

(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2007-505130

(P2007-505130A)

(43) 公表日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/12	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 5
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12	4 C O 8 7
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-526293 (P2006-526293)	(71) 出願人	503081933
(86) (22) 出願日	平成16年9月9日(2004.9.9)		バイレクシス コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月8日(2006.5.8)		アメリカ合衆国 メリーランド 2087
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/029492		7, ガイザースバーグ, ペリー パー
(87) 国際公開番号	W02005/023313		クウェイ 200, スイート 1エイ
(87) 国際公開日	平成17年3月17日(2005.3.17)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/501,665		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成15年9月9日(2003.9.9)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ルー, シャオビン
			アメリカ合衆国 メリーランド 2087
			4, ジャーマンタウン, コーチマンズ
			コート 7
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトにおいてH I Vに対する免疫応答を生成するための、レンチウイルスベクターベースのアプローチ

# (57) 【要約】

本発明は、レンチウイルスベースのベクターの技術を用いて、ヒトにおける免疫応答の生成のための複数の新規なアプローチに関する。本発明は、弱毒生ワクチン(L A)の効力を、数種のL Aワクチンに関してあり得るような疾患のリスクに対して患者を曝すことなく模倣する能力を提供する。本発明は、従って、相補的な条件に複製するベクター、複製欠損型ウイルス様粒子を生成するベクター、ならびにウイルスもしくは微生物病原体を標的化する複数抗原構築物の系を提供する。本発明の実施においてこれらの材料を使用することによって、これらにより提示される抗原に対する、強固な細胞性応答および体液性応答の生成が可能になる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体における免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、  
条件的に複製する 2 種以上のレンチウイルスベクターの系を該被験体の細胞へと投与する工程  
を包含し、

該 2 種以上のベクターの各々は、該系におけるもう一方のベクターの存在下でのみ複製し、該系のベクターは、1 種以上の抗原を発現し、該 1 種以上の抗原に対する免疫応答が該被験体中において望まれる、方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記ベクターのうちの少なくとも一つは、前記系における 1 種以上の他のベクターに対する遺伝的な抗ウイルス因子を含む、方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、前記系は、2 種のレンチウイルスベクターを含む、方法。

## 【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法であって、前記ベクターの 1 種のみが、env コード配列を含む、方法。

## 【請求項 5】

請求項 1～請求項 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記投与する工程が、エキソビポで行われる、方法。

## 【請求項 6】

請求項 1～請求項 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記免疫応答は、性質が細胞性であり、そして CTL および / または CD4 + 細胞の増強を含む、方法。

## 【請求項 7】

請求項 5 に記載の方法であって、前記免疫応答は、性質が細胞性であり、そして CTL および / または CD4 + 細胞の増強を含む、方法。

## 【請求項 8】

請求項 1～請求項 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記免疫応答は、前記ベクターにより発現される 1 種以上の抗原を発現するウイルスまたは微生物に対して防御的である、方法。

## 【請求項 9】

請求項 5 に記載の方法であって、前記免疫応答は、前記ベクターにより発現される 1 種以上の抗原を発現するウイルスまたは微生物に対して防御的である、方法。

## 【請求項 10】

請求項 1～請求項 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、1 種以上の HIV 抗原である、方法。

## 【請求項 11】

請求項 5 に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、1 種以上の HIV 抗原である、方法。

## 【請求項 12】

被験体において免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、  
2 種以上のレンチウイルスベクターの系を、該被験体の細胞へと投与する工程  
を包含し、該系のベクターは、ウイルス様粒子を形成するのに必要とされるタンパク質を発現し、該ベクターのうちの少なくとも 1 種は、該粒子へとパッケージされ得ない、方法。

## 【請求項 13】

複製欠損型レンチウイルスベクターであって、該複製欠損型レンチウイルスベクターは、セントラルポリプリン配列と、ベクターによりコードされるウイルスタンパク質の発現を指向し得る異種プロモーターとのすべてまたは一部に欠損を含む、複製欠損型レンチウ

10

20

30

40

50

イルスベクター。

【請求項 14】

被験体における免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、  
請求項 13 に記載の複製欠損型レンチウイルスベクターを、該被験体の細胞へと投与する工程  
を包含し、

該ベクターは、ウイルス様粒子を形成するのに必要とされるタンパク質を発現する、方法。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 請求項 4、請求項 12、および請求項 14 のうちのいずれか 1 項に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、複数のウイルスエピトープの発現をもたらす複数抗原コード構築物によって単一のポリペプチドとして発現される、方法。 10

【請求項 16】

請求項 5 に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、複数のウイルスエピトープの発現をもたらす複数抗原コード構築物によって単一のポリペプチドとして発現される、方法。

【請求項 17】

請求項 6 に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、複数のウイルスエピトープの発現をもたらす複数抗原コード構築物によって単一のポリペプチドとして発現される、方法。 20

【請求項 18】

請求項 7 に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、複数のウイルスエピトープの発現をもたらす複数抗原コード構築物によって単一のポリペプチドとして発現される、方法。

【請求項 19】

請求項 8 に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、複数のウイルスエピトープの発現をもたらす複数抗原コード構築物によって単一のポリペプチドとして発現される、方法。

【請求項 20】

請求項 9 に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、複数のウイルスエピトープの発現をもたらす複数抗原コード構築物によって単一のポリペプチドとして発現される、方法。 30

【請求項 21】

請求項 10 に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、複数のウイルスエピトープの発現をもたらす複数抗原コード構築物によって単一のポリペプチドとして発現される、方法。

【請求項 22】

請求項 11 に記載の方法であって、前記 1 種以上の抗原は、複数のウイルスエピトープの発現をもたらす複数抗原コード構築物によって単一のポリペプチドとして発現される、方法。 40

【請求項 23】

請求項 1 ～ 請求項 4、請求項 12、および請求項 14 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含む、方法。

【請求項 24】

請求項 5 に記載の方法であって、該ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含む、方法。

【請求項 25】

請求項 6 に記載の方法であって、該ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含む、方法。

【請求項 26】

請求項 7 に記載の方法であって、該ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含む、方法。

【請求項 2 7】

請求項 8 に記載の方法であって、該ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含む、方法。

【請求項 2 8】

請求項 9 に記載の方法であって、該ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含む、方法。

【請求項 2 9】

請求項 10 に記載の方法であって、該ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含む、方法。 10

【請求項 3 0】

請求項 11 に記載の方法であって、該ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含む、方法。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 請求項 4、請求項 12、および請求項 14 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記ベクターは、非レンチウイルス抗原をコードする配列を含み、該非レンチウイルス抗原は、レトロウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスからなる群より選択されるウイルス由来の抗原である、方法。 20

【請求項 3 2】

請求項 24 に記載の方法であって、前記非レンチウイルス抗原は、レトロウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、方法。

【請求項 3 3】

請求項 25 に記載の方法であって、前記非レンチウイルス抗原は、レトロウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、方法。

【請求項 3 4】

請求項 26 に記載の方法であって、前記非レンチウイルス抗原は、レトロウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、方法。 30

【請求項 3 5】

請求項 27 に記載の方法であって、前記非レンチウイルス抗原は、レトロウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、方法。

【請求項 3 6】

請求項 28 に記載の方法であって、前記非レンチウイルス抗原は、レトロウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、方法。 40

【請求項 3 7】

請求項 29 に記載の方法であって、前記非レンチウイルス抗原は、レトロウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、方法。

【請求項 3 8】

請求項 30 に記載の方法であって、前記非レンチウイルス抗原は、レトロウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

## 【0001】

## (技術分野)

本発明は、レンチウイルスベースのベクターの技術を用いる、ヒトにおける免疫応答の生成のための複数の新規なアプローチに関する。本発明は、例えば、以前に弱毒化生ワクチン(LA) HIVワクチンに関して実証されたように、患者を疾患のリスクに曝すことなく、LAの効力を模倣する能力を提供する。さらに、本発明は、ウイルス(例えば、HIV)の極度の変化可能な性質に起因して以前のワクチンの失敗をもたらしたウイルスエスケープ(virus escape)を防止する。エスケープに対する制御が、複数の抗原(好ましくは、インビボでの上記抗原の野生型出現例に見出されるかまたはそれに類似する複数の抗原)を提示するための、レンチウイルスベクターベースの技術の使用を介して提供される。複数の抗原の提示により、多様化した免疫応答の生成が提供される。上記レンチウイルスベースのベクターとしては、条件的に複製するベクター、および非感染性ベクター様粒子(VLP)を生成するベクターが挙げられる。本発明は、HIVに関して例示されるが、その戦略は、他のウイルスまたは微生物(細菌を含む)に対する免疫応答の生成に対して容易に適用され得る。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

## (背景技術)

HIVは、世界中で4200万人に感染している。米国(U.S.)では、980,000人を超える人々がHIVに感染していると推定されている。HIV/AIDSによる死亡数は、世界中で年間約300万人であると推定されており、そして米国では、15,000人を超えると推定されている(非特許文献1;非特許文献2)。HIVに対する処置の選択肢は存在するが、これらは、高価であり、そして以下に示すように、患者の生活の質に対して著しく負の影響力を有する。従って、成功するHIVワクチンについての重大な必要性が存在する。

20

## 【0003】

HIV/AIDSの処置についての現在の標準法は、強力な抗レトロウイルス療法(HAART)である。この療法は、代表的には、ヌクレオシドリバーストランスクリプターゼインヒビター(NRTI)、非ヌクレオシドリバーストランスクリプターゼインヒビター(NNRTI)およびプロテアーゼインヒビター(PI)の3種類の「カクテル」からなる。これらのカクテルは、ウイルス負荷を減少して免疫機能を回復するのに成功しているが、これらは、治癒を示さず、そしてHAARTの長期間の使用に関連する有害な作用に関する懸念がある。具体的には、種々の代謝障害(HIV関連リポジストロフィ、腹部の肥満症(central adiposity)、異脂肪血症、高脂血症、高血糖症、およびインスリン抵抗性が挙げられる)は、HAARTに起因するものとして報告されている(非特許文献3;非特許文献4;非特許文献5)。これらの反応は、複雑かつ扱いにくい投薬レジメンと組み合わされ、治療に対する患者-被験体の指示遵守度に対して有害な影響を有し得る(非特許文献6;非特許文献7)。さらに、指示遵守が乏しければ、HIV耐性の速度が増大し、薬物に対する感受性が減少したウイルス株が生じる(非特許文献8;非特許文献9)。実際、米国において新規に感染したHIV感染個体のうちの18.5%もの多くが、抗レトロウイルス薬物併用療法に対して失敗したかまたは耐性である(非特許文献10)。これらの患者には、処置選択肢がなく、そして予後が非常に悪い。この数は、増加すると予測されている。なぜなら、1995年~2000年の間に薬物耐性の著しい増大が実証され、そして薬物耐性が増大し続けるであろうという合理的な予測があるからである。さらに、これらの数は、副作用が原因で薬物療法に不寛容である個体を含まない(非特許文献11)。

30

40

## 【0004】

歴史的には、ワクチンは、強度の抗ウイルス中和抗体応答を惹起することにより、ウイルス感染からの防御を提供する。中和抗体は、そのウイルス表面上のタンパク質を認識し、そして健常細胞への結合および感染を防止する。しかし、このアプローチは、HIVサ

50

ブタイプの広範な範囲と、十分には多様性でない免疫応答からHIVが免れることを可能にする迅速な変異速度とが原因で、HIVに対しては有効ではない。中和抗体を惹起するように設計された最も成功したワクチンは、2種の異なるHIV株に由来する組換えエンペロブタンパク質からなる、2価ワクチンである。VaxGenは、これらの2価ワクチンに関する分野をリードする。しかし、いくつかの防御的免疫が惹起されるけれども、これらのワクチンに対する免疫応答は、乏しいままである。明白ではないが、このワクチンの乏しい防御に関する理由は、このワクチンが生成する体液性免疫応答（抗体ベースの免疫応答）に加えて、強固で多様な細胞性免疫応答をこのワクチンが刺激しないことであると、考えられている。研究者らはまた、細胞性免疫応答に基づくHIVワクチンを開発している。細胞性免疫は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、すなわちCD8+Tリンパ球（これは、ウイルスに感染した細胞を殺す）と呼ばれる、ある型の白血球に基づく。このアプローチは、体内でのウイルスの増幅を防止し、その結果、疾患は発症せず、そしてこのウイルスは、別の個体へと伝播され得ない。

10

#### 【0005】

いくつかのグループが、細胞性免疫に基づくワクチンを試験した。主に、これらの研究は、HIVタンパク質をペイロード（payload）として運搬する、疾患を生ぜしめない組換えキャリアウイルスを使用した。このワクチンは、組換えキャリアウイルスが体の中へ送達された場合に、保有されるHIVタンパク質ペイロードを生成して免疫応答を惹起するが、組換えキャリアウイルス自身は複製しないように、設計される。しかし、このアプローチに関しては、いくつかの問題があった。キャリアウイルスを使用する場合、その免疫応答は、HIVペイロードに加えてこのキャリアウイルスと反応する。これによって、この応答は2つに分岐し、それによって抗HIV免疫応答の影響力を減少する。さらに、通常は一種のみのHIVタンパク質が、このキャリアウイルスゲノムの大きさの制限原因で、一度に発現され得る。これによって、HIVがゲノムのその単一の領域において変異を蓄積して、ウイルスの適性に対する著しいコストを伴わずに、その免疫応答から免れることが、より容易になる。Merck Research Laboratoriesにより試験され、そして科学雑誌のNature（2002年1月）に公表された最新のワクチンは、そのワクチン戦略としてこのアプローチを用いた。Merckは、サルにおいてSIVタンパク質gagを発現する複製不能なアデノウイルスワクチンベクターを用いた。しかし、同じ号の雑誌において報告されているように、免疫が、単一のHIVタンパク質に対して発生するだけであるという事実におそらく起因して、ウイルスは、最終的に変異し、そしてワクチン誘導型抗-HIV免疫応答を免れる。CTL応答は、より広い範囲のHIV株に対して防御し得るが、この応答の性質は、この応答が、標的HIVタンパク質のほんのわずかな領域に対してのみ発生する傾向があるということである。これによって、耐性が起こりやすくなる。なぜなら、HIVにおける回避的な変異は、ウイルス構造を著しく変化させることなく生じ得るからである。これは、一種のHIVタンパク質のみがワクチン接種において使用される場合に、特に当てはまる。

20

30

#### 【0006】

代替的なワクチンアプローチは、HIVの弱毒化生（LA）ワクチン、または、強度の減少したHIVワクチンを使用することである。これは、現在使用されている多くのワクチン（例えば、ポリオワクチン）に関して使用されるアプローチである。LAワクチンは、ヒトにおいて疾患を引き起こさないが、LAワクチンは、複製し得、そして広範な包括的な免疫応答を惹起し得る。この免疫応答は、感染の間に生じたHIVタンパク質に対する、細胞性免疫および中和抗体応答の両方からなる。多様な免疫応答がHIVに対してマウントされることは特に重要である。感染の間のこのウイルスの大きな変異速度によって、このウイルスが免疫系にとってどのように見えるかが変化するので、。LAワクチンは、これらの多様な可変物を免疫系に提示し、これにより、この問題を回避する。しかし、HIVの類似の動物モデル、サル免疫欠損ウイルス（SIV）の感染は、LA SIVワクチンが、若年のサルおよび新生児のサルにおいて、疾患を引き起こし得ることを示した。若年のサルは、これらの動物において病原性になる弱毒化ウイルス（非特許文献12）

40

50

を促進する可能性のある未熟な免疫応答を有する。興味深いことに、このワクチンにおける突破ウイルスは、ウイルス復帰変異体から生じるのではなく、むしろ、インビボでより迅速に複製し、さらに欠失したウイルスから生じる。LA SIVワクチンをサルに用いた研究に見られるように、LAアプローチにより、コンプロマイズド・免疫応答 (compromised immune response) を有するヒトおよび特に未熟な免疫系を有する小児において、LA HIVワクチンで免疫することがまた、疾患を生じ得るので、このデータは、ヒトにおけるLA HIVワクチンでの免疫が、ヒトにおける使用に適切ではないことを示す。

#### 【0007】

おそらく、より重要なことには、弱毒化HIVワクチンの使用のリスクは、感染した個体からの血液注入により、HIVの弱毒化株 ( - Nef ) に不注意に感染した一群の人々のグループにより表される ( 非特許文献 13 ; 非特許文献 14 )。若年性のサルにおけるLA SIVの結果に類似して見える結果では、 - Nefウイルスで感染したものの半分は、後にCD4 + Tリンパ球の減少を経験し、このCD4 + Tリンパ球の減少がAIDSの進行の主要な指標である。これらの個体により示されるLA - HIVワクチンの不幸な現実、ほとんどのLA - ワクチンとは異なり、LA - HIVは、迅速にこの宿主中で潜伏を達成するか、または宿主中のCD4 + Tリンパ球のレザバーへの感染を達成し、次いで、将来の任意の時期に疾患を引き起こし得る。

#### 【0008】

成功したHIV / AIDSワクチンを生成する困難な点が、免疫系の慢性的な過剰活性化につながる強度の抗 - HIV応答を患者が実際に生み出すという事実により過小評価される。しかし、HIVのコントロールにつながる代わりに、免疫の活性化は、サイトカインの調節不全をもたらし、そしてHIVが、最終的に後期にリンパ節および胸腺の破壊につながる感染の初期段階の間にリンパ系組織中で高レベルで複製するのを可能にする。皮肉なことに、CD4 + Tリンパ球の活性化 ( 適応免疫の発達の中心となる ) は、感染細胞における単にHIVの産生を増強し、その一方で、健康で活性化した細胞は、ウイルスの伝播のためのさらなる燃料 ( fuel ) を提供する。

#### 【0009】

インビボでのHIVの制御およびAIDSの長期の非進行剤 ( LTNP ) は、CD8 + Tリンパ球細胞傷害性応答に関連しているが、抗体応答には関連していない ( 非特許文献 15 )。リンパ球が、HIV媒介性の死、HIV関連のアポトーシス、またはCTL - 媒介性のHIV感染CD4 + Tリンパ球の殺傷により殺傷されるので、この応答の弱化は、リンパ球としてのCD4 + Tリンパ球の支援の損失の結果であると考えられる。HIV患者のLTNPの存在は、宿主およびウイルス因子が、HIV / AIDSの病因に影響することを示す。特に、ケモカインレセプターCCR5の欠損するヒトは、HIVに感染しない。より早期に議論した、天然に獲得した弱毒化HIVウイルスゲノム ( nef欠失 ) に感染した患者は、AIDSの進行の遅延を示した。

#### 【0010】

この点では、最終的に不十分ではあるが、免疫は、HIVの複製およびAIDSの進行に影響する。なぜなら、それぞれDNAおよび抗原発現ベクターを用いた弱毒化ウイルス、不完全なウイルス粒子、またはプライム / ブースト戦略に基づくワクチンは、短期間、疾患の進行を遅延させ得、そしてウイルスの複製を含み得る ( 非特許文献 16 ; 非特許文献 13、非特許文献 12 )。African GreenモンキーおよびSooty Mangabeyモンキーは、SIVに感染した後も、AIDSを発達させないし、リンパ節の破壊も胸腺の破壊も示さず、従って、ウイルスと宿主とのバランスが可能であることを示唆する。

#### 【0011】

今日まで、HIV感染速度を防止するか、またはAIDSの発症を遅延させることに成功したワクチンは存在していない。従来 of ワクチン戦略 ( これは、他のウイルス、細菌、および癌に対してさえ、功を奏した ) は、HIVに対しては適用可能ではない。これは、

H I V の、他のレトロウイルスとの比較においてさえ異常に高い変異速度の結果であり、これは、ウイルスそれ自体と同程度に破壊的であり得る神風様の免疫系の性質を可能にする。理想的には、最良のワクチンアプローチは、デノボでH I V 感染を防止するものである。しかし、さらなるアプローチは、H I V 感染した個体および/またはナイーブな個体に使用され得るワクチンを開発し、インビボでウイルスの複製を抑制してそしてさらなる治療上の処置をせずにA I D S の発症を防止する防御的なレベルにまで免疫をブーストし、H I V を「無害」にすることである。この目的を達するため、ワクチン戦略において以前に使用されたものとは別個に、新規の戦略（免疫をブーストし、その一方でH I V の複製を抑制する）が採用され得る。

#### 【 0 0 1 2 】

新規の疾患は、少なくとも10年間ごとに断続的に出現している（例えば、1980年代はH I V、1990年代はE B O L A、そして2000年代はS A R S）。新規の疾患が出現するたびに、各疾患が、防御を達成するために種々の種類のワクチンを必要とするので、相当な量の研究資金が、この疾患の防御的なワクチンを開発するのにあてられる。これは、真実である。なぜなら、いくつかの疾患は液性の応答により制御され、いくつかの疾患は細胞応答により制御され、そしていくつかの疾患は、両方を必要とするからである。各新規の疾患に関し、弱毒化生ワクチンのリスク、および殺傷されたウイルスの効力または組換えタンパク質ワクチンの効力が評価されねばならない。しかし、多様な細胞性免疫および体液性免疫を惹起するワクチン接種のベクターベースのアプローチは、各々の出現の脅威の遺伝的構造に従って再遺伝子操作され得る、すべての疾患に対する単一のワクチンアプローチを可能にする。

#### 【 0 0 1 3 】

上記書類の引用は、前述のいずれもが適切な先行技術である承認として意図されるのではない。日付に関するすべての記載またはこれらの書類の中身に関する説明は、出願人に入手可能な情報に基づいており、これらの書類の日付または内容の正確さに関して承認を構成しない。

【非特許文献1】UNAIDS Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. AIDS epidemic updates. (2002)

【非特許文献2】Centers for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS surveillance report. 13 (2001)

【非特許文献3】Vigouroux, C.ら、Adverse metabolic disorders during highly active antiretroviral treatment (HAART) of HIV disease. 「Diab. Metab.」(1999)25, 385~392

【非特許文献4】Behrens G.M.N., Stoll M. および Schmidt R.E. Lipodystrophy syndrome in HIV infection. What is it, what causes it, and how can it be managed? 「Drug Saf.」(2000)23, 57~76

【非特許文献5】Powderly WG. Long-term exposure to lifelong therapies. 「J. Acq. Imm. Def. Synd.」(2002)29S, 28~40

【非特許文献6】Lucas G.M., Chaisson R.E., および Moore R.D. Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic: risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. 「Ann. Int. Med.」(1999)131, 81-87

【非特許文献7】Max B. および Sherer R. Management of

10

20

30

40

50

the adverse effects of antiretroviral therapy and medication adherence. 「Clin. Infect. Dis.」(2000)30S, 96-116

【非特許文献8】Nijuis M., Deeks S. および Boucher C. Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. 「Curr. Opin. Infect. Dis.」(2001)14, 23-28

【非特許文献9】Turner B. J. Adherence to antiretroviral therapy by human immunodeficiency virus-infected patients. 「J. Infect. Dis.」(1993)185S, 145-151 10

【非特許文献10】11th International Workshop for HIV drug resistance(2002)Rapid Report

【非特許文献11】Little S. J. ら、Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. 「New Eng. J. Med.」(2002)347, 385-394.

【非特許文献12】Wyand S., Manson K., Montefiori D. C., Lifson J. D., Johnson, R. P, および Desrosiers R. C. Protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus against heterologous challenge. 「J. Virol.」(1999)73, 8356-8363. 20

【非特許文献13】Deacon N. J. ら、Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. 「Science.」(1995)270, 988-991

【非特許文献14】Learmont J. C. ら、Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. 「N. Engl. J. Med.」(1999)340, 1715-1722. 30

【非特許文献15】Gea-Banacloche, J. C. ら、Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. 「J. Immunol.」(2000)165, 1082-1092.

【非特許文献16】Amara R. R. ら、Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. 「Science.」(2001)292, 69-74. 40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0014】

(発明の開示)

本願は、レンチウイルスベースのベクターの技術を用いた、ヒト中の免疫応答(好ましくは、ウイルス(例えば、HIV)に対する免疫応答)の生成のための、複数の新規のアプローチを提供する。前に弱毒性生(LA)ワクチンを用いて観察された場合とは異なり、処置した被験体を疾患のリスクに曝さずに、本発明は、LAワクチンの効力に擬似し得 50

るかまたはL A ワクチンの効力を再生産し得る、組成物または方法を提供する。さらに、本発明は、以前のワクチンの効果からのウイルスの回避をもたらす、高い変異速度という現象に焦点を当てる。

【0015】

従って、第一の局面では、本発明は、条件的に複製するウイルスをインビボでの抗原提示のために使用するレンチウイルスベクターベースの技術を与える。このベクターベースの技術は、複数の抗原の発現を可能にし、多様化した免疫応答の生成を可能にするが、この応答は、必ずしも本発明により提示されるすべての抗原またはエピトープに対する応答でなければならないことはない。必要とされるのは、本発明の使用により発現される一種以上の抗原に対する応答の生成のみである。好ましくは、この応答は、性質が細胞性および体液性であるが、いずれかの応答の出現が、本発明の実行において生じ得る。よりいっそう好ましいのは、抗原を提示する、抗原または病原体を用いた後のチャレンジに対して防御的である応答である。

10

【0016】

ベクターベースのアプローチは、いくつかの長所を提供する。これらとしては、複数の抗原の同時提示；異種のウイルスキャリアと免疫源との間の免疫応答の二分岐がまったくないこと（またはこの二分岐が減少すること）；条件的なベクター複製の背景で、野生型ウイルス複製を模すること；および抗原産生の期間の延長が挙げられる。従って、本発明は、複数（2種以上）の相補的であるが個々では複製欠損型のベクター、または条件的に複製するウイルスベクター（例えば、条件的に複製するHIVベクター（crHIV））の系の使用を提供する。この設計は、弱毒化生（LA）ウイルスよりも安全で、かつ、単一の複製欠損型ベクターよりもなお効力のあるワクチンベクター系を提供する。

20

【0017】

非限定的な例として、2種の相補的な、複製欠損型HIV-1ベクターは、一種以上のベクターを使用して本発明者らによりなされる知見に基づいて、両ベクターの細胞内の制限された複製および細胞内への詰め込みを提供し得、これらのベクターの一方が、別のベクターの複製を補完するVSV-Gエンベロープタンパク質を発現する。個々のcrHIVの複製は、常に最適以下（suboptimal）である。なぜなら、この系は、成育可能なウイルス粒子を生み出すために、必要な相補的ベクターを用いた全く同一の細胞の共感染（co-infection）を必要とするからである。細胞がこれらのベクターに感染する場合、複数のHIV抗原が生み出され、強度の体液性免疫応答および細胞性免疫応答を惹起し、これらの体液性免疫応答および細胞性免疫応答は、LAウイルスワクチンを用いたワクチン接種で見られる体液性免疫応答および細胞性免疫応答と類似する。各ベクター単独では、自身では複製し得ず、そして新規の細胞へ伝播し得ない。しかし、必要な相補的ベクターが同一の細胞に存在する場合、相補的ベクターの各々は、細胞が天然に存在するHIVに感染しているかのように、別のベクターの複製および詰め込みを支持する。子孫のワクチンベクターは、後に他の（隣接）細胞に感染し、従って、この免疫応答を伝播させる。これは、図1に図示される。

30

【0018】

これらの相補的なベクターによる複製の間、感染性ウイルス粒子を生み出すための、HIVの複製および詰め込みに必要なHIVタンパク質のすべてが発現され、（例えば、誤りがちの逆転写プロセスを介して）発現されたウイルス性抗原に変異が生じていくらかの多様性を提供する機会が生み出される。これは、結果的な免疫応答において上記ベクターに対する寛容を生み出し、従って、上記標的ウイルス因子または標的微生物因子に対する寛容を生み出し、その結果、標的ウイルスまたは微生物の回避に基づく変異は、上記ベクターの投与後（ワクチン接種後）に最小化される。ベクターの変異は、LAウイルス複製に見られる変異を模することが予想され、惹起された免疫応答によりベクター変異物が最終的に排除されるまで、上記ベクターが伝播する間の変異型改変体に対する多様な免疫応答を惹起する。従って、このベクターの、条件的な様式での複製能力および変異能力は、新規の抗原展示（antigenic display）を常に提供する「活性な」ワク

40

50

チンを提供し、病原体（例えば、H I V）に対して、試験されている現在の代替のないこれらのワクチンよりも十分に防御し得る強度で広範な免疫応答を惹起する。しかし、元になるベクターが、本質的に複製欠損にされ、その結果個々のコード領域のランダムな変異を超えるものが複製能力の再生のために必要であるので、改変体抗原のこの活発な産生は、ビルレンスの潜在能力を増強しないことに留意すべきである。

#### 【 0 0 1 9 】

ベクター間には、必要なウイルスタンパク質の分離に基づいて設計され得る相補的ベクターに複数の構造が存在する。理論上は、任意の必須ウイルスタンパク質が *t r a n s* で提供され得、そして複製のために、本発明の意図する（が限定しない）治療上のメカニズムの一部として必須ウイルスタンパク質を必要とするベクターにより利用され得る。相補的ベクター間での組み替えにより生成される、複製能を有するベクター（R C V）が存在しないことを確かめるために、分子デザイン（遺伝的抗ウイルス因子）が少なくとも一つのベクター内に、随意には、各ベクター中に含まれ得る。各ベクターにおけるこのような因子の例としては、もう一方のベクターへと指向される、標的化アンチセンス配列、リボザイム、および翻訳後の遺伝子サイレンシング（P T G S）が挙げられるがこれらに限定されない。P T G Sの例としては、以下に記載のように、小さな干渉RNA（*s i R N A*）およびRNA阻害（*R N A i*）が挙げられる。非限定的な例として、そして共感染した細胞中の相補的ベクターの十分な伝播を確実にするために、このような因子が、この細胞中で示差的に標的化され得る。例えば、一種のベクターは、核内で発現する因子を発現し得、その一方で、第二のベクターにより発現された因子は、細胞質へと往来する。独立した伝播を抑えることなく上記2種のベクター間の組換えを防止する別の非限定的なアプローチは、発現カセットを、二種の相補的ベクターの1種の中に逆方向に設置することである。組換えを通して、元の方に反転する可能性が極めて低いか、または恐らく不可能であるという理由で、組換えの可能性が回避され、標的化因子は必要とされ得ない。しかし、複製のために *c i s* の形態で必要とされるウイルス因子は、詰め込みおよび増殖されやすい、条件的に複製するベクターのすべてに存在する。

10

20

#### 【 0 0 2 0 】

条件的に複製するベクターは、任意の適切なエンベロープタンパク質（V S V - Gエンベロープタンパク質、天然のH I VエンベロープもしくはH T L Vエンベロープ、またはC D 4 + Tリンパ球および/もしくはマクロファージもしくは樹状細胞を標的化する任意の分子が挙げられるが、これらに限定されない）で偽型化され得る。偽型粒子は、ベクターすべての複製を補完するのに必要な、少なくとも1コピーの各ベクターを含有し得る。あるいは、この粒子は、ベクターすべての複製を補完する、少なくとも1コピーの各ベクターを含有し得ないが、代わりに、これらのベクターのすべてではないベクターを含有し得る。増殖し得る粒子の使用を介して細胞内へとさらに導入され得る必要なベクターのすべてを提供する粒子の組み合わせは、意図する細胞に感染し、必要な粒子の組み合わせを提供する。2種の相補的なベクターの場合の非限定的な例として、各々は、粒子へと別々に詰め込まれ得、次いで、この粒子は、この粒子に感染した細胞が増殖する条件下で、感染のために標的細胞と接触させられ、その結果、これらの細胞のいくつか、これらの細胞の多くまたはこれらの細胞のすべてが各ベクターの少なくとも1コピーに感染する。

30

40

#### 【 0 0 2 1 】

条件的に複製するベクターは、自家細胞移植を利用して、高濃度の標的細胞をエキソビボで形質転換するために使用され得る。あるいは、相補的ベクターは、インビボ（例えば、筋肉内に、皮下に、全身に、またはリンパ系への直接的なドレナージについて標的化された領域）で使用され得る。ブースターは、筋肉内に、または皮下に与えられる、1種以上の条件的に複製するベクターのDNAを用いる単一のDNAワクチン接種から構成され得る。他の遺伝的（ベクター）またはタンパク性のビヒクル（例えば、ワクチン）はまた、*t r a n s* の形態での相補的因子を提供するために使用され得る。非限定的な例として、2種のベクター系が使用される場合（第一のベクターが機能的T a tタンパク質を提供し、第二のベクターの複製を可能にする）、T a tタンパク質の送達、またはT a tタン

50

バク質を発現し得る他のベクターは、第二のベクターの複製を活性化するために使用され得る。

#### 【0022】

上記相補的ベクター系はまた、非感染性のウイルス様粒子 (VLP) を生み出すために修飾され得る。好ましくは、この VLP は、レンチウイルス様粒子であるが、粒子 (例えば、HIV-1 タンパク質 (HIV-2 または他の修飾された env タンパク質もしくは異種 env タンパク質の使用を除く) からなる粒子の場合) を構成するウイルスコンポーネントと細胞コンポーネントとのハイブリッドであってもよい。最も単純な修飾は、cis の形態に必要なウイルス因子を 1 種以上のベクターから省略することである。従って、この系のすべてのベクターを含む細胞がウイルス粒子を生み出すのに対し、少なくとも 1 種のベクターは、粒子へと詰め込まれ得ない。これは、VLP を産生する能力の、一つの細胞から別の細胞への伝播に対する制御を可能にする。

10

#### 【0023】

あるいは、トランスの形態で必要であるが感染の初期には、ウイルス粒子とともに存在する 1 種以上のウイルス因子のコード配列は、変異されるかまたは省略され得、その結果、1 回のみの複製および詰め込みが生じ得る。HIV の場合の非限定的な例としては、リバーストランスクリプターゼおよび / またはプロテアーゼの活性の発現を防止する pol 遺伝子の変異、または欠失が生じ得る。従って、このような変異または欠失を含むベクターは、インビトロでヘルパーベクター / 詰め込みベクターとともに詰め込まれ得、これらはトランスの形態でリバーストランスクリプターゼおよび / またはプロテアーゼの活性を提供し、これがまた、必要な相補的ベクターとの影響を受けやすい細胞への導入の後、結果的な粒子へと組み込まれ、1 回の複製および詰め込みを許可する。

20

#### 【0024】

第 2 の局面では、本発明は、2 種以上の相補的な、条件的に複製するベクターを使用せずに、非感染性ベクター様粒子 (VLP) の産生を与える。この局面では、レンチウイルスベクターベースの抗原の産生は、ウイルス因子または微生物因子 (例えば、HIV が挙げられるが、これに限定されない) に対する最大限の細胞性免疫および体液性免疫を同時刺激する。HIV の非限定的な例としては、このアプローチは、HIV 抗原スペクトルの提示を最大にするベクターの投与 (およびワクチン接種) による、HIV に対する強度でかつ防御的な免疫を生成し、このベクターの投与 (およびワクチン接種) が、HIV 抗原スペクトルの提示を最大化する。複製欠損型ウイルス様粒子 (RD-VLP) をコードする HIV ベースのベクターは、体液性免疫応答および細胞媒介性免疫応答の両方を生成するように設計される。この (ワクチン) ベクターは、HIV 抗原の全体 (またはほとんど全体) の提示ならびに抗体媒介性免疫応答および細胞媒介性免疫応答の両方を刺激する能力のために、「Toti-VacHIV」と見なされ得る。従って、このベクターにより提供される防御は、伝統的な単一の様式 (単一の抗原) のワクチンまたは限定数の抗原を提示するワクチンよりも包括的であると予想される。しかし、本発明は、HIV または任意の他の標的化ウイルスもしくは標的化微生物の、すべてには満たない可能な抗原および抗原性エピトープを提示する「ほぼ全体」のベクターの使用を企図する。

30

#### 【0025】

Toti-VacHIV は、エピトープが細胞によりインビボでプロセッシングされるように、各ウイルスタンパク質からのエピトープを発現する用に設計される。好ましくは、Toti-VacHIV は、レンチウイルスベースのベクターであり、このレンチウイルスベースのベクターは、5'LTR エlement および 3'LTR エlement の両方、ならびに宿主細胞または標的細胞への導入後に (HIV もしくは他のレンチウイルスベクターに対して) 異種の構成的に活性な、HIV コード遺伝子産物の発現を指令するプロモーターを含む。これは、リバーストランスクリプターゼ活性を介した、このベクターの DNA 形態への後の変換であり得る。構成的に活性なプロモーターの選択は、当業者により好まれるものならいづれのプロモーターでもよい (シミアンサイトメガロウイルス (S-CMV-P) に由来するプロモーターが挙げられるが、これに限定されない)。あるいは、異種

40

50

の誘導可能なプロモータは、構成的に活性なプロモーターの代わりに使用され得る。

【0026】

HIVおよび他のレンチウイルスおよびいくつかのレトロウイルスの場合、エピトープとしては、gag-pol領域、vif領域、vpr領域およびenv領域からのエピトープ（これらのエピトープは、スプライシングを受けていないメッセンジャーRNAまたは部分的にスプライシングを受けたメッセンジャーRNAに由来する）ならびにtat領域、rev領域、およびnef領域からのエピトープ（これらのエピトープは、複数スプライシングされたmRNA（multiply spliced mRNA）に由来する）が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターを含む細胞（例えば、ワクチン接種した抗原提示細胞）内でのこれらの抗原のde novoでの合成は、細胞媒介性免疫応答の生成のためにMHCクラスIの経路に指向される。VLPの産生のための、このベクターおよび上で議論された相補的なベクターの一つの有益な特徴は、このベクターが、細胞内のVLPの組み立てをもたらし能力が残ったままであるように、gag-pol構造遺伝子、およびenv構造遺伝子の機能的に重要な領域のいくつかを削除することにより、完全に不完全なVLPを作製する能力である。ベクターを含む細胞から放出されるVLPは、抗体応答を誘導し得る。VLPの利点は、生成された抗体のいくつかは、ウイルス粒子の表面に見出されそしてウイルス中和に影響するように、ウイルス構造エピトープに指向される（図2を参照のこと）。

【0027】

不完全なウイルス様粒子ベクター系を構築するために、かなり大きな変異がウイルス遺伝子およびウイルスエレメント（例えば、cis活性化エレメント）の重要な領域に導入され得る。ウイルス配列中の複数の欠失により、このベクターの複製可能なウイルスへの返転（reversion）の可能性が激的に減少する。非限定的な例として、このシス活性化詰め込みシグナル（ $\Psi$ ）、プライマー結合部位（PBS）、セントラルポリプリン配列（cPPT）、および/ならびにポリプリン配列（PPT）はすべて、ベクターから除去され、ベクターが詰め込まれ、そして/または逆転写されるのを防止する。さらに、リバーストランスクリプターゼ（RT）および/またはインテグラーゼ（IN）をpol領域中にコードする機能的領域、およびエンベロープ（env）構造遺伝子は、ベクターの複製欠損を全体的に確実にするために削除され得る。このプロセスにおいて、VLP組み立てのためのgag機能が保存され、上に記載されるような抗体応答の生成のための不完全な粒子の産生を確実にする（図3を参照のこと）。あるいは、これらの部分によりコードされるエピトープに対して指向される免疫応答が望ましい場合、RT、IN、および/またはenvコード配列の一部が保持される。好ましくは、このような部分は、RT、INまたはenvの、VLPを産生するのに必要な機能を超えた、通常の機能をコードしない。

【0028】

被験体または患者へのワクチンベクターの送達のための非限定的な方法としては、アジュバンドの存在下で裸のDNAを用いた、筋肉内ルート、皮下ルート、または全身ルート、続いて、培養物中で生成されたToti-VacHIV DNAおよびVLPを用いたブースター注射が挙げられるが、これらに限定されない（図4を参照のこと）。あるいは、このワクチンは、レンチウイルス詰め込み系中に詰め込まれたベクターを用いた、標的細胞（最も好ましくは、リンパ球）および/またはマクロファージもしくは樹状細胞（もしくは他の抗原提示細胞）のエキソピボ導入を介して与えられ、このレンチウイルス詰め込み系は、適切なエンベロープタンパク質（例えば、水疱性口内炎ウイルス（VSV）由来のGタンパク質が挙げられるが、これに限定されない）でこのベクターを偽型化する。後者の場合、HIV中のシス活性エレメント（例えば、 $\Psi$ エレメント、PBSエレメント、およびPPTエレメント）は、このベクター中で保持され得る。

【0029】

ウイルス遺伝子およびシス活性エレメントの必要不可欠な領域の大規模な欠失を考慮すれば、HIVの複製可能な形態へのベクターの返転の可能性は、合理的に、存在しないか

、またはほぼ存在しなくなる。従って、このワクチンアプローチは、L A H I V ウイルスの使用からの質的な改善を提供し、このL A H I V ウイルスは、サルおよびヒトにおいて病原性であることが示されている。

#### 【0030】

本発明の第三の局面において、複数抗原発現ベクターが提供される。抗原認識がヒトからヒトへと変化 (variation) することは、主として主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) のクラス I 分子およびクラス II 分子のペプチド結合部位に存在する遺伝子多形に由来し、提示された抗原に対する免疫応答の生成および進展をもたらすために、この主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) のクラス I 分子およびクラス II 分子は、外来抗原を、それぞれ T 細胞および B 細胞に提示するために機能する。MHC 分子のペプチド結合部位のコンフォメーションに依拠して、提示された特定のペプチドは異なる。従って、広範なヒトの人口を超えて適用可能なワクチンは、好ましくは、いくつかのペプチド抗原を使用し、処置される被験体のほとんどまたはすべての間での有効な刺激を確実にする。さらに、H I V 感染の場合、長期の非進行 (L T N P) が、代表的な H I V 患者よりも著しく多様な抗 - H I V C D 8 + T リンパ球応答を有し、従って、任意のワクチンアプローチにおいて、多様な免疫応答を H I V / A I D S に対して生成する重要性を強調する。

10

#### 【0031】

より発展した宿主の免疫系により認識されるエピトープ (例えば、哺乳動物または霊長類のエピトープ) は、応答 (respond) する細胞 (細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) )、ヘルパー C D 4 + T リンパ球 (C D 4) )、および B 細胞) に従い、3 つの主要なクラスへと分類され得る。B 細胞エピトープは、このエピトープが 3 次元のネイティブ構造として認識されるか、または変性した直鎖状単位として認識されるかに依存して、構造エピトープおよび直鎖状エピトープへとさらに分類される。多くの免疫優勢エピトープは、経験的に、関連する MHC 遺伝子と併せて定義され、そして本発明のベクターにより、複数抗原提示の一部として容易に発現され得る。

20

#### 【0032】

本発明は、本明細書中に開示される、異なる H L A 型を表すエピトープの広範囲のスペクトルを含む任意のベクターを与える。本発明はまた、MHC 制限の背景で、種々の疾患を引き起こす感染因子 (H I V - 1 および H I V - 2 が挙げられる) のエピトープを機能的に決定するために、使用され得る。現存する合成ペプチドに対するこのアプローチの利点は、ネイティブでかつ、人工的にというよりもむしろ自然にプロセッシングを受けたエピトープが選択されていることである。以前のペプチドワクチンの短所が、構造的エピトープ (タンパク質のフォルディングの一部として寄せ集められるアミノ酸残基により形成されるネイティブタンパク質の免疫学的決定基) を模した合成分子を生み出すことが困難であることに對し、本発明のベクターは、よりネイティブな背景で、タンパク質および抗原を生み出すように設計される。次いで、同定された抗原およびエピトープの複数のメンバーは、本発明のベクターにおける発現のために合わされ得る。

30

#### 【0033】

このような複数抗原ベクターは、C T L、C D 4 +、および / または B 細胞の刺激 (およびこれらによる認識) のための、多くの保存された優勢なエピトープ (1 種以上のポリペプチドとして結合されている) をコードする 1 種以上の配列を含む。好ましくは、エピトープの間に挿入されているのは、保存されたペプチド抗原プロセッシング配列である。このエピトープは、後に生じる免疫応答を免れ得るウイルス変異体の可能性を減少させるように設計された多価ワクチンの開発のための各ウイルスタンパク質を網羅するように設計される。別の言い方では、このエピトープは、好ましくは、多くのウイルス株またはすべてのウイルス株または他の病原体において保存されているエピトープである。種々のエピトープ (例えば、C T L 応答の増強、C D 4 + 応答の増強および / または B 細胞応答の増強、特に強度でかつ防御的な応答) の同定または決定が、当業者に公知の任意の方法による同定または決定であり得る。このようなエピトープ、またはその適切に代表的なメンバーは、好ましくは、本発明の実行において使用され、被験体中で、強力に防御的な、細胞

40

50

性免疫応答および体液性免疫応答を刺激する。

【0034】

上記の戦略は、別々に使用され得るか、またはお互いに組み合わせて、および/もしくは当業者に公知の他のワクチン戦略と一緒に、これらを必要とする被験体中への投与のために、使用され得る。このような被験体としては、ウイルス因子または微生物因子（例えば、HIV）にすでに感染している個体、およびこのような感染のために危険な状態の個体が挙げられる。投与は、当該分野で公知の方法（上記被験体の1以上の細胞を本発明の組成物と接触させる工程が挙げられるが、これに限定されない）による投与であり得る。この開示された戦略は、容易に再度遺伝子操作され、免疫応答を生成し得、そしてワクチンの、多くの他のウイルス感染もしくは細菌感染、または癌に対して、防御的な状態を生成し得る。本発明の実行についての好ましい被験体は、ヒトであるが、本発明は、他の生物、特に哺乳動物および霊長類における使用のために適用され得る。

10

【0035】

従って、本発明は、組成物（例えば、上記の核酸構築物およびベクター、これらのウイルス粒子カプセル化形態、それらの使用のための処方物、および免疫応答を引き起こすための方法、ならびに、多くの他のウイルス感染もしくは細菌感染、または癌に対するワクチンの防御的な状態）を提供する。さらに、本発明は、本明細書中に開示される方法の実行のための、本発明の構成要素を含有するキットの形態で具体化され得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

20

（本発明を実行するための様式）

本発明は、レンチウイルス由来のベクターの使用に基づく。レンチウイルスベクターは、レンチウイルスからのLTRを最小限に含み、そして必要に応じて、レンチウイルスの5'リーダー配列およびgag-コード配列の詰め込み配列を含む。このベクターはまた、Rev依存的な様式で、ベクターRNAの核への輸送を促進するRREエレメントを必要に応じて含む。

【0037】

上および本明細書中に記載された本発明の各局面は、その使用により生成される免疫応答が、（1）天然に変異するHIVの間での多様性を模するウイルス抗原に対する多価応答、（2）免疫刺激の広範な寛容、（3）バランスのとれた体液性免疫応答および細胞性免疫応答、の生成により、入来病原体（例えば、HIVウイルス）の多様性を含む可能性を最小化するように設計されている。Toti Vac HIV系において、ウイルスタンパク質のネイティブなコンフォメーションが、成熟したウイルス粒子の背景で保存されているのは注目に値し、これは、中和抗体の産生に利点を提供し得る。

30

【0038】

最良の防御的な結果を媒介するために、まったく自然に、本発明のこれらの局面が含まれる。非限定的な例として、患者は、まず複数抗原ベクターで免疫され、次いで、相補的、条件的に複製するベクターの系で免疫され、この応答の多様化を促進し得る。あるいは、これらのワクチンアプローチは、当業者に公知の前もって試験したワクチン（例えば、LAワクチン、不活化ワクチン、または単一のタンパク質（もしくは他の組換え）ワクチン）と合わせられ得る。具体的には、そして非限定的な例として、患者は、まずToti-Vac HIVで免疫され、免疫を感作し、その結果、後に患者は、強力な多様な免疫応答の発展のために、疾患なしで、弱毒化HIVでワクチン接種され得る。

40

【0039】

相補的な、条件的に複製するベクターの系に関して、図1は、2種の相補的な、条件的に複製するベクター、VRX-V2AおよびVRX-V2Bが、誘導と同時に、T細胞または樹状細胞の刺激により、免疫応答を生成するために使用される、本発明の実施形態を例示する。図1に示されるように、各ベクター単独では、増殖し得ない（一方のベクターは、transの形態で必要とされる構造タンパク質をコードする一方で、もう一方は、transの形態で必要とされる非構造的タンパク質をコードする）が、Tリンパ球の共

50

感染の間、両ベクターは、お互いの複製を支援する。

【0040】

ワクチンベクターで感受性の高い哺乳動物細胞を感染させることで、HIVタンパク質の発現および後の免疫の刺激が生じる。細胞内のただ1種のベクターによる感染の間、このベクターによりコードされるHIVタンパク質は、さらに発現されるが、生み出されたベクターの子孫は存在しない。ベクターを細胞内へと導入する方法は、当該分野で公知であり、そして本発明の実行において使用され得る。非限定的な例として、この方法は、2000年8月31日に出願された、認可済の米国特許出願09/653,088に開示される方法を包含し、これは、完全に記載されるように、本明細書中で参考として援用されている。

10

【0041】

2種のベクターが、一緒に詰め込まれる場合、アンチセンス遺伝エレメントの、各ベクター中のその存在は、組換えを抑制および/または防止し、複製能力あるHIVベクターを形成する。アンチセンスベースの遺伝エレメントに加えて、本発明は、翻訳後の遺伝子サイレンシング(PTGS)のための、リボザイムまたはポリヌクレオチドを生成する配列で実行され得る。遺伝子発現およびウイルス複製を阻害するためのリボザイムの使用が、他の目的で条件的に複製するベクターの使用を介して、米国特許第6,410,257号に開示される。PTGSは、相同な二本鎖RNA(dsRNA)の存在により媒介され、これが、標的化RNAの迅速な崩壊を引き起こす。PTGSの一つの形態は、dsRNAの指向された導入により媒介されるRNA干渉(RNAi)である。別の形態は、細胞中でPTGSを誘導する二本鎖または一本鎖形態の約30ヌクレオチド未満の小さな干渉RNA(siRNA)の使用を介する。一本鎖siRNAは、RNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)の一部であると考えられ、この複合体を切断および分解のために相同mRNA標的にガイドする。siRNAは、標的mRNA転写物の遺伝子特異的分解の経路を誘導する。siRNAは、相補的なRNA鎖をコードする二重発現カセットの使用を介して発現され得るか、またはヘアピン分子として発現され得る。

20

【0042】

図1の工程3および工程4は、ワクチンベクターのさらなる段階の感染および伝播を例示する。ワクチンベクターのさらなる伝播は、免疫媒介性の排除が生じるまで続き、細胞性免疫応答および体液性免疫応答の両方により媒介される防御的免疫とつりあう。

30

【0043】

当然、本明細書中に開示される相補的ベクターが発現し、従って、非HIVタンパク質(例えば、他のウイルスまたは微生物に由来するタンパク質)に対する免疫応答を生成する。このような他のウイルスの非限定的な例としては、他のレンチウイルス(HIV-1、HIV-2、EIAV、VMV、CAEV、BIV、FIVおよびSIV)、レトロウイルス、およびエンベロープ糖タンパク質を有する他のウイルス(例えば、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、およびコロナウイルスが挙げられるが、これらに限定されない)が挙げられる。異種のエンベロープタンパク質が、ベクターによりコードされ、そして発現されるはずである場合、このベクターは、好ましくは、このベクターを偽型化し得るベクターである。偽型化のための適切なエンベロープタンパク質の非限定的な例として、HIV-1、HIV-2、またはMMLVエンベロープタンパク質；水泡性口内炎ウイルス(VSV)、モコラウイルス、もしくは狂犬病ウイルス由来のGタンパク質；GalV；アルファウイルスE1/2糖タンパク質；ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)由来のエンベロープタンパク質；RD114、ネコ内因性ウイルス由来のenvタンパク質；または他のレンチウイルスもしくはレトロウイルス由来の糖タンパク質(例えば、ウマの感染性貧血ウイルス(EIAV)由来のgp90もしくはウシ免疫欠損ウイルス(BIV)の表面糖タンパク質)が挙げられる。以下のウイルスファミリーに由来するエンベロープタンパク質をコードする配列もまた、使用され得る：ピコルナウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、ラブドウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、

40

50

アレナウイルス科、パルボウイルス科 (Paroviridae)、ポックスウイルス科、ヘパドナウイルス科、およびヘルペスウイルス。あるいは、1種より多くのエンベロプタンパク質の一部を含むハイブリッドエンベロプタンパク質が、本発明のベクターにより、コード化され、そして発現され得る。

#### 【0044】

ウイルスエンベロプタンパク質の発現についてのさらなる方法は、本発明に包含される。一つの意味で、これらの方法は、エンベロプタンパク質置換戦略とみなされ得、そしてウイルス間 (特に、HIV) でのenvタンパク質の変異性 (variability) のために、特に魅力的である。AIDS Research and Reference Reagent Program of the U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 6003 Executive Boulevard, Bethesda, Md. 20892) は、多くの改変体env遺伝子の配列を入手可能にしている。HIVまたはレンチウイルスベクターの系におけるenvコード配列の、別のHIV株または分離株からの改変体遺伝子との置換は、より十分に生じたベクターを調節し、免疫応答を生成する。さらに、これらは、レンチウイルス (例えば、HIV) に関して見られる固有の変異速度に基づく上記env配列中の変異のための異なる開始点を提供する。これらの代替的なベクターは、世界の特定の部分もしくは特定の集団に蔓延しているHIV株に対して、または特定のビルレント株に対して、ワクチン接種するために使用され得る。このベクターはまた、特定の感染患者の治療上の処置 (例えば、患者に感染した特定のHIV株の、患者からの単離および同定後の、特定のHIV株由来のenvタンパク質をコードする配列の封入による処置) のために調節され得、AIDSの兆候の発症を妨害する。これは、env配列をクローニングし、そして日常的な方法 (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の日常的な方法および他の組換えDNA技術) により、このenv配列をクローン化配列とベクター中で置き換えることにより、容易に達成される。別の実施形態では、異なる多様なEnvタンパク質をコードするベクターの組み合わせが、本発明の実行において使用され得る。改変envコード配列はまた、変異誘発により遺伝子操作され得、そして本発明の実行により使用され得る。

#### 【0045】

本発明の好ましい実施形態では、そして被験体中でのウイルス感染の処置または防止のために、このベクターは、標的ウイルス中に予想されるかまたは見出される天然のエンベロプタンパク質とともに使用され (そしてこれを発現する)。免疫応答が標的ウイルスのエンベロプタンパク質に対して生成されるのを可能にする工程に加え、このアプローチにより、ウイルスの蔓延を促進する異種のエンベロプタンパク質とともに標的化ウイルスが詰め込まれる可能性が低減するか、または最小化する。さらに、本発明のベクターは、標的化ウイルスのコピーとのベクターのウイルス粒子中への詰め込みを防止する抗ウイルス因子をコードし得るか、またはこれを含み得る。あるいは、本発明のベクターは、本発明のベクターと野生型ウイルスとの組換えの可能性を低減または最小化するエレメントおよび因子を含み得る。このような因子およびエレメントの非限定的な例は、米国特許第6,168,953号および2000年9月22日に出願された認可済の米国特許出願09/667,893に提供され、これらの両方は、十分に記載されるように、参考として本明細書中に援用される。

#### 【0046】

このベクターはまた、他のウイルスタンパク質 (他のレンチウイルスまたは他のレトロウイルス由来のカプシドタンパク質が挙げられるが、これに限定されない) をコードし得る。実際に、有用な免疫応答を生成し得る、ウイルスまたは微生物の事実上任意のタンパク質 (構造的なタンパク質、非構造的なタンパク質を問わない) は、ベクターの複製および/または遺伝子の発現を防止しない限り、ベクターおよび本発明の方法により発現され

得る。これらのタンパク質はまた、envコード配列について上に記載された置換技術に影響を受けやすい。さらに、当業者にとって明白なように、本発明のベクターは、本明細書中に開示されている他のレンチウイルスベクターのゲノムに基づき得る。他のレンチウイルスベクターの使用はまた、異種のタンパク質の発現がベクターの複製および/または遺伝子発現を妨害（別のレンチウイルスゲノムが使用されている場合にこの妨害が減少し得るかまたは存在し得ない）する場合に焦点を当てるために使用され得る。コロナウイルスタンパク質を発現する場合、本発明はまた、SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) を引き起こすウイルスに対して、免疫応答および/または防御的作用を提供するタンパク質の発現を与える。

#### 【0047】

一つの代表的な例として、HIVに基づくベクターは、gp160切断部位の変異とともに構築され、この変異は、gp120およびgp41へのgp160エンベロープ前駆体のプロセッシングをブロックする。これは、HIVベースの粒子の伝播の間のgp120抗原の「シェディング (shedding)」を減少し得る。gp160のgp41部分は、gp120抗原をよりしっかりと、gp160が挿入される膜に縛られ得る膜貫通ペプチドである。gp120部分の保持の増大は、本発明のベクターの免疫原性部分を改善し、そして膜内の「シェディング」の阻害または保持の増大は、免疫応答を生成するのに有用であり得る。別の代表的な実施形態として、このenvタンパク質は、キメラ糖タンパク質（例えば、HIV-1およびHIV-2の両方からのエレメントを有するキメラ糖タンパク質、または、HIV-1 env遺伝子内の種々の位置にて単離されたMNウイルスのV3ループに由来する部分 (USP 5, 866, 137号) を有するキメラ糖タンパク質）であり得る。

#### 【0048】

図2は、HIVウイルス様粒子 (VLP) を生み出す複製欠損型ベクターが、HIVタンパク質に対して細胞性応答および/または液性応答を誘導するために使用される本発明の実施形態を示す。このベクター（例えば、Toti-VacHIV）は、安定に宿主細胞のゲノムへと合体し、そして小胞体 (ER) 内で内的にプロセッシングされ、そして細胞 (CD8すなわち細胞傷害性) 免疫応答の刺激のためにMHCクラスI経路を介して発現される、HIV抗原を生み出す。さらに、タンパク質は、組み込まれたベクターにより生み出され、このベクターを伝播し得ないVLPの形成（例えば、「出芽」を介して）を可能にする。

#### 【0049】

しかし、VLPは、細胞（例えば、抗原提示細胞 (APC)）により占められ、そしてこの細胞（免疫応答の生成に寄与する細胞を含む）内の細胞プロセスにより加工される。これの非限定的な例が、図2に示され、APCは、MHCクラスII経路を介してVLPからの液性応答の刺激のための抗原を提示する。

#### 【0050】

図3は、本発明のToti-VacHIVベクターの可能な実施形態のすべての設計を示す。このベクターは、標的細胞へと（安定に）導入された後、いくつかのHIVエピトープを提示するように設計される（「E」と表記される）。エピトープは、HIVに由来するスプライス部位（スプライスドナー、すなわち「SD」およびスプライスアクセプター、すなわち「SA」部位）のすぐ近くで切り離される。この示された部位は、「SD1」、「SD2」、「SA1」、および「SA2」である。mRNAは、構成的に発現されるプロモーター、この場合、CMVプロモーターから転写される。他のプロモーターは、本発明の実行において使用され得る。非限定的な例としては、Tkプロモーター、EF-プロモーター、およびPGKプロモーターが挙げられる。

#### 【0051】

投与後のベクターの伝播を阻害または防止するために、RNA詰め込みのためのエレメント、核移入のためのエレメント（セントラルポリプリン配列すなわちcPPT）、および複製のためのエレメント（プライマー結合部位すなわちPBS）が除去される。しかし

10

20

30

40

50

、 1 ) このベクターの伝播を阻害または防止するために、他の欠失または変異 (例えば、トランス活性応答性 (TAR) 領域、gag カルボキシ末端 Cys His ボックス (すなわち、「ジンクナックル (zinc knuckle) 」) 領域、および nef 領域内のポリプリン配列) の欠失) が作製され得ること; 2 ) 3 種の例示的な変異が、単独で、対で、または他の欠失もしくは変異と組み合わせて使用され、ベクターの増殖を防止し得ること、が当業者には明白である。

#### 【0052】

このベクターの他の特徴としては、すべてのエピトープペプチドまたは抗原におけるかなり大きな欠失; HIV ウイルスゲノムのネイティブな立体配置に基づくエピトープまたは抗原の発現; gag-pol (GP) エピトープは、リバーstransクリプターゼ (RT) 活性およびインテグラーゼ (IN) 活性の両方が欠失しているが細胞から「出芽」し得る VLP を組み立て得る; vif-vpr 領域は、保存されたエピトープを保持する; tat 領域は、本質的ではあるが、免疫原性であることが公知ではない、トランス活性応答 (TAR) 領域を有する、相互作用のための R ドメインを含む; env 領域は、gp120 と gp41 との間に切断部位の欠失を含む; nef 領域は、RR (ダブルのアルギニン)、Myr (ミリスチル化部位)、NBP-1 (Nef 結合タンパク質-1) および -COP (コートマータンパク質) 結合部位に欠失を含む; そして Rev は、この実施形態における唯一の機能的ウイルスタンパク質である、が挙げられる。上記の変化の多くはまた、複製欠損型ベクターの複製に寄与することに注意されるべきである。他の好ましい実施形態は、tat 領域、vpr 領域および / または nef 領域の全体または一部に変更 (変異および / もしくは欠失) を有し、この変更は、Tat タンパク質、Vpr タンパク質および / または Nef タンパク質の機能を低減させるか、またはこれらの非存在をもたらす。本発明の実施において特に好ましいのは、cPPT および / または PPT の全体または一部に不活化欠失を含む実施形態である。本発明のこの局面のいくつかの実施形態は、PBS の欠損も RNA 詰め込み配列も含まない。

#### 【0053】

当然、本発明の複製欠損型ベクターは、他の配列変更ならびに他のタンパク質、抗原、およびエピトープを発現する能力を含み得る。例えば、他のウイルスまたは病原性微生物因子に由来のタンパク質は、これらをコードする配列により発現され、そして本発明のベクター中へと設置され得る。一つの非限定的な例では、これは、条件的に複製するベクターについて上に記載された置換戦略によるものであり得る。

#### 【0054】

図 3 に示される実施形態、および本開示に基づく他の類似のベクターとしては、5'LTR および / または 3'LTR が挙げられるが、必要に応じてこれらを省略し得る。それにもかかわらず、このようなベクターの各々は、多くのエピトープを同時に提示し得る、完全に複製欠損型のウイルスベクターである。図 2 に示される場合のように、エピトープ / 抗原は、MHC I (このベクターを含む細胞内の内因性エピトープの発現) を介して、そして MHC II (このベクターを含む細胞から放出された VLP を介して) を介して、提示され得る。このエピトープは、ネイティブな立体配置で、または天然の立体配置に緊密に類似した状態であることが予想される。

#### 【0055】

本発明の複製欠損型ベクターは、このベクターを用いてトランスフェクションした後、VLP 産生を支持し得る高感受性の細胞 (例えば、インビボまたはエキソビボ (特に、造血由来) での、HeLa、HeLa-tat、COS、293、CHO、BHK、CEM x 174、SupT1、Vero 細胞、3T3、D17、酵母、細菌、または霊長類細胞が挙げられるが、これらに限定されない) へと導入され得る。このベクターの導入は、任意の公知の手段によるものであり得、そして一時的または恒久的に VLP の発現をもたらす得る。この VLP は、非限定的な例としては、ペレット化、スクロース勾配精製、またはカラムクロマトグラフィにより、培養物上清から単離され得る。あるいは、このベクターは、エキソビボの条件下で被験体または患者の細胞へと導入され得、その後、この被験

体または患者へと戻され得る。この細胞は、戻される前にVLPを産生する能力について確かめられ得るか、または単に戻されて、インビボでVLPを産生し得る。しかし、このベクターが細胞中に存在する場合、たとえこのベクターが複製欠損型であっても、複製欠損型「プロウイルスの」形態とみなされ得る。使用され得る本発明の別の実施形態は、このベクターを含み、そしてVLPを発現する細胞（すなわち、「VLP産生者細胞」）では、被験体または患者へと導入され、VLPsをインビボで生成する。これは、細胞が必ずしも被験体由来のものまたは患者由来のものである必要はなく、この場合、これらの細胞に対する免疫応答が存在し得るという点でエキソビボのアプローチとは異なる。これは、異種移植片ではなく同種移植片を構成する細胞の使用により幾分軽減され得るが、免疫抑制的な因子の適切な使用は、これらが導入される被験体にとって異種の任意のVLP産生者細胞の使用とともに、必要とされ得る。

10

#### 【0056】

本発明の代替的な実施形態では、上記インビトロの方法またはインビボの方法により産生されるVLPは、治療として、被験体または患者へと導入され、これにより、インビボで存在するベクターの必要性を未然に防ぎ得る。処置されるべき被験体または患者に由来する細胞の使用は、結果として生じたVLPが最小限の排出物（issue of rejection）の状態で使用され得るという点で、特に有利である。この細胞は、エキソビボで培養物中で維持され、延長された期間、当該分野で公知の技術を介して、VLPを産生し得る。

#### 【0057】

20

図4は、本発明の複製欠損型ベクターの媒介する方法を用いたプロトコルの説明である。この実施形態は、Toti-Vac HIV DNAを用いた免疫に始まる。このDNAが、送達され、そして任意の適切な方法（DNAが細胞のゲノムへと安定に組み込まれ得る場合、またはエピソーム様に維持され得る場合が挙げられる）により、被験体の細胞に吸収され得る。細胞によるエピトープの発現は、MHC Iの背景と組み合わせることでエピトープの提示をもたらす、細胞ベースの免疫応答を生成する。この細胞はまた、VLP産生に必要なタンパク質を発現し得、続いて、VLPが組み立てられ、そしてVLP細胞外環境へと放出されるか、または細胞から細胞への直接的な媒介性移入を介してVLPが放出される。抗原提示細胞によるVLPの取り込みは、MHC IIの背景の中でのVLPの提示をもたらす、液性ベースの免疫応答を生成する。

30

#### 【0058】

十分な時間の後、被験体は、少なくとも一回、Toti-Vac HIV DNAとVLPとの組み合わせ（必要に応じて、上記DNAにより産生される）によりブーストされる。このブーストは、初期の細胞性免疫応答および体液性免疫応答の両方を増強する。細胞性応答または液性応答の誘導または存在は、CTL活性についてのクロム放出アッセイおよび中和抗体についてのアッセイ（当業者に公知であるようなアッセイ）に基づく任意の点でアッセイされ得る。

#### 【0059】

あるいは、図4に例示されていないが、被験体は、個々にブーストされ得るか、またはToti-Vac HIVと組み合わせることで、本明細書中で開示される別のベクターもしくは当業者に公知の別のワクチンと組み合わせることで、ブーストされ得る。

40

#### 【0060】

本明細書中に開示される任意のベクターは、代替的に使用され、複数の抗原構築物を発現し得、この複数の抗原構築物は、免疫応答の生成のための、特に興味深いエピトープとして同定されたエピトープを含む。この複数抗原構築物は、好ましくは、抗原またはエピトープを含み、この抗原またはエピトープは、好ましくは、優勢な抗原決定基を含み、この優勢な抗原決定基が、細胞性応答および免疫性応答の両方を誘導する。このような抗原およびエピトープは、本発明のベクターの使用により同定され得、本発明のベクターは、免疫応答の生成のために、種々の抗原およびエピトープを、単独でかまたは組み合わせることで、種々の型で、動物モデルにおいて提示することに対して適用され得る。強力な細胞性応

50

答および／または液性応答を惹起するこれらの決定基が、本発明のベクターを介した発現のための複数抗原構築物の調製において、選択され、そして使用され得る。

【0061】

宿主への導入の前に、本発明のベクターまたは構築物は、治療上および予防上の処置の方法における使用を促進するための、種々の組成物中へと処方され得る。特に、このベクターおよび構築物は、薬学的に受容可能な適切なキャリアまたは希釈剤との組み合わせにより、薬学的組成物へと作製され得、そして、ヒトへの適用または獣医学上の適用に対して適切であるように処方され得る。さらに、遅延型の放出すなわち予定時間を越えた放出のための処方もまた、提供される。

【0062】

従って、本発明の方法における使用のための組成物は、1種以上の上述のベクターまたは構築物（好ましくは、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせる）を含有し得る。薬学的に受容可能なキャリアは、当業者に周知であり、免疫応答の生成のための投与の適切な方法も同様に当業者に周知である。キャリアの選択は、部分的に、特定のベクターまたは構築物により、および組成物を投与するために使用される特定の方法により、決定される。当業者はまた、組成物を投与する工程の種々のルートが利用できること、および投与のための1種以上のルートが使用され得るが、特定のルートが別のルートよりも直接的でかつ効果的な反応を提供し得ることを認識する。従って、本発明の組成物の、広範な種々の適切な処方物が存在する。

【0063】

本発明のベクターまたは構築物からなる組成物は、単独でかまたは他の抗ウイルス化合物と組み合わせ、被験体への直接的な投与またはエキソピボでの被験体の細胞への投与にとって適切な処方物へと作製され得る。このような処方物としては、水性および非水性、等張（すなわち等浸透性）無菌注射溶液（これは、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬、およびこの処方物と意図されたレシピエントの血液とを等張にする溶質、ならびに、懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、保存薬を含有し得る、水性および非水性の無菌懸濁液を含有し得る）が挙げられる。この処方物は、単位投薬量封入容器または複数用量封入容器（例えば、アンプルおよびバイアル）にて進呈され得、そして無菌液体キャリア（例えば、水（例えば、使用の直前の、注射用水）の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で貯蔵され得る。突発的に注射可能な溶液および懸濁液は、本明細書中に記載されるような、無菌の散剤、顆粒剤、および錠剤より調製され得る。

【0064】

上記ベクターは、望ましい場合には、任意の適切な溶液中に貯蔵され得るか、緩衝液中に貯蔵され得るか、または凍結乾燥可能な形態で貯蔵され得る。好ましい貯蔵緩衝液は、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline；トレハロース水溶液（1 - 50％）と混合されたDulbecco's Phosphate Buffered Saline（1：1）、好ましくはトレハロース水溶液（10％）と混合されたDulbecco's Phosphate Buffered Saline（1：1）（その結果、最終濃度は、5％トレハロース）；グルコース水溶液（1 - 50％）と混合されたDulbecco's Phosphate Buffered Saline（1：1）、好ましくは、グルコース溶液（10％）と混合されたDulbecco's Phosphate Buffered Saline（1：1）（その結果、グルコース最終濃度は5％）；トレハロース水溶液（1 - 50％）と混合された20 mM HEPES - 緩衝化生理食塩水（1：1）、好ましくはトレハロース水溶液（10％）と混合された20 mM HEPES - 緩衝化生理食塩水（1：1）（その結果、最終トレハロース濃度は5％）；または；マンニトロール水溶液（1 - 50％）と混合された20 mM HEPES - 緩衝化生理食塩水（1：1）、好ましくはマンニトロール水溶液（5％）と混合された20 mM HEPES - 緩衝化生理食塩水（1：1）（その結果、最終トレハロース濃度は2.5％）である。

【0065】

経口投与に適切な処方物は、液体溶液（例えば、希釈剤（例えば、水、生理食塩水、フルーツジュース）に溶解した有効量の化合物）；カプセル剤、におい袋（s a c h e t）もしくは錠剤（各々が固形物または顆粒剤として規定量の活性成分を含有する）；ならびに水中油エマルジョンまたは油中水エマルジョンからなり得る。錠剤の形態は、一種以上のラクトース、マンニトール、コーンスターチ、ジャガイモスターチ、微結晶性セルロース、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム（c r o s c a r m e l l o s e s o d i u m）、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝化剤、湿潤剤、保存剤、矯味矯臭剤、ならびに薬理学的に適合性のキャリアの１種以上を含有し得る。

【 0 0 6 6 】

10

経口投与が適切な処方物は、風味の活性成分（通常は、スクロースおよびアカシアまたはトラガカント）を含有し得る口内錠の形態を包含し得る。不活性な基材（例えば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシア）を含有するトローチ剤（p a s t i l l e）；ならびに適切な液体キャリア中に活性成分を含有するうがい薬；ならびに、活性成分に加えて当該分野で公知であるようなキャリアを含有する、クリーム、エマルジョン、ゲルなどが挙げられ得る。

【 0 0 6 7 】

吸入を介した投与に対して適切なエアロゾル処方物がまた作製され得る。このエアロゾル処方物は、加圧された受容可能な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など）中に設置され得る。

20

【 0 0 6 8 】

局所的な適用に適した処方物は、クリーム、軟膏、ローション剤の形態であり得る。

【 0 0 6 9 】

動物（本発明の背景では、特にヒト）に投与された用量は、妥当な時間枠にわたって、感染した個体において（防御的）免疫応答を達成するのに十分であるべきである。使用される特定のベクターまたは構築物の潜在能力、疾患状態の重症度、ならびに感染した個体の体重および年齢により決定される。用量の大きさはまた、使用される特定のベクターの使用または構築物の使用に付随する、見出された任意の副作用の存在により決定される。可能な時にはいつでも、副作用を最小限に維持することが、常に望ましい。

【 0 0 7 0 】

30

上記投薬は、単位投薬形態であり得る。本明細書中で用いられる場合、用語「単位投薬形態」とは、ヒトおよび動物被験体にとっての単位投薬量として適切な、物理的に別々の単位をいい、各単位は、単独でかまたは他の抗ウイルス因子と組み合わせて、薬学的に受容可能な希釈剤、キャリア、またはビヒクルに関連して所望の効果を生み出すのに十分な量が計算された規定量のベクターまたは構築物を含有する。本発明の単位投薬形態についての仕様は、使用される特定の化合物または化合物、ならびに達成されるべき効果、ならびに宿主中の各化合物に関連する薬力学に依存する。投与される用量は、「有効量」または個々の患者において「有効レベル」を達成するのに必要な量であるべきである。

【 0 0 7 1 】

「有効レベル」は、投薬のための好ましい終末点として使用されるので、ファーマコキネティクス、薬物の分布、および代謝における個体差に依存して、実際の投薬量およびスケジュールが変動し得る。「有効レベル」は、例えば、本発明に従う１種以上のベクターまたは構築物の濃度に対応する、患者において所望される血液または組織レベルとして定義され得、これが、臨床的な効力に対して予測的なアッセイにおいて、所望のレベルの免疫応答または防御的ワクチン化状態を生み出す。本発明に従う使用についての「有効なレベル」はまた、本発明の組成物が、ジドブジンもしくは他の公知の抗ウイルス性化合物またはこれらの組み合わせと組み合わせて使用される場合に、変動し得る。

40

【 0 0 7 2 】

当業者は、個々の患者において所望の「有効レベル」を達成するために、使用されている組成物の正確な処方のための適切な投与用量、投与スケジュール、および投与方法を容

50

易に決定し得る。当業者はまた、適切な患者サンプル（例えば、血液および／または組織）のウイルス感染の、直接的なインジケータ（例えば、分析化学的分析）または間接的なインジケータ（例えば、ウイルス感染の代理のインジケータ（例えば、AIDSまたはAIDS様疾患の処置のための、p24またはリバーストランスクリプターゼ））により、本発明の薬剤の「有効レベル」の適切なインジケータを、容易に決定し、そして使用し得る。

#### 【0073】

さらに、AIDSまたはAIDS様疾患の処置のための、患者における有効レベルを決定する工程に関して、適切な動物モデルが利用可能であり、そしてHIVに対する種々の免疫源のインビボでの効力を評価するために広く実施されている。他のウイルスおよび感染性因子についての類似のモデルもまた、当業者に公知である。このモデルとしては、マウス、サル、およびネコが挙げられる。これらの動物のいくつかは、天然にはHIV疾患に感受性ではないが、ヒト抹消血単核細胞（PBMC）、リンパ節、胎児の肝臓／胸腺または他の組織が再形成したキメラマウスモデル（例えば、SCID、bg/nu/xid、NOD/SCID、SCID-hu、免疫応答性SCID-hu、骨髓剥離BALB/c）は、ベクターまたはHIVで感染され得、そしてHIVの病因および遺伝子治療のためのモデルとして使用される。同様に、シミアン免疫欠損ウイルス（SIV）／サルのモデルが、使用され得、同様にネコの免疫欠損ウイルス（FIV）／ネコのモデルが使用され得る。

10

#### 【0074】

さらに、特に、AIDSまたはAIDS様疾患の処置についての、患者における有効レベルを決定する工程に関して、適切な動物モデルが、利用可能であり、そして種々の免疫源のHIVに対するインビボでの効力を評価するために実行されている。他のウイルスまたは感染因子についての類似のモデルはまた、当業者に公知である。これらのモデルはまた、臨床試験のために、上記ベクター系の確証の目的で、ベクターの安全性を決定するために使用され得る。重要な適用は、生態分布研究のためのこれらの動物モデルの使用である。形質導入された細胞（好ましくは、ベクターを含むヒトの細胞であるが、これに限定されない）は、非ヒト動物モデルへと注入され、そしてこのベクターの分布の程度は、動物組織におけるベクター遺伝性物質の存在により決定される。ベクター遺伝的物質が動物組織に存在しないことは、そのベクターが自律的に複製せず、そして他の細胞へも伝播せず、従って、本発明に従って使用され得ることを意味する。他の細胞にベクターが存在することは、このベクターが、元の細胞を超えて伝播し得たことを示唆する。しかし、このベクターが自律的に複製する際には、このベクターは、安全性に関する他の基準（例えば、特定の組織における複製の欠如、または動物における複製レベルであるが、これらに限定されない）に従って評価され得る。このベクターの存在または非存在は、PCR、またはFACS分析（試験されるベクターがFACSにより可視化され得るマーカー遺伝子を発現する場合）により決定され得るが、このような検出方法に限定されない。

20

30

#### 【0075】

一般的に、投与されるベクターまたは構築物が体重の約 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $300\text{mg}/\text{kg}$ 、特に、体重の約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $200\text{mg}/\text{kg}$ である組織濃度を達成するのに十分なベクターの量が好まれる。用量の数は、送達の手段および投与される特定のベクターに依存して変動する。

40

#### 【0076】

いくつかのウイルス感染個体の処置において、「メガ・用量」レジメンを使用することが望ましくあり得、大用量のベクターが投与され、薬剤が作用するための時間が与えられ、次いで、適切な試薬が、活性因子を不活化するために、個体に投与される。本発明の方法においては、処置（すなわち、条件的に複製する構築物、または複製欠損型の構築物の投与）は、必然的に限定される。

#### 【0077】

薬学的組成物は、本発明に従うベクターまたは構築物と組み合わせた、他の製剤を含有

50

する、治療上 A I D S を処置するために使用される、医薬の形態であり得る。これらの他の製剤は、従来の様式（すなわち、疾患を処置するための薬剤として）で使用され得る。特に、アンチレトロウイルス因子（例えば、好ましくは、ジドブジン）が使用されることが企図される。以前に記載されたものに加えて使用され得るこれらのさらなる製剤のさらなる代表的な例としては、A I D S を処置するために使用され得る、抗ウイルス性化合物、イムノモジュレーター、免疫賦活薬、抗生物質、および他の薬剤ならびに処置レジメン（代替的な医薬として認識されるものを含む）が挙げられる。抗ウイルス性化合物としては、d d I、d d C、ガンシルクロビル（g a n c y l c l o v i r）、フッ化ジデオキシヌクレオチド、非ヌクレオシドアナログ化合物（例えば、ネピラピン（S h i h ら、P N A S , 8 8 , 9 8 7 8 ~ 9 8 8 2 ( 1 9 9 1 )）、T I B O 誘導体（例えば、R 8 2 9 1 3）（W h i t e ら、A n t i v i r a l R e s e a r c h , 1 6 , 2 5 7 ~ 2 6 6 ( 1 9 9 1 )）、B I - R J - 7 0（S h i h ら、A m . J . M e d . , 9 0（補遺 4 A）、8 S - 1 7 S（1 9 9 1））、および上に記載のように、当業者に公知の試薬およびレジメンが挙げられるが、これらに限定されない。イムノモジュレーターおよび免疫賦活薬としては、種々のインターロイキン、C D 4、サイトカイン、抗体調製、血液の輸血、細胞輸血（c e l l t r a n s f u s i o n）が挙げられるが、これらに限定されない。抗生物質としては、抗菌因子、抗細菌因子、および抗ニューモシスティスカリニ因子が挙げられる。

#### 【0078】

他の抗レトロウイルス因子、および特に、公知の R T インヒビター（例えば、d d C、ジドブリジン、d d I、d d A、または他の H I V タンパク質に対して作用する他の阻害剤（例えば、抗 T A T 因子）とのウイルス阻害化合物の投与は、一般的に、ウイルスのライフサイクルの複製段階のほとんどまたはすべてを阻害する。A I D S 患者または A R C 患者において使用される d d C およびジドブジンの投薬量が公開されている。d d C のウイルス増殖を抑制する範囲は、一般的には、0 . 0 5  $\mu$  M と 1 . 0  $\mu$  M との間である。約 0 . 0 0 5 m g / k g 体重 ~ 約 0 . 2 5 m g / k g 体重の範囲は、ほとんどの患者においてウイルス増殖を抑制する。経口投与のための用量範囲は、例えば、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、および 1 2 時間の間隔での 1 回以上の用量で与えられる場合、0 . 0 0 1 ~ 0 . 2 5 m g / k g より幾分広い。好ましくは、0 . 0 1 m g / k g 体重の d d C が 8 時間ごとに与えられる。併用療法において与えられた場合、もう一方の抗ウイルス化合物は、例えば、本発明に従うベクターと同時に与えられ得るか、または投薬量は所望のように変動（s t a g g e r）され得る。このベクターはまた、組成物中で合わされ得る。各用量は、組み合わせで使用される場合、いずれか単独で使用されるより少ない量であり得る。

#### 【0079】

また、本発明により提供されるのは、コンポーネント（例えば、本明細書中に開示される方法での実行中に使用するための本発明のベクター）を含むキットであり、このようなキットは、容器を含み得、各容器は、この方法で使用される種々の試薬（代表的には、濃縮された形態）を（例えば、必要な場合には緩衝液および試薬を含む）一種以上含む。本発明の方法におけるキットのコンポーネントを記載するラベルもしくはインジケーター、またはこれらを使用するための一連の取扱説明書はまた、代表的には、取扱説明書が包装挿入物および / またはキットもしくはその構成要素の詰め込みに関連する場所に含まれ得る。

#### 【0080】

本発明のベクターベースの戦略は、性質が理解しにくい特定の病原体（例えば、H I V）に対して、特に有益であり、そしてより効果的であることが予想される。しかし、本発明は、他の感染性疾患に対して、等しい有効性で容易に適用され得る。非限定的な例として、ヒトの集団に対する最近の S A R S の脅威を考慮し得る。一度 S A R S ウイルスが配列決定され、同定されれば、このウイルスの遺伝的エレメントは、容易に本発明のベクター（例えば、T o t i - V a c , 条件的に複製するベクター、複数抗原発現ベクター、ま

たはこれらの組み合わせ)中へと遺伝子操作され得る。本発明により提供される利点は、拡張的な研究も新興の各疾患についての開発も必要とせずに、新興の各疾患により提示される抗原に対して強度の細胞性応答および液性応答を確実に惹起し得るワクチンの産生である。

#### 【実施例】

##### 【0081】

以下の実施例は、当業者に完全な開示および本発明の製造方法および使用方法の記載を提供するために提案され、そして発明者らが本発明とみなすものの範囲を限定するものではなく、発明者らは、以下の実験が遂行されたすべての実験であり、遂行された実験はこれらだけであることを示すことを意図するものではない。使用された数(例えば、量、温度など)に関して、正確さを保証するための努力がなされているが、いくつかの実験上の誤差および偏差が考慮されるべきである。他に示されなければ、部分は、重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は、セルシウス温度であり、そして圧力は、大気圧またはその周辺である。

##### 【0082】

(実施例 細胞培養物におけるワクチンHIV - ベースのベクターの伝播)

条件的に複製するHIVベースのベクターが、培養物中でお互いに補完し、そして限定された期間に伝播する能力を調査した。第一のベクターは、複製に必要なすべてのタンパク質を含むHIV - ベースのベクターであるが、エンベロープタンパク質を欠損していた。第二のベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV - G)からのエンベロープタンパク質を発現した。プラスミドを用いて、1500mmのディッシュ上の $1.2 \times 10^6$ 個の細胞(293F細胞)を、それぞれ25 $\mu$ gおよび20 $\mu$ gでコトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、上清を収集し、アリコートし、そして使用するまで-80で貯蔵した。上清を、培地中で5倍、10倍、50倍、100倍、および1000倍に希釈し、そして6 - ウェルプレート中で $1 \times 10^6$  HeLa - tat細胞に添加した(これを対にした)。希釈を増加した場合の両ベクター構築物の用途を用いて、細胞におけるコインфекションが、図1に示されるように、他の細胞に感染し得る子孫ベクターの産生をもたらすことを示した。このような子孫ベクターは、インビボでの免疫応答を惹起するのに寄与した。

##### 【0083】

ウイルスの伝播を、ビリオン産生の測定として、細胞上清についてp24 ELISA (ABI Labs、Kensington MD)により測定した。ビリオン産生の用量依存的レベルを測定し、そして補完の最終的な減少が生じた(図5)。従って、予想通り、このベクターは、一定期間複製し、その後、2種のベクター構築物のうちの1種を含む細胞に関して、複製周期を終了した。これは、図1に示されており、そして利点が付加されるか、または、本発明に重要な安全特徴を提供する。

##### 【0084】

ベクターの伝播の終結は、生成される免疫応答のレベルに無関係に、このベクターが、複製を続けないことを示唆する。従って、このベクターは、防御的免疫応答(免疫)の生成または防御的免疫応答の未生成のいずれかの後、このベクターの蔓延は続かない。防御的免疫応答(すなわち、成功したワクチン接種)の生成は、公知のアッセイ(細胞性および抗体についてのインビトロのアッセイ、ならびに疾患の動物モデル(例えば、HIVに標的化した治療法に対するサル)が挙げられるが、これらに限定されない)により試験され得る。

##### 【0085】

ベクターの伝播の終結に続いて、そして当業者により必要であると思われるので、ベクターの増殖は、ベクターの組み合わせの反復しようにより再活性化され得る。あるいは、再活性化は、個々のベクターの使用によるものであり得る。必要に応じて、ビリオンの形態で、もともと使用されているベクターのどれか一種を含む細胞に重複感染する。非限定的な例として、そして第一のベクターがすべて必要な成分(第二のベクターにより提供さ

10

20

30

40

50

れるウイルスエンベロープタンパク質を除く)を有する場合、第二のベクターは、上記エンベロープタンパク質を発現し得、ウイルス粒子へと詰め込まれ、次いで、2種のベクターの伝播が停止している被験体の細胞へと導入され得る。第二のベクターを含むウイルス粒子による、第一のベクターのみを含む細胞の感染は、上記2種のベクターがさらに目ね気応答を誘導またはブーストする。当然、この再活性化は、上で議論され、そして観察されたのと類似の様式で伝播の程度を制限される。

#### 【0086】

本発明の別の実施形態では、そしてベクターエレメント(例えば、ビリオン粒子上に見出されるもの)に対して免疫応答が処置された被験体中で生成される状況に立ち向かうために、異なるビリオン粒子の使用が、使用され得る。従って、ベクターの伝播を再活性化するかまたは「ブースト」するために使用される、第二のベクターに関する上記非限定的な例は、第二のベクターが異なる抗原をあらわにするウイルス粒子へと詰め込まれるように修飾され得る。例えば、第二のベクターが、もともと、抗原A、抗原Bおよび抗原Cを再活性化のためにあらわにする粒子への詰め込みを介して使用される場合、同一のベクターが、抗原D、抗原E、抗原Fをあらわにする粒子へと詰め込まれ、被験体における免疫応答を回避し得る。

10

#### 【0087】

本明細書中に引用されるすべての参考文献(特許、特許出願、および刊行物)は、以前に具体的に援用されていようがされていなかろうが、本明細書中に参考としてその全体が援用される。

20

#### 【0088】

本発明を十分に記載したので、同一発明が、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、そして過度の実験なしに、等価のパラメーター、濃度、および条件の広汎な範囲で行われ得ることは、当業者により理解される。

#### 【0089】

本発明が特定の実施形態と組み合わせて記載される一方、さらなる改変がなされ得る。本願は、一般に、本発明(本発明に関する技術の範囲内の、公知または慣用的な業務の範囲内にある、本開示からのこのような逸脱、および本明細書中に記載される本質的な特徴に応用され得るような、本開示からのこのような逸脱を含む)の原理に従う、本発明の任意のバリエーション、使用、または順応を網羅することが意図される。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0090】

【図1】図1は、相補的、複製欠損型ベクターを使用する本発明の戦略の表示としての一つの実施形態の図を示す。工程1：T細胞へのベクターの静脈送達；細胞内での第一段階の感染。工程2：第一段階のベクターの産生；アンチセンス安全特徴により抑制される共詰め込み。工程3：T細胞内への第二段階の感染；共感染は、第二段階のベクターの産生をもたらす。工程4：免疫媒介性クリアランスまでの細胞内へのベクター感染の伝播。

【図2】図2は、ウイルス様粒子(VLP)を用いた本発明の戦略の戦略として、一つの実施形態の図を示す。

【図3】図3は、VLPを生み出すための複製欠損型HIVベクターのゲノムを包含する本発明の一つの実施形態を示す。特徴：復帰変異体を防止するために、すべてのエピトープは、かなり大きな欠失により不完全である。エピトープは、ウイルスゲノムにおけるもともとの配置から発現される。E<sub>g</sub>Pは、RTおよびINが欠損しているが、出芽可能なウイルス様粒子を組み立て得る。E<sub>vif</sub>-V<sub>pr</sub>は、保存的なエピトープを含む。E<sub>tat</sub>は、免疫原性でないTARに関して必要不可欠なR-ドメインを削除する。E<sub>env</sub>は、gp120とgp41との間のプロテアーゼ切断部位を削除する。E<sub>Nef</sub>は、RR、Myr、NBP-1、-COP結合部位に欠失を含む。Revは、この系における唯一の機能的なウイルスタンパク質である。欠失cis-活性座：-TAR、-、-PBS、-cPPT、-PPT。図3は、完全な複製欠損型ウイルスDNAベクターを記載し、これは、以下の特徴を有する：単一のベクターでの多くのエピトープの提示

40

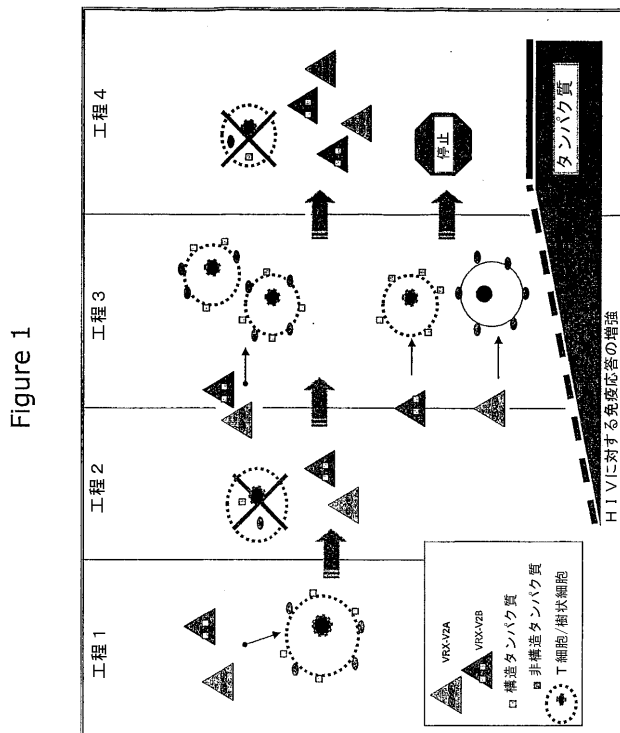
50

、ならびにMHC Iを介したCTLに対する抗原（内因性エピトープ発現）の提示、MHC IIを介した抗体に対する抗原（ワクチン化細胞より放出されるウイルス様粒子、エピトープは、ネイティブな高次構造であり得る）の提示。

【図4】図4は、免疫応答を生み出すための複製欠損型HIVベクターおよびVLPの使用を包含する、本発明の一つの実施形態を示す。

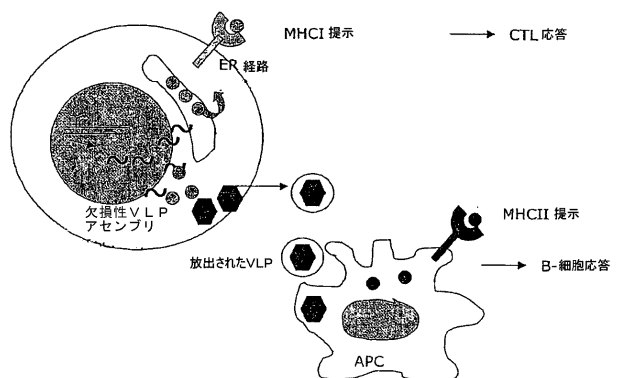
【図5】図5は、相補的な複製欠損型HIV-ベースのベクターの系の細胞培養物中での伝播を示す。

【図1】



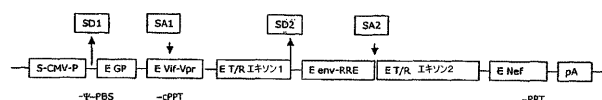
【図2】

Figure 2



【図3】

Figure 3





## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International Application No. <b>PCT/US2004/029492</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7    A61K48/00    A61K39/21		
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) IPC 7    A61K    C12N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
<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	WO 02/24897 A2 (VIRXSYS) 28 March 2002 (2002-03-28) page 16 - page 65	1-38
X	DEMAISON C ET AL: "High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 13, no. 7, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 803-813, XP002263326 ISSN: 1043-0342 figure 1  ----- -/-	13-15, 23,31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but 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 *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 February 2005		14/02/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Schulz, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2004/029492

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MANGEOT P-E ET AL: "DEVELOPMENT OF MINIMAL LENTIVIRUS VECTORS DERIVED FROM SIMIAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (SIVMAC251) AND THEIR USE FOR GENE TRANSFER INTO HUMAN DENDRITIC CELLS" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 18, September 2000 (2000-09), pages 8307-8315, XP000943677 ISSN: 0022-538X page 8307 - page 8314; figure 1	13-15, 23,31
A	BRENNER S ET AL: "Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 1640, no. 1, 7 April 2003 (2003-04-07), pages 1-24, XP004417690 ISSN: 0167-4889 page 13 - page 16; figure 1 figures 1,3	1-38
A	LUNDSTROM K: "Latest development in viral vectors for gene therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 3, March 2003 (2003-03), pages 117-122, XP004412608 ISSN: 0167-7799 page 120 - page 121	1-38
A	DROPULIC B: "Lentivirus in the clinic." MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY. DEC 2001, vol. 4, no. 6, December 2001 (2001-12), pages 511-512, XP008042363 ISSN: 1525-0016 the whole document	1-38
A	KAY MARK A ET AL: "Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics" NATURE MEDICINE, vol. 7, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 33-40, XP008042487 ISSN: 1078-8956 page 35 - page 36; figure 1	1-38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2004/029492**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 1 - 12, 14 - 38 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2004/029492

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0224897	A2	28-03-2002	AU 9307501 A	02-04-2002
			CA 2422544 A1	28-03-2002
			CZ 20030784 A3	12-11-2003
			EP 1356070 A2	29-10-2003
			JP 2004524813 T	19-08-2004
			NO 20031293 A	14-05-2003

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 31/18 (2006.01)</b>		A 6 1 P 31/18		
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>		C 1 2 N 15/00	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, IT, LU, MC, 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ドロップリック, ボロ  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 0 4 2, エリコット シティ, ゴールデン オーク ド  
 ライブ 1 2 6 3 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA35 CA04 CA05 CA06 DA02 DA03 EA02 FA02 GA11  
 GA18 HA08 HA14 HA17  
 4C084 AA13 ZB33 ZB35 ZC55  
 4C085 AA03 BA55 BA65 BA78 DD62 EE01  
 4C087 AA02 BC83 NA13 ZB09 ZB33 ZC55