非溶媒を添加し、それにより、水滴の周囲にポリマーが沈殿して初期のマイクロカプセルが形成される。マイクロカプセルを回収し、一連の薬剤（ポリビニルアルコール (PVA)、ゼラチン、アルギン酸塩、ポリビニルピロリドン (PVP)、メチルセルロース) のうちの1つを用いて安定化させ、真空乾燥または溶媒抽出のいずれかによって溶媒を除去する。

20

30

【0045】

HCMVプロモーターに関しては、米国特許第5, 168, 062号および同第5, 385, 839号を参照する。細胞からの発現のためのプラスミドDNAでの細胞のトランスフェクションに関しては、Felgnerら, (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561を参照する。さらに、種々の感染症に対する簡潔且つ有効なワクチン接種法としてのプラスミドDNAの直接注射に関しては、Science, 259: 1745-49, 1993を参照する。したがって、ベクターDNAの直接注射によってベクターを使用することができることは本発明の範囲内である。

【0046】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「アミノ酸配列」を、任意の長さのアミノ酸残基のポリマーをいうために本明細書中で互換的に使用する。ポリマーは、直鎖または分岐鎖であってよく、改変アミノ酸またはアミノ酸アナログを含むことができ、アミノ酸以外の化学的部分を挿入することができる。これらの用語はまた、天然または介入（例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは改変（標識成分または生体活性成分との抱合など）によって改変されたアミノ酸ポリマーを含む。

40

【0047】

本明細書中で使用する場合、用語「抗原」または「免疫原」を、被験体において免疫応答を誘導することができる物質、典型的にはタンパク質をいうために互換的に使用する。この用語はまた、一旦被験体に投与した場合に（直接かタンパク質をコードするヌクレオ

50

チド配列またはベクターを被験体に投与することによる) そのタンパク質に対して体液性および／または細胞性の免疫応答を惹起することができるという意味において免疫学的に活性なタンパク質をいう。

【0048】

タンパク質およびタンパク質をコードする核酸が本明細書中に例示および記載の正確な配列と異なり得ると理解すべきである。したがって、本発明は、配列が本発明の方法にしたがって機能する限り、示した配列の欠失、付加、短縮、および置換を含む。これに関して、置換は、一般に、事実上保存的であろう(すなわち、アミノ酸ファミリー内で起こる置換)。例えば、アミノ酸は、一般に、以下の4つのファミリーに分類される：(1) 酸性—アスパラギン酸およびグルタミン酸；(2) 塩基性—リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3) 非極性—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；および(4) 無電荷極性—グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、およびチロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時折、芳香族アミノ酸として分類される。ロイシンのイソロイシンまたはバリンとの単独置換、またはその逆；アスパラギン酸のグルタミン酸との単独置換またはその逆；トレオニンのセリンとの単独置換またはその逆；またはアミノ酸の構造的に関連するアミノ酸との類似の保存的置換は、生物学的活性に大きな影響を及ぼさないと合理的に予測可能である。したがって、例示および記載の配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するが、タンパク質の免疫原性に実質的に影響を及ぼさない小さなアミノ酸置換を保有するタンパク質は、本発明の範囲内である。

【0049】

本明細書中で使用する場合、用語「ヌクレオチド配列」および「核酸配列」は、デオキシリボ核酸(DNA)配列またはリボ核酸(RNA)配列(伝令RNA(mRNA)、DNA/RNAハイブリッド、または合成核酸が含まれるが、これらに限定されない)をいう。核酸は、一本鎖であり得るか、部分的または完全に二本鎖(二重鎖)であり得る。二重鎖核酸は、ホモ二重鎖またはヘテロ二重鎖であり得る。

【0050】

本明細書中で使用する場合、用語「導入遺伝子」を、本発明のタンパク質をコードする任意のヌクレオチド配列に由来し得る「組換え」ヌクレオチド配列をいうために使用することができる。用語「組換え」は、「人によって」操作されており、天然では生じないか、別のヌクレオチド配列に連結しているか、天然では異なる配置で認められるヌクレオチド配列を意味する。「人によって」操作されたとは、装置、コドン最適化、制限酵素の使用などが含まれるいくつかの人為的手段によって操作されたことを意味すると理解される。異種抗原をコードするCMVベクターは、定義によれば組換えCMVベクターである。

【0051】

ヌクレオチド配列をコドン最適化することができる、例えば、コドンを、ヒト細胞での使用のために最適化することができる。例えば、任意のウイルス配列または細菌配列をそのようにして変更することができる。多くのウイルス(HIVおよび他のレンチウイルスが含まれる)は多数の稀なコドンを使用し、Andreら, J. Virol. 72:1497-1503, 1998に記載のように、所望の被験体で一般的に使用されるコドンに対応するようにこれらのコドンを変更することにより、異種抗原の発現を増強することができる。

【0052】

CMVベクターおよびこのベクター中に含まれる糖タンパク質の機能的におよび／または抗原的に等価なバリエーションおよび誘導体をコードするヌクレオチド配列を意図する。これらの機能的に等価なバリエーション、誘導体、およびフラグメントは、抗原活性を保持する能力を示す。例えば、コードされたアミノ酸配列を変化させないDNA配列の変化、ならびにアミノ酸残基の保存的な置換、1つまたは少数のアミノ酸の欠失または付加、およびアミノ酸残基のアミノ酸アナログとの置換をもたらす変化は、コードされたポリペプチドの性質に有意に影響を及ぼさない変化である。保存的アミノ酸置換は、グリシン／アラニ

ン；バリン／イソロイシン／ロイシン；アスパラギン／グルタミン；アスパラギン酸／グルタミン酸；セリン／トレオニン／メチオニン；リジン／アルギニン；およびフェニルアラニン／チロシン／トリプトファンである。1つの実施形態では、バリエーションは、目的の抗原、エпитープ、免疫原、ペプチド、またはポリペプチドと少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%相同または同一である。

【0053】

10

配列の同一性または相同性を、配列ギャップを最小にしながら重複および同一性を最大にするように整列させた時に配列を比較することによって決定する。特に、配列同一性を、いくつかの数学アルゴリズムのうちのいずれかを使用して決定することができる。2配列の比較のために使用される数学アルゴリズムの非限定的な例は、Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 5873-5877で認められるように修正したKarlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2264-2268のアルゴリズムである。

【0054】

配列比較のために使用される数学アルゴリズムの別の例は、Myers & Miller, CABIOS 1988; 4: 11-17のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムを、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込む。アミノ酸配列比較用のALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み付け残基表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用することができる。局所配列同一性およびアラインメントの領域を同定するためのさらに別の有用なアルゴリズムは、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 2444-2448に記載のFASTAアルゴリズムである。

【0055】

WU-BLAST (Washington University BLAST) バージョン2.0ソフトウェアが本発明での使用に有利である。いくつかのUNIXプラットフォームのためのWU-BLASTバージョン2.0実行プログラムを、ftp://blast.wustl.edu/blast/executablesからダウンロードすることができる。このプログラムはWU-BLASTバージョン1.4に基づき、これはさらにパブリックドメインNCBI-BLASTバージョン1.4に基づく (Altschul & Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschulら, Journal of Molecular Biology 1990; 215: 403-410; Gish & States, 1993; Nature Genetics 3: 266-272; Karlin & Altschul, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877; その全てが本明細書中で参考として援用される)。

【0056】

種々の本発明の組換えヌクレオチド配列および抗体および／または抗原を、標準的な組換えDNAおよびクローニング技術を使用して作製する。かかる技術は当業者に周知である。例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, second edition (Sambrookら, 1989)を参照のこと。

【0057】

本発明のヌクレオチド配列を、「ベクター」に挿入することができる。用語「ベクター

50

」は、当業者によって広く使用され、理解されており、本明細書中で使用する場合、用語「ベクター」を、当業者が理解する意味と一致する意味で使用する。例えば、用語「ベクター」は、ある環境から別の環境への核酸分子の移行が可能であるか容易にするビヒクルまたは核酸分子の操作が可能であるか容易にするビヒクルをいうために当業者によって一般的に使用される。

【0058】

本発明のウイルスを発現させる任意のベクターを、本発明にしたがって使用することができる。一定の実施形態では、本発明のウイルスを、コードされたHIV-抗原および／または抗体を産生するために *in vitro*（無細胞発現系を使用するなど）でおよび／または *in vitro* で成長させた培養細胞中で使用することができる。次いで、タンパク様ワクチンの産生などの種々の適用のために使用することができる。かかる適用のために、*in vitro* および／または培養細胞中でウイルスを発現可能な任意のベクターを使用することができる。

10

【0059】

発現させるべき本発明の異種抗原のために、異種抗原のタンパク質コード配列を、タンパク質の転写および翻訳を指示する制御配列または核酸調節配列に「作動可能に連結」すべきである。本明細書中で使用する場合、コード配列および核酸調節配列またはプロモーターは、これらが核酸調節配列の影響下または調節下でコード配列を発現または転写および／または翻訳するような方法で共有結合的に連結する場合、「作動可能に連結された」という。「核酸調節配列」は、任意の核酸エレメント（プロモーター、エンハンサー、IRES、イントロン、および作動可能に連結された核酸配列またはコード配列の発現を指示する本明細書中に記載の他のエレメントなどであるが、これらに限定されない）であり得る。用語「プロモーター」を、本明細書中で、RNAポリメラーゼIIの開始部位周囲にクラスター化し、本発明のタンパク質コード配列に作動可能に連結された場合にコードされたタンパク質を発現させる転写調節モジュール群をいうために使用されるであろう。本発明の導入遺伝子の発現は、構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターの調節下にあってもよく、いくつかの特定の外部刺激（テトラサイクリンなどの抗生物質、エクジソンなどのホルモン、または重金属などであるが、これらに限定されない）に暴露された場合のみ転写を開始する。プロモーターはまた、特定の細胞型、組織、または器官に特異的であり得る。多数の適切なプロモーターおよびエンハンサーは当該分野で公知であり、任意のかかる適切なプロモーターまたはエンハンサーを、本発明の導入遺伝子の発現のために使用することができる。例えば、適切なプロモーターおよび／またはエンハンサーを、真核生物プロモーターデータベース（EPDB）から選択することができる。

20

30

【0060】

本発明は、外来エピトープを発現する組換えウイルスベクターに関する。有利には、エピトープはHIVエピトープである。有利な実施形態では、HIVエピトープは、本発明のタンパク質フラグメントであるが、本発明は、さらなるHIV抗原、エピトープ、または免疫原を含むことができる。有利には、HIVエピトープは、以下の米国特許のHIV抗原が含まれるが、これらに限定されないHIV抗原である：米国特許第7,341,731号；同第7,335,364号；同第7,329,807号；同第7,323,553号；同第7,320,859号；同第7,311,920号；同第7,306,798号；同第7,285,646号；同第7,285,289号；同第7,285,271号；同第7,282,364号；同第7,273,695号；同第7,270,997号；同第7,262,270号；同第7,244,819号；同第7,244,575号；同第7,232,567号；同第7,232,566号；同第7,223,844号；同第7,223,739号；同第7,223,534号；同第7,223,368号；同第7,220,554号；同第7,214,530号；同第7,211,659号；同第7,211,432号；同第7,205,159号；同第7,198,934号；同第7,195,768号；同第7,192,555号；同第7,189,826号；同第7,189,522号；同第7,186,507号；同第7,179,645号；同第7,175

40

50

, 843号;同第7, 172, 761号;同第7, 169, 550号;同第7, 157, 083号;同第7, 153, 509号;同第7, 147, 862号;同第7, 141, 550号;同第7, 129, 219号;同第7, 122, 188号;同第7, 118, 859号;同第7, 118, 855号;同第7, 118, 751号;同第7, 118, 742号;同第7, 105, 655号;同第7, 101, 552号;同第7, 097, 971号;同第7, 097, 842号;同第7, 094, 405号;同第7, 091, 049号;同第7, 090, 648号;同第7, 087, 377号;同第7, 083, 787号;同第7, 070, 787号;同第7, 070, 781号;同第7, 060, 273号;同第7, 056, 521号;同第7, 056, 519号;同第7, 049, 136号;同第7, 048, 929号;同第7, 033, 593号;同第7, 030, 094号;同第7, 022, 326号;同第7, 009, 037号;同第7, 008, 622号;同第7, 001, 759号;同第6, 997, 863号;同第6, 995, 008号;同第6, 979, 535号;同第6, 974, 574号;同第6, 972, 126号;同第6, 969, 609号;同第6, 964, 769号;同第6, 964, 762号;同第6, 958, 158号;同第6, 956, 059号;同第6, 953, 689号;同第6, 951, 648号;同第6, 946, 075号;同第6, 927, 031号;同第6, 919, 319号;同第6, 919, 318号;同第6, 919, 077号;同第6, 913, 752号;同第6, 911, 315号;同第6, 908, 617号;同第6, 908, 612号;同第6, 902, 743号;同第6, 900, 010号;同第6, 893, 869号;同第6, 884, 785号;同第6, 884, 435号;同第6, 875, 435号;同第6, 867, 005号;同第6, 861, 234号;同第6, 855, 539号;同第6, 841, 381号;同第6, 841, 345号;同第6, 838, 477号;同第6, 821, 955号;同第6, 818, 392号;同第6, 818, 222号;同第6, 815, 217号;同第6, 815, 201号;同第6, 812, 026号;同第6, 812, 025号;同第6, 812, 024号;同第6, 808, 923号;同第6, 806, 055号;同第6, 803, 231号;同第6, 800, 613号;同第6, 800, 288号;同第6, 797, 811号;同第6, 780, 967号;同第6, 780, 598号;同第6, 773, 920号;同第6, 764, 682号;同第6, 761, 893号;同第6, 753, 015号;同第6, 750, 005号;同第6, 737, 239号;同第6, 737, 067号;同第6, 730, 304号;同第6, 720, 310号;同第6, 716, 823号;同第6, 713, 301号;同第6, 713, 070号;同第6, 706, 859号;同第6, 699, 722号;同第6, 699, 656号;同第6, 696, 291号;同第6, 692, 745号;同第6, 670, 181号;同第6, 670, 115号;同第6, 664, 406号;同第6, 657, 055号;同第6, 657, 050号;同第6, 656, 471号;同第6, 653, 066号;同第6, 649, 409号;同第6, 649, 372号;同第6, 645, 732号;同第6, 641, 816号;同第6, 635, 469号;同第6, 613, 530号;同第6, 605, 427号;同第6, 602, 709号;同第6, 602, 705号;同第6, 600, 023号;同第6, 596, 477号;同第6, 596, 172号;同第6, 593, 103号;同第6, 593, 079号;同第6, 579, 673号;同第6, 576, 758号;同第6, 573, 245号;同第6, 573, 040号;同第6, 569, 418号;同第6, 569, 340号;同第6, 562, 800号;同第6, 558, 961号;同第6, 551, 828号;同第6, 551, 824号;同第6, 548, 275号;同第6, 544, 780号;同第6, 544, 752号;同第6, 544, 728号;同第6, 534, 482号;同第6, 534, 312号;同第6, 534, 064号;同第6, 531, 572号;同第6, 531, 313号;同第6, 525, 179号;同第6, 525, 028号;同第6, 524, 582号;同第6, 521, 449号;同第6, 518, 030号;同第6, 518, 015号;同第6, 514, 691号;同第6, 514, 503号;同第6, 511, 845号;同第6, 511, 812号;同第6, 511, 801号;同第6, 509, 313号;同第6, 506, 384号;同第6, 5

03, 882号;同第6, 495, 676号;同第6, 495, 526号;同第6, 495, 347号;同第6, 492, 123号;同第6, 489, 131号;同第6, 489, 129号;同第6, 482, 614号;同第6, 479, 286号;同第6, 479, 284号;同第6, 465, 634号;同第6, 461, 615号;同第6, 458, 560号;同第6, 458, 527号;同第6, 458, 370号;同第6, 451, 601号;同第6, 451, 592号;同第6, 451, 323号;同第6, 436, 407号;同第6, 432, 633号;同第6, 428, 970号;同第6, 428, 952号;同第6, 428, 790号;同第6, 420, 139号;同第6, 416, 997号;同第6, 410, 318号;同第6, 410, 028号;同第6, 410, 014号;同第6, 407, 221号;同第6, 406, 710号;同第6, 403, 092号;同第6, 399, 295号;同第6, 392, 013号;同第6, 391, 657号;同第6, 384, 198号;同第6, 380, 170号;同第6, 376, 170号;同第6, 372, 426号;同第6, 365, 187号;同第6, 358, 739号;同第6, 355, 248号;同第6, 355, 247号;同第6, 348, 450号;同第6, 342, 372号;同第6, 342, 228号;同第6, 338, 952号;同第6, 337, 179号;同第6, 335, 183号;同第6, 335, 017号;同第6, 331, 404号;同第6, 329, 202号;同第6, 329, 173号;同第6, 328, 976号;同第6, 322, 964号;同第6, 319, 666号;同第6, 319, 665号;同第6, 319, 500号;同第6, 319, 494号;同第6, 316, 205号;同第6, 316, 003号;同第6, 309, 633号;同第6, 306, 625号;同第6, 296, 807号;同第6, 294, 322号;同第6, 291, 239号;同第6, 291, 157号;同第6, 287, 568号;同第6, 284, 456号;同第6, 284, 194号;同第6, 274, 337号;同第6, 270, 956号;同第6, 270, 769号;同第6, 268, 484号;同第6, 265, 562号;同第6, 265, 149号;同第6, 262, 029号;同第6, 261, 762号;同第6, 261, 571号;同第6, 261, 569号;同第6, 258, 599号;同第6, 258, 358号;同第6, 248, 332号;同第6, 245, 331号;同第6, 242, 461号;同第6, 241, 986号;同第6, 235, 526号;同第6, 235, 466号;同第6, 232, 120号;同第6, 228, 361号;同第6, 221, 579号;同第6, 214, 862号;同第6, 214, 804号;同第6, 210, 963号;同第6, 210, 873号;同第6, 207, 185号;同第6, 203, 974号;同第6, 197, 755号;同第6, 197, 531号;同第6, 197, 496号;同第6, 194, 142号;同第6, 190, 871号;同第6, 190, 666号;同第6, 168, 923号;同第6, 156, 302号;同第6, 153, 408号;同第6, 153, 393号;同第6, 153, 392号;同第6, 153, 378号;同第6, 153, 377号;同第6, 146, 635号;同第6, 146, 614号;同第6, 143, 876号;同第6, 140, 059号;同第6, 140, 043号;同第6, 139, 746号;同第6, 132, 992号;同第6, 124, 306号;同第6, 124, 132号;同第6, 121, 006号;同第6, 120, 990号;同第6, 114, 507号;同第6, 114, 143号;同第6, 110, 466号;同第6, 107, 020号;同第6, 103, 521号;同第6, 100, 234号;同第6, 099, 848号;同第6, 099, 847号;同第6, 096, 291号;同第6, 093, 405号;同第6, 090, 392号;同第6, 087, 476号;同第6, 083, 903号;同第6, 080, 846号;同第6, 080, 725号;同第6, 074, 650号;同第6, 074, 646号;同第6, 070, 126号;同第6, 063, 905号;同第6, 063, 564号;同第6, 060, 256号;同第6, 060, 064号;同第6, 048, 530号;同第6, 045, 788号;同第6, 043, 347号;同第6, 043, 248号;同第6, 042, 831号;同第6, 037, 165号;同第6, 033, 672号;同第6, 030, 772号;同第6, 030, 770号;同第6, 030, 618号;同第6, 025, 141号;同第6, 025, 125号;同第6

, 020, 468号;同第6, 019, 979号;同第6, 017, 543号;同第6, 017, 537号;同第6, 015, 694号;同第6, 015, 661号;同第6, 013, 484号;同第6, 013, 432号;同第6, 007, 838号;同第6, 004, 811号;同第6, 004, 807号;同第6, 004, 763号;同第5, 998, 132号;同第5, 993, 819号;同第5, 989, 806号;同第5, 985, 926号;同第5, 985, 641号;同第5, 985, 545号;同第5, 981, 537号;同第5, 981, 505号;同第5, 981, 170号;同第5, 976, 551号;同第5, 972, 339号;同第5, 965, 371号;同第5, 962, 428号;同第5, 962, 318号;同第5, 961, 979号;同第5, 961, 970号;同第5, 958, 765号;同第5, 958, 422号;同第5, 955, 647号;同第5, 955, 342号;同第5, 951, 986号;同第5, 951, 975号;同第5, 942, 237号;同第5, 939, 277号;同第5, 939, 074号;同第5

, 935, 580号;同第5, 928, 930号;同第5, 928, 913号;同第5, 928, 644号;同第5, 928, 642号;同第5, 925, 513号;同第5, 922, 550号;同第5, 922, 325号;同第5, 919, 458号;同第5, 916, 806号;同第5, 916, 563号;同第5, 914, 395号;同第5, 914, 109号;同第5, 912, 338号;同第5, 912, 176号;同第5, 912, 170号;同第5, 906, 936号;同第5, 895, 650号;同第5, 891, 623号;同第5, 888, 726号;同第5, 885, 580号;同第5, 885, 578号;同第5, 879, 685号;同第5, 876, 731号;同第5, 876, 716号;同第5, 874, 226号;同第5, 872, 012号;同第5, 871, 747号;同第5, 869, 058号;同第5, 866, 694号;同第5, 866, 341号;同第5, 866, 320号;同第5, 866, 319号;同第5, 866, 137号;同第5, 861, 290号;同第5, 858, 740号;同第5, 858, 647号;同第5, 858, 646号;同第5, 858, 369号;同第5, 858, 368号;同第5, 858, 366号;同第5, 856, 185号;同第5, 854, 400号;同第5, 853, 736号;同第5, 853, 725号;同第5, 853, 724号;同第5, 852, 186号;同第5, 851, 829号;同第5, 851, 529号;同第5, 849, 475号;同第5, 849, 288号;同第5, 843, 728号;同第5, 843, 723号;同第5, 843, 640号;同第5, 843, 635号;同第5, 840, 480号;同第5, 837, 510号;同第5, 837, 250号;同第5, 837, 242号;同第5, 834, 599号;同第5, 834, 441号;同第5, 834, 429号;同第5, 834, 256号;同第5, 830, 876号;同第5, 830, 641号;同第5, 830, 475号;同第5, 830, 458号;同第5, 830, 457号;同第5, 827, 749号;同第5, 827, 723号;同第5, 824, 497号;同第5, 824, 304号;同第5, 821, 047号;同第5, 817, 767号;同第5, 817, 754号;同第5, 817, 637号;同第5, 817, 470号;同第5, 817, 318号;同第5, 814, 482号;同第5, 807, 707号;同第5, 804, 604号;同第5, 804, 371号;同第5, 800, 822号;同第5, 795, 955号;同第5, 795, 743号;同第5, 795, 572号;同第5, 789, 388号;同第5, 780, 279号;同第5, 780, 038号;同第5, 776, 703号;同第5, 773, 260号;同第5, 770, 572号;同第5, 766, 844号;同第5, 766, 842号;同第5, 766, 625号;同第5, 763, 574号;同第5, 763, 190号;同第5, 762, 965号;同第5, 759, 769号;同第5, 756, 666号;同第5, 753, 258号;同第5, 750, 373号;同第5, 747, 641号;同第5, 747, 526号;同第5, 747, 028号;同第5, 736, 320号;同第5, 736, 146号;同第5, 733, 760号;同第5, 731, 189号;同第5, 728, 385号;同第5, 721, 095号;同第5, 716, 826号;同第5, 716, 637号;同第5, 716, 613号;同

第5, 714, 374号;同第5, 709, 879号;同第5, 709, 860号;同第5, 709, 843号;同第5, 705, 331号;同第5, 703, 057号;同第5, 702, 707号;同第5, 698, 178号;同第5, 688, 914号;同第5, 686, 078号;同第5, 681, 831号;同第5, 679, 784号;同第5, 674, 984号;同第5, 672, 472号;同第5, 667, 964号;同第5, 667, 783号;同第5, 665, 536号;同第5, 665, 355号;同第5, 660, 990号;同第5, 658, 745号;同第5, 658, 569号;同第5, 643, 756号;同第5, 641, 624号;同第5, 639, 854号;同第5, 639, 598号;同第5, 637, 677号;同第5, 637, 455号;同第5, 633, 234号;同第5, 629, 153号;同第5, 627, 025号;同第5, 622, 705号;同第5, 614, 413号;同第5, 610, 035号;同第5, 607, 831号;同第5, 606, 026号;同第5, 601, 819号;同第5, 597, 688号;同第5, 593, 972号;同第5, 591, 829号;同第5, 591, 823号;同第5, 589, 466号;同第5, 587, 285号;同第5, 585, 254号;同第5, 585, 250号;同第5, 580, 773号;同第5, 580, 739号;同第5, 580, 563号;同第5, 573, 916号;同第5, 571, 667号;同第5, 569, 468号;同第5, 558, 865号;同第5, 556, 745号;同第5, 550, 052号;同第5, 543, 328号;同第5, 541, 100号;同第5, 541, 057号;同第5, 534, 406号;同第5, 529, 765号;同第5, 523, 232号;同第5, 516, 895号;同第5, 514, 541号;同第5, 510, 264号;同第5, 500, 161号;同第5, 480, 967号;同第5, 480, 966号;同第5, 470, 701号;同第5, 468, 606号;同第5, 462, 852号;同第5, 459, 127号;同第5, 449, 601号;同第5, 447, 838号;同第5, 447, 837号;同第5, 439, 809号;同第5, 439, 792号;同第5, 418, 136号;同第5, 399, 501号;同第5, 397, 695号;同第5, 391, 479号;同第5, 384, 240号;同第5, 374, 519号;同第5, 374, 518号;同第5, 374, 516号;同第5, 364, 933号;同第5, 359, 046号;同第5, 356, 772号;同第5, 354, 654号;同第5, 344, 755号;同第5, 335, 673号;同第5, 332, 567号;同第5, 320, 940号;同第5, 317, 009号;同第5, 312, 902号;同第5, 304, 466号;同第5, 296, 347号;同第5, 286, 852号;同第5, 268, 265号;同第5, 264, 356号;同第5, 264, 342号;同第5, 260, 308号;同第5, 256, 767号;同第5, 256, 561号;同第5, 252, 556号;同第5, 230, 998号;同第5, 230, 887号;同第5, 227, 159号;同第5, 225, 347号;同第5, 221, 610号;同第5, 217, 861号;同第5, 208, 321号;同第5, 206, 136号;同第5, 198, 346号;同第5, 185, 147号;同第5, 178, 865号;同第5, 173, 400号;同第5, 173, 399号;同第5, 166, 050号;同第5, 156, 951号;同第5, 135, 864号;同第5, 122, 446号;同第5, 120, 662号;同第5, 103, 836号;同第5, 100, 777号;同第5, 100, 662号;同第5, 093, 230号;同第5, 077, 284号;同第5, 070, 010号;同第5, 068, 174号;同第5, 066, 782号;同第5, 055, 391号;同第5, 043, 262号;同第5, 039, 604号;同第5, 039, 522号;同第5, 030, 718号;同第5, 030, 555号;同第5, 030, 449号;同第5, 019, 387号;同第5, 013, 556号;同第5, 008, 183号;同第5, 004, 697号;同第4, 997, 772号;同第4, 983, 529号;同第4, 983, 387号;同第4, 965, 069号;同第4, 945, 082号;同第4, 921, 787号;同第4, 918, 166号;同第4, 900, 548号;同第4, 888, 290号;同第4, 886, 742号;同第4, 885, 235号;同第4, 870, 003号;同第4, 869, 903号;同第4, 861, 707号;同第4, 853, 326号

；同第4，839，288号；同第4，833，072号；および同第4，795，739号。

【0061】

別の実施形態では、HIVまたはその免疫原性フラグメントを、HIVエピトープとして利用することができる。例えば、米国特許第7，393，949号、同第7，374，877号、同第7，306，901号、同第7，303，754号、同第7，173，014号、同第7，122，180号、同第7，078，516号、同第7，022，814号、同第6，974，866号、同第6，958，211号、同第6，949，337号、同第6，946，254号、同第6，896，900号、同第6，887，977号、同第6，870，045号、同第6，803，187号、同第6，794，129号、同第6，773，915号、同第6，768，004号、同第6，706，268号、同第6，696，291号、同第6，692，955号、同第6，656，706号、同第6，649，409号、同第6，627，442号、同第6，610，476号、同第6，602，705号、同第6，582，920号、同第6，557，296号、同第6，531，587号、同第6，531，137号、同第6，500，623号、同第6，448，078号、同第6，429，306号、同第6，420，545号、同第6，410，013号、同第6，407，077号、同第6，395，891号、同第6，355，789号、同第6，335，158号、同第6，323，185号、同第6，316，183号、同第6，303，293号、同第6，300，056号、同第6，277，561号、同第6，270，975号、同第6，261，564号、同第6，225，045号、同第6，222，024号、同第6，194，391号、同第6，194，142号、同第6，162，631号、同第6，114，167号、同第6，114，109号、同第6，090，392号、同第6，060，587号、同第6，057，102号、同第6，054，565号、同第6，043，081号、同第6，037，165号、同第6，034，233号、同第6，033，902号、同第6，030，769号、同第6，020，123号、同第6，015，661号、同第6，010，895号、同第6，001，555号、同第5，985，661号、同第5，980，900号、同第5，972，596号、同第5，939，538号、同第5，912，338号、同第5，869，339号、同第5，866，701号、同第5，866，694号、同第5，866，320号、同第5，866，137号、同第5，864，027号、同第5，861，242号、同第5，858，785号、同第5，858，651号、同第5，849，475号、同第5，843，638号、同第5，840，480号、同第5，821，046号、同第5，801，056号、同第5，786，177号、同第5，786，145号、同第5，773，247号、同第5，770，703号、同第5，756，674号、同第5，741，706号、同第5，705，612号、同第5，693，752号、同第5，688，637号、同第5，688，511号、同第5，684，147号、同第5，665，577号、同第5，585，263号、同第5，578，715号、同第5，571，712号、同第5，567，603号、同第5，554，528号、同第5，545，726号、同第5，527，895号、同第5，527，894号、同第5，223，423号、同第5，204，259号、同第5，144，019号、同第5，051，496号、および同第4，942，122号のHIVヌクレオチドは、本発明に有用である。

【0062】

HIV抗体によって認識される任意のエピトープを、本発明で利用することができる。例えば、米国特許第6，949，337号、同第6，900，010号、同第6，821，744号、同第6，768，004号、同第6，613，743号、同第6，534，312号、同第6，511，830号、同第6，489，131号、同第6，242，197号、同第6，114，143号、同第6，074，646号、同第6，063，564号、同第6，060，254号、同第5，919，457号、同第5，916，806号、同第5，871，732号、同第5，824，304号、同第5，773，247号

、同第5, 736, 320号、同第5, 637, 455号、同第5, 587, 285号、
同第5, 514, 541号、同第5, 317, 009号、同第4, 983, 529号、同
第4, 886, 742号、同第4, 870, 003号、および同第4, 795, 739号
の抗HIV抗体は、本発明に有用である。さらに、米国特許第7, 074, 556号、同
第7, 074, 554号、同第7, 070, 787号、同第7, 060, 273号、同第
7, 045, 130号、同第7, 033, 593号、再発行特許第39, 057号、同第
7, 008, 622号、同第6, 984, 721号、同第6, 972, 126号、同第6
, 949, 337号、同第6, 946, 465号、同第6, 919, 077号、同第6,
916, 475号、同第6, 911, 315号、同第6, 905, 680号、同第6, 9
00, 010号、同第6, 825, 217号、同第6, 824, 975号、同第6, 81 10
8, 392号、同第6, 815, 201号、同第6, 812, 026号、同第6, 812
, 024号、同第6, 797, 811号、同第6, 768, 004号、同第6, 703,
019号、同第6, 689, 118号、同第6, 657, 050号、同第6, 608, 1
79号、同第6, 600, 023号、同第6, 596, 497号、同第6, 589, 74
8号、同第6, 569, 143号、同第6, 548, 275号、同第6, 525, 179
号、同第6, 524, 582号、同第6, 506, 384号、同第6, 498, 006号
、同第6, 489, 131号、同第6, 465, 173号、同第6, 461, 612号、
同第6, 458, 933号、同第6, 432, 633号、同第6, 410, 318号、同
第6, 406, 701号、同第6, 395, 275号、同第6, 391, 657号、同第
6, 391, 635号、同第6, 384, 198号、同第6, 376, 170号、同第6 20
, 372, 217号、同第6, 344, 545号、同第6, 337, 181号、同第6,
329, 202号、同第6, 319, 665号、同第6, 319, 500号、同第6, 3
16, 003号、同第6, 312, 931号、同第6, 309, 880号、同第6, 29
6, 807号、同第6, 291, 239号、同第6, 261, 558号、同第6, 248
, 514号、同第6, 245, 331号、同第6, 242, 197号、同第6, 241,
986号、同第6, 228, 361号、同第6, 221, 580号、同第6, 190, 8
71号、同第6, 177, 253号、同第6, 146, 635号、同第6, 146, 62
7号、同第6, 146, 614号、同第6, 143, 876号、同第6, 132, 992
号、同第6, 124, 132号、再発行特許第36, 866号、同第6, 114, 143
号、同第6, 103, 238号、同第6, 060, 254号、同第6, 039, 684号 30
、同第6, 030, 772号、同第6, 020, 468号、同第6, 013, 484号、
同第6, 008, 044号、同第5, 998, 132号、同第5, 994, 515号、同
第5, 993, 812号、同第5, 985, 545号、同第5, 981, 278号、同第
5, 958, 765号、同第5, 939, 277号、同第5, 928, 930号、同第5
, 922, 325号、同第5, 919, 457号、同第5, 916, 806号、同第5,
914, 109号、同第5, 911, 989号、同第5, 906, 936号、同第5, 8
89, 158号、同第5, 876, 716号、同第5, 874, 226号、同第5, 87
2, 012号、同第5, 871, 732号、同第5, 866, 694号、同第5, 854
, 400号、同第5, 849, 583号、同第5, 849, 288号、同第5, 840,
480号、同第5, 840, 305号、同第5, 834, 599号、同第5, 831, 0 40
34号、同第5, 827, 723号、同第5, 821, 047号、同第5, 817, 76
7号、同第5, 817, 458号、同第5, 804, 440号、同第5, 795, 572
号、同第5, 783, 670号、同第5, 776, 703号、同第5, 773, 225号
、同第5, 766, 944号、同第5, 753, 503号、同第5, 750, 373号、
同第5, 747, 641号、同第5, 736, 341号、同第5, 731, 189号、同
第5, 707, 814号、同第5, 702, 707号、同第5, 698, 178号、同第
5, 695, 927号、同第5, 665, 536号、同第5, 658, 745号、同第5
, 652, 138号、同第5, 645, 836号、同第5, 635, 345号、同第5,
618, 922号、同第5, 610, 035号、同第5, 607, 847号、同第5, 6
04, 092号、同第5, 601, 819号、同第5, 597, 896号、同第5, 59 50

7, 688号、同第5, 591, 829号、同第5, 558, 865号、同第5, 514, 541号、同第5, 510, 264号、同第5, 478, 753号、同第5, 374, 518号、同第5, 374, 516号、同第5, 344, 755号、同第5, 332, 567号、同第5, 300, 433号、同第5, 296, 347号、同第5, 286, 852号、同第5, 264, 221号、同第5, 260, 308号、同第5, 256, 561号、同第5, 254, 457号、同第5, 230, 998号、同第5, 227, 159号、同第5, 223, 408号、同第5, 217, 895号、同第5, 180, 660号、同第5, 173, 399号、同第5, 169, 752号、同第5, 166, 050号、同第5, 156, 951号、同第5, 140, 105号、同第5, 135, 864号、同第5, 120, 640号、同第5, 108, 904号、同第5, 104, 790号、同第5, 049, 389号、同第5, 030, 718号、同第5, 030, 555号、同第5, 004, 697号、同第4, 983, 529号、同第4, 888, 290号、同第4, 886, 742号、および同第4, 853, 326号のモノクローナル抗HIV抗体も本発明に有用である。

【0063】

1つの例では、エピトープはSIVエピトープである。当業者は、本明細書中でHIVに関するものはいずれもSIVに適用されると理解する。有利な実施形態では、SIVエピトープは、本発明のタンパク質フラグメントであるが、本発明は、さらなるSIV抗原、エピトープ、または免疫原を含むことができる。有利には、SIVエピトープは、以下のSIV抗原が含まれるが、これらに限定されないSIV抗原である：米国特許第7, 892, 729号；同第7, 886, 962号；同第7, 879, 914号；同第7, 829, 287号；同第7, 794, 998号；同第7, 767, 455号；同第7, 759, 477号；同第7, 758, 869号；同第7, 754, 420号；同第7, 749, 973号；同第7, 748, 618号；同第7, 732, 124号；同第7, 709, 606号；同第7, 700, 342号；同第7, 700, 273号；同第7, 625, 917号；同第7, 622, 124号；同第7, 611, 721号；同第7, 608, 422号；同第7, 601, 518号；同第7, 585, 675号；同第7, 534, 603号；同第7, 511, 117号；同第7, 508, 781号；同第7, 507, 417号；同第7, 479, 497号；同第7, 464, 352号；同第7, 457, 973号；同第7, 442, 551号；同第7, 439, 052号；同第7, 419, 829号；同第7, 407, 663号；同第7, 378, 515号；同第7, 364, 760号；同第7, 312, 065号；同第7, 261, 876号；同第7, 220, 554号；同第7, 211, 240号；同第7, 198, 935号；同第7, 169, 394号；同第7, 098, 201号；同第7, 078, 516号；同第7, 070, 993号；同第7, 048, 929号；同第7, 034, 010号；再発行特許第39, 057号；同第7, 022, 814号；同第7, 018, 638号；同第6, 955, 919号；同第6, 933, 377号；同第6, 908, 617号；同第6, 902, 929号；同第6, 846, 477号；同第6, 818, 442号；同第6, 803, 231号；同第6, 800, 281号；同第6, 797, 811号；同第6, 790, 657号；同第6, 712, 612号；同第6, 706, 729号；同第6, 703, 394号；同第6, 682, 907号；同第6, 656, 706号；同第6, 645, 956号；同第6, 635, 472号；同第6, 596, 539号；同第6, 589, 763号；同第6, 562, 571号；同第6, 555, 523号；同第6, 555, 342号；同第6, 541, 009号；同第6, 531, 574号；同第6, 531, 123号；同第6, 503, 713号；同第6, 479, 281号；同第6, 475, 718号；同第6, 469, 083号；同第6, 468, 539号；同第6, 455, 265号；同第6, 448, 390号；同第6, 440, 730号；同第6, 423, 544号；同第6, 365, 150号；同第6, 362, 000号；同第6, 326, 007号；同第6, 322, 969号；同第6, 291, 664号；同第6, 277, 601号；同第6, 261, 571号；同第6, 255, 312号；同第6, 207, 455号；同第6, 194, 142号；同第6, 117,

10

20

30

40

50

656号；同第6，111，087号；同第6，107，020号；同第6，080，846号；同第6，060，064号；同第6，046，228号；同第6，043，081号；同第6，027，731号；同第6，020，123号；同第6，017，536号；同第6，004，781号；同第5，994，515号；同第5，981，259号；同第5，961，976号；同第5，950，176号；同第5，929，222号；同第5，928，913号；同第5，912，176号；同第5，888，726号；同第5，861，243号；同第5，861，161号；同第5，858，366号；同第5，830，475号；同第5，817，316号；同第5，804，196号；同第5，786，177号；同第5，759，768号；同第5，747，324号；同第5，705，522号；同第5，705，331号；同第5，698，446号；同第5，688，914号；同第5，688，637号；同第5，654，195号；同第5，650，269号；同第5，631，154号；同第5，582，967号；同第5，552，269号；同第5，512，281号；同第5，508，166号；同第5，470，572号；同第5，312，902号；同第5，310，651号；同第5，268，265号；同第5，254，457号；同第5，212，084号；同第5，087，631号；および同第4，978，687号。

【0064】

本発明で使用するベクターを、典型的には、適切な遺伝子調節領域（プロモーターまたはエンハンサーなど）を含み、且つ本発明の抗原を発現することができるように選択すべきである。

【0065】

例えば、HIV-1抗原に対する免疫応答および／またはHIV-1に対する防御免疫を得るために本発明の抗原を被験体中にて *in vivo* で発現させることを目的とする場合、被験体での発現に適切であり、且つ *in vivo* での使用が安全な発現ベクターを選択すべきである。例えば、幾つかの実施形態では、本発明のHIV-1免疫原性組成物およびワクチンの前臨床試験などのために実験動物において本発明の抗体および／または抗原を発現させることが望ましいかもしれない。他の実施形態では、本発明の免疫原性組成物およびワクチンの臨床試験および実際の臨床などでの使用のためにヒト被験体中で本発明の抗原を発現させることが望ましいであろう。かかる使用に適切な任意のベクターを使用することができ、適切なベクターを選択することは十分に当業者の能力の範囲内である。いくつかの実施形態では、これらの *in vivo* 適用のために使用されるベクターを、ベクターが被験体中で増幅するのを防止するために弱毒化することが好ましいかもしれない。例えば、プラスミドベクターを使用する場合、好ましくは、プラスミドベクターは、被験体中での *in vivo* 使用の安全性を向上させるために被験体中で機能する複製起点を欠くであろう。ウイルスベクターを使用する場合、好ましくは、ウイルスベクターは、この場合もまた、被験体中での *in vivo* 使用の安全性を向上させるために被験体中で弱毒化されるか、複製が欠損されている。

【0066】

本発明の好ましい実施形態では、ウイルスベクターを使用する。有利には、ベクターは、少なくとも糖タンパク質UL128を欠くCMVベクターまたは少なくとも糖タンパク質UL130を欠くCMVベクターである。各CMVベクターはまた、糖タンパク質UL131を発現する。

【0067】

例えば、CD8+免疫応答（被験体中でMHCクラスIIによって提示されるエピトープに指向する異種抗原に対する高比率のCD8+T細胞応答によって特徴づけられる免疫応答が含まれる）が含まれる免疫原性応答を生じさせることを目的とする場合、開示のCMVベクターを *in vivo* で投与することができる。例えば、いくつかの実施形態では、RhCMVを使用した免疫原性組成物およびワクチンの前臨床試験のためにアカゲザルなどの実験動物において開示のCMVベクターを使用することが望ましいかもしれない。他の実施形態では、HCMVを使用した免疫原性組成物の臨床試験および実際の臨床で

の使用などのためにヒト被験体中で開示のCMVベクターを使用することが望ましいであろう。

【0068】

かかる *in vivo* 適用のために、開示のCMVベクターを、薬学的に許容され得るキャリアをさらに含む免疫原性組成物の成分として投与する。本発明の免疫原性組成物は、異種抗原（病原体特異的抗原が含まれる）に対する免疫応答を刺激するのに有用であり、AIDSの防止、改善、または処置のためのHIV-1に対する防止用または治療用のワクチンの1つ以上の成分として使用することができる。本発明の核酸およびベクターは、遺伝子ワクチン（すなわち、本発明の抗原をコードする核酸をヒトなどの被験体に送達し、その後に免疫応答を誘発するために前記抗原が被験体中で発現されるようにするためのワクチン）を提供するのに特に有用である。

10

【0069】

本発明の組成物は、注射用の懸濁液、溶液、噴霧、凍結乾燥粉末、シロップ、およびエリキシルなどであり得る。任意の適切な形態の組成物を使用することができる。かかる組成物を調製するために、所望の純度の本発明の核酸またはベクターを、1つ以上の薬学的に許容され得るキャリアおよび／または賦形剤と混合する。キャリアおよび賦形剤は、組成物の他の成分と適合するという意味で「許容可能」でなければならない。許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度でレシipientに無毒であり、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、またはその組み合わせ、緩衝液（リン酸、クエン酸、および他の有機酸の緩衝液など）；抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニンが含まれる）；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン（メチルパラベンまたはプロピルパラベンなど）；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど）；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなど）；モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンが含まれる）；キレート剤（EDTAなど）；糖（スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなど）；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および／または非イオン性界面活性剤（TWEEN（登録商標）プルロニックス（登録商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）など）が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0070】

免疫原性組成物または免疫学的組成物を、水中油滴型エマルションの形態で処方することもできる。水中油滴型エマルションは、例えば、軽流動パラフィンオイル（欧州薬局方（European Pharmacopeia）型）；イソプレノイドオイル（スクアラン、スクアレノ、エイコサン（商標）、またはテトラテトラコンタンなど）；アルケン（例えば、イソブテンまたはデセン）のオリゴマー化に起因するオイル；直鎖アルキル基（植物油、オレイン酸エチル、プロピレングリコールジ（カプリラート／カプラート）、グリセリトリ（カプリラート／カプラート）、またはプロピレングリコールジオレアートなど）を含む酸またはアルコールのエステル；分岐脂肪酸またはアルコールのエステル（例えば、イソステアリン酸エステル）に基づき得る。オイルを乳化剤と組み合わせて使用してエマルションを形成することが有利である。乳化剤は、非イオン性界面活性剤（ソルビタン、マンニド（例えば、無水マンニトールオレアート）、グリセロール、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびオレイン酸、イソステアリン酸、リシノール酸、またはヒドロキシステアリン酸（任意選択的にエトキシル化されている）のエステル、およびポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンコポリマーブロック（プルロニック（登録商標）生成物（例えば、L121）など）など）であり得る。アジュバントは、乳化剤、ミ

40

50

セル形成剤、およびオイルの混合物であってよく、商標名プロバックス（登録商標）（I D E C P h a r m a c e u t i c a l s , S a n D i e g o , C A）で市販されている。

【0071】

本発明の免疫原性組成物は、ワクチンの有効性を増大させるためのさらなる物質（湿潤剤または乳化剤、緩衝剤、またはアジュバントなど）を含むことができる（R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 1 8 t h e d i t i o n , M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , (e d .) 1 9 8 0）。

【0072】

アジュバントを含むこともできる。アジュバントには、無機酸の塩（例えば、A l K (S O ₄) ₂、A l N a (S O ₄) ₂、A l N H (S O ₄) ₂、シリカ、ミョウバン、A l (O H) ₃、C a ₃ (P O ₄) ₂、カオリン、またはカーボン）、免疫刺激複合体（I S C O M）を含むか含まないポリヌクレオチド（例えば、C p Gオリゴヌクレオチド（C h u a n g , T . H . ら , (2 0 0 2) J . L e u k . B i o l . 7 1 (3) : 5 3 8 - 4 4 ; A h m a d - N e j a d , P . ら (2 0 0 2) E u r . J . I m m u n o l . 3 2 (7) : 1 9 5 8 - 6 8 に記載のものなど）；ポリIC酸またはポリAU酸、C p Gを含むか含まないポリアルギニン（当該分野でI C 3 1としても公知；S c h e l l a c k , C . ら (2 0 0 3) P r o c e e d i n g s o f t h e 3 4 t h A n n u a l M e e t i n g o f t h e G e r m a n S o c i e t y o f I m m u n o l o g y ; L i n g n a u , K . ら (2 0 0 2) V a c c i n e 2 0 (2 9 - 3 0) : 3 4 9 8 - 5 0 8 を参照のこと）、ジュバックス（登録商標）（米国特許第6, 6 9 3, 0 8 6号）、一定の天然物質（例えば、M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s由来のワックスD、C o r n y e b a c t e r i u m p a r v u m、B o r d e t e l l a p e r t u s s i s、またはB r u c e l l a属のメンバーで見出される物質）、フラジェリン（T o l l様受容体5リガンド；M c S o r l e y , S . J . ら (2 0 0 2) J . I m m u n o l . 1 6 9 (7) : 3 9 1 4 - 9 を参照のこと）、サポニン（Q S 2 1、Q S 1 7、およびQ S 7など）（米国特許第5, 0 5 7, 5 4 0号；同第5, 6 5 0, 3 9 8号；同第6, 5 2 4, 5 8 4号；同第6, 6 4 5, 4 9 5号）、モノホスホリルリピドA、特に、3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA（3 D - M P L）、イミキモド（当該分野でI Q Mとしても公知であり、アルダラ（登録商標）として市販されている；米国特許第4, 6 8 9, 3 3 8号；同第5, 2 3 8, 9 4 4号；Z u b e r , A . K . ら (2 0 0 4) 2 2 (1 3 - 1 4) : 1 7 9 1 - 8）、およびC C R 5インヒビターC M P D 1 6 7（V e a z e y , R . S . ら (2 0 0 3) J . E x p . M e d . 1 9 8 : 1 5 5 1 - 1 5 6 2 を参照のこと）が含まれるが、これらに限定されない。水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム（ミョウバン）は、一般に、0. 0 5 ~ 0. 1 %リン酸緩衝生理食塩水溶液として使用されている。特にDNAワクチンと共に使用することができる他のアジュバントは、コレラ毒素、特にC T A 1 - D D / I S C O M（M o w a t , A . M . ら (2 0 0 1) J . I m m u n o l . 1 6 7 (6) : 3 3 9 8 - 4 0 5 を参照のこと）、ポリホスファゼン（A l l c o c k , H . R . (1 9 9 8) A p p . O r g a n o m e t a l l i c C h e m . 1 2 (1 0 - 1 1) : 6 5 9 - 6 6 6 ; P a y n e , L . G . ら (1 9 9 5) P h a r m . B i o t e c h n o l . 6 : 4 7 3 - 9 3）、サイトカイン（I L - 2、I L - 4、G M - C S F、I L - 1 2、I L - 1 5、I G F - 1、I F N - α、I F N - β、およびI F N - γなどであるが、これらに限定されない）（B o y e r ら , (2 0 0 2) J . L i p o s o m e R e s . 1 2 1 : 1 3 7 - 1 4 2 ; W O 0 1 / 0 9 5 9 1 9）、免疫調節タンパク質（C D 4 0 L（A D X 4 0；例えば、W O 0 3 / 0 6 3 8 9 9号を参照のこと）、およびナチュラルキラー細胞のC D 1 aリガンド（C R O N Yまたはα-ガラクトシルセラミドとしても公知；G r e e n , T . D . ら , (2 0 0 3) J . V i r o l . 7 7 (3) : 2 0 4 6 - 2 0 5 5 を参照のこと）など）、免疫賦活性融合タンパク質（免疫グロブリンのF cフラグメントに融合したI L - 2（B a r o u c h ら , S c i e n c e 2 9 0 : 4 8 6 - 4 9 2 , 2 0 0 0）など）および

10

20

30

40

50

共刺激分子 B7. 1 および B7. 2 (Boyer) であり、これら全てをタンパク質として、DNA の形態で、本発明の抗原をコードするウイルスベクターと同一のウイルスベクター中、または個別の発現ベクターに投与することができる。あるいは、本発明のワクチンを準備し、いかなるアジュバントも用いずに投与することができる。

【0073】

免疫原性組成物を、適切且つ制御された速度で所望の作用部位および放出部位に CMV ベクターが導入されるようにデザインすることができる。制御放出処方物の調製方法は、当該分野で公知である。例えば、制御放出調製物を、免疫原および／または免疫原性組成物を複合体化するか吸収するためにポリマーを使用することによって產生することができる。制御放出処方物を、所望の制御放出特性または放出プロファイルが得られることが公知の適切な高分子（例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレンビニルアセタート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、または硫酸プロタミン）を使用して調製することができる。制御放出調製物による作用持続時間を調節するための別の可能な方法は、有効成分をポリマー材料（例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、これらの酸のコポリマー、またはエチレンビニルアセタートコポリマーなど）の粒子中に組み込むことである。あるいは、これらの有効成分をポリマー粒子中に組み込む代わりに、これらの材料を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製したマイクロカプセル内（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）、コロイド薬物送達系中（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）、またはマクロエマルジョン中に補足することが可能である。かかる技術は、New Trends and Developments in Vaccines, Volle

10

20

【0074】

免疫原性組成物中の CMV ベクターの適切な投薬量を、当業者は容易に決定することができる。例えば、CMV ベクターの投薬量は、投与経路および被験体のサイズに応じて変化し得る。適切な用量を、当業者は、例えば、従来の免疫学的技術を使用して被験体（実験動物など）の免疫応答を測定し、必要に応じて投薬量を調整することによって決定することができる。かかる被験体の免疫応答の測定技術には、クロム放出アッセイ、四量体結合アッセイ、IFN- γ ELISPOT アッセイ、IL-2 ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカインアッセイ、および他の免疫学的検出アッセイ（例えば、テキスト「Antibodies: A Laboratory Manual」by Ed Harlow and David Lane に詳述）が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0075】

免疫原性組成物を、任意の適切な送達方法（筋肉内、静脈内、皮内、粘膜、および局所への送達が含まれるが、これらに限定されない）を使用して投与することができる。かかる技術は当業者に周知である。送達方法のさらなる具体例は、筋肉内注射、皮内注射、および皮下注射である。しかし、送達は、注射方法に制限される必要はない。

40

【0076】

動物（ヒトが含まれる）のための免疫スケジュール（またはレジメン）は周知であり、特定の被験体および免疫原性組成物について容易に決定することができる。それ故、免疫原を、1 回以上被験体に投与することができる。好ましくは、免疫原性組成物の個別の投与の時間間隔を設定する。この間隔は被験体毎に変化するが、典型的には、10 日間～数週間の範囲であり、しばしば、2、4、6、または 8 週間である。ヒトについて、間隔は、典型的には、2～6 週間である。本発明の特定の有利な実施形態では、間隔はより長く、有利には、約 10 週間、12 週間、14 週間、16 週間、18 週間、20 週間、22 週間、24 週間、26 週間、28 週間、30 週間、32 週間、34 週間、36 週間、38 週

50

間、40週間、42週間、44週間、46週間、48週間、50週間、52週間、54週間、56週間、58週間、60週間、62週間、64週間、66週間、68週間、または70週間である。

【0077】

免疫レジメンは、典型的には、免疫原性組成物を1～6回投与するが、1回または2回または4回ほどの低頻度であり得る。免疫応答の誘導方法はまた、免疫原とのアジュバントの投与を含むことができる。いくつかの例では、年1回、年2回、または他の長期の間隔（5～10年）の追加免疫で最初の免疫プロトコルを補足することができる。

【0078】

本発明の方法はまた、種々のプライムブーストレジメン、例えば、DNAプライム-アデノウイルスブーストレジメンを含む。これらの方法では、1回以上のプライミング免疫後に、1回以上の追加免疫を行う。実際の免疫原性組成物は、各免疫および免疫原性組成物のタイプ（例えば、タンパク質または発現ベクターを含む）、経路について同一でも異なっているように、免疫原の処方も異なり得る。例えば、発現ベクターをプライミングおよび追加免疫工程のために使用する場合、発現ベクターは同一または異なるタイプ（例えば、DNAまたは細菌またはウイルスの発現ベクター）のいずれかであり得る。1つの有用なプライム-追加免疫レジメンは、4週間間隔で2回のプライミング免疫を行い、その後最後のプライミング免疫から4週間後および8週間後に2回の追加免疫を行う。プライミングおよび追加免疫レジメンを得るために本発明のDNA、細菌およびウイルスの発現ベクターを使用した並べ替えおよび組み合わせがいくつか存在することも当業者に容易に明らかなはずである。ウイルスベクターがUS2-11またはUS2-11領域中にコードされたいくつかの遺伝子を発現する事象では、ウイルスベクターを繰り返し使用することができる一方で、異なる病原体由来の異なる抗原を発現することができる。

【0079】

特定の実施形態は、被験体に免疫原性組成物を1回以上投与することによる被験体における病原体に対する免疫応答の誘導方法であって、ここで、エピトープが被験体における特異的免疫応答を誘導するのに十分なレベルで発現する、方法を提供する。かかる免疫を、所望の免疫レジメンにしたがって、少なくとも2、4、または6週間（またはそれを超える）間隔で複数回繰り返すことができる。

【0080】

本発明の免疫原性組成物を、単独で投与することができるか、他の抗原（例えば、「他の」免疫学的組成物、抗原性組成物、ワクチン組成物、または治療組成物）と共に同時投与するか連続的に投与することができるか、それにより、本発明の多価組成物または「カクテル」組成物または組み合わせ組成物およびこれらの組成物の使用方法を得ることができる。また、成分および投与様式（連続投与または同時投与）、ならびに投薬量を、特定の被験体の年齢、性別、体重、種、および容態、ならびに投与経路などの要因を考慮して決定することができる。

【0081】

組み合わせで使用する場合、他の抗原を、全免疫レジメンの一部として（例えば、プライムブーストレジメンまたは他の免疫プロトコルの一部として）同時または異なる時間に投与することができる。

【0082】

本発明およびその利点を詳述してきたが、添付の特許請求の範囲で定義の本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書中で種々の変更、代替、および変化を行うことができることと理解すべきである。

【実施例】

【0083】

以下の実施例は、開示の方法を例示する。本開示を考慮して、当業者は、過度の実験を行うことなくこれらの実施例の変形および開示の方法の他の例が可能であることを認識するであろう。

【0084】

実施例1-UL128およびUL130が欠失したRhCMVベクターでの免疫により、SIV抗原に対する広範な種々のCD8⁺T細胞エピトープによって特徴づけられる免疫応答が得られる

活性なUL128およびUL130を欠くが(ΔUL128-130)、活性なUL131を含むRhCMV68-1株(Hansen, SGら, J Virol 77, 6620 (2003); 本明細書中で参考として援用される)由来のRhCMV/gagベクターによって誘発されたSIVgag特異的CD8⁺T細胞応答のエピトープターゲットティングプロフィールを、より一般的なベクターおよびSIV自体によって誘発されるプロフィールと比較した。フローサイトメトリー細胞内サイトカイン染色を使用して、全SIVgagタンパク質を対象とする125の連続する15merペプチド(11アミノ酸の重複)の各々に対するCD8⁺T細胞応答を個別に定量した。全部で29頭のアカゲザル(RM)を使用した: 14頭にΔUL128-130RhCMV/gagベクターでワクチン接種した。4頭にエレクトロポレーションを行ったDNA/gag+インターロイキン(IL)-12をワクチン接種した。3頭にアデノウイルス(Ad)5/gagをワクチン接種し、別の3頭にワクシニアウイルス(MVA)/gagをワクチン接種した。別の5頭に、自然発生的なウイルス制御を有するSIV(SIVmac239)を予め感染させた。

10

【0085】

ΔUL128-130RhCMV/gagベクターワクチン接種RM由来の末梢血CD8⁺T細胞は、試験した125の15mer SIVgagペプチドのうちの平均46に対して応答した。これは、平均約35の異なるエピトープに対応していた(図1A)。対照的に、SIV感染コントローラーならびにエレクトロポレーションを行ったDNA/gag+IL-12、Ad5/gag、およびMVA/gagをワクチン接種したRMは平均10~19ペプチドと応答し、これは平均9~15の異なるエピトープに対応していた。ΔUL128-130RhCMV/gagベクターワクチン接種RMにおける応答幅は非常に大きく、14頭の研究した非近交系動物のほとんど、さらには全てにおいて多数のSIVgag15merペプチドがCD8⁺T細胞によってターゲットングされた(図1A)。

20

【0086】

この所見が単一の共通のエピトープ(「スーパートープ」)の偶然の認識または単純なT細胞認識「ホットスポット」(複数が重複するが、異なるエピトープ)を反映するかどうかを決定するために、一連の短縮ペプチドに対する応答を分析した。これらの短縮ペプチドは、応答あたり3頭のRMで認識された15merのうちの7つに対応していた。次いで、これらのペプチドを使用して各RM中のコアエピトープを同定した(図1B)。

30

【0087】

短縮ペプチドを使用して以下の2つの異なる応答パターンが認められた: 本明細書中でタイプ1と呼ばれる第1の応答パターンタイプを、応答頻度が重要なアミノ残基の喪失と共に急激に低下するパターンと定義する。これらの短縮により、典型的には、9merコアエピトープ(例えば、Gag₂₅₉₋₂₆₇、Gag₂₇₆₋₂₈₄、およびGag₄₈₂₋₄₉₀)が得られた。本明細書中でタイプ2と呼ばれる第2の応答タイプを、最適な配列の短縮につれて応答頻度が段階的に低下するパターンと定義する。これらの短縮により、典型的には、12merコアエピトープ(Gag₄₁₋₅₂、Gag₂₁₁₋₂₂₂、Gag₂₉₀₋₃₀₁、Gag₄₉₅₋₅₀₆)が得られた。これらの短縮応答パターンおよびコアペプチドは、各応答について研究した全てのRMで同一であり、いかなる場合でも、コアペプチドは、親15merより優れた刺激(より高い応答頻度)を示した(図1C)。

40

【0088】

まとめると、これらのデータは、ΔUL128-130RhCMV/gagベクターワクチン接種RMにおいてCD8⁺T細胞によってターゲットングされた多数のSIVgag

50

g エピトープが異種MHCハプロタイプを介して一般的またはさらに普遍的に認識される特異的決定基であることを強く示唆する。実際に、それぞれ、これらの短縮15mer（タイプ1および2短縮パターンの両方が含まれる）のうちの5つのコア（最適）ペプチドに対する検出可能なCD8⁺T細胞応答は、42頭のRhCMV/gagワクチン接種非近交系RMの100%で認められ、6つの他のペプチド（2つの最適ペプチドおよび4つの15mer）に対する応答は60%を超えるRMで見出された（図1D）。顕著には、これらのエピトープは、従来のSIV感染RMにおいてCD8⁺T細胞によって稀に認識された。したがって、SIVgagに対するΔUL128-130RhCMV/gagベクター誘発CD8⁺T細胞応答は、従来のように感染されたSIVgag特異的CD8⁺T細胞応答の約3倍の範囲であり、広く認識される「スーパートープ」の頻繁なターゲティングによって固有に特徴づけられる。

10

【0089】

実施例2-タイプ1CD8⁺応答はMHC-I拘束性であり、タイプ2CD8⁺応答はMHC-II拘束性である

MHC-I拘束性エピトープは、典型的には8~10アミノ酸長であり、上記のタイプ1短縮パターンと一致する「末端閉鎖」MHC-I結合溝（Rammensee HGら, Ann Rev Immunol 11, 213（1993）；本明細書中で参考として援用される）の特性に適合するように結合ポケット（アンカー残基）に会合する位置特異的アミノ酸を有する。対照的に、タイプ2短縮パターンは、MHC-II拘束性エピトープにより典型的である（典型的にはより長く、通常12merコアを超え、特異的アンカー残基を欠き、長さの不均一性により耐性を示す（Southwood Sら, J Immunol 160, 3363（1998）およびChelvanayagam G, Hum Immunol 58, 61（1997）；その両方が本明細書中で参考として援用される）。これは、RhCMV/gagベクターワクチン接種RMにおけるタイプ2SIVgagエピトープを認識するCD8⁺T細胞がMHC-II拘束性であり得ることを示唆していた。これに関して、クラスII拘束性CD8⁺T細胞応答は明らかに普通ではないが、かかる応答は、マウス（Mizuochi Tら, J Exp Med 168, 437（1988）；Suzuki Hら, J Immunol 153, 4496（1994）；Matechak EOら, Immunity 4, 337（1996）；Shimizu T and Takeda S, Eur J Immunol 27, 500（1997）；Tyznik AJら, J Exp Med 199, 559（2004）；Pearce ELら, J Immunol 173, 2494（2004）；その全てが本明細書中で参考として援用される）およびヒト（Heemskerk MHら, Proc Natl Acad Sci USA 98, 6806（2001）；Rist Mら, Blood 114, 2244（2009）；Hirosawa Tら, Cancer Sci 102, 1281（2011）；その全てが本明細書中で参考として援用される）の両方で以前に報告されており、有意義なTCRシグナル伝達にはそれぞれのMHC-IIまたはMHC-Iとの特異的なCD4またはCD8共受容体会合が必要ないということが証明されている（Viola Aら, J Exp Med 186, 1775（1997）およびLustgarten Jら, Eur J Immunol 21, 2507（1991）；その両方が本明細書中で参考として援用される）。

20

30

40

【0090】

ΔUL128-130RhCMVgagがgagに対するMHC-II拘束性CD8⁺T細胞応答を誘発したかどうかを調査するために、MHC-IおよびMHC-IIならびにインバリエント鎖由来のMHC-II特異的結合ペプチドCLIP（Sette A, J Exp Med 181, 677（1995）；本明細書中で参考として援用される）に特異的な「遮断」モノクローナル抗体（mAb）がΔUL128-130RhCMVgagで免疫したRMにおけるタイプ1およびタイプ2エピトープ特異的CD8⁺T細胞応答を遮断する能力を評価した（図2A）。これらの試薬による5つの普遍的スーパートープ特異的CD8⁺T細胞応答の阻害は、タイプ1対2短縮パターンに正確に対応し、3

50

つのタイプ2エピトープ (G a g₂₁₁₋₂₂₂、G a g₂₉₀₋₃₀₁、G a g₄₉₅₋₅₀₆) のT細胞認識は抗MHC-I IおよびCLIPによって遮断されるが抗MHC-I Iによって遮断されず、2つのタイプ1エピトープ (G a g₂₇₆₋₂₈₄、G a g₈₂₋₄₉₀) のT細胞認識については逆であった。

【0091】

MHC-I I遮断対MHC-I I遮断に関して図2Aにマッピングしたエピトープ特異的応答 (図2B、図2C)。予想通り、SIV感染RMおよび従来のワクチンを接種したRMにおける全CD8⁺T細胞応答はMHC-I Iをターゲティングする試薬によってのみ遮断されたのに対して、ΔUL128-130RhCMV/SIVワクチン接種RMでは、ターゲティングされた15merの大部分 (61%) に対するCD8⁺T細胞応答はMH 10
C-I Iインヒビターによって特異的に遮断され、のこりの少数 (36%) はMHC-I I mAbによってのみ遮断された (約3%の応答は不確定であった)。

【0092】

MHC-I I遮断CD8⁺T細胞応答がMHC-I I拘束性 (問題となるエピトープがMHC-I Iと関連して認識されると定義される) であることを確認し、MHC異種RMを介したこれらの応答の不規則性の根拠を調査するために、単一のアカゲザルMHC-I I異形を発現する細胞株を構築した。選択したMHC-I I対立遺伝子は、特徴づけられたSIVgagエピトープ認識プロフィールを有する4頭のRhCMV/gagワクチン接種RMによって発現された。フローサイトメトリーICSAッセイは、個別のペプチドでのMHC-I I異形トランスファクタントのパルシングによって、遮断実験によってM 20
HC-I I関連と分類された応答のみの頑強なCD8⁺T細胞刺激が得られたが親MHC-I I陰性細胞株では得られず (図3A)、これらの応答を抗MHC-I I mAbおよびCLIPペプチドを使用して遮断することができたが、抗MHC-I mAbでは遮断できなかったことを示した。重要なことに、個別のMHC-I I異形は複数のペプチドを提示し、個別のペプチドは複数のMHC-I I異形によって頻繁に提示された (図3A)。個別の異形が複数のgagペプチドを提示する能力は、これらのMHC-I I拘束性応答の範囲を説明するのに役立つ。複数のMHC-I I異形が多数の個別のペプチドを提示する能力は、MHC異種RMを介したRhCMV/gagベクター誘発CD8⁺T細胞によるこれらのペプチドの共通の認識 (例えば、そのスーパートープ特性) が少なくとも1つの各 30
応答に有効なMHC-I I異形を発現する全てのRMによって説明される可能性が高いことを示唆している。

【0093】

MHC-I I拘束性CD4⁺T細胞応答について以前に報告されているように (C o r r a d i n C a n d L a n z a v e c c i a A, I n t R e v I m m u n o l 7, 139 (1991) ; 本明細書中で参考として援用される)、RhCMV/gagベクターによって誘発されたMHC-I I拘束性SIVgag特異的CD8⁺T細胞はT細胞ドナーによって発現されないペプチド結合MHC-I I異形との関連でその特異的ペプチドエピトープに 40
応答することができ (図3Aおよび3B)、このことは、これらのT細胞のTCRが結合したペプチドのみまたはMHC-I I分子上の非多型構造との組み合わせを認識することを示す。

【0094】

実施例3-ΔUL128-130RhCMV/SIVベクター誘発CD8⁺T細胞応答の表現型および機能

RhCMV/SIVベクターワクチン接種によって生成および維持されたSIV特異的CD8⁺T細胞の通常でないエピトープ特異性は、これらの応答を支配する特に非従来型のMHC-I I拘束性集団の機能的潜在性に関する問題を提起する。第1に、これに関して、最適なペプチド (タイプ1およびタイプ2の両方) に対する応答を100000倍超の希釈倍率のペプチド濃度で証明することができるので (図4A)、これらのスーパートープ特異的CD8⁺T細胞応答は、標準的なICSAッセイで使用した高ペプチド濃度の人為的結果ではない。第2に、タイプ1およびタイプ2スーパートープ特異的応答はワク 50

チン接種直後に惹起され（図4B）、RhCMV/SIVベクターワクチン接種RMについて前に報告したパターンで（Hansen SGら, Nature 473, 523 (2011)；本明細書中で参考として援用される）全身に協調的に分布している（図4Cおよび4D）。第3に、RhCMV特異的CD8⁺T細胞およびRhCMV/SIVベクター誘発SIV特異的T細胞について以前に報告されるように（Hansen SGら, Nat Med 15, 293 (2009)；本明細書中で参考として援用される）、タイプ1およびタイプ2スーパーT細胞の両方は、エフェクターメモリーT細胞分化を示す同一の表現型（CCR7⁻、CD28⁻）およびこのエフェクターメモリー表現型と一致する同一の多機能プロファイル（高いTNF、IFN- γ 、およびMIP-1 α の産生、高CD107内在化（脱顆粒）、および低IL-2産生）を示す（図4Eおよび4F）。エフェクターメモリー分化がAg駆動であると考えられるので、これらのデータは、ワクチン接種したRMでは、これらのCD8⁺T細胞がタイプ1およびタイプ2のエピトープに等価にin vivo曝露されると示唆される。

【0095】

実施例4-UL128およびUL130はCMV誘発CD8⁺T細胞応答のターゲティングを調節する

この通常でないCD8⁺免疫応答に関連し、前記応答を潜在的に担う候補CMV遺伝子を同定するために、内因性CMV最初期（IE）タンパク質に対するCD8⁺T細胞応答も非従来型のエピトープ（特に、MHC-I Iによって拘束されるスーパーT細胞）をターゲティングするかどうかを最初に問うた。これを、野生型RhCMV（コロニー流行株）で天然に感染させたRMおよび例示的な Δ UL128-130欠損68.1株RhCMV/SIVベクターをワクチン接種したRMの評価によって決定した。驚くほどのことではないが、 Δ UL128-130ベクターをワクチン接種したRMは、同一RMにおいてSIVgag特異的CD8⁺T細胞応答と同一のターゲティング特性を有するIE特異的CD8⁺T細胞応答が証明された：30超の異なるIEエピトープ/RM（抗MHC-I Iで遮断されたエピトープ特異的応答の大部分および抗MHC-Iで遮断された少数の部分が含まれる）。

【0096】

しかし、著しく対照的に、天然にRhCMV感染させたRMにおけるIE特異的CD8⁺T細胞応答ははるかに狭くターゲティングされ（約8エピトープ/RM）、MHC-I I拘束性やエピトープ不規則性の証拠はなく（図5A、5B、および5C）、従来の免疫優性ヒエラルキーと一致した。これらの所見は、従来になくターゲティングされたCMV特異的CD8⁺T細胞応答が（これらの応答についての相当数の分析にもかかわらず）天然に暴露されたCMV⁺RMおよびヒトにおいて報告されていなかった理由を説明する可能性が高く、より重要には、従来になくターゲティングされたCD8⁺T細胞応答の生成を担う機構における Δ UL128-130欠損株68.1ベースのRhCMVベクターと Δ UL128-130含有野生型RhCMVとの間の遺伝的相違を含意する。

【0097】

プライミング中のCD8⁺T細胞のターゲティングにおけるこれらの遺伝子の役割を評価するために、UL128およびUL130のオルソログの発現を再確立するRhCMV/gagベクターを生成した（Lilja AEら, Proc Natl Acad Sci USA 105, 19950 (2008)）。次いで、UL128およびUL130のオルソログ発現のこの「修復」によってベクター誘発gag特異的CD8⁺T細胞応答のエピトープターゲティングプロファイルが変化したかどうかを問うた。実際に、いかなる前に定義したMHC-IまたはMHC-I IスーパーT細胞の認識を含まなかったUL128およびUL130修復RhCMV/gagベクターによって誘発されたSIVgag特異的CD8⁺T細胞応答は、非修復68.1株ベクター（UL128-UL130オルソログ発現を欠く）によって誘発された応答よりもはるかに狭くターゲティングされ、この応答は完全にMHC-Iに関連していた（図5D、5E、および5F）。

【0098】

実施例5—UL128またはUL130を単一欠失したCMVベクターはクラスII拘束によって特徴づけられるCD8応答を示し、UL131を単一欠失したCMVベクターは重複感染が不可能である

RhCMV68.1株を、RhCMV/SIVベクター構築におけるその使用前に線維芽細胞培養において複数回継代し、この株はUL130遺伝子の一部および全UL128遺伝子を欠失することが元の野生分離株と異なる(Gillら, Virology 447, 208 (2013); 本明細書中で参考として援用される)。UL128およびUL130の遺伝子は、5'-UL131-UL130-UL128-3'の順序でUL131と共に単一のmRNA上にコードされる(Lilja AEら, 2008 前出)。3つ全ての遺伝子がこの単一の「多シストロン性」mRNAによってコードされ、且つこのmRNAの全3'末端が68-1中で欠如しているので、以前にはHansen SGら, Science 340, 1237874 doi, 24 May 2013 (本明細書中で参考として援用される)において、68.1の欠如によりHCMV UL128、130、および131遺伝子の3つ全ての活性RhCMVオルソログ(Rh157.6、157.4、および157.5)を発現できると考えられていた。MHC-II拘束性CD8+T細胞のプライミングの調整におけるUL128、UL130、およびUL131の個別の機能を決定するために、本発明者らは、これらの各遺伝子を個別に欠くRhCMV/SIVgagベクターを生成した。UL128-130「修復」RhCMV-68-1.2ウイルス(Liljaら 2008 前出)を本発明者らの出発点として使用して、本発明者らは、ΔUL128RhCMV/gag、ΔUL130/RhCMVgag、およびΔUL131/RhCMVgagを生成し、これらの各構築物を予めRhCMVを天然に感染させた2頭のRMに接種した。図6に示すように、UL128を欠くがUL130およびUL131を含むRhCMVは、両動物においてSIVgagに対するT細胞応答を誘導した。同様に、UL130を欠くがUL131およびUL128を含むRhCMVは、両動物においてSIVgagに対するT細胞応答を誘導した。対照的に、UL131を欠くがUL130およびUL128のインタクトな遺伝子を含むRhCMVは、CMV陽性動物において免疫応答を誘導することができなかった。これらのデータは、機能的UL131遺伝子にはCMV陽性動物の重複感染が必要であることを示唆している。RhCMV68-1が重複感染可能であるので、この結果はまた、多シストロン性mRNAの一部の欠失にもかかわらずRhCMV68-1が機能的UL131を含み、RhCMV68-1がΔUL128-130ベクターであることと一致していることを証明している。UL130またはUL128が単一欠失したベクターがMHC-II拘束性CD8+T細胞を誘発するかどうかをさらに決定するために、本発明者らは、MHC-IまたはMHC-II-遮断抗体の存在下でのSIVgagのアミノ末端部分に対応する25の重複15merペプチドに対するCD8+T細胞応答をモニタリングした。図7に示すように、個別のペプチドに対するMHC-IおよびMHC-II拘束性CD8+T細胞応答の両方が認められた。これらの結果は、UL128またはUL130のいずれかを欠くがUL131を含む単一欠失ベクターが非従来型のT細胞応答を誘導することができることを証明している。

【0099】

実施例6—Mycobacterium tuberculosis抗原を含むΔUL128-130が欠損したCMVベクターはクラスII制限によって特徴づけられるCD8応答を示す

上記実施例では、本発明者らは、UL128および/またはUL130を欠くベクターがCMV-IEタンパク質またはSIVgagタンパク質などのウイルス抗原に対してより一般的に認められるMHC-IよりもむしろMHC-IIに拘束される非従来型のCD8+T細胞を誘導することを証明した。ΔUL128-130ベクターが細菌抗原に対してMHC-II拘束性CD8+T細胞を誘導することもできるかどうかを決定するために、本発明者らは2つのMycobacterium tuberculosis抗原の融合タンパク質をΔUL128-130ベクターに挿入した。得られたベクターRhCMV

／TBは、*Mycobacterium tuberculosis*の50kDa融合タンパク質ESAT6および抗原85Bをコードする（Derrick SCら、Vaccine 23、780-788（2004）；本明細書中で参考として援用される）。ESAT6は初期分泌タンパク質であるのに対して、抗原85Bは結合し、*Mycobacterium tuberculosis*によって発現される最も豊富なタンパク質である（Brandt, J Immunol 157, 3527（1996）本明細書中で参考として援用される）。3頭のRMにRhCMV68-1由来ベクターRhCMV／TBを接種し、個別のペプチドに対するCD8+T細胞応答を、MHC-IまたはMHC-IIを遮断する抗体の存在下でモニタリングした。図8に示すように、ワクチン接種した各動物は両方の抗原に対するCD8+T細胞応答を生じ、CD8+T細胞によってはMHC-Iによって拘束されたものもあれば、他のMHC-IIによって拘束されたものもあった。したがって、これらのデータは、UL128およびUL130を欠くCMVベクターによるMHC-II拘束性CD8+T細胞を誘導する能力がウイルス抗原に制限されず、他の異種抗原（細菌抗原が含まれる）に拡大することができることを証明している。

【0100】

実施例7 UL128-130欠失ベクターおよびUL128-130含有ベクターの連続接種が異種抗原のエピトープ範囲を増大させる

上記の実施例では、本発明者らは、UL128-130を欠くベクターがMHC-IおよびMHC-II拘束性のCD8+T細胞の両方を誘導するのに対して、UL128-130インタクトなベクターがMHC-I拘束性CD8+T細胞のみを誘導することを証明した。同一抗原を保有するがUL128およびUL130の存在に関して異なるベクターによる連続接種が異種抗原のエピトープ範囲を増大させるかどうかを決定するために、本発明者らは、ΔUL128-130（68-1）を予めワクチン接種した2頭のRMに別のラウンドのΔUL128-130（68-1）を接種後、UL128-130「修復」（68-1.2）RhCMVベクターを連続的に接種した。全ベクターがSIVgagを発現した。SIVgagに対する全CD8+T細胞応答を、ΔUL128-130（68-1由来）ベクターおよびUL128-130修復（68-1.2由来）ベクターの両方の再ワクチン接種によって追加免疫した一方で、68-1／SIVgagベクターでの以前のワクチン接種に起因する各動物中に存在する個別のペプチドに対する応答を、68-1／SIVgagベクターによって追加免疫したが、68-1.2／SIVgagベクターによって追加免疫しなかった（図9、上のパネル）。個別のペプチドがMHC-IおよびMHC-IIのいずれかによって拘束されたCD8+T細胞によって認識されたので、これらのデータは、UL128およびUL130を欠くベクターによって誘導されるエピトープ範囲がMHC-I拘束性T細胞についてさえインタクトなUL128およびUL130を含むベクターのエピトープ範囲と重複しないことを証明している。この結果は、同一抗原を保有するUL128／130欠失ベクターおよびUL128-130インタクトベクターでの同一個体の連続ワクチン接種が単一ベクターを用いた接種と比較して遥かに広い範囲のT細胞応答を誘導することをさらに示唆していた。この結論は、個別のSIVgagエピトープに対するCD8+T細胞応答が68-1／gagでの単一のワクチン接種、68-1／gagでの再ワクチン接種、および68-1.2／gagでのワクチン接種後に2頭のRMにおいてモニタリングされた場合に支持された。図9の下のパネルに示すように、同一タイプのベクターでの再ワクチン接種およびそのUL128-130組成が異なるベクターでのワクチン接種の両方により、以前のワクチン接種由来のT細胞応答を維持しながらさらなるSIVgagエピトープを認識する新規のT細胞が誘導された。各コアエピトープが9-12アミノ酸長であり、且つSIVgagが510のアミノ酸をコードすることを考慮して、これらの動物における連続ワクチン接種戦略によって誘導された45-52エピトープは、全SIVgagポリペプチド配列の約90%を対象とする。本発明者らが知る限り、このエピトープ範囲レベルは任意の他のベクター系を使用して以前には認められなかった。

【0101】

実施例 8－材料と方法

動物：全部で165頭の目的に合うように交配された遺伝子背景がインドの雄または雌の若年アカゲザル (*Macaca mulatta*) を本研究で使用した (68-1株 RhCMV/SIVベクター (野生型または遺伝子改変型、単独またはその後に従来のワクチンまたはウイルス抑制SIV感染で異種プライミングを行った) でワクチン接種した110頭のマカク、SIV感染のみの47頭のマカク (SIVmac239またはSIVmac251)、およびRhCMVのコロニー流行株で天然に感染した8頭の非ワクチン接種マカクが含まれる)。NIHの実験動物の管理と使用に関する指針の基準下で、Oregon National Primate Research Center Institutional Animal Care and Use Committee に承認された全てのマカクを使用した。これらの実験で使用したマカクは、オナガザル (*cercopithecine*) ヘルペスウイルス1、D型サルレトロウイルス、およびサルTリンパ球向性ウイルスタイプ1を持たなかった。Mamu-A*01、Mamu-A*02、Mamu-B*08、およびMamu-B*17対立遺伝子のMHC-I遺伝子型同定を、Loffredo JTら、J Virol 81, 8827 (2007) (本明細書中で参考として援用される) に記載の配列特異的プライミングポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって行った。選択したマカクに対して大規模シーケンシングによってDRB-遺伝子型同定を行った。簡潔に述べれば、Mamu-DRB領域のアンプリコンを、高信頼性 Phusion (登録商標) ポリメラーゼ (NEBiolabs) およびユニバーサルMHC-DRB特異的プライマーの対 (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-MID-CTGGTCTGTCTGTCTCTCC-配列番号1; 5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-MID-TGGAAGGTCCAGTCTCCATT-配列番号2) を用い、以下の熱サイクル条件を使用したPCRによるcDNAの増幅によって作製した: 98℃で3分間、(98℃で5秒間、60℃で10秒間、72℃で20秒間) を25サイクル、および72℃で5分間。一次cDNA-PCR産物を、AMPure XP磁性ビーズ (Beckman Coulter Genomics) を使用して精製した。Lib-Aキット (Roche/454 Life Sciences) を使用したエマルジョンPCR、ビーズ精製、およびRoche/454 GS Junior装置を使用したピロシーケンシング手順を、製造者の説明書通りに行った。配列アセンブリのためのGeneious-Pro (登録商標) バイオインフォマティクスソフトウェア (Biomatters Ltd.) と併せてLabkeyデータベースを使用してデータを分析した。免疫学的アッセイのための単核球調製物を、記載のように (Pitcher CJら、J Immunol 168, 29 (2002) およびVeazey RSら、Science 280, 427 (1998); その両方が本明細書中で参考として援用される) 血液、骨髄、気管支肺胞洗浄液 (BAL)、リンパ節、脾臓、肝臓、骨髄、および腸粘膜から得た。精製CD8+T細胞 (純度90%超) を、CD8マイクロビーズおよびLSカラム (Miltenyi Biotec) を使用してPBMCから得た。SIV+マカクの血漿ウイルス量を、定量的リアルタイム逆転写PCR (RT-PCR) (60) によって決定した。SIV+マカクは、血漿ウイルス量が 2.0×10^4 コピー/ml未満である場合にSIVコントローラーと見し、血漿ウイルス量が 3.0×10^3 コピー/ml未満である場合にeliteコントローラーと見なした。

【0102】

RhCMV/SIVベクター：68-1株由来RhCMV/SIVの構築、特徴付け、および投与は、Hansen SGら、Nature 473, 523 (2011); Hansen SGら、Nat Med 15, 293 (2009) およびHansen SGら、Science 328, 102 (2010) (その全てが本明細書中で参考として援用される) に詳述されている。本研究で使用した全ての組換えウイルスは、組織培養物中でのin vivo組換えによるRhCMV-EGFP中の緑色蛍光タンパク質 (GFP) のSIVgag発現カセットとの置換によって生成したRhCMV (gagL)

を除き、RhCMV68-1BAC株から誘導した。RhCMV68-1について記載のように(Malouli Dら, J Virol 86, 8959(2012)およびHansen SGら, J Virol 77, 6620(2003);その両方が本明細書中で参考として援用される)、BAC由来構築物と同様に、RhCMVgagLはインタクトな読み取り枠(ORF)、Rh61/Rh60(UL36)を含む。組織培養への適応の結果として、BACおよび非BACのRhCMV68-1構築物の両方は、ORF157.5およびORF Rh157.4のほとんどが欠失している(これらは、HCMV UL128およびUL130のホモログをそれぞれコードする)(Oxford KLら, Virology 373, 181(2008);本明細書中で参考として援用される)。低継代数のRhCMVでは、これら2つのORFは、Rh157.6(UL131)を含む同一の多シストロン性mRNAから翻訳される(Lilja AEら, Proc Natl Acad Sci USA 105, 19950(2008);本明細書中で参考として援用される)。

10

【0103】

修復UL128-UL130を発現するベクターを生成するために、SIVgag発現カセットを、RhCMV68-1.2(Rh61/Rh60(UL36)、Rh157.4(UL130)、およびRh157.5(UL128)が修復された組換えウイルス)のRh211に挿入した。ΔRh182-189RhCMV/gagは、Hansenら2010前出に記載されている。同様に、Rh182-189をコードするゲノム領域(Malouliら 2012前出におけるBACゲノムアノテーションを使用した塩基対193,161~199,823)のEF1αSIVrev/tat/nefまたはgHSIV/env発現カセットとの置換によってΔRh182-189RhCMV/rtnおよび/envを構築した。部分欠失変異体ΔRh182-185RhCMV/gagおよび/rtnを、塩基対193,161および196,305をSIVgagまたはSIVrev/tat/nefのための発現カセットと置換することによって生成した。部分欠失変異体ΔRh186-189RhCMV/gagおよびrtnを、塩基対196,593~199,823をSIVgagまたはSIVrev/tat/nef発現カセットと置換することによって構築した。Rh189(US11)のみを欠く組換えRhCMVを生成するために、本発明者らは、Rh189コード領域をRhCMVrtn中のSIVgagのコード領域と置換した。したがって、このベクターは、Rh189プロモーターの調節下でSIVgagを発現し、EF1αプロモーターの調節下でSIVrtn(Rh211に挿入)を発現する(図S10)。全ての組換えウイルスを特徴づけ、制限消化によって確認し、その隣接領域を含む抗原インサートの配列を検証した。SIV抗原の発現を免疫ブロットによって検証した。さらに、隣接遺伝子発現をRT-PCRによって検証した。

20

30

【0104】

他のワクチン:本研究で使用したAd5/gagベクターの構築、特徴付け、および投与は、(Hansenら 2011 前出)に記載されている。MVA/gagを、MH5(初期/後期ワクシニアプロモーター)の調節下でコドン最適化された全長SIVmac239gag遺伝子をMVAシャトルベクターpLW44に挿入することによって構築して、組換えプラスミドpJV7を生成した。pLW44内の隣接配列は、相同組換えによるチミジンキナーゼ遺伝子座への組換え構築物の挿入を指示した。ニワトリ胚性線維芽細胞をpJV7でトランスフェクション後、MVA1974株を感染させてSIVmac239gagを発現する組換えウイルスを生成した(ウェスタンブロットによってSIVgag発現が確認された)。組換えウイルスをブランク精製し、大量培養で増幅させた。ウイルスストックを24→40%スクロース勾配で精製後、36%スクロースクッションによってペレット化し、次いで、ペレットを1mM Tris-Cl(pH9.0)に懸濁した。MVA/gagワクチン接種のために、マカクに10⁸ブランク形成単位のこのベクターを筋肉内注射によって投与した。DNA/gag+IL-12ワクチンは、Inovio Pharmaceuticalsから提供された。簡潔に述べれば、SIVg

40

50

ag インサート発現がヒト CMV (HCMV) プロモーター／エンハンサーおよびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルによって調節されるように、コドン最適化された全長 SIVmac239 gag の 5' ハーフおよび 3' ハーフを pVAX (登録商標) 骨格 (Invitrogen) にクローン化した。最適化アカゲザル IL-12 アジュバントを、以前に使用したマカク IL-12 の非最適化バージョン (63) の修正によって構築した。修正には、p35 インサート配列および p40 インサート配列のみのコドンおよび RNA 最適化が含まれ、最適化を GeneArt (登録商標) (Invitrogen) によって実施した。記載のように (Laddy DL ら, J Virol 83, 4264 (2009) ; 本明細書中で参考として援用される)、マカクに 1mg の 2 つの SIVgag 構築物および 0.5mg の IL-12 構築物を投与し、DNA を四頭筋に送達後、Celectra (登録商標) 定電流デバイス (Inovio Pharmaceuticals Inc.) を使用して in vivo でエレクトロポレーションを行った。

【0105】

抗原および抗原提示細胞：SIVgag、rev、nef、tat、env、および pol タンパク質および RhCMV IE-1 タンパク質を含む連続 15mer ペプチド (11 アミノ酸重複) ならびにこれらのタンパク質内の特異的 9~14mer ペプチドの合成を、SIVmac239 配列 (GenBank 受入番号 M33262) (Kestler H ら, Science 248, 1109 (1990) ; 本明細書中で参考として援用される) または 68-1 株 RhCMV IE-1 配列 (GenBank 受入番号 AY186194) (Hansen SG ら, J Virol 77, 6620 (2003) ; 本明細書中で参考として援用される) を使用して、Intavis AG (登録商標) によって行った。全ペプチドを、N 末端からの包括的なアミノ酸の位置によって同定する (例えば、Gag_{x-x-y-y})。連続 15mer も、N 末端 15mer から開始する 15mer の位置によって命名する (例えば、Gag₁₋₁₅ は 15mer 番号 1 である ; Gag₄₋₁₉ は 15mer 番号 2 である、など)。他で規定しない限り、これらのペプチドを、T 細胞アッセイにおいて 2 μg/ml (単独または総タンパク質混合物中のいずれにおいても) で使用した。アルドリチオール-2 不活化 SIV (AT-2-SIV ; ロット P4146、AIDS およびがんプログラム、米国国立癌研究所フレデリック支所、Frederick, MD) を、記載のように産生した (Buseyne F ら, Nat Med 7, 344 (2001) ; 本明細書中で参考として援用される)。自己 B-リンパ芽球様細胞株 (BLCL) を、アカゲザル PBMC にヒヘルペスウイルスを感染させることによって生成した (Voss G ら J Virol Methods 39, 185 (1992) ; 本明細書中で参考として援用される)。自己 SIV 感染標的細胞を、記載のように (Sacha JB ら, J Immunol 178, 2746 (2007) ; 本明細書中で参考として援用される) スクロース精製 SIVmac239 での活性化 CD4⁺T 細胞のスピンキュレーション、その後の 4 日間の培養、その後の CD4 マイクロビーズおよび LS カラム (Miltenyi Biotec) での精製によって産生した。感染細胞調製物は、富化後に 95% 超が CD4⁺T 細胞であり、SIV 感染率は 50% 超であった。これをエフェクター：標的比 80:1 で使用した。単一の Mamu-DR 異形トランスファクタントを、pcDNC3.1 よりもむしろプラスミド pCEP4 (Invitrogen) に Mamu-DR 対立遺伝子を挿入することを除いて記載のように (Giraldó-Vela JP ら, J Virol 82, 859 (2008) ; 本明細書中で参考として援用される) 構築した。Mamu-DRA*01:05 を、DRB1*10:07、DRB1*04:06、DRB1*03:09、DRB5*03:01、DRB*w2:01、および DRB*w26:03 と対にし、Mamu-DRA*01:021 を DRB*w4:01 と対にした。MHC-II 拘束アッセイ前に、これらのトランスファクタント由来の mRNA を、AllPrep (登録商標) DNA/RNA ミニキット (Qiagen) を使用して抽出し、Mamu-DRB の高多型性 β1 領域に及ぶユニバーサルプライマー対 (5'-GACACTGATGGTGCTGAGC-3'-配列番号 3 および 5'-GCTGCACCTGTGAAGCTCTC-3'-配列番号 4) を

10

20

30

40

50

使用したRT-PCRによって増幅し、その配列を確認した。MHC-I IトランスファクタントおよびBLC Lを、目的のGagペプチドで最終濃度5 μ g/mlにて90分間(37℃)パルスし、次いで、温PBSで2回洗浄し、温R10で1回洗浄して非結合ペプチドを除去後、エフェクター：標的比10：1で新たに単離したPBMCを刺激するために使用した。

【0106】

T細胞アッセイ：SIVおよびRhCMV特異的なCD4+およびCD8+Tの細胞応答を、詳述するように(Hansen SGら 2011 前出；Hansen SGら 2009 前出、およびHansen SGら, 2010 前出)、フローサイトメトリーICSによって血液および組織由来の単核球調製物中で測定した。簡潔に述べれば、単核球または単離CD8+T細胞を、抗原(ペプチド、AT-2SIV、ペプチドをパルスしたBLC LまたはMHC-I Iトランスファクタント、またはSIV感染CD4+T細胞)および共刺激分子CD28およびCD49d(BD Biosciences)と1時間インキュベートし、その後にブレフェルジンA(Sigma-Aldrich)を添加してさらに8時間インキュベートした。抗原を使用しない共刺激をバックグラウンドコントロールとして準備した。応答とのMHC関連(MHC-I対MHC-II)を、単離単核球またはAPCを、MHC-I mAb(10 μ g/ml；クローンW6-32)対MHC-II mAb(HLA-DR；クローンG46-6)またはCLIPペプチド(MHC-I I関連インバリアント鎖、アミノ酸89~100；2 μ g/ml)の存在下にて室温で1時間プレインキュベート後、ペプチドを添加するかエフェクターおよび標的細胞を組み合わせ、標準的なICSアッセイでインキュベートすることによって決定した。刺激された細胞を、Hansen SGら 2011 前出；Hansen SGら 2009 前出、およびHansen SGら, 2010 前出に記載のように固定し、透過処理し、染色し、LSR-II装置(BD Biosciences)にてフローサイトメトリー分析を行った。FlowJo(登録商標)ソフトウェア(Tree Star)を使用して分析を行った。全分析において、小リンパ球の光散乱サインに対するゲーティング後、CD3+集団、次いでCD4+/CD8-対CD4-/CD8+T細胞サブセットに対して段階的にゲーティングした。CD4+T細胞集団またはCD8+T細胞集団についての抗原特異的応答頻度を、CD69およびIFN- γ またはTNF- α のいずれかまたはその両方の細胞内発現から日常的に決定した(選択実験では、応答を細胞内CD69およびIL-2もしくはMIP-1 β 産生またはCD107外在化のいずれかによっても特徴づけた(11))。他の選択実験では、(CD69+/TNF- α +および/またはCD69+/IFN- γ +)のブールゲートを生成し、ゲーティングした(応答性)CD8+T細胞集団におけるCD28およびCCR7の発現を決定した。記載のように(Pitcher CJら, J Immunol 168, 29(2002)；本明細書中で参考として援用される)、バックグラウンド減算およびメモリ補正後に応答頻度を報告した。エピトープ逆重畳実験のために、より厳格な応答基準を使用して偽陽性を防止した。これらの研究では、所与の15merペプチドに対する応答を、少なくとも2つの独立したアッセイにおいてCD69⁺、TNF- α ⁺、およびIFN- γ ⁺としてクラスター化した事象頻度が0.05%以上であり、バックグラウンドが0.01%未満である場合、陽性に見なした。MHC-I関連対MHC-II関連としての個別のペプチド応答の分類は、アイソタイプコントロールと比較したMHC-I遮断またはMHC-II遮断のいずれかによる応答の90%超阻害に基づいていた。これらの基準を満たさなかった応答を、不確定に見なした。最小独立エピトープ数を、以下の基準に従った連続15merペプチドの試験によって同定された陽性応答から推定した：単一陽性ペプチド=1独立エピトープ；2隣接陽性ペプチド=1独立エピトープ；3隣接陽性ペプチド=2独立エピトープ；4隣接陽性ペプチド=2独立エピトープ；および5隣接陽性ペプチド=3独立エピトープ。これらの最小数の独立エピトープの推定を、MHC関連データの恩恵を受けずに最初に実施したが、その後同一の基準を用いて修正し、MHC-I遮断応答対MHC-II遮断応答に独立して適用した。

10

20

30

40

50

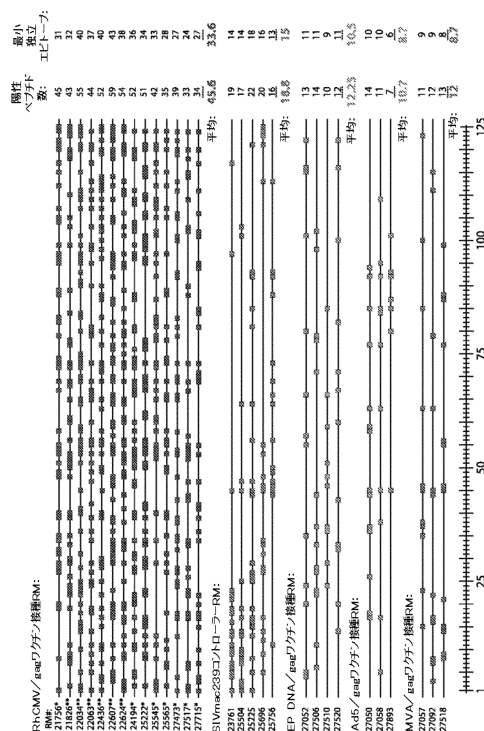
【0107】

統計：独立したサンプルの比較のために、本発明者らは、ウィルコクソン順位和検定としても公知の2変量マン・ホイットニーU検定を適用した。固定null仮定値との一標本比較のために(100%と比較した百分率など)、本発明者らは一標本ウィルコクソン符号付き順位検定を適用した(Wolfe DA and Hollander M Nonparametric Statistical Methods (Wiley, New York, 1973); 本明細書中で参考として援用される)。全検定を、第一種過誤率5%を用いた両側検定として実施した。本発明者らは、全ての統計解析のためにR言語を使用した(www.Rproject.org (2011); 本明細書中で参考として援用される)。

10

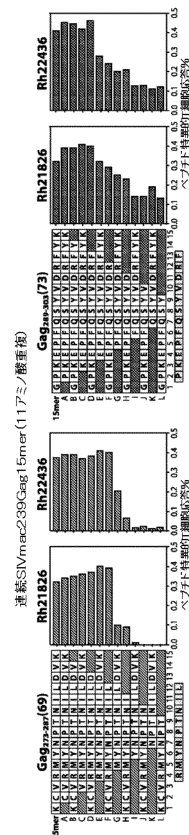
【図1A】

Figure 1A



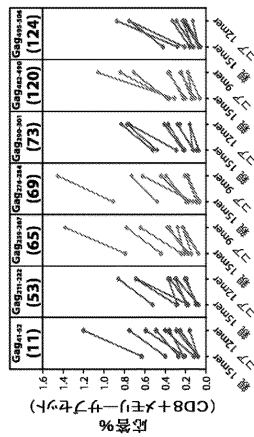
【図1B】

Figure 1B



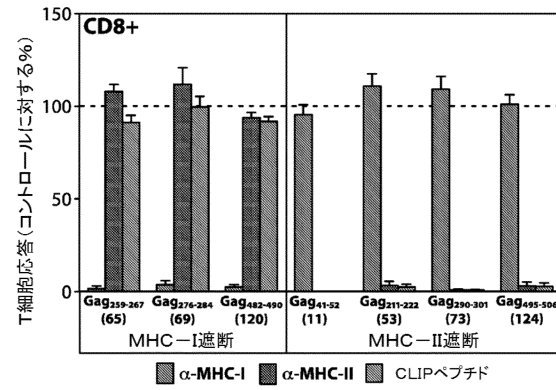
【図 1 C】

Figure 1C



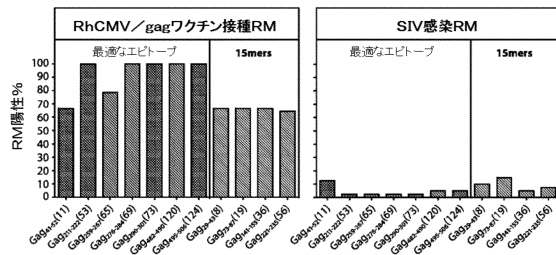
【図 2 A】

Figure 2A



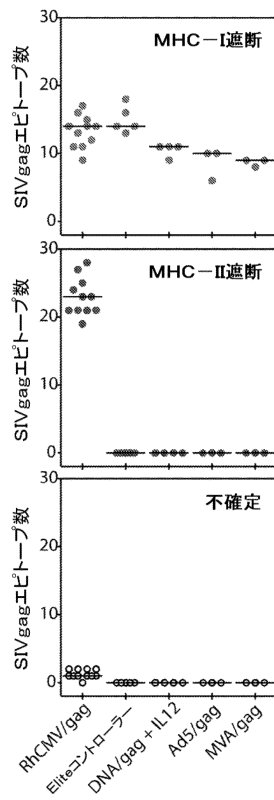
【図 1 D】

Figure 1D



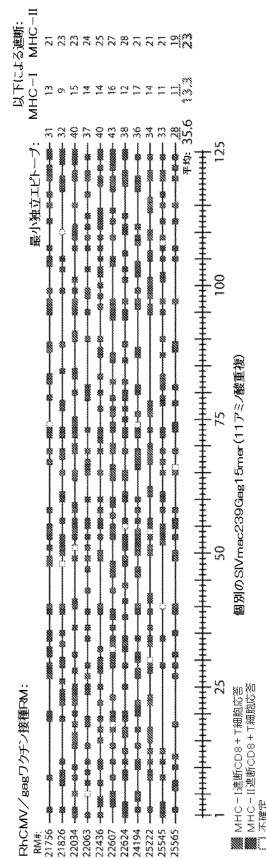
【図 2 B】

Figure 2B



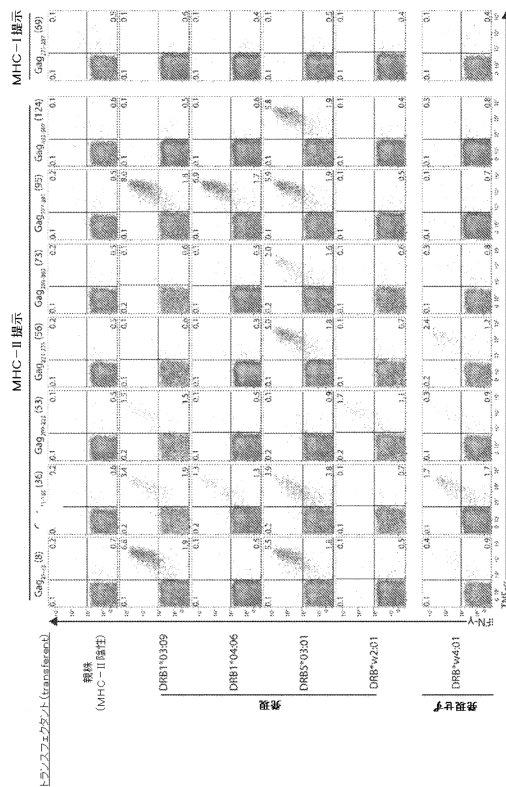
【図 2 C】

Figure 2C



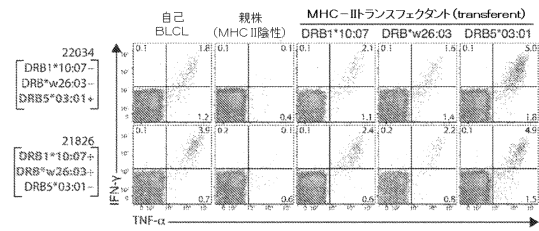
【図 3 A】

Figure 3A



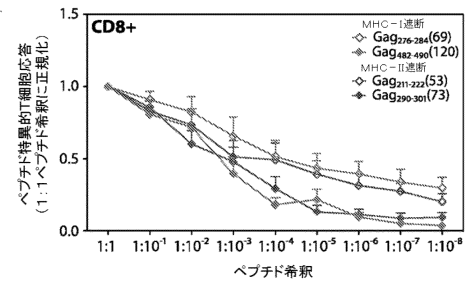
【図 3 B】

Figure 3B



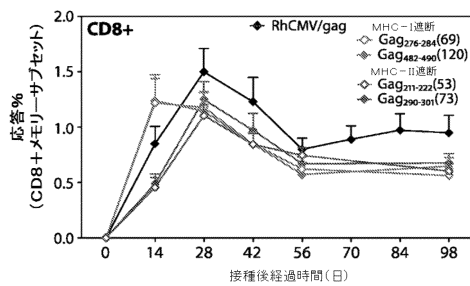
【図 4 A】

Figure 4A



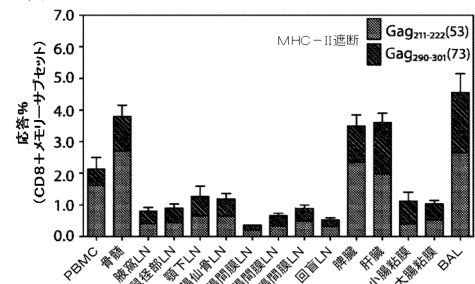
【図 4 B】

Figure 4B



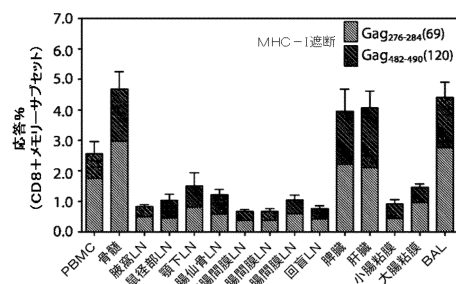
【図 4 D】

Figure 4D



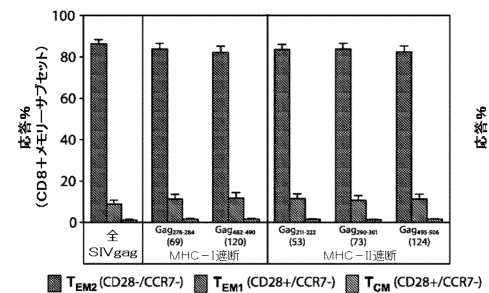
【図 4 C】

Figure 4C



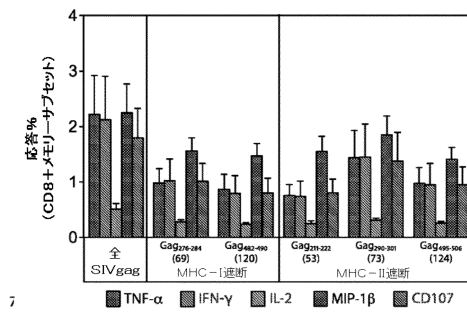
【図 4 E】

Figure 4E



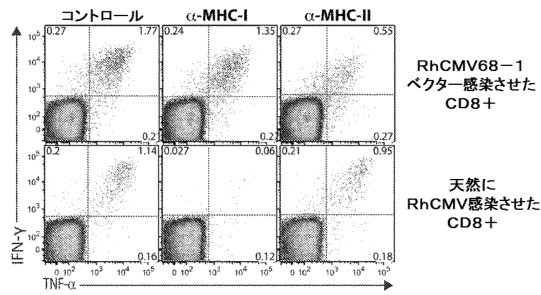
【図 4 F】

Figure 4F



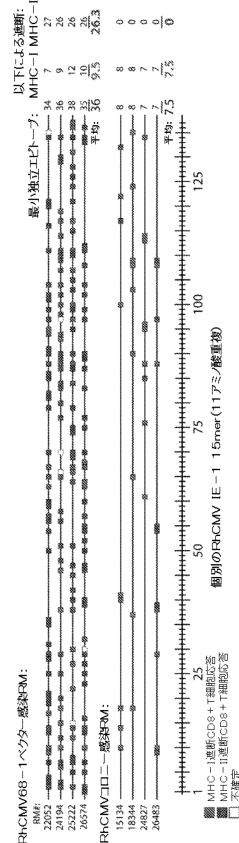
【図 5 A】

Figure 5A



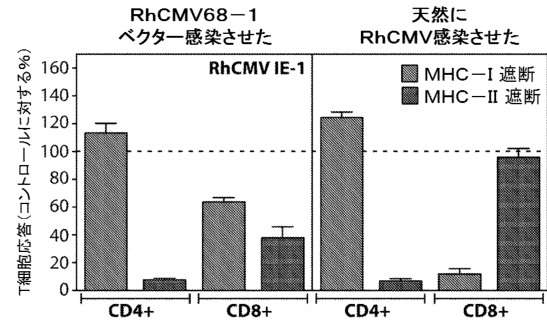
【図 5 C】

Figure 5C



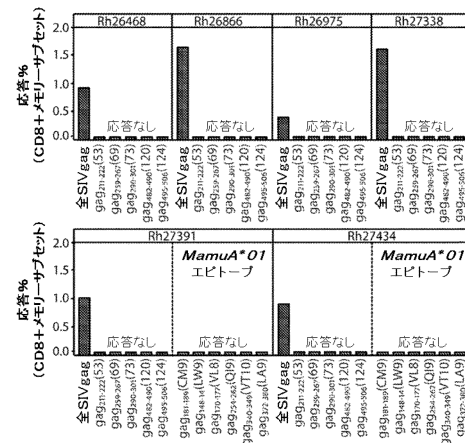
【図 5 B】

Figure 5B



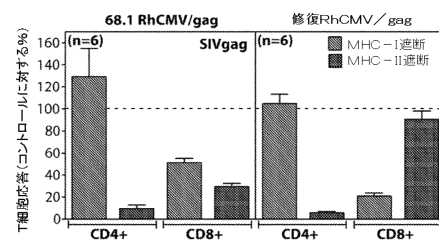
【図 5 D】

Figure 5D



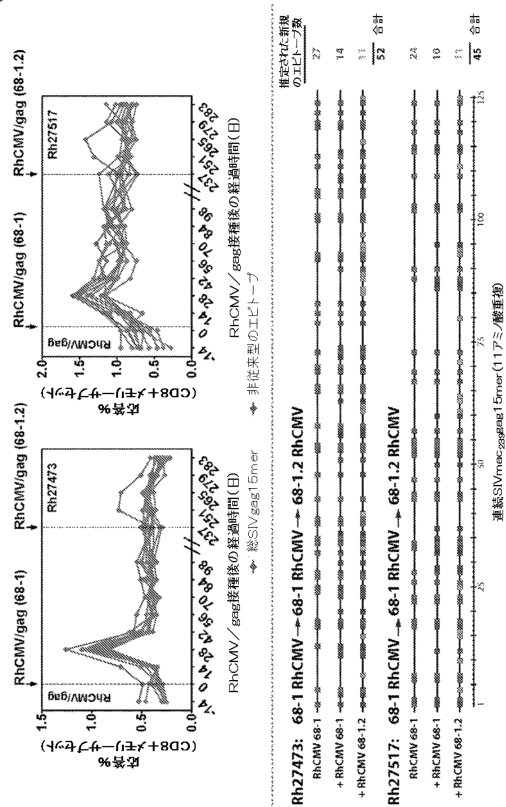
【図 5 E】

Figure 5E



【図 9】

Figure 9



【配列表】

0006483033000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/00 (2006.01) A 6 1 P 31/00 1 7 1

- (72)発明者 ルイス・ピッカー
アメリカ合衆国 9 7 2 2 9 オレゴン州ポートランド、ノースウエスト・ナインティフィフス・アベ
ニュー 2 5 番
- (72)発明者 スコット・ハンセン
アメリカ合衆国 9 7 2 1 0 オレゴン州ポートランド、ノースウエスト・バル・ビスタ・テラス 3 0
5 0 番
- (72)発明者 クラウス・フルー
アメリカ合衆国 9 7 2 2 9 オレゴン州ポートランド、ノースウエスト・ワンハンドレッドサーティ
ーンズ・アベニュー 1 9 8 0 番
- (72)発明者 ダニエル・マルーリ
アメリカ合衆国 9 7 1 2 4 オレゴン州ヒルズボロ、ノースウエスト・アダージオ・ウェイ 2 8 3 6
番

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 1 4 3 6 5 0 (WO, A 1)
米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 1 0 1 8 8 (US, A 1)
米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 1 9 3 6 9 (US, A 1)
Journal of General Virology, 2005, Vol.86, pp.275-284
Journal of Immunology, 2004, Vol.173, pp.2494-2499

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 0 7 K 1 4 / 0 0
PubMed