

(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2004-532603

(P2004-532603A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004. 10. 28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/145	A 6 1 K 39/145	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/165	A 6 1 K 39/165	4 C O 8 7
A 6 1 K 39/21	A 6 1 K 39/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 258 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-500664 (P2002-500664)	(71) 出願人	500422148
(86) (22) 出願日	平成13年3月2日 (2001. 3. 2)		エモリー ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月2日 (2002. 9. 2)		アメリカ合衆国, ジョージア 3 0 3 2 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/006795		, アトランタ, スイート 1 3 0, ノース
(87) 国際公開番号	W02001/092470		ディケーター ビルディング, ノース
(87) 国際公開日	平成13年12月6日 (2001. 12. 6)		ディケーター ロード 1 7 8 4
(31) 優先権主張番号	60/186, 364	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成12年3月2日 (2000. 3. 2)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100108774
(31) 優先権主張番号	60/251, 083		弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成12年12月1日 (2000. 12. 1)	(72) 発明者	ロビンソン ハリート エル.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ジョージア州 アトラン
			タ メイソン ウッズ ドライブ 1 0 5
			1
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 DNA発現ベクターおよび使用法

(57) 【要約】

本発明は、DNAワクチン挿入物を送達するためのベクターとして有用な新規のpGA構築物を提供する。ワクチン挿入物は、様々なウイルス、細菌、寄生生物、および／または菌類のDNA転写物を含んでもよい。病原体ワクチン挿入物を含む治療的有効量の新規pGA構築物を投与し、その後、同じワクチン挿入物を含む生ベクターワクチンを用いて追加免疫化を行うことによって、マルチエピトープCD8⁺ T細胞応答を惹起する方法も述べられる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

λ T O ターミネーターをコードする終結配列；

原核生物複製起点；

選択マーカー遺伝子；および

病原体に由来する一つまたは複数の免疫原をコードするワクチン挿入物を含む真核生物転写カセット

を含むベクター。

【請求項 2】

病原体がウイルス病原体である、請求項 1 記載のベクター。

10

【請求項 3】

ウイルス病原体が H I V、麻疹、インフルエンザ、ポリオ、および風疹からなる群より選択される、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 4】

一つまたは複数の免疫原が、H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素（h e m a g g l u t i n i n）、麻疹核タンパク質、インフルエンザ血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列（s u b s e q u e n c e）からなる群より選択される、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 5】

一つまたは複数の免疫原が、H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、および H I V V L P、それらの変異体、ならびにそれらの部分配列からなる群よりさらに選択される、請求項 1 記載のベクター。

20

【請求項 6】

一つまたは複数の免疫原をコードするワクチン挿入物が少なくとも 1 つの C 3 d 遺伝子をさらに含む、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 7】

請求項 1 記載のベクターを含む治療的有効量の生理学的に許容される組成物を投与する段階を含む、患者を免疫化または治療する方法。

【請求項 8】

H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザ血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原を発現する組換えボックスウイルスベクターを含む治療的有効量の組成物を続いて投与する段階をさらに含む、請求項 7 記載の方法。

30

【請求項 9】

一つまたは複数の免疫原が、H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザ血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原を発現する治療的有効量の組換えボックスウイルスベクターを続いて投与する段階をさらに含む、請求項 7 記載の方法。

40

【請求項 11】

ベクターが、H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原を発現する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】

50

配列番号：1のDNA配列を含むベクター。

【請求項13】

HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザ選択性血球凝集素 (influenza selected hemagglutinin)、インフルエンザ膜貫通血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原をコードするワクチン挿入物をさらに含み、選択的に少なくとも1つのC3d遺伝子を含む、請求項12記載のベクター。

【請求項14】

一つまたは複数の免疫原が、HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される、請求項12記載のベクター。

【請求項15】

配列番号：2のDNA配列を含むベクター。

【請求項16】

HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザ選択性血球凝集素、インフルエンザ膜貫通血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原をコードするワクチン挿入物をさらに含み、選択的に少なくとも1つのC3d遺伝子を含む、請求項15記載のベクター。

【請求項17】

一つまたは複数の免疫原が、HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される、請求項15記載のベクター。

【請求項18】

配列番号：3のDNA配列を含むベクター。

【請求項19】

HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザ選択性血球凝集素、インフルエンザ膜貫通血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原をコードするワクチン挿入物をさらに含み、選択的に少なくとも1つのC3d遺伝子を含む、請求項18記載のベクター。

【請求項20】

一つまたは複数の免疫原が、HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される、請求項18記載のベクター。

【請求項21】

配列番号：4のDNA配列を含むベクター。

【請求項22】

HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザから選択された血球凝集素、インフルエンザ膜貫通血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原をコードするワクチン挿入物をさらに含み、選択的に少なくとも1つのC3d遺伝子を含む、請求項21記載のベクター。

【請求項23】

一つまたは複数の免疫原が、HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される、請求項21記載のベクター。

【請求項24】

配列番号：5のDNA配列を含むベクター。

【請求項 25】

H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザから選択された血球凝集素、インフルエンザ膜貫通血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原をコードするワクチン挿入物をさらに含み、選択的に少なくとも1つのC 3 d遺伝子を含む、請求項 24 記載のベクター。

【請求項 26】

一つまたは複数の免疫原が、H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される、請求項 24 記載のベクター。

10

【請求項 27】

患者を免疫化または治療する方法であり、以下の段階を含む方法：

ベクターが配列番号：1、2、3、4、および5から選択される配列を含む核酸であり、治療的有効量の組成物の投与が筋肉内経路または皮内経路を通る、ベクターを含む治療的有効量の生理学的に許容される組成物を投与する段階。

【請求項 28】

ベクターが、H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザ血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原、ならびに選択的に少なくとも1つのC 3 d遺伝子を発現する、請求項 27 記載の方法。

20

【請求項 29】

ベクターが、H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原を発現する、請求項 27 記載の方法。

【請求項 30】

H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、麻疹融合タンパク質、麻疹血球凝集素、麻疹核タンパク質、インフルエンザ血球凝集素、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原を発現する治療的有効量の組換えボックスウイルスベクターを続いて投与する段階をさらに含む、請求項 27 記載の方法。

30

【請求項 31】

ベクターが、H I V G a g、H I V g p 1 2 0、H I V P o l、H I V E n v、H I V V L P、それらの変異体、およびそれらの部分配列からなる群より選択される一つまたは複数の免疫原を発現する、請求項 27 記載の方法。

【請求項 32】

請求項 29 記載のベクターを含む治療的有効量の組成物を投与する段階を含む、免疫化または治療を必要とする患者を免疫化または治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

本出願は、2000年3月2に出願された米国特許仮出願第60/186,364号および2000年12月1日出願された第60/251,083号からの優先権の恩典を主張する。

【0002】

政府支援

本明細書で述べられる成果は、一部が、米国立衛生研究所助成金5 P 0 1 A I 4 3 0 4 5および米国立衛生研究所／米国立アレルギー感染症研究所助成金R 2 1 A I 4 4 3 2 5-01によって支援されている可能性がある。米国政府は本発明において一定の権利を有し得る。

【0003】

50

発明の分野

本発明は、一般的に、分子遺伝学および免疫学の分野に関する。さらに詳細には、本発明は、新規のDNA発現ベクター、免疫原タンパク質をコードするDNAを含む新規のベクター、および免疫原タンパク質をコードするDNAを含む新規のベクターを投与することによってヒトを含む動物を免疫化する新規の方法について述べる。

【0004】

発明の背景

ワクチンは、世界の保健に重大かつ長期にわたる影響を及ぼしてきた。天然痘は撲滅され、ポリオは根絶に近づいており、ジフテリア、麻疹、おたふくかぜ、百日咳、および破傷風などの疾患の蔓延が阻止されている。それにもかかわらず、微生物は依然として主な死因であり、現行のワクチンはヒトおよび家畜の感染症のほんの一握りにしか対応していない。ワクチンがない一般的な感染症によって年に1200億米ドルの損害をこうむっている(Robinsonら、1997)。先進工業諸国では、免疫不全症ウイルスなどの感染症の出現ならびに薬剤耐性型結核のような疾患の再出現は新たな脅威をもたらし、ワクチン開発への難題を投げかける。有効なワクチンは入手不可能または法外に高いことが多い、第三世界の国々において、新たなワクチンおよび改善されたワクチンの必要性はさらに著しい。最近、抗原を発現するDNAの直接注射は防御免疫応答を開始することが示されている。

【0005】

DNAに基づくワクチンは、ワクチン接種された宿主においてタンパク質免疫原を発現させるために細菌プラスミドを使用する。目的の免疫原をコードするcDNAを真核生物発現プラスミドにクローニングするために、組換えDNA技術が使用される。次いで、ワクチンプラスミドは細菌内で増幅され、精製され、ワクチン接種される宿主に直接接種される。DNAは、一般的に、食塩水に溶解したDNAの針注射、またはDNAをコーティングした金ビーズを皮膚に送達する遺伝子銃装置によって接種される。プラスミドDNAは宿主細胞に吸収され、ワクチンタンパク質が発現され、プロセッシングされ、自己主要(self-major)組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI分子およびクラスII分子において提示され、DNAによりコードされる免疫原に対する免疫応答が生じる。

【0006】

DNAワクチン(「遺伝子的免疫化(genetic immunization)」とも呼ばれる)の歴史的な根拠は、遺伝子療法に関する研究およびレトロウイルスベクターを用いた研究から同時に生まれた。筋肉へのDNA送達に関する遺伝子療法研究によって、純粋なDNAは、骨格筋細胞トランスフェクションの媒介においてリポソーム内に封入したDNAと同じくらい有効であることが明らかになった(Wolffら、1990)。この封入されていないDNAは、風変わりな用語である「裸のDNA」と呼ばれる。この用語は、核酸ワクチン接種に用いられる純粋なDNAの説明のためによく知れるようになってきた。植物細胞にDNAを送達するために開発された遺伝子銃もまた、DNAを皮膚に送達する遺伝子療法研究に用いられた。プラスミドによって発現されるヒト成長ホルモンがマウスの成長を変える能力を試験した一連の実験において、このプラスミド接種が成長を変えず、抗体を誘発したことが明らかにされた(Tang、De Vito、およびJohnson、1992)。これは、接種プラスミドDNAによる免疫応答の惹起(raise)の初めての証明であった。同時に、レトロウイルスベクターを用いた実験によって、ごくわずかな($10^4 \sim 10^5$ 個程度の)感染細胞によって防御免疫応答を惹起できることが証明された。ニワトリインフルエンザモデルにおいて行われた、ワクチン接種用の感染形態のレトロウイルスベクターを産生するのに使用されたことのあるプラスミドDNAの直接的な試験によって防御免疫が得られた(Robinson、HuntおよびWebster、1993)。

【0007】

HIV-1は2000年までに世界人口の1%に感染し、そのために、この最近出現した病原体に対するワクチン開発が世界保健の最優先事項となっている。DNAワクチンの前

臨床試験によって、チンパンジーにおいて、非常に弱力化されたH I V - 1 の攻撃をD N Aだけで防御することができるが（B o y e r ら、1 9 9 7）、マカク（m a c a q u e）においてさらに毒性の高いS I Vの攻撃を防御できないことが証明された（L u ら、1 9 9 7）。D N Aによる初回抗原刺激とエンベロップ糖タンパク質による追加抗原刺激の併用によって、S I VとH I Vの非病原性キメラ（S H I V - I I I b）を用いた同種攻撃に対して、中和抗体に関連した防御が惹起された（L e t v i n ら、1 9 9 7）。つい最近、S H I V - s（シミアンウイルスとヒト免疫不全症ウイルスのキメラ）による一連の攻撃を防御する能力について8種類の異なるプロトコルを試験した比較試験において、D N A皮内接種による初回抗原刺激および組換え鶏痘ウイルスベクターを用いた追加抗原刺激を含む免疫化プロトコルにより攻撃感染の最高の封じ込め（c o n t a i n m e n t）が示された（R o b i n s o n ら、1 9 9 9）。この攻撃感染の封じ込めは、攻撃ウイルスに対する中和抗体の存在と無関係である。攻撃感染の封じ込めに効果がないことが判明したプロトコルは、皮内D N A接種または遺伝子銃D N A接種による初回抗原刺激および追加抗原刺激による免疫化、皮内D N A接種または遺伝子銃D N A接種を用いた初回抗原刺激、次に、タンパク質サブユニットを用いた追加抗原刺激による免疫化、遺伝子銃D N A接種を用いた初回抗原刺激および組換え鶏痘ウイルスを用いた追加抗原刺激による免疫化、タンパク質のみを用いた免疫化、ならびに組換え鶏痘ウイルスのみを用いた免疫化を含んだ（R o b i n s o n ら、1 9 9 9）。ヒトでのD N Aワクチン初期臨床試験によって、副作用はなく（M a c G r e g o r ら、1 9 9 6）、細胞溶解性T細胞は惹起しないことが明らかになった（C a l a r o t a ら、1 9 9 8）。多くの研究によって、同時トランスフェクションされたリンホカインおよび補助刺激分子が免疫化効率を高める能力がスクリーニングされている（R o b i n s o n および P e r t m e r、印刷中）。

【0008】

D N Aワクチン法の欠点として、D N Aによりコードされる産物（例えば、タンパク質）に対する免疫化の制限、ならびに真核生物による細菌タンパク質および寄生生物タンパク質の異常プロセシングの可能性が挙げられる。D N Aワクチンの既存の方法に関する別の重大な問題は、ワクチン挿入物配列の中には細菌内でのD N Aワクチンプラスミドの増殖および増幅間に不安定になるものもあることである。不安定の原因として考えられる1つは、プラスミド増殖の際の、細菌エンドヌクレアーゼが認識することができるワクチン挿入物またはプラスミドバックボーンの二次構造の曝露である。

【0009】

従って、H I V - 1 を含む様々な感染症に対するワクチンとして有用な免疫原タンパク質を真核生物で発現するための、細菌宿主内での安定性が改善した、ヒトを含む動物において安全に使用することができるD N A発現ベクターが必要とされる。

【0010】

発明の概要

本発明は新規p G A構築物を提供する。新規p G A構築物はD N Aワクチン送達のためのベクターとして有用である。

【0011】

本発明はまた、ワクチン挿入物を有する新規p G A構築物を提供する。病原体ワクチン挿入物は、任意のウイルス、細菌、寄生生物、および／または菌類のD N A転写単位を含んでもよい。

【0012】

本発明は、病原体ワクチン挿入物を含む治療的有効量の新規のp G A構築物を投与することによって患者を免疫化する新規の方法について述べる。

【0013】

本発明は、病原体ワクチン挿入物を含む治療的有効量の新規p G A構築物を投与し、その後、同じワクチン挿入物を含む生ベクターワクチン（例えば、組換え改変ワクシニアアンカラ（m o d i f i e d v a c c i n i a A n k a r a ; M V A）ベクター）を用いて

追加免疫化を行うことによって、患者を免疫化する新規の方法について述べる。

【0014】

本発明はまた、病原体ワクチン挿入物を含む治療的有効量の新規 p G A 構築物を投与し、その後、同じワクチン挿入物を含む生ベクターワクチン（例えば、組換え改変ワクシニアアンカラ（M V A）ベクター）を用いて追加免疫化を行うことによって、マルチエピトープ C D 8 T 細胞応答を惹起する新規の方法について述べる。

【0015】

本発明は以下でさらに詳細に説明される。

【0016】

発明の詳細な説明

10

本発明は、新規のベクター、病原体ワクチン挿入物を含む新規のベクター、および病原体に対して患者を免疫化する新規の方法に関する。新規の免疫化方法は、病原体の感染、蔓延、または増殖を制限し得る細胞性免疫応答および体液性免疫応答を誘発し、その後の病原体による攻撃を防御する。

【0017】

DNA ワクチンの代表的な参考文献として、免疫応答惹起の最初の証明（T a n g、D e V i t、および J o h n s t o n、1992）、細胞傷害性 T 細胞（T c）により媒介される免疫の最初の証明（U l m e r ら、1993）、皮内（i . d .）、筋肉内（i . m .）、静脈内（i . v .）、鼻腔内（i . n .）、および遺伝子銃（g . g .）免疫化の防御効力の最初の証明（F y n a n ら、1993；R o b i n s o n、H u n t、および W e b s t e r、1993）、遺伝子アジュバントの最初の使用（X i a n g および E r t l、1995）、ライブラリー免疫化（l i b r a r y i m m u n i z a t i o n）の最初の使用（B a r r y、L a i、J o h n s t o n、1995）、ならびに DNA 送達法による T ヘルパー型免疫応答を調節する能力の最初の証明（F e l t q u a t e ら、1997）が挙げられる。DNA ワクチン情報をまとめた非常に有用なウェブサイトが <http://www.genweb.com/Dnavax/dnavax.html> で見られる。

20

【0018】

便宜上、明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲内で用いられる特定の用語をここに集める。

30

【0019】

定義

本明細書において用いられる「核酸」という用語は、任意の、天然および合成の線状のおよび連続的なヌクレオチドおよびヌクレオシド、例えば、c D N A、ゲノム D N A、m R N A、t R N A、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、およびそれらの誘導体を意味する。理解しやすくするために、このような核酸は、本明細書ではひとまとめにして「構築物」、「プラスミド」、または「ベクター」と呼ばれうる。本発明の核酸の代表例として、発現ベクター、クローニングベクター、コスミドベクター、および形質転換ベクターを含む細菌プラスミドベクター（p B R 3 2 2 などがあるが、これに限定されない）、動物ウイルスベクター（例えば、改変されたアデノウイルス、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルスなどがあるが、これに限定されない）、バクテリオファージ核酸に由来するベクター、ならびに化学合成された D N A または R N A のような合成オリゴヌクレオチドが挙げられる。「核酸」という用語は、改変されたまたは誘導体化されたヌクレオチドおよびヌクレオシド（これに限定されないが 5-ブロモウラシルなどのハロゲン化ヌクレオチドなどがあるが、これに限定されない）、およびビオチン標識ヌクレオチドなどの誘導体化されたヌクレオチドをさらに含む。

40

【0020】

本明細書において用いられる「単離された核酸」という用語は、（a）天然のどの核酸の構造とも同一でない、または（b）3つを超える別々の遺伝子にまたがる天然のゲノム核酸のどの断片の構造とも同一でない構造を有する核酸を意味し、D N A、R N A、または

50

それらの誘導体もしくは変異種を含む。この用語は以下を含むが、これらに限定されない：
（a）天然のゲノム分子の一部の配列を有するが、それが天然の種のゲノムにおいて前記分子の一部に隣接するコード配列の少なくとも1つと隣接しないDNA；（b）得られる分子がどのベクターとも天然のゲノムDNAとも同一にならないように、ベクターまたは原核生物もしくは真核生物のゲノム核酸に組み込まれた核酸；（c）cDNA、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、もしくは化学合成によって生成された断片、または制限断片などの、ばらばらの分子；（d）ハイブリッド遺伝子（すなわち、融合タンパク質をコードする遺伝子）の一部である組換えヌクレオチド配列、ならびに（e）非天然のハイブリッド配列の一部である組換えヌクレオチド配列。

10

【0021】

いくつかの目的のためには、ヌクレオチド配列が精製された形態であることが有利である。核酸に関連する「精製された」という用語は、天然環境に比べて配列の純度が高いことを示す。

【0022】

本明細書において用いられる「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、ペプチド結合によって結合された、連続した配列の3つ以上のアミノ酸からなるアミノ酸重合体を意味する。「ポリペプチド」という用語は、タンパク質、タンパク質断片、タンパク質類似体、オリゴペプチドなどを含む。「ポリペプチド」という用語は、核酸によってコードされるか、組換え技術によって生成されるか、適切な供給源から単離されるか、または合成される、前記で定義されたポリペプチドを意図している。「ポリペプチド」という用語は、化学修飾アミノ酸または標識リガンドに共有結合もしくは非共有結合されたアミノ酸を含む、前記で定義されたポリペプチドをさらに意図している。

20

【0023】

核酸（例えば、cDNA）について言及するために本明細書で用いられる「断片」という用語は、人工的に（例えば、化学合成によって）構築された、または制限エンドヌクレアーゼもしくは機械的剪断を用いて天然産物を複数の部分に切断することによって構築された目的の核酸の単離された部分、あるいはPCR、DNAポリメラーゼ、もしくは当技術分野において周知の他の任意の重合法によって合成された核酸または当業者に周知の組換え核酸技術によって宿主細胞において発現された核酸の部分の意味する。本明細書において用いられる「断片」という用語はまた、少なくとも1種類のプロテアーゼによるタンパク質分解切断によって天然に生じるポリペプチドから切断された、または当業者に周知の化学的方法によって合成された天然のポリペプチドの部分である、ポリペプチドの単離された部分の意味してもよい。

30

【0024】

本明細書において用いられる「遺伝子」という用語は、RNA全体、タンパク質全体、またはこのRNA全体もしくはタンパク質全体の任意の部分合成するための遺伝情報をコードするRNAまたはDNA両方を含む核酸配列を意味する。特定の生物のゲノムの天然の部分ではない遺伝子は「外来遺伝子」、「異種遺伝子」、または「外因性遺伝子」と呼ばれ、特定の生物のゲノムの天然の部分である遺伝子は「内因性遺伝子」と呼ばれる。

40

【0025】

本明細書において用いられる「発現された」または「発現」という用語は、遺伝子の核酸2本鎖の一方のある領域に対して部分的に少なくとも相補的なRNA核酸分子を生じるような、遺伝子からの転写を意味する。本明細書において用いられる「発現された」または「発現」という用語はまた、タンパク質もしくはポリペプチドまたはその一部を生じるような、前記RNA核酸分子からの翻訳を意味する。

【0026】

本明細書において用いられる「遺伝子座」という用語は、染色体上での遺伝子の部位を意味する。遺伝子対が遺伝形質を支配し、それぞれの遺伝子是一对の染色体上の同じ位置にある。これらの遺伝子対（すなわち対立遺伝子）は形質発現において両方が優性でもよく

50

、両方が劣性でもよい。どちらの場合でも、個体は、その遺伝子対が支配する形質についてホモ接合型であると言われている。遺伝子対（対立遺伝子）が一方が優性形質および他方が劣性形質からなる場合、個体は、遺伝対が支配する形質についてヘテロ接合型である。例えば、組換え事象により引き起こされるまたは変異の結果として生じる、遺伝子または核酸分子における天然の変化は、類似するが同一でないヌクレオチド配列を有する対立遺伝子変異種を生じる。このような対立遺伝子変異種は、一般的に、それと比較される遺伝子によってコードされるタンパク質と類似の活性を有するタンパク質をコードする。なぜなら、機能を変える変異体は一般的に自然淘汰に不利であるからである。対立遺伝子変異種はまた、遺伝子の非翻訳領域（例えば、3'または5'の非翻訳領域）における変化を含んでもよく、オルタナティブエキソンが隣接して配置されるような新生転写物のオルタナティブスプライシングを伴うこともできる。 10

【0027】

本明細書において用いられる「転写調節配列」という用語は、遺伝子核酸配列に連結され、遺伝子の転写発現を調節するヌクレオチド配列を意味する。「転写調節配列」は単離されてもよく、適切な細胞においてベクターDNAの一部の調節された転写を可能にするようにベクター核酸に組み込まれてもよい。「転写調節配列」は、mRNAに転写することができるタンパク質コード配列の5'末端領域にある核酸配列領域の前であってもよいが、これに限定されない。転写調節配列はまた、タンパク質コード領域内に位置してもよく、「イントロン」領域として特定される遺伝子領域内であってもよく、核酸領域にある核酸配列領域内であってもよい。 20

【0028】

本明細書において用いられる「コード領域」という用語は、タンパク質に翻訳することができるヌクレオチドの連続線状配列を意味する。完全長コード領域が完全長タンパク質（すなわち、翻訳後修飾されておらず、その天然状態で翻訳された完全なタンパク質）に翻訳される。完全長コード領域はまた任意のリーダータンパク質配列を含んでもよく、または天然では翻訳されたタンパク質から切り出され得る他の任意のタンパク質領域を含んでもよい。

【0029】

本明細書において用いられる「プローブ」という用語は核酸を指す場合、相補配列（または、プローブ配列とは異なるが、使用されるハイブリダイゼーションストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーションを妨げる程度まで異ならない相補配列）とハイブリダイズし、それにより相補配列の存在を特定するために使用することができるヌクレオチド配列を意味する。プローブは、標識（放射性基、ビオチン、または当技術分野において周知の他の任意の標識などがあるが、これだけではない）を用いて修飾されてもよい。 30

【0030】

本明細書において用いられる「核酸ベクター」という用語は、トランスフェクションまたは形質転換によって細胞に導入され、宿主細胞ゲノムとは関係なくまたは宿主細胞ゲノム内で複製することができる、天然または合成の一本鎖または二本鎖のプラスミドまたはウイルス核酸分子を意味する。プラスミドベクターのヌクレオチド配列に基づいて適切な制限酵素を用いた処理によって、環状二本鎖プラスミドを線状化することができる。ベクターを制限酵素で切断し、部分を一緒に連結することによって、核酸をベクターに挿入することができる。核酸分子はRNAでもDNAでもよい。 40

【0031】

本明細書において用いられる「発現ベクター」という用語は、M_gOタンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結される少なくとも1つの調節配列をさらに含み得る核酸ベクターを意味する。調節配列は当技術分野において十分に認知されており、当業者が過度に実験することなく、連結ヌクレオチド配列の良好な発現を確かなものとするように選択することができる。本明細書において用いられる「調節配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、および発現を制御することができる他のエレメントを含む。適切な発現ベクター、プロモーター、および他の発現制御エレメントを設計するために 50

、サンプブルック (Sambrook) ら編「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、Cold Spring Harbor Press (1989) などの標準的な分子生物学の教科書を参照してもよい。しかしながら、適切な発現ベクターの選択は、形質転換されるべき宿主細胞の選択および／または発現されるべきタンパク質の種類を含む複数の要因によって左右されることが理解されるべきである。

【0032】

本明細書において用いられる「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、核酸を宿主に挿入する過程を意味する。形質転換またはトランスフェクションによる原核生物または真核生物への核酸の導入を容易にするための多くの技法が当業者に周知である。これらの方法は、宿主細胞が核酸分子を取り込めるようにする様々な技法（例えば、高濃度の塩（カルシウム塩もしくはマグネシウム塩などがあるが、これだけではない）、電場、界面活性剤、またはリポソーム媒介トランスフェクションによる細胞の処理）を必要とする。

10

【0033】

「組換え細胞」という用語は、天然では互いに共有結合していない核酸セグメントの新たな組み合わせを有する細胞を意味する。核酸セグメントの新たな組み合わせを、当業者に利用可能な様々な核酸操作技法を用いて生物に導入することができる。組換え細胞は真核細胞でもよく、原核細胞でもよく、哺乳動物細胞でもよい。組換え細胞はゲノム外にベクターを有してもよい。ゲノム外核酸ベクターは細胞ゲノムに挿入されない。組換え細胞はゲノム内にベクターまたはその一部をさらに有してもよい。用語ゲノム内は、組換え細胞のゲノム内に組み込まれた核酸構築物を定義する。

20

【0034】

本明細書において用いられる「組換え核酸」という用語は、真核細胞にも原核細胞にも天然では見出されない少なくとも2つの核酸配列の組み合わせを意味する。核酸配列として、核酸ベクター、遺伝子発現調節エレメント、複製起点、発現時に抗生物質耐性を付与する配列、およびタンパク質コード配列が挙げられ得るが、これに限定されない。「組換えポリペプチド」という用語は、位置、純度、または構造の点で天然のポリペプチドとは異なるように組換えDNA技法によって産生されたポリペプチドを含むことが意図される。一般的に、このような組換えポリペプチドは、天然で通常観察されるものとは異なる量で細胞に存在する。

30

【0035】

本明細書において用いられる「患者」という用語は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを意味する。

【0036】

本明細書において用いられる「免疫化する」または「免疫化」という用語は、病原体により引き起こされる感染（すなわち、疾患）の発現を（部分的または完全に）防御する、患者における免疫応答の発生を意味する。本発明によって免疫化された患者は病原体に感染しないか、または免疫化なしで起こる程度より少ない程度で感染する。免疫化は本質的に予防的免疫化でも治療的免疫化でもよい。すなわち、以前に感染していない患者および感染患者の両方とも本発明によって免疫化することができる。

40

【0037】

本明細書において用いられる「DNA転写単位」という用語は、少なくとも2つの成分である抗原コードDNAおよび転写プロモーターエレメントを含むポリヌクレオチド配列を意味する。DNA転写単位は、選択的に、エンハンサーエレメント、スプライシングシグナル、終結シグナルおよびポリアデニル化シグナル、ウイルスレプリコン、ならびに／または細菌プラスミド配列などのさらなる配列を含んでもよい。DNA転写単位は、多くの既知の方法によって作製することができる。例えば、マニアティス (Maniatis) ら「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、Cold Spring Harbor La

50

laboratory Press (1989) (その開示は全体的に参照として本明細書に組み入れられる)に記載のように、DNA転写単位を構築するために、望ましい抗原をコードするDNAを発現ベクターに挿入することができる。

【0038】

本明細書において用いられる「ワクチン挿入物」という用語は、病原体のDNA転写単位を意味する。好ましくは、ワクチン挿入物は、患者において免疫応答を生じることができるDNA転写単位である。例えば、ワクチン挿入物は、任意のウイルス、細菌、寄生生物および／または菌類に由来する抗原をコードする病原体ワクチン挿入物である。例示的なウイルスとして、ヘルペスウイルス、オルトミクソウイルス、ライノウイルス、ピコルナウイルス、アデノウイルス、パラミクソウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、ブニavirus、風疹ウイルス、レオウイルス、麻疹、ヘパドナウイルス、エボラ、レトロウイルス（ヒト免疫不全症ウイルスを含む）などが挙げられる。例示的な細菌として、結核、マイコバクテリア、スピロヘータ、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマなどが挙げられる。例示的な寄生生物としてマラリアなどが挙げられる。例示的な菌類として、酵母、かびなどが挙げられる。このリストは、本明細書に記載の方法によって防御免疫応答が生じることができる全ての可能性のある病原体を含まないことが当業者に理解されると考えられる。

10

【0039】

本明細書において用いられる「抗原」という用語は、病原体に対して防御応答を誘発することができる、病原体により発現される任意のタンパク質、炭水化物、または他の部分を意味する。抗原は病原体の構成成分でもよく、構成成分でなくてもよい。「抗原」という用語に意図されているものはまた、様々な長さの翻訳産物でもポリペプチドでもよい、遺伝子によってコードされる抗原である。抗原は、グリコシル化、ミリスティル化、またはリン酸化などの通常の宿主細胞修飾を受ける。さらに、細胞内、細胞外、または細胞表面に発現するように抗原を設計することができる。さらに、集合し、細胞から放出するように抗原を設計することができる。

20

【0040】

本明細書において用いられる「アジュバント」という用語は、ワクチンの免疫原性を高めるためにワクチンに添加される物質を意味する。アジュバントが働く機構は完全に分かっていない。抗原をゆっくりと放出することで免疫応答を高めると考えられているアジュバントもあり、その一方で、それ自体で強力な免疫原性があり、協力作用的に機能すると考えられているアジュバントもある。既知のワクチンアジュバントとして、油性および水性のエマルジョン (oil and water emulsion) (例えば、完全フロイントアジュバントおよび不完全フロイントアジュバント)、コリネバクテリウム・パルヴム (*Corynebacterium parvum*)、BCG (*Bacillus Calmette Guérin*)、水酸化アルミニウム、グルカン、デキストラン硫酸、酸化鉄、アルギン酸ナトリウム、バクトアジュバント (*Bacto-Adjuvant*)、ある特定の合成重合体 (例えば、ポリアミノ酸およびアミノ酸共重合体)、サポニン、「レグレシン (REGRESSIN)」 (*Vetrepharm, Athens, Ga.*)、「アブリジン (AVRIDINE)」 (*N, N*-ジオクタデシル-*N'*, *N'*-ビス (2-ヒドロキシエチル)-プロパンジアミン)、パラフィン油、およびムラミルジペプチドが挙げられるが、これに限定されない。アジュバントはまた、遺伝子アジュバント (例えば、同時接種DNAにコードされる免疫調節分子)を含む。同時接種DNAはワクチン免疫原と同じワクチン構築物内にあってもよく、別々のDNAベクター内にあってもよい。

30

40

【0041】

本明細書において用いられる「薬学的に許容される担体」という用語は、副作用なくウシ宿主に注射することができるワクチンを含むための賦形剤を意味する。当技術分野において周知の適切な薬学的に許容される担体として、滅菌水、食塩水、グルコース、デキストロース、または緩衝溶液が挙げられるが、これに限定されない。担体には、希釈剤、

50

安定化剤（すなわち、糖およびアミノ酸）、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝剤、増粘剤、顔料などを含むがこれに限定されない、補助剤が含まれ得る。

【0042】

本明細書において用いられる「選択（selectable）マーカー遺伝子」という用語は、選択マーカー遺伝子を含む細胞集団を、発現選択マーカー遺伝子を有さない細胞集団から選択するのを可能にする、発現遺伝子を意味する。例えば、「選択マーカー遺伝子」は、特定の抗生物質によって以前では悪影響を受けていた微生物に抗生物質耐性を付与することができる「抗生物質耐性遺伝子」でもよい。このような耐性は、変異、または微生物を形質転換する耐性遺伝子含有プラスミドによる耐性獲得から生じるものでもよい。

【0043】

本明細書において用いられる「ターミネーター配列」または「ターミネーター」という用語は、転写を止めるように機能するヌクレオチド配列を意味する。本明細書において用いられる「転写」または「転写する」という用語は、相補的塩基対形成によってDNA鋳型上でRNA分子が形成される過程を意味する。この過程はRNAポリメラーゼによって媒介される。

【0044】

本明細書において用いられる「VLP」という用語はウイルス様粒子を意味し、この用語が使用される場合、ウイルスタンパク質の凝集も意味する。

【0045】

DNAをベースとする免疫化の主な免疫学的利点は、免疫原がMHCクラスI分子およびクラスII分子の両方によって提示されることである。内因的に合成されたタンパク質は、ペプチドエピトープをMHC I分子およびII分子に積み込むためにプロセッシング経路に速やかに入る。MHC Iにより提示されたエピトープは細胞傷害性T細胞（Tc）応答を惹起するが、MHC IIにより提示されたエピトープはヘルパーT細胞（Th）を惹起する。対照的に、細胞内で合成されない免疫原は、主としてMHC IIエピトープの積み込みおよびTcではなくThの惹起に制限される。弱力化生ワクチン、または細胞において免疫原を産生し、ThおよびTcの両方を惹起する組換えウイルスベクターと比較した場合、DNAワクチンは、非感染性であり、免疫応答を免疫化に望ましい抗原だけに集中させるという利点を有する。DNAワクチンはまた、1型ヘルパーT細胞または2型ヘルパーT細胞を惹起するために比較的容易に操作することができるので有利である。これによって、ワクチンを、感染と闘うために動員される免疫応答のタイプに合わせることが可能になる。プラスミドを組換えDNA技術を用いて容易に構築できること、ワクチン産生（プラスミドDNAの増殖および精製）のために遺伝子的方法が使用できること、および広範囲の温度にわたるDNA安定性のために、DNAワクチンはまた費用対効果が高い。

【0046】

最良の免疫応答は、組換えタンパク質産生のために開発されたベクターをもとにした非常に活発な発現ベクターを用いて達成される（RobinsonおよびPertmer、1998）。最も頻繁に用いられる転写制御エレメントとして強力なプロモーターが挙げられる。使用に適した1つのこのようなプロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）即時初期プロモーターであるが、本発明の範囲を逸脱することなく他のプロモーターをDNAワクチンに使用してもよい。本発明に有用な他の転写制御エレメントとして、強力なポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモンをコードする遺伝子から得られたもの、またはウサギβグロビンポリアデニル化シグナル）が挙げられる（Bohmら、1996；Chapmanら、1991；Hartikkaら、1996；Mantthorpéら、1993；Montgomeryら、1993）。CMV即時初期プロモーターはイントロンAがあってもなくても使用されうる（Chapman、1991）。イントロンAの存在は、恐らく、発現されたRNAに、真核生物mRNAとしてのプロセッシングおよび機能を支援する配列を与えることによって、RNAウイルス、細菌、および寄生生物からの多くの抗原の発現を増加させる。発現はまた、当技術分野において周知の他の方法

10

20

30

40

50

(原核生物 mRNA のコドン使用頻度を真核細胞の使用頻度に合わせて最適化することを含むが、これに限定されない) によって増大させることができることが理解されることが考えられる (Andreら、1998; Uchijimaら、1998)。1種類を超える免疫原または1種類の免疫原および免疫刺激タンパク質を発現させるために、多シストロン性ベクターを使用してもよい (Iwasakiら、1997a; Wildら、1998)。

【0047】

免疫原はまた、発現された抗原を特定の細胞区画に向けることによって、抗体または Tc の惹起に多かれ少なかれ効果があるように操作することができる。例えば、抗体応答は、細胞内部に局在する抗原より、細胞の細胞膜上に提示された抗原または細胞から分泌された抗原によって効果的に惹起される (Boyle、Koniaras、および Lew、1997; Inchauspéら、1997)。Tc 応答は、DNA にコードされるタンパク質を、急速な細胞質分解を引き起こすプロテオソームに向ける N 末端ユビキチン化シグナル、および MHC I 経路へのより効率的なペプチドの積み込みによって増大させることができる (Rodriguez、Zhang、および Whittton、1997; Tobery および Siliciano、1997; Wu および Kipps、1997)。DNA で惹起される免疫応答の機構基礎の概説については、Robinson および Per tmer、ウイルス研究の進歩 (Advances in Virus Research)、53 巻、Academic Press (2000) を参照のこと (この開示はその全体が参照として本明細書に組み入れられる)。

10

20

【0048】

抗体応答に及ぼす様々なタンパク質コンフォメーション形態の影響、MHC I エピトープ (ミニ遺伝子) のひも (string) が Tc 応答を惹起する能力、および抗原と免疫標的タンパク質とを融合する効果が、特定の挿入物を用いて評価されている。ウイルス様粒子などの順序づけられた構造は、順序づけられていない構造より抗体惹起に効果があるように見える (Fomsgaardら、1998)。これは、免疫原の規則的な配列が、Ig 受容体の架橋ならびに抗体を増やし、産生する B 細胞のシグナリングに抗原単量体より効果があることを反映している可能性が高い。様々な病原体からの MHC エピトープのひもをコードする組換え DNA 分子が、多くの病原体に対する Tc 応答を誘発することができる (Hankeら、1998b)。これらの Tc エピトープのひもは、これらが Th 30

30

【0049】

免疫応答を操作するための別のアプローチは、免疫原と免疫標的分子または免疫刺激分子を融合することである。現在まで、これらの融合の最も成功した例は、分泌型免疫原を抗原提示細胞 (APC) またはリンパ節に向けたものである (Boyle、Brady、および Lew、1998)。分泌型ヒト IgG と CTLA-4 の融合は、IgG に対する抗体応答を 1000 倍を超えて増加させ、応答の偏りを補体 (C') 依存性抗体から C' 非依存性抗体に変えた。

【0050】

ヒト IgG と L-セレクトインとの融合もまた抗体応答を増加させるが、惹起した抗体の C' 結合特性を変えなかった。L-セレクトインと融合した免疫原は、恐らく、入り口として働く高内皮細静脈に結合することによってリンパ節に送達された。抗原とサイトカイン cDNA との融合は、中程度の抗体、Th、および Tc 応答の増加をもたらした (Hakim、Levy、および Levy、1996; Maecckerら、1997)。IL-4 融合は抗体応答を増加させたが、IL-12 および IL-1 β は T 細胞応答を増大させた。

40

【0051】

DNA 送達のための 2 つのアプローチは、皮下注射針を用いた食塩水に溶解した DNA の注射、または DNA でコーティングした金ビーズの遺伝子銃送達である。食塩水注射は DNA を細胞外空間に送達するが、遺伝子銃送達は DNA を直接細胞内に打ち込む。食塩水 50

50

注射には、遺伝子銃よりかなり多量の（100倍～1000倍の）DNAが必要である（Fynanら、1993）。これらの2種類の送達はまだ、食塩水注射は応答を1型ヘルパーT細胞に偏らせるが、遺伝子銃送達は応答を2型ヘルパーT細胞に偏らせる点で異なる（Feltquateら、1997；Pertmer、ロバーツ、およびハynes、1996）。食塩水に溶解して注射されたDNAは急速に体全体に広がる。銃によって送達されたDNAは標的部位に局在する。どちらの接種方法に従っても、細胞外プラスミドDNAの半減期はほぼ10分と短い（Kawabata、Takakura、およびHashida、1995；Lewら、1995）。食塩水注射によるワクチン接種は筋肉内（i. m.）でも皮内（i. d.）でもよい（Fynanら、1993）。

【0052】

様々なプラスミドの静脈内注射および皮下注射が様々な程度の成功を収めているが（Bohmら、1998；Fynanら、1993）、腹腔内注射は不成功に終わっている（Bohmら、1998；Fynanら、1993）。遺伝子銃送達は、皮膚または外科的に曝露された筋肉に送達することができる。マウスでの免疫応答惹起に効果のあったDNA送達の方法および経路は、他の種において有効である。

【0053】

DNAの粘膜送達による免疫化は、非経口接種経路を用いた免疫化よりうまくいかなかった。食塩水に溶解したDNAの鼻腔内投与は、大成功（Asakuraら、1997；Sasakiら、1998b）および限られた成功（Fynanら、1993）を収めた。遺伝子銃は、腔粘膜へのDNA送達後にIgGを首尾よく惹起した（Livingstonら、1995）。リボソーム（McCluskieら、1998）、マイクロスフェア（Chenら、1998a；Jonesら、1997）、および組換え赤痢菌ベクター（Sizemore、Branstrom、およびSadoff、1995；Sizemore、Branstrom、およびSadoff、1997）を用いて、粘膜表面へのDNA送達のある程度の成功も達成された。

【0054】

応答を惹起するために必要とされるDNAの用量は、送達方法、宿主、ベクター、およびコードされる抗原によって決まる。送達方法に関して最も大きな影響が見られる。一般的に、10 μ g～1mgのDNAがDNAの食塩水注射に用いられるが、0.2 μ g～20 μ gのDNAがDNAの遺伝子銃送達に使われる。一般的に、それより少ない用量のDNAがマウスで用いられ（食塩水注射については10 μ g～100 μ g、遺伝子銃送達については0.2 μ g～2 μ g）、それより高い用量が霊長類で用いられる（食塩水注射については100 μ g～1mg、遺伝子銃送達については2 μ g～20 μ g）。遺伝子銃送達に必要なとされるDNAがかなり少ない量であるのは、DNAを金ビーズで細胞に直接送達することを反映している。

【0055】

応答惹起に及ぼす抗原の顕著な影響の一例が、インフルエンザ血球凝集素または免疫不全症ウイルスエンベロープ糖タンパク質（Env）を発現するDNAがウサギにおいて抗体応答を惹起する能力を比較した研究において見つけることができる（Richmondら、1998）。同様の免疫化条件下で、血球凝集素を発現するDNAは、長時間効果のある、高アビディティー、高力価の抗体（約100 μ g/mlの特異的抗体）を惹起したが、Envを発現するDNAは、一過性の、低アビディティー、および低力価の抗体応答（<10 μ g/mlの特異的抗体）しか惹起しなかった。惹起された抗体のこれらの差は、血球凝集素がT依存性抗原であり、高度にグリコシルされた免疫不全症ウイルスEnvがT非依存性抗原として作用することを反映していると仮説を立てられた。

【0056】

DNAで初回抗原刺激された免疫応答を追加抗原刺激するために、タンパク質および組換えウイルスの両方が用いられている。タンパク質追加抗原刺激は、HIV-1 Envに対する中和抗体応答を増大させるために用いられた。組換えポックスウイルスによる追加抗原刺激は、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を増大させるために用いられた

10

20

30

40

50

。

【0057】

DNAで惹起された抗体応答が天然に感染した動物における抗体応答のほんの少ししかない免疫不全症ウイルスEn vなどの弱い免疫原については、タンパク質追加抗原刺激が、低力価の抗体応答を増大させる手段をもたらした（L e t v i nら、1997；R i c h m o n dら、1998）。ウサギでの研究において、タンパク質追加抗原刺激は、抗体力価およびアビディティーならびに抗体応答の持続性を増加させた（R i c h m o n dら、1998）。タンパク質追加抗原刺激に対する二次免疫応答と一致して、DNAで初回抗原刺激された動物は、タンパク質追加抗原刺激後に、タンパク質だけを与えた動物より急速な抗体増加および高い力価の抗体を示した。しかしながら、第2のタンパク質免疫化による抗体応答の動態および力価は、DNA初回免疫化を行った動物およびDNA初回免疫化を行っていない動物においてほぼ同じであった。

10

【0058】

組換えボックスウイルス追加抗原刺激は、DNAで初回抗原刺激されたCD8+細胞応答を追加抗原刺激する、非常に良好な方法であることが実証されている（H a n k eら、1998a；K e n tら、1998；S c h n e i d e rら、1998）。DNAで初回抗原刺激されたマウスまたはマカクにおいて、ボックスウイルス追加抗原刺激後に抗原特異的CD8+細胞は10倍ほど増加した。免疫化の順番を試験した研究によって、最初にDNAを送達しなければならないことが明らかになった（S c h n e i d e rら、1998）。これは、DNAが免疫応答を望ましい免疫原に集中させることを反映していると仮説を立てられた。ボックスウイルス追加抗原刺激後のCD8+細胞応答のさらなる増加は、ボックスウイルスベクターにより発現される多量の抗原、ならびに免疫応答を高めるボックスウイルス誘導サイトカインを反映していると仮説を立てられた（K e n tら、1998；S c h n e i d e rら、1998）。

20

【0059】

多くの様々なボックスウイルスを、ボックス追加抗原刺激に使用することができる。改変ワクシニアアンカラ（MVA）と名付けられたワクシニアウイルスがマウスモデルにおいて特に効果があった（S c h n e i d e rら、1998）。これは、哺乳動物モデルにおいて複製欠損であるMVAが、宿主免疫応答を逃れる能力が弱まっていることを反映している可能性がある。

30

【0060】

DNA初回抗原刺激、それに続くボックスウイルス追加抗原刺激によって惹起された応答は、防御細胞性免疫応答の惹起に非常に効果があり得る。マウスにおいて、DNAの筋肉内注射、それに続く組換えボックス追加抗原刺激は、マラリア攻撃を防御した（S c h n e i d e rら、1998）。マカクにおいて、皮内の（遺伝子銃ではない）DNA初回抗原刺激、それに続く組換えボックスウイルス追加抗原刺激はシミアンウイルスおよびヒト免疫不全症ウイルスのキメラによる攻撃を防いだ（R o b i n s o nら、1999）。

【0061】

HIV-1などの免疫不全症ウイルスに対するDNAワクチンは攻撃（c h a l l e n g e）に立ちむかい、AIDSにつながる容赦ない長期感染が阻止されるように、入ってくる感染を十分に制限する。これは、中和抗体が惹起されにくく、特定のウイルス株に特異的であることによって悪化される（B u r t o nおよびM o n t e f i o r i、1997；M o o r eおよびH o、1995）。中和抗体の惹起に問題があったので、感染を大幅に抑えるのに十分な強さの細胞性応答の惹起にかなりの努力が集中した。現在まで、高力価Tc惹起の最良の成功は、DNA初回抗原刺激、それに続いて組換えボックスウイルス追加抗原刺激を用いた免疫化プロトコルから得られている。細胞傷害活性アッセイ法を用いた特異的Tcレベルの測定（K e n tら、1998）、特異的SIV Gagエプトープに対するMHC特異的四量体を用いた染色、およびSIVまたはSHIVによる攻撃（H a n k e、1999）によって、このプロトコルの効力が評価されている。

40

【0062】

50

多くの際立った発見が、DNA初回抗原刺激および組換えポックスウイルス追加抗原刺激を用いた前臨床試験から明らかになっている。第1の発見は、血漿ウイルスRNAの定量的RT-PCR分析を用いて検出することができるレベル以下で、攻撃感染を防ぐことができることである(Robinsonら、1999)。第2の発見は、この防御が長時間効果があり、中和抗体の存在を必要としないことである(Robinsonら、1999)。第3の発見は、DNAの食塩水注射による皮内DNA初回抗原刺激が、防御免疫の惹起について遺伝子銃初回抗原刺激より優れていることである(P=0.01、フィッシャーの正確検定)(Robinsonら、1999)。

【0063】

本発明の新規のpGAベクターは、原核生物複製起点、プラスミド選択用の選択マーカー遺伝子、および真核細胞用の転写カセットを有する。同じ転写方向であり、選択マーカー遺伝子の後ろにあるλターミネーターの含有が、本発明のpGAベクターに特有のものである。プラスミドが細菌内で産生されている間、このターミネーター配列は、カナマイシンカセットからワクチン配列への読みとばし(read through)を防ぐ。転写読みとばし阻止は、細菌エンドヌクレアーゼが認識できる二次構造の曝露を制限することでワクチン挿入物配列を安定化させる。

【0064】

本発明のpGAベクターに組み込まれる転写カセットは、転写を制御するために、サイトメガロウイルス即時初期プロモーター(CMVIE)およびウシ成長ホルモンポリアデニル化配列(BGHpA)からの配列を使用する。組織プラスミノゲンアクチベーター遺伝子(tPA)リーダー配列の合成ホモログであるリーダー配列は、この転写カセットにおいて任意である。本発明のベクターは、ワクチン挿入物を受け入れるために使用することができる部位、および転写カセットがCMVIEプロモーターにイントロンA配列を含むかどうかという点で異なる。イントロンA配列およびtPAリーダー配列は両方とも、ある場合において、強力な発現の利点をワクチン挿入物に与えることが示されている(Chapmanら、1991)。

【0065】

pGA1は3894bpのプラスミドである。pGA1は、プロモーター(1~690bp)、CMV-イントロンA(691~1638bp)、tPAリーダー配列の合成模倣物(1659~1721bp)、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列(1761~1983bp)、λT0ターミネーター(1984~2018bp)、カナマイシン耐性遺伝子(2037~2830bp)、およびColEIレプリケーター(2831~3890bp)を含む。pGA1構築物のDNA配列(配列番号:1)を図2に示す。図1において表示した制限部位は、ワクチン挿入物のクローニングに有用なシングルカッター(single cutter)である。ClaIまたはBspD1部位は、ワクチン挿入物の5'末端がtPAリーダー上流にクローニングされる時に用いられる。NheI部位は、配列をtPAリーダー配列とインフレームでクローニングするために用いられる。SmaIとBlnIの間に表示した部位は、ワクチン挿入物の3'末端のクローニングに用いられる。

【0066】

pGA2は、pGA1に見られる947bpのイントロンA配列を欠く2947bpのプラスミドである。pGA2は、イントロンA配列の欠失以外はpGA1と同じである。pGA2は、効率的な発現のために上流イントロンを必要としない配列のクローニング、または上流イントロンが良好な発現のために必要とされるスプライシングのパターンを妨げる可能性のある配列のクローニングに有用である。図3は、ワクチン挿入物のクローニングに有用な制限部位を有するpGA2地図を示し、図4は配列番号:2のDNA配列を示す。ワクチン挿入物をpGA2にクローニングするための制限部位の使用法は、断片をpGA1にクローニングするために用いられるものと同じである。

【0067】

pGA3は、イントロンAを含む3893bpのプラスミドである。pGA3は、ワクチン

ン挿入物の導入に使用することができるクローニング部位以外は p G A 1 と同じである。p G A 3 において、t P A リーダー配列の上流にクローニングされる挿入物は H i n d I I I 部位を使用する。t P A リーダー配列の下流にクローニングされる配列は S m a I 部位と B l n I 部位の間の部位を使用する。p G A 3 において、これらの部位は B a m H I 部位を含む。図 5 は p G A 3 地図を示し、図 6 は配列番号：3 の D N A 配列を示す。

【0068】

本明細書での開示を考慮すると、当業者は、本明細書に記載の新規の p G A 構築物に、当技術分野において周知の任意のワクチン挿入物（H I V、インフルエンザ、麻疹、ヘルペス、エボラなどのようなウイルス病原体が挙げられるが、これに限定されない）を使用することができることを理解すると考えられる。

10

【0069】

例えば、本発明は、免疫不全症ウイルス、より好ましくは H I V（H I V－1 および H I V－2 の全てのクレード（c l a d e）ならびにそれらの変異体を含む）に由来する挿入物；インフルエンザウイルス遺伝子（全てのサブタイプおよびそれらの変異体を含む）；ならびに麻疹遺伝子に由来するワクチン挿入物を意図する。当業者は、免疫不全症ウイルス；インフルエンザウイルス；麻疹ウイルス；およびそれらの変異体に由来する挿入物に関する議論が本質的に例示であり、例示のためだけに示されることを理解すると考えられる。

【0070】

本発明の免疫不全症ウイルスワクチン挿入物は、一本の D N A から非感染性ウイルス様粒子（V L P）を発現するように設計された。これは、免疫不全症ウイルスが一本のウイルス R N A から複数の遺伝子産物を発現するために通常用いるサブゲノムスプライシングエレメントを用いて達成された。（i）完全長ウイルス R N A に存在するスプライス部位およびアクセプター、（i i）R e v 応答エレメント（R R E）、ならびに（i i i）R e v タンパク質が、サブゲノムスプライシングパターンに重要である。レトロウイルス R N A におけるスプライス部位は、真核生物 R N A におけるスプライス部位の特徴的な配列を使用する。R R E は、ウイルス R N A を核から細胞質へ輸送する R e v タンパク質と相互作用する約 2 0 0 b p の R N A 構造である。R e v 非存在下では、約 1 0 k b の免疫不全症ウイルス R N A がスプライシングを受けて、調節遺伝子 T a t、R e v、および N e f の m R N A になる。これらの遺伝子は、R T と E n v の間に存在し、ゲノム 3' 末端にあるエキソンによりコードされる。R e v 存在下では、複雑にスプライシングされた T a t、R e v、および N e f の m R N A に加えて、1 回だけスプライシングされた E n v m R N A ならびにスプライシングされていない G a g および P o l の m R N A が発現される。

20

30

【0071】

一本の D N A からの非感染性 V L P の発現は、免疫不全症ウイルスワクチンに多くの有利な特徴をもたらす。一本の D N A からの多数のタンパク質の発現は、ワクチン接種された宿主に、これらのタンパク質に含まれる T 細胞エピトープおよび B 細胞エピトープの幅（b r e a d t h）に応答する機会をもたらす。複数のエピトープを含むタンパク質の発現は、多様な組織適合型によるエピトープ提示の機会をもたらす。全タンパク質を使用することによって、異なる組織適合型の宿主に、広範囲の T 細胞応答を惹起する機会をもたらす。このようなことは、高い変異率が素早い免疫応答回避を指示する免疫不全症ウイルス感染の効果的な封じ込めに必須でありうる（E v a n s ら、1 9 9 9）（P o i g n a r d ら、1 9 9 9；E v a n s ら、1 9 9 5）。まさに薬物療法と同じように、回避のために複数の変異を必要とするマルチエピトープ T 細胞応答は、回避のために 1 回の変異しか必要としないシングルのエピトープ T 細胞応答より優れた防御をもたらすと考えられる。

40

【0072】

抗体応答は、多くの場合、順序付けられた配列のエピトープを応答 B 細胞に提示する多価ワクチンによって最も良好に初回抗原刺激される（B a c h m a n n および Z i n k e r n a g e l、1 9 9 7）。ウイルス様粒子は、ビリオン膜における E n v の多価性（m

50

ultivalency) によって抗Env抗体応答の惹起を容易にする。これらの粒子はまた、変性していない正常形態のEnvを免疫系に提示する。

【0073】

本発明の新規のベクターは、アジュバント、またはDNAの取り込みを促進する能力もしくは免疫系細胞を接種部位に動員する能力を有する他の物質の存在下で患者に投与されることができる。態様は、DNAワクチンと従来のアジュバントまたは遺伝子アジュバントを組み合わせることを含む。DNAの安定性および取り込みに有利に働くか、免疫系細胞を接種部位に動員するか、または応答リンパ球の免疫活性化を促進する試薬を含む従来のアジュバントとして、油性および水性のエマルジョン（例えば、完全フロイントアジュバントおよび不完全フロイントアジュバント）、コリネバクテリウム・パルヴム、BCG、水酸化アルミニウム、グルカン、デキストラン硫酸、酸化鉄、アルギン酸ナトリウム、バクトアジュバント、ある特定の合成重合体（例えば、ポリアミノ酸およびアミノ酸共重合体）、サポニン、「レグレシン」（Vetrepharm、Athens、Ga.）、「アブリジン」（N，N-ジオクタデシル-N'，N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）-プロパンジアミン）、パラフィン油、およびムラミルジペプチドが挙げられるが、これに限定されない。本発明はまた、遺伝子アジュバント（例えば、同時接種DNAにコードされる免疫調節分子）の使用を意図する。同時接種DNAは、ワクチン免疫原と同じワクチン構築物内にあってもよく、別のDNAベクター内にあってもよい。

10

【0074】

本発明によるワクチンは、任意の非経口経路または局所経路を含む様々な方法で投与することができる。例えば、個体は、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、または筋肉内方法によって接種することができる。接種は、例えば、皮下注射針、針のない送達装置（例えば、液体の流れを標的部位に進ませるもの）を使用してもよく、金ビーズ上にあるDNAを標的部位に打ち込む遺伝子銃を使用してもよい。病原体ワクチン挿入物を含むベクターは、鼻腔内投与（すなわち、点鼻剤もしくは吸入剤）、または溶剤、ゲル剤、泡、もしくは坐剤による直腸内投与もしくは腔内投与を含む様々な方法によって粘膜表面に投与することができる。または、ワクチン挿入物を含むベクターは、錠剤、カプセル剤、チュアブル錠、シロップ剤、乳濁液などの形で経口投与することができる。別の態様において、ベクターは、受動的皮膚パッチ（passive skin patch）、イオン導入手段などによって経皮投与することができる。

20

30

【0075】

任意の適切な生理学的に許容される媒質が、病原体ワクチン挿入物を含むベクターの患者への導入に適している。例えば、当技術分野において周知の適切な薬学的に許容される担体として、滅菌水、食塩水、グルコース、デキストロース、または緩衝溶液が挙げられるが、これに限定されない。担体として、希釈剤、安定化剤（すなわち、糖およびアミノ酸）、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝剤、増粘剤、顔料などを含むが、これに限定されない補助剤が挙げられ得る。

【0076】

本発明は、例示のために示され、限定するものとして解釈すべきでない以下の実施例によってさらに例示される。全ての参考文献、公開された特許、および本出願を通じて引用された特許の内容は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

40

【0077】

実施例1：pGA1の構造および配列

図1および図2に図示するpGA1は、ColE1複製起点、抗生物質選択のためのカナマイシン耐性遺伝子、λT0ターミネーター、および真核生物発現カセット（上流イントロンを含む）を含む。ColE1複製起点は、複製起点（ori）を含み、RNAプライマーをコードし、2つの負の複製開始レギュレーターをコードする600ヌクレオチドDNA断片である。プラスミド複製のための酵素機能は全て細菌宿主によりもたらされる。ColE1レプリケーターを含む元々の構築プラスミドはpBR322であった（Bolivarら、1977；Sutcliffeら、1978）。

50

【0078】

カナマイシン耐性遺伝子は、細菌におけるプラスミド選択用の抗生物質耐性遺伝子である。λ T Oターミネーターは、原核生物でのプラスミド増殖間の、カナマイシン耐性遺伝子からワクチン転写カセットへの読みとばしを防ぐ (S c h o l t i s s e k および G r o s s e、1987)。ワクチン発現カセットへの読みとばしを防ぐことにより、ターミネーターは、細菌における増殖間でのプラスミド挿入物の安定化を助ける。

【0079】

真核生物発現カセットは、イントロンAを含むCMV即時初期プロモーター (C M V I EーI A)、およびウシ成長ホルモンポリアデニル化配列からの終結配列 (B G H p A) からなる。転写カセット内に、組織プラスミノゲンアクチベーター (t P A) リーダー配列の合成模倣物をオプションとして含める。これらのエレメントを有するカセットは、真核細胞での外来遺伝子発現に非常に有効であることが実証されている (C h a p m a n ら、1991)。転写カセット内のクローニング部位として、t P A リーダーの上流にあるC l a I 部位、t P A リーダーとインフレーションにクローニングするためのN h e I 部位、ならびにB G H p A の前にクローニングするためのX m n I、S m a I、R s r I I、A v r I I、およびB l n I 部位が挙げられる。

10

【0080】

C o l E 1レプリケーター、カナマイシン耐性遺伝子、および真核細胞用の転写制御エレメントは、市販のベクターp Z E r O - 2 (I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A) および真核生物発現ベクターp J W 4 3 0 3 (L u ら、1997) からのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 断片を用いて1つのプラスミドにまとめられた。

20

【0081】

p Z E r O 2 (n t 1 3 1 9 ~ n t 3 1 7 8) からの1853bp断片は、C o l E 1複製起点およびカナマイシン耐性遺伝子を含んでいた。p J W 4 3 0 3 (n t 3 7 6 ~ n t 2 4 1 6) からの2040bp断片は、イントロンAを含むCMV IEプロモーター、組織プラスミノゲンアクチベーター (t P A) リーダーの合成模倣物、およびウシ成長ホルモンポリアデニル化部位 (B G H p A) を含んでいた。S a l I 部位を含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって、断片を増幅した。反対の転写方向でp Z E r O 2 からのカナマイシン耐性転写カセットおよびp J W 4 3 0 3 からの真核生物転写カセットを含む連結産物を、さらなる開発のために特定した。このp G A ベクター母体のヌクレオチド番号付けをCMVプロモーター5'末端の第一番目の塩基対から始めた。

30

【0082】

このp G A ベクター母体にT Oターミネーターを、5'末端にB a m H I 制限エンドヌクレアーゼ部位および3'末端にX b a I 制限エンドヌクレアーゼ部位を含む391bp断片のP C R増幅によって導入した。この断片の最初の355bpは、p J W 4 3 0 3 転写カセットに由来するB G H p A 配列内の配列であり、合成オリゴヌクレオチド内の次の36塩基がT O 配列およびX b a I 部位を導入した。導入されたT Oターミネーター配列は、以下のようなヌクレオチド配列を含んだ。

5'-ATAAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAA-3' (配列番号 :

40

)

【0083】

p X e R O 2 およびp J W 4 3 0 3 から作製されたプラスミド内のT Oターミネーターを含まない相同断片を、T Oターミネーター含有B a m H I - X b a I 断片で置換した。T O方向を確かめるために、この産物を配列決定した。

【0084】

ヌクレオチド1755~1845間の真核生物転写カセットの領域は、S I V n e f のリーディングフレームの最後の30bpを含んだ。n t 1 8 5 8 の配列を変異させ、A v

50

r I I 制限エンドヌクレアーゼ部位を作製することにより、この領域を p G A から除去した。天然の A v r I I 部位が n t 1 7 5 5 にある。A v r I I 酵素による消化、次に、T 4 D N A リガーゼによる再連結によって、ヌクレオチド 1 7 5 5 ～ 1 8 4 5 間の D N A の S I V セグメントを除去した。p G A ベクターへの H I V - 1 配列のクローニングを容易にするために、部位特異的変異誘発を用いて C l a I 部位を第 1 6 4 5 番目の塩基に導入し、R s r I I 部位を第 1 7 4 3 番目の塩基に導入した。構築物を配列分析によって確かめた。

【0085】

実施例 2：p G A 2 の構造および配列

図 3 および図 4 に図示した p G A 2 は、C M V I E プロモーターからイントロン A 配列を欠失した以外は p G A 1 と同一である。C M V I E プロモーターにおける m R N A キャップ部位の 8 b p 下流に C l a I 部位を導入することによって、p G A 1 から p G A 2 を作製した。以下の相補プライマーを用いたオリゴヌクレオチド特異的変異誘発を用いて、C l a I 部位を導入した。

5'-CCGTCAGATCGCATCGATACGCCATCCACG-3' (配列番号 :) 及び

5'-CGTGGATGGCGTATCGATGCGATCTGACGG-3' (配列番号 :) .

【0086】

新たな C l a I 部位を挿入した後、p G A 1 から 9 4 6 b p の C l a I 断片を除去するために p G A 1 を C l a I で消化し、次いで、再連結して p G A 2 を得た。

【0087】

実施例 3：p G A 3 の構造および配列

図 5 および図 6 に図示した p G A 3 は、n t 1 6 4 5 の C l a I 部位の代わりに H i n d I I I 部位を、ヌクレオチド 1 7 4 3 の R s r I I 部位の代わりに B a m H I 部位を導入した以外は p G A 1 と同一である。

【0088】

実施例 4：p G A 3 および p J W 4 3 0 3 の発現および免疫原性の比較

ワクチンベクターとしての p G A プラスミドの効力を確かめるために、p G A プラスミドを、以前に述べられたワクチンベクター p J W 4 3 0 3 と比較した。p J W 4 3 0 3 プラスミドは、マウス、ウサギ、およびアカゲザルにおける D N A ワクチン接種に使用されている (R o b i n s o n ら、1999 ; R o b i n s o n ら、1997 ; P e r t m e r ら、1995 ; F e l t q u a t e ら、1997 ; T o r r e s ら、1999) 。正常な細胞膜型 A / P R / 8 / 3 4 (H 1 N 1) インフルエンザウイルス血球凝集素をコードするワクチン挿入物を含む p G A 3 (p G A 3 / H 1) および同じ断片をコードする p J W 4 3 0 3 (p J W 4 3 0 3 / H 1) を用いて比較を行った。p G A 3 および p J W 4 3 0 3 は両方ともインフルエンザ H 1 配列の上流にイントロン A を含む。

【0089】

p G A 3 / H 1 および p J W 4 3 0 3 / H 1 ワクチンプラスミドは、以下にまとめたように真核細胞においてほぼ同じレベルの H 1 を発現した。

【0090】

【表 5】 HA プラスミドのインビトロ発現レベル

プラスミド	HA 相対単位	
	上清	細胞溶解物
PGA3/H1	0.1±0.1	5.7±0.6
pGA ベクター	0.0±0.0	0.2±0.1
PJW4303/H1	0.3±0.05	4.8±0.5
pJW4303	0.0±0.0	0.1±0.1

【0091】

ヒト胎児腎臓293T細胞にプラスミド2 μ gを一過的にトランスフェクトし、抗原捕獲ELISA (antigen-capture ELISA) を用いて上清および細胞溶解物のH1をアッセイした。捕獲抗体はポリクローナルウサギH1抗血清であり、検出抗体はポリクローナルマウスH1抗血清であった。pGA3/H1は、pJW4303/H1よりわずかに多いH1を発現した(5.8 HA単位に対して5.1 H1単位)(表6)。予想通り、H1抗原の90%が細胞溶解物中にあった。pGA3/H1およびpJW4303/H1を用いた比較免疫化研究によって、pGA3/H1の免疫原性はpJW4303/H1と同等であるか、またはpJW4303/H1より高いことが証明された(図7)。免疫原性はBALB/cマウスにおいて評価した。この実施例では、DNAでコーティングされた金粒子を用いて、遺伝子銃によってマウスにワクチン接種を行った。低用量(0.1 μ g)または高用量(1 μ g)のプラスミドDNAを用いて、マウスに初回抗原刺激および追加抗原刺激を行った。追加免疫化は初回免疫化の4週間後に行った。pGA3/H1による免疫化後の、免疫化に応答して惹起された抗H1 IgG量は、pJW4303/H1による免疫化後の抗H1 IgG量と同じくらいであるか、またはそれより多かった(図7)。従って、pGAベクターは、免疫応答の惹起に、pJW4303ベクターと同じくらい効果があるか、またはpJW4303ベクターより効果があることが実証された。

10

【0092】

実施例5：pGAベクター内の免疫不全症ウイルスワクチン挿入物
ウイルス様粒子を発現する免疫不全症ウイルスワクチン挿入物がpGA1およびpGA2において開発されている。このVLP挿入物は、米国に特有のHIV-1配列と一致するようにクレードB HIV-1配列を用いて設計された。クレードBでは、様々な分離株がクラスター多様性を示し、各分離株は、クレードの共通配列由来の全体的な類似した多様性を有する(Subbarao、Schochetman、1996)。従って、任意のクレードB分離株が、他のクレードB分離株の相応する配列として使用することができる。HIV-1分離株は、補助受容体として様々なケモカイン受容体を用いる。伝播しているウイルスの大部分がCCR-5補助受容体を用いる(Berger、E. A.、1997)。従って、CCR-5を使用するEnvを有するように、ワクチン挿入物を設計した。

20

30

【0093】

HIV-1 DNAワクチンによるR5-Envを含むVLPの発現はまた、プロフェッショナル抗原提示細胞(APC)(例えば、樹状細胞およびマクロファージ)へのEnvによる粒子の侵入を支援するという利点がある。樹状細胞およびマクロファージは両方とも、CD4受容体、およびCCR-5指向性(R5) HIV-1 Envが使用するCCR-5補助受容体を発現する。ワクチンにR5 Envを使用することによって、トランスフェクトされた非プロフェッショナルAPC(例えば、ケラチン生成細胞または筋細胞)において発現されたVLPは、Envによる侵入によってAPC細胞質に侵入することができる。APC細胞質への侵入後、VLPは、プロセッシングおよびクラスI組織適合抗原による提示に用いられる。DNAに基づく免疫化は、抗原提示のためのプロフェッショナルAPCに依存する(Corrら、1996; Fuら、1997; Iwasakiら、1997)。DNAに基づく免疫化の多くは、プロフェッショナルAPCの直接トランスフェクションによって達成される(Condonら、1996; Porgadorら、1998)。トランスフェクトされた筋細胞またはケラチン生成細胞は抗原の工場として働くが、免疫応答を直接惹起しない(Torresら、1997)。集合され、トランスフェクトされたケラチン生成細胞または筋細胞から放出され、次いで、プロフェッショナルAPCに積極的に侵入する発現抗原を使用することによって、免疫化効率を高めることができる。

40

【0094】

pGA2/JS2構築における目標は、(i) CCR-5を使用するクレードB VLP

50

を高発現で得ること、(i i) 非感染性 V L P を産生すること、および (i i i) ワクチンプラスミドのサイズを最小限にすることであった。C C R-5 を使用する V L P (p G A 2 / J S 2) の構築後、E n v 欠損 V L P を発現する J S 2 誘導体を作製した。このプラスミド挿入物を J S 5 と呼んだ。この配列は E n v を含む J S 2 V L P より効果の弱いワクチンであると予想されるが、この E n v を含まない V L P はワクチン接種にある有利な点をもたらす。これらの有利な点として、E n v についてのセロコンバージョンによってワクチン接種集団の感染をモニターできることが挙げられる。E n v 配列の欠失はまたワクチンプラスミドのサイズを小さくする。p G A 2 / J S 2 の D N A 配列を図 1 7 に示し、p G A 1 / J S 5 の D N A 配列を図 1 8 に示す。

【0095】

高発現の V L P プラスミドを得るために、以下の表に示すように候補ワクチンを 7 つの異なる H I V-1 配列から構築した。

【0096】

【表1】 候補ワクチン挿入物の比較

プラスミドの名称	被験配列	プラスミドを増殖させる能力	Gagの発現	Envの発現	補足
BH10-VLP	BH10	良い	良い	良い	X4 Env
6A-VLP	BH10-VLP内の6A env	悪い	試験せず	試験せず	
BAL-VLP	BH10-VLP内のBAL env	良い	悪い	悪い	
ADA-VLP	BH10-VLP内のADA env	良い	良い	良い	ワクチン用に選択され、pGA1/JS1と改名された
CDC-A-VLP	BH10-VLP内のCDC-A env	良い	良い	悪い	
CDC-B-VLP	BH10-VLP内のCDC-B-env	良い	良い	良い	ADAほど好ましい発現ではない
CDC-C-VLP	BH10-VLP内のCDC-C env	良い	良い	良い	ADAほど好ましい発現ではない

【0097】

初期構築物 p B H 1 0 - V L P は、細菌において安定であり、かつ真核細胞において高発現する I I I b 配列から作製された。B H 1 0 配列は、N I H の後援を受けている A I D S 貯蔵所 (カタログ番号 9 0) から入手した。親 p B H 1 0 は、p B H 1 0 - V L P を構築するための P C R 反応の鋳型として使用した。

【0098】

5' から 3' の 1 0 5 b p の 5' 非翻訳リーダー配列ならびに G a g 開始コドンから R T コード配列末端までの g a g 配列および p o l 配列を含む G a g - R t P C R 産物 (5' P C R 産物) を得るように、プライマーを設計した。このオリゴヌクレオチドプライマーによって、P C R 産物の 5' 末端に C l a I 部位が導入され、P C R 産物の 3' 末端に E c o R I 部位および N h e I 部位が導入された。5' P C R 産物を増幅するために、センスプライマー 1

(5'-GAGCTCTATCGATGCAGGACTCGGCTTGC-3' (配列番号 :

))

およびアンチセンスプライマー 2

(5'-GGCAGGTTTTAATCGCTAGCCTATGCTCTCC-

3' (配列番号 :))

10

20

30

40

50

を使用した。

【0099】

H I V-1 e n v 領域の P C R 産物 (3 ' P C R 産物) は、v p u、t a t、r e v、および e n v 配列、ならびにこれらの各 m R N A の正しいプロセッシングおよび発現に必要なスプライスアクセプター部位を含んだ。この産物の 5 ' 末端に E c o R I 部位が導入され、3 ' 末端に N h e I 部位および R s r I I 部位が導入された。3 ' P C R 産物を増幅するために、センスプライマー 3

(5'-

GGGCAGGAGTGCTAGCC-3' (配列番号 :))

10

およびアンチセンスプライマー 4

(5'-

CCACACTACTTTTCGGACCGCTAGCCACCC-3' (配列番号 :))

を使用した。

【0100】

5 ' P C R 産物を p G A 1 に C l a I 部位および N h e I 部位でクローニングし、構築物の同一性を配列決定で確かめた。次いで、3 ' P C R 産物を 5 ' クローンに E c o R I 部位および N h e I 部位で挿入して、p B H 1 0 - V L P を得た。この V L P の構築は、L T R、インテグラーゼ、v i f、および v p r 配列を欠くプロウイルス配列をもたらした (図 8 A を参照のこと) 。

20

【0101】

B H 1 0 - V L P は R 5 E n v ではなく X 4 を有したので、B H 1 0 - V L P の e n v 配列を、6 つの異なる R 5 E n v をコードする配列で置換した。これは、様々なウイルスゲノムに由来する t a t、r e v、v p u、および e n v コード配列を含む E c o R I - B a m H I 断片を p B H 1 0 - V L P にクローニングすることによって行われた。得られた e n v 配列および r e v 配列は、置換配列および B H 1 0 配列のキメラであった (例えば、図 8 B を参照のこと) 。A D A エンベロープの場合、B H 1 0 - V L P の E c o R I - B a m H I 領域を E c o R I - B a m H I 断片で置換するのを容易にするために、A D A 配列に B a m H I 部位を導入した (図 8) 。これらの構築の結果を表 1 にまとめる。6 つの試験配列の 1 つ 6 A - V L P は、形質転換細菌における不十分なプラスミド増殖に関連することが見出された。このプラスミドは、さらなるワクチン開発に使用しなかった (表 1) 。

30

【0102】

細菌において良好な増殖を示すプラスミドのうち、最も良い V L P 発現が A D A - V L P で見出された (表 1) 。2 9 3 T 細胞での一過性トランスフェクションにおいて、A D A - V L P の発現は、A D A または I I I b の野生型プロウイルスの発現より高かった (図 9) 。発現はまた、アカゲザルにおいて細胞傷害性 T 細胞 (T c) 応答を首尾よく初回抗原刺激した (K e n t ら、1 9 9 8) 、以前の V L P - ワクチン (d p o l) (R i c h m o n d ら、1 9 9 8) より高かった。

40

【0103】

実施例 6 : 安全変異 (s a f e t y m u t a t i o n)

さらなるワクチン開発に好ましい候補として A D A - V L P を特定したら、ヒトにおいて使用するための安全性を高めるために、このプラスミドを変異させた。さらなる変異は、ウイルス R N A のキャプシド形成において活発に働く N C のジンクフィンガーを不能にし、ウイルス逆転写酵素およびウイルスプロテアーゼの活性を不活化するように点変異を付加した (図 8) 。以下の表は安全点変異の位置をまとめている。

【0104】

50

【表2】 pGA/JS2およびpGA/JS5における、ウイルスRNAパッケージングを阻害する安全点変異の位置およびワクチン構築物における逆転写酵素活性をなくす安全点変異の位置

遺伝子	領域	機能	アミノ酸変化 ¹	位置
Gag	Znフィンガー	ウイルスRNAパッケージング	C392S	1285/128
Gag	Znフィンガー	ウイルスRNAパッケージング	C392S	1294/129
Gag	Znフィンガー	ウイルスRNAパッケージング	C413S	1348/135
Gag	Znフィンガー	ウイルスRNAパッケージング	C416S	1357/135
Pol	RT	ポリメラーゼ活性	D185N	2460/246
Pol	RT	鎖移動	W266T	2703/2704/2
Pol	RNAse H	RNAse活性	E478Q	3339

10

¹ アミノ酸の番号は、H I V - 1 B H 1 0 配列における個々の遺伝子に対応する。

² 野生型H I V - 1 B H 1 0 配列におけるヌクレオチドの番号。

20

【0105】

部位特異的変異誘発キット (S t r a t a g e n e) を用い製造業者のプロトコールに従って、変異を生じさせた。全ての変異を配列決定によって確かめた。変異誘発に使用したプライマー対は以下の通りであった。

(A) C15S ZN1 5'-GGTTAAGAGCTTCAATAGCGGCAAAGAAGGGC-3'

(配列番号 :)

C15S ZN2 5'-GCCCTTCTTTGCCGCTATTGAAGCTCTTAACC-3'

(配列番号 :)

(B) C36S ZN3 5'-GGGCAGCTGGAAAAGCGGAAAGGAAGG-3' (配列

10

番号 :)

C36S ZN4 5'-CCTTCCTTTCCGCTTTTCCAGCTGCCC-3' (配列

番号 :)

(C) D185N RT1 5'-

20

CCAGACATAGTTATCTATCAATACATGAACGATTTGTATGTAGG-3'

(配列番号 :)

D185N RT2 5'-

CCTACATACAAATCGTTCATGTATTGATAGATAACTATGTCTGG-3'

(配列番号 :)

(D) W266T RT3 5'-GGGGAAATTGAATACCGCAAGTCAGATTTACCC-

30

3' ‡

(配列番号 :)

W266T RT4 5' GGGTAAATCTGACTTGCGGTATTCAATTTCCCC-3'

(配列番号 :)

(E) E478Q

RT5

5'-

CCCTAACTAACACAACAAATCAGAAAACCTCAGTTACAAGC-3'

(配列番号 :)

E478Q

RT6

5'-

GCTTGTAAGTGAAGTTTTCTGATTTGTTGTGTTAGTTAGGG-3'

(配列番号 :)

10

(F) D25A Prt1 5'-GGCAACTAAAGGAAGCTCTATTAGCCACAGGAGC-3'

(配列番号 :)

D25Aprt2 5'-GCTCCTGTGGCTAATAGAGCTTCCTTTAGTTGCC-3'

(配列番号 :)

20

【0106】

ジンクフィンガー変異およびRT変異を含むADA-VLPは、変異のないVLPプラスミドより効率的にGagおよびEnvを発現することが見出された（図10）。プロテアーゼ遺伝子を不活化した変異はVLP発現を著しく低下させ（図10）、ワクチンプラスミドのさらなる開発に含めなかった。変異のないADA-VLPをJS1と呼び、変異のあるADA-VLPをJS2と呼ぶ。

【0107】

実施例7：JS5ワクチン挿入物の構築

Gag、RT、Tat、およびRevを発現するプラスミドであるJS5挿入物は、JS2から、ADA EnvのBgIII断片を欠失させることによって構築された（図8）。この欠失によって、pGA2/JS2配列のnt4906～5486配列が除去され、env遺伝子に未熟停止コドンが生じ、tat、rev、およびvpuコード領域、RRE、ならびにスプライスアクセプター部位が無傷なままで、Envの854アミノ酸のうち269アミノ酸が発現される。pGA1/JS5のDNA配列を図18に示す。

【0108】

実施例8：JS2およびJS5ワクチンプラスミドのサイズの最小化

JS2およびJS5ワクチン挿入物は、元々は、ワクチン挿入物上流にCMVIEプロモーターの約1kbイントロンAを含むベクターであるpGA1において構築された。このイントロンAが高レベルのワクチン発現に必要であるかどうかを確かめるために、イントロンAを欠き、JS2およびJS5ワクチン挿入物を発現するpGA2ベクターが構築された。この発現試験において、pGA2は、JS2についてはpGA1と同じくらい良好な発現パターンを有することが実証された（図11）。この結果とは対照的に、pGA1によるJS5の発現はpGA2によるJS5の発現より非常に効率的であった（図11）。JS5挿入物について、イントロンA非存在下での発現はイントロンA存在下での発現の1/2～1/3であった。

【0109】

実施例9．ワクチン挿入物JS2およびJS5における安全変異の効力についての試験

RTにおける3つの点変異（表2）は、JS2およびJS5の検出可能なレベルの逆転写酵素活性を完全になくした。逆転写産物がPCRによって増幅される非常に感度の高い逆

50

転写酵素アッセイ法を使用した（Yamamoto、Folks、Heneine、1996）。このアッセイ法は、10個と少ないウイルス粒子中の逆転写酵素を検出することができる。逆転写酵素アッセイ法を、一過的にトランスフェクトされた細胞の培養上清に対して行った。JS1ワクチンにおいて10個と少ない粒子（ 4×10^{-3} pgのp24）の逆転写酵素活性が容易に検出されたが、JS2またはJS5挿入物では検出することができなかった。

【0110】

JS2およびJS5ワクチン挿入物における欠失およびジンクフィンガー変異（表2）は、粒子中のウイルスRNAレベルを少なくとも1/1000に低下させた。一過的にトランスフェクトされた細胞の上清からペレット化された粒子を、ウイルスRNAのパッケージング効率について試験した。VLPをDNaseで処理し、RNAを抽出し、RT-PCR前にRNA量をp24レベルによって標準化した。RT-PCR反応の後に、ウイルス配列に特異的なプライマーを用いてネスティッドPCRを行った。VLP RNAの終点希釈（end point dilution）を、野生型HIV-1 BalウイルスにパッケージングされるRNAから得られたシグナルと比較した。

【0111】

JS2およびJS5のパッケージングは両方とも、以下にまとめたようにプラスミドにおける欠失によって1/500～1/1000に制限された。

【0112】

【表3】 pGA2/JS2およびpGA1/JS5 VLPにおいてウイルスRNAパッケージングが

低下する

ワクチン構築物	欠失/変異	野生型HIV-1 bと比較したvRNAコピー
HIV-1 bal	Wt	1
pGA1/JS1 VLP	欠失：LTRs, int, vif, vpr, nef	.002
pGA1/JS2 VLP	欠失：LTRs, int, vif, vpr, nef, ZnフィンガーおよびRTにおける変異	.0001
pGA1/JS4 VLP	欠失：LTRs, int, vif, vpr, nef	.001
pGA1/JS5 VLP	欠失：LTRs, int, vif, vpr, nef, env; ZnフィンガーおよびRTにおける変異	.001

【0113】

ジンクフィンガー変異は、JS2粒子のパッケージング効率をさらに1/20に減少させたが、JS5粒子のパッケージング効率にさらに影響を及ぼさなかった。このパッケージングパターンは、独立したトランスフェクションにおいて産生された粒子について再現可能であった。

【0114】

実施例10：タンパク質発現のウェスタンブロット分析

図12A～Dに示すウェスタンブロット分析によって、pGA2/JS2およびpGA1/JS5の予想発現パターンが明らかになった。細胞溶解物では未熟タンパク質および成熟タンパク質が両方とも観察されたが、VLP含有溶解物では成熟形態のGagおよびEnvしか見出されなかった（図12Bおよび12C）。逆転写酵素は細胞溶解物において容易に検出された（図12D）。

【0115】

実施例11：pGA2/89.6 SHIVベクターの構築

最初の免疫原性試験は、HIV-1を発現するワクチンプラスミドではなくSHIVを発現するVLPを用いて行われた。SHIVは、マカクにおいて良好に増殖する、シミアン

ウイルス配列およびヒト免疫不全症ウイルス配列のハイブリッドである (Liら、1992)。SHIVを使用することによって、少なくとも部分的にはHIV-1起源のワクチンをマカクモデルでの効力について試験することができる。

【0116】

pGA2/89.6 (pGA2/M2とも呼ばれる) は、SHIV-89.6に由来する配列を発現する (Reimann、Li、Vossら、1996; Reimann、Li、Veazeyら、1996)。89.6 Envは患者分離株である (Collmanら、1992)。SHIV-89.6ウイルスは、ワクチン効力の迅速な決定を可能にする高病原性攻撃ストック (challenge stock) (SHIV-89.6 Pと呼ばれる) として利用することができる (Reimann、Li、Vossら、1996; Reimann、Li、Veazeyら、1996)。SHIV-89.6 P攻撃は、直腸内経路および静脈内経路によって投与することができる。SHIV-89.6およびSHIV89.6 Pは交差中和抗体を生じない。

【0117】

pGA2/89.6 (図13) にはpGA2/JS2の設計上の特徴の多くがある。両方とも免疫不全症ウイルスVLPを発現する。pGA2/JS2の場合ではHIV-1 VLPであるのに対して、pGA2/89.6により発現されるVLPはSHIV VLPである。pGA2/89.6におけるgag-pol配列はSIV239に由来するのに対して、tat、rev、およびenv配列はHIV-1-89.6に由来する。pGA2/89.6はまた、インテグラーゼ、vif、およびvpr配列が欠失されておらず、逆転写酵素遺伝子が点変異によって不活化されていない点でpGA2/JS2とは異なる。最後に、NCにおけるジンクフィンガーが、点変異ではなく欠失によって不活化されている。

【0118】

Gag-Pol-Envを発現するpGA2/89.6と共にGag-Pol発現ベクターの防御効率を評価するために、pGA1/Gag-Polも構築した。このベクターはpGA1/JS5およびpGA2/89.6から構築した (図13)。

【0119】

実施例12: pGA2/89.6 SHIVプラスミド発現とpGA2/JS2発現の比較

pGA2/89.6およびpGA1/Gag-Polは両方ともpGA2/JS2とほぼ同じレベルのGagを発現した。発現の比較研究は、一過的にトランスフェクトされた293T細胞で行った。一過的にトランスフェクトされた細胞の溶解物および上清の分析によって、両プラスミドがほぼ同じレベルのキャプシド抗原を発現することが明らかになった (図14)。HIV-1 p24およびSIV p27の市販の抗原捕獲ELISAキットを用いて、キャプシドタンパク質を定量した。

【0120】

実施例13: pGA2/89.6 SHIVワクチンプロトコール

全身DNA初回抗原刺激、それに続く組換えMVA (rMVA) 追加抗原刺激が、SHIV-89.6 P攻撃株 (Amaralら、2001) による粘膜攻撃を防御する能力を調べるために、アカゲザルモデルを使用した。

【0121】

ワクチン (pGA2/89.6) のDNA成分を実施例11に記載のように作製し、免疫不全症ウイルスのサブゲノムスプライシング機構を用いて一本の転写物から8つの免疫不全症ウイルスタンパク質 (SIV Gag、Pol、Vif、Vpx、およびVpr、ならびにHIV Env、Tat、およびRev) を発現させた。rMVA追加抗原刺激 (89.6-MVA) はバーナードモス (Bernard Moss) 博士 (NIH) によって提供され、HIV89.6 EnvおよびSIV239 Gag-Pol (それぞれMVAの欠失IIおよび欠失IIIに挿入) をワクシニアウイルス初期/後期プロモーターの制御下で発現する (WyattおよびMoss、未発表の結果)。89.6 Envタンパ

ク質は g p 4 1 の C 末端 1 1 5 アミノ酸が切断された。改変 H 5 プロモーターが両外来遺伝子の発現を制御した。

【0122】

このワクチン接種試験は、DNA ワクチンの皮内投与および筋肉内投与、ならびにマカク GM-C SF 発現プラスミドである遺伝子アジュバントが、ワクチン挿入物により惹起された免疫応答を高める能力を比較した。ワクチン接種は、0 週および 8 週での DNA による初回抗原刺激および 24 週での r M V A による追加抗原刺激によって行われた。GM-C SF 発現プラスミドの同時送達のために、2.5 mg/ml p G A 2 / 8 9.6 および 2.5 mg/ml p G M-C S F を含む溶液を用いて、1~100 μ l 皮内接種を行った。

10

【0123】

DNA の皮内送達および筋肉内送達を、2 種類の用量 2.5 mg および 250 μ g の DNA について比較した。6 匹のアカゲザルからなる 4 つのワクチン群に、針のないジェット式注射装置 (Bioject、Portland OR) を用いて、皮内 (i. d.) 経路または筋肉内 (i. m.) 経路によって、2.5 mg (高用量) または 250 μ g (低用量) の DNA のいずれかで初回抗原刺激を行った。89.6-M V A 追加免疫化 (2×10^8 p f u) は、針を用いて皮内および筋肉内に注射した。対照群は、2 匹の偽性免疫化動物および 2 匹の投薬されていない動物を含んだ。ワクチン接種プロトコルを以下のようにまとめた。

【0124】

20

【表4】 ワクチン接種試験

群 (マカクの数)	第0週及び第8週での 初回抗原刺激	免疫原	第24週での 追加抗原刺激	免疫原
1 (6)	i.d. バイオジェクト	2.5 mg VLP DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env
2 (6)	i.m. バイオジェクト	2.5 mg VLP DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
3 (6)	i.d. バイオジェクト	250 ug VLP DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
4 (6)	i.m. バイオジェクト	250 ug VLP DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
5 (6)	i.d. バイオジェクト	2.5 mg gag-pol DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol
6 (6)	i.d. バイオジェクト	250 ug gag-pol DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol
7 (6)	i.d. バイオジェクト	250 ug VLP DNA+ 250 ug GM-CSF DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
8 (5)	i.d. バイオジェクト i.d. + i.m. 対照 MVA	2.5 mg 対照 DNA 対照 MVA	i.d. + i.m.	対照 MVA
9 (4)	i.d., バイオジェクト	250 ug 対照 DNA + 250 ug GM-CSF DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
10 (6)	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env

30

40

VLP DNA は N e f を除く全ての S H I V - 8 9.6 タンパク質を発現し、LTR が切断され、2 番目の Z N + + フィンガーが細胞表面 E n v を発現するように変異されている。g a g - p o l DNA は、S I V m a c 2 3 9 g a g - p o l を発現する。M V A g a g - p o l - e n v は、8 9.6 切断 e n v および S I V m a c 2 3 9 g a g - p o l を発現する。M V A g a g - p o l は、S I V m a c 2 3 9 g a g - p o l を発現する。M V A 用量は 1×10^8 p f u である。

【0125】

ワクチンが長期免疫を生じたかどうかを試験するために、r M V A 追加抗原刺激の 7 ヶ月

50

後に動物を攻撃した。ほとんどのH I V-1感染は粘膜表面を横断して伝播されるので、ワクチンが免疫不全症ウイルス粘膜攻撃の蔓延を防ぐことができるかどうかを試験するために、直腸内攻撃を投与した。簡単に述べると、アカゲザルにおける最初のS H I V-89.6 Pストックの1回の静脈内継代、その後の1回の直腸内継代によって、攻撃ストック(1mlにつき 5.7×10^9 コピーのウイルスRNA)を作製した。リンパ球をウイルス血症ピークで直腸内感染動物から採取し、CD8を枯渇させ、ストック作製のためにマイトジェンで刺激した。直腸内攻撃前に、絶食させた動物を麻酔し(ケタミン、10mg/kg)、骨盤部位を少し高い位置にして腹這いにした。栄養チューブ[8Fr(2.7mm)×16インチ(41cm)、シャーウッドメディカル(Sherwood Medical)、St. Louis、MO]を直腸に15~20cm挿入した。栄養チューブの挿入後、RPMI-1640+10%ウシ胎児血清(FBS)2mlに20直腸内感染用量を含む注射器を栄養チューブに取り付け、接種物を直腸にゆっくりと注入した。接種物を送達した後、栄養チューブにウシ胎児血清を含まないRPMI 3.0mlを流し、次いで、チューブをゆっくりと引き抜いた。攻撃後10分間、動物を、骨盤部位を少し高い位置にして同じ位置で固定した。

10

【0126】

実施例14：ワクチンで惹起されたT細胞応答

図15に示すように、DNA初回抗原刺激、それに続くrMVA追加抗原刺激によって高頻度のウイルス特異的T細胞が生じ、これはrMVA追加抗原刺激の1週間後にピークに達した。Gag-CM9エピトープを認識するT細胞の頻度を、Mamu-A*01-四量体を用いて評価した。GagおよびEnv全体にわたるエピトープを認識するT細胞の頻度を、重複Gagペプチドおよび重複Envペプチドのプールならびに酵素結合イムノスポット(enzyme linked immunospot: ELISPOT)法を用いて評価した。

20

【0127】

四量体分析のために、約 1×10^6 個のPBMCの表面を、CD3抗体(FN-18、Biosource International、Camarillo、CA)、CD8抗体(SK1、Becton Dickinson、San Jose、CA)、およびGag-CM9(CTPYDINQM)-MamuA*01四量体抗体(それぞれ、FITC、PerCP、およびAPCに結合)を用いて、100μlの体積で8~10℃で30分間、染色した。細胞を、2%FBSを含む冷PBSで2回洗浄し、PBSに溶解した1%パラホルムアルデヒドで固定し、24時間以内に、FACScaliber(Becton Dickinson、San Jose、CA)で分析を行った。細胞を、最初に、前方散乱光および側方散乱光を用いてリンパ球集団にゲーティングし、次いで、CD3細胞にゲーティングした。次いで、CD3細胞を、CD8細胞および四量体結合細胞について分析した。各試料について約150,000個のリンパ球を得た。FloJoソフトウェア(Tree Star, Inc.、San Carlos、CA)を用いて、データを分析した。

30

【0128】

IFN-γELISPOTのために、MULTISCREEN 96ウェル濾過プレート(Millipore Inc.、Bedford、MA)を、2μg/mlの濃度で重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)に溶解した抗ヒトIFN-γ抗体(クローンB27、Pharmingen、San Diego、CA)で、8~10℃で一晩コーティングした。プレートをRPMI培地で2回洗浄し、次いで、完全培地(10%FBS含有RPMI)で37℃で1時間ブロックした。プレートを何も添加していないRPMI培地でもう5回洗浄し、 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/ウェルの数の細胞を完全培地100μlに二つ組播種した。ペプチドプールを完全培地に溶解して各ペプチド最終濃度2μg/ml、体積100μlで各ウェルに添加した。細胞を、5%CO₂、37℃で約36時間培養した。プレートを洗浄緩衝液(0.05%Tween-20含有PBS)で6回洗浄し、次いで、2%FBSを含む洗浄緩衝液で希釈した1μg/mlビオチン化抗ヒトIFN

40

50

γ抗体（クローン7-86-1、Diapharma Group Inc.、West Chester、OH）とインキュベートした。プレートを37℃で2時間インキュベートし、洗浄緩衝液で6回洗浄した。アビジン-HRP（Vector Laboratories Inc、Burlingame、CA）を各ウェルに添加し、37℃で30～60分間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で6回洗浄し、安定なDAB（Research Genetics Inc.、Huntsville、AL）を基質として用いてスポットを発色させた。立体解剖顕微鏡を用いてスポットを数えた。オボアルブミンペプチド（S I I N F E K L）を各分析において対照として含めた。オボアルブミンペプチドのバックラウンドスポットは、一般的に、 5×10^5 PBMCの場合<5であった。このバックラウンドは、 1×10^6 PBMCについて標準化された場合、<10であった。このバックラウンドの2倍（ ≥ 20 ）のELISPOT総数だけを有意とみなした。細胞希釈が異なるとフィーダー細胞の非存在下でのスポット形成の効率が異なるので、ELISPOTの頻度は概算値である（34）。ある特定の時点の全ての動物について同じ細胞希釈を使用した。記憶応答（memory response）およびピークエフェクター応答（peak effector response）を検出するために異なる希釈を使用した。

【0129】

ワクチン接種群での、追加抗原刺激後のELISPOT応答と攻撃後のELISPOT応答の相関関係、記憶ELISPOT応答と攻撃後のELISPOT応答の相関関係、およびウイルス負荷（viral load）対数とELISPOT頻度の相関関係を評価するために、単回帰分析を使用した。ウイルス負荷対数およびELISPOT応答対数を用いた2標本t検定によって、ワクチン群と対照群の比較を行った。2標本t検定を用いて、 A^*01 マカクと非 A^*01 マカクとのELISPOTまたはウイルス負荷対数の比較を行った。ピークDNA/MVA ELISPOT、記憶DNA/MVA ELISPOT、および対数変換されたGag抗体データに及ぼす用量および投与経路の影響を調べるために、二元配置の分散分析を使用した。

【0130】

Gag-CM9四量体分析は、Mamu-A*01組織適合型を発現するマカクに制限されたが、ELISPOT応答は特定の組織適合型に依存しなかった。T細胞応答の急性（エフェクター細胞ピーク）期および長期（記憶）期の両方をスコア付けるために、時間T細胞アッセイ法を設計した（図15A）。予想通り、DNA免疫化によって低レベルの記憶細胞が惹起され、これはrMVA追加抗原刺激の1週間以内に高頻度まで増殖した（図15）。Mamu-A*01マカクにおいて、Gag-CM9エピトープ特異的細胞は、総CD8⁺T細胞の19%という高い頻度まで増殖した（図15Bの動物2を参照のこと）。この特異的細胞ピークは、DNA/MVA記憶プールに1/10以下に縮小した（図15AおよびB）。Gagペプチドの3つのプールのELISPOTもまた、DNA/MVA記憶応答に縮小する前に大幅に増大した（ 1×10^6 PBMCの場合4000スポットまでの頻度）（図15C）。ELISPOTの頻度は、 A^*01 組織適合型のあるマカクおよび A^*01 組織適合型のないマカクにおいて同じであった（ $P > 0.2$ ）。ワクチン応答のピーク期および記憶期の両方で、異なるワクチン群におけるELISPOTの高さ（height）の順序は、2.5mg皮内>2.5mg筋肉内>250μg皮内>250μg筋肉内であった（図15C）。IFN-γ-ELISPOTはCD4細胞およびCD8細胞の両方を含んだ（進行中の研究）。ペプチドによる再刺激後の、Gag-CM9特異的CD8細胞の溶解活性は良好であった（データ示さず）。

【0131】

印象的なことに、非近交動物集団において、GagおよびEnv全体にわたるペプチドのプールがIFN-γ-ELISPOTを刺激した（図16A）。ワクチンで惹起されたT細胞が記憶期にある時期であるrMVA追加抗原刺激の25週間後に、細胞応答の幅を試験した。Gagペプチドの7プールのうち7つ、およびEnvペプチドの21プールのうち16がワクチン接種動物のT細胞によって認識された。認識されなかった5つのEnv

プールのうち2つは、米国疾病管理センターでのマカクDNA/MVAワクチン試験において認識されている（データ示さず）。残りの3つ（プール19～21）は本発明者らの免疫原において切断されており（Amararaら、2001、提出済み）、負の対照とした。GagおよびEnv ELISPOTの頻度は、DNA/MVA記憶応答において全般的にはほぼ同じであった（図16B）。最大の応答幅は高用量皮内DNA初回抗原で刺激された動物の幅であり、平均して10のペプチドプール（4.5 Gagおよび5.3 Env）が認識された。幅についてのワクチン群の順序はピークDNA/MVA応答と同じであった：2.5mg皮内>2.5mg筋肉内>250μg皮内>250μg筋肉内（図16B）。

【0132】

実施例15：AIDSの攻撃およびAIDSに対する防御

ワクチンで惹起されたT細胞が記憶期にあるrMVA追加抗原刺激の7ヶ月後に、高病原性SHIV-89.6P攻撃を直腸内に投与した（図15）。

【0133】

SHIVコピー数の決定：

QIAamp Viral RNAキット（Qiagen）を用いて、ACDで血液凝固阻止された血漿150μlからウイルスRNAを直接抽出し、AVE緩衝液60μlに溶出し、SHIV RNA定量を行うまで-80℃で凍結させた。50mM KCl、10mM Tris-HCl（pH8.3）、4mM MgCl₂、1mM各dNTP、2.5μM ランダムヘキサマー、20単位MultiScribe RT、および8単位RNase 阻害剤を含む最終体積20μl中で、精製血漿RNA 5μlを逆転写した。反応物を25℃で10分間インキュベートし、続いて、42℃で20分間インキュベートし、逆転写酵素を99℃で5分間不活化させた。50mM KCl、10mM Tris-HCl（pH8.3）、4mM MgCl₂、0.4mM各dNTP、0.2μMフォワードプライマー、0.2μMリバープライマー、0.1μMプローブ、および5単位AmpliTaq Gold DNAポリメラーゼを含む最終体積50μlに、反応混合物を調節した（全ての試薬はパーキンエルマーアプライドバイオシステムズ（Perkin Elmer Applied Biosystems）、Foster City、CAから入手した）。SHIV gag遺伝子の保存部分内のプライマー配列は以前に述べられたものと同じである（Staprans, S. ら、1996）。

【0134】

パーキンエルマーアプライドバイオシステムズ（Perkin Elmer Applied Biosystems）7700配列検出システム（Sequence Detection System）を、PCRプロフィール：95℃10分、続いて93℃30秒、59.5℃1分の40サイクルと共に使用した。7700配列検出器および内部保存gag遺伝子配列に対するプローブを用いて、PCR産物の蓄積をモニターした。ここで、FAMおよびTamraはレポーター色素およびクエンチャー色素を示す。SHIV bDNA法（Bayer Diagnostics、Emeryville、CA）により定量されたビリオン由来SHIVmac239 RNAからなる外部標準曲線との比較によって、SHIV RNAコピー数を決定した。全ての標本を抽出し、二つ組増幅し、平均結果を記録した。0.15mlの血漿投入量で、アッセイ法の感度は10³ コピーRNA/ml血漿であり、線形動的範囲は10³～10⁸ RNAコピーである（R²=0.995）。アッセイ内変導係数（intra-assay coefficient of variation）は、>10⁴ SHIV RNAコピー/mlを含む試料については<20%であり、10³～10⁴ SHIV RNAコピー/mlを含む試料については<25%である。16週目および20週目のワクチン接種動物における少ないSHIV RNAコピー数をより正確に定量するために、SHIV RNAアッセイ法の感度を高める以下の変更を行った：1) ≤1mlの血漿からのビリオンを23,000g、10℃で150分間の遠心分離によって濃縮し、ウイルスRNAを抽出した；2) 一段階RT-PCR法を使用した。SHIV RNAコピーの絶対数を同じSHIVmac239標準との比較に

10

20

30

40

50

よって決定した。これらの変更によって、300コピーSHIV RNA/mlの信頼性の高い定量限界、および最初の使用した方法により得られた値と非常に相関するSHIV RNA値が得られた ($r = 0.91$ 、 $p < 0.0001$)。

【0135】

攻撃結果：

攻撃は、ワクチン接種動物および対照動物の全てに感染した。しかしながら、攻撃2週間後までに、ワクチン群の血漿ウイルスRNA力価（幾何平均 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ ）は、対照動物（幾何平均 4×10^8 ）の少なくとも $1/10$ であった（図19A）。攻撃8週間後までに、高用量DNA初回抗原刺激群および低用量皮内DNA初回抗原刺激群は両方とも、負荷の幾何平均を約1000コピーウイルスRNA/mlまで減らした。この時、低用量筋肉内DNA初回抗原刺激群のウイルスRNAコピーの幾何平均は 6×10^3 であり、非ワクチン接種対照の幾何平均は 2×10^6 であった。攻撃20週間後までに、低用量筋肉内群でさえもウイルスRNAコピーの幾何平均を1000まで減らした。この時、非ワクチン接種対照はAIDSで死につつあった。24匹のワクチン接種動物のうち、低用量筋肉内群の1匹の動物でしか断続的ウイルス負荷が 1×10^4 コピー/mlを上回らなかった（図19D）。

【0136】

ウイルス負荷の急速な減少が、ワクチン接種されたマカクをCD4細胞喪失および急速なAIDS発症から守った（図19B、19C、19E）。攻撃5週間後までに、非ワクチン接種対照の全てが、SHIV-89.6P感染の特徴である完全なCD4細胞枯渇をこうむった（図19B）。CD4がゆっくりと減少した（図19E）、動物22（前記を参照のこと）を除くワクチン接種動物の全てがCD4細胞を維持した。攻撃23週間後までに、4匹の対照動物のうち3匹がAIDSで死んだ（図19C）。これらの動物には、様々な程度の、下痢を伴う全腸炎、クリプトスポリジウム症、大腸菌性膀胱炎、腸内カンピロバクター感染、巨脾腫（splenomegaly）、リンパ節症、およびSIV関連巨細胞性肺炎があった。対照的に、24匹全てのワクチン接種動物が健康を保った。

【0137】

細胞内サイトカインアッセイ法：

5mlポリプロピレンチューブ内で、0.1%BSAならびに抗ヒトCD28および抗ヒトCD49d（Pharmingen Inc.、San Diego、CA）補助刺激抗体（ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含むRPMI 100 μl の体積中、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のGag-CM9ペプチド（CTPYDINQM）を用いて、約 1×10^6 PBMCを37℃で1時間刺激した。10%FBSおよびモネンジン（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含むRPMI 900 μl を添加し、細胞を、5%CO₂下、5度の角度で、37℃でさらに5時間培養した。細胞の表面を、PerCP結合CD8抗体（クローンSK1、Becton Dickinson）を用いて8℃～10℃で30分間染色し、2%FBSを含む冷PBSで2回洗浄し、固定し、Cytotfix/Cytoperm溶液（Pharmingen Inc.）で浸透性を高めた。次いで、細胞を、Perm洗浄溶液（Pharmingen）に溶解したヒトCD3抗体（クローンFN-18、Biosource International、Camarillo、CA）およびIFN- γ 抗体（クローンB27、Pharmingen）（それぞれ、FITCおよびPEに結合）と4℃で30分間インキュベートした。細胞を、Perm洗浄溶液で2回、何も添加していないPBSで1回洗浄し、PBSに溶解した1%パラホルムアルデヒドに再懸濁した。FACScaliberで約150,000個のリンパ球を得、FloJoソフトウェアを用いて分析した。

【0138】

増殖アッセイ法：

約20万個のPBMCを、10%FCSを含むRPMIに溶解して体積200 μl で適切な抗原を用いて、5%CO₂下、37℃で5日間、三つ組刺激した。SHIV-89.6 GagおよびPolまたはSHIV-89.6 Gag、Pol、およびEnvのいずれかを発現するDNAでトランスフェクトされた293T細胞からの上清を、抗原として直

接使用した。偽性DNA（ベクターのみ）でトランスフェクトされた細胞からの上清は、負の対照とした。6日目に、細胞を、ウェル1個につき1 μ Ciのトリチウム化チミジンで16～20時間パルス標識した。細胞を、自動セルハーベスター（TOMTEC、Harvester 96, Model 1010、Hamden、CT）を用いて採取し、Wallac 1450 MICROBETAシンチレーションカウンター（Gaithersburg、MD）を用いて計測した。刺激指数は、89.6抗原で刺激されたPBMCに取り込まれたトリチウム化チミジンの総数／偽性抗原で刺激された同じPBMCに取り込まれたトリチウム化チミジンの総数である。

【0139】

攻撃後T細胞結果：

ウイルス攻撃の封じ込めは、抗ウイルスT細胞の爆発と関連していた（図15；図20A）。攻撃1週間後に、末梢血中の四量体+細胞の頻度は減少した。これは、もしかすると、感染部位への特異的T細胞の動員を反映しているのかもしれない（図20A）。しかしながら、攻撃2週間後までに、末梢血中の四量体+細胞は、MVA追加抗原刺激後と同じくらいの頻度またはそれより高い頻度まで急速に増殖した（図15、20A）。四量体+細胞の大部分は、ペプチドGag-CM9による6時間の刺激にตอบสนองしてIFN- γ を産生し（図20B）、慢性ウイルス感染において時々観察される「静かな（stunned）」IFN- γ の負の表現型を有さなかった。攻撃後のT細胞の爆発はウイルス負荷の低下を伴った。攻撃12週間後までに、ウイルス特異的T細胞はピーク高さの約1／10であった（図15A、20A、およびデータ示さず）。ピークDNA／MVA誘導ELISPOTの高さは、ELISPOTにより測定された攻撃後T細胞応答の高さの前兆となった（ $r=+0.79$ 、 $P<0.0001$ ）。ワクチン接種動物における勢いのある二次応答とは対照的に、投薬されていない動物は弱い一次応答を展開した（図15B、15C、および20A）。四量体+細胞は総CD8細胞の1%未満でピークに達し（図20A）、ワクチン群での1000～6000の非常に高い頻度とは対照的に、IFN- γ 産生T細胞は約300の平均頻度で存在した（図15C）（ $P<0.05$ ）。対照群での四量体+細胞は、ワクチン群での四量体+細胞と同様に、Gag-CM9ペプチドによる刺激後に主にIFN- γ を産生する（図20B）。攻撃12週間後までに、4匹の対照のうち3匹のIFN- γ 産生T細胞は検出不可能なレベルであった（データ示さず）。高ウイルス負荷の存在下での抗ウイルスCD8細胞のこの急速な喪失は、CD4の助けが無いことを反映しているのかもしれない。

【0140】

T細胞増殖応答によって、ウイルス特異的CD4細胞は攻撃から生き残り、抗ウイルス免疫応答を支援できることが証明された（図20C）。攻撃12週間後で、Gag-Pol-E ν またはGag-Polタンパク質の平均刺激指数はワクチン群において35～14であったが、対照群では検出することができなかった。増殖アッセイ法と一致して、細胞内サイトカインアッセイ法によって、ワクチン接種動物にはウイルス特異的CD4細胞が存在するが、対照動物には存在しないことが証明された（データ示さず）。増殖応答の大きさについてのワクチン群の全体的な順序は、2.5mg皮内>2.5mg筋肉内>250 μ g皮内>250 μ g筋肉内であった。

【0141】

リンパ節の保存：

攻撃12週間後で、ワクチン接種動物からのリンパ節は形態学的に完全な状態のままであり、感染にตอบสนองしていたが、感染した対照からのリンパ節は機能が破壊されていた（図5）。ワクチン接種動物からのリンパ節は、拡大した胚中心ならびに不連続な暗い区域および明るい区域のある多数の反応性二次濾胞を含んだ（図5A）。対照的に、ワクチン接種されていない対照動物からのリンパ節は濾胞および傍皮質の喪失を示したのに対して（図5B）、ワクチン接種されておらず、攻撃されていない動物からのリンパ節は、正常な数の最小限に反応性の胚中心を示した（図5C）。胚中心は、感染対照ではリンパ節総面積の<0.05%、非感染対照ではリンパ節面積の2%、ワクチン接種群ではリンパ節面積

10

20

30

40

50

の18%までを占めた(図5D)。低用量DNA初回抗原刺激を与えた動物の胚中心が占めるリンパ節面積は、高用量DNA初回抗原刺激を与えた動物の約2倍であった。このことは、低用量動物における勢いのある免疫反応性を示唆している(図5D)。攻撃12週間後での、ウイルスRNAのインサイチュハイブリダイゼーションによって、24匹のワクチン接種マカクのうち3匹からのリンパ節において、ウイルスを発現する細胞は極めて少ないことが明らかになったが、各感染対照動物からのリンパ節において、ウイルスを発現する細胞は容易に検出された(図5E)。CD4 T細胞が完全に枯渇した対照において、感染リンパ節細胞の細胞形態はマクロファージの表現型と一致した(データ示さず)。

【0142】

時間的抗体応答：

総抗Gag抗体に対するELISAは、ウェルをコーティングするために細菌産生SIV gag p27 (2 µg/ml、重炭酸緩衝液に溶解)を使用した。抗Env抗体に対するELISAは、一過的にトランスフェクトされた293T細胞において産生された89.6 Env (ヒツジEnv抗体(カタログ番号6205; International Enzymes, Fairbrook CA)を用いて捕獲された)を使用した。SHIV-89.6感染マカクからの血清と既知量の抗Gagまたは抗Env IgGを用いて、GagおよびEnv ELISAの標準曲線を作製した。ヤギ抗マカクIgG-PO (カタログ番号YNGMOIGGFCP, Accurate Chemical, Westbury, NY) およびTMB基質(カタログ番号T3405, Sigma, St. Louis, MO)を用いて、結合抗体を検出した。血清を、二つ組のウェルにおいて3倍希釈でアッセイした。試験血清の希釈を、乳清緩衝液(1×PBSに溶解した4%乳清および0.1% tween 20)に溶解して行った。ブロッキング緩衝液は、乳清緩衝液+0.5%脱脂粉乳からなった。反応を2M H₂SO₄で止め、光学密度を450nmで読み取った。SOF Tmax 2.3ソフトウェア(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて、標準曲線をフィットさせ、試料濃度をµg抗体/ml血清として挿入した。

【0143】

結果は、初回抗原刺激/追加抗原刺激ストラテジーが低レベルの抗Gag抗体および検出不可能なレベルの抗Env抗体を惹起したことを示した(図22)。しかしながら、攻撃後、Env抗体およびGag抗体は両方とも既往反応を受け、総Gag抗体は1mg/mlに近い高さに達し、総Env抗体は100 µg/mlまでの高さに達した(図22AおよびB)。

【0144】

攻撃2週間後までに、高用量DNA初回抗原刺激群において、89.6免疫原に対する中和抗体は存在したが、SHIV-89.6P攻撃に対する中和抗体は存在しなかった(幾何平均力価は皮内群では352、筋肉内群では303)(図22C)。攻撃5週間後までに、89.6Pに対する中和抗体が生じ(幾何平均力価は高用量皮内群では200、高用量筋肉内群では126)(図22D)、89.6に対する中和抗体は低下し始めた。従って、89.6に対する抗体応答の初回抗原刺激は、SHIV-89.6Pに対する中和抗体につながるB細胞応答を妨げなかった。攻撃16~20週間後までに、Gag抗体およびEnv抗体はほとんどの動物において減少した(図22AおよびB)。これは、ウイルス感染の蔓延の阻止と一致した。

【0145】

T細胞は防御と相関関係にある

攻撃2週間後および3週間後の血漿ウイルスRNAレベルは、DNA/MVA惹起IFN-γ ELISPOTのピーク攻撃前頻度と逆の相関関係にあった(それぞれ、 $r = -0.53$ 、 $P = 0.008$ 、および $r = -0.70$ 、 $P = 0.0002$)(図23A)。

【0146】

重要なことに、これらの相関関係は、免疫応答がウイルス血症レベルを活発に下げていた

10

20

30

40

50

間に観察された。攻撃後の後の時間で、検出レベルまたは検出レベル未満のウイルス負荷のクラスタリングは相関関係を排除した。ウイルス負荷と、攻撃後 E L I S P O T、増殖応答、および中和抗体応答との相関関係も求めた。攻撃 2 週間後の I F N - γ E L I S P O T レベルは、攻撃 3 週間後のウイルス負荷と相関関係にあった ($r = -0.51$ 、 $P = 0.009$) (データ示さず)。攻撃後の増殖応答と中和抗体応答はウイルス負荷と相関関係になかった。

【0147】

用量および経路

DNA の用量は、細胞性応答および体液性応答に有意な影響を及ぼしたのに対して ($P < 0.05$)、DNA の投与経路は体液性応答にだけ有意な影響を及ぼした (図 23C ~ E)。DNA 送達の皮内経路は筋肉内経路より Gag 抗体産生に約 10 倍効果があった ($P = 0.02$) (図 23E)。本発明者らのデータセット内で、皮内 DNA 注射は、ウイルス特異的 T 細胞の高さおよび幅の初回抗原刺激に約 3 倍効果があった (図 23C および D)。しかしながら、これらの差異は有意ではなかった (高さ、 $P = 0.2$; 幅、 $P = 0.08$)。興味深いことに、DNA の経路および用量は防御の程度に有意な影響を及ぼさなかった。攻撃 20 週間後の、高用量 DNA 初回抗原刺激動物のウイルス RNA レベルの幾何平均 (7×10^2 および 5×10^2) は、低用量 DNA 初回抗原刺激動物 (9×10^2 および 1×10^3) よりわずかに少なかった。最も高い断続的ウイルス負荷を有する動物 (マカク 22) が低用量筋肉内初回抗原刺激群にあった (図 19D)。従って、ウイルス血症の蔓延を防ぐのが遅かった (図 19A)、低用量筋肉内初回抗原刺激群は、十分な長期防御を示さない可能性がある。この応答の幅は、ウイルス負荷の封じ込めに対して速やかな効果がなかったが、時間と共にウイルス回避の頻度に影響を及ぼすかもしれない。

【0148】

これらの結果は、多タンパク質 DNA / MVA ワクチンが、非常に毒性のある免疫不全症ウイルス粘膜攻撃の蔓延を防ぐことができる記憶免疫応答を惹起できることをはっきりと証明している。本発明者らの、優れたウイルス蔓延防止レベルは、DNA または rMVA ワクチンだけを用いて達成されたもの (Egan ら、2000; I. Ourmanov ら、2000) より好ましく、アジュバントとしてインターロイキン-2 を使用した DNA 免疫化で得られたもの (Barouch ら、2000) に匹敵する。これらの以前の研究の全てが 3 回を超えるワクチン接種を使用し、誰も粘膜攻撃を使用しておらず、ほとんどがピークエフェクター応答で攻撃し、本発明者らの研究でなされたように「長期」効力を試験するためにワクチン接種後長い期間をとらなかった。本発明者らの結果はまた、I F N - γ E L I S P O T によって測定された、ワクチンで惹起された T 細胞がウイルス血症の蔓延の防止と相関することを初めて証明している。今や、この比較的簡単なアッセイ法は、H I V - 1 の DNA および MVA 免疫原の前臨床評価に使用することができ、ヒトにおける臨床試験の効力のマーカーとして使用できるはずである。

【0149】

DNA / MVA ワクチンは感染を阻止しなかった。正しくは、このワクチンは感染の蔓延を妨げ、ウイルス負荷を血液 1 ml につき 1000 コピーのウイルス RNA 近くまでまたはそれ未満に急速に減少させた。感染の阻止ではなく封じ込めは、ウイルスに慢性感染を確立する機会を与える (Chun ら、1998)。それにもかかわらず、多タンパク質 DNA / MVA ワクチンは、急速にウイルス負荷を減らすことによって長期間進行しない可能性を広げ、H I V 蔓延を制限する。

【0150】

実施例 16: Gag - Pol ワクチン試験

ワクチンに Env を含める重要性を確かめるために、Gag - Pol - Env ではなく Gag - Pol を発現する免疫原を用いた試験を行った (構築物については図 27 を参照のこと)。Env を含まなかったワクチンには、この分野においてある利点 (例えば、感染マーカーとして抗 Env 抗体をスクリーニングできること) があった。この試験は、pG A1 / Gag - Pol およびバーナードモス博士 (N I H - N I A I D) により提供さ

れたS I V 2 3 9のG a g - P o l配列を発現するr M V A (M V A / G a g - P o l)を使用した。

【0151】

「G a g - P o l」免疫原は、「G a g - P o l - E n v」(p G A 2 / 8 9 . 6 M V A / 8 9 . 6)免疫原について前記実施例13に記載したスケジュールを用いて投与した(表4、群5および群6を参照のこと)。高用量群および低用量群を初回抗原刺激するために同じDNA用量2.5mgおよび250μgを使用し、皮内経路によって投与を行った。実施例13~15に記載の前記ワクチン試験と同様に、2~3匹のm a m u A * 0 1マカクを各試験群に含めた。p 1 1 c - m四量体を用いて、および前記実施例に記載のように重複ペプチドプールによって刺激されたE L I S P O Tを用いて、p 1 1 c - mエピトープに特異的なT細胞応答についてT細胞応答を追跡した。 10

【0152】

免疫化後、ワクチンレシピエントは、G a g - P o l - E n vワクチン試験で観察されたものと同様の抗G a g T細胞応答を示した。r M V A追加抗原刺激の7.5ヵ月後に、動物の直腸内をS H I V - 8 9 . 6 Pで攻撃した(図28)。急速なC D 4細胞喪失から動物を守ったG a g - P o l - E n vワクチンプロトコルとは対照的に、G a g - P o l動物は一樣にC D 4細胞を喪失した(図28Bおよび28D)。この喪失は、低用量皮内DNA初回抗原刺激を与えた群において最も顕著であった。C D 4細胞喪失と一致して、G a g - P o l DNA免疫化群はまた、G a g - P o l - E n v群よりウイルス負荷の低下に効果がなかった(図28Aおよび28C)。これらの群の幾何平均ウイルス負荷は攻撃3週間後で10~100倍多く、攻撃5週間後で10倍多かった。これらの結果は、E n v遺伝子が、攻撃された動物においてC D 4細胞防御およびウイルスRNAレベル低下に重要な役割を果たしていることを証明している。これらの結果はまた、G a g - P o l - E n v DNA / M V Aワクチンが、有害な攻撃からのレシピエントの防御においてG a g - P o l DNA / M V Aワクチンより効果的に機能することを示している。 20

【0153】

実施例17：麻疹挿入物

ワクチン接種によってより早くかつ効率的な抗H抗体応答が得られるかどうかを確かめるために、麻疹Hおよび補体成分C 3 dの融合を発現するDNAワクチンを使用した。デンプセイ(D e m p s e y)らによるマウスでの以前の研究において、2または3コピーのC 3 dとモデル抗原であるニワトリ卵白リゾチームとの融合は、免疫化効率を1000倍を超えて増大させた(D e m p s e yら、1996)。これは、血球凝集素阻害(H I)活性および防御免疫の急速な出現をもたらした(R o s sら、2000およびR o s sら、2001)。 30

【0154】

ヒト免疫系において、補体活性化の1つの結果は、活性化タンパク質への第3補体タンパク質C 3 d断片の共有結合である。次に、C 3 dは、Bリンパ球活性化を増幅するB細胞刺激機能を有する分子である、Bリンパ球上のC D 2 1に結合する。麻疹H-C 3 d融合タンパク質において、融合のH部分は、B細胞上の抗H I g受容体に結合し、このB細胞受容体を介してシグナルを発するのに対して、融合のC 3 d部分はC D 2 1に結合し、C D 1 9を介してシグナルを発すると考えられる。この仮説において、H-C 3 d融合タンパク質に応答するB細胞は、Hのみに応答するB細胞より効果的なシグナリングを受けると考えられる。分泌型Hと3コピーのC 3 dとの融合(s H - 3 C 3 d)を発現するDNAでワクチン接種されたマウスは、s Hのみを発現するDNAより中和抗体活性の急速な出現および高いレベルを生じた。 40

【0155】

プラスミドDNA：

真核生物挿入物転写開始のための2コピーのサイトメガロウイルス即時初期プロモーター(C M V - I E) + イントロンA (I A)、および転写終結のためのウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル(B G H ポリA)を含むように、p T R 6 0 0真核生物発現ベクタ 50

ーを構築した。このベクターは、遺伝子セグメントの簡単な挿入のためのマルチクローニングサイト、原核生物複製のためのC o l E 1複製起点、および抗生物質培地での選択のためのカナマイシン耐性遺伝子 (K a n^r) を含む (図29A)。

【0156】

エドモントン (E d m o n t o n) 株に由来する血球凝集素 (H) c D N A 配列およびC3d配列を以前に述べられたようにクローニングし、固有の制限エンドヌクレアーゼ部位を用いてpT R 6 0 0ワクチンベクターに導入した (図29B)。Hの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠失させることによって、分泌型を作製した。これは、組織プラスミノゲンアクチベーター (t p A) リーダー配列のN末端合成模倣物とインフレイムでH遺伝子の断片をクローニングするためにP C Rを用いて達成された (T o r r e s ら、2000)。

【0157】

s H-C3d融合タンパク質を発現するベクターは、以前に述べられたように、s H遺伝子3'末端とインフレイムでマウスC3dホモログの3つの縦列反復をクローニングすることによって作製された (D e m p s e y、1996; R o s s ら、2000; およびR o s s ら、2001)。構築物設計はデンプセイ (D e m p s e y) らに基づいており、p S L G-C3dからの配列を使用した。4個のグリシンおよび1個のセリンの2回の反復 { (G₄S)₂ } からなるリンカーは、HおよびC3dの接合部で、および各C3d反復間で融合された。C3d接合部ならびにs HおよびC3dの接合部の間の潜在的なタンパク質分解切断部位は、A r g コドンにG l y コドンに変異させるB a m H I およびB g l I I 融合を用いることによって変異された。

【0158】

プラスミドを大腸菌D H 5 α株において増幅し、陰イオン交換樹脂カラム (Q i a g e n、V a l e n c i a、C A) を用いて精製し、d H₂Oに溶解して-20℃で保存した。適切な制限酵素消化およびゲル電気泳動によってプラスミドを確かめた。260nmおよび280nmでの光学密度を読み取ることによって、D N A 調製物の純度を測定した。

【0159】

マウスおよびD N A 免疫化：

接種のために、6~8週齢のB A L B/cマウス (H a r l a n S p r a g u e D a w l e y、I n d i a n a p o l i s、I N) を使用した。簡単に述べると、ケタミンH C l 5 m l (100mg/ml) およびキシラジン1 m l (20mg/ml) の混合物0.03~0.04 m lを用いて、マウスに麻酔をかけた。マウスを、400 p s i のヘリウム圧設定で、約1 μ m金ビーズ (D e G u s s a-H u l s C o r p.、R i d g e f i e l d P a r k、N J) 0.5 m gにつき0.5 μ gのD N Aを含む2遺伝子銃量を用いて免疫化した。

【0160】

トランスフェクションおよび発現分析：

ヒト胎児腎臓細胞293T株 (5×10⁵細胞/トランスフェクション) を、製造業者のガイドライン (L i f e T e c h n o l o g i e s、G r a n d I s l a n d、N Y) に従って、12%リポフェクタミンを用いてD N A 2 μ gでトランスフェクトした。上清を収集し、-20℃で保存した。以前に述べられたように (C a r d o s o ら、1998)、Hに対する定量抗原捕獲E L I S Aを行った。

【0161】

ウエスタンハイブリダイゼーション分析のために、上清または細胞溶解物15 μ lを、S D S 試料緩衝液 (B i o-R a d、H e r c u l e s、C A) で1:2に希釈し、10%ポリアクリルアミド/S D Sゲルにロードした。分離したタンパク質をニトロセルロース膜 (B i o-R a d、H e r c u l e s、C A) に移し、0.1% T w e e n 2 0 および1%脱脂粉乳を含むP B Sで1:1000に希釈したポリクローナルウサギ抗H A抗血清とインキュベートした。徹底的な洗浄の後、1:2000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ抗血清および化学発光増幅法 (A m e r s h a m、B u c k

inghamshire、UK)を用いて、結合したウサギ抗体を検出した。

【0162】

抗体アッセイ法：

抗H特異的IgGレベルと評価するために、定量ELISAを行った。簡単に述べると、MVのHタンパク質を構成的に発現するLtk⁻細胞(24)を96ウェルプレート内で増殖させた。抗血清希釈を、H抗原を発現する無傷の細胞とインキュベートした。抗H抗体を細胞に30分間結合させ、その後、細胞をアセトン(80%)で固定した。ビオチン化抗マウスIgG抗体およびストレプトアビジン-ホスファターゼ(アルカリ性)システム(Sigma)を用いて、特異的抗体応答を検出した。このシステムを標準化するために、H抗原を発現しないLtk⁻細胞への抗体結合を使用した。結果は終点希釈力価として表された。 10

【0163】

中和アッセイ法：

中和アッセイ法は、6ウェルプレート内で増殖されたペロ細胞に対して行った(25)。簡単に述べると、100~200 p.f.u.の麻疹ウイルスエドモントン株を血清の系列希釈と混合し、37℃で1時間インキュベートし、次いで、プレートに接種した。プレートを37℃で48時間インキュベートし、プラークを数えた。中和力価は、プラーク形成を50%または90%減少させるのに必要とされる血清希釈の逆数として定義される。免疫前血清は負の対照とした。

【0164】

結果：

エドモントン株からの分泌型H(sH)を発現するように、または分泌型HとC3dとの融合(sH-3C3d)を発現するように2種類の血球凝集素発現ワクチンプラスミドをpTR600ベクターにおいて構築した(図29)。sHはHのエクトドメイン全体に相当するが、膜貫通領域および細胞質領域を排除した。このクローニングによって、組織プラスミノゲンアクチベーター(tpA)リーダー配列のN末端合成模倣物がH配列とインフレームで配置された。tPAリーダーおよびH配列を、Hの膜貫通ドメインのすぐ3'側で融合した。sH-3C3d融合タンパク質は、分泌型H遺伝子とインフレームでマウスC3dホモログの3つの縦列反復をクローニングすることによって作製された(図29B)。各C3d分子間の接合部ならびにHタンパク質と最初のC3dコード領域の間の接合部に見られるタンパク質分解切断部位は、変異誘発によって破壊された。 30

【0165】

ウエスタンブロット分析は、予想サイズのsHおよびsH-3C3dタンパク質を明らかにした。MV H抗血清に対するウサギポリクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロット分析は、トランスフェクト細胞の上清中に分泌型Hに対応する約70kDの広いバンドを示した。約190kDの高分子量バンドがsH-3C3d融合タンパク質の予想サイズと一致する(図30)。ウエスタンブロットによって、sH-C3d融合タンパク質のタンパク質分解切断の証拠は見られなかった。

【0166】

麻疹ウイルスHは、sHまたはsH-3C3dを含むプラスミドによって、膜貫通結合型の抗原と比較してわずかに少ないレベルで発現された。ヒト293T細胞を2μgのプラスミドで一過的にトランスフェクトし、抗原捕獲ELISAを用いて上清および細胞溶解物の両方のHをアッセイした。sH-DNAおよびsH-3C3d-DNAでトランスフェクトされた細胞の両方について、Hタンパク質の約75%が上清に分泌された。予想通り、膜貫通型Hを発現するプラスミドでトランスフェクトされた細胞の細胞溶解物に、H抗原の約99%が検出された。 40

【0167】

麻疹H DNA免疫化に対する抗体応答：

sH-3C3d発現DNAプラスミドは、sH DNAより高力価のELISA抗体を惹起した。DNAでコーティングされた金粒子によって、0.1μgまたは1μg接種物を 50

用いた遺伝子銃でBALB/cマウスにワクチン接種を行った。ワクチン接種の4週間後および26週間後に、マウスに、最初の免疫化で与えた同じ用量のDNAで追加抗原刺激を行った。抗H抗体の出現の時間パターンは、sH-DNAワクチン接種マウスと比較して、C3d融合発現DNAワクチン接種マウスにおいて速く出始めることを示した。良好な力価の抗体が最初の免疫化によって惹起された。これらは、2回目および3回目の免疫化によって追加抗原刺激され、3回目の免疫化の後、sH-3C3Dワクチン接種マウスの力価はsH-DNAワクチン接種マウスより5~6倍高かった。

【0168】

中和アッセイ法：

MV中和についての血清の調査によって、0.1 µg sH-3C3d発現DNAの2回
目の接種後、力価は1700までであることが分かった。ペロ細胞に対して行われた中和抗
体研究によって、sH-3C3d構築物によって誘発されたマウス血清におけるプロトタ
イプMVエドモントン株に対する中和活性の力価は、sH発現DNAワクチン接種マウス
の血清における力価より高いことが検出された。sH-3C3d発現プラスミドワクチン
接種マウスは中和抗体レベルが急激に上昇し、14週目までにプラトーに達した。対照的
に、sH発現DNAでは、検出可能なレベルの中和抗体を誘発するのに3回のワクチン接
種を要した。ワクチン接種の28週間後、sH-3C3d-DNAワクチン接種マウスか
らの血清は、MV感染のプラーク形成を90%減少させることができる中和力価(>25
0)を有した。

【0169】

C3dタンパク質発現構築物でワクチン接種されたマウスでのHに対する抗体応答の高さ
の増加は、sHのみを発現するDNAでワクチン接種されたマウスと比較して7~15倍
多かった。sH-3C3d発現DNAによって発現されたタンパク質の量がsHのみを発
現するプラスミドの約60%であったので、sH-3C3d発現DNAを用いた抗体応答
の増加はかなり興味深いものである。

【0170】

全抗体レベルの増加に加えて、インビトロ感染アッセイ法においてMVを特異的に中和す
ることができる抗体がさらに速く出始めた。sH-3C3d発現DNAでワクチン接種さ
れたマウスでは、2回目の免疫化の後に検出可能なレベルの中和抗体が観察された。中和
抗体の力価は14週目(50%プラーク減少、1700)でピークに達し、これは、防御
のための最小限の相関関係(50%プラーク減少、>120)をかなり上回る。対照的に
、sH発現DNAでワクチン接種されたマウスの中和抗体レベルは、3回目のワクチン接
種後でさえも低かった(50%プラーク減少、180)(図31)。

【0171】

実施例18：C3dを含む、およびC3dを含まないインフルエンザ挿入物
プラスミドベクターの構築手順および精製手順はJW4303について以前に述べられて
いる(Torresら、1999；Pertmerら1995；Feltquateら1
997)。簡単に述べると、A/PR/8/34(H1N1)からのインフルエンザ血球
凝集素(HA)配列を、固有の制限部位を用いてpJW4303またはpGA真核生物発
現ベクターにクローニングした。

【0172】

2種類のHA、分泌(s)型および膜貫通(tm)結合型が以前に述べられている(Tor
resら1999；Feltquateら、1997)。pJW4303においてsH
AまたはtmHAを発現するベクターを、それぞれpJW/sHAおよびpJW/tmH
Aと呼び、pGAにおいてsHA、tmHA、またはsHA-3C3dを発現するベクタ
ーを、それぞれpGA/sHA、pGA/tmHA、およびpGA/sHA-3C3dと
呼んだ。

【0173】

HA-C3d融合タンパク質を発現するベクターは、マウスC3dホモログの3つの縦列
反復をクローニングし、3つの縦列反復を分泌型HA遺伝子とインフレーションに配置するこ

10

20

30

40

50

とによって作製された。設計された構築物はDempseyら(1996)に基づいた。4個のグリシンおよび1個のセリンの2回の反復 $[(G_4S)_2]$ からなるリンカーは、各C3d反復の接合部で融合された。pGA/sHA-3C3dプラスミドは、pGA/sHAベクターにより発現されたタンパク質の約50%を発現した。しかしながら、上清で見出されたsHA-3C3dと細胞溶解物で見出されたsHA-3C3dの比は、pGA/sHAにより発現された抗原の比とほぼ同じであった。80%を超えるタンパク質が上清に分泌された。ウェスタン分析において、高分子量のバンドが120kDaで検出され、これはsHA-3C3d融合タンパク質に相当した。従って、sHA-3C3d融合タンパク質は、sHA抗原と同じくらい効率的に上清に分泌される。

【0174】

10

マウスおよびDNA免疫化：

接種のために、6～8週齢のBALB/cマウス(Harlan Sprague Dawley、Indianapolis、IN)を使用した。マイクロアイソレーターユニットに収容し、飼料および水を自由に与えたマウスを、USDA実験動物ガイドラインに従って飼育した。ケタミンHCl 5ml(100mg/ml)およびキシラジン1ml(20mg/ml)の混合物0.03～0.04mlを用いて、マウスに麻酔をかけた。手持ち式のアクセラ(Accell)遺伝子送達システムを用いて、毛をそり落とした腹部皮膚に遺伝子銃免疫化を行った。400psiのヘリウム圧設定で約1μm金ビーズ(DeGussa-Huls Corp.、Ridgefield Park、NJ)0.5mgにつき0.5μgのDNAを含む2遺伝子銃量で免疫化を行った。

20

【0175】

インフルエンザウイルス攻撃：

生きている、マウスに適合されたインフルエンザウイルス(A/PR/8/34)による攻撃は、3致死量のウイルスを含むようにPBSで希釈した尿膜腔液50μlを、ケタミンで麻酔したマウスの鼻孔に注入することによって行った。この方法は急速な肺感染につながり、非免疫化マウスの100%が死に至る。ワクチン接種の8週間後または14週間後、個々のマウスを攻撃し、体重減少および生存についてモニターした。データを、攻撃後の日数に対する群における個々の平均体重(攻撃前の体重の%)としてグラフ化した。

【0176】

HA DNA免疫化プロトコールに対する抗体応答：

30

t mHA発現DNAプラスミドおよびsHA-3C3d発現DNAプラスミドは、sHA DNAより高力価のELISA抗体を惹起した。DNAでコーティングされた金粒子によって、0.1μgまたは1μg用量の接種物を用いた遺伝子銃でBALB/cマウスにワクチン接種を行った。ワクチン接種の4週間後に、各群のマウスの半分に、最初の免疫化で与えた同じ用量のDNAで追加抗原刺激を行った。sHA-3C3d発現プラスミドおよびt mHA発現プラスミドにより誘導された総抗HA IgGは異なる実験マウス群においてほぼ同じであり、sHA発現プラスミドにより惹起された量より3～5倍多かった(図24)。さらに、誘発された抗HA抗体の量は、ワクチン接種に用いられたDNA量と比較して用量依存的に増加した(図24E～24F)。全体的に見て、用量反応曲線および抗HA抗体出現の時間パターンは、t mHA DNAまたはsHA-3C3d-DNAでワクチン接種されたマウスにおいてほぼ同じであったが、sHA-DNAでワクチン接種されたマウスでは低く、遅かった。予想通り、追加免疫化は両方とも、HA抗体の力価を促進および増大させた。

40

【0177】

マウスHA抗血清のアビディティ：

チオシアン酸ナトリウム(NaSCN)置換(displacement)ELISAによって、sHA-3C3d発現DNAで生じたHA特異的抗体のアビディティが、sHA-DNAまたはt mHA-DNAでワクチン接種されたマウスからの抗体より一貫して高いことが証明された(図25)。抗原-抗体相互作用を破壊するために段階濃度のカオトロピック剤NaSCNを使用することによって、HA特異的抗体のアビディティを比

50

較した。低いアビディティを有する抗体と抗原との結合は、高いアビディティを有する抗体と抗原との結合より低い濃度のNaSCNで破壊される。sHA-DNAまたはtmHA-DNA (0.1 µg用量または1 µg用量) で追加抗原刺激されたマウスからワクチン接種8週間後に収集された抗血清の50%を遊離するのに必要とされるNaSCNの有効濃度(ED₅₀)は、約1.20 Mであった(図25A)。対照的に、sHA-3C3d-DNAでワクチン接種および追加抗原刺激されたマウスからの抗血清のED₅₀は、約1.75 Mであった(図25B)。攻撃時(ワクチン接種の14週間後)に、sHA-DNAワクチン接種マウスおよびtmHA-DNAワクチン接種マウスからの抗体のED₅₀は、約1.8 Mまで増加した(図25C)。sHA-3C3d-DNAでワクチン接種されたマウスからの抗体のED₅₀は、約2.0まで増加した(図25D)。これらの結果は、sHA-3C3d-DNAワクチン接種マウスからの抗体が、sHA-DNAワクチン接種マウスまたはtmHA-DNAワクチン接種マウスからの抗体より急速な親和性成熟を受けたことを示唆している。sHA-3C3dおよびtmHAに対する抗体の時間アビディティ成熟の差は、惹起された抗体のレベルと無関係であった。これらのプラスミドは両方とも、抗体出現の時間パターンおよび抗体を惹起する能力についての用量反応曲線が類似した(図25)。

【0178】

血球凝集素阻害(HI)力価：

惹起された抗体が、シアル酸へのA/PR/8/34(H1N1)の結合をブロックする能力を評価するために、血球凝集素阻害アッセイ法(HI)を行った。HI力価は、ワクチン接種の8週間後および14週間後にマウスから採取された血清試料から測定した。全ての追加抗原刺激マウスが、与えられた用量にもワクチンにも関係なく14週目で測定可能なHI力価を有した。sHA-3C3d-DNAワクチン接種マウスについては最高力価(1:1200まで)を記録した。追加抗原刺激されていないマウスは大きなHI力価変動を示した。0.1 µg用量のsHA-DNA発現プラスミドまたはtmHA-DNA発現プラスミドでワクチン接種された、追加抗原刺激されていないマウスは、1:10という低いHI力価を有した。対照的に、sHA-3C3d-DNAワクチン接種マウスは、1:640より大きな力価を有した。8週目に測定可能なHI力価(1:160)を有した唯一のワクチン接種マウスは、1 µg用量のsHA-3C3d-DNAでワクチン接種された追加抗原刺激マウスであった。これらの結果から、C3dはsHAと融合すると、抗体のアビディティ成熟、従って、HAに対する中和抗体の産生を高めるように特異的B細胞を刺激できることが分かる。

【0179】

インフルエンザ攻撃に対する防御効力：

sHA-3C3d-DNAは、HI抗体の最高力価の誘発と一致して、sHAまたはtmHA-DNAより効果的な防御を惹起した。様々なHA-DNAワクチンの防御効力を試験するために、致死量のA/PR/8/34インフルエンザウイルス(H1N1)を用いてマウスを攻撃し、罹患率(体重減少を測定)および死亡率を毎日モニターした。各動物の体重減少を、攻撃後の日数に対する攻撃前の平均体重の%としてグラフ化した(図26)。ウイルスで攻撃された、投薬されていないマウスおよびpGAベクターのみでワクチン接種されたマウスは急速な体重減少を示し、マウスは全て攻撃8日後までに体重の>20%を減らした(図26)。対照的に、PBS偽性で攻撃されたマウスは、14日間の観察にわたって体重減少を示さなかった。全ての追加抗原刺激マウスが、投与されたDNAプラスミドの用量に関係なくワクチン接種14週間後の攻撃から生き残った。しかしながら、0.1 µg用量のsHA-DNAでワクチン接種された追加抗原刺激マウスは、回復する前に攻撃の8日後、最初の体重の92%まで落ちた(図26)。対照的に、1 µg用量で追加抗原刺激されたマウスをワクチン接種8週間後に攻撃した場合、攻撃から生き残っている唯一のマウスは、ワクチン接種14週間後に攻撃されたマウスから観察されたものより大きな体重減少にもかかわらず、sHA-3C3dワクチン接種マウスおよびtmHA-DNAワクチン接種マウスであった。ワクチン接種8週間後の攻撃から生き残って

いる、唯一の、 $0.1 \mu\text{g}$ 用量で追加抗原刺激されたマウスは、sHA-3C3dワクチン接種マウスであった（図26）。

【0180】

追加抗原刺激のない $0.1 \mu\text{g}$ 用量の免疫化のうち、sHA-3C3d DNAワクチン接種マウスだけが、ワクチン接種14週間後の攻撃から生き残った（図26）。一回のDNAワクチン接種を与えた全てのマウスが体重を失った。しかしながら、これらのマウスのうち、sHA-3C3d-DNAワクチン接種マウスの体重減少が最も少なく、これらのマウスは、致死攻撃から生き残った唯一のマウスであった（図26）。これらの結果によって、3C3dタンパク質はHAと融合するとDNAワクチン効率を高め、致死インフルエンザウイルス攻撃からの防御をもたらすのに必要とされるDNA用量およびワクチン接種回数を減らすことが証明された。 10

【0181】

実施例19：HIV gp120-C3d融合構築物

本研究では、3コピーのマウスC3dとHIV Env gp120サブユニットのカルボキシ末端を融合するために、実施例18に記載のものと同様のアプローチを使用した。DNAワクチン接種を用いて、BALB/cマウスに接種を行い、免疫応答の上昇をアッセイした。この融合構築物は、それぞれの野生型gp120配列より高いEnvに対する免疫応答、および速いアビディティ成熟の開始を誘導した。これらの結果は、抗体を惹起するためのDNAワクチンの効力が、タンパク質とC3dを融合することによって有意に改善できることを示唆している。 20

【0182】

プラスミドDNA：

前記実施例1に記載のように、真核生物挿入物転写開始のためのサイトメガロウイルス即時初期プロモーター（CMV-IE）+イントロンA（IA）、および転写終結のためのウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（BGHポリア）を含むように、pGAを構築した。ほぼ全てのgp120領域をコードする、分離株ADA、IIIb、および89.6からのHIVエンベロップ配列ならびにC3d配列を、固有の制限エンドヌクレアーゼ部位を用いてpGAワクチンベクターにクローニングした。gp120セグメントはアミノ酸32～465の領域をコードし、アミノ酸配列VAPTRAで終わった。最初の32アミノ酸が各sgp120のN末端から欠失され、組織プラスミノゲンアクチベーター（tpA）から配列決定されたリーダーで置換された。sgp120-C3d融合タンパク質を発現するベクターは、sgp120発現DNAとインフレイムでマウスC3dホモログの3つの縦列反復をクローニングすることによって作製された。構築物設計はデンプセイ（Dempsey）ら（1996）に基づいた。4個のグリシンおよび1個のセリンの2回の反復 $\{(G_4S)_2\}$ からなるリンカーは、HAおよびC3dの接合部で、ならびに各C3d反復間で融合された。C3d接合部ならびに3C3dの接合部の間の潜在的なタンパク質分解切断部位は、ArgコドンにGlyコドンに変異させるようにBamHIおよびBglII制限エンドヌクレアーゼ部位を連結することによって変異された。 30

【0183】

プラスミドを大腸菌DH5 α 株において増幅し、陰イオン交換樹脂カラム（キアゲン、Valencia、CA）を用いて精製し、dH₂Oに溶解して -20°C で保存した。適切な制限酵素消化およびゲル電気泳動によってプラスミドを確かめた。260nmおよび280nmでの光学密度を読み取ることによって、DNA調製物の純度を測定した。 40

【0184】

マウスおよびDNA免疫化：

前記実施例17に記載のように、6～8週齢のBALB/cマウス（Harlan Sprague Dawley、Indianapolis、IN）にワクチン接種を行った。簡単に述べると、マウスを、400psiのヘリウム圧設定で、約 $1 \mu\text{m}$ 金ビーズ（DeGussa-Huls Corp.、Ridgefield Park、NJ）0.5mgにつき $0.5 \mu\text{g}$ のDNAを含む2遺伝子銃量を用いて免疫化した。 50

【0185】

トランスフェクションおよび発現分析およびウエスタンハイブリダイゼーション実験は、ニトロセルロース膜を0.1% Tween 20および1%脱脂粉乳を含むPBSで1:1000に希釈したポリクロールヒトHIV感染患者抗血清とインキュベーションした以外は実施例17に記載のように行った。徹底的な洗浄の後、1:2000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト抗血清および化学発光増幅法(Amersham、Buckinghamshire、UK)を用いて、結合したヒト抗体を検出した。

【0186】

ELISAおよびアビディティーアッセイ法:

免疫血清中の抗Env IgGの力価を評価するために、述べられたように(Richmondら、1998)、プレートをコーティングするのに精製HIV-1-IIIB gp120 CHO発現タンパク質(Intracell)を用いて、終点ELISAを行った。または、プレートを、ヒッジ抗Env抗体(International Enzymes Inc.、Fallbrook、CA)でコーティングし、sgp120発現ベクターで一過的にトランスフェクトされた293T細胞において産生されたsgp120を捕獲するために使用した。ワクチン接種マウスからのマウス血清を結合させ、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGによって検出した。バックグラウンドより2倍高い終点力価が陽性とみなされた。アビディティーELISAを、試料および標準の添加まで血清抗体測定ELISAと同様に行った。O.D.によってほぼ同じ濃度の特異的IgGが得られるように試料を希釈した。プレートを0.05% PBS-Tween 20で3回洗浄した。次いで、異なる濃度の、PBSに溶解したカオトロピック剤チオシアン酸ナトリウム(NaSCN)を添加した(0M、1M、1.5M、2M、2.5M、および3M NaSCN)。プレートを室温で15分間放置し、次いで、PBS-Tween 20で6回洗浄した。後のステップを血清抗体測定ELISAと同様に行い、初期IgGの%を初期O.D.の%として計算した。全てのアッセイ法を三つ組行なった。

【0187】

中和抗体アッセイ法:

抗体によるHIV-1-IIIBおよび89.6の中和を、以前に述べられたように(Montefioriら、1988)、MT-2細胞死滅アッセイ法において測定した。簡単に述べると、ポリ-L-リジンでコーティングされた96ウェルマイクロタイタープレートの三つ組のウェル内の複数の血清試料希釈(増殖培地100μlで希釈)に、細胞を含まないウイルス(10^8 TCID₅₀のウイルスを含む50μl)を添加し、37℃で1時間インキュベートし、その後、MT-2細胞を添加した(ウェル1個につき、1000μlに溶解した 10^5 細胞を添加した)。細胞密度が減少し、必要な場合に、インキュベーションの3日後に培地を交換した。対照ウェルでの細胞変性効果が>70%であるが、100%未満である場合に、フィンターのニュートラルレッド(Finter's neutral red)による生細胞の染色によって、中和を測定した。%防御は、試験ウェル(細胞+ウイルス)間の吸収(A_{540})の差を計算し、この結果を、細胞対照ウェル(細胞のみ)およびウイルス対照ウェル(ウイルスのみ)間の吸収の差で割ることによって求めた。中和力価は、ウイルスによる死滅から細胞の少なくとも50%を防御するのに必要とされる血漿希釈の逆数として表される。

【0188】

結果:

Envは、sgp120-C3d発現プラスミドによる2/4のレベル以外は、分泌型の抗原を含むどちらのプラスミドでもほぼ同じ全体レベルで発現された。ヒト293T細胞をプラスミド2μgで一過的にトランスフェクトし、抗原捕獲ELISAを用いて、上清および細胞溶解物の両方をgp120についてアッセイした。sgp120構築物は450~800ng/mlを発現したが、3C3d融合は140~250ng/mlを発現した。sgp120トランスフェクト細胞およびsgp120-3C3d-DNAトランスフェクト細胞の両方で、上清にEnvタンパク質の約90%が存在した(データ示さず)

。異なる s g p 1 2 0 の発現レベルの約 2 倍の差は、E n v 遺伝子の差ならびに捕獲抗体および検出抗体が異なる E n v を認識する効率の差を反映している可能性が高い。

【0189】

ウエスタンブロット分析は、予想サイズの s g p 1 2 0 および s g p 1 2 0 - 3 C 3 d タンパク質を明らかにした。ヒト患者ポリクローナル抗血清を用いて、ウエスタンブロット分析は、g p 1 2 0 に対応する 1 1 5 ~ 1 2 0 k D の予想される広いバンドを示した。約 2 4 0 k D の高分子量のバンドが s g p 1 2 0 - 3 C 3 d 融合タンパク質の予想サイズと一致した。抗原捕獲アッセイ法と一致して、濃いタンパク質バンドが s g p 1 2 0 - D N A トランスフェクト細胞の上清に存在したが、それより薄いバンドが s g p 1 2 0 - 3 C 3 d - D N A トランスフェクト細胞の上清に存在した（データ示さず）。ウエスタンブロット分析によって、s g p 1 2 0 - C 3 d 融合タンパク質のタンパク質分解切断の証拠は見られなかった。

10

【0190】

E n v g p 1 2 0 D N A 免疫化に対する免疫応答：

s g p 1 2 0 - 3 C 3 d 発現 D N A プラスミドは、s g p 1 2 0 D N A より高力価の E L I S A 抗体を惹起した。D N A でコーティングされた金粒子によって、1 μ g 用量の接種物を用いた遺伝子銃で B A L B / c マウスにワクチン接種を行った。1 日目にマウスにワクチン接種を行い、次いで、4 週間、1 4 週間、および 2 6 週間で、最初の免疫化で与えた同じ D N A を用いて追加抗原刺激を行った。血清を g p 1 2 0 - I I I B コーティングプレートでアッセイした場合、C 3 d 融合タンパク質を発現する D N A でワクチン接種されたマウスの抗 E n v 抗体量は、対応する s g p 1 2 0 発現プラスミドにより惹起された抗体量より 3 ~ 7 倍多かった。C 3 d 構築物のうち、s g p 1 2 0 - (I I I B) - 3 C 3 d でワクチン接種されたマウスの抗体レベルが最も高く、s g p 1 2 0 - (A D A) - 3 C 3 d 発現 D N A でワクチン接種されたマウスの抗 E n v 抗体レベルが最も低かった。抗 E n v 抗体の出現の時間パターンによって、試験した全ての構築物のそれぞれの接種で力価が追加抗原刺激されることが明らかになった。

20

【0191】

様々な E n v によって惹起された抗体レベルの差は、惹起された抗体の特異性によって決まるように見えた。相同な E n v の上に抗体を捕獲する別の E L I S A プロトコルを用いると、C 3 d 融合の全てがほぼ同じレベルの抗体を惹起するように見えた。このアッセイ法では、一過的に産生された s g p 1 2 0 タンパク質を捕獲するためにヒツジ抗 E n v 抗体を使用した。このアッセイ法によって、各 s g p 1 2 0 - 3 C 3 d 構築物によって惹起される抗体のレベルは低い、ほぼ同じであることが明らかになった。このアッセイ法において検出された低レベルの抗体は、抗体を捕獲するために用いられた、トランスフェクションによって産生された E n v のレベルが、プレートをコーティングするために商業生産された I I I B g p 1 2 0 を使用したアッセイ法での E n v のレベルより少ないことを反映している可能性が高い。E L I S A 法を用いて予想されたように、最も弱い抗体応答でさえも達成するのに追加免疫化が必要であった。

30

【0192】

マウス E n v 抗血清のアビディティー：

チオシアン酸ナトリウム (N a S C N) 置換 E L I S A によって、s g p 1 2 0 - 3 C 3 d 発現 D N A を用いて生じた抗体のアビディティーが、s g p 1 2 0 - D N A ワクチン接種マウスからの抗体より一貫して高いことが証明された。アビディティーアッセイ法は、惹起された抗血清のタイプ特異性および捕獲抗原として使用するための I I I B タンパク質の商業的な入手のしやすさ（他のタンパク質は入手しにくい）のために s g p 1 2 0 - (I I I B) および s g p 1 2 0 - (I I I B) - 3 C 3 d によって惹起された血清に対して行った。抗原-抗体相互作用を破壊するために段階濃度のカオトロピック剤 N a S C N を使用することによって、特異的 E n v 抗体のアビディティーを比較した。結果から、s g p 1 2 0 - 3 C 3 d - D N A ワクチン接種マウスからの抗体は、s g p 1 2 0 - D N A ワクチン接種マウスからの抗体より急速な親和性成熟を受けたことが分かった。

40

50

【0193】

Env-3C3d 発現プラスミドは少量の中和抗体を誘発する：

MT-2 細胞で行われた中和抗体研究から、gp120-3C3d 構築物によって生じた血清における中和活性力価が、sgp120 構築物によって生じた血清における中和活性力価より高いことが検出された。血清を、2 種類のシンシチウム（IIIIB (X4) および 89.6 (X4R5) ウイルスを含む）に対して試験した。sgp120-3C3d 発現プラスミドでワクチン接種されたマウスの、HIV 同種株に対する中和抗体のレベルは非常に低かった。中和抗体のレベルは、ニュートラルレッドの取り込みによって測定される、ウイルスによる死滅からの MT-2 細胞の防御によって試験された。gp120 発現 DNA によって惹起された中和抗体の力価はアッセイ法のバックグラウンドであった。

10

【0194】

この研究の結果によって、HIV-1 Env と 3 コピーのマウス C3d の融合は、ワクチン接種マウスにおいて Env に対する抗体応答を上昇させたことが分かった。3 種類の sgp120 配列発現 DNA プラスミドでワクチン接種されたマウスも、4 回のワクチン接種の後（初回抗原刺激の 28 週間後）、低いかまたは検出不可能な抗体レベルを示した。対照的に、sgp120 および 3C3d タンパク質の融合を発現する DNA でワクチン接種されたマウスは、迅速な抗体の出現（3 回のワクチン接種）ならびに高レベルの抗体を誘発した。

【0195】

Env 抗体の抗体力価およびアビディティー成熟の上昇とは対照的に、ワクチン接種マウスにおいて誘発された中和抗体の量は少なかった。sgp120 発現プラスミドでワクチン接種されたマウスの中和抗体レベルは低く、このレベルは、sp120-3C3d 発現プラスミドでワクチン接種されたマウスにおいて、わずかに少し増加した。しかしながら、中和抗体レベルは 4 回目の免疫化後に明らかに増加した。中和抗体の不十分な力価は、sgp120-3C3d 融合タンパク質が、中和エピトープを応答 B 細胞に適切に曝露しないために、中和抗体を本質的に十分に惹起できないことを反映した可能性がある。マウス血清における HIV-1 中和アッセイ法の本質的な高いバックグラウンドもまた不十分な中和力価に寄与した可能性がある。

20

【0196】

これらの結果は、抗体産生および抗体成熟の増大における分子アジュバントとしての C3d 融合の有効性を証明している。さらに、Env に対する中和抗体応答は、C3d 融合ワクチンでワクチン接種されたマウスにおいて少し増加した。麻疹ウイルスおよびインフルエンザウイルスに由来する分泌型 HA を用いた実施例 17 および 18 で見られた結果と同様に、C3d による抗体応答の上昇が、非融合 sgp120 を発現するプラスミドの半分の量しかタンパク質を発現しないプラスミドで達成された。

30

【0197】

参照

Amara, R., et al. (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA Vaccine. Submitted.

Andre, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W., Bultmann, A., and Haas, J. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol* 72(2), 1497-503.

10

Asakura, Y., Hinkula, J., Leandersson, A. C., Fukushima, J., Okuda, K., and Wahren, B. (1997). Induction of HIV-1 specific mucosal immune responses by DNA vaccination. *Scand J Immunol* 46(4), 326-30.

Bachmann MF, Zinkernagel RM. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu Rev Immunol* 1997;15:235-70.

20

Barouch. D. H. et al., 2000. *Science* 290: 486-92.

Barry, M. A., Lai, W. C., and Johnston, S. A. (1995). Protection against mycoplasma infection using expression library immunization. *Nature* 377(6550), 632-5.

Berger EA (1997). HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 11 Suppl A:S3-16

30

Bohm, W., Kuhrober, A., Paier, T., Mertens, T., Reimann, J., and Schirmbeck, R. (1996). DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after

intramuscular injection. *J Immunol Methods* 193(1), 29-40.

Bohm, W., Mertens, T., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (1998). Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine* 16(9-10), 949-54.

Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2(2):95-113

10

Boyer, J. D., Ugen, K. E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W. V., Refaeli, Y., Ciccarelli, R. B., McCallus, D., Coney, L., and Weiner, D. B. (1997). Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* 3(5), 526-32.

20

Boyle, J. S., Koniaras, C., and Lew, A. M. (1997). Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol* 9(12), 1897-906.

30

Burton, D. R., and Montefiori, D. C. (1997). The antibody response in HIV-1 infection [see comments]. *Aids* 11(Suppl A), S87-98.

Calarota, S., Bratt, G., Nordlund, S., Hinkula, J., Leandersson, A. C., Sandstrom, E., and Wahren, B. (1998). Cellular cytotoxic response induced by

DNA vaccination in HIV- 1 -infected patients. *Lancet* 351(9112), 1320-5.

Cardoso, A.I, Blixenkrone-Moller, M., Fayolle, J., Liu, M., Buckland, R., and Wild, F.T. Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. 1998. *Virology*. 225:293-299.

10

Chapman BS, Thayer RM, Vincent KA, Haigwood NL. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 1991;19(14):3979-86.

Chen, S. C., Jones, D. H., Fynan, E. F., Farrar, G. H., Clegg, J. C., Greenberg, H. B., and Herrmann, J. E. (1998a). Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus; DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J Virol* 72(7), 5757-61.

20

Chun. T.W. et al., 1998. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8869-73.

Collman R, Balliet JW, Gregory SA, Friedman H, Kolson DL, Nathanson N, et al. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1992;66(12):7517-21.

30

Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD, Jr. DNA-

40

based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2(10):1122-8.

Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 1996;184(4):1555-60.

Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271:348-50.

10

Egan, M.A. *et al.*, (2000) *J Virol* 74: 7485-95.

Evans DT, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Sidney J, da Silva J, et al. Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef. *Nat Med* 1999;5(11):1270-6.

20

Feltquate, D. M., Heaney, S., Webster, R. G., and Robinson, H. L. (1997). Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *Journal of Immunology* 158(5), 2278-84.

30

Fomsgaard, A., Nielsen, H. V., Bryder, K., Nielsen, C., Machuca, K, Bruun, L., Hansen, J., and Buus, S. (1998). Improved humoral and cellular immune responses against the gp120 V3 loop of HIV- I following genetic immunization with a chimeric DNA vaccine encoding the V3 inserted into the hepatitis B surface antigen. *Scand J Immunol* 47(4), 289-95.

40

Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, et al.
Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for
professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from
myocytes. *Mol Med* 1997;3(6):362-71.

Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C.,
and Robinson, H. L. (1993). DNA vaccines: protective immunizations by
parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA*
90(24),11478-82.

10

Gromkowski, S. H., Nabel, G. J., and et al. (1995). Cancer gene therapy
using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice
[see comments]. *Hum Gene Ther* 6(5), 553-64.

20

Hakim, I., Levy, S., and Levy, R. (1996). A nine-amino acid peptide from
IL-1 beta augments antitumor immune responses induced by protein and DNA
vaccines. *J Immunol* 157(12), 5503-11.

Hanke T, Samuel RV, Blanchard TJ, Neumann VC, Allen TM, Boyson
JE, Sharpe SA, Cook N, Smith GL, Watkins DI, Cranage MP, McMichael (1999).
Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T
lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified
vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *J Virol* 73(9):7524-32

30

Hanke, T., Blanchard, T. J., Schneider, J., Hannan, C. M., Becker, M.,

Gilbert S. C., Hill, A. V., Smith, G. L., and McMichael, A. (1998a).

Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 16(5), 439-45.

Hanke, T., Schneider, J., Gilbert S. C., Hill, A. V., and McMichael, A. (1998b). DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice. *Vaccine* 16(4), 426-35.

10

Hartikka, J., Sawdey, M., Comefert-Jensen, F., Margalith, M., Barnhart, K., Nolasco, M., Vahlsing, H. L., Meek, J., Marquet, M., Hobart, P., Norman, J., and Manthorpe, M. (1996). An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 7(10), 1205-17.

20

Inchauspe, G., Vitvitski, L., Major, M. E., Jung, G., Spengler, U., Maisonnas, M., and Trepo, C. (1997). Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol* 16(2), 185-95.

Iwasaki A, Torres CA, Ohashi PS, Robinson HL, Barber BH. (1997b) The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J Immunol* 159(1):11-4.

30

Iwasaki, A., Stiernholm, B. J., Chan, A. K., Berinstein, N. L., and Barber, B. H. (1997a). Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens

encoding costimulatory molecules and cytokines. *J Immunol* 158(10),4591-601.

Jones, D. H., Corris, S., McDonald, S., Clegg, J. C., and Farrar, G. H.
(1997). Poly(DL-lactide-co-glycolide)encapsulated plasmid DNA elicits systemic
and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration.
Vaccine 15(8), 814-7.

10

Kawabata, K., Takakura, Y., and Hashida, M. (1995). The fate of plasmid
DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in
its hepatic uptake. *Pharm Res* 12(6), 825-30.

Kent S. J., Zhao, A., Best, S. J., Chandler, J. D., Boyle, D. B., and
Ramshaw, I. A. (1998). Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy
of a human immunodeficiency virus type I vaccine regimen consisting of
consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J*
Viro 72(12), 10180-8.

20

Kuroda MJ, Schmitz JE, Barouch DH, Craiu A, Allen TM, Sette A, et al.
Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency
virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major
histocompatibility complex class I-peptide complex. *Journal of Experimental*
Medicine 1998;187(9):1373-81.

30

Letvin, N. L., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Perry, H. C., Davies, M.
E., Lekutis, C., Alroy, M., Freed, D. C., Lord, C. I., Handt, L. K., Liu, M. A., and

Shiver, J. W. (1997). Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(17), 9378-83.

Lew, D., Parker, S. E., Latimer, T., Abai, A. M., Kuwahara-Rundell, A., Doh, S. G., Yang, Z. Y., Laface, D., Gromkowski, S.H., and Nabel, G.J., et al. (1995). Cancer gene therapy using plasmid DNA: Pharmacokinetic study of DNA following injection in mice [see comments]. *Hum. Gene Ther.* 6:553.

10

Li J, Lord CI, Haseltine W, Letvin NL, Sodroski J. Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 1992;5(7):639-46.

20

Livingston, J. B., Lu, S., Robinson, H. L., and Anderson, D. J. (1995). The induction of mucosal immunity in the female genital tract using gene-gun technology. Part 1: Antigen expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 772,265-7.

Lu, S., Manson, K., Wyand, M., and Robinson, H. L. (1997). SIV DNA vaccine trial in macaques: post-challenge necropsy in vaccine and control groups. *Vaccine* 15(g), 920-3.

30

MacGregor, R. R., Gluckman, S., Lacy, K., Kaniefski, B., Boyer, J., Wang, B., Bagarazzi, M., William, W. V., Francher, D., Ginsberg, R., Higgins,

T., and Weiner, D. (1996). First human trial of a facilitated DNA plasmid vaccine for HIV-1: safety and host response. *Int Conf AIDS* 11(2), 23 (abstract no. We.B.293).

Maecker, H. T., Umetsu, D. T., De Kruyff, R. H., and Levy, S. (1997). DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin. *Vaccine* 15(15), 1687-96.

10

Maecker, H. T., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H., and Levy, S. (1998). Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via class II MHC. *J Immunol* 161(12),6532-6.

Manthorpe, M., Comefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M., and Dwarki, V. (1993). Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther* 4(4), 419-31.

20

McCluskie, M. J., Chu, Y., Xia, J. L., Jessee, J., Gebyehu, G., and Davis, H. L. (1998). Direct gene transfer to the respiratory tract of mice with pure plasmid and lipid-formulated DNA [In Process Citation]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8(5), 401-14.

30

Montefiori, D.C., W. E. Robinson, S. S. Schuffman, and W. M. Mitchell, 1988. Evaluation of antiviral drugs and neutralizing antibodies to HIV by a rapid and sensitive microtiter infection assay. *J. Clin. Microbiol.* 26:231-237.

Montgomery, D. L., Shiver, J. W., Leander, K. R., Perry, H. C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., and Liu, M. A. (1993). Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 12(9), 777-83.

Moore, J. P., and Ho, D. D. (1995). HIV-1 neutralization: the consequences of viral adaptation to growth on transformed T cells. *Aids* 9(Suppl A), S 117-36.

10

Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998;8(2):177-87.

Ourmanov. I. et al. 2000. *J Virol* 74: 2740-51.

20

Pertmer, T. M., Eisenbraun, M. D., McCabe, D., Prayaga, S. K., Fuller, D. H., and Haynes, J. R. (1995). Gene gunbased nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* 13(15), 1427-30.

30

Pertmer, T. M., Roberts, T. R., and Haynes, J. R. (1996). Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol* 70(9), 6119-25.

Pertmer, T.M. and Robinson, H.L. (In press). Studies on antibody responses following neonatal immunization with influenza hemagglutinin DNA or protein. *Virology*.

Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katinger H, Parren PW, Mosier DE, Burton DR (1999). Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* 10(4):431-8

10

Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 1998;188(6):1075-82.

Reimann KA, Li JT, Veazey R, Halloran M, Park IW, Karlsson GB, et al. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *Journal of Virology* 1996;70(10):6922-8.

20

Reimann KA, Li JT, Voss G, Lekutis C, Tenner-Racz K, Racz P, et al. An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *Journal of Virology* 1996;70(5):3198-206.

30

Richmond, J. F., Lu, S., Santoro, J. C., Weng, J., Hu, S. L., Montefiori, D.

C., and Robinson, H. L. (1998). Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J Virol* 72(11), 9092-9 100.

Robinson, H.L. and Pertmer, T.M. (2000). DNA vaccines: Basic studies and applications. *In* *Advances in Virus Research*. Academic Press,. Vol. 53 (in press).

10

Robinson, H.L, Montefiori, D.C., Johnson, R.P., Manson, K.H., Kalish, M.L., Lifson, J.D., Rizvi, T.A., Lu, S., Hu, S.L., Mazzara, G.P., Panicali, D.L., Herndon, J.G., Glickman, R., Candido, M.A., Lydy, S.L., Wand, M.S., and McClure, H.M. (1999). Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat. Med.* 5:526.

20

Robinson, H. L., and Pertmer, T. M. (1998). Nucleic Acid Immunizations. *In* "Current Protocols in Immunology" (R. Coico, Ed.), Vol. 1, pp. 2.14.1-2.14.19. 3 vols. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Robinson, H. L., Ginsberg, H. S., Davis, H. L., Johnston, S. A., and Liu, M. A. (1997). The Scientific Future of DNA for Immunization. American Academy of Microbiology. May31-June2-1996.

30

Robinson, H. L., Hunt, L. A., and Webster, R. G. (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-

expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11(9), 957-60.

Rodriguez, F., Zhang, J., and Whitton, J. L. (1997). DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol* 71(11), 8497-503.

Ross, T. M., Y. Xu, R. A. Bright, and H. L. Robinson. C3d enhancement of antibodies to Hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat. Immunol.* 2000. 1:127-131.

10

Ross, T.M., Y. Xu, T. D. Green, D.C. Montefiori, and H.L. Robinson. 2001. Enhanced Avidity maturation of Antibody to Human Immunodeficiency Virus envelope: DNA Vaccination with gp120-C3d Fusion Proteins. *AIDS Res. Human Retro.* In press.

20

Sasaki, S., Hamajima, K., Fukushima, J., Ihata, A., Ishii, N., Gorai, I., Hirahara, F., Mohri, H., and Okuda, K. (1998b). Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type I with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine. *Infect Immun* 66(2), 823-6.

Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L., and Hill, A. V. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8⁺ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4(4), 397-402.

30

Scholtissek S, Grosse F. A cloning cartridge of lambda t(o) terminator.
Nucleic Acids Res 1987; 15(7):3185.

Sizemore, D. R., Branstrom, A. A., and Sadoff, J. C. (1997). Attenuated
bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine*
15(8), 804-7.

10

Sizemore, D. R., Branstrom, A. A., and Sadoff, J. C. (1995). Attenuated
Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science*
270(5234), 299-302.

Staprans, S., B. Corliss, J. Guthrie, M.B. Feinberg, in *Viral Genome*
Methods K. Adolph, Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL, 1996) pp. 167-184.

20

Subbarao S, Schochetman G. Genetic variability of HIV-1. *Aids*
1996;10(Suppl A):S13-23.

Sutcliffe, et al. 1978. Cold Spring Harbor Quant. Biol. 43:77-90

Tang, D. C., De Vit, M., and Johnston, S. A. (1992). Genetic
immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*
356(6365), 152-4.

30

Thomson, S. A., Sherritt, M. A., Medveczky, J., Elliott, S. L., Moss, D. J.,
Fernando, G. J., Brown, L. E., and Suhrbier, A. (1998). Delivery of multiple CD8
cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J Immunol* 160(4),1717-23.

40

Tobery, T. W., and Siliciano, R. F. (1997). Targeting of FHV- I antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses *in vivo* after immunization. *J Exp Med* 185(5), 909-20.

Torres CA, Yang K, Mustafa F, Robinson HL (2000). DNA immunization: effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses. *Vaccine* 18: 805-14

10

Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* 1997;158(10):4529-32.

20

Uchijima, M., Yoshida, A., Nagata, T., and Koide, Y. (1998). Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J Immunol* 161(10), 5594-9.

Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., De Witt, C. M., Friedman, A., and et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259(5102), 1745-9.

30

Wild, J., Gruner, B., Metzger, K., Kuhrober, A., Pudollek, H. P., Hauser,

H., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (1998). Polyvalent vaccination against hepatitis B surface and core antigen using a dicistronic expression plasmid. *Vaccine* 16(4), 353-60.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247(4949 Pt 1), 1465-8.

10

Wu, Y., and Kipps, T. J. (1997). Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasomedependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* 159(12), 6037-43.

Xiang, Z., and Ertl, H. C. (1995). Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2(2), 129-35.

20

Yamamoto S, Folks TM, Heneine W. Highly sensitive qualitative and quantitative detection of reverse transcriptase activity: optimization, validation, and comparative analysis with other detection systems. *J Virol Methods* 1996;61(1-2):135-43.

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の新規の p G A 1 構築物を示す。表示はベクターにおけるエレメントの名称および位置である。イタリック体の表示は、ベクターへのワクチン挿入物のクローニングに有用な固有の制限エンドヌクレアーゼ部位である。

【図 2】図 1 に示した新規の p G A 1 構築物の配列番号：1 の DNA 配列を示す。プラスミドにおけるエレメントの位置をヌクレオチド配列の下に示す。

【図 3】本発明の新規の p G A 2 構築物を示す。表示はベクターにおけるエレメントの名称および位置である。イタリック体の表示は、ベクターへのワクチン挿入物のクローニングに有用な固有の制限エンドヌクレアーゼ部位である。

【図 4】図 3 に示した新規の p G A 2 構築物の配列番号：2 の DNA 配列を示す。プラスミドにおけるエレメントの位置をヌクレオチド配列の下に示す。

【図 5】本発明の新規の p G A 3 構築物を示す。表示はベクターにおけるエレメントの名称および位置である。イタリック体の表示は、ベクターへのワクチン挿入物のクローニングに有用な固有の制限エンドヌクレアーゼ部位である。

【図 6】図 5 に示した新規の p G A 3 構築物の配列番号：3 の DNA 配列を示す。プラスミドにおけるエレメントの位置をヌクレオチド配列の下に示す。

【図 7】p G A ベクター（p G A 3 / H 1）および p J W 4 3 0 3 研究ベクター（p J W 4 3 0 3 / H 1）において発現されたインフルエンザ H 1 血球凝集素によって惹起された

50

抗H A I g Gのレベルの比較である。遺伝子銃接種を用いて、B A L B / cマウスを、低用量 (0.1 μ g) または高用量 (1 μ g) の表示プラスミドによって免疫化しかつ追加抗原刺激した。初回免疫化の4週間後に追加免疫化を行った。

【図8】図8Aは親野生型B H 1 0プロウイルスの模式図を示す。ここから非感染性ウイルス様粒子 (V L P) を産生する構築物を作製した。点で示す領域はV L P構築物において欠失された配列を示す。B H 1 0プロウイルスの様々な領域の位置および表示を四角い枠の中に示す。長末端反復をコードするU 3 R U 5領域は転写制御エレメントを含む。他の全ての表示領域はタンパク質をコードする。明確にするために、p o l (P r t、R T、I n t) ならびにe n v (S UおよびT M) によって発現される産物を示す。図8BはJ S 2ワクチン挿入物を示す。この6.7 k bワクチン挿入物は、H I V-1-I I I b B H 1 0株のG a g配列、P r t配列、およびR T配列、A D Aに由来するT a tタンパク質およびV p uタンパク質、ならびにA D A配列およびB H 1 0配列のキメラであるR e vタンパク質およびE n vタンパク質を発現する。G a g配列は、ウイルスR N Aのパッケージングを制限するためのジンクフィンガー変異を含む。R T配列は、逆転写酵素活性を無くす3つの点変異を含む。表示は図8Aと同じである。括弧でくくった領域は、C C R-5を使用するE n vを導入するためにB H 1 0配列をA D A由来の配列で置換したB H 1 0領域を示す。xは安全変異を示す。図8CはJ S 5挿入物を示す。J S 5は、G a g、P r t、R T、V p u、T a t、およびR e vを発現する6 k bワクチン挿入物である。J S 5は、E n vにおける配列が欠失された以外はJ S 2と同じ配列からなる。欠失配列は図8Bに黒い四角い囲みとして示される。表示は図8Aおよび8Bと同じである。E n vの3'領域にあるR e v応答エレメント (R R E) は構築物に維持される。

【図9Aおよび図9B】J S 2ワクチン挿入物構築における中間体に関するG a g発現およびE n v発現をそれぞれ示す。データは、293 T細胞での一過的トランスフェクションに由来する。p G A 1 / J S 1 (A D A V L P) は、野生型H I V-1 A D AまたはH I V-1 I I I bプロウイルス、および以前の研究で用いられたV L P産生DNA (d P o l) より高いレベルのG a g (図9A) およびE n v (図9B) を産生した。

【図10】安全変異のない挿入物を発現するワクチンベクター (J S 1およびJ S 4)、ジンクフィンガーおよびR Tに点変異のある挿入物を発現するワクチンベクター (J S 2およびJ S 5)、ならびにジンクフィンガー、R T、およびプロテアーゼに点変異のある挿入物を発現するワクチンベクター (J S 3およびJ S 6) によって一過的にトランスフェクトされた細胞におけるp 2 4キャプシド発現を示す。ジンクフィンガーおよびR Tにおける安全変異は活発なV L P発現を指示するが、P r tにおける安全変異はそうではないことに留意されたい。安全変異の存在下での高レベル発現に基づいて、引き続くベクター開発のためにJ S 2およびJ S 5が選択された。

【図11Aおよび図11B】イントロンAを有するp G AベクターおよびイントロンAをもたないp G Aベクターによって発現された新規の候補ワクチン構築物のG a g発現およびE n v発現をそれぞれ示す。P G A 1はイントロンAを含むが、p G A 2はイントロンAを含まない。好ましい発現レベルに基づいてワクチンにおいて使用するためにp G A 2 / J S 2およびp G A 1 / J S 5が選択された。

【図12】(1) 偽性、(2) p G A 2 / J S 2、および(3) p G A 1 / J S 5でトランスフェクトされた293 T細胞からの細胞溶解物および組織培養上清のウエスタンブロットを示す。ここで一次抗体は、感染患者由来の抗H I V I g (図12A)、抗p 2 4 (図12B)、抗g p 1 2 0 (図12C)、および抗R T (図12D) からそれぞれプールされた。

【図13】p G Aを示す。

【図14】p G A 2 / 89.6、p G A 1 / G a g-P o l、およびp G A 2 / J S 2間でのG a g発現レベルの比較である。発現の比較研究は、一過的にトランスフェクトされた293 T細胞で行った。

【図15】G a g特異的T細胞の時間的頻度を示す。図15A：DNA初回免疫化およびr M V A追加免疫化により惹起されたG a g特異的C D 8 T細胞応答である。概略図は

、高用量皮内DNA免疫化動物において得られたGag-CM9四量体データを示す。図15B：攻撃前の様々な時点および攻撃2週間後での、Mamu-A*01ワクチン接種マカクおよび対照マカクにおけるGag-CM9-Mamu-A*01四量体特異的T細胞である。各グラフの右上隅の数字は、総CD8⁺T細胞の%としての四量体特異的CD8⁺T細胞の頻度を示す。各グラフの段の上の数字は個々の動物を指定する。図15C：攻撃前の様々な時点および攻撃2週間後での、A*01および非A*01（斜線の棒）のワクチン接種されたマカクおよびワクチン接種されていないマカクにおけるGag特異的IFN- γ ELISPOTである。約10~13のGagペプチド（12個における22merの重複）の3つのプールを分析に使用した。データの棒の上の数字は、各群のELISPOTの相加平均±標準偏差を示す。グラフの上の数字は個々の動物を指定する。* 10
、データ入手できず；#、<20 ELISPOT/ 1×10^6 PBMC。

【図16】DNA/MVA記憶応答におけるGagおよびEnvに対するIFN- γ 産生ELISPOTの高さおよび幅を示す。図16A：個々のGagペプチドプールおよびEnvペプチドプールに対する応答である。群内の動物のデータを同じ記号で示す。図16B：異なる群のELISPOT応答の高さおよび幅の平均である。高さは、各群の動物のGag ELISPOTおよびEnv ELISPOTの合計の平均±標準偏差である。幅は、各群の動物によって認識されたGagプールおよびEnvプールの数の平均±標準偏差である。ELISPOT応答は、記憶期の間、rMVA追加抗原刺激後25週目（攻撃の4週間前）で、約70アミノ酸のGag配列を代表するGagペプチド（12個において約7つの22merの重複）の7プール、および約40アミノ酸のEnv配列を代表するEnvペプチド（11個において約10の15merの重複）の21プールを用いてPBMCにおいて測定された。 20

【図17】病原体ワクチン挿入物を含むpGA2構築物の配列番号：4のDNA配列を示す。JS2はクレードB HIV-1 VLPを発現する。配列番号：4のヌクレオチド配列およびコードされるタンパク質の両方を示す。

【図18】病原体ワクチン挿入物を含むpGA1構築物のDNA配列を示す。JS5はクレードB HIV-1 Gag-pol挿入物を発現する。この配列およびコードされるタンパク質の両方を示す。

【図19】ワクチン接種動物および対照動物を攻撃した後の、時間的な、ウイルス負荷、CD4総数、および生存を示す。図19A：幾何平均ウイルス負荷である。図19B：攻撃後様々な週での、ワクチン群および対照群の幾何平均CD4総数である。群の記号表をパネルBに示す。図19C：ワクチン接種動物および対照動物の生存曲線である。点線は24匹全てのワクチン接種動物を示す。図19D：ウイルス負荷である。図19E：ワクチン群および対照群における個々の動物のCD4総数である。動物番号の記号表を図19Eに示す。攻撃後最初の12週間のアッセイ法のバックグラウンドは1000コピーRNA/1ml血漿であった。1000未満の負荷がある動物を負荷500と記録した。16週目および20週目の検出のためのバックグラウンドは300コピーRNA/mlであった。300未満のウイルスレベルがある動物を300と記録した。 30

【図20】ワクチン群および対照群における攻撃後のT細胞応答を示す。図20A：時間的な四量体+細胞およびウイルス負荷である。図20B：攻撃2週間後でのGag-CM9ペプチドによる刺激に反応したIFN- γ 産生についての細胞内サイトカインアッセイ法。このエクスピボアッセイ法によって、図15Aで示されたピーク攻撃後四量体+細胞の機能状態を評価することができる。図20C：攻撃12週間後での増殖アッセイ法。一過性トランスフェクションによって産生されたGag-Pol-Env（白棒）およびGag-Pol（斜線棒）を刺激のために使用した。偽性トランスフェクトされた培養物からの上清を対照抗原とした。刺激のためにタンパク質を約1 μ g/ml p27 Gagで使した。刺激指数は、ウイルス抗原存在下での培養物の増殖/偽性抗原存在下での培養物の増殖である。 40

【図21】攻撃12週間後でのリンパ節の組織形態およびウイルス負荷を示す。図21A：拡大した胚中心ならびに不連続な暗い区域および明るい区域のある非常に多くの二次濾 50

胞が存在することを特徴とする濾胞過形成の証拠を示す、ワクチン接種マカクからの代表的なリンパ節。図21B：濾胞減少および傍皮質リンパ細胞萎縮を示す、対照感染動物からの代表的なリンパ節。図21C：非反応性胚中心を示す、年齢が一致した非感染マカクからの代表的なリンパ節。図21D：濾胞過形成の非特異的な指標を示すために、胚中心が占めるリンパ節総面積の割合を測定した。非感染対照のデータは、4匹の年齢が一致したアカゲザルのデータである。図21E：SHIV-89.6 gagおよびpolに相補的なアンチセンスリボプローブカクテルを用いたインサイチュハイブリダイゼーションによって、リンパ節のウイルス荷重(viral burden)を測定した。検査されたリンパ節は全て鼠径リンパ節であった。

【図22】攻撃後の時間的な抗体応答を示す。酵素結合免疫測定法(ELISA)を用いて、総Gag抗体(図22A)または総Env抗体(図22B)のマイクログラムを測定した。MT-2細胞死滅およびニュートラルレッド染色を用いて、89.6(図22C)および89.6P(図22D)に対する中和抗体の力価を測定した。力価は、ヒトPBM Cで増殖された表示ウイルスの50%中和を生じる血清希釈の逆数である。動物の記号は図19と同じである。

【図23】ワクチン試験の相関関係および用量反応曲線(図23AおよびB)を示す。攻撃2週間後(図23A)および3週間後(図23B)での、ピークワクチン惹起IFN- γ ELISPO Tとウイルス負荷には逆相関がある。動物3(図15Cを参照のこと)のピークDNA/MVA ELISPO T試料がなくなったために、24匹のワクチン接種動物のうち23匹だけを相関関係に含める。図23C：ピークDNA-MVA応答でのGag ELISPO Tの平均高さの用量反応曲線(図15Cからのデータ)。図23D：DNA/MVA記憶ELISPO T応答の幅の用量反応曲線(図16Bからのデータ)。図23E：MVA追加抗原刺激後のピーク抗Gag抗体応答の用量反応曲線(図22Aからのデータ)。異なる用量のDNAが、異なるレベルのELISPO Tおよび抗体応答を惹起した($P < 0.05$)。DNA接種経路は抗体に有意な影響を及ぼしたが($P = 0.02$)、ELISPO T応答には影響を及ぼさなかった。

【図24】HAタンパク質を発現するDNAの遺伝子銃接種により惹起された抗HA Ig Gを示す。

【図25】3種類の異なるHA DNAワクチンにより惹起された抗HA Ig Gのアビディティーを示す。

【図26】ウイルス攻撃後の体重減少からの防御を示す。

【図27】ワクチンにEnvを含める重要性を示す。

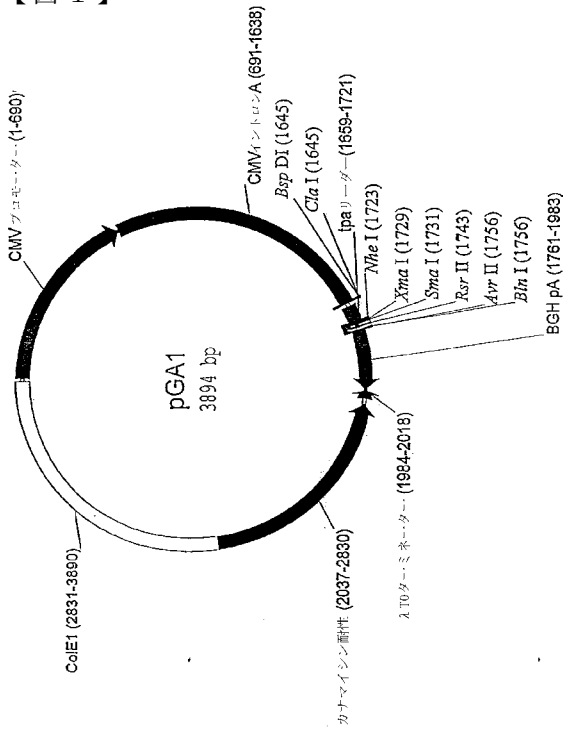
【図28】SHIV-89.6Pで直腸内に攻撃された動物に投与されるワクチンにEnvを含める重要性を示す。

【図29】ベクターDNAワクチン構築物の模式図である。

【図30】インビトロでのワクチン構築物の発現を示すウエスタンブロットの結果を示す。

【図31】麻疹ウイルス中和抗体の時間的な曲線を示す。

【 図 1 】



【 図 2 】

Twelve, December 21, 1998 7:23 PM
pGA1 Final Version Map (pGA1 (17-3894)) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Bsp DI (1645) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Cla I (1645) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Ipa リーダー (1659-1724) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Xma I (1723) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Xma I (1729) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Sma I (1731) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Rsr II (1743) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Avr II (1756) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Bln I (1756) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) BGH pA (1761-1883) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) CMVプロモーター (-1-690) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) ColE1 (2831-3890) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Kanamycin resistance gene (カナマイシン耐性) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) pGA1 3894 bp Site and Sequence

Twelve, December 21, 1998 7:23 PM
pGA1 Final Version Map (pGA1 (17-3894)) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Bsp DI (1645) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Cla I (1645) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Ipa リーダー (1659-1724) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Xma I (1723) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Xma I (1729) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Sma I (1731) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Rsr II (1743) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Avr II (1756) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Bln I (1756) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) BGH pA (1761-1883) Site and Sequence

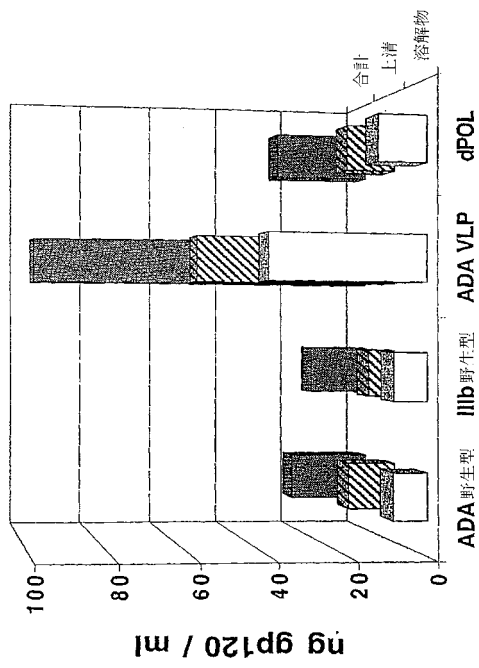
Enzyme: I (1645) CMVプロモーター (-1-690) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) ColE1 (2831-3890) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) Kanamycin resistance gene (カナマイシン耐性) Site and Sequence

Enzyme: I (1645) pGA1 3894 bp Site and Sequence

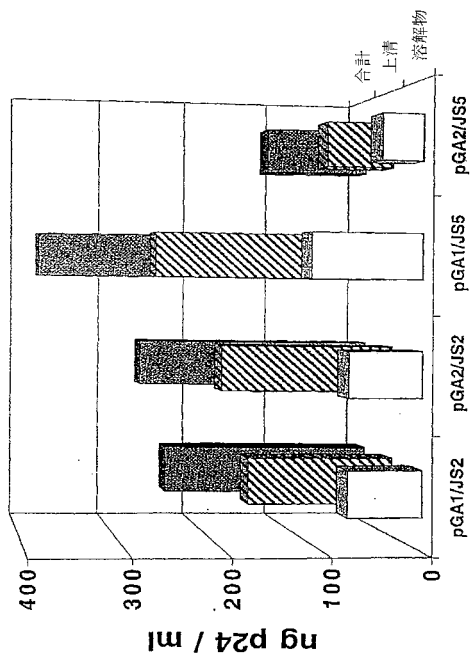
【図 9 B】



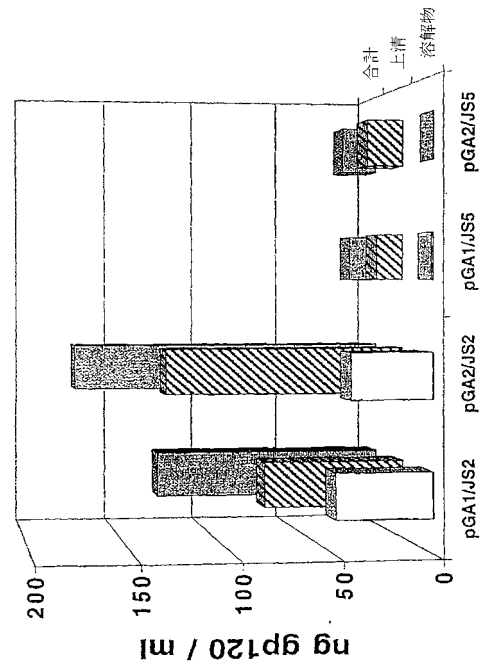
【図 10】



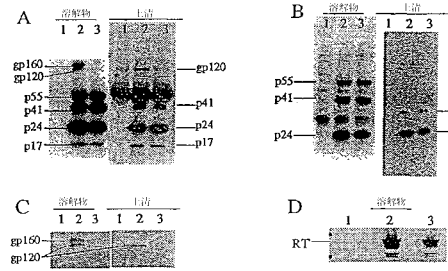
【図 11 A】



【図 9 B】

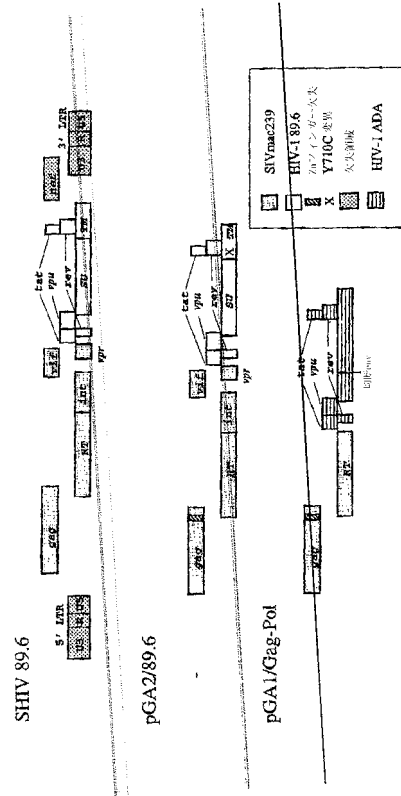


【図 1 2】

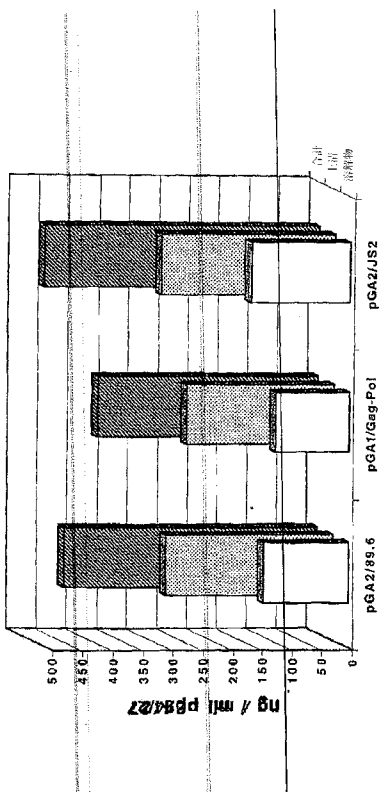


1) 偽 2) pGA2/JS2 3) pGA1/JS5 で形質転換された293T細胞の溶解産物
および組織培養上清のウエスタンブロッティング
-抗体: A) 感染患者由来のフルセした抗HIV Ig B) 抗p24 C) 抗gp120 D) 抗RT

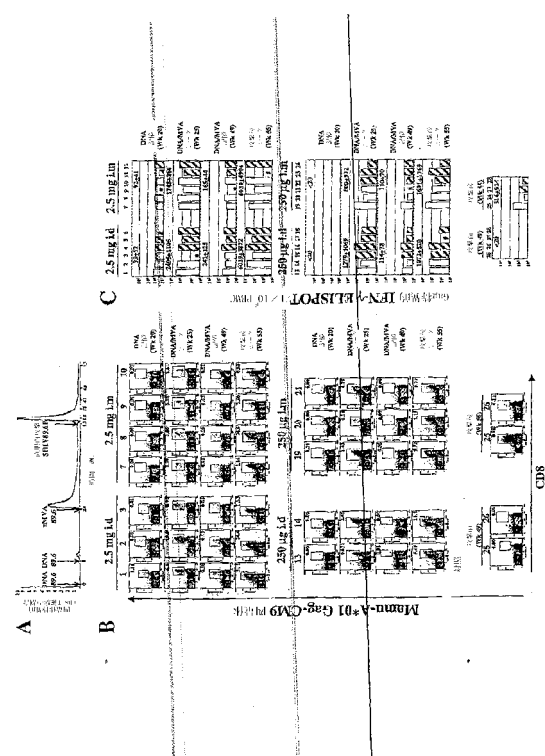
【図 1 3】



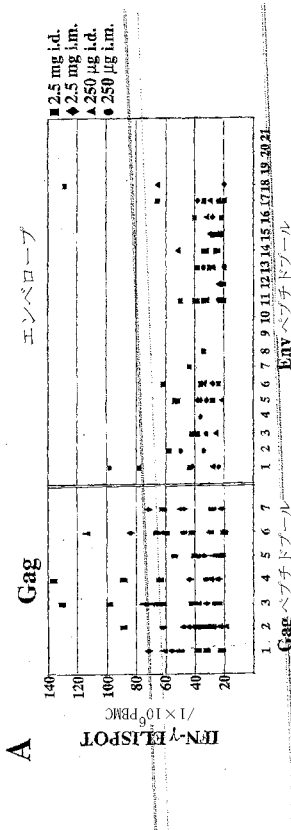
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 16】

**B**

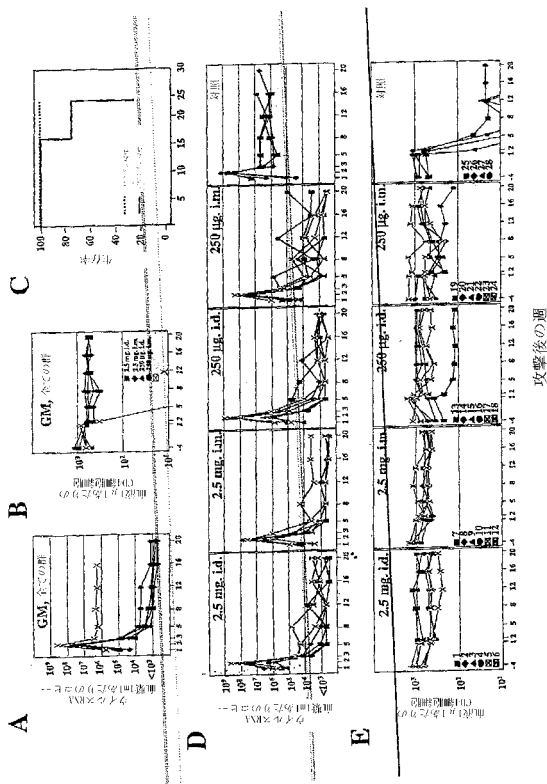
ENV-1 SPOT		ENV-2 SPOT		ENV-3 SPOT		ENV-4 SPOT		ENV-5 SPOT		ENV-6 SPOT		ENV-7 SPOT		ENV-8 SPOT		ENV-9 SPOT		ENV-10 SPOT		ENV-11 SPOT		ENV-12 SPOT		ENV-13 SPOT		ENV-14 SPOT		ENV-15 SPOT		ENV-16 SPOT		ENV-17 SPOT		ENV-18 SPOT		ENV-19 SPOT		ENV-20 SPOT		ENV-21 SPOT		ENV-22 SPOT		ENV-23 SPOT		ENV-24 SPOT		ENV-25 SPOT		ENV-26 SPOT		ENV-27 SPOT		ENV-28 SPOT		ENV-29 SPOT		ENV-30 SPOT		ENV-31 SPOT		ENV-32 SPOT		ENV-33 SPOT		ENV-34 SPOT		ENV-35 SPOT		ENV-36 SPOT		ENV-37 SPOT		ENV-38 SPOT		ENV-39 SPOT		ENV-40 SPOT		ENV-41 SPOT		ENV-42 SPOT		ENV-43 SPOT		ENV-44 SPOT		ENV-45 SPOT		ENV-46 SPOT		ENV-47 SPOT		ENV-48 SPOT		ENV-49 SPOT		ENV-50 SPOT		ENV-51 SPOT		ENV-52 SPOT		ENV-53 SPOT		ENV-54 SPOT		ENV-55 SPOT		ENV-56 SPOT		ENV-57 SPOT		ENV-58 SPOT		ENV-59 SPOT		ENV-60 SPOT		ENV-61 SPOT		ENV-62 SPOT		ENV-63 SPOT		ENV-64 SPOT		ENV-65 SPOT		ENV-66 SPOT		ENV-67 SPOT		ENV-68 SPOT		ENV-69 SPOT		ENV-70 SPOT		ENV-71 SPOT		ENV-72 SPOT		ENV-73 SPOT		ENV-74 SPOT		ENV-75 SPOT		ENV-76 SPOT		ENV-77 SPOT		ENV-78 SPOT		ENV-79 SPOT		ENV-80 SPOT		ENV-81 SPOT		ENV-82 SPOT		ENV-83 SPOT		ENV-84 SPOT		ENV-85 SPOT		ENV-86 SPOT		ENV-87 SPOT		ENV-88 SPOT		ENV-89 SPOT		ENV-90 SPOT		ENV-91 SPOT		ENV-92 SPOT		ENV-93 SPOT		ENV-94 SPOT		ENV-95 SPOT		ENV-96 SPOT		ENV-97 SPOT		ENV-98 SPOT		ENV-99 SPOT		ENV-100 SPOT		ENV-101 SPOT		ENV-102 SPOT		ENV-103 SPOT		ENV-104 SPOT		ENV-105 SPOT		ENV-106 SPOT		ENV-107 SPOT		ENV-108 SPOT		ENV-109 SPOT		ENV-110 SPOT		ENV-111 SPOT		ENV-112 SPOT		ENV-113 SPOT		ENV-114 SPOT		ENV-115 SPOT		ENV-116 SPOT		ENV-117 SPOT		ENV-118 SPOT		ENV-119 SPOT		ENV-120 SPOT		ENV-121 SPOT		ENV-122 SPOT		ENV-123 SPOT		ENV-124 SPOT		ENV-125 SPOT		ENV-126 SPOT		ENV-127 SPOT		ENV-128 SPOT		ENV-129 SPOT		ENV-130 SPOT		ENV-131 SPOT		ENV-132 SPOT		ENV-133 SPOT		ENV-134 SPOT		ENV-135 SPOT		ENV-136 SPOT		ENV-137 SPOT		ENV-138 SPOT		ENV-139 SPOT		ENV-140 SPOT		ENV-141 SPOT		ENV-142 SPOT		ENV-143 SPOT		ENV-144 SPOT		ENV-145 SPOT		ENV-146 SPOT		ENV-147 SPOT		ENV-148 SPOT		ENV-149 SPOT		ENV-150 SPOT		ENV-151 SPOT		ENV-152 SPOT		ENV-153 SPOT		ENV-154 SPOT		ENV-155 SPOT		ENV-156 SPOT		ENV-157 SPOT		ENV-158 SPOT		ENV-159 SPOT		ENV-160 SPOT		ENV-161 SPOT		ENV-162 SPOT		ENV-163 SPOT		ENV-164 SPOT		ENV-165 SPOT		ENV-166 SPOT		ENV-167 SPOT		ENV-168 SPOT		ENV-169 SPOT		ENV-170 SPOT		ENV-171 SPOT		ENV-172 SPOT		ENV-173 SPOT		ENV-174 SPOT		ENV-175 SPOT		ENV-176 SPOT		ENV-177 SPOT		ENV-178 SPOT		ENV-179 SPOT		ENV-180 SPOT		ENV-181 SPOT		ENV-182 SPOT		ENV-183 SPOT		ENV-184 SPOT		ENV-185 SPOT		ENV-186 SPOT		ENV-187 SPOT		ENV-188 SPOT		ENV-189 SPOT		ENV-190 SPOT		ENV-191 SPOT		ENV-192 SPOT		ENV-193 SPOT		ENV-194 SPOT		ENV-195 SPOT		ENV-196 SPOT		ENV-197 SPOT		ENV-198 SPOT		ENV-199 SPOT		ENV-200 SPOT		ENV-201 SPOT		ENV-202 SPOT		ENV-203 SPOT		ENV-204 SPOT		ENV-205 SPOT		ENV-206 SPOT		ENV-207 SPOT		ENV-208 SPOT		ENV-209 SPOT		ENV-210 SPOT		ENV-211 SPOT		ENV-212 SPOT		ENV-213 SPOT		ENV-214 SPOT		ENV-215 SPOT		ENV-216 SPOT		ENV-217 SPOT		ENV-218 SPOT		ENV-219 SPOT		ENV-220 SPOT		ENV-221 SPOT		ENV-222 SPOT		ENV-223 SPOT		ENV-224 SPOT		ENV-225 SPOT		ENV-226 SPOT		ENV-227 SPOT		ENV-228 SPOT		ENV-229 SPOT		ENV-230 SPOT		ENV-231 SPOT		ENV-232 SPOT		ENV-233 SPOT		ENV-234 SPOT		ENV-235 SPOT		ENV-236 SPOT		ENV-237 SPOT		ENV-238 SPOT		ENV-239 SPOT		ENV-240 SPOT		ENV-241 SPOT		ENV-242 SPOT		ENV-243 SPOT		ENV-244 SPOT		ENV-245 SPOT		ENV-246 SPOT		ENV-247 SPOT		ENV-248 SPOT		ENV-249 SPOT		ENV-250 SPOT		ENV-251 SPOT		ENV-252 SPOT		ENV-253 SPOT		ENV-254 SPOT		ENV-255 SPOT		ENV-256 SPOT		ENV-257 SPOT		ENV-258 SPOT		ENV-259 SPOT		ENV-260 SPOT		ENV-261 SPOT		ENV-262 SPOT		ENV-263 SPOT		ENV-264 SPOT		ENV-265 SPOT		ENV-266 SPOT		ENV-267 SPOT		ENV-268 SPOT		ENV-269 SPOT		ENV-270 SPOT		ENV-271 SPOT		ENV-272 SPOT		ENV-273 SPOT		ENV-274 SPOT		ENV-275 SPOT		ENV-276 SPOT		ENV-277 SPOT		ENV-278 SPOT		ENV-279 SPOT		ENV-280 SPOT		ENV-281 SPOT		ENV-282 SPOT		ENV-283 SPOT		ENV-284 SPOT		ENV-285 SPOT		ENV-286 SPOT		ENV-287 SPOT		ENV-288 SPOT		ENV-289 SPOT		ENV-290 SPOT		ENV-291 SPOT		ENV-292 SPOT		ENV-293 SPOT		ENV-294 SPOT		ENV-295 SPOT		ENV-296 SPOT		ENV-297 SPOT		ENV-298 SPOT		ENV-299 SPOT		ENV-300 SPOT		ENV-301 SPOT		ENV-302 SPOT		ENV-303 SPOT		ENV-304 SPOT		ENV-305 SPOT		ENV-306 SPOT		ENV-307 SPOT		ENV-308 SPOT		ENV-309 SPOT		ENV-310 SPOT		ENV-311 SPOT		ENV-312 SPOT		ENV-313 SPOT		ENV-314 SPOT		ENV-315 SPOT		ENV-316 SPOT		ENV-317 SPOT		ENV-318 SPOT		ENV-319 SPOT		ENV-320 SPOT		ENV-321 SPOT		ENV-322 SPOT		ENV-323 SPOT		ENV-324 SPOT		ENV-325 SPOT		ENV-326 SPOT		ENV-327 SPOT		ENV-328 SPOT		ENV-329 SPOT		ENV-330 SPOT		ENV-331 SPOT		ENV-332 SPOT		ENV-333 SPOT		ENV-334 SPOT		ENV-335 SPOT		ENV-336 SPOT		ENV-337 SPOT		ENV-338 SPOT		ENV-339 SPOT		ENV-340 SPOT		ENV-341 SPOT		ENV-342 SPOT		ENV-343 SPOT		ENV-344 SPOT		ENV-345 SPOT		ENV-346 SPOT		ENV-347 SPOT		ENV-348 SPOT		ENV-349 SPOT		ENV-350 SPOT		ENV-351 SPOT		ENV-352 SPOT		ENV-353 SPOT		ENV-354 SPOT		ENV-355 SPOT		ENV-356 SPOT		ENV-357 SPOT		ENV-358 SPOT		ENV-359 SPOT		ENV-360 SPOT		ENV-361 SPOT		ENV-362 SPOT		ENV-363 SPOT		ENV-364 SPOT		ENV-365 SPOT		ENV-366 SPOT		ENV-367 SPOT		ENV-368 SPOT		ENV-369 SPOT		ENV-370 SPOT		ENV-371 SPOT		ENV-372 SPOT		ENV-373 SPOT		ENV-374 SPOT		ENV-375 SPOT		ENV-376 SPOT		ENV-377 SPOT		ENV-378 SPOT		ENV-379 SPOT		ENV-380 SPOT		ENV-381 SPOT		ENV-382 SPOT		ENV-383 SPOT		ENV-384 SPOT		ENV-385 SPOT		ENV-386 SPOT		ENV-387 SPOT		ENV-388 SPOT		ENV-389 SPOT		ENV-390 SPOT		ENV-391 SPOT		ENV-392 SPOT		ENV-393 SPOT		ENV-394 SPOT		ENV-395 SPOT		ENV-396 SPOT		ENV-397 SPOT		ENV-398 SPOT		ENV-399 SPOT		ENV-400 SPOT	
Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env	Gag	Env																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								

[illegible]

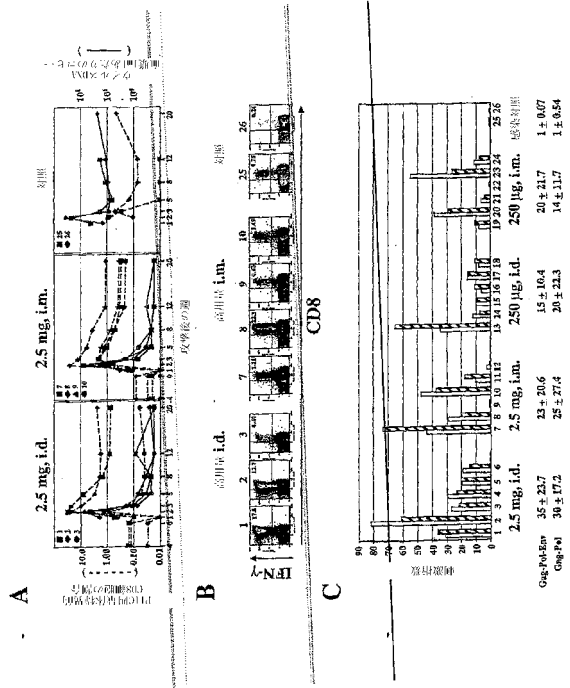
5000
 5100
 5200
 5300
 5400
 5500
 5600
 5700
 5800
 5900
 6000
 6100
 6200
 6300
 6400
 6500
 6600
 6700
 6800
 6900
 7000
 7100
 7200
 7300
 7400
 7500
 7600
 7700
 7800
 7900
 8000
 8100
 8200
 8300
 8400
 8500
 8600
 8700
 8800
 8900
 9000
 9100
 9200
 9300
 9400
 9500
 9600
 9700
 9800
 9900
 10000

1000
 1100
 1200
 1300
 1400
 1500
 1600
 1700
 1800
 1900
 2000
 2100
 2200
 2300
 2400
 2500
 2600
 2700
 2800
 2900
 3000
 3100
 3200
 3300
 3400
 3500
 3600
 3700
 3800
 3900
 4000
 4100
 4200
 4300
 4400
 4500
 4600
 4700
 4800
 4900
 5000
 5100
 5200
 5300
 5400
 5500
 5600
 5700
 5800
 5900
 6000
 6100
 6200
 6300
 6400
 6500
 6600
 6700
 6800
 6900
 7000
 7100
 7200
 7300
 7400
 7500
 7600
 7700
 7800
 7900
 8000
 8100
 8200
 8300
 8400
 8500
 8600
 8700
 8800
 8900
 9000
 9100
 9200
 9300
 9400
 9500
 9600
 9700
 9800
 9900
 10000

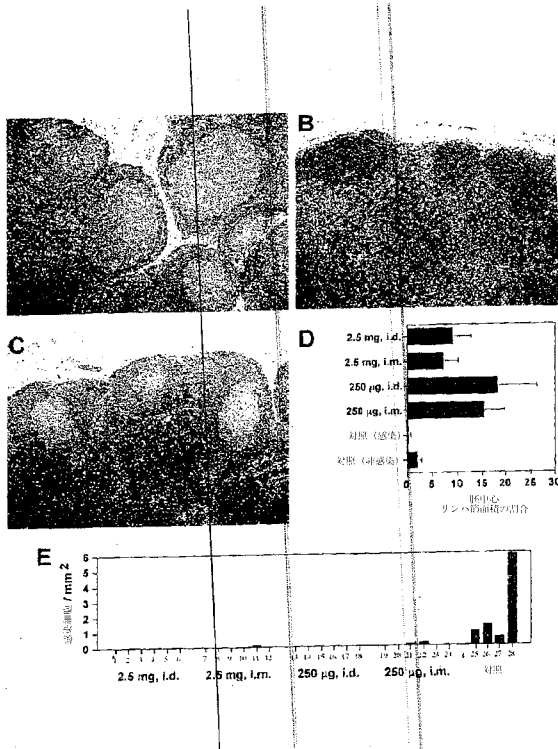
【図 19】



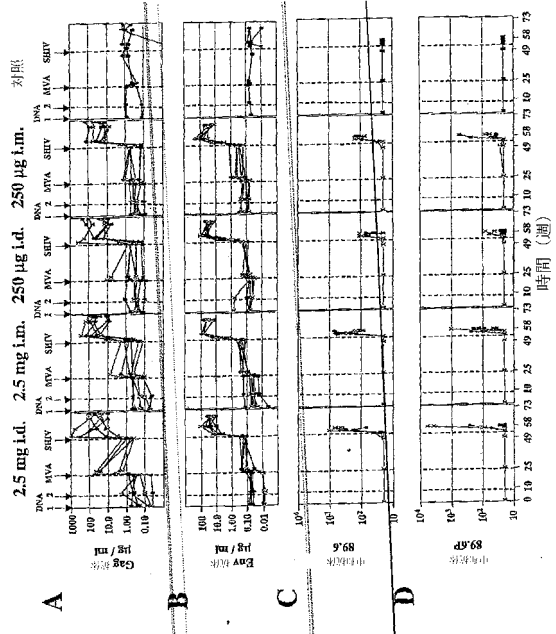
【図 20】



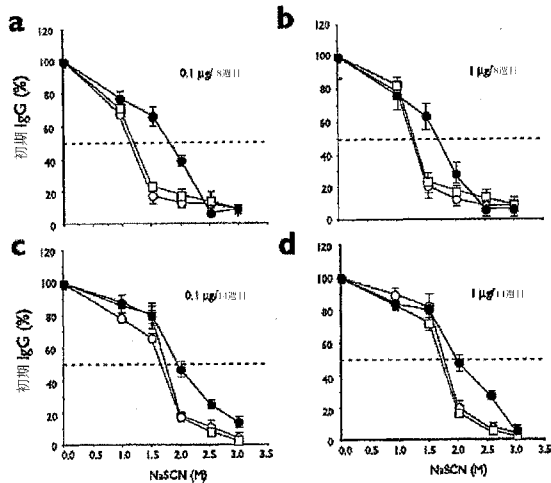
【図 2 1】



【図 2 2】

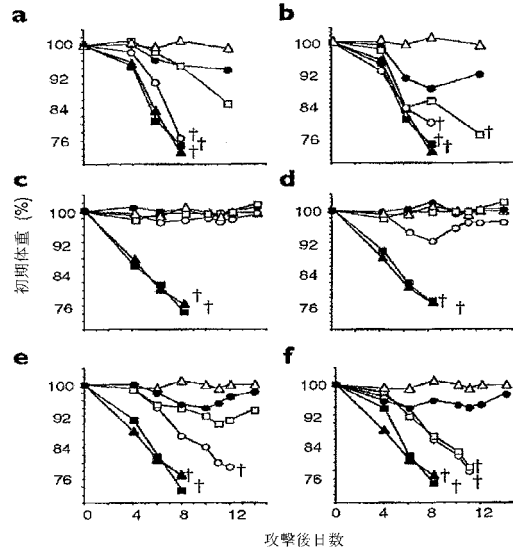


【図 25】



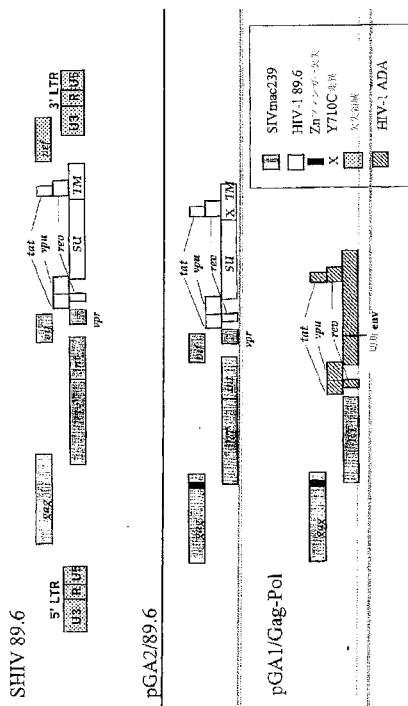
3種類の異なるHA-DNAワクチンにより惹起された抗HA-IgGのアビディティー8週目 (a, b) および14週目 (c, d) 由来の血清を、A/PR/8/34(H1N1)特異的NaSCN置換ELISAで分析した。接種されたマウスから血清を得た。血清は、sHA (白丸)、tMHA (白四角)、またはsHA-3C3d (黒丸) を含むマウスから得られた。デッセイ法では、各マウス群由来の1:300希釈のプール血清試料を使用した。データは、3回の実験の平均±標準誤差として表される。

【図 26】

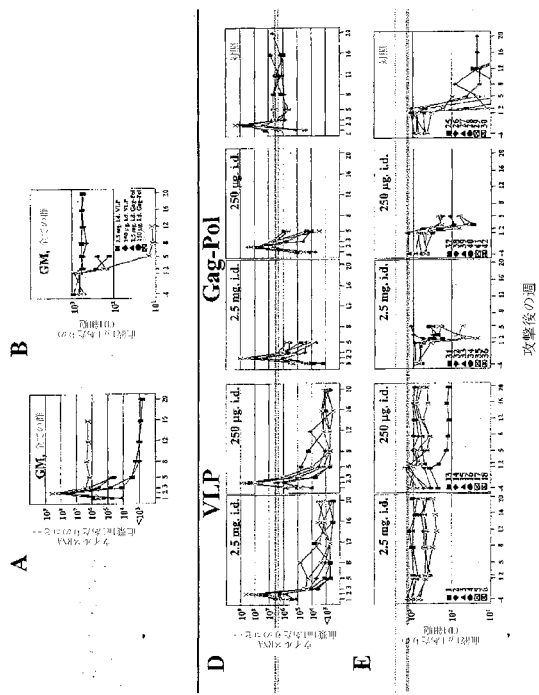


ウイルス攻撃後の体重減少からの防御8週目 (a, b) または14週目 (c, d) に、致死量のインフルエンザウイルスA/PR/8/34(H1N1)を用いてマウスの鼻孔内に攻撃し、体重減少を毎日モニターした。データを平均初期体重の%としてグラフ化した。(a, c) 1 µg用量のDNAワクチンを用いてマウスを初回抗原刺激および追加抗原刺激した。(b, d) 0.1 µg用量のDNAワクチンを用いてマウスを初回抗原刺激および追加抗原刺激した。(e) マウスに1 µg単用量のDNAワクチンを与えた。(f) マウスに0.1 µg単用量接種のDNAワクチンを与えた。ベクター (黒四角)、sHA (白丸)、tMHA (白四角)、sHA-3C3d (黒丸)、非投薬-協性 (白三角)、または非投薬ウイルス (黒三角) を含むマウスから血清を得た。十字は、一つの群における5匹全てのマウスが病気で死んだ時点を表す。

【図 27】



【図 28】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 December 2001 (06.12.2001)

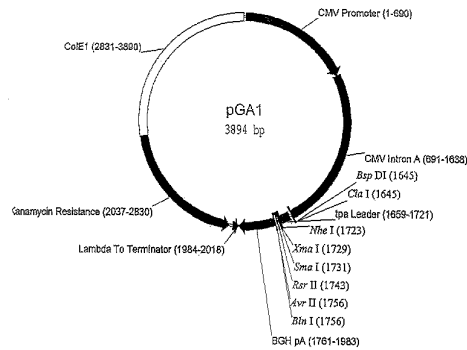
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/92470 A2

- (51) International Patent Classification: C12N Place, Decatur, GE 30333 (US). ELLENBERGER, Dennis, 5055 Broadreen Drive, Norcross, GE 30092 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/06795
- (22) International Filing Date: 2 March 2001 (02.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/186,364 2 March 2000 (02.03.2000) US
60/251,083 1 December 2000 (01.12.2000) US
- (71) Applicant: EMORY UNIVERSITY [US/US]; 2009 Ridgewood Drive, Atlanta, GA 30322 (US).
- (72) Inventors: ROBINSON, Harriet, L., 1051 Mason Woods Drive, Atlanta, GE 30329 (US). SMITH, James, M., 6523 Sevenoaks Drive, Tucker, GE 30084 (US). ROSS, Ted, M., 4111 Treetops Circle, Winterville, NC 28590 (US). BRIGHT, Rick, Arthur, 426 Rock Springs Road, NE, Atlanta, GE 30324 (US). HUA, Jian, 3251 Valleybrook
- (74) Agent: HAYZER, David, J., Womble Carlyle Sandridge & Rice, P.O. Box 7037, Atlanta, GA 30357-0037 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page.]

(54) Title: DNA EXPRESSION VECTORS AND METHODS OF USE



(57) Abstract: The present invention provides novel pGA constructs which are useful as vectors for the delivery of DNA vaccine inserts. The vaccine inserts can include the DNA transcripts of various virus, bacteria, parasite and/or fungi. Also described are methods of raising multi-epitope CD8 T-cell responses by administering therapeutically effective amounts of the novel pGA constructs comprising pathogen vaccine inserts followed by booster immunizations with a live vectored vaccine comprising the same vaccine inserts.

WO 01/92470 A2

WO 01/92470 A2

**Published:**

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

5

1

10 **DNA EXPRESSION VECTORS AND METHODS OF USE**

The present application claims the benefit of priority from U.S. provisional applications Serial No. 60/186,364, filed March 2, 2000, and Serial No. 60/251,083, filed December 1, 2000.

15 **GOVERNMENT SUPPORT**

Work described herein may have been supported in part by National Institutes of Health Grant 5 P01 AI43045 and National Institutes of Health/National Institute of Allergy and Infectious Diseases Grant R21 AI44325-01. The U.S. Government may have certain rights in this invention.

20 **FIELD OF THE INVENTION**

The present invention is directed generally to the fields of molecular genetics and immunology. More particularly, the present invention describes novel DNA expression vectors, novel vectors comprising DNA encoding an

WO 01/92470

PCT/US01/06795

immunogenic protein, and novel methods of immunizing animals including humans by administering the novel vectors comprising DNA encoding an immunogenic protein.

5 **BACKGROUND OF THE INVENTION**

Vaccines have had profound and long lasting effects on world health. Small pox has been eradicated, polio is near elimination, and diseases such as diphtheria, measles, mumps, pertussis, and tetanus are contained. Nonetheless, microbes remain major killers with current vaccines addressing only a handful of

10 the infections of man and his domesticated animals. Common infectious diseases for which there are no vaccines cost the United States \$120 billion dollars per year (Robinson et al., 1997). In first world countries, emerging infections such as immunodeficiency viruses, as well as reemerging diseases like drug resistant forms of tuberculosis, pose new threats and challenges for vaccine development.

15 The need for both new and improved vaccines is even more pronounced in third world countries where effective vaccines are often unavailable or cost-prohibitive. Recently, direct injections of antigen-expressing DNAs have been shown to initiate protective immune responses.

DNA-based vaccines use bacterial plasmids to express protein

20 immunogens in vaccinated hosts. Recombinant DNA technology is used to clone cDNAs encoding immunogens of interest into eukaryotic expression plasmids. Vaccine plasmids are then amplified in bacteria, purified, and directly inoculated into the hosts being vaccinated. DNA typically is inoculated by a needle injection

WO 01/92470

PCT/US01/06795

of DNA in saline, or by a gene gun device that delivers DNA-coated gold beads into skin. The plasmid DNA is taken up by host cells, the vaccine protein is expressed, processed and presented in the context of self-major histocompatibility (MHC) class I and class II molecules, and an immune response against the DNA-
5 encoded immunogen is generated.

The historical foundations for DNA vaccines (also known as "genetic immunization") emerged concurrently from studies on gene therapy and studies using retroviral vectors. Gene therapy studies on DNA delivery into muscle revealed that pure DNA was as effective as liposome-encapsulated DNA at
10 mediating transfection of skeletal muscle cells (Wolff et al., 1990). This unencapsulated DNA was termed "naked DNA," a fanciful term that has become popular for the description of the pure DNA used for nucleic acid vaccinations. Gene guns, which had been developed to deliver DNA into plant cells, were also used in gene therapy studies to deliver DNA into skin. In a series of experiments
15 testing the ability of plasmid-expressed human growth hormone to alter the growth of mice, it was realized that the plasmid inoculations, which had failed to alter growth, had elicited antibody (Tang, De Vit, and Johnston, 1992). This was the first demonstration of the raising of an immune response by an inoculated plasmid DNA. At the same time, experiments using retroviral vectors,
20 demonstrated that protective immune responses could be raised by very few infected cells (on the order of 10^4 - 10^5). Direct tests of the plasmid DNA that had been used to produce infectious forms of the retroviral vector for vaccination, performed in an influenza model in chickens, resulted in protective

WO 01/92470

PCT/US01/06795

immunizations (Robinson, Hunt, and Webster, 1993).

HIV-1 is projected to infect 1% of the world's population by the year 2000, making vaccine development for this recently emergent agent a high priority for world health. Preclinical trials on DNA vaccines have demonstrated
5 that DNA alone can protect against highly attenuated HIV-1 challenges in chimpanzees (Boyer et al., 1997), but not against more virulent SIV challenges in macaques (Lu et al., 1997). A combination of DNA priming plus an envelope glycoprotein boost has raised a neutralizing antibody-associated protection against a homologous challenge with a non-pathogenic chimera between SIV and HIV
10 (SHIV-IIIb) (Letvin et al., 1997). More recently, a comparative trial testing eight different protocols for the ability to protect against a series of challenges with SHIV-s (chimeras between simian and human immunodeficiency viruses) revealed the best containment of challenge infections by an immunization protocol that included priming by intradermal inoculation of DNA and boosting
15 with recombinant fowl pox virus vectors (Robinson et al., 1999). This containment of challenge infections was independent of the presence of neutralizing antibody to the challenge virus. Protocols which proved less effective at containing challenge infections included immunization by both priming and boosting by intradermal or gene gun DNA inoculations,
20 immunization by priming with intradermal or gene gun DNA inoculations and then boosting with a protein subunit; immunization by priming with gene gun DNA inoculations and boosting with recombinant fowl pox virus, immunization with protein only, and immunization with recombinant fowl pox virus only

WO 01/92470

PCT/US01/06795

(Robinson et al,1999). Early clinical trials of DNA vaccines in humans have revealed no adverse effects (MacGregor et al., 1996) and the raising of cytolytic T-cells (Calarota et al., 1998). A number of studies have screened for the ability of co-transfected lymphokines and co-stimulatory molecules to increase the efficiency of immunization (Robinson and Pertmer, in press).

Disadvantages of DNA vaccine approaches include the limitation of immunizations to products encoded by DNA (e.g., proteins) and the potential for atypical processing of bacterial and parasitic proteins by eukaryotic cells. Another significant problem with existing approaches to DNA vaccines is the instability of some vaccine insert sequences during the growth and amplification of DNA vaccine plasmids in bacteria. One possible cause of instability is exposure during plasmid growth of secondary structures in vaccine inserts or the plasmid backbone that can be recognized by bacterial endonucleases.

A need exists, therefore, for DNA expression vectors that exhibit improved stability in bacterial hosts and may be safely used in animals, including humans, for eukaryotic expression of immunogenic proteins useful as vaccines against a variety of infectious diseases, including HIV-1.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides novel pGA constructs. The novel pGA constructs are useful as vectors for the delivery of DNA vaccines.

The present invention also provides novel pGA constructs having vaccine inserts. The pathogen vaccine inserts can include the DNA transcription unit of any virus, bacteria, parasite and/or fungi.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

The present invention describes novel methods of immunizing patients by administering therapeutically effective amounts of the novel pGA constructs comprising pathogen vaccine inserts.

5 The present invention describes novel methods of immunizing patients by administering therapeutically effective amounts of the novel pGA constructs comprising pathogen vaccine inserts followed by booster immunizations with live vectored vaccines such as recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) vectors comprising the same vaccine inserts.

10 The present invention also describes novel methods of raising multi-epitope CD8 T-cell responses by administering therapeutically effective amounts of the novel pGA constructs comprising pathogen vaccine inserts followed by booster immunizations with a live vectored vaccine such as recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) vectors comprising the same vaccine inserts.

The present invention is described in more detail below.

15

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 illustrates a novel pGA1 construct of the present invention. Designations are identities and positions of elements in the vector. Designations in *italic print* are unique restriction endonuclease sites useful for cloning vaccine
20 inserts into the vector.

Fig. 2 illustrates the DNA sequence SEQ ID NO: 1 of the novel pGA1 construct shown in **Fig. 1**. The positions of elements in the plasmid are indicated below the nucleotide sequence.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

Fig. 3 illustrates a novel pGA2 construct of the present invention. Designations are identities and positions of elements in the vector. Designations in italic print are unique restriction endonuclease sites useful for cloning vaccine inserts into the vector.

5 **Fig. 4** illustrates the DNA sequence SEQ ID NO: 2 of the novel pGA2 construct shown in **Fig. 3**. The positions of elements in the plasmid are indicated below the nucleotide sequence. **Fig. 5** illustrates a novel pGA3 construct of the present invention. Designations are identities and positions of elements in the vector. Designations in italic print are unique restriction endonuclease sites useful
10 for cloning vaccine inserts into the vector.

Fig. 6 illustrates the DNA sequence SEQ ID NO: 3 of the novel pGA3 construct shown in **Fig. 5**. The positions of elements in the plasmid are indicated below the nucleotide sequence.

Fig. 7 compares the levels of anti-HA IgG raised by the influenza H1
15 hemagglutinin expressed in a pGA vector (pGA3/H1) and in the pJW4303 research vector (pJW4303/H1). BALB/c mice were immunized and boosted with a low dose (0.1 µg) or a high dose (1 µg), of the indicated plasmids using gene gun inoculations. A priming immunization was followed by a booster immunization at 4 weeks.

20 **Fig. 8A** presents a schematic of the parent wt BH10 provirus from which constructs producing non-infectious virus like particles (VLPs) were produced. Dotted regions indicate sequences that were deleted in the VLP constructs. Positions and designations of the various regions of the BH10 provirus are

WO 01/92470

PCT/US01/06795

indicated in the rectangular boxes. The U3RU5 regions which encode the long terminal repeats contain transcriptional control elements. All other indicated regions encode proteins. For clarity, products expressed by *pol* (Prt, RT, Int) and *env* (SU and TM) are indicated.

5 **Fig. 8B** depicts the JS2 vaccine insert. This 6.7 kb vaccine insert expresses the Gag, Prt, and RT sequences of the BH10 strain of HIV-1-IIIb, Tat and Vpu proteins that are from ADA, and Rev and Env proteins that are chimeras of ADA and BH10 sequences. The Gag sequences include mutations of the zinc fingers to limit packaging of viral RNA. The RT sequences encompass three point
10 mutations to eliminate reverse transcriptase activity. Designations are the same as in Fig. 8A. The bracketed area indicates the region of BH10 in which sequences from ADA have been substituted for the BH10 sequences to introduce a CCR-5 using Env. The x's indicate safety mutations.

Fig. 8C depicts the JS5 insert. JS5 is a 6kb vaccine insert that expresses
15 Gag, Prt, RT, Vpu Tat, and Rev. JS5 is comprised of the same sequences as JS2 except that sequences in Env have been deleted. The deleted sequences are indicated in Figure 8B as a filled rectangle. Designations are the same as in Figs. 8A and 8B. The Rev responsive element (RRE) which is in the 3' region of Env is retained in the construct.

20 **Figs. 9A** and **9B** show Gag and Env expression, respectively, for intermediates in the construction of the JS2 vaccine insert. Data are from transient transfections in 293T cells. pGA1/JS1 (ADA VLP) produced higher levels of both Gag (**Fig. 9A**) and Env (**Fig. 9B**) than wild type HIV-1 ADA or

WO 01/92470

PCT/US01/06795

HIV-1 IIIb proviruses, and a VLP-producing DNA (dPol) used in previous studies.

Fig. 10 shows the expression of p24 capsid in transiently transfected cells by vaccine vectors expressing inserts without safety mutations (JS1 and JS4),
5 inserts with point mutations in the zinc fingers and in RT (JS2 and JS5), and point mutations in the zinc fingers, RT, and protease (JS3 and JS6). Note that the safety mutations in the zinc fingers and RT supported active VLP expression whereas the safety mutation in Prt did not. JS2 and JS5 were chosen for continued vector development based on their high levels of expression in the presence of safety
10 mutations.

Figs. 11A and 11B show Gag and Env expression, respectively, of novel candidate vaccine constructs expressed by pGA vectors with and without intron A. pGA1 but not pGA2 contains intron A. pGA2/JS2 and pGA1/JS5 were chosen for use in vaccines based on their favorable levels of expression.

15 Figs. 12A-12D shows Western blots of cell lysates and tissue culture supernatants from 293T cells transfected with (1) mock, (2) pGA2/JS2, and (3) pGA1/JS5, where the primary antibody was pooled from anti-HIV Ig from infected patients (Fig. 12A), anti-p24 (Fig. 12B), anti-gp120 (Fig. 12C), and anti-RT (Fig. 12D) respectively.

20 Fig. 13 illustrates pGA.

Fig. 14 compares Gag expression levels between pGA2/89.6, pGA1/Gag-Pol and pGA2/JS2. Comparative studies for expression were performed on transiently transfected 293T cells.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

Figs. 15A-15C show the temporal frequencies of Gag-specific T cells.

Fig. 15A: Gag-specific CD8 T Cell responses raised by DNA priming and rMVA booster immunization. The schematic presents Gag-CM9-tetramer data generated in the high-dose i.d. DNA-immunized animals. Fig. 15B: Gag-CM9-Mamu-A*01 tetramer- specific T cells in *Mamu-A*01* vaccinated and control macaques at various times before challenge and at two weeks after challenge. The number at the upper right corner of each plot represents the frequency of tetramer-specific CD8 T cells as a % of total CD8 T cells. The numbers above each column of plots designate individual animals. Fig. 15C: Gag-specific IFN- γ ELISPOTs in *A*01* and non- *A*01* (hatched bars) vaccinated and non-vaccinated macaques at various times before challenge and at two weeks after challenge. Three pools of approximately 10-13 Gag peptides (22-mers overlapping by 12) were used for the analyses. The numbers above data bars represent the arithmetic mean $\pm$ the standard deviation for the ELISPOTs within each group. The numbers at the top of the graphs designate individual animals. *, data not available; #, <20 ELISPOTs per 1×10^6 PBMC.

Figs. 16A-16B shows the height and breadth of IFN- γ -producing ELISPOTs against Gag and Env in the DNA/MVA memory response. Fig. 16A: Responses against individual Gag and Env peptide pools. Data for animals within a group are designated by the same symbol. Fig. 16B: Averages of the height and breadth of ELISPOT responses for the different groups. The heights are the mean $\pm$ the standard deviation for the sums of the Gag and Env ELISPOTs for animals in each group. The breadths are the mean $\pm$ the standard deviation for the number

WO 01/92470

PCT/US01/06795

of Gag and Env pools recognized by animals in each group. ELISPOT responses were determined in PBMC, during the memory phase, at 25 weeks after the rMVA booster (four weeks prior to challenge) using 7 pools of Gag peptides (approximately seven 22-mers overlapping by 12) representing about 70 amino acids of Gag sequence, and 21 pools of Env peptides (approximately ten 15-mers overlapping by 11) representing about 40 amino acids of Env sequence.

Fig. 17 shows the DNA sequence SEQ ID NO: 4 of a pGA2 construct comprising the vaccine insert, where the pathogen vaccine insert. JS2 expresses clade B HIV-1 VLP. Both the nucleotide sequence SEQID NO: 4 and encoded proteins are indicated.

Fig. 18 shows the DNA sequence of a pGA1 construct comprising a pathogen vaccine insert, where the pathogen vaccine insert. JS5 expresses clade B HIV-1 Gag-pol insert. Both the sequence and the encoded proteins are shown.

Figs. 19A-19E show temporal viral loads, CD4 counts and survival after challenge of vaccinated and control animals. **Fig. 19A:** Geometric mean viral loads and **Fig. 19B:** geometric mean CD4 counts for vaccine and control groups at various weeks post-challenge. The key for the groups is in panel B. **Fig. 19C:** Survival curve for vaccinated and control animals. The dotted line represents all 24 vaccinated animals. **Fig. 19D:** viral loads and **Fig. 19E:** CD4 counts for individual animals in the vaccine and control groups. The key to animal numbers is presented in **Fig. 19E**. Assays for the first 12 weeks post challenge had a background of 1000 copies of RNA per ml of plasma. Animals with loads below 1000 were scored with a load of 500. For weeks 16 and 20, the background for

WO 01/92470

PCT/US01/06795

detection was 300 copies of RNA/ml. Animals with levels of virus below 300 were scored at 300.

Figs. 20A-20C show Post-challenge T-cell responses in vaccine and control groups. **Fig. 20A:** temporal tetramer+ cells and viral loads. **Fig. 20B:**

5 Intracellular cytokine assays for IFN- γ production in response to stimulation with the Gag-CM9 peptide at two weeks post-challenge. This *ex vivo* assay allows evaluation of the functional status of the peak post-challenge tetramer+ cells displayed in Figure 15A. **Fig. 20C:** Proliferation assay at 12 weeks post-challenge. Gag-Pol-Env (open bars) and Gag-Pol (hatched bars) produced by
10 transient transfections were used for stimulation. Supernatants from mock-transfected cultures served as control antigen. Proteins were used at approximately 1 μ g per ml of p27 Gag for stimulations. Stimulation indices are the growth of cultures in the presence of viral antigens divided by the growth of cultures in the presence of mock antigen.

15 **Figs. 21A-21E** show lymph node histomorphology and viral loads at 12 weeks post-challenge. **Fig. 21A:** Typical lymph node from a vaccinated macaque showing evidence of follicular hyperplasia characterized by the presence of numerous secondary follicles with expanded germinal centers and discrete dark and light zones. **Fig. 21B:** Typical lymph node from an infected control animal
20 showing follicular depletion and paracortical lymphocellular atrophy. **Fig. 21C:** A representative lymph node from an age-matched, uninfected macaque displaying non-reactive germinal centers. **Fig. 21D:** The percent of the total lymph node area occupied by germinal centers was measured to give a non-

WO 01/92470

PCT/US01/06795

specific indicator of follicular hyperplasia. Data for uninfected controls are for four age-matched rhesus macaques. **Fig. 21E:** Lymph node virus burden was determined by in situ hybridization using an antisense riboprobe cocktail that was complementary to SHIV-89.6 *gag* and *pol*. All of the examined nodes were

5 inguinal lymph nodes.

Figs. 22A-22D show temporal antibody responses following challenge. Micrograms of total Gag (**Fig. 22A**) or Env (**Fig. 22B**) antibody were determined using enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs). The titers of neutralizing antibody for 89.6 (**Fig. 22C**) and 89.6P (**Fig. 22D**) were determined using MT-2

10 cell killing and neutral red staining. Titers are the reciprocal of the serum dilution giving 50% neutralization of the indicated viruses grown in human PBMC. Symbols for animals are the same as in Figure 19.

Figs. 23A-23E show correlations and dose response curves for the vaccine trial (**Figs. 23A and B**). Inverse correlations between peak vaccine raised IFN- γ

15 ELISPOTs and viral loads at 2 (**Fig. 23A**) and 3 (**Fig. 23B**) weeks post-challenge. Only twenty-three of the 24 vaccinated animals are included in the correlations because of the loss of the peak DNA/MVA ELISPOT sample for animal 3 (see Fig 15C). (**Fig. 23C**) Dose response curves for the average height of Gag ELISPOTS at the peak DNA-MVA response (data from Fig. 15C). (**Fig. 23D**)

20 Dose response curve for the breadth of the DNA/MVA memory ELISPOT response (data from Fig. 16B). (**Fig. 23E**) Dose response curves for the peak anti-Gag antibody response post the MVA booster (data from Fig. 22A). The different doses of DNA raised different levels of ELISPOT and antibody

WO 01/92470

PCT/US01/06795

responses ($P<0.05$). The route of DNA inoculation had a significant effect on the antibody ($P=0.02$), but not the ELISPOT response.

Fig. 24 shows anti-HA IgG raised by gene gun inoculation of DNAs expressing HA proteins.

5 Fig. 25. Shows avidity of the anti HA IgG raised by the three different HA DNA vaccines.

Fig. 26 shows protection from weight loss after virus challenge.

Fig. 27 illustrates the importance of including Env in the vaccine.

10 Figs. 28A-28D illustrates the importance of including Env in vaccines administered to animals challenged interectally with SHIV-89.6P.

Fig. 29 is a schematic representation of vector DNA vaccine constructs.

Fig. 30 shows Western blot results showing expression of vaccine constructs in vitro.

Fig. 31 is a temporal curve of measles virus neutralizing antibody.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

This invention relates to novel vectors, novel vectors comprising pathogen vaccine inserts, and novel methods of immunizing patients against a pathogen.

- 5 The novel immunization methods elicit both cell-mediated and humoral immune responses that may limit the infection, spread or growth of the pathogen and result in protection against subsequent challenge by the pathogen.

Classic references for DNA vaccines include the first demonstration of the raising of an immune response (Tang, De Vit, and Johnston, 1992); the first
10 demonstration of cytotoxic T-cell (Tc)-mediated immunity (Ulmer et al., 1993); the first demonstration of the protective efficacy of intradermal (i.d.), intramuscular (i.m.), intravenous (i.v.), intranasal (i.n.), and gene gun (g.g.) immunizations (Fynan et al., 1993; Robinson, Hunt, and Webster, 1993); the first use of genetic adjuvants (Xiang and Ertl, 1995); the first use of library
15 immunizations (Barry, Lai, and Johnston, 1995); and the first demonstration of the ability to modulate the T-helper type of an immune response by the method of DNA delivery (Feltquate et al., 1997). A highly useful web site compiling DNA vaccine information can be found at <http://www.genweb.com/Dnavax/dnavax.html>.

For convenience, certain terms employed in the specification, examples,
20 and appended claims are collected here.

Definitions

The term "nucleic acid" as used herein refers to any natural and synthetic linear and sequential arrays of nucleotides and nucleosides, for example cDNA,

WO 01/92470

PCT/US01/06795

genomic DNA, mRNA, tRNA, oligonucleotides, oligonucleosides and derivatives thereof. For ease of discussion, such nucleic acids may be collectively referred to herein as "constructs," "plasmids," or "vectors." Representative examples of the nucleic acids of the present invention include bacterial plasmid vectors including

5 expression, cloning, cosmid and transformation vectors such as, but not limited to, pBR322, animal viral vectors such as, but not limited to, modified adenovirus, influenza virus, polio virus, pox virus, retrovirus, and the like, vectors derived from bacteriophage nucleic acid, and synthetic oligonucleotides like chemically synthesized DNA or RNA. The term "nucleic acid" further includes modified or

10 derivatised nucleotides and nucleosides such as, but not limited to, halogenated nucleotides such as, but not only, 5-bromouracil, and derivatised nucleotides such as biotin-labeled nucleotides.

The term "isolated nucleic acid" as used herein refers to a nucleic acid with a structure (a) not identical to that of any naturally occurring nucleic acid or

15 (b) not identical to that of any fragment of a naturally occurring genomic nucleic acid spanning more than three separate genes, and includes DNA, RNA, or derivatives or variants thereof. The term includes, but is not limited to, the following: (a) a DNA which has the sequence of part of a naturally occurring genomic molecule but is not flanked by at least one of the coding sequences that

20 flank that part of the molecule in the genome of the species in which it naturally occurs; (b) a nucleic acid incorporated into a vector or into the genomic nucleic acid of a prokaryote or eukaryote in a manner such that the resulting molecule is not identical to any vector or naturally occurring genomic DNA; (c) a separate

WO 01/92470

PCT/US01/06795

molecule such as a cDNA, a genomic fragment, a fragment produced by polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction (LCR) or chemical synthesis, or a restriction fragment; (d) a recombinant nucleotide sequence that is part of a hybrid gene, i.e., a gene encoding a fusion protein, and (e) a recombinant
5 nucleotide sequence that is part of a hybrid sequence that is not naturally occurring.

It is advantageous for some purposes that a nucleotide sequence is in purified form. The term "purified" in reference to nucleic acid represents that the sequence has increased purity relative to the natural environment.

10 As used herein the terms "polypeptide" and "protein" refer to a polymer of amino acids of three or more amino acids in a serial array, linked through peptide bonds. The term "polypeptide" includes proteins, protein fragments, protein analogues, oligopeptides and the like. The term "polypeptides" contemplates polypeptides as defined above that are encoded by nucleic acids, produced
15 through recombinant technology, isolated from an appropriate source, or are synthesized. The term "polypeptides" further contemplates polypeptides as defined above that include chemically modified amino acids or amino acids covalently or noncovalently linked to labeling ligands.

The term "fragment" as used herein to refer to a nucleic acid (e.g., cDNA)
20 refers to an isolated portion of the subject nucleic acid constructed artificially (e.g., by chemical synthesis) or by cleaving a natural product into multiple pieces, using restriction endonucleases or mechanical shearing, or a portion of a nucleic acid synthesized by PCR, DNA polymerase or any other polymerizing technique

WO 01/92470

PCT/US01/06795

well known in the art, or expressed in a host cell by recombinant nucleic acid technology well known to one of skill in the art. The term "fragment" as used herein may also refer to an isolated portion of a polypeptide, wherein the portion of the polypeptide is cleaved from a naturally occurring polypeptide by
5 proteolytic cleavage by at least one protease, or is a portion of the naturally occurring polypeptide synthesized by chemical methods well known to one of skill in the art.

The term "gene" or "genes" as used herein refers to nucleic acid sequences (including both RNA or DNA) that encode genetic information for the synthesis
10 of a whole RNA, a whole protein, or any portion of such whole RNA or whole protein. Genes that are not naturally part of a particular organism's genome are referred to as "foreign genes", "heterologous genes" or "exogenous genes" and genes that are naturally a part of a particular organism's genome are referred to as "endogenous genes".

15 The term "expressed" or "expression" as used herein refers to the transcription from a gene to give an RNA nucleic acid molecule at least complementary in part to a region of one of the two nucleic acid strands of the gene. The term "expressed" or "expression" as used herein also refers to the translation from said RNA nucleic acid molecule to give a protein or polypeptide
20 or a portion thereof.

As used herein, the term "locus" or "loci" refers to the site of a gene on a chromosome. Pairs of genes control hereditary traits, each in the same position on a pair of chromosomes. These gene pairs, or alleles, may both be dominant or

WO 01/92470

PCT/US01/06795

both be recessive in expression of that trait. In either case, the individual is said to be homozygous for the trait controlled by that gene pair. If the gene pair (alleles) consists of one dominant and one recessive trait, the individual is heterozygous for the trait controlled by the gene pair. Natural variation in genes
5 or nucleic acid molecules caused by, for example, recombination events or resulting from mutation, gives rise to allelic variants with similar, but not identical, nucleotide sequences. Such allelic variants typically encode proteins with similar activity to that of the protein encoded by the gene to which they are compared, because natural selection typically selects against variations that alter
10 function. Allelic variants can also comprise alterations in the untranslated regions of the gene as, for example, in the 3' or 5' untranslated regions or can involve alternate splicing of a nascent transcript, resulting in alternative exons being positioned adjacently.

The term "transcription regulatory sequences" as used herein refers to
15 nucleotide sequences that are associated with a gene nucleic acid sequence and which regulate the transcriptional expression of the gene. The "transcription regulatory sequences" may be isolated and incorporated into a vector nucleic acid to enable regulated transcription in appropriate cells of portions of the vector DNA. The "transcription regulatory sequence" may precede, but are not limited
20 to, the region of a nucleic acid sequence that is in the region 5' of the end of a protein coding sequence that may be transcribed into mRNA. Transcriptional regulatory sequences may also be located within a protein coding region, in regions of a gene that are identified as "intron" regions, or may be in regions of

WO 01/92470

PCT/US01/06795

nucleic acid sequence that are in the region of nucleic acid.

The term "coding region" as used herein refers to a continuous linear arrangement of nucleotides that may be translated into a protein. A full length coding region is translated into a full length protein; that is, a complete protein as
5 would be translated in its natural state absent any post-translational modifications. A full length coding region may also include any leader protein sequence or any other region of the protein that may be excised naturally from the translated protein.

The term "probe" as used herein, when referring to a nucleic acid, refers to
10 a nucleotide sequence that can be used to hybridize with and thereby identify the presence of a complementary sequence, or a complementary sequence differing from the probe sequence but not to a degree that prevents hybridization under the hybridization stringency conditions used. The probe may be modified with labels such as, but not only, radioactive groups, biotin, or any other label that is well
15 known in the art.

The term "nucleic acid vector" as used herein refers to a natural or synthetic single or double stranded plasmid or viral nucleic acid molecule that can be transfected or transformed into cells and replicate independently of, or within, the host cell genome. A circular double stranded plasmid can be linearized by
20 treatment with an appropriate restriction enzyme based on the nucleotide sequence of the plasmid vector. A nucleic acid can be inserted into a vector by cutting the vector with restriction enzymes and ligating the pieces together. The nucleic acid molecule can be RNA or DNA.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

The term "expression vector" as used herein refers to a nucleic acid vector that may further include at least one regulatory sequence operably linked to a nucleotide sequence coding for the Mago protein. Regulatory sequences are well recognized in the art and may be selected to ensure good expression of the linked

5 nucleotide sequence without undue experimentation by those skilled in the art. As used herein, the term "regulatory sequences" includes promoters, enhancers, and other elements that may control expression. Standard molecular biology textbooks such as *Sambrook et al.* eds "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd ed. Cold Spring Harbor Press (1989) may be consulted to design

10 suitable expression vectors, promoters, and other expression control elements. It should be recognized, however, that the choice of a suitable expression vector depends upon multiple factors including the choice of the host cell to be transformed and/or the type of protein to be expressed.

The terms "transformation" and "transfection" as used herein refer to the

15 process of inserting a nucleic acid into a host. Many techniques are well known to those skilled in the art to facilitate transformation or transfection of a nucleic acid into a prokaryotic or eukaryotic organism. These methods involve a variety of techniques, such as treating the cells with high concentrations of salt such as, but not only a calcium or magnesium salt, an electric field, detergent, or liposome

20 mediated transfection, to render the host cell competent for the uptake of the nucleic acid molecules.

The term "recombinant cell" refers to a cell that has a new combination of nucleic acid segments that are not covalently linked to each other in nature. A

WO 01/92470

PCT/US01/06795

new combination of nucleic acid segments can be introduced into an organism using a wide array of nucleic acid manipulation techniques available to those skilled in the art. A recombinant cell can be a single eukaryotic cell, or a single prokaryotic cell, or a mammalian cell. The recombinant cell can harbor a vector
5 that is extragenomic. An extragenomic nucleic acid vector does not insert into the cell's genome. A recombinant cell can further harbor a vector or a portion thereof that is intragenomic. The term intragenomic defines a nucleic acid construct incorporated within the recombinant cell's genome.

The term "recombinant nucleic acid" as used herein refers to combinations
10 of at least two nucleic acid sequences that are not naturally found in a eukaryotic or prokaryotic cell. The nucleic acid sequences may include, but are not limited to nucleic acid vectors, gene expression regulatory elements, origins of replication, sequences that when expressed confer antibiotic resistance, and protein-encoding sequences. The term "recombinant polypeptide" is meant to
15 include a polypeptide produced by recombinant DNA techniques such that it is distinct from a naturally occurring polypeptide either in its location, purity or structure. Generally, such a recombinant polypeptide will be present in a cell in an amount different from that normally observed in nature.

The term "patients," as used herein, refers to animals, preferably
20 mammals, and more preferably humans.

The term "immunizing" or "immunization," as used herein, refers to the production of an immune response in a patient that protects (partially or totally) from the manifestations of infection (i.e., disease) caused by a pathogen. A

WO 01/92470

PCT/US01/06795

patient immunized by the present invention will not be infected by the pathogen or will be infected to a lesser extent than would occur without immunization. Immunizations may be either prophylactic or therapeutic in nature. That is, both previously uninfected and infected patients may be immunized with the present invention.

The term "DNA transcription unit" as used herein" refers to a polynucleotide sequence that includes at least two components: antigen-encoding DNA and transcriptional promoter elements. A DNA transcription unit may optionally include additional sequences, such as enhancer elements, splicing signals, termination and polyadenylation signals, viral replicons, and/or bacterial plasmid sequences. The DNA transcription unit can be produced by a number of known methods. For example, DNA encoding the desired antigen can be inserted into an expression vector to construct the DNA transcription unit, as described in Maniatis et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), the disclosure of which is incorporated by reference in its entirety.

The term "vaccine insert" as used herein refers to the DNA transcription unit of a pathogen. Preferably, the vaccine insert is a DNA transcription unit that can generate an immune responses in a patient. For example, the vaccine insert is a pathogen vaccine insert encoding antigens derived from any virus, bacteria, parasite and/or fungi. Exemplary viruses include herpesvirus, orthomyxoviruses, rhinoviruses, picornaviruses, adenoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, rhabdoviruses, togaviruses, flaviviruses, bunyaviruses, rubella virus, reovirus,

WO 01/92470

PCT/US01/06795

measles, hepadna viruses, Ebola, retroviruses (including human immunodeficiency virus), and the like. Exemplary bacteria include tuberculosis, mycobacteria, spirochetes, rickettsias, chlamydia, mycoplasma and the like. Exemplary parasites include malaria and the like. Exemplary fungi include
5 yeasts, molds, and the like. One skilled in the art will appreciate that this list does not include all potential pathogens against which a protective immune response can be generated by the methods described herein.

The term "antigen" as used herein refers to any protein, carbohydrate, or other moiety expressed by a pathogen that is capable of eliciting a protective
10 response against a pathogen. The antigen may or may not be a structural component of the pathogen. Also contemplated to be within the term "antigen" are encoded antigens that can be translation products or polypeptides of various lengths. Antigens undergo normal host cell modifications such as glycosylation, myristoylation or phosphorylation. In addition, they can be designed to undergo
15 intracellular, extracellular or cell-surface expression. Furthermore, they can be designed to undergo assembly and release from cells.

As used herein, the term "adjuvant" means a substance added to a vaccine to increase a vaccine's immunogenicity. The mechanism of how an adjuvant operates is not entirely known. Some adjuvants are believed to enhance the
20 immune response by slowly releasing the antigen, while other adjuvants are strongly immunogenic in their own right and are believed to function synergistically. Known vaccine adjuvants include, but are not limited to, oil and water emulsions (for example, complete Freund's adjuvant and incomplete

WO 01/92470

PCT/US01/06795

Freund's adjuvant), *Corynebacterium parvum*, Bacillus Calmette Guerin, aluminum hydroxide, glucan, dextran sulfate, iron oxide, sodium alginate, Bacto-Adjuvant, certain synthetic polymers such as poly amino acids and co-polymers of amino acids, saponin, "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.),
5 "AVRIDINE" (N, N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl)-propanediamine), paraffin oil, and muramyl dipeptide. Adjuvants also encompass genetic adjuvants such as immunomodulatory molecules encoded in a co-inoculated DNA. The co-inoculated DNA can be in the same vaccine construct as the vaccine immunogen or in a separate DNA vector.

10 As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" means a vehicle for containing the vaccine that can be injected into a bovine host without adverse effects. Suitable pharmaceutically acceptable carriers known in the art include, but are not limited to, sterile water, saline, glucose, dextrose, or buffered solutions. Carriers may include auxiliary agents including, but not limited to,
15 diluents, stabilizers (i.e., sugars and amino acids), preservatives, wetting agents, emulsifying agents, pH buffering agents, viscosity enhancing additives, colors and the like.

The terms "selectable marker gene" as used herein refer to an expressed gene that allows for the selection of a population of cells containing the selectable
20 marker gene from a population of cells not having the expressed selectable marker gene. For example, the "selectable marker gene" may be an "antibiotic resistance gene" that can confer tolerance to a specific antibiotic by a microorganism that was previously adversely affected by the drug. Such resistance may result from a

WO 01/92470

PCT/US01/06795

mutation or the acquisition of resistance due to plasmids containing the resistance gene transforming the microorganism.

The term "terminator sequence" or "terminator" as used herein refers to nucleotide sequences that function to stop transcription. The terms
5 "transcription" or "transcribe" as used herein refers to the process by which RNA molecules are formed upon DNA templates by complementary base pairing. This process is mediated by RNA polymerase.

The term "VLP" as used herein refers to virus-like particles and, as used, also refers to aggregates of viral proteins.

10 The major immunological advantage of DNA-based immunizations is the ability of the immunogen to be presented by both MHC class I and class II molecules. Endogenously synthesized proteins readily enter processing pathways for the loading of peptide epitopes onto MHC I as well as MHC II molecules. MHC I-presented epitopes raise cytotoxic T-cells (Tc) responses whereas MHC
15 II-presented epitopes raise helper T-cells (Th). By contrast, immunogens that are not synthesized in cells are largely restricted to the loading of MHC II epitopes and the raising of Th but not Tc. When compared with live attenuated vaccines or recombinant viral vectors that produce immunogens in cells and raise both Th and Tc, DNA vaccines have the advantages of not being infectious and of focusing the
20 immune response on only those antigens desired for immunization. DNA vaccines also are advantageous because they can be manipulated relatively easily to raise type 1 or type 2 T-cell help. This allows a vaccine to be tailored for the type of immune response that will be mobilized to combat an infection. DNA

WO 01/92470

PCT/US01/06795

vaccines are also cost effective because of the ease with which plasmids can be constructed using recombinant DNA technology, the ability to use a generic method for vaccine production (growth and purification of plasmid DNA), and the stability of DNA over a wide range of temperatures.

5 The best immune responses are achieved using highly active expression vectors modeled on those developed for the production of recombinant proteins (Robinson and Pertmer, 1998). The most frequently used transcriptional control elements include a strong promoter. One such promoter suitable for use is the cytomegalovirus (CMV) intermediate early promoter, although other promoters
10 may be used in a DNA vaccine without departing from the scope the present invention. Other transcriptional control elements useful in the present invention include a strong polyadenylation signal such as, for example, that derived from a bovine growth hormone encoding gene, or a rabbit β globin polyadenylation signal (Bohm et al., 1996; Chapman et al., 1991; Hartikka et al., 1996; Manthorpe
15 et al., 1993; Montgomery et al., 1993). The CMV immediate early promoter may be used with or without intron A (Chapman et al., 1991). The presence of intron A increases the expression of many antigens from RNA viruses, bacteria, and parasites, presumably by providing the expressed RNA with sequences which support processing and function as an eukaryotic mRNA. It will be appreciated
20 that expression also may be enhanced by other methods known in the art including, but not limited to, optimizing the codon usage of prokaryotic mRNAs for eukaryotic cells (Andre et al., 1998; Uchijima et al., 1998). Multi-cistronic vectors may be used to express more than one immunogen or an immunogen and

WO 01/92470

PCT/US01/06795

a immunostimulatory protein (Iwasaki et al., 1997a; Wild et al., 1998).

Immunogens can also be engineered to be more or less effective for raising antibody or Tc by targeting the expressed antigen to specific cellular compartments. For example, antibody responses are raised more effectively by
5 antigens that are displayed on the plasma membrane of cells, or secreted therefrom, than by antigens that are localized to the interior of cells (Boyle, Koniaras, and Lew, 1997; Inchauspe et al., 1997). Tc responses may be enhanced by using N-terminal ubiquitination signals which target the DNA-encoded protein to the proteasome causing rapid cytoplasmic degradation and more efficient
10 peptide loading into the MHC I pathway (Rodriguez, Zhang, and Whitton, 1997; Tobery and Siliciano, 1997; Wu and Kipps, 1997). For a review on the mechanistic basis for DNA-raised immune responses, refer to Robinson and Pertmer, *Advances in Virus Research*, vol. 53, Academic Press (2000), the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety.

15 The effects of different conformational forms of proteins on antibody responses, the ability of strings of MHC I epitopes (minigenes) to raise Tc responses, and the effect of fusing an antigen with immune-targeting proteins have been evaluated using defined inserts. Ordered structures such as virus-like particles appear to be more effective than unordered structures at raising antibody
20 (Fomsgaard et al., 1998). This is likely to reflect the regular array of an immunogen being more effective than a monomer of an antigen at cross-linking Ig-receptors and signaling a B-cell to multiply and produce antibody. Recombinant DNA molecules encoding a string of MHC epitopes from different

WO 01/92470

PCT/US01/06795

pathogens can elicit Tc responses to a number of pathogens (Hanke et al., 1998b). These strings of Tc epitopes are most effective if they also include a Th epitope (Maecker et al., 1998; Thomson et al., 1998).

Another approach to manipulating immune responses is to fuse
5 immunogens to immunotargeting or immunostimulatory molecules. To date, the most successful of these fusions have targeted secreted immunogens to antigen presenting cells (APC) or lymph nodes (Boyle, Brady, and Lew, 1998). Fusion of a secreted form of human IgG with CTLA-4 increased antibody responses to the IgG greater than 1000-fold and changed the bias of the response from
10 complement (C'-)dependent to C'-independent antibodies.

Fusions of human IgG with L-selectin also increased antibody responses but did not change the C'-binding characteristics of the raised antibody. The immunogen fused with L-selectin was presumably delivered to lymph nodes by binding to the high endothelial venules, which serve as portals. Fusions between
15 antigens and cytokine cDNAs have resulted in more moderate increases in antibody, Th, and Tc responses (Hakim, Levy, and Levy, 1996; Maecker et al., 1997). IL-4-fusions have increased antibody responses, whereas IL-12 and IL-1 β have enhanced T-cell responses.

Two approaches to DNA delivery are injection of DNA in saline using a
20 hypodermic needle or gene gun delivery of DNA-coated gold beads. Saline injections deliver DNA into extracellular spaces, whereas gene gun deliveries bombard DNA directly into cells. The saline injections require much larger amounts of DNA (100-1000 times more) than the gene gun (Fynan et al., 1993).

WO 01/92470

PCT/US01/06795

These two types of delivery also differ in that saline injections bias responses towards type 1 T-cell help, whereas gene gun deliveries bias responses towards type 2 T-cell help (Feltquate et al., 1997; Pertner, Roberts, and Haynes, 1996). DNAs injected in saline rapidly spread throughout the body. DNAs delivered by
5 the gun are more localized at the target site. Following either method of inoculation, extracellular plasmid DNA has a short half life on the order of 10 minutes (Kawabata, Takakura, and Hashida, 1995; Lew et al., 1995). Vaccination by saline injections can be intramuscular (i.m.) or intradermal (i.d.) (Fynan et al., 1993).

10 Although intravenous and subcutaneous injections have met with different degrees of success for different plasmids (Bohm et al., 1998; Fynan et al., 1993), intraperitoneal injections have not met with success (Bohm et al., 1998; Fynan et al., 1993). Gene gun deliveries can be administered to the skin or to surgically exposed muscle. Methods and routes of DNA delivery that are effective at raising
15 immune responses in mice are effective in other species.

Immunization by mucosal delivery of DNA has been less successful than immunizations using parenteral routes of inoculation. Intranasal administration of DNA in saline has met with both good (Asakura et al., 1997; Sasaki et al., 1998b) and limited (Fynan et al., 1993) success. The gene gun has successfully raised
20 IgG following the delivery of DNA to the vaginal mucosa (Livingston et al., 1995). Some success at delivering DNA to mucosal surfaces has also been achieved using liposomes (McCluskie et al., 1998), microspheres (Chen et al., 1998a; Jones et al., 1997) and recombinant Shigella vectors (Sizemore,

Branstrom, and Sadoff, 1995; Sizemore, Branstrom, and Sadoff, 1997).

The dose of DNA needed to raise a response depends upon the method of delivery, the host, the vector, and the encoded antigen. The most profound effect is seen for the method of delivery. From 10 µg to 1 mg of DNA is generally used for saline injections of DNA, whereas from 0.2 µg to 20 µg of DNA is used for gene gun deliveries of DNA. In general, lower doses of DNA are used in mice (10-100 µg for saline injections and 0.2 µg to 2 µg for gene gun deliveries), and higher doses in primates (100 µg to 1 mg for saline injections and 2 µg to 20 µg for gene gun deliveries). The much lower amount of DNA required for gene gun deliveries reflect the gold beads directly delivering DNA into cells.

An example of the marked effect of an antigen on the raised response can be found in studies comparing the ability to raise antibody responses in rabbits of DNAs expressing the influenza hemagglutinin or an immunodeficiency virus envelope glycoprotein (Env) (Richmond et al., 1998). Under similar immunization conditions, the hemagglutinin-expressing DNA raised long lasting, high avidity, high titer antibody (~100 µg per ml of specific antibody), whereas the Env-expressing DNA raised only transient, low avidity, and low titer antibody responses (<10 µg per ml of specific antibody). These differences in raised antibody were hypothesized to reflect the hemagglutinin being a T-dependent antigen and the highly glycosylated immunodeficiency virus Env behaving as a T-independent antigen.

Both protein and recombinant viruses have been used to boost

WO 01/92470

PCT/US01/06795

DNA-primed immune responses. Protein boosts have been used to increase neutralizing antibody responses to the HIV-1 Env. Recombinant pox virus boosts have been used to increase both humoral and cellular immune responses.

For weak immunogens, such as the immunodeficiency virus Env, for
5 which DNA-raised antibody responses are only a fraction of those in naturally infected animals, protein boosts have provided a means of increasing low titer antibody responses (Letvin et al., 1997; Richmond et al., 1998). In a study in rabbits, the protein boost increased both the titers of antibody and the avidity and the persistence of the antibody response (Richmond et al., 1998). Consistent with
10 a secondary immune response to the protein boost, DNA primed animals showed both more rapid increases in antibody, and higher titers of antibody following a protein boost than animals receiving only the protein. However, by a second protein immunization, the kinetics and the titer of the antibody response were similar in animals that had, and had not, received DNA priming immunizations.

15 Recombinant pox virus boosts have proved to be a highly successful method of boosting DNA-primed CD8+ cell responses (Hanke et al., 1998a; Kent et al., 1998; Schneider et al., 1998). Following pox virus boosters, antigen-specific CD8+ cells have been increased by as much as 10-fold in DNA primed mice or macaques. Studies testing the order of immunizations reveal that
20 the DNA must be delivered first (Schneider et al., 1998). This has been hypothesized to reflect the DNA focusing the immune response on the desired immunogens. The larger increases in CD8+ cell responses following pox virus boosts has been hypothesized to reflect both the larger amount of antigen

WO 01/92470

PCT/US01/06795

expressed by the pox virus vector, as well as pox virus-induced cytokines augmenting immune responses (Kent et al., 1998; Schneider et al., 1998).

A number of different pox viruses can be used for the pox boost. A vaccinia virus termed modified vaccinia Ankara (MVA) has been particularly
5 effective in mouse models (Schneider et al., 1998). This may reflect MVA, which is replication defective in mammalian models, being attenuated for the ability to evade host immune responses.

Responses raised by a DNA prime followed by pox virus boost can be highly effective at raising protective cell-mediated immune responses. In mice,
10 intramuscular injections of DNA followed by recombinant pox boosts have protected against a malaria challenge (Schneider et al., 1998). In macaques, intradermal, but not gene gun DNA primes, followed by recombinant pox virus boosters have contained challenges with chimeras of simian and human immunodeficiency viruses (Robinson et al., 1999).

15 DNA vaccines for immunodeficiency viruses such as HIV-1 encounter the challenge of sufficiently limiting an incoming infection such that the inexorable long-term infections that lead to AIDS are prevented. Complicating this is that neutralizing antibodies is both difficult to raise and specific against particular viral strains (Burton and Montefiori, 1997; Moore and Ho, 1995). Given the
20 problems with raising neutralizing antibody, much effort has focused on raising cell-mediated responses of sufficient strength to severely curtail infections. To date, the best success at raising high titers of Tc have come from immunization protocols using DNA primes followed by recombinant pox virus boosters. The

WO 01/92470

PCT/US01/06795

efficacy of this protocol has been evaluated by determining the level of specific Tc using assays for cytolytic activity (Kent et al., 1998), by staining with MHC-specific tetramers for specific SIV Gag epitopes and by challenge with SIVs or SHIVs (Hanke, 1999).

5 A number of salient findings are emerging from preclinical trials using DNA primes and recombinant pox virus boosts. The first is that challenge infections can be contained below the level that can be detected using quantitative RT-PCR analyses for plasma viral RNA (Robinson et al., 1999). The second is that this protection is long lasting and does not require the presence of
10 neutralizing antibody (Robinson et al., 1999). The third is that intradermal DNA priming with saline injections of DNA is superior to gene gun priming for raising protective immunity ($P=0.01$, Fisher's exact test) (Robinson et al., 1999).

The novel pGA vectors of the present invention have a prokaryotic origin of replication, a selective marker gene for plasmid selection, and a transcription
15 cassette for eukaryotic cells. Unique to the pGA vectors of the present invention is the inclusion of the lambda terminator in the same transcriptional orientation, and following, the selective marker gene. This terminator sequence prevents read-through from the kanamycin cassette into vaccine sequences while the plasmid is being produced in bacteria. Prevention of transcriptional read-through
20 stabilizes vaccine insert sequences by limiting the exposure of secondary structures that can be recognized by bacterial endonucleases.

A transcription cassette as incorporated in the pGA vectors of the present invention uses sequences from the cytomegalovirus immediate early promoter

WO 01/92470

PCT/US01/06795

(CMVIE) and from the bovine growth hormone polyadenylation sequences (BGHPA) to control transcription. A leader sequence that is a synthetic homolog of the tissue plasminogen activator gene leader sequence (tPA) is optional in the transcription cassette. The vectors of the present invention differ in the sites that
5 can be used for accepting vaccine inserts and in whether the transcription cassette includes intron A sequences in the CMVIE promoter. Both intron A and the tPA leader sequence have been shown in certain instances to supply a strong expression advantage to vaccine inserts (Chapman et al., 1991).

pGA1 is a 3894 bp plasmid. pGA1 comprises a promoter (bp 1-690), the
10 CMV-intron A (bp 691-1638), a synthetic mimic of the tPA leader sequence (bp 1659 – 1721), the bovine growth hormone polyadenylation sequence (bp1761-1983), the lambda T0 terminator (bp 1984-2018), the kanamycin resistance gene (bp 2037-2830) and the ColEI replicator (bp 2831-3890). The DNA sequence of the pGA1 construct (SEQ ID NO: 1) is shown in Fig. 2. In Fig. 1, the indicated
15 restriction sites are single cutters useful for the cloning of vaccine inserts. The ClaI or BspD1 sites are used when the 5' end of a vaccine insert is cloned upstream of the tPA leader. The NheI site is used for cloning a sequence in frame with the tPA leader sequence. The sites listed between SmaI and BlnI are used for cloning the 3' terminus of a vaccine insert.

20 pGA2 is a 2947 bp plasmid lacking the 947 bp of intron A sequences found in pGA1. pGA2 is the same as pGA1, except for the deletion of intron A sequences. pGA2 is valuable for cloning sequences which do not require an upstream intron for efficient expression, or for cloning sequences in which an

WO 01/92470

PCT/US01/06795

upstream intron might interfere with the pattern of splicing needed for good expression. Fig. 3 presents a map of pGA2 with useful restriction sites for cloning vaccine inserts, and Fig. 4 shows the DNA sequence SEQ ID NO: 2. The use of restriction sites for cloning vaccine inserts into pGA2 is the same as that
5 used for cloning fragments into pGA1.

pGA3 is a 3893 bp plasmid that contains intron A. pGA3 is the same as pGA1 except for the cloning sites that can be used for the introduction of vaccine inserts. In pGA3, inserts cloned upstream of the tPA leader sequence use a Hind III site. Sequences cloned downstream from the tPA leader sequence use sites
10 between the SmaI and the BlnI site. In pGA3, these sites include a BamHI site. Fig. 5 shows the map for pGA3, and Fig. 6 shows the DNA sequence SEQ ID NO: 3.

In view of the teachings herein, one skilled in the art will recognize that any vaccine insert known in the art can be used in the novel pGA constructs
15 described herein, including but not limited to viral pathogens like HIV, influenza, measles, herpes, Ebola, and the like.

For example, the present invention contemplates inserts from immunodeficiency virus, more preferably HIV, including all clades of HIV-1 and HIV-2 and modifications thereof; influenza virus genes including all subtypes and
20 modifications thereof; and vaccine inserts derived from measles genes. One skilled in the art will appreciate that the discussion about inserts derived from immunodeficiency virus; influenza virus; measles virus; and modifications thereof are exemplary in nature and provided for the sake of illustration only.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

The immunodeficiency virus vaccine inserts of the present invention were designed to express non-infectious virus like particles (VLPs) from a single DNA. This was achieved using the subgenomic splicing elements normally used by immunodeficiency viruses to express multiple gene products from a single viral RNA. Important to the subgenomic splicing patterns are (i) splice sites and acceptors present in full length viral RNA, (ii) the Rev responsive element (RRE) and (iii) the Rev protein. The splice sites in retroviral RNAs use the canonical sequences for splice sites in eukaryotic RNAs. The RRE is an ~200bp RNA structure that interacts with the Rev protein to allow transport of viral RNAs from the nucleus to the cytoplasm. In the absence of Rev, the ~10 kb RNA of immunodeficiency virus undergoes splicing to the mRNAs for the regulatory genes Tat, Rev, and Nef. These genes are encoded by exons present between RT and Env and at the 3' end of the genome. In the presence of Rev, the singly spliced mRNA for Env and the unspliced mRNA for Gag and Pol are expressed in addition to the multiply spliced mRNAs for Tat, Rev, and Nef.

The expression of non-infectious VLPs from a single DNA affords a number of advantageous features to an immunodeficiency virus vaccine. The expression of a number of proteins from a single DNA affords the vaccinated host the opportunity to respond to the breadth of T- and B-cell epitopes encompassed in these proteins. The expression of proteins containing multiple epitopes affords the opportunity for the presentation of epitopes by diverse histocompatibility types. By using whole proteins, one offers hosts of different histocompatibility types the opportunity to raise broad-based T-cell responses. Such may be

WO 01/92470

PCT/US01/06795

essential for the effective containment of immunodeficiency virus infections, whose high mutation rate supports ready escape from immune responses (Evans et al., 1999) (Poignard et al., 1999, Evans, *et al.*, 1995). Just as in drug therapy, multi-epitope T-cell responses that require multiple mutations for escape will
5 provide better protection than single epitope T-cell responses that require only a single mutation for escape.

Antibody responses are often best primed by multi-valent vaccines that present an ordered array of an epitope to responding B-cells (Bachmann, Zinkernagel, 1997). Virus-like particles, by virtue of the multivalency of Env in
10 the virion membrane, will facilitate the raising of anti-Env antibody responses. These particles will also present non-denatured and normal forms of Env to the immune system.

The novel vectors of the present invention can be administered to a patient in the presence of adjuvants or other substances that have the capability of
15 promoting DNA uptake or recruiting immune system cells to the site of the inoculation. Embodiments include combining the DNA vaccine with conventional adjuvants or genetic adjuvants. Conventional adjuvants, including reagents that favor the stability and uptake of the DNA, recruit immune system cells to the site of inoculation, or facilitate the immune activation of responding
20 lymphoid cells, include but are not limited to oil and water emulsions (for example, complete Freund's adjuvant and incomplete Freund's adjuvant), *Corynebacterium parvum*, Bacillus Calmette Guerin, aluminum hydroxide, glucan, dextran sulfate, iron oxide, sodium alginate, Bacto-Adjuvant, certain

WO 01/92470

PCT/US01/06795

synthetic polymers such as poly amino acids and co-polymers of amino acids, saponin, "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), "AVRIDINE" (N, N-di-octadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl)-propanediamine), paraffin oil, and muramyl dipeptide. The present invention also contemplates the use of genetic
5 adjuvants such as immunomodulatory molecules encoded in a co-inoculated DNA. The co-inoculated DNA can be in the same vaccine construct as the vaccine immunogen or in a separate DNA vector.

A vaccine according to the present invention can be administered in a variety of ways including through any parenteral or topical route. For example,
10 an individual can be inoculated by intravenous, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous or intramuscular methods. Inoculation can be, for example, with a hypodermic needle, needleless delivery devices such as those that propel a stream of liquid into the target site, or with the use of a gene gun that bombards DNA on gold beads into the target site. The vector comprising the pathogen vaccine insert
15 can be administered to a mucosal surface by a variety of methods including intranasal administration, i.e., nose drops or inhalants, or intrarectal or intravaginal administration by solutions, gels, foams, or suppositories. Alternatively, the vector comprising the vaccine insert can be orally administered in the form of a tablet, capsule, chewable tablet, syrup, emulsion, or the like. In
20 an alternate embodiment, vectors can be administered transdermally, by passive skin patches, iontophoretic means, and the like.

Any appropriate physiologically acceptable medium is suitable for introducing the vector comprising the pathogen vaccine insert into the patient.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

For example, suitable pharmaceutically acceptable carriers known in the art include, but are not limited to, sterile water, saline, glucose, dextrose, or buffered solutions. Carriers may include auxiliary agents including, but not limited to, diluents, stabilizers (i.e., sugars and amino acids), preservatives, wetting agents, 5 emulsifying agents, pH buffering agents, viscosity enhancing additives, colors and the like.

The present invention is further illustrated by the following examples, which are provided by way of illustration and should not be construed as limiting. The contents of all references, published patents and patents cited throughout the 10 present application are hereby incorporated by reference in their entirety.

Example 1: Structure and Sequence of pGA1

pGA1 as illustrated in Fig. 1 and Fig. 2 contains the ColE1 origin of replication, the kanamycin resistance gene for antibiotic selection, the lambda T0 15 terminator, and a eukaryotic expression cassette including an upstream intron. The ColE1 origin of replication is a 600 nucleotide DNA fragment that contains the origin of replication (*ori*), encodes an RNA primer, and encodes two negative regulators of replication initiation. All enzymatic functions for replication of the plasmid are provided by the bacterial host. The original constructed plasmid that 20 contained the ColE1 replicator was pBR322 (Bolivar, et al. 1977; Sutcliffe, et al. 1978).

The kanamycin resistance gene is an antibiotic resistance gene for plasmid selection in bacteria. The lambda T0 terminator prevents read through

WO 01/92470

PCT/US01/06795

from the kanamycin resistance gene into the vaccine transcription cassette during prokaryotic growth of the plasmid (Scholtissek and Grosse, 1987). By preventing read through into the vaccine expression cassette, the terminator helps stabilize plasmid inserts during growth in bacteria.

5 The eukaryotic expression cassette is comprised of the CMV immediate early promoter including intron A (CMVIE-IA) and termination sequences from the bovine growth hormone polyadenylation sequence (BGHpA). A synthetic mimic of the leader sequence for tissue plasminogen activator (tPA) is included as an option within the transcription cassette. Cassettes with these elements have
10 proven to be highly effective for expressing foreign genes in eukaryotic cells (Chapman et al., 1991). Cloning sites within the transcription cassette include a ClaI site upstream of the tPA leader, a NheI site for cloning in frame with the tPA leader, and XmnI, SmaI, RsrII, AvrII, and BlnI sites for cloning prior to the BGHpA.

15 The ColE1 replicator, the Kanamycin resistance gene and transcriptional control elements for eukaryotic cells were combined in one plasmid using polymerase chain reaction (PCR) fragments from a commercial vector, pZErO-2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) and a eukaryotic expression vector, pJW4303 (Lu et al., 1997).

20 A 1853 bp fragment from pZErO2 from nt 1319 to nt 3178 included the ColE1 origin of replication and the kanamycin resistance gene. A 2040 bp fragment from pJW4303 from nt 376 to nt 2416 included the CMVIE promoter with intron A, a synthetic homolog of the tissue plasminogen activator leader

WO 01/92470

PCT/US01/06795

(tPA), and the bovine growth hormone polyadenylation site (BGHpA). Fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with oligonucleotide primers containing SalI sites. A ligation product with the transcription cassettes for Kanamycin resistance from pZeRO2 and the eukaryotic transcription cassette
 5 form pJW4303 in opposite transcriptional orientations was identified for further development. Nucleotide numbering for this parent for the pGA vectors was started from the first bp of the 5' end of the CMV promoter .

The T0 terminator was introduced into this parent for the pGA vectors by PCR amplification of a 391 bp fragment with a BamHI restriction endonuclease
 10 site at its 5' end and an XbaI restriction endonuclease site at its 3' end. The initial 355 bp of the fragment were sequences in the BGHpA sequence derived from the pJW4303 transcription cassette, the next 36 bases in a synthetic oligonucleotide introduced the T0 sequence and the XbaI site. The introduced T0 terminator sequences comprised the nucleotide sequence as follows:

15 5'-ATAAAAAACGCCCGCGCAACCGAGCGTTCTGAA-3' (SEQ ID NO:
)

The T0 terminator containing BamHI - XbaI fragment was substituted for the homologous fragment without the T0 terminator in the plasmid created from pXeRO 2 and pJW4303. The product was sequenced to verify the T0 orientation.

20 A region in the eukaryotic transcription cassette between nucleotides 1755-1845 contained the last 30bp of the reading frame for SIV nef. This region was removed from pGA by mutating the sequence at nt1858 and generating an Avr II restriction endonuclease site. A naturally occurring Avr II site is located at

WO 01/92470

PCT/US01/06795

nt1755. Digestion with *Avr II* enzyme and then religation with T4 DNA ligase allowed for removal of the SIV segment of DNA between nucleotides 1755-1845. To facilitate cloning of HIV-1 sequences, into pGA vectors a *Clal* site was introduced at bp1645 and an *RsrII* site at bp 1743 using site directed mutagenesis.

5 Constructions were verified by sequence analyses.

Example 2: Structure and Sequence of pGA2

pGA2, as illustrated in Fig. 3 and Fig. 4, is identical to pGA1 except for deletion of the intron A sequences from the CMVIE promoter. pGA2 was created
10 from pGA1 by introducing a *Clal* site 8 bp downstream from the mRNA cap site in the CMVIE promoter. The *Clal* site was introduced using oligonucleotide-directed mutagenesis using the complimentary primers

5'-CCGTCAGATCGCATCGATACGCCATCCACG-3' (SEQ ID NO:) and

5'-CGTGGATGGCGTATCGATGCGATCTGACGG-3' (SEQ ID NO:).

15 After insertion of the new *Clal* site, pGA1 was digested with *Clal* to remove the 946bp *Clal* fragment from pGA1, and then religated to yield pGA2.

Example 3: Structure and Sequence of pGA3

pGA3 as shown in Fig. 5 and Fig. 6 is identical to pGA1 except for the
20 introduction of a *HindIII* site in stead of the *Clal* site at nt 1645 and a *BamHI* site instead of the *RsrII* site at nucleotide 1743.

Example 4: Comparative Expression and Immunogenicity of pGA3 and

pJW4303

To determine the efficacy of the pGA plasmids as vaccine vectors, a pGA plasmid was compared to the previously described vaccine vector pJW4303. The pJW4303 plasmid has been used for DNA vaccinations in mice, rabbits, and rhesus macaques (Robinson et al. 1999; Robinson et al., 1997; Pertmer, et al., 1995; Feltquate, et al. 1997; Torres, et al. 1999). Comparisons were done with pGA3 with a vaccine insert encoding the normal, plasma-membrane form of the A/PR/8/34 (H1N1) influenza virus hemagglutinin (pGA3/H1) and pJW4303 encoding the same fragment (pJW4303/H1). Both pGA3 and pJW4303 contain intron A upstream of influenza H1 sequences.

The pGA3/H1 and pJW4303/H1 vaccine plasmids expressed similar levels of H1 in eukaryotic cells, as summarized below:

TABLE 5: *In Vitro* Expression Levels of HA plasmids.

Plasmids	Relative HA Units	
	Supernatant	Cell Lysate
PGA3/H1	0.1±0.1	5.7±0.6
pGA vector	0.0±0.0	0.2±0.1
pJW4303/H1	0.3±0.05	4.8±0.5
pJW4303	0.0±0.0	0.1±0.1

Human embryonic kidney 293T cells were transiently transfected with 2µg of plasmid and the supernatants and cell lysates assayed for H1 using an antigen-capture ELISA. The capture antibody was a polyclonal rabbit serum against H1, and the detection antibody, polyclonal mouse sera against H1. pGA3/H1 expressed slightly more H1 than pJW4303/H1 (5.8 HA units as

WO 01/92470

PCT/US01/06795

opposed to 5.1 H1 units (Table 6). As expected, 90% of the H1 antigen was in the cell lysates. A comparative immunization study using pGA3/H1, and pJW4303/H1 demonstrated comparable or better immunogenicity for pGA3/H1 than pJW4303/H1 (Figure 7). Immunogenicity was assessed in BALB/c mice. In this example, mice were vaccinated with DNA coated gold particles via gene gun. Mice were primed and boosted with a low dose (0.1µg) or a high dose (1µg) of the plasmid DNAs. The booster immunization was given at 4 weeks after the priming immunization. The amount of anti-H1 IgG raised in response to immunizations was as high or higher following immunization with pGA3/H1 than following immunization with pJW4303/H1 (Figure 7). Thus the pGA vector proved to be as effective, or more effective, than the pJW4303 vector at raising immune responses.

Example 5: Immunodeficiency Virus Vaccine Inserts in pGA Vectors

Immunodeficiency virus vaccine inserts expressing virus like particles have been developed in pGA1 and pGA2. The VLP insert was designed with clade B HIV-1 sequences so that it would match HIV-1 sequences that are endemic in the United States. Within clade B, different isolates exhibit clustal diversity, with each isolate having overall similar diversity from the consensus sequence for the clade (Subbarao, Schochetman, 1996). Thus, any clade B isolate can be used as a representative sequence for other clade B isolates. HIV-1 isolates use different chemokine receptors as co-receptors. The vast majority of viruses that are undergoing transmission use the CCR-5 co-receptor (Berger, E.A., 1997). Therefore the vaccine insert was designed to have a CCR-5 using Env.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

The expression of VLPs with an R5-Env by a HIV-1 DNA vaccine also has the advantage of supporting Env-mediated entry of particles into professional antigen presenting cells (APCs) such as dendritic cells and macrophages. Both dendritic cells and macrophages express the CD4 receptor and the CCR-5 co-
5 receptor used by CCR-5-tropic (R5) HIV-1 Envs. By using an R5 Env in the vaccine, the VLP expressed in a transfected non-professional APC (for example keratinocyte or muscle cells) can gain entry into the cytoplasm of an APC by Env-mediated entry. Following entry into the cytoplasm of the APC, the VLP will be available for processing and presentation by class I histocompatibility antigens.
10 DNA-based immunizations rely on professional APCs for antigen presentation (Corr et al., 1996; Fu, et al., 1997; Iwasaki A, et al., 1997). Much of DNA-based immunization is accomplished by direct transfection of professional APC (Condon et al., 1996; Porgador et al., 1998). Transfected muscle cells or keratinocytes serve as factories of antigen but do not directly raise immune
15 response (Torres et al., 1997). By using an expressed antigen that is assembled and released from transfected keratinocytes or muscle cells and then actively enters professional APC, the efficiency of the immunization may be increased.

Goals in the construction of pGA2/JS2 were (i) to achieve a CCR-5-using clade B VLP with high expression, (ii) to produce a VLP that was non infectious
20 and (iii) to minimize the size of the vaccine plasmid. Following the construction of the CCR-5-using VLP (pGA2/JS2), a derivative of JS2 was prepared that expresses an Env-defective VLP. This plasmid insert was designated JS5. Although it is anticipated that this sequence will be a less effective vaccine than

WO 01/92470

PCT/US01/06795

the Env-containing JS2 VLP, the non-Env containing VLP offers certain advantages for vaccination. These include the ability to monitor vaccinated populations for infection by sero-conversion to Env. Deletion of Env sequences also reduces the size of the vaccine plasmid. The DNA sequence of pGA2/JS2 is shown in Fig. 17 and that of pGA1/JS5 in Figure 18.

To achieve a VLP plasmid with high expression, candidate vaccines were constructed from 7 different HIV-1 sequences, as shown in the following table:

Table I: Comparison of candidate vaccine inserts

Plasmid designation	Sequences tested	Ability to grow plasmid	Expression of Gag	Expression of Env	Comment
BH10-VLP	BH10	good	good	good	X4 Env
6A-VLP	6A env in BH10-VLP	poor	not tested	not tested	
BAL-VLP	BAL env in BH10-VLP	good	poor	poor	
ADA-VLP	ADA env in BH10-VLP	good	good	good	chosen for vaccine, renamed pGA1/JS1
CDC-A-VLP	CDC-A env in BH10-VLP	good	good	poor	
CDC-B-VLP	CDC-B-env in BH10-VLP	good	good	good	not as favorable expression as ADA
CDC-C-VLP	CDC-C env in BH10-VLP	good	good	good	not as favorable expression as ADA

An initial construct, pBH10-VLP, was prepared from IIIb sequences that are stable in bacteria and have high expression in eukaryotic cells. The BH10 sequences were obtained from the NIH-sponsored AIDS Repository (catalog #90). The parental pBH10 was used as the template for PCR reactions to

WO 01/92470

PCT/US01/06795

construct pBH10-VLP.

Primers were designed to yield a Gag-Rt PCR product (5' PCR product) encompassing from 5' to 3' 105 bp of the 5' untranslated leader sequence and gag and pol sequences from the start codon for Gag to the end of the RT coding sequence. The oligonucleotide primers introduced a ClaI site at the 5' end of the PCR product and EcoRI and NheI sites at the 3' end of the PCR product. Sense primer 1 (5'-GAGCTCTATCGATGCAGGACTCGGCTTGC-3' (SEQ ID NO:)) and antisense primer 2 (5'-GGCAGGTTTAAATCGCTAGCCTATGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:)) were used to amplify the 5'PCR product.

The PCR product for the env region of HIV-1 (3'PCR product) encompassed the vpu, tat, rev, and env sequences and the splice acceptor sites necessary for proper processing and expression of their respective mRNAs. An EcoRI site was introduced at the 5' end of this product and NheI and RsrII sites were introduced into the 3' end. Sense primer 3 (5'-GGGCAGGAGTGCTAGCC-3' (SEQ ID NO:)) and antisense primer 4 (5'-CCACACTACTTTCGGACCGCTAGCCACCC-3' (SEQ ID NO:)) were used to amplify the 3'PCR product).

The 5' PCR product was cloned into pGA1 at the ClaI and NheI sites and the identity of the construct confirmed by sequencing. The 3' PCR product was then inserted into the 5' clone at the EcoRI and NheI sites to yield pBH10-VLP. The construction of this VLP resulted in proviral sequences that lacked LTRs, integrase, vif, and vpr sequences (see Figure 8A).

WO 01/92470

PCT/US01/06795

Because the BH10-VLP had an X4 rather than an R5 Env, sequences encoding six different R5 Envs were substituted for env sequences in BH10-VLP. This was done by cloning EcoRI to BamHI fragments encompassing tat, rev, vpu and env coding sequences from different viral genomes into pBH10-VLP. The resulting env and rev sequences were chimeras for the substituted sequences and BH10 sequences (for example see Figure 8B). In the case of the ADA envelope, a BamHI site was introduced into the ADA sequence to facilitate substituting an EcoRI to BamHI fragment for the EcoRI to BamHI region of the BH10-VLP (Figure 8). The results of these constructions are summarized in Table 1. Of the six sequences tested, one, the 6A-VLP was found to be associated with poor plasmid growth in transformed bacteria. This plasmid was not used for further vaccine development (Table 1).

Among the plasmids exhibiting good growth in bacteria, the best expression of the VLP was found for the ADA-VLP (Table 1). In transient transfections in 293T cells, the expression of the ADA-VLP was higher than that of wt proviruses for ADA or IIIb (Fig.9). Expression was also higher than for a previous VLP-vaccine (dpol) (Richmond et al., 1998) that had successfully primed cytotoxic T-cell (Tc) responses in rhesus macaques (Kent et al., 1998).

Example 6: Safety mutations

Once the ADA-VLP had been identified as a favorable candidate for

WO 01/92470

PCT/US01/06795

further vaccine development, this plasmid was mutated to increase its safety for use in humans. Further mutations disabled the Zinc fingers in NC that are active in the encapsidation of viral RNA, and added point mutations to inactivate the activity of the viral reverse transcriptase and the viral protease (Fig. 8). The

5 following table summarizes the location of the safety point mutations

Table 2. Location of safety point mutations in pGA/JS2 and pGA/JS5 to inhibit viral RNA packaging and abolish reverse transcriptase activity in vaccine

10 constructs

GENE	REGION	FUNCTION	AMINO ACID CHANGE ¹	LOCATIO
Gag	Zn finger	Viral RNA packaging	C392S	1285/128
Gag	Zn finger	Viral RNA packaging	C392S	1294/129
Gag	Zn finger	Viral RNA packaging	C413S	1348/135
Gag	Zn finger	Viral RNA packaging	C416S	1357/135
Pol	RT	Polymerase activity	D185N	2460/246
Pol	RT	Strand transfer	W266T	2703/2704/2
Pol	RNAse H	RNAse activity	E478Q	3339

¹Amino acid number corresponds to individual genes in HIV-1 BH10 sequence;

²Nucleotide number in wt HIV-1 BH10 sequence

15

The mutations were made using a site directed mutagenesis kit (Stratagene) following the manufacturer's protocol. All mutations were confirmed by

WO 01/92470

PCT/US01/06795

sequencing. Primer pairs used for the mutagenesis were:

(A) C15S ZN1 5'-GGTTAAGAGCTTCAATAGCGCAAAGAAGGGC-3'

(SEQ ID NO:)

5 C15S ZN2 5'-GCCCTTCTTTGCCGCTATTGAAGCTCTTAACC-3'

(SEQ ID NO:)

(B) C36S ZN3 5'-GGGCAGCTGGAAAAGCGGAAAGGAAGG-3' (SEQ ID

NO:)

10 C36S ZN4 5'-CCTTCCTTTCCGCTTTTCCAGCTGCCC-3' (SEQ ID

NO:)

(C) D185N RT1 5'-

15 CCAGACATAGTTATCTATCAATACATGAACGATTTGTATGTAGG-3'

(SEQ ID NO:)

D185N RT2 5'-

CCTACATACAAATCGITCATGTATTGATAGATAACTATGTCTGG-3'

(SEQ ID NO:)

20

(D) W266T RT3 5'-GGGGAAATTGAATACCGCAAGTCAGATTACCC-

3'

(SEQ ID NO:)

W266T RT4 5' GGGTAAATCTGACTTGCGGTATTCAATTTCCCC-3'

WO 01/92470

PCT/US01/06795

(SEQ ID NO:)

(E) E478Q RT5 5'-
CCCTAACTAACACAACAAATCAGAAAACTCAGTTACAAGC-3'

5 (SEQ ID NO:)

E478Q RT6 5'-
GCTTGTAAGTGAAGTTTCTGATTTGTTGTGTTAGTTAGGG-3'
(SEQ ID NO:)

10 (F) D25A Prt1 5'-GGCAACTAAAGGAAGCTCTATTAGCCACAGGAGC-3'

(SEQ ID NO:)

D25Aprt2 5'-GCTCCTGTGGCTAATAGAGCTCCITTTAGTTGCC-3'

(SEQ ID NO:)

15 The ADA-VLP with the zinc finger and RT mutations was found to
express Gag and Env more effectively than the VLP plasmid without the
mutations (Figure 10). The mutation that inactivated the protease gene markedly
reduced VLP expression (Figure 10) and was not included in the further
development of the vaccine plasmid. The ADA-VLP without mutations was
20 designated JS1 and the ADA-VLP with mutations, JS2.

Example 7: Construction of the JS5 Vaccine Insert

The JS5 insert, a plasmid expressing Gag, RT, Tat, and Rev was
constructed from JS2 by deleting a BglII fragment in the ADA Env (Fig. 8). This

WO 01/92470

PCT/US01/06795

deletion removed sequences from nt 4906-5486 of the pGA2/JS2 sequence and results in a premature stop codon in the env gene leading to 269 out of the 854 amino acids of Env being expressed while leaving the tat, rev, and vpu coding regions the RRE and splice acceptor sites intact. The DNA sequence of
5 pGA1/JS5 is shown in Fig. 18.

Example 8: Minimizing the Size of the JS2 and JS5 Vaccine Plasmids

The JS2 and JS5 vaccine inserts were originally constructed in pGA1, a vector that contains the ~1 kb intron A of the CMVIE promoter upstream of the
10 vaccine insert. To determine whether this intron was necessary for high levels of vaccine expression, pGA2 vectors lacking intron A were constructed expressing the JS2 and JS5 vaccine inserts. In expression tests, pGA2 proved to have as good an expression pattern as pGA1 for JS2 (Figure 11). In contrast to this result, JS5 was expressed much more effectively by pGA1 than pGA2 (Figure 11). For
15 the JS5 insert, the absence of intron A resulted in 2-3-fold lower levels of expression than in the presence of intron A.

Example 9. Testing for the efficacy of the safety mutations

in the vaccine inserts JS2 and JS5

20 The three point mutations in RT (Table 2) completely abolished detectable levels of reverse transcriptase activity for JS2 and JS5. A highly sensitive reverse transcriptase assay was used in which the product of reverse transcription was amplified by PCR (Yamamoto, Folks, Hencine, 1996). This assay can detect

WO 01/92470

PCT/US01/06795

reverse transcriptase in as few as 10 viral particles. Reverse transcriptase assays were conducted on the culture supernatants of transiently transfected cells. Reverse transcriptase activity was readily detected for as few as 10 particles (4×10^{-3} pg of p24) in the JS1 vaccine but could not be detected for the JS2 or JS5
5 inserts.

The deletions and zinc finger mutations in the JS2 and JS5 vaccine inserts (Table 2) reduced the levels of viral RNA in particles by at least 1000-fold. Particles pelleted from the supernatants of transiently transfected cells were tested for the efficiency of the packaging of viral RNA. The VLPs were treated with
10 DNase, RNA was extracted and the amount of RNA standardized by p24 levels before RT PCR. The RT PCR reaction was followed by nested PCR using primers specific for viral sequences. End point dilution of the VLP RNA was compared to the signal obtained from RNA packaged in wt HIV-1 Bal virus.

Packaging for both JS2 and JS5 was restricted by the deletions in the
15 plasmid by 500-1000-fold, as summarized below:

Table 3: Packaging of viral RNA is reduced in pGA2/JS2 and pGA1/JS5 VLPs

Vaccine Construct	Deletions/Mutations	Copies vRNA relative to wt HIV-1 b
HIV-1 bal	Wt	1
pGA1/JS1 VLP	Deleted: LTRs, int, vif, vpr, nef	.002
pGA1/JS2 VLP	Deleted: LTRs, int, vif, vpr, nef, Mutations in Zn fingers and RT	.0001
pGA1/JS4 VLP	Deleted: LTRs, int, vif, vpr, nef	.001
pGA1/JS5 VLP	Deleted: LTRs, int, vif,	.001

WO 01/92470

PCT/US01/06795

	vpr, nef, env; Mutations in Zn fingers and RT	
--	--	--

The zinc finger mutations decreased the efficiency of packaging for the JS2 particles a further 20-fold but did not further affect the efficiency of packaging for the JS5 particles. This pattern of packaging was reproducible for
5 particles produced in independent transfections.

Example 10: Western blot analyses of protein expression.

Western blot analyses, shown in Figs. 12A-D, revealed the expected patterns of expression of pGA2/JS2 and pGA1/JS5. Both immature and mature
10 proteins were observed in cell lysates, whereas only the mature forms of Gag and Env were found in the VLP-containing lysates (Figs. 12B and 12C). Reverse transcriptase was readily detected in cell lysates (Fig. 12D).

15 **Example 11: pGA2/89.6 SHIV Vector Construction**

Initial immunogenicity trials have been conducted with a SHIV-expressing VLP rather than the HIV-1-expressing vaccine plasmids. SHIVs are hybrids of simian and human immunodeficiency virus sequences that grow well in macaques (Li et al., 1992). By using a SHIV, vaccines that are at least partially of HIV-1
20 origin can be tested for efficacy in macaque models.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

pGA2/89.6 (also designated as pGA2/M2) expresses sequences from SHIV-89.6 (Reimann, Li, Voss, et al., 1996; Reimann, Li, Veazey, et al., 1996). The 89.6 Env represents a patient isolate (Collman et al., 1992). The SHIV-89.6 virus is available as a highly pathogenic challenge stock, designated SHIV-89.6P (Reimann, Li, Voss, et al., 1996; Reimann, Li, Veazey, et al., 1996), which allows a rapid determination of vaccine efficacy. The SHIV-89.6P challenge can be administered via both intrarectal and intravenous routes. SHIV-89.6 and SHIV-89.6P do not generate cross-neutralizing antibody.

pGA2/89.6 (Fig.13) has many of the design features of pGA2/JS2. Both express immunodeficiency virus VLPs: HIV-1 VLP in the case of pGA2/JS2, while the VLP expressed by pGA2/89.6 is a SHIV VLP. The gag-pol sequences in pGA2/89.6 are from SIV239, while the tat, rev, and env sequences are from HIV-1-89.6. pGA2/89.6 also differs from pGA2/JS2 in that the integrase, vif and vpr sequences have not been deleted, nor has the reverse transcriptase gene been inactivated by point mutations. Finally, the zinc fingers in NC have been inactivated by a deletion and not by point mutations.

pGA1/Gag-Pol was also constructed to allow evaluation of the protective efficacy of a Gag-Pol expressing vector with the Gag-Pol-Env expressing pGA2/89.6. This vector was constructed from pGA1/JS5 and pGA2/89.6 (Fig.13).

20

**Example 12: Comparison of the expression of pGA2/89.6 SHIV plasmid
with
pGA2/JS2 expression**

Both pGA2/89.6 and pGA1/Gag-Pol expressed similar levels of Gag as pGA2/JS2. Comparative studies for expression were performed on transiently transfected 293T cells. Analyses of the lysates and supernatants of transiently transfected cells revealed that both plasmids expressed similar levels of capsid antigen (Figure 14). The capsid proteins were quantified using commercial antigen capture ELISA kits for HIV-1 p24 and SIV p27.

Example 13: pGA2/89.6 SHIV vaccine protocol

A rhesus macaque model was used to investigate the ability of systemic DNA priming followed by a recombinant MVA (rMVA) booster to protect against a mucosal challenge with the SHIV-89.6P challenge strain (Amara et al, 2001).

The DNA component of the vaccine (pGA2/89.6) was made as described in Example 11 and expressed eight immunodeficiency virus proteins (SIV Gag, Pol, Vif, Vpx, and Vpr and HIV Env, Tat, and Rev) from a single transcript using the subgenomic splicing mechanisms of immunodeficiency viruses. The rMVA booster (89.6-MVA) was provided by Dr. Bernard Moss (NIH) and expresses both the HIV 89.6 Env and the SIV 239 Gag-Pol, inserted into deletion II and deletion III of MVA respectively, under the control of vaccinia virus early/late promoters (Wyatt and Moss, unpublished results). The 89.6 Env protein was truncated for the C-terminal 115 amino acids of gp41. The modified H5 promoter controlled the expression of both foreign genes.

The vaccination trial compared i.d. and i.m. administration of the DNA vaccine and the ability of a genetic adjuvant, a plasmid expressing macaque GM-

WO 01/92470

PCT/US01/06795

CSF, to enhance the immune response raised by the vaccine inserts. Vaccination was accomplished by priming with DNA at 0 and 8 weeks and boosting with rMVA at 24 weeks. For co-delivery of a plasmid expressing GM-CSF, 1-100 µl i.d. inoculation was given with a solution containing 2.5 mg of pGA2/89.6 and 2.5
5 mg per ml of pGM-CSF.

I.d. and i.m. deliveries of DNA were compared for two doses, 2.5 mg and 250 µg of DNA. Four vaccine groups of six rhesus macaques were primed with either 2.5 mg (high-dose) or 250 µg (low-dose) of DNA by intradermal (i.d.) or intramuscular (i.m.) routes using a needleless jet injection device (Bioject,
10 Portland OR). The 89.6-MVA booster immunization (2×10^8 pfu) was injected with a needle both i.d. and i.m. A control group included two mock immunized animals and two naive animals. The vaccination protocol is summarized as follows:

WO 01/92470

PCT/US01/06795

Table 4. Vaccination Trial

Group, (# macaque)	Prime at 0 and 8 weeks	Immunogen	Boost at 24 weeks	Immunogen
1 (6)	i.d. bioject	2.5 mg VLP DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env
2 (6)	i.m. bioject	2.5 mg VLP DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
3 (6)	i.d. bioject	250 ug VLP DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
4 (6)	i.m. bioject	250 ug VLP DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
5 (6)	i.d. bioject	2.5 mg gag-pol DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol
6 (6)	i.d. bioject	250 ug gag-pol DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol
7 (6)	i.d. bioject	250 ug VLP DNA+ 250 ug GM-CSF DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
8 (5)	i.d. bioject i.d. + i.m. control MVA	2.5 mg control DNA control MVA	i.d. + i.m.	control MVA
9 (4)	i.d., bioject	250 ug control DNA + 250 ug GM-CSF DNA	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env
10 (6)	i.d. + i.m.	MVA gag-pol-env	i.d.+ i.m.	MVA gag-pol-env

5 VLP DNA expresses all SHIV-89.6 proteins except Nef, truncated for LTRs, 2nd ZN++ finger, mutated to express cell surface Env; gag-pol DNA expresses SIV mac 239 gag-pol; MVA gag-pol-env expresses 89.6 truncated env and SIV mac 239 gag-pol; MVA gag-pol expresses SIVmac239 gag-pol; MVA dose is 1x10⁸ pfu

10 Animals were challenged seven months after the rMVA booster to test whether the vaccine had generated long-term immunity. Because most HIV-1 infections are transmitted across mucosal surfaces, an intrarectal challenge was administered to test whether the vaccine could control a mucosal immunodeficiency virus challenge. Briefly, the challenge stock (5.7×10^9 copies of viral RNA per ml) was produced by one i.v. followed by one intrarectal passage in rhesus macaques of the original SHIV-89.6P stock. Lymphoid cells

WO 01/92470

PCT/US01/06795

were harvested from the intrarectally infected animal at peak viremia, CD8-depleted and mitogen-stimulated for stock production. Prior to intrarectal challenge, fasted animals were anesthetized (ketamine, 10mg/kg) and placed on their stomach with the pelvic region slightly elevated. A feeding tube [8Fr (2.7mm) x 16 inches (41 cm), Sherwood Medical, St. Louis, MO] was inserted into the rectum for a distance of 15-20 cm. Following insertion of the feeding tube, a syringe containing 20 intrarectal infectious doses in two ml of RPMI-1640 plus 10% fetal bovine serum (FBS) was attached to the tube and the inoculum slowly injected into the rectum. Following delivery of the inoculum, the feeding tube was flushed with 3.0 ml of RPMI without fetal calf serum and then slowly withdrawn. Animals were left in place, with pelvic regions slightly elevated, for a period of ten minutes following the challenge.

Example 14: Vaccine-raised T-cell responses

DNA priming followed by rMVA boosting generated high frequencies of virus-specific T cells that peaked at one week following the rMVA booster, as shown in Fig. 15. The frequencies of T cells recognizing the Gag-CM9 epitope were assessed using Mamu-A*01- tetramers; and the frequencies of T cells recognizing epitopes throughout Gag and Env, using pools of overlapping Gag and Env peptides and an enzyme linked immunospot (ELISPOT) assay.

For tetramer analyses, approximately 1×10^6 PBMC were surface stained with antibodies to CD3 (FN-18, Biosource International, Camarillo, CA), CD8 (SK1, Becton Dickinson, San Jose, CA), and Gag-CM9 (CTPYDINQM)-Mamu-A*01 tetramer conjugated to FITC, PerCP and APC respectively, in a volume of 100 μ l at 8-10°C for 30 min. Cells were washed twice with cold PBS containing

WO 01/92470

PCT/US01/06795

2% FBS, fixed with 1% paraformaldehyde in PBS and analyses acquired within 24 hrs. on a FACScaliber (Becton Dickinson, San Jose, CA). Cells were initially gated on lymphocyte populations using forward scatter and side scatter and then on CD3 cells. The CD3 cells were then analyzed for CD8 and tetramer-binding
5 cells. Approximately 150,000 lymphocytes were acquired for each sample. Data were analyzed using FloJo software (Tree Star, Inc. San Carlos, CA).

For IFN- γ ELISPOTs, MULTISCREEN 96 well filtration plates (Millipore Inc. Bedford, MA) were coated overnight with anti-human IFN- γ antibody (Clone B27, Pharmingen, San Diego, CA) at a concentration of 2 μ g/ml
10 in sodium bicarbonate buffer (pH 9.6) at 8-10°C. Plates were washed two times with RPMI medium then blocked for one hour with complete medium (RPMI containing 10% FBS) at 37°C. Plates were washed five more times with plain RPMI medium and cells were seeded in duplicate in 100 μ l complete medium at numbers ranging from 2×10^4 to 5×10^5 cells per well. Peptide pools were added to
15 each well to a final concentration of 2 μ g/ml of each peptide in a volume of 100 μ l in complete medium. Cells were cultured at 37°C for about 36 hrs under 5% CO₂. Plates were washed six times with wash buffer (PBS with 0.05% Tween-20) and then incubated with 1 μ g of biotinylated anti-human IFN- γ antibody per ml (clone 7-86-1, Diapharma Group Inc., West Chester, OH) diluted in wash
20 buffer containing 2% FBS. Plates were incubated for 2 hrs at 37°C and washed six times with wash buffer. Avidin-HRP (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) was added to each well and incubated for 30-60 min at 37°C. Plates were washed six times with wash buffer and spots were developed using stable DAB as substrate (Research Genetics Inc., Huntsville, AL). Spots were counted using a
25 stereo dissecting microscope. An ovalbumin peptide (SIINFEKL) was included as a control in each analysis. Background spots for the ovalbumin peptide were

WO 01/92470

PCT/US01/06795

generally <5 for 5×10^5 PBMC s. This background when normalized for 1×10^6 PBMC is <10 . Only ELISPOT counts of twice the background (≥ 20) were considered significant. The frequencies of ELISPOTs are approximate because different dilutions of cells have different efficiencies of spot formation in the
5 absence of feeder cells (34). The same dilution of cells was used for all animals at a given time point, but different dilutions were used to detect memory and peak effector responses.

Simple linear regression was used to estimate correlations between post-booster and post-challenge ELISPOT responses, between memory and post-
10 challenge ELISPOT responses, and between log viral loads and ELISPOT frequencies in vaccinated groups. Comparisons between vaccine and control groups were performed by means of 2-sample t-tests using log viral load and log ELISPOT responses. Comparisons of ELISPOTs or log viral loads between *A*01* and non *A*01* macaques were done using 2-sample t-tests. Two-way analyses of
15 variance were used to examine the effects of dose and route of administration on peak DNA/MVA ELISPOTs, memory DNA/MVA ELISPOTs, and on logarithmically transformed Gag antibody data.

Gag-CM9 tetramer analyses were restricted to macaques that expressed the *Mamu-A*01* histocompatibility type, whereas ELISPOT responses did not
20 depend on a specific histocompatibility type. Temporal T cell assays were designed to score both the acute (peak of effector cells) and long-term (memory) phases of the T cell response (Fig 15A). As expected, the DNA immunizations raised low levels of memory cells that expanded to high frequencies within one week of the rMVA booster (Fig. 15). In *Mamu-A*01* macaques, cells specific to
25 the Gag-CM9 epitope expanded to frequencies as high as 19% of total CD8 T cells (see animal 2 Fig 15B). This peak of specific cells underwent a >10 -fold

WO 01/92470

PCT/US01/06795

contraction into the DNA/MVA memory pool (Figs. 15A and B). ELISPOTs for three pools of Gag peptides also underwent a major expansion (frequencies up to 4000 spots for 1×10^6 PBMC) before contracting into the DNA/MVA memory response (Fig. 15C). The frequencies of ELISPOTs were the same in macaques with and without the *A*01* histocompatibility type ($P > 0.2$). At both peak and memory phases of the vaccine response, the rank order for the height of the ELISPOTs in the different vaccine groups was 2.5 mg i.d. > 2.5 mg i.m. > 250 μ g i.d. > 250 μ g i.m. (Fig. 15C). The IFN- γ -ELISPOTs included both CD4 and CD8 cells (work in progress). Gag-CM9-specific CD8 cells had good lytic activity following restimulation with peptide (data not shown).

Impressively, in the outbred population of animals, pools of peptides throughout Gag and Env stimulated IFN- γ -ELISPOTs (Fig. 16A). The breadth of the cellular response was tested at 25 weeks after the rMVA boost, a time when vaccine-raised T cells were in memory. Seven out of 7 pools of Gag peptides and 16 out of 21 pools of Env peptides were recognized by T cells in vaccinated animals. Of the five Env pools that were not recognized, two have been recognized in a macaque DNA/MVA vaccine trial at the U.S. Centers for Disease Control (data not shown). The remaining three (pools 19-21) had been truncated in our immunogens (Amara et al, 2001, submitted) and served as negative controls. Gag and Env ELISPOTs had overall similar frequencies in the DNA/MVA memory response (Fig. 16B). The greatest breadth of response was in high-dose i.d. DNA-primed animals where on average 10 peptide pools (4.5 Gag and 5.3 Env) were recognized. The rank order of the vaccine groups for breadth was the same as for the peak DNA/MVA response: 2.5 mg i.d. > 2.5 mg i.m. > 250 μ g i.d. > 250 μ g i.m. (Fig. 16B).

Example 15: Challenge and protection against AIDS

The highly pathogenic SHIV-89.6P challenge was administered intrarectally at 7 months after the rMVA booster, when vaccine-raised T cells were in memory (Fig 15).

5 *Determination of SHIV copy number:* viral RNA from 150 μ l of ACD anticoagulated plasma was directly extracted with the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen), eluted in 60 μ l AVE buffer, and frozen at -80°C until SHIV RNA quantitation was performed. 5 μ l of purified plasma RNA was reverse transcribed in a final 20 μ l volume containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 4 mM
10 MgCl₂, 1 mM each dNTP, 2.5 μ M random hexamers, 20 units MultiScribe RT, and 8 units RNase inhibitor. Reactions were incubated at 25°C for 10 min., followed by incubation at 42°C for 20 min. and inactivation of reverse transcriptase at 99°C for 5 min. The reaction mix was adjusted to a final volume of 50 μ l containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM
15 each dNTP, 0.2 μ M forward primer, 0.2 μ M reverse primer, 0.1 μ M probe and 5 units AmpliTaq Gold DNA polymerase (all reagents from Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA). The primer sequences within a conserved portion of the SIV *gag* gene are the same as those described previously (Staprans, S., et al., 1996).

20 A Perkin Elmer Applied Biosystems 7700 Sequence Detection System was used with the PCR profile: 95°C for 10 min., followed by 40 cycles at 93°C for 30 sec., 59.5°C for 1 min. PCR product accumulation was monitored using the 7700 sequence detector and a probe to an internal conserved *gag* gene sequence, where FAM and Tamra denote the reporter and quencher dyes. SHIV
25 RNA copy number was determined by comparison to an external standard curve

WO 01/92470

PCT/US01/06795

consisting of virion-derived SIVmac239 RNA quantified by the SIV bDNA method (Bayer Diagnostics, Emeryville, CA). All specimens were extracted and amplified in duplicate, with the mean result reported. With a 0.15-ml plasma input, the assay has a sensitivity of 10^3 copies RNA/ml plasma, and a linear dynamic range of 10^3 to 10^8 RNA copies ($R^2 = 0.995$). The intra-assay coefficient of variation is $<20\%$ for samples containing $>10^4$ SHIV RNA copies/ml, and $<25\%$ for samples containing $10^3 - 10^4$ SHIV RNA copies/ml. In order to more accurately quantitate low SHIV RNA copy number in vaccinated animals at weeks 16 and 20, the following modifications to increase the sensitivity of the SHIV RNA assay were made: 1) Virions from ≤ 1 ml of plasma were concentrated by centrifugation at 23,000g, 10°C for 150 minutes and viral RNA was extracted; 2) A one-step RT-PCR method was used. Absolute SHIV RNA copy numbers were determined by comparison to the same SIVmac239 standards. These changes provided a reliable quantitation limit of 300 SHIV RNA copies/ml, and gave SHIV RNA values that were highly correlated to those obtained by the first method used ($r = 0.91$, $p < 0.0001$).

Challenge results: The challenge infected all of the vaccinated and control animals. However, by two weeks post-challenge, titers of plasma viral RNA were at least 10-fold lower in the vaccine groups (geometric means of 1×10^7 to 5×10^7) than in the control animals (geometric mean of 4×10^8) (Fig. 19A). By 8 weeks post-challenge, both high-dose DNA-primed groups and the low-dose i.d. DNA-primed group had reduced their geometric mean loads to about 1000 copies of viral RNA per ml. At this time the low-dose i.m. DNA-primed group had a geometric mean of 6×10^3 copies of viral RNA and the non-vaccinated controls, a geometric mean of 2×10^6 . By 20 weeks post-challenge, even the low-dose i.m. group had reduced its geometric mean copies of viral RNA to 1000. At this time,

WO 01/92470

PCT/US01/06795

the unvaccinated controls were succumbing to AIDS. Among the 24 vaccinated animals, only one animal, in the low dose i.m. group, had intermittent viral loads above 1×10^4 copies per ml (Fig 19D).

The rapid reduction of viral loads protected the vaccinated macaques
 5 against the loss of CD4 cells and the rapid onset of AIDS (Figs. 19B, 19C, 19E). By 5 weeks post-challenge, all of the non-vaccinated controls had undergone the profound depletion of CD4 cells that is characteristic of SHIV-89.6P infections (Fig 19B). All of the vaccinated animals maintained their CD4 cells with the exception of animal 22 (see above), which underwent a slow CD4 decline (Fig
 10 19E). By 23 weeks post-challenge, three of the four control animals had succumbed to AIDS (Fig. 19C). These animals had variable degrees of enterocolitis with diarrhea, cryptosporidiosis, colicystitis, enteric campylobacter infection, splenomegaly, lymphadenopathy, and SIV-associated giant cell pneumonia. In contrast, all 24 vaccinated animals have maintained their health.

15 *Intracellular cytokine assays:* approximately 1×10^6 PBMC were stimulated for one hour at 37°C in 5 ml polypropylene tubes with 100 μg of Gag-CM9 peptide (CTPYDINQM) per ml in a volume of 100 μl RPMI containing 0.1% BSA and anti-human CD28 and anti-human CD49d (Pharmingen, Inc. San Diego, CA) costimulatory antibodies (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 900 μl RPMI containing 10%
 20 FBS and monensin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added and the cells cultured for an additional 5 hrs at 37°C at an angle of 5 degrees under 5% CO_2 . Cells were surface stained with antibodies to CD8 conjugated to PerCP (clone SK1, Becton Dickinson) at $8^\circ\text{--}10^\circ\text{C}$ for 30 min., washed twice with cold PBS containing 2% FBS, fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (Pharmingen, Inc.). Cells were
 25 then incubated with antibodies to human CD3 (clone FN-18, Biosource International, Camarillo, CA) and IFN- γ (Clone B27, Pharmingen) conjugated to

WO 01/92470

PCT/US01/06795

FITC and PE, respectively, in Perm wash solution (Pharmingen) for 30 min at 4°C. Cells were washed twice with Perm wash once with plain PBS, resuspended in 1% para-formaldehyde in PBS. Approximately 150,000 lymphocytes were acquired on the FACScaliber and analyzed using FloJo software.

5 *Proliferation assay:* Approximately 0.2 million PBMC were stimulated with appropriate antigen in triplicate in a volume of 200 µl for five days in RPMI containing 10% FCS at 37°C under 5% CO₂. Supernatants from 293T cells transfected with the DNA expressing either SHIV-89.6 Gag and Pol or SHIV-89.6 Gag, Pol and Env were used directly as antigens. Supernatants from mock DNA
10 (vector alone) transfected cells served as negative controls. On day six cells were pulsed with 1 µCi of tritiated-thymidine per well for 16-20 hrs. Cells were harvested using an automated cell harvester (TOMTEC, Harvester 96, Model 1010, Hamden, CT) and counted using a Wallac 1450 MICROBETA Scintillation counter (Gaithersburg, MD). Stimulation indices are the counts of tritiated-
15 thymidine incorporated in PBMC stimulated with 89.6 antigens divided by the counts of tritiated-thymidine incorporated by the same PBMC stimulated with mock antigen.

Post-challenge T cell results: Containment of the viral challenge was associated with a burst of antiviral T cells (Fig.15; Fig.20A). At one-week post
20 challenge, the frequency of tetramer+ cells in the peripheral blood had decreased, potentially reflecting the recruitment of specific T cells to the site of infection (Fig. 20A). However, by two weeks post-challenge, tetramer+ cells in the peripheral blood had expanded rapidly, to frequencies as high, or higher, than after the MVA booster (Figs. 15, 20A). The majority of the tetramer+ cells
25 produced IFN-γ in response to a 6-hour stimulation with peptide Gag-CM9 (Fig. 20B) and did not have the “stunned” IFN-γ negative phenotype sometimes

WO 01/92470

PCT/US01/06795

observed in chronic viral infections. The post-challenge burst of T cells contracted concomitant with the decline of the viral load. By 12 weeks post-challenge, virus-specific T cells were present at approximately one tenth of their peak height (Figs. 15A, 20A, and data not shown). The height of the peak DNA/MVA-induced ELISPOTs presaged the height of the post-challenge T cell response as measured by ELISPOTs ($r = +0.79$, $P < 0.0001$). In contrast to the vigorous secondary response in the vaccinated animals, the naive animals mounted a modest primary response (Figs. 15B, 15C and 20A). Tetramer+ cells peaked at less than 1% of total CD8 cells (Fig. 20A), and IFN- γ -producing T cells were present at a mean frequency of about 300 as opposed to the much higher frequencies of 1000 to 6000 in the vaccine groups (Fig. 15C) ($P < 0.05$). The tetramer+ cells in the control group, like those in the vaccine group, were largely IFN- γ producing following stimulation with the Gag-CM9 peptide (Fig. 20B). By 12 weeks post challenge, 3 of the 4 controls had undetectable levels of IFN- γ -producing T cells (data not shown). This rapid loss of anti-viral CD8 cells in the presence of high viral loads may reflect the lack of CD4 help.

T cell proliferative responses demonstrated that virus-specific CD4 cells had survived the challenge and were available to support the antiviral immune response (Fig. 20C). At 12 weeks post-challenge, mean stimulation indices for Gag-Pol-Env or Gag-Pol proteins ranged from 35 to 14 in the vaccine groups but were undetectable in the control group. Consistent with the proliferation assays, intracellular cytokine assays demonstrated the presence of virus-specific CD4 cells in vaccinated but not control animals (data not shown). The overall rank order of the vaccine groups for the magnitude of the proliferative response was 2.5 mg i.d. > 2.5 mg i.m. > 250 μ g i.d. > 250 μ g i.m.

Preservation of lymph nodes: At 12 weeks post-challenge, lymph nodes

from the vaccinated animals were morphologically intact and responding to the infection whereas those from the infected controls had been functionally destroyed (Fig. 5). Nodes from vaccinated animals contained large numbers of reactive secondary follicles with expanded germinal centers and discrete dark and light zones (Fig. 5A). By contrast, lymph nodes from the non-vaccinated control animals showed follicular and paracortical depletion (Fig. 5B), while those from unvaccinated and unchallenged animals displayed normal numbers of minimally reactive germinal centers (Fig. 5C). Germinal centers occupied < 0.05% of total lymph node area in the infected controls, 2% of the lymph node area in the uninfected controls, and up to 18 % of the lymph node area in the vaccinated groups (Fig. 5D). The lymph node area occupied by germinal centers was about two times greater for animals receiving low-dose DNA priming than for those receiving high-dose DNA priming, suggesting more vigorous immune reactivity in the low-dose animals (Fig. 5D). At 12 weeks post-challenge, *in situ* hybridization for viral RNA revealed rare virus-expressing cells in lymph nodes from 3 of the 24 vaccinated macaques, whereas virus-expressing cells were readily detected in lymph nodes from each of the infected control animals (Fig. 5E). In the controls, which had undergone a profound depletion in CD4 T cells, the cytomorphology of infected lymph node cells was consistent with a macrophage phenotype (data not shown).

Temporal antibody response: ELISAs for total anti-Gag antibody used bacterial produced SIV gag p27 to coat wells (2 µg per ml in bicarbonate buffer). ELISAs for anti-Env antibody used 89.6 Env produced in transiently transfected 293T cells captured with sheep antibody against Env (catalog number 6205; International Enzymes, Fairbrook CA). Standard curves for Gag and Env ELISAs were produced using serum from a SHIV-89.6-infected macaque with known

WO 01/92470

PCT/US01/06795

amounts of anti-Gag or anti-Env IgG. Bound antibody was detected using goat anti-macaque IgG-PO (catalog # YNGMOIGGFCP, Accurate Chemical, Westbury, NY) and TMB substrate (Catalog # T3405, Sigma, St. Louis, MO). Sera were assayed at 3-fold dilutions in duplicate wells. Dilutions of test sera
5 were performed in whey buffer (4% whey and 0.1% tween 20 in 1X PBS). Blocking buffer consisted of whey buffer plus 0.5% non-fat dry milk. Reactions were stopped with 2M H₂SO₄ and the optical density read at 450 nm. Standard curves were fitted and sample concentrations were interpolated as µg of antibody per ml of serum using SOFTmax 2.3 software (Molecular Devices, Sunnyvale,
10 CA).

Results showed that the prime/boost strategy raised low levels of anti-Gag antibody and undetectable levels of anti-Env antibody (Fig. 22). However, post-challenge, antibodies to both Env and Gag underwent anamnestic responses with total Gag antibody reaching heights approaching one mg per ml and total Env
15 antibody reaching heights of up to 100 µg per ml (Figs. 22A and B).

By two weeks post-challenge, neutralizing antibodies for the 89.6 immunogen, but not the SHIV-89.6P challenge were present in the high-dose DNA-primed groups (geometric mean titers of 352 in the i.d. and 303 in the i.m. groups) (Fig. 22C). By 5 weeks post-challenge, neutralizing antibody to 89.6P
20 had been generated (geometric mean titers of 200 in the high-dose i.d. and 126 in the high-dose i.m. group) (Fig. 22D) and neutralizing antibody to 89.6 had started to decline. Thus, priming of an antibody response to 89.6 did not prevent a B cell response leading to neutralizing antibody for SHIV-89.6P. By 16 to 20 weeks post-challenge, antibodies to Gag and Env had fallen in most animals (Figs. 22A
25 and B). This would be consistent with the control of the virus infection.

T cells correlate with protection. The levels of plasma viral RNA at both

WO 01/92470

PCT/US01/06795

two and three weeks post-challenge correlated inversely with the peak pre-challenge frequencies of DNA/MVA-raised IFN- γ ELISPOTs ($r=-0.53$, $P=0.008$ and $r=-0.70$, $P=0.0002$ respectively) (Fig. 23A).

Importantly, these correlations were observed during the time the immune response was actively reducing the levels of viremia. At later times post-challenge, the clustering of viral loads at or below the level of detection precluded correlations. Correlations also were sought between viral load and post-challenge ELISPOT, proliferative, and neutralizing antibody responses. The levels of IFN- γ ELISPOTS at two weeks post-challenge correlated with the viral load at 3 weeks post-challenge ($r=-0.51$, $P=0.009$) (data not shown). Post-challenge proliferative and neutralizing antibody responses did not correlate with viral loads.

Dose and route: The dose of DNA had significant effects on both cellular and humoral responses ($P<0.05$) while the route of DNA administration had a significant effect only on humoral responses (Figs. 23 C-E). The intradermal route of DNA delivery was about 10 times more effective than the intramuscular route for generating antibody to Gag ($P=0.02$) (Fig. 23E). Within our data set, i.d. DNA injections were about 3 times more effective at priming the height and breadth of virus-specific T cells (Figs. 23C and D). However, these differences were not significant (height, $P=0.2$; breadth, $P=0.08$). Interestingly, the route and dose of DNA had no significant effect on the level of protection. At 20 weeks post-challenge, the high-dose DNA-primed animals had slightly lower geometric mean levels of viral RNA (7×10^2 and 5×10^3) than the low-dose DNA-primed animals (9×10^2 and 1×10^3). The animal with the highest intermittent viral loads (macaque 22) was in the low dose i.m.-primed group (Fig. 19D). Thus, the low dose i.m.-primed group, which was slow to control viremia (Fig. 19A), may have poorer long term protection. The breadth of the response did not have an

WO 01/92470

PCT/US01/06795

immediate effect on the containment of viral loads, but with time may affect the frequency of viral escape.

These results clearly demonstrate that a multiprotein DNA/MVA vaccine can raise a memory immune response capable of controlling a highly virulent mucosal immunodeficiency virus challenge. Our excellent levels of viral control are more favorable than have been achieved using only DNA or rMVA vaccines (Egan et al., 2000; I. Ourmanov et al., 2000) and comparable to those obtained for DNA immunizations adjuvanted with interleukin-2 (Barouch et al., 2000). All of these previous studies have used more than three vaccine inoculations, none have used mucosal challenges, and most have challenged at peak effector responses and not allowed a prolonged post vaccination period to test for "long term" efficacy as was done in our study. Our results also demonstrate for the first time that vaccine-raised T cells, as measured by IFN- γ ELISPOTs, are a correlate for the control of viremia. This relatively simple assay can now be used for preclinical evaluation of DNA and MVA immunogens for HIV-1, and should be able to be used as a marker for the efficacy of clinical trials in humans.

The DNA/MVA vaccine did not prevent infection. Rather, the vaccine controlled the infection, rapidly reducing viral loads to near or below 1000 copies of viral RNA per ml of blood. Containment, rather than prevention of infection, affords the virus the opportunity to establish a chronic infection (Chun et al., 1998). Nevertheless, by rapidly reducing viral loads, a multiprotein DNA/MVA vaccine will extend the prospect for long-term non-progression and limit HIV transmission.

Example 16: Gag-Pol Vaccine Trial

A trial using Gag-Pol rather than Gag-Pol-Env expressing immunogens

WO 01/92470

PCT/US01/06795

was conducted to determine the importance of including Env in the vaccine (see Fig 27 for constructs). A vaccine that did not include Env would have certain advantages in the field, such as the ability to screen for anti-Env antibody as a marker for infection. This trial used pGA1/Gag-Pol and a rMVA expressing the
5 Gag-Pol sequences of SIV239 (MVA/Gag-Pol) supplied by Dr. Bernard Moss (NIH-NIAID)

The "Gag-Pol" immunogens were administered using the schedule described in Example

13 above for the "Gag-Pol-Env" (pGA2/89.6 MVA/89.6) immunogens (see Table
10 4, Groups 5 and 6). The same doses of DNA, 2.5 mg and 250 µg, were used to prime a high dose and a low dose group and administration was via an intradermal route. As in the previous vaccine trial described in examples 13 – 15, two to three
manu A*01 macaques were included in each trial group. T cell responses were followed for those specific for the p11c-m epitope using the p11c-m tetramers and
15 using ELISPOTs stimulated by pools of overlapping peptides, as described in the above Examples.

Following immunization, vaccine recipients showed anti-Gag T cell responses similar to those observed in the Gag-Pol-Env vaccine trial. Animals were challenged intrarectally with SHIV-89.6P at 7.5 months following the
20 rMVA booster (Fig. 28). In contrast to the Gag-Pol-Env vaccine protocol, which protected animals against the rapid loss of CD4 cells, the Gag-Pol animals uniformly lost CD4 cells (Figs 28B and 28D). This loss was most pronounced in the group receiving the low dose i.d. DNA prime. Consistent with the loss of CD4

WO 01/92470

PCT/US01/06795

cells, the Gag-Pol DNA-immunized groups were also less effective at reducing their viral loads than the Gag-Pol-Env groups (Figs.28A and 28C). Geometric mean viral loads for these groups were 10-100-fold higher at 3 weeks post challenge and 10 fold higher at 5 weeks post challenge. These results demonstrate
5 that the Env gene plays an important role in protecting CD4 cells and reducing the levels of viral RNA in challenged animals. The results also show that Gag-Pol-Env DNA/MVA vaccines function more effectively than Gag-Pol DNA/MVA vaccines in protecting recipients against a virulent challenge.

10 **Example 17: Measles inserts**

A DNA vaccine expressing a fusion of measles H and the C3d component of complement was used to determine if vaccination could achieve earlier and more efficient anti-H antibody responses. In prior studies in mice by Dempsey *et al.*, the fusion of two or three copies of C3d to a model antigen, hen egg lysozyme
15 increased the efficiency of immunizations by more than 1000-fold (Dempsey et al, 1996). This resulted in more rapid appearance of hemagglutination inhibition (HI) activity and protective immunity (Ross et al, 2000 and Ross et al., 2001).

In the human immune system, one consequence of complement activation is the covalent attachment of the C3d fragment of the third complement protein to
20 the activating protein. C3d in turn binds to CD21 on B lymphocytes, a molecule with B cell stimulatory functions that amplify B lymphocyte activation. In a measles H-C3d fusion protein, the H moiety of the fusion would bind to anti-H Ig receptors on B cells and signal through the B cell receptor, while the C3d moiety

WO 01/92470

PCT/US01/06795

of the fusion would bind to CD21 and signal through CD19. In this hypothesis, a B cell responding to an H-C3d fusion protein would undergo more effective signaling than a B cell responding to H alone. Mice vaccinated with DNA expressing a secreted H-fused to three copies of C3d (sH-3C3d) generated a more
5 rapid appearance and higher levels of neutralizing antibody activity than DNA expressing sH only.

Plasmid DNA: pTR600, a eukaryotic expression vector, was constructed to contain two copies of the cytomegalovirus immediate-early promoter (CMV-IE) plus intron A (IA) for initiating transcription of eukaryotic inserts and the
10 bovine growth hormone polyadenylation signal (BGH poly A) for termination of transcription. The vector contains a multi-cloning site for the easy insertion of gene segments and the Col E1 origin of replication for prokaryotic replication and the Kanamycin resistance gene (*Kan^r*) for selection in antibiotic media (Fig. 29A).

Hemagglutinin (H) cDNA sequences from the Edmonton strain and C3d
15 sequences were cloned as previously described and transferred into the pTR600 vaccine vector using unique restriction endonuclease sites (Fig. 29B). The secreted version was generated by deleting the transmembrane and cytoplasmic domains of H. This was accomplished using PCR to clone a fragment of the H gene in frame with an N-terminal synthetic mimic of the tissue plasminogen
20 activator (tpA) leader sequence (Torres, et al, 2000).

The vectors expressing sH-C3d fusion proteins were generated by cloning three tandem repeats of the mouse homologue of C3d in frame at the 3' end of the sH gene as previously described (Dempsey, 1996; Ross et al, 2000; and Ross et

WO 01/92470

PCT/US01/06795

al, 2001). The construct design was based upon Dempsey *et al.* and used sequences from pSLG-C3d. Linkers composed of two repeats of 4 glycines and a serine {(G₄S)₂} were fused at the junctures of H and C3d and between each C3d repeat. Potential proteolytic cleavage sites between the junctions of C3d and the
5 junction of sH and C3d were mutated by using *Bam HI* and *Bgl II* fusion to mutate an Arg codon to a Gly codon.

The plasmids were amplified in *Escherichia coli* strain, DH5 α , purified using anion-exchange resin columns (Qiagen, Valencia, CA) and stored at -20°C in dH₂O. Plasmids were verified by appropriate restriction enzyme digestion and
10 gel electrophoresis. Purity of DNA preparations was determined by optical density reading at 260nm and 280nm.

Mice and DNA immunizations: Six to 8 week old BALB/c mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) were used for inoculations. Briefly, mice were anesthetized with 0.03-0.04 ml of a mixture of 5ml ketamine HCl
15 (100mg/ml) and 1ml xylazine (20mg/ml). Mice were immunized with two gene gun doses containing 0.5 μ g of DNA per 0.5mg of approximately 1- μ m gold beads (DeGussa-Huls Corp., Ridgefield Park, NJ) at a helium pressure setting of 400 psi.

Transfections and expression analysis: The human embryonic kidney cell
20 line 293T (5 X 10⁵ cells/transfection) was transfected with 2 μ g of DNA using 12% lipofectamine according to the manufacture's guidelines (Life Technologies, Grand Island, NY). Supernatants were collected and stored at -20°C. Quantitative antigen capture ELISAs for H were conducted as previously

WO 01/92470

PCT/US01/06795

described (Cardoso et al, 1998).

For western hybridization analysis, 15 µl of supernatant or cell lysate was diluted 1:2 in SDS sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA) and loaded onto a 10% polyacrylamide/SDS gel. The resolved proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA) and incubated with a 1:1000 dilution of polyclonal rabbit anti-HA antisera in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% nonfat dry milk. After extensive washing, bound rabbit antibodies were detected using a 1:2000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antiserum and enhanced chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Antibody assays: A quantitative ELISA was performed to assess anti-H specific IgG levels. Briefly, Ltk⁻ cells constitutively expressing the H protein of MV (24) were grown in 96-well plates. Antisera dilutions were incubated with the intact cells expressing H antigen. The anti-H antibodies were allowed to bind to the cells for 30 min following which the cells were fixed in acetone (80%). The specific antibody responses were detected with biotinylated anti-mouse IgG antibodies and the streptavidine-phosphatase alkaline system (Sigma). Antibody binding to Ltk⁻ cells not expressing H antigen was used to standardize the system. The results were expressed as the endpoint dilution titer.

Neutralization assays. Neutralization assays were conducted on Vero cells grown in six well plates (25). Briefly, 100-200 p.f.u. of the Edmonton strain of measles virus were mixed with serial dilution of sera, incubated for 1 h at 37°C and then inoculated onto plates. Plates were incubated at 37°C for 48 h and

WO 01/92470

PCT/US01/06795

containing either the sH or sH-3C3d compared to transmembrane-associated forms of the antigen. Human 293T cells were transiently transfected with 2 µg of plasmid and both supernatants and cell lysates were assayed for H using an antigen capture ELISA. Approximately 75% of the H protein was secreted into the supernatant for both sH-DNA and sH-3C3d-DNA transfected cells. As expected, ~99% of the H antigen was detected in the cell lysate of cells transfected with plasmids expressing transmembrane form of H.

Antibody Response to Measles H DNA Immunizations: The sH-3C3d expressing DNA plasmids raised higher titers of ELISA antibody than sH DNA. BALB/c mice were vaccinated by DNA coated gold particles via gene gun with either a 0.1 µg or a 1 µg inoculum. At 4 and 26 weeks post vaccination, mice were boosted with the same dose of DNA given in the first immunization. The temporal pattern for the appearance of anti-H antibody showed a faster onset in mice vaccinated with the C3d fusion expressing DNA compared to mice vaccinated with sH DNA. Good titers of antibody were raised by the first immunization. These were boosted by the 2nd and 3rd immunizations. Following the third immunization, titers were 5-6 times higher in the sH-3C3D vaccinated mice than in those vaccinated with sH DNA.

Neutralization assays: Examination of the serum for MV neutralization showed titers up to 1700 after the second inoculation of 0.1 µg of sH-3C3d expressing DNA. Neutralizing antibody studies performed on Vero cells detected higher titers of neutralizing activity against the prototype MV Edmonton strain in mouse sera elicited by the sH-3C3d constructs than in the sera of mice vaccinated with

WO 01/92470

PCT/US01/06795

plaques were counted. Neutralization titers are defined as the reciprocal dilution of sera required to reduce plaque formation by 50% or 90%. Preimmune sera served as negative controls.

Results: Two hemagglutinin-expressing vaccine plasmids were constructed in the pTR600 vector to express either a secreted form of H (sH) from the Edmonston strain or a C3d-fusion of the secreted form of H (sH-3C3d) (Fig. 29). The sH represented the entire ectodomain of H, but excluded the transmembrane and cytoplasmic region. The cloning placed the N-terminal synthetic mimic of the tissue plasminogen activator (tPA) leader sequence in frame with the H sequence. The tPA leader and H sequences were fused immediately 3' to the transmembrane domain of H. The sH-3C3d fusion protein was generated by cloning three tandem repeats of the mouse homologue of C3d in frame with the secreted H gene (Fig. 29B). The proteolytic cleavage sites, found at the junction between each C3d molecule as well as the junction between the H protein and the first C3d coding region, were destroyed by mutagenesis.

Western blot analyses revealed sH and sH-3C3d proteins of the expected sizes. Using a rabbit polyclonal antibody to MV H antisera, western blot analysis showed a broad band of ~70kD corresponding to the secreted form of H in the supernatant of transfected cells. A higher molecular weight band at ~190 kD is consistent with the projected size of the sH-3C3d fusion protein (Fig. 30). No evidence for the proteolytic cleavage of the sH-3C3d fusion protein was seen by western analysis.

Measles virus H was expressed at slightly lower levels by plasmids

WO 01/92470

PCT/US01/06795

sH expressing DNA. Mice vaccinated with sH-3C3d expressing plasmids had a sharp rise in neutralizing antibody levels that reached a plateau by week 14. In contrast, it took a third vaccination with sH expressing DNA to elicit detectable levels of neutralizing antibodies. After 28 weeks post-vaccination, sera from
5 mice vaccinated with sH-3C3d-DNA had neutralizing titers (>250) that could reduce plaque formation of MV infection by 90%.

The increase in height of the antibody response to H was 7-15 fold higher in mice vaccinated with the C3d protein expressing constructs compared to mice vaccinated with DNA expressing sH only. The increase in antibody response
10 with DNA expressing sH-3C3d is even more intriguing, since this plasmid expressed ~60% as much protein as plasmid expressing sH only.

In addition to the increase in the overall antibody level, there was a faster onset of antibodies that could specifically neutralize MV in an *in vitro* infection assay. After the second immunization, detectable levels of neutralizing antibodies
15 were observed in mice vaccinated with DNA expressing sH-3C3d. The titer of the neutralizing antibody peaked at week 14 (1700 for 50% plaque reduction), which are substantially above the minimum correlate for protection (>120 for 50% plaque reduction). In contrast, mice vaccinated with sH expressing DNA had low levels of neutralizing antibody even after the third vaccination (180 for
20 50% plaque reduction) (Fig. 31).

Example 18: Influenza inserts with and without -C3d

Plasmid vector construction and purification procedures have been

WO 01/92470

PCT/US01/06795

previously described for JW4303 (Torres, et al. 1999; Pertmer et al. 1995; Feltquate et al. 1997). In brief, influenza hemagglutinin (HA) sequences from A/PR/8/34 (H1N1) were cloned into either the pJW4303 or pGA eukaryotic expression vector using unique restriction sites.

5 Two versions of HA, a secreted(s) and a transmembrane (tm) associated, have been previously described (Torres et al. 1999; Feltquate et al., 1997). Vectors expressing sHA or tmHA in pJW4303 were designated pJW/sHA and pJW/tmHA respectively and the vectors expressing sHA, tmHA, or sHA-3C3d in pGA were designated pGA/sHA, pGA/tmHA, and pGA/sHA-3C3d respectively.

10 Vectors expressing HA-C3d fusion proteins were generated by cloning three tandem repeats of the mouse homolog of C3d and placing the three tandem repeats in-frame with the secreted HA gene. The construct designed was based upon Dempsey *et al.* (1996). Linkers composed of two repeats of 4 glycines and a serine [(G₄S)₂] were fused at the joints of each C3d repeat. The
15 pGA/sHA-3C3d plasmid expressed approximately 50% of the protein expressed by the pGA/sHA vector. However, the ratio of sHA-3C3d found in the supernatant vs. the cell lysate was similar to the ratio of antigen expressed by pGA/sHA. More than 80% of the protein was secreted into the supernatant. In western analysis, a higher molecular weight band was detected at 120kDa and
20 represented the sHA-3C3d fusion protein. Therefore, the sHA-3C3d fusion protein is secreted into the supernatant as efficiently as the sHA antigen.

Mice and DNA immunizations. Six to 8 week old BALB/c mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) were used for inoculations. Mice, housed in

WO 01/92470

PCT/US01/06795

microisolator units and allowed free access to food and water, were cared for under USDA guidelines for laboratory animals. Mice were anesthetized with 0.03-0.04 ml of a mixture of 5ml ketamine HCl (100mg/ml) and 1ml xylazine (20mg/ml). Gene gun immunizations were performed on shaved abdominal skin
5 using the hand held Accell gene delivery system and immunized with two gene gun doses containing 0.5 µg of DNA per 0.5mg of approximately 1-µm gold beads (DeGussa-Huls Corp., Ridgefield Park, NJ) at a helium pressure setting of 400 psi.

Influenza virus challenge. Challenge with live, mouse-adapted, influenza virus (A/PR/8/34) was performed by intranasal instillation of 50 µl allantoic fluid,
10 diluted in PBS to contain 3 lethal doses of virus, into the nares of ketamine-anesthetized mice. This method leads to rapid lung infections and is lethal to 100% of non-immunized mice. Individual mice were challenge at either 8 or 14 weeks after vaccination and monitored for both weight loss and survival. Data
15 were plotted as the average individual weight in a group, as a percentage of pre-challenge weight, versus days after challenge.

Antibody response to the HA DNA Immunization protocol: The tmHA and sHA-3C3d expressing DNA plasmids raised higher titers of ELISA antibody than the sHA DNA. BALB/c mice were vaccinated by DNA coated gold particles via
20 gene gun with either a 0.1 µg or 1 µg dose inoculum. At 4 weeks post vaccination, half of the mice in each group were boosted with the same dose of DNA given in the first immunization. Total anti-HA IgG induced by the sHA-3C3d- and tmHA- expressing plasmids were similar in the different experimental

WO 01/92470

PCT/US01/06795

mouse groups and 3-5 times higher than the amount raised by the sHA expressing plasmids (Fig. 24). In addition, the amount of anti-HA antibody elicited increased relative to the amount of DNA used for vaccination in a dose dependent manner (Fig 24E-24F). Overall, the dose response curves and temporal pattern for the appearance of anti-HA antibody were similar in the mice vaccinated with tmHA-DNA or sHA-3C3d-DNA, but lower and slower, in the mice vaccinated with sHA-DNA. As expected, the booster immunization both accelerated and increased the titers of antibodies to HA.

Avidity of mouse HA antiserum. Sodium thiocyanate (NaSCN) displacement ELISAs demonstrated that the avidity of the HA-specific antibody generated with sHA-3C3d expressing DNA was consistently higher than antibodies from sHA-DNA or tmHA-DNA vaccinated mice (Fig. 25). The avidity of specific antibodies to HA was compared by using graded concentrations NaSCN, a chaotropic agent, to disrupt antigen-antibody interactions. The binding of antibodies with less avidity to the antigen is disrupted at lower concentrations of NaSCN than that of antibodies with greater avidity to the antigen. The effective concentration of NaSCN required to release 50% of antiserum (ED_{50}) collected at 8 weeks after vaccination from sHA-DNA or tmHA-DNA boosted mice (0.1 μ g dose or 1 μ g dose) was ~ 1.20 M (Fig. 25A). In contrast, antiserum from mice vaccinated and boosted with sHA-3C3d-DNA had an ED_{50} of ~ 1.75 M (Fig 25B). At the time of challenge (14 weeks after vaccination), the ED_{50} had increased to ~ 1.8 M for antibodies from both sHA-DNA and tmHA-DNA vaccinated mice (Fig. 25C). Antibodies from mice

WO 01/92470

PCT/US01/06795

vaccinated with sHA-3C3d-DNA had increased to an ED₅₀ of ~2.0 M (Fig 25D). These results suggest that the antibody from sHA-3C3d-DNA vaccinated mice had undergone more rapid affinity maturation than antibody from either sHA-DNA or tmHA-DNA vaccinated mice. The difference between the temporal
5 avidity maturation of antibody for sHA-3C3d and tmHA was independent of the level of the raised antibody. Both of these plasmids had similar temporal patterns for the appearance of antibody and dose response curves for the ability to raise antibody (Fig. 25).

Hemagglutinin-Inhibition (HI) titers. Hemagglutination-inhibition assays (HI)
10 were performed to evaluate the ability of the raised antibody to block binding of A/PR/8/34 (H1N1) to sialic acid. The HI titers were measured from serum samples harvested from mice at 8 and 14 weeks after vaccination. All boosted mice had measurable HI titers at week 14 regardless of the dose or vaccine given. The highest titers (up to 1:1200) were recorded for the sHA-3C3d-DNA
15 vaccinated mice. Nonboosted mice showed more variation in HI titers. Nonboosted mice vaccinated with a 0.1 µg dose of either sHA-DNA or tmHA-DNA expressing plasmids had low HI titers of 1:10. In contrast, mice vaccinated with sHA-3C3d-DNA had titers greater than 1:640. The only vaccinated mice that had a measurable HI titer (1:160) at week 8 were boosted mice vaccinated
20 with 1 µg dose sHA-3C3d-DNA. These results indicate that C3d, when fused to sHA, is able to stimulate specific B cells to increase the avidity maturation of antibody and thus the production of neutralizing antibodies to HA.

Protective efficacy to influenza challenge. Consistent with eliciting the highest

WO 01/92470

PCT/US01/06795

titers of HI antibody, the sHA-3C3d DNA raised more effective protection than the sHA or tmHA DNAs. To test the protective efficacy of the various HA-DNA vaccines, mice were challenged with a lethal dose of A/PR/8/34 influenza virus (H1N1) and monitored daily for morbidity (as measured by weight loss) and mortality. Weight loss for each animal was plotted as a percentage of the average pre-challenge weight versus days after challenge (Fig. 26). Virus-challenged naive mice and pGA vector only vaccinated mice showed rapid weight loss with all the mice losing >20% of their body weight by 8 days post-challenge (Fig. 26). In contrast, PBS mock-challenged mice showed no weight loss over the 14 days of observation. All boosted mice survived challenge, 14 weeks after vaccination, regardless of the dose of DNA plasmid administered. However, boosted mice vaccinated with a 0.1 µg dose of sHA-DNA did drop to 92% of their initial body weight at 8 days post-challenge before recovering (Fig. 26). In contrast, when 1 µg dose, boosted mice were challenged at 8 weeks after vaccination, the only mice to survive challenge were sHA-3C3d- and tmHA-DNA vaccinated mice, albeit with greater weight loss than was observed from mice challenged at 14 weeks after vaccination. The only 0.1 µg dose, boosted mice to survive challenge at 8 weeks after vaccination were the sHA-3C3d vaccinated mice (Fig. 26).

Among the nonboosted, 0.1 µg dose immunizations, only the sHA-3C3d-DNA vaccinated mice survived challenge at 14 weeks after vaccination (Fig. 26). All mice administered a single DNA vaccination lost weight. However, of these, the sHA-3C3d-DNA vaccinated mice lost the least weight and these mice were

WO 01/92470

PCT/US01/06795

the only mice to survive the lethal challenge (Fig. 26). These results demonstrate that 3C3d protein, when fused to HA, increased the efficiency of a DNA vaccine, allowing for the reduction in dose of DNA and the number of vaccinations needed to afford protection to a lethal influenza virus challenge.

5

10

Example 19: HIV gp120 -C3d Fusion Constructs

In this study, a similar approach to that described in Example 18 was used to fuse three copies of murine C3d to the carboxyl terminus of HIV Env gp120 subunit. Using DNA vaccination, BALB/c mice were inoculated and assayed for enhanced immune responses. The fusion constructs induced higher antibody responses to Env and a faster onset of avidity maturation than did the respective wild-type gp120 sequences. These results suggest that the efficacy of DNA vaccines for raising antibody can be significantly improved by fusing proteins with C3d.

20 *Plasmid DNA:* pGA was constructed as described in Example 1 above to contain the cytomegalovirus immediate-early promoter (CMV-IE) plus intron A (IA) for initiating transcription of eukaryotic inserts and the bovine growth hormone polyadenylation signal (BGH poly A) for termination of transcription.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- HIV envelope sequences from the isolates ADA, IIB, and 89.6, encoding almost the entire gp120 region, and C3d sequences were cloned into the pGA vaccine vector using unique restriction endonuclease sites. The gp120 segment encoded a region from amino acid 32 to 465 and ended with the amino acid sequence
- 5 VAPTRA. The first 32 amino acids were deleted from the N-terminus of each sgp120 and replaced with a leader sequenced from the tissue plasminogen activator (tpA). The vectors expressing sgp120-C3d fusion proteins were generated by cloning three tandem repeats of the mouse homologue of C3d in frame with the sgp120 expressing DNA. The construct design was based upon
- 10 Dempsey *et al* (1996). Linkers composed of two repeats of 4 glycines and a serine {(G₄S)₂} were fused at the junctures of HA and C3d and between each C3d repeat. Potential proteolytic cleavage sites between the junctions of C3d and the junction of 3C3d were mutated by ligating *Bam* *HI* and *Bgl* *II* restriction endonuclease sites to mutate an Arg codon to a Gly codon.
- 15 The plasmids were amplified in *Escherichia coli* strain-DH5 α , purified using anion-exchange resin columns (Qiagen, Valencia, CA) and stored at -20°C in dH₂O. Plasmids were verified by appropriate restriction enzyme digestion and gel electrophoresis. Purity of DNA preparations was determined by optical density reading at 260nm and 280nm.
- 20 *Mice and DNA immunizations:* Six to 8 week old BALB/c mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) were vaccinated as described in Example 17 above. Briefly, mice were immunized with two gene gun doses containing 0.5 μ g of DNA per 0.5mg of approximately 1- μ m gold beads (DeGussa-Huls Corp.,

WO 01/92470

PCT/US01/06795

Ridgefield Park, NJ) at a helium pressure setting of 400 psi.

Transfections and expression analysis and western hybridization experiments were conducted as described in Example 17, except that the nitrocellulose membranes were incubated with a 1:1000 dilution of polyclonal
5 human HIV-infected patient antisera in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% nonfat dry milk. After extensive washing, bound human antibodies were detected using a 1:2000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human antiserum and enhanced chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, UK).

WO 01/92470

PCT/US01/06795

ELISA and avidity assays: An endpoint ELISA was performed to assess the titers of anti-Env IgG in immune serum using purified HIV-1-IIIB gp120 CHO-expressed protein (Intracell) to coat plates as described (Richmond et al., 1998). Alternatively, plates were coated with sheep anti-Env antibody (International Enzymes Inc., Fallbrook, CA) and used to capture sgp120 produced in 293T cells that were transiently transfected with sgp120 expression vectors. Mouse sera from vaccinated mice was allowed to bind and subsequently detected by anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase. Endpoint titers were considered positive that were two fold higher than background. Avidity ELISAs were performed similarly to serum antibody determination ELISAs up to the addition of samples and standards. Samples were diluted to give similar concentrations of specific IgG by O.D. Plates were washed three times with 0.05% PBS-Tween 20. Different concentrations of the chaotropic agent, sodium thiocyanate (NaSCN) in PBS, were then added (0M, 1 M, 1.5 M, 2 M, 2.5 M, and 3 M NaSCN). Plates were allowed to stand at room temperature for 15 minutes and then washed six times with PBS-Tween 20. Subsequent steps were performed similarly to the serum antibody determination ELISA and percent of initial IgG calculated as a percent of the initial O.D. All assays were done in triplicate.

Neutralizing antibody assays: Antibody-mediated neutralization of HIV-1 IIIB and 89.6 was measured in an MT-2 cell-killing assay as described previously (Montefiori et al., 1988). Briefly, cell-free virus (50 μ l containing 10^8 TCID₅₀ of virus) was added to multiple dilutions of serum samples in 100 μ l of growth medium in triplicate wells of 96-well microtiter plates coated with poly-L-lysine

WO 01/92470

PCT/US01/06795

and incubated at 37°C for 1 h before MT-2 cells were added (10^5 cells in 100 μ l added per well). Cell densities were reduced and the medium was replaced after 3 days of incubation when necessary. Neutralization was measured by staining viable cells with Finter's neutral red when cytopathic effects in control wells were

5 >70% but less than 100%. Percentage protection was determined by calculating the difference in absorption (A_{540}) between test wells (cells + virus) and dividing this result by the difference in absorption between cell control wells (cells only) and virus control wells (virus only). Neutralizing titers are expressed as the reciprocal of the plasma dilution required to protect at least 50% of cells from

10 virus-induced killing.

Results: Env was expressed at overall similar levels by plasmids containing either the secreted form of the antigen, but at a two-four-fold lower level by the sgp120-C3d expressing plasmids. Human 293T cells were transiently transfected with 2 μ g of plasmid and both supernatants and cell lysates were

15 assayed for gp120 using an antigen capture ELISA. The sgp120 constructs expressed from 450 to 800 ng per ml, whereas the 3C3d fusions expressed from 140 to 250 ng per ml. Approximately 90% of the Env protein was present in the supernatant for both sgp120 and sgp120-3C3d-DNA transfected cells (data not shown). The approximately 2-fold differences in the levels of expression of the

20 different sgp120s is likely a reflection in differences in the Env genes as well as differences in the efficiency that the capture and detection antibodies recognized the different Envs.

Western blot analyses revealed sgp120 and sgp120-3C3d proteins of the

WO 01/92470

PCT/US01/06795

expected sizes. Using human patient polyclonal antisera, western blot analysis showed the expected broad band of 115-120 kD corresponding to gp120. A higher molecular weight band at ~240 kD was consistent with the projected size of the sgp120-3C3d fusion protein. Consistent with the antigen-capture assay, intense
5 protein bands were present in the supernatants of cells transfected with sgp120-DNA, whereas less intense bands were present in the supernatants of cells transfected with sgp120-3C3d-DNA (data not shown). No evidence for the proteolytic cleavage of the sgp120-C3d fusion protein was seen by western analysis.

10 *Antibody response to Env gp120 DNA immunizations:* The sgp120-3C3d expressing DNA plasmids raised higher titers of ELISA antibody than the sgp120 DNA. BALB/c mice were vaccinated by DNA coated gold particles via gene gun with a 1µg dose inoculum. Mice were vaccinated at day 1 and then boosted at 4, 14, and 26 weeks with the same DNA given in the first immunization. When sera
15 were assayed on gp120-IIIB -coated plates, mice vaccinated with the DNAs expressing the C3d fusion proteins had anti-Env antibodies 3-7 times higher than the amount of antibody raised by the counterpart sgp120 expressing plasmids. Among the C3d constructs, mice vaccinated with sgp120-(IIIB)-3C3d had the highest levels of antibody and mice vaccinated with sgp120-(ADA)-3C3d
20 expressing DNA had the lowest levels of anti-Env antibodies. The temporal pattern for the appearance of anti-Env antibody revealed titers being boosted at each of the inoculations for all constructs tested.

Differences in the levels of the antibody raised by the different Envs

WO 01/92470

PCT/US01/06795

appeared to be determined by the specificity of the raised antibody. Using an alternative ELISA protocol, in which antibody was captured on the homologous Env, all of the C3d-fusions appeared to raise similar levels of antibody. In this assay, sheep anti-Env antibody was used to capture transiently produced sgp120 proteins. This assay revealed low, but similar levels of antibody raised by each of the sgp120-3C3d constructs. The lower levels of antibody detected in this assay are likely to reflect the levels of transfection-produced Env used to capture antibody being lower than in the assays using commercially produced IIB gp120 to coat plates. As expected using either ELISA method, booster immunizations were necessary to achieve even the most modest antibody response.

Avidity of mouse Env antiserum: Sodium thiocyanate (NaSCN) displacement ELISAs demonstrated that the avidity of the antibody generated with sgp120-3C3d expressing DNA was consistently higher than that from sgp120-DNA vaccinated mice. Avidity assays were conducted on sera raised by sgp120-(IIB) and sgp120-(IIB)-3C3d because of the type specificity of the raised antisera and the commercial availability of the IIB protein (but not the other proteins) for use as capture antigen. The avidity of specific antibodies to Env was compared by using graded concentrations NaSCN, a chaotropic agent, to disrupt antigen-antibody interaction. Results indicated that the antibody from sgp120-3C3d-DNA vaccinated mice underwent more rapid affinity maturation than antibody from sgp120-DNA vaccinated mice.

Env-3C3d expressing plasmids elicit modest neutralizing antibody: Neutralizing antibody studies performed on MT-2 cells detected higher titers of

WO 01/92470

PCT/US01/06795

neutralizing activity in the sera generated by the gp120-3C3d constructs than in the sera generated by the sgp120 constructs. Sera were tested against two syncytium inducing, HIB (X4) and 89.6 (X4R5) viruses. Mice vaccinated with sgp120-3C3d expressing plasmids had very modest levels of neutralizing
5 antibody to the homologous strain of HIV tested by the protection of MT-2 cells from virus-induced killing as measured by neutral red uptake. Titers of neutralizing antibody raised by the gp120-expressing DNAs were at the background of the assay.

The results of this study showed that fusions of HIV-1 Env to three copies
10 of murine C3d enhanced the antibody response to Env in vaccinated mice. Mice vaccinated with any of the three DNA plasmids expressing sgp120 sequence had low or undetectable levels of antibody after 4 vaccinations (28 weeks post-prime). In contrast, mice vaccinated with DNA expressing the fusion of sgp120 and 3C3d proteins elicited a faster onset of antibody (3 vaccinations), as well as higher
15 levels of antibodies.

In contrast to the enhancement of antibody titers and avidity maturation of antibodies to Env, the amount of neutralizing-antibody elicited in the vaccinated mice was low. Mice vaccinated with plasmids expressing sgp120 had low levels of neutralizing antibody that were only modestly increased in mice vaccinated
20 with sp120-3C3d expressing plasmids. However, the levels of neutralizing antibodies did apparently increase after the fourth immunization. The poor titers of neutralizing antibody could have reflected an inherent poor ability of the sgp120-3C3d fusion protein to raise neutralizing antibody because of the failure

WO 01/92470

PCT/US01/06795

to adequately expose neutralizing epitopes to responding B cells. The intrinsic high backgrounds for HIV-1 neutralization assays in mouse sera also may have contributed to the poor neutralization titers.

The results demonstrate the effectiveness of C3d-fusions as a molecular adjuvant
5 in enhancing antibody production and enhancing antibody maturation. In addition, the neutralizing antibody response to Env was modestly increased in mice vaccinated with C3d-fusion vaccines. Similar to results seen in Examples 17 and 18, using secreted versions of HA from measles and influenza viruses, C3d-enhanced antibody responses were achieved with plasmids expressing only
10 half as much protein as plasmids expressing non-fused sgp120.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

REFERENCES

- Amara, R., et al. (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA Vaccine. Submitted.
- Andre, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W., Bultmann, A., and Haas, J. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol* 72(2), 1497-503.
- Asakura, Y., Hinkula, J., Leandersson, A. C., Fukushima, J., Okuda, K., and Wahren, B. (1997). Induction of HIV-1 specific mucosal immune responses by DNA vaccination. *Scand J Immunol* 46(4), 326-30.
- 10 Bachmann MF, Zinkernagel RM. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu Rev Immunol* 1997;15:235-70.
- Barouch. D. H. et al., 2000. *Science* 290: 486-92.
- Barry, M. A., Lai, W. C., and Johnston, S. A. (1995). Protection against mycoplasma infection using expression library immunization. *Nature* 377(6550), 15 632-5.
- Berger EA (1997). HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 11 Suppl A:S3-16
- Bohm, W., Kuhrober, A., Paier, T., Mertens, T., Reimann, J., and Schirmbeck, R. (1996). DNA vector constructs that prime hepatitis B surface 20 antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after

WO 01/92470

PCT/US01/06795

intramuscular injection. *J Immunol Methods* 193(1), 29-40.

Bohm, W., Mertens, T., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (1998). Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine* 16(9-10), 949-54.

5 Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2(2):95-113

Boyer, J. D., Ugen, K. E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W. V.,
10 Refaeli, Y., Ciccarelli, R. B., McCallus, D., Coney, L., and Weiner, D. B. (1997). Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* 3(5), 526-32.

Boyle, J. S., Koniaras, C., and Lew, A. M. (1997). Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T
15 lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol* 9(12), 1897-906.

Burton, D. R., and Montefiori, D. C. (1997). The antibody response in HIV-1 infection [see comments]. *Aids* 11(Suppl A), S87-98.

Calarota, S., Bratt, G., Nordlund, S., Hinkula, J., Leandersson, A. C.,
20 Sandstrom, E., and Wahren, B. (1998). Cellular cytotoxic response induced by

WO 01/92470

PCT/US01/06795

DNA vaccination in HIV- 1 -infected patients. *Lancet* 351(9112), 1320-5.

Cardoso, A.I, Blixenkrone-Moller, M., Fayolle, J., Liu, M., Buckland, R.,
and Wild, F.T. Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus
hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity.

5 1998. *Virology*. 225:293-299.

Chapman BS, Thayer RM, Vincent KA, Haigwood NL. Effect of intron A
from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous
expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 1991;19(14):3979-86.

10 Chen, S. C., Jones, D. H., Fynan, E. F., Farrar, G. H., Clegg, J. C.,
Greenberg, H. B., and Hermann, J. E. (1998a). Protective immunity induced by
oral immunization with a rotavirus; DNA vaccine encapsulated in microparticles.
J Virol 72(7), 5757-61.

Chun. T.W. et al., 1998. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8869-73.

15

Collman R, Balliet JW, Gregory SA, Friedman H, Kolson DL, Nathanson
N, et al. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and
highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*
1992;66(12):7517-21.

20 Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD, Jr. DNA-

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2(10):1122-8.
- Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 1996;184(4):1555-60.
- 5 Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271:348-50.
- Egan, M.A. *et al.*, (2000) *J Virol* 74: 7485-95.
- 10 Evans DT, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Sidney J, da Silva J, et al. Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef. *Nat Med* 1999;5(11):1270-6.
- Feltquate, D. M., Heaney, S., Webster, R. G., and Robinson, H. L. (1997). Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene 15 gun DNA immunization. *Journal of Immunology* 158(5), 2278-84.
- Fomsgaard, A., Nielsen, H. V., Bryder, K., Nielsen, C., Machuca, K, Bruun, L., Hansen, J., and Buus, S. (1998). Improved humoral and cellular immune responses against the gp120 V3 loop of HIV- 1 following genetic immunization with a chimeric DNA vaccine encoding the V3 inserted into the 20 hepatitis B surface antigen. *Scand J Immunol* 47(4), 289-95.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, et al.
Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for
professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from
myocytes. *Mol Med* 1997;3(6):362-71.
- 5 Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C.,
and Robinson, H. L. (1993). DNA vaccines: protective immunizations by
parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA*
90(24),11478-82.
- Gronkowski, S. H., Nabel, G. J., and et al. (1995). Cancer gene therapy
10 using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice
[see comments]. *Hum Gene Ther* 6(5), 553-64.
- Hakim, I., Levy, S., and Levy, R. (1996). A nine-amino acid peptide from
IL-1 beta augments antitumor immune responses induced by protein and DNA
vaccines. *J Immunol* 157(12), 5503-11.
- 15 Hanke T, Samuel RV, Blanchard TJ, Neumann VC, Allen TM, Boyson
JE, Sharpe SA, Cook N, Smith GL, Watkins DI, Cranage MP, McMichael (1999).
Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T
lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified
vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *J Virol* 73(9):7524-32
- 20 Hanke, T., Blanchard, T. J., Schneider, J., Hannan, C. M., Becker, M.,

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- Gilbert S. C., Hill, A. V., Smith, G. L., and McMichael, A. (1998a). Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 16(5), 43 9-45.
- Hanke, T., Schneider, J., Gilbert S. C., Hill, A. V., and McMichael, A. (1998b). DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice. *Vaccine* 16(4), 426-3 5.
- Hartikka, J., Sawdey, M., Comefert-Jensen, F., Margalith, M., Barnhart, K., Nolasco, M., Vahlsing, H. L., Meek, J., Marquet, M., Hobart, P., Norman, J., and Manthorpe, M. (1996). An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 7(10), 1205-17.
- Inchauspe, G., Vitvitski, L., Major, M. E., Jung, G., Spengler, U., Maisonnas, M., and Trepo, C. (1997). Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol* 16(2), 185-95.
- Iwasaki A, Torres CA, Ohashi PS, Robinson HL, Barber BH. (1997b) The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J Immunol* 159(1):11-4.
- Iwasaki, A., Stiernholm, B. J., Chan, A. K., Berinstein, N. L., and Barber, B. H. (1997a). Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens

WO 01/92470

PCT/US01/06795

encoding costimulatory molecules and cytokines. *J Immunol* 158(10),4591-601.

Jones, D. H., Corris, S., McDonald, S., Clegg, J. C., and Farrar, G. H.
(1997). Poly(DL-lactide-co-glycolide)encapsulated plasmid DNA elicits systemic
and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration.
5 *Vaccine* 15(8), 814-7.

Kawabata, K., Takakura, Y., and Hashida, M. (1995). The fate of plasmid
DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in
its hepatic uptake. *Pharm Res* 12(6), 825-30.

Kent S. J., Zhao, A., Best, S. J., Chandler, J. D., Boyle, D. B., and
10 Ramshaw, I. A. (1998). Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy
of a human immunodeficiency virus type I vaccine regimen consisting of
consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J*
Viro 72(12), 10180-8.

Kuroda MJ, Schmitz JE, Barouch DH, Craiu A, Allen TM, Sette A, et al.
15 Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency
virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major
histocompatibility complex class I-peptide complex. *Journal of Experimental*
Medicine 1998;187(9):1373-81.

Letvin, N. L., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Perry, H. C., Davies, M.
20 E., Lokutis, C., Alroy, M., Freed, D. C., Lord, C. I., Handt, L. K., Liu, M. A., and

WO 01/92470

PCT/US01/06795

Shiver, J. W. (1997). Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(17), 9378-83.

Lew, D., Parker, S. E., Latimer, T., Abai, A. M., Kuwahara-Rundell, A.,
5 Doh, S. G., Yang, Z. Y., Laface, D., Gromkowski, S.H., and Nabel, G.J., et al.
(1995). Cancer gene therapy using plasmid DNA: Pharmacokinetic study of DNA following injection in mice [see comments]. *Hum. Gene Ther.* 6:553.

Li J, Lord CI, Haseltine W, Letvin NL, Sodroski J. Infection of
cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the
10 HIV-1 envelope glycoproteins. *Journal of Acquired Immune Deficiency
Syndromes* 1992;5(7):639-46.

Livingston, J. B., Lu, S., Robinson, H. L., and Anderson, D. J. (1995). The
induction of mucosal immunity in the female genital tract using gene-gun
technology. Part 1: Antigen expression. *Annals of the New York Academy of
15 Sciences* 772,265-7.

Lu, S., Manson, K., Wyand, M., and Robinson, H. L. (1997). SIV DNA
vaccine trial in macaques: post-challenge necropsy in vaccine and control groups.
Vaccine 15(g), 920-3.

MacGregor, R. R., Gluckman, S., Lacy, K., Kaniefski, B., Boyer, J.,
20 Wang, B., Bagarazzi, M., William, W. V., Francher, D., Ginsberg, R., Higgins,

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- T., and Weiner, D. (1996). First human trial of a facilitated DNA plasmid vaccine for HIV-1: safety and host response. *Int Conf AIDS* 11(2), 23 (abstract no. We.B.293).
- Maecker, H. T., Umetsu, D. T., De Kruyff, R. H., and Levy, S. (1997).
5 DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin. *Vaccine* 15(15), 1687-96.
- Maecker, H. T., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H., and Levy, S. (1998).
Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via class II MHC. *J Immunol* 161(12), 6532-6.
- 10 Mantforpe, M., Comefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M., and Dwarki, V. (1993). Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther* 4(4), 419-31.
- McChuskie, M. J., Chu, Y., Xia, J. L., Jesse, J., Gebyehu, G., and Davis,
15 H. L. (1998). Direct gene transfer to the respiratory tract of mice with pure plasmid and lipid-formulated DNA [In Process Citation]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8(5), 401-14.
- Montefiori, D.C., W. E. Robinson, S. S. Schuffman, and W. M. Mitchell,
1988. Evaluation of antiviral drugs and neutralizing antibodies to HIV by a rapid
20 and sensitive microtiter infection assay. *J. Clin. Microbiol.* 26:231-237.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- Montgomery, D. L., Shiver, J. W., Leander, K. R., Perry, H. C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., and Liu, M. A. (1993). Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 12(9), 777-83.
- 5 Moore, J. P., and Ho, D. D. (1995). HIV-1 neutralization: the consequences of viral adaptation to growth on transformed T cells. *Aids* 9(Suppl A), S 117-36.
- Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander
10 activation during viral infection. *Immunity* 1998;8(2):177-87.
- Ourmanov. I. et al. 2000. *J Virol* 74: 2740-51.
- Pertmer, T. M., Eisenbraun, M. D., McCabe, D., Prayaga, S. K., Fuller, D. H., and Haynes, J. R. (1995). Gene gunbased nucleic acid immunization:
15 elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* 13(15), 1427-30.
- Pertmer, T. M., Roberts, T. R., and Haynes, J. R. (1996). Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery.
20 *J Virol* 70(9), 6119-25.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- Pertmer, T.M. and Robinson, H.L. (In press). Studies on antibody responses following neonatal immunization with influenza hemagglutinin DNA or protein. *Virology*.
- Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katfinger H, Parren PW, Mosier DE, Burton DR (1999). Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* 10(4):431-8
- Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 1998;188(6):1075-82.
- Reimann KA, Li JT, Veazey R, Halloran M, Park IW, Karlsson GB, et al. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *Journal of Virology* 1996;70(10):6922-8.
- Reimann KA, Li JT, Voss G, Lekutis C, Tenner-Racz K, Racz P, et al. An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *Journal of Virology* 1996;70(5):3198-206.
- Richmond, J. F., Lu, S., Santoro, J. C., Weng, J., Hu, S. L., Montefiori, D.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

C., and Robinson, H. L. (1998). Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J Virol* 72(11), 9092-9 100.

Robinson, H.L. and Pertmer, T.M. (2000). DNA vaccines: Basic studies
5 and applications. *In* Advances in Virus Research. Academic Press, Vol. 53 (in press).

Robinson, H.L., Montefiori, D.C., Johnson, R.P., Manson, K.H., Kalish, M.L., Lifson, J.D., Rizvi, T.A., Lu, S., Hu, S.L., Mazzara, G.P., Panicali, D.L.,
10 Herndon, J.G., Glickman, R., Candido, M.A., Lydy, S.L., Wand, M.S., and McClure, H.M. (1999). Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat. Med.* 5:526.

Robinson, H. L., and Pertmer, T. M. (1998). Nucleic Acid Immunizations.
15 *In* "Current Protocols in Immunology" (R. Coico, Ed.), Vol. 1, pp. 2.14.1-2.14.19. 3 vols. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Robinson, H. L., Ginsberg, H. S., Davis, H. L., Johnston, S. A., and Liu, M. A. (1997). The Scientific Future of DNA for Immunization. American Academy of Microbiology. May31-June2-1996.

20 Robinson, H. L., Hunt, L. A., and Webster, R. G. (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-

WO 01/92470

PCT/US01/06795

expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11(9), 957-60.

Rodriguez, F., Zhang, J., and Whitton, J. L. (1997). DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol* 71(11), 8497-503.

5 Ross, T. M., Y. Xu, R. A. Bright, and H. L. Robinson. C3d enhancement of antibodies to Hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat. Immunol.* 2000. 1:127-131.

 Ross, T.M., Y. Xu, T. D. Green, D.C. Montefiori, and H.L. Robinson.
2001. Enhanced Avidity maturation of Antibody to Human Immunodeficiency
10 Virus envelope: DNA Vaccination with gp120-C3d Fusion Proteins. *AIDS Res.*
Human Retro. In press.

 Sasaki, S., Hamajima, K., Fukushima, J., Ihata, A., Ishii, N., Gorai, I.,
Hirahara, F., Mohri, H., and Okuda, K. (1998b). Comparison of intranasal and
intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type I with a
15 DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine. *Infect Immun* 66(2), 823-6.

 Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J.,
Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R_ Smith, G. L., and Hill, A. V. (1998).
Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective
efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus
20 Ankara. *Nat Med* 4(4), 397-402.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- Scholtissek S, Grosse F. A cloning cartridge of lambda t(o) terminator. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(7):3185.
- Sizemore, D. R., Branstrom, A. A., and Sadoff, J. C. (1997). Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine* 15(8), 804-7.
- Sizemore, D. R., Branstrom, A. A., and Sadoff, J. C. (1995). Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270(5234), 299-302.
- Staprans, S., B. Corliss, J. Guthrie, M.B. Feinberg, in *Viral Genome Methods* K. Adolph, Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL, 1996) pp. 167-184.
- Subbarao S, Schochetman G. Genetic variability of HIV-1. *Aids* 1996;10(Suppl A):S13-23.
- Sutcliffe, et al. 1978. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.* 43:77-90
- Tang, D. C., De Vit, M., and Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356(6365), 152-4.
- Thomson, S. A., Sherritt, M. A., Medveczky, J., Elliott, S. L., Moss, D. J., Fernando, G. J., Brown, L. E., and Suhrbier, A. (1998). Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J Immunol* 160(4),1717-23.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

- Tobery, T. W., and Siliciano, R. F. (1997). Targeting of FHV- I antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses *in vivo* after immunization. *J Exp Med* 185(5), 909-20.
- 5 Torres CA, Yang K, Mustafa F, Robinson HL (2000). DNA immunization: effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses. *Vaccine* 18: 805-14
- Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J*
- 10 *Immunol* 1997;158(10):4529-32.
- Uchijima, M., Yoshida, A., Nagata, T., and Koide, Y. (1998). Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J*
- 15 *Immunol* 161(10), 5594-9.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., De Witt, C. M., Friedman, A., and et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259(5102), 1745-9.
- 20 Wild, J., Gruner, B., Metzger, K., Kuhrober, A., Pudollek, H. P., Hauser,

WO 01/92470

PCT/US01/06795

H., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (1998). Polyvalent vaccination against hepatitis B surface and core antigen using a dicistronic expression plasmid. *Vaccine* 16(4), 353-60.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247(4949 Pt 1), 1465-8.

Wu, Y., and Kipps, T. J. (1997). Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasomedependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* 159(12), 603743.

10 Xiang, Z., and Ertl, H. C. (1995). Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2(2), 129-35.

Yamamoto S, Folks TM, Heneine W. Highly sensitive qualitative and quantitative detection of reverse transcriptase activity: optimization, validation, and comparative analysis with other detection systems. *J Virol Methods* 1996;61(1-2):135-43.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

CLAIMS

What is claimed is:

1. A vector comprising:
 - a termination sequence encoding for the lambda T0 terminator;
 - 5 a prokaryotic origin of replication;
 - a selectable marker gene; and
 - a eukaryotic transcription cassette comprising a vaccine insert encoding one or more immunogens derived from a pathogen.
- 10 2. The vector of Claim 1, wherein the pathogen is a viral pathogen.
3. The vector of Claim 1, wherein the viral pathogen is selected from the group consisting of HIV, measles, influenza, polio and rubella.
- 15 4. The vector of Claim 1, wherein the one or more immunogens is selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120 HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein, influenza hemagglutinin, mutants thereof, and subsequences thereof.
- 20 5. The vector of Claim 1, wherein the one or more immunogens are further selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, and HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

6. The vector according to Claim 1, wherein the vaccine insert encoding one or more immunogen or immunogens further comprises at least one C3d gene.
- 5
7. A method of immunizing or treating a patient, comprising the step of administering a therapeutically effective amount of a physiologically acceptable composition, comprising the vector of Claim 1.
- 10
8. The method of Claim 7, further comprising the step of subsequently administering a therapeutically effective amount of a composition comprising a recombinant pox virus vector expressing one or more immunogens selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein, influenza hemagglutinin, mutants thereof, and subsequences thereof.
- 15
9. The method of Claim 7, wherein the one or more immunogens is selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.
- 20
10. The method of Claim 7, further comprising subsequently administering a therapeutically effective amount of a recombinant pox virus vector

WO 01/92470

PCT/US01/06795

expressing one or more immunogens selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein, influenza hemagglutinin, mutants thereof, and subsequences thereof.

5

11. The method of Claim 7, wherein the vector expresses one or more immunogens selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.

- 10 12. A vector comprising the DNA sequence SEQ ID NO: 1.

13. The vector of Claim 12, wherein the vector further comprises a vaccine insert encoding one or more immunogens selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein, influenza selected hemagglutinin, influenza transmembrane hemagglutinin mutants thereof, and subsequences thereof, and optionally at least one C3d gene.

- 20 14. The vector of Claim 12, wherein the one or more immunogens is selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

15. A vector comprising the DNA sequence SEQ ID NO: 2.
16. The vector of Claim 15, wherein the vector further comprises a vaccine
insert encoding one or more immunogens selected from the group
consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP,
measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein,
influenza selected hemagglutinin, influenza transmembrane hemagglutinin
mutants thereof, and subsequences thereof; and optionally at least one C3d
gene.
17. The vector of Claim 15, wherein the one or more immunogens is selected
from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env,
HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.
18. A vector comprising the DNA sequence SEQ ID NO: 3.
19. The vector of Claim 18, wherein the vector further comprises a vaccine
insert encoding one or more immunogens selected from the group
consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP,
measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein,
influenza selected hemagglutinin, influenza transmembrane hemagglutinin
mutants thereof, and subsequences thereof; and optionally at least one C3d
gene.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

20. The vector of Claim 18, wherein the one or more immunogens is selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.
- 5
21. A vector comprising the DNA sequence SEQ ID NO: 4.
22. The vector of Claim 21, wherein the vector further comprises a vaccine insert encoding one or more immunogens selected from the group
- 10 consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein, influenza selected hemagglutinin, influenza transmembrane hemagglutinin mutants thereof, and subsequences thereof; and optionally at least one C3d gene.
- 15
23. The vector of Claim 21, wherein the one or more immunogens is selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.
- 20
24. A vector comprising the DNA sequence SEQ ID NO: 5.
25. The vector of Claim 24, wherein the vector further comprises a vaccine insert encoding one or more immunogens selected from the group

WO 01/92470

PCT/US01/06795

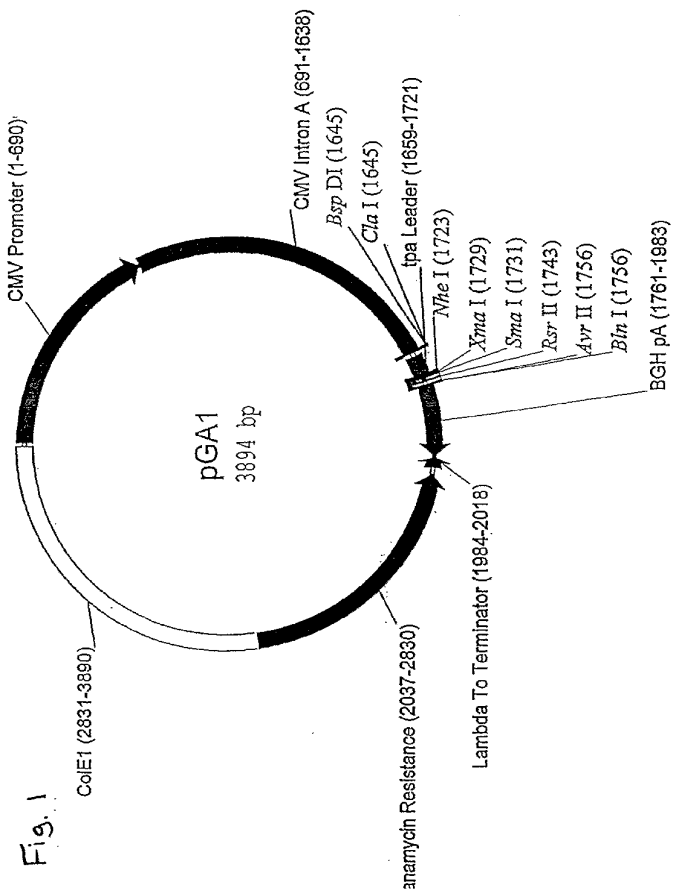
- consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein, influenza selected hemagglutinin, influenza transmembrane hemagglutinin mutants thereof, and subsequences thereof; and optionally at least one C3d gene.
- 5
26. The vector of Claim 24, wherein the one or more immunogens is selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.
- 10
27. A method of immunizing or treating a patient comprising administering a therapeutically effective amount of a physiologically acceptable composition comprising a vector wherein the vector is a nucleic acid comprising a sequence selected from SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 and 5, and
- 15 wherein administration of the therapeutically effective amount of the composition is by an intramuscular or intradermal route.
28. The method of Claim 27, wherein the vector expresses one or more immunogens selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120,
- 20 HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein, influenza hemagglutinin, mutants thereof, and subsequences thereof; and optionally at least one C3d gene.

WO 01/92470

PCT/US01/06795

29. The method of Claim 27, wherein the vector expresses one or more immunogens selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.
- 5 30. The method of Claim 27, further comprising subsequently administering a therapeutically effective amount of a recombinant pox virus vector expressing one or more immunogens selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, measles fusion protein, measles hemagglutinin, measles nucleoprotein, influenza
10 hemagglutinin, mutants thereof, and subsequences thereof.
31. The method of Claim 27, wherein the vector expresses one or more immunogens selected from the group consisting of HIV Gag, HIV gp120, HIV Pol, HIV Env, HIV VLP, mutants thereof, and subsequences thereof.
- 15 32. A method of immunizing or treating a patient in need thereof comprising administering a therapeutically effective amount of a composition comprising the vector of Claim 29.

::ODMA\PCDOCS\ATLANTA\245915\1



WO 01/92470

2/55

PCT/US01/06795

Fig. 2

Tuesday, December 21, 1999 7:23 PM
PANI File Version Map.MPD (17 > 3964) Site and Sequence
Sequence 1 of 818 in map (17 > 3964)
Contigs: 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000

85
270
805
640
875
810
945
1000

Page 1

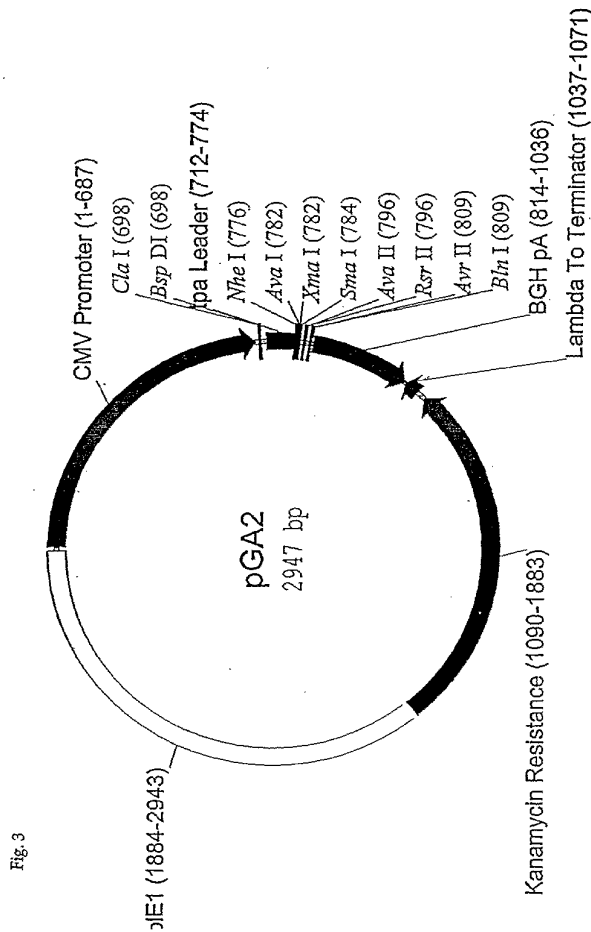
[illegible]

Page 3

Tuesday, December 21, 1999 7:23 PM
p041 First Version Map.MPD (1.1 - 2864) Site and Sequence

1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877

Tuesday, December 21, 1999 12:51 PM
 pGAF Final Version Map.MPD (1.2 - 3694) Site and Sequence



[illegible]

Page 1

0942 Final Version Mss.MPD (1.2.2547) Site and Sequence

108C
 ATTCATTCTTGGGCGTGGGCGTGGGCGAGGCAATCGAGGAGATCTGGAGGATCGCTGGGAGTCATATAAAGCCGCGGCGGACACGAGCGTCTGACCGCTAGAGT
 TAAATAGAGCGTCGACGCGCGCGCTGCTGTGTGTGGCGGTGATGAGCGCTCTGTATATGTCTGTAGAGCGCTAGGACGACGGAATATTTTGTGGAGCGCGCTGTGCTGACGATCGCTGATCTA

109A → 109B
 109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

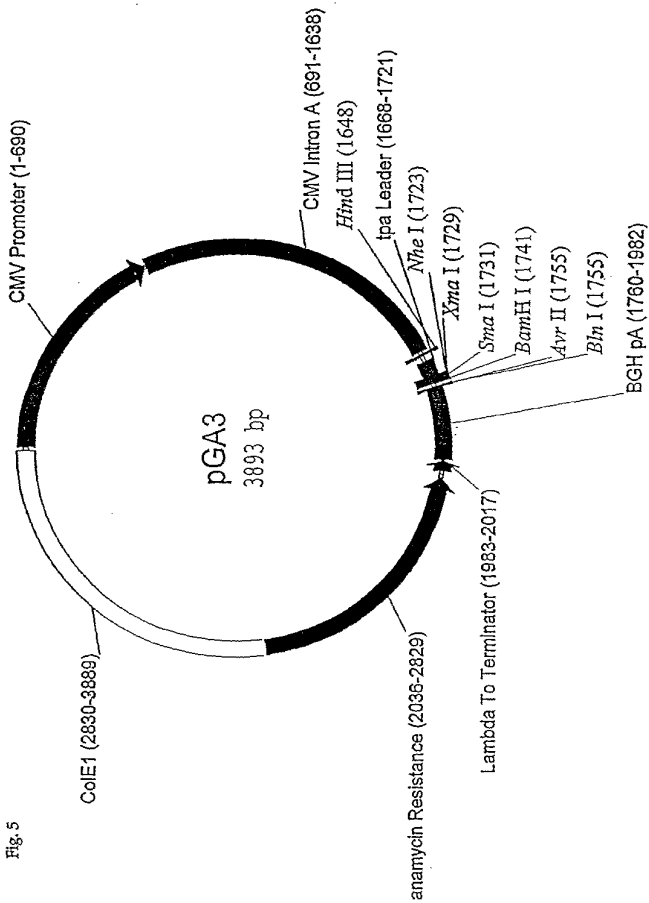
109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L
 109M
 109N
 109O
 109P
 109Q
 109R
 109S
 109T
 109U
 109V
 109W
 109X
 109Y
 109Z

109A
 109B
 109C
 109D
 109E
 109F
 109G
 109H
 109I
 109J
 109K
 109L

[illegible]



2016
2015
2014
2013
2012
2011
2010
2009
2008
2007
2006
2005
2004
2003
2002
2001
2000
1999
1998
1997
1996
1995
1994
1993
1992
1991
1990
1889
1888
1887
1886
1885
1884
1883
1882
1881
1880
1879
1878
1877
1876
1875
1874
1873
1872
1871
1870
1869
1868
1867
1866
1865
1864
1863
1862
1861
1860
1859
1858
1857
1856
1855
1854
1853
1852
1851
1850
1849
1848
1847
1846
1845
1844
1843
1842
1841
1840
1839
1838
1837
1836
1835
1834
1833
1832
1831
1830
1829
1828
1827
1826
1825
1824
1823
1822
1821
1820
1819
1818
1817
1816
1815
1814
1813
1812
1811
1810
1809
1808
1807
1806
1805
1804
1803
1802
1801
1800
1799
1798
1797
1796
1795
1794
1793
1792
1791
1790
1789
1788
1787
1786
1785
1784
1783
1782
1781
1780
1779
1778
1777
1776
1775
1774
1773
1772
1771
1770
1769
1768
1767
1766
1765
1764
1763
1762
1761
1760
1759
1758
1757
1756
1755
1754
1753
1752
1751
1750
1749
1748
1747
1746
1745
1744
1743
1742
1741
1740
1739
1738
1737
1736
1735
1734
1733
1732
1731
1730
1729
1728
1727
1726
1725
1724
1723
1722
1721
1720
1719
1718
1717
1716
1715
1714
1713
1712
1711
1710
1709
1708
1707
1706
1705
1704
1703
1702
1701
1700
1699
1698
1697
1696
1695
1694
1693
1692
1691
1690
1689
1688
1687
1686
1685
1684
1683
1682
1681
1680
1679
1678
1677
1676
1675
1674
1673
1672
1671
1670
1669
1668
1667
1666
1665
1664
1663
1662
1661
1660
1659
1658
1657
1656
1655
1654
1653
1652
1651
1650
1649
1648
1647
1646
1645
1644
1643
1642
1641
1640
1639
1638
1637
1636
1635
1634
1633
1632
1631
1630
1629
1628
1627
1626
1625
1624
1623
1622
1621
1620
1619
1618
1617
1616
1615
1614
1613
1612
1611
1610
1609
1608
1607
1606
1605
1604
1603
1602
1601
1600
1599
1598
1597
1596
1595
1594
1593
1592
1591
1590
1589
1588
1587
1586
1585
1584
1583
1582
1581
1580
1579
1578
1577
1576
1575
1574
1573
1572
1571
1570
1569
1568
1567
1566
1565
1564
1563
1562
1561
1560
1559
1558
1557
1556
1555
1554
1553
1552
1551
1550
1549
1548
1547
1546
1545
1544
1543
1542
1541
1540
1539
1538
1537
1536
1535
1534
1533
1532
1531
1530
1529
1528
1527
1526
1525
1524
1523
1522
1521
1520
1519
1518
1517
1516
1515
1514
1513
1512
1511
1510
1509
1508
1507
1506
1505
1504
1503
1502
1501
1500
1499
1498
1497
1496
1495
1494
1493
1492
1491
1490
1489
1488
1487
1486
1485
1484
1483
1482
1481
1480
1479
1478
1477
1476
1475
1474
1473
1472
1471
1470
1469
1468
1467
1466
1465
1464
1463
1462
1461
1460
1459
1458
1457
1456
1455
1454
1453
1452
1451
1450
1449
1448
1447
1446
1445
1444
1443
1442
1441
1440
1439
1438
1437
1436
1435
1434
1433
1432
1431
1430
1429
1428
1427
1426
1425
1424
1423
1422
1421
1420
1419
1418
1417
1416
1415
1414
1413
1412
1411
1410
1409
1408
1407
1406
1405
1404
1403
1402
1401
1400
1399
1398
1397
1396
1395
1394
1393
1392
1391
1390
1389
1388
1387
1386
1385
1384
1383
1382
1381
1380
1379
1378
1377
1376
1375
1374
1373
1372
1371
1370
1369
1368
1367
1366
1365
1364
1363
1362
1361
1360
1359
1358
1357
1356
1355
1354
1353
1352
1351
1350
1349
1348
1347
1346
1345
1344
1343
1342
1341
1340
1339
1338
1337
1336
1335
1334
1333
1332
1331
1330
1329
1328
1327
1326
1325
1324
1323
1322
1321
1320
1319
1318
1317
1316
1315
1314
1313
1312
1311
1310
1309
1308
1307
1306
1305
1304
1303
1302
1301
1300
1299
1298
1297
1296
1295
1294
1293
1292
1291
1290
1289
1288
1287
1286
1285
1284
1283
1282
1281
1280
1279
1278
1277
1276
1275
1274
1273
1272
1271
1270
1269
1268
1267
1266
1265
1264
1263
1262
1261
1260
1259
1258
1257
1256
1255
1254
1253
1252
1251
1250
1249
1248
1247
1246
1245
1244
1243
1242
1241
1240
1239
1238
1237
1236
1235
12

PCT/US01/06795

2295
2296
2297
2298
2299
2300
2301
2302
2303
2304
2305
2306
2307
2308
2309
2310
2311
2312
2313
2314
2315
2316
2317
2318
2319
2320
2321
2322
2323
2324
2325
2326
2327
2328
2329
2330
2331
2332
2333
2334
2335
2336
2337
2338
2339
2340
2341
2342
2343
2344
2345
2346
2347
2348
2349
2350
2351
2352
2353
2354
2355
2356
2357
2358
2359
2360
2361
2362
2363
2364
2365
2366
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
2374
2375
2376
2377
2378
2379
2380
2381
2382
2383
2384
2385
2386
2387
2388
2389
2390
2391
2392
2393
2394
2395
2396
2397
2398
2399
2400
2401
2402
2403
2404
2405
2406
2407
2408
2409
2410
2411
2412
2413
2414
2415
2416
2417
2418
2419
2420
2421
2422
2423
2424
2425
2426
2427
2428
2429
2430
2431
2432
2433
2434
2435
2436
2437
2438
2439
2440
2441
2442
2443
2444
2445
2446
2447
2448
2449
2450
2451
2452
2453
2454
2455
2456
2457
2458
2459
2460
2461
2462
2463
2464
2465
2466
2467
2468
2469
2470
2471
2472
2473
2474
2475
2476
2477
2478
2479
2480
2481
2482
2483
2484
2485
2486
2487
2488
2489
2490
2491
2492
2493
2494
2495
2496
2497
2498
2499
2500
2501
2502
2503
2504
2505
2506
2507
2508
2509
2510
2511
2512
2513
2514
2515
2516
2517
2518
2519
2520
2521
2522
2523
2524
2525
2526
2527
2528
2529
2530
2531
2532
2533
2534
2535
2536
2537
2538
2539
2540
2541
2542
2543
2544
2545
2546
2547
2548
2549
2550
2551
2552
2553
2554
2555
2556
2557
2558
2559
2560
2561
2562
2563
2564
2565
2566
2567
2568
2569
2570
2571
2572
2573
2574
2575
2576
2577
2578
2579
2580
2581
2582
2583
2584
2585
2586
2587
2588
2589
2590
2591
2592
2593
2594
2595
2596
2597
2598
2599
2600
2601
2602
2603
2604
2605
2606
2607
2608
2609
2610
2611
2612
2613
2614
2615
2616
2617
2618
2619
2620
2621
2622
2623
2624
2625
2626
2627
2628
2629
2630
2631
2632
2633
2634
2635
2636
2637
2638
2639
2640
2641
2642
2643
2644
2645
2646
2647
2648
2649
2650
2651
2652
2653
2654
2655
2656
2657
2658
2659
2660
2661
2662
2663
2664
2665
2666
2667
2668
2669
2670
2671
2672
2673
2674
2675
2676
2677
2678
2679
2680
2681
2682
2683
2684
2685
2686
2687
2688
2689
2690
2691
2692
2693
2694
2695
2696
2697
2698
2699
2700
2701
2702
2703
2704
2705
2706
2707
2708
2709
2710
2711
2712
2713
2714
2715
2716
2717
2718
2719
2720
2721
2722
2723
2724
2725
2726
2727
2728
2729
2730
2731
2732
2733
2734
2735
2736
2737
2738
2739
2740
2741
2742
2743
2744
2745
2746
2747
2748
2749
2750
2751
2752
2753
2754
2755
2756
2757
2758
2759
2760
2761
2762
2763
2764
2765
2766
2767
2768
2769
2770
2771
2772
2773
2774
2775
2776
2777
2778
2779
2780
2781
2782
2783
2784
2785
2786
2787
2788
2789
2790
2791
2792
2793
2794
2795
2796
2797
2798
2799
2800
2801
2802
2803
2804
2805
2806
2807
2808
2809
2810
2811
2812
2813
2814
2815
2816
2817
2818
2819
2820
2821
2822
2823
2824
2825
2826
2827
2828
2829
2830
2831
2832
2833
2834
2835
2836
2837
2838
2839
2840
2841
2842
2843
2844
2845
2846
2847
2848
2849
2850
2851
2852
2853
2854
2855
2856
2857
2858
2859
2860
2861
2862
2863
2864
2865
2866
2867
2868
2869
2870
2871
2872
2873
2874
2875
2876
2877
2878
2879
2880
2881
2882
2883
2884
2885
2886
2887
2888
2889
2890
2891
2892
2893
2894
2895
2896
2897
2898
2899
2900
2901
2902
2903
2904
2905
2906
2907
2908
2909
2910
2911
2912
2913
2914
2915
2916
2917
2918
2919
2920
2921
2922
2923
2924
2925
2926
2927
2928
2929
2930
2931
2932
2933
2934
2935
2936
2937
2938
2939
2940
2941
2942
2943
2944
2945
2946
2947
2948
2949
2950
2951
2952
2953
2954
2955
2956
2957
2958
2959
2960
2961
2962
2963
2964
2965
2966
2967
2968
2969
2970
2971
2972
2973
2974
2975
2976
29

36AGCTGCTGTTTGTGATGCTGTGATGGGGGCGAGACTATGGAAGAGCCGACGACGGCGCTTTTACGGTTCCTGGCTTTTCTGCGCTTTTCTGCTACATGTGT
 3693
 CTGGAGCTAAACACATACGAGCATGCTCCCGCGCTGTGGATACCTTTTCTGGGTGTGTGCGCGGGGAATTCGAGAGACGCGAAGAGCGATGTGTACACA

Fig. 7

Amount of Total IgG Antibodies
Elicited from Gene Gun Vaccinated Mice

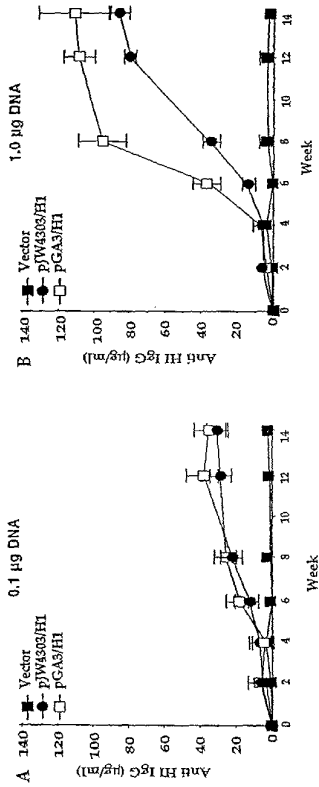
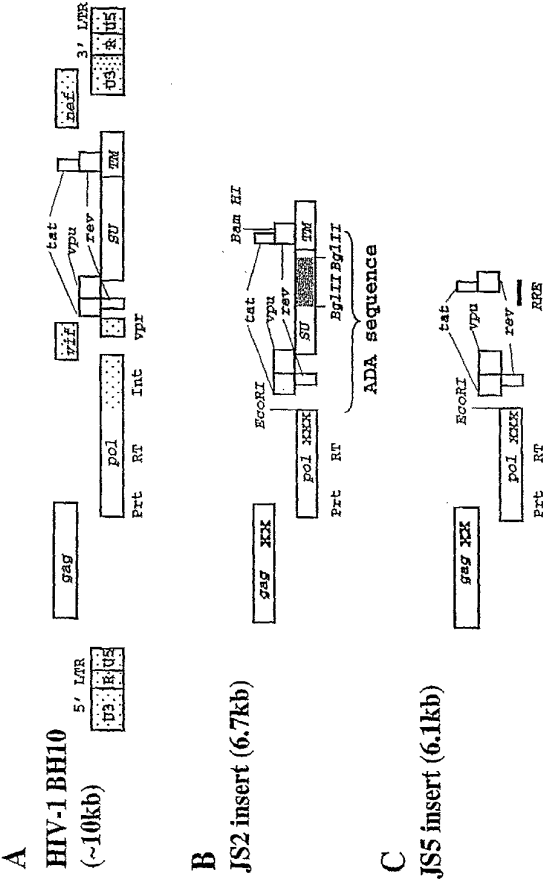
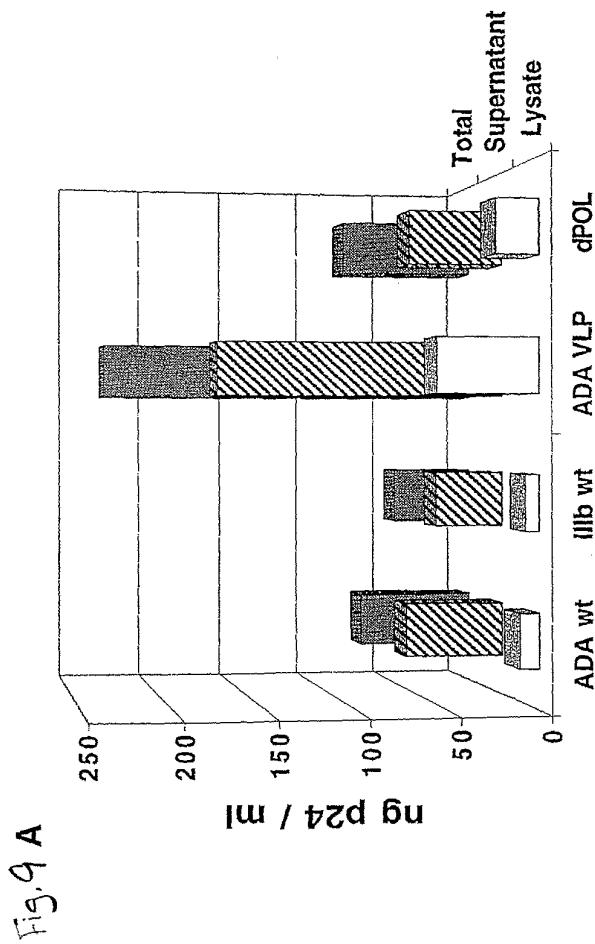
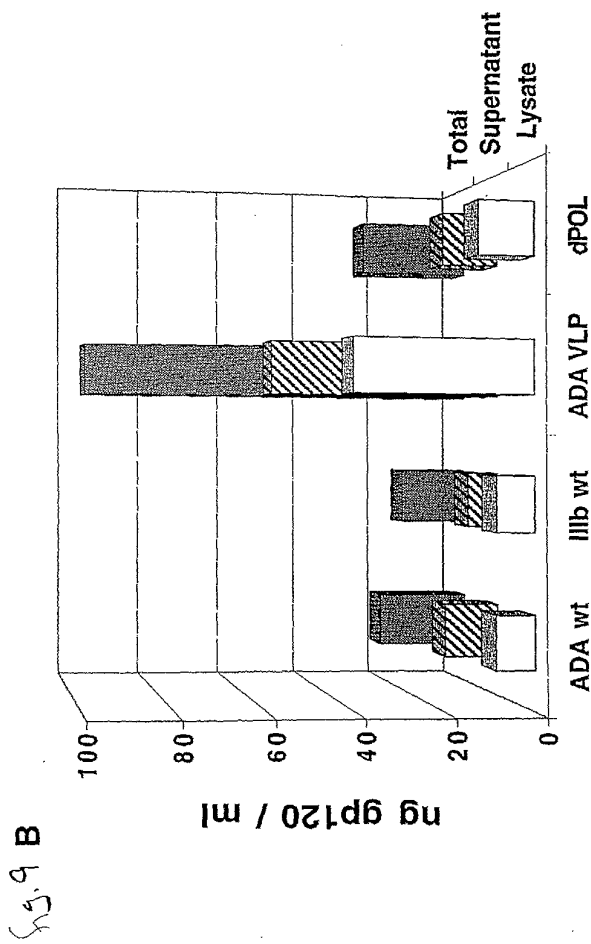
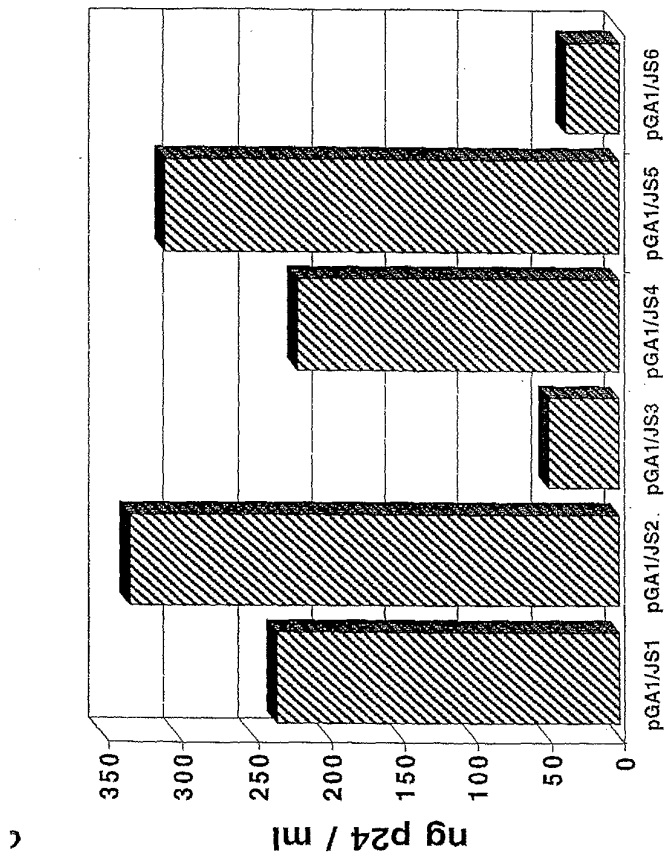


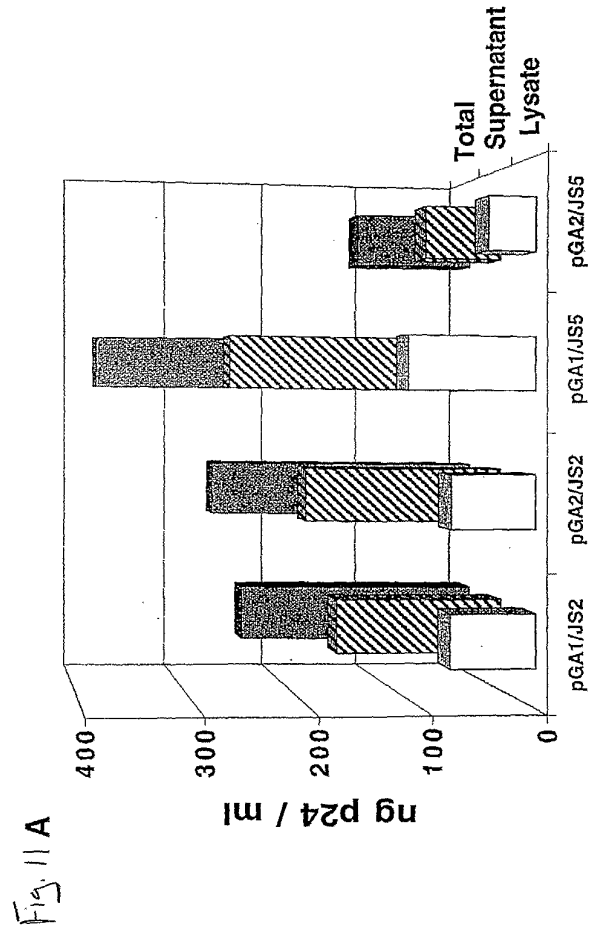
Fig. 2











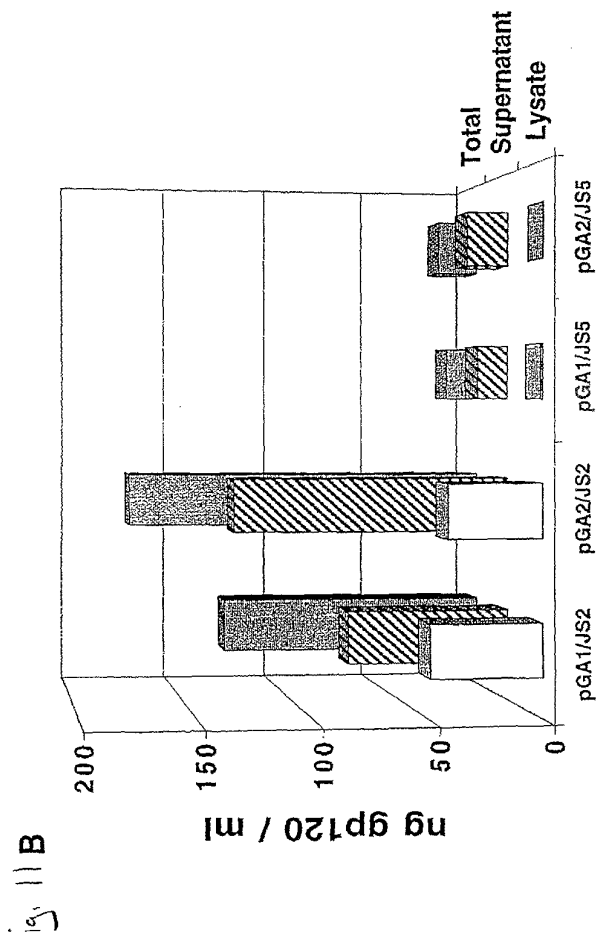
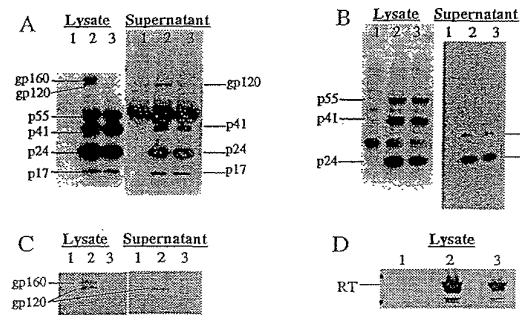


Fig. 12



Western blots of cell lysates and tissue culture supernatants from 293T cells transfected with: 1) Mock 2) pGA2/JS2 3) pGA1/JS5 Primary antibody: A) pooled anti-HIV Ig from infected patients B) anti-p24 C) anti-gp120 D) anti-RT.

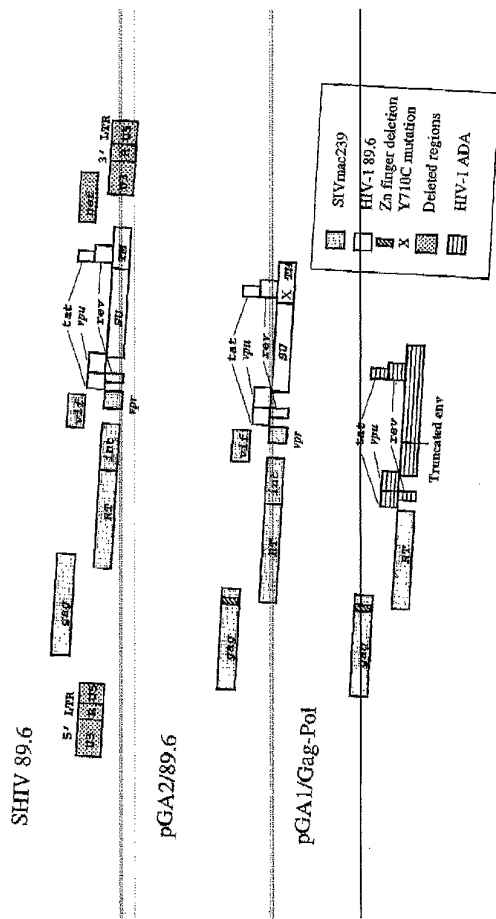


FIGURE 13

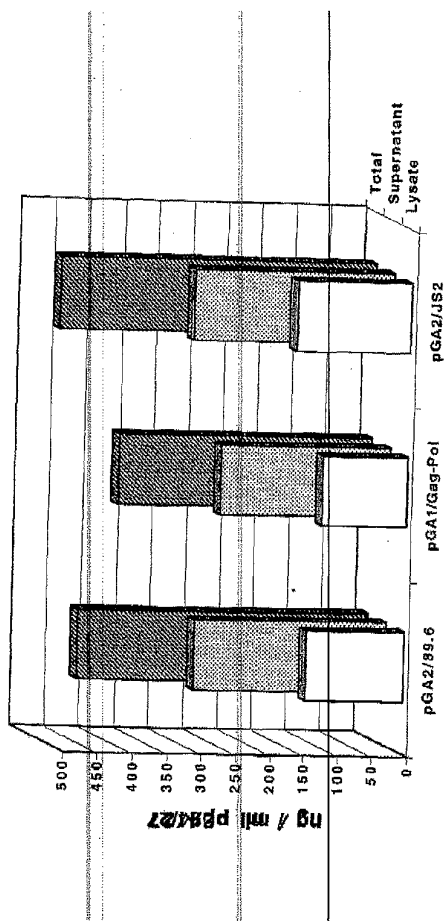
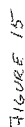


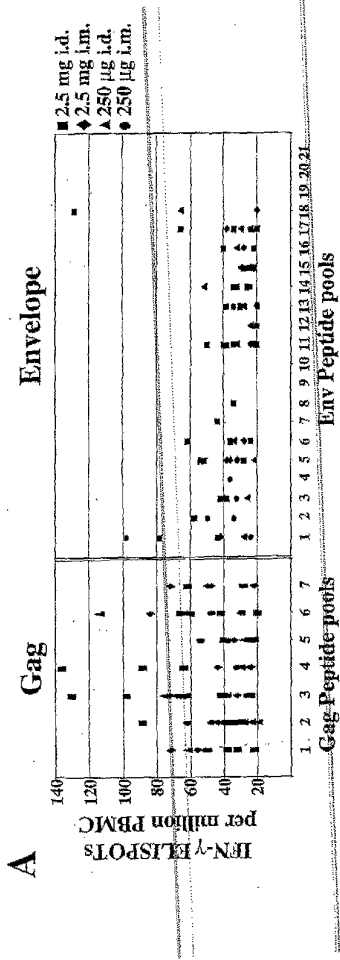
FIGURE 14



WO 01/92470

25/55

PCT/US01/06795



B

DNA Prime	Height of ELISPOTs			Breadth of ELISPOTs		
	Gag	Env	Total	Gag	Env	Total
2.5 mg. i.d.	285 $\pm$ 130	224 $\pm$ 76	509 $\pm$ 137	4.5 $\pm$ 1.2	5.3 $\pm$ 2.0	9.8 $\pm$ 2.4
2.5 mg. i.m.	203 $\pm$ 97	83 $\pm$ 44	286 $\pm$ 73	4.4 $\pm$ 1.8	2.8 $\pm$ 1.3	7.2 $\pm$ 1.1
250 μ g. i.d.	104 $\pm$ 113	101 $\pm$ 77	205 $\pm$ 183	2.2 $\pm$ 2.5	3.5 $\pm$ 2.4	5.7 $\pm$ 4.5
250 μ g. i.m.	76 $\pm$ 99	84 $\pm$ 110	160 $\pm$ 207	1.7 $\pm$ 2.0	2.3 $\pm$ 2.9	4.0 $\pm$ 4.7
Control DNA	0	0	0	0	0	0

Fig. 16

WO 01/92470

26/55

PCT/US01/06795

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

[illegible]

[illegible]

[illegible]

WO 01/92470

30/55

PCT/US01/06795

100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000
10010
10020
10030
10040
10050
10060
10070
10080
10090
10100
10110
10120
10130
10140
10150
10160
10170
10180
10190
10200
10210
10220
10230
10240
10250
10260
10270
10280
10290
10300
10310
10320
10330
10340
10350
10360
10370
10380
10390
10400
10410
10420
10430
10440
10450
10460
10470
10480
10490
10500
10510
10520
10530
10540
10550
10560
10570
10580
10590
10600
10610
10620
10630
10640
10650
10660
10670
10680
10690
10700
10710
10720
10730
10740
10750
10760
10770
10780
10790
10800
10810
10820
10830
10840
10850
10860
10870
10880
10890
10900
10910
10920
10930
10940
10950
10960
10970
10980
10990
11000
11010
11020
11030
11040
11050
11060
11070
11080
11090
11100
11110
11120
11130
11140
11150
11160
11170
11180
11190
11200
11210
11220
11230
11240
11250
11260
11270
11280
11290
11300
11310
11320
11330
11340
11350
11360
11370
11380
11390
11400
11410
11420
11430
11440
11450
11460
11470
11480
11490
11500
11510
11520
11530
11540
11550
11560
11570
11580
11590
11600
11610
11620
11630
11640
11650
11660
11670
11680
11690
11700
11710
11720
11730
11740
11750
11760
11770
11780
11790
11800
11810
11820
11830
11840
11850
11860
11870
11880
11890
11900
11910
11920
11930
11940
11950
11960
11970
11980
11990
12000
12010
12020
12030
12040
12050
12060
12070
12080
12090
12100
12110
12120
12130
12140
12150
12160
12170
12180
12190
12200
12210
12220
12230
12240
12250
12260
12270
12280
12290
12300
12310
12320
12330
12340
12350
12360
12370
12380
12390
12400
12410
12420
12430
12440
12450
12460
12470
12480
12490
12500
12510
12520
12530
12540
12550
12560
12570
12580
12590
12600
12610
12620
12630
12640
12650
12660
12670
12680
12690
12700
12710
12720
12730
12740
12750
12760
12770
12780
12790
12800
12810
12820
12830
12840
12850
12860
12870
12880
12890
12900
12910
12920
12930
12940
12950
12960
12970
12980
12990
13000
13010
13020
13030
13040
13050
13060
13070
13080
13090
13100
13110
13120
13130
13140
13150
13160
13170
13180
13190
13200
13210
13220
13230
13240
13250
13260
13270
13280
13290
13300
13310
13320
13330
13340
13350
13360
13370
13380
13390
13400
13410
13420
13430
13440
13450
13460
13470
13480
13490
13500
13510
13520
13530
13540
13550
13560
13570
13580
13590
13600
13610
13620
13630
13640
13650
13660
13670
13680
13690
13700
13710
13720
13730
13740
13750
13760
13770
13780
13790
13800
13810
13820
13830
13840
13850
13860
13870
13880
13890
13900
13910
13920
13930
13940
13950
13960
13970
13980
13990
14000
14010
14020
14030
14040
14050
14060
14070
14080
14090
14100
14110
14120
14130
14140
14150
14160
14170
14180
14190
14200
14210
14220
14230
14240
14250
14260
14270
14280
14290
14300
14310
14320
14330
14340
14350
14360
14370
14380
14390
14400
14410
14420
14430
14440
14450
14460
14470
14480
14490
14500
14510
14520
14530
14540
14550
14560
14570
14580
14590
14600
14610
14620
14630
14640
14650
14660
14670
14680
14690
14700
14710
14720
14730
14740
14750
14760
14770
14780
14790
14800
14810
14820
14830
14840
14850
14860
14870
14880
14890
14900
14910
14920
14930
14940
14950
14960
14970
14980
14990
15000
15010
15020
15030
15040
15050
15060
15070
15080
15090
15100
15110
15120
15130
15140
15150
15160
15170
15180
15190
15200
15210
15220
15230
15240
15250
15260
15270
15280
15290
15300
15310
15320
15330
15340
15350
15360
15370
15380
15390
15400
15410
15420
15430
15440
15450
15460
15470
15480
15490
15500
15510
15520
15530
15540
15550
15560
15570
15580
15590
15600
15610
15620
15630
15640
15650
15660
15670
15680
15690
15700
15710
15720
15730
15740
15750
15760
15770
15780
15790
15800
15810
15820
15830
15840
15850
15860
15870
15880
15890
15900
15910
15920
15930
15940
15950
15960
15970
15980
15990
16000
16010
16020
16030
16040
16050
16060
16070
16080
16090
16100
16110
16120
16130
16140
16150
16160
16170
16180
16190
16200
16210
16220
16230
16240
16250
16260
16270
16280
16290
16300
16310
16320
16330
16340
16350
16360
16370
16380
16390
16400
16410
16420
16430
16440
16450
16460
16470
16480
16490
16500
16510
16520
16530
16540
16550
16560
16570
16580
16590
16600
16610
16620
16630
16640
16650
16660
16670
16680
16690
16700
16710
16720
16730
16740
16750
16760
16770
16780
16790
16800
16810
16820
16830
16840
16850
16860
16870
16880
16890
16900
16910
16920
16930
16940
16950
16960
16970
16980
16990
17000
17010
17020
17030
17040
17050
17060
17070
17080
17090
17100
17110
17120
17130
17140
17150
17160
17170
17180
17190
17200
17210
17220
17230
17240
17250
17260
17270
17280
17290
17300
17310
17320
17330
17340
17350
17360
17370
17380
17390
17400
17410
17420
17430
17440
17450
17460
17470
17480
17490
17500
17510
17520
17530
17540
17550
17560
17570
17580
17590
17600
17610
17620
17630
17640
17650
17660
17670
17680
17690
17700
17710
17720
17730
17740
17750
17760
17770
17780
17790
17800
17810
17820
17830
17840
17850
17860
17870
17880
17890
17900
17910
17920
17930
17940
17950
17960
17970
17980
17990
18000
18010
18020
18030
18040
18050
18060
18070
18080
18090
18100
18110
18120
18130
18140
18150
18160
18170
18180
18190
18200
18210
18220
18230
18240
18250
18260
18270
18280
18290
18300
18310
18320
18330
18340
18350
18360
18370
18380
18390
18400
18410
18420
18430
18440
18450
18460
18470
18480
18490
18500
18510
18520
18530
18540
18550
18560
18570
18580
18590
18600
18610
18620
18630
18640
18650
18660
18670
18680
18690
18700
18710
18720
18730
18740
18750
18760
18770
18780
18790
18800
18810
18820
18830
18840
18850
18860
18870
18880
18890
18900
18910
18920
18930
18940
18950
18960
18970
18980
18990
19000
1

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

WO 01/92470

35/55

PCT/US01/06795

1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

WO 01/92470

36/55

PCT/US01/06795

1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

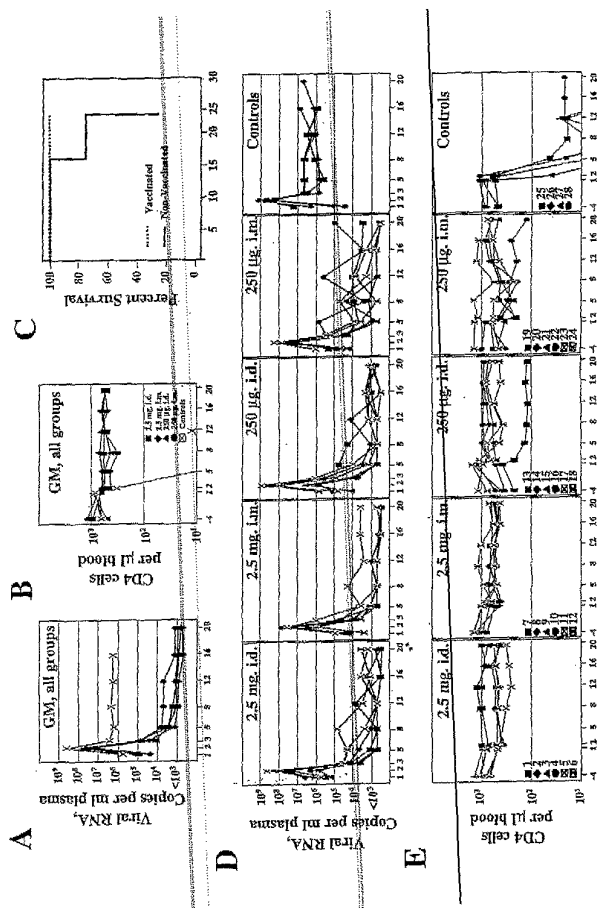
[illegible]

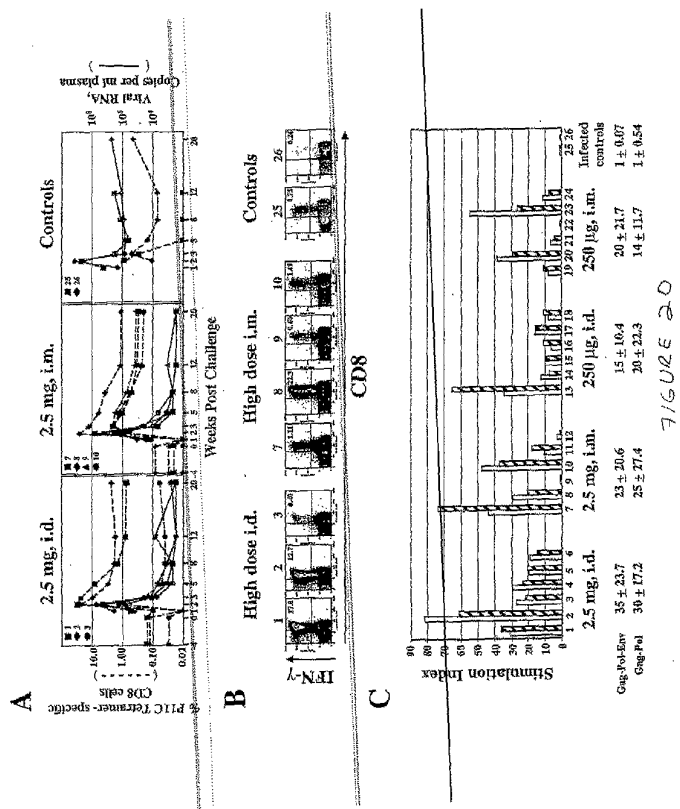
[illegible]

WO 01/92470

43/55

PCT/US01/06795





WO 01/92470

45/55

PCT/US01/06795

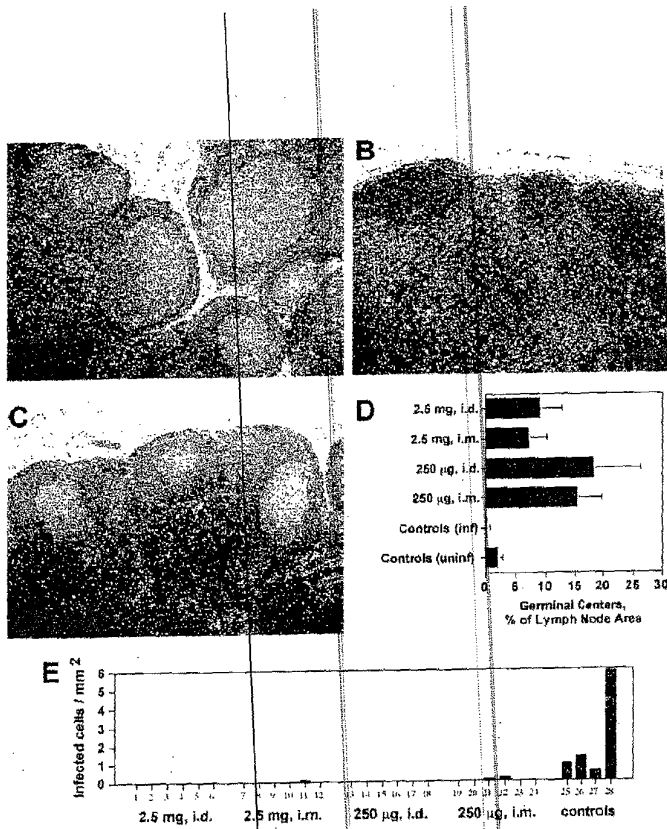


FIGURE 21

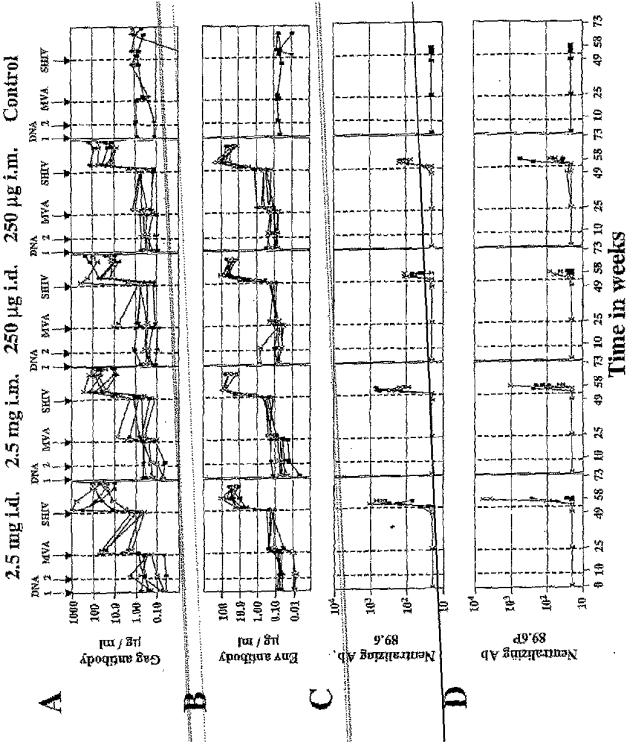


FIGURE 22

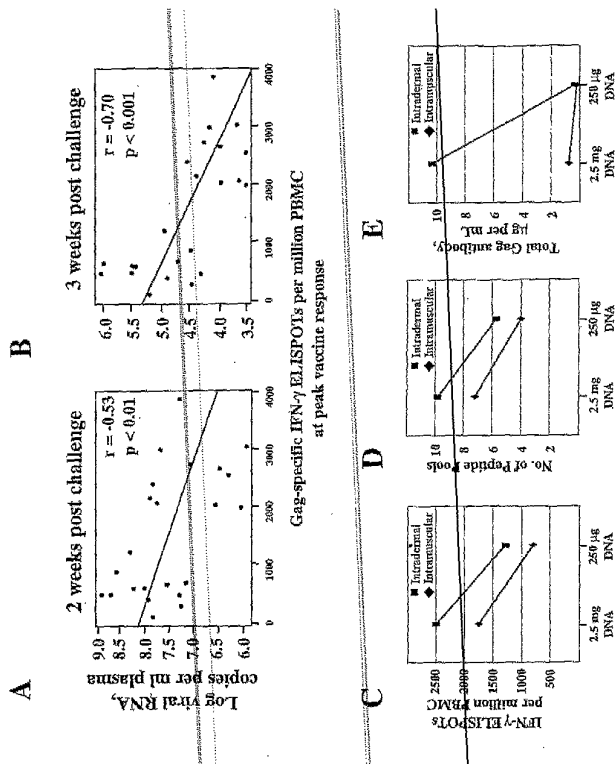


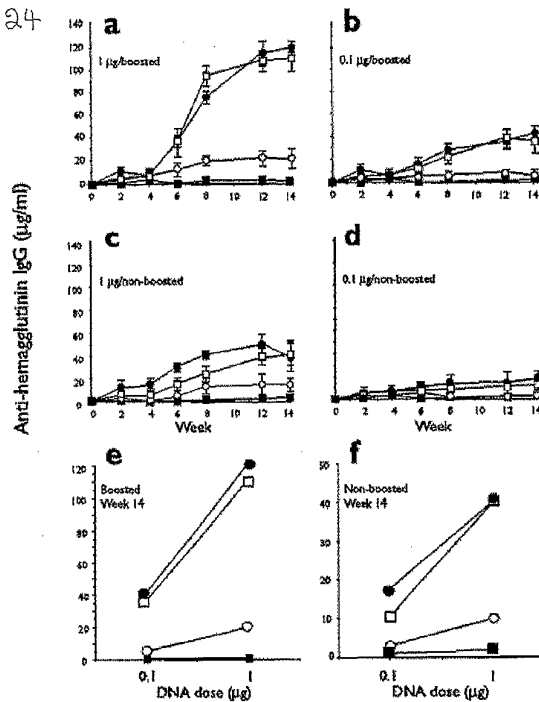
FIGURE 23

WO 01/92470

48/55

PCT/US01/06795

Fig. 24



Anti-HA IgG raised by gene gun inoculation of DNAs expressing HA proteins. Mice were immunized with different doses of vaccine plasmid. Half of the mice were primed at day 0 and boosted at week 4 (a,b) and half were given a single vaccination at day 0 (c,d). A ratio of the dose of DNA to specific IgG concentrations was obtained at week 14 (e,f). Sera were obtained from mice with vector (filled squares), sHA (open circles), tmHA (open squares) or sHA-3C3d (filled circles). Sera collected at the indicated times from each group were pooled for determination of specific IgG levels by ELISA. Data are represented as the average of three individual assays. Preimmune sera from mice had no detectable specific IgG.

Figure 24

WO 01/92470

49/55

PCT/US01/06795

Fig. 25

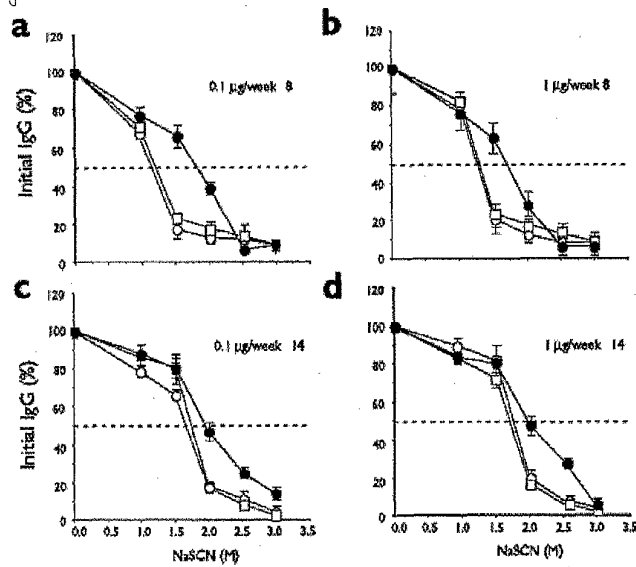


Figure 25 Avidity of the anti-HA IgG raised by the three different HA DNA vaccines. Sera were analyzed from week 8 (a,b) and week 14 (c,d) in an A/PR/8/34 (H1N1)-specific NaSCN-displacement ELISA. Sera were obtained from mice inoculated. Sera were obtained from mice with sHA (open circles), tmHA (open squares) or sHA-3C3d (filled circles). Assays used pooled serum samples from each mouse group at a dilution of 1:300. Data are represented as the average of three independent experiments plus standard errors.

Figure 25

WO 01/92470

50/55

PCT/US01/06795

Fig. 26

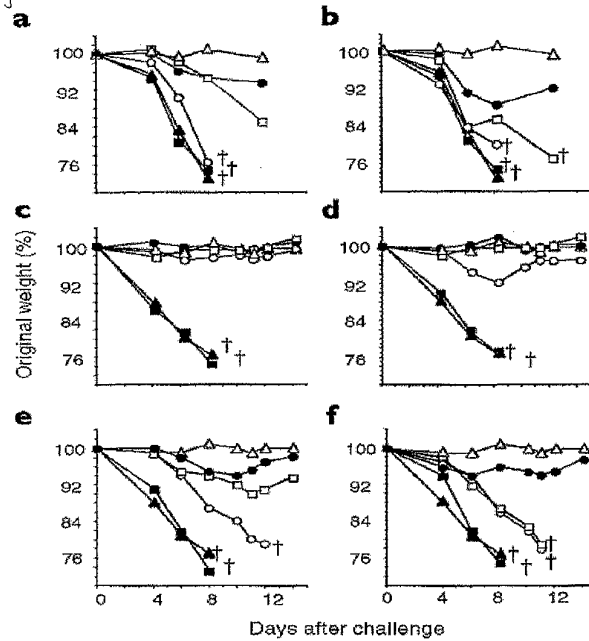


FIG. 26 Protection from weight loss after virus challenge. At week 8 (a,b) or week 14 (c-f) mice were challenged intranasally with a lethal dose of influenza virus, A/PR/8/34 (H1N1), and monitored daily for weight loss. The data are plotted as percentage of the average initial weight. (a,c) Mice were primed and boosted with a 1 g dose of DNA vaccine. (b,d) Mice were primed and boosted with a 0.1 g dose of DNA vaccine. (e) Mice were given a single 1 g dose of DNA vaccine. (f) Mice were given a single 0.1 g dose inoculum of DNA vaccine. Sera were obtained from mice with vector (filled squares), shA (open circles), tmfA (open squares), shA-3C3d (filled circles), naive-mock (open triangles) or naive-virus (filled triangles). The open cross indicates the time-point at which all five mice in a group succumbed to disease.

Figure 26

WO 01/92470

51/55

PCT/US01/06795

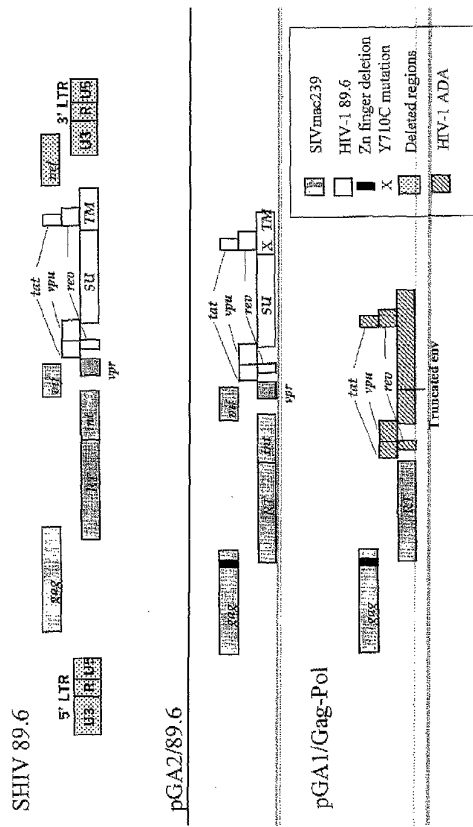


FIGURE 27

Weeks Post Challenge

FIGURE 28

WO 01/92470

54/55

PCT/US01/06795

Fig. 30

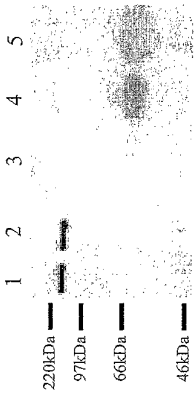
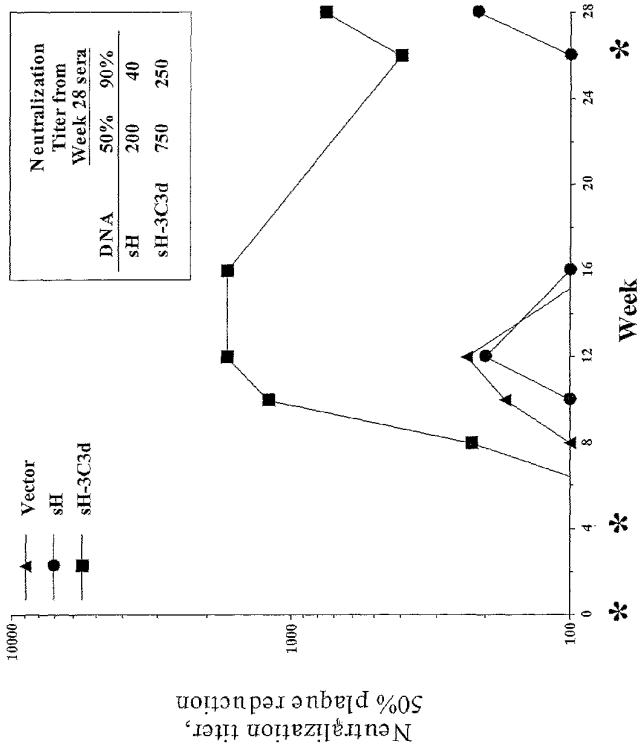


Fig. 31.



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 December 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2001/092470 A3

(51) International Patent Classification: **A61K 39/21**,
39/275, A01N 63/00, C07H 21/04, C12N 15/74, 15/86,
15/97

(21) International Application Number:
PCT/US2001/006795

(22) International Filing Date: 2 March 2001 (02.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/186,364 2 March 2000 (02.03.2000) US
60/251,083 1 December 2000 (01.12.2000) US

(71) Applicant: EMORY UNIVERSITY [US/US], 2009
Ridgewood Drive, Atlanta, GA 30322 (US).

(72) Inventors: ROBINSON, Harriet, L.; 1051 Mason Woods
Drive, Atlanta, GE 30329 (US). SMITH, James, M.; 6523
Sevenoaks Drive, Tucker, GE 30084 (US). ROSS, Ted,
M.; 4111 Treetops Circle, Winterville, NC 28590 (US).
BRIGHT, Rick, Arthur; 426 Rock Springs Road, NE,
Atlanta, GE 30324 (US). HUA, Jian; 3251 Valleybrook
Place, Decatur, GE 30333 (US). ELLENBERGER, Den-
nis; 5055 Broadreen Drive, Norcross, GE 30092 (US).

(74) Agent: HAYZER, David, J.; Womble Carlyle Sandridge
& Rice, P.O. Box 7037, Atlanta, GA 30357-0037 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT
(utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ,
CA, CH, CN, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility
model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EE (utility
model), EE, ES, FI (utility model), 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,
UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the International search report:
25 March 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DNA EXPRESSION VECTORS AND METHODS OF USE

(57) Abstract: The present invention provides novel pGA constructs which are useful as vectors for the delivery of DNA vaccine inserts. The vaccine inserts can include the DNA transcripts of various virus, bacteria, parasite and/or fungi. Also described are methods of raising multi-epitope CD8 T-cell responses by administering therapeutically effective amounts of the novel pGA constructs comprising pathogen vaccine inserts followed by booster immunizations with a live vectored vaccine comprising the same vaccine inserts.

WO 2001/092470 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/06795
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/98.2, 188.1, 207.1, 232.1; 435/955, 461, 463, 464, 466, 476, 480; 536/23.72 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, WEST 2.0		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KENT et al. Enhanced T-Cell Immunogenicity and Protective Efficacy of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccine Regimen Consisting of Consecutive Priming with DNA and Boosting with Recombinant Fowlpox Virus. Journal of Virology, December 1998, Vol. 72, No. 12, pages 10180-10188, see entire document.	1-11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23 and 25-32
Y	BOHM et al. Routes of Plasmid DNA Vaccination that Prime Murine Humoral and Cellular Immune Responses. Vaccine. 1998, Vol. 16, No. 9/10, pages 945-954, see entire document.	1-11, 13-14, 16, 17, 19, 20, 22, 23 and 25-32
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 JUNE 2001		Date of mailing of the international search report 13 JAN 2004
Name and mailing address of the ISA/US Receiving Office (as of the priority date 1998)* Box TCT		Authorized officer Telephone No. (702) 308-1255 L. SCHEINER for

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/06795
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROBINSON et al. Neutralizing Antibody-Independent Containment of Immunodeficiency Virus Challenges by DNA Priming and Recombinant Pox Virus Booster Immunizations. Nature Medicine. May 1999, Vol. 5, No. 5, pages 526-534, see entire document.	I-II, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23 and 25-32
Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)*		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US01/06795
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: IPC (7) A61K 39/21, 39/275; A01N 68/00; C07H 21/04; C12N 15/74 15/86, 15/97 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: US CL : 424/95.2, 188.1, 207.1, 232.1; 435/455, 461, 463, 464, 466, 476, 480; 536/28.72 Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)*	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

A 6 1 K 48/00

F I

A 6 1 K 48/00

テーマコード (参考)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,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,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 スミス ジェイムズ エム.

アメリカ合衆国 ジョージア州 タッカー セブンオークス ドライブ 6 5 2 3

(72)発明者 ロス テッド エム.

アメリカ合衆国 ノースキャロライナ州 ウィンタービル トゥリートップス サークル 4 1 1
1

(72)発明者 ブライト リック アーサー

アメリカ合衆国 ジョージア州 アトランタ エヌイー ロック スプリングス ロード 4 2 6

(72)発明者 ハー ジアン

アメリカ合衆国 ジョージア州 ディケイター バレイブルック プレイス 3 2 5 1

(72)発明者 エレンバーガー デニス

アメリカ合衆国 ジョージア州 ノークロス ブロードリーン ドライブ 5 0 5 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA01 DA02 EA04 FA02 FA07 FA08 FA10 GA11

HA08 HA17

4C084 AA13 NA10 ZB092

4C085 AA03 BA55 BA58 BA69 DD62

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA10 ZB09