

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5264840号
(P5264840)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711 Z N A
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18

請求項の数 18 (全 96 頁)

(21) 出願番号	特願2010-184487 (P2010-184487)	(73) 特許権者	309040701
(22) 出願日	平成22年8月19日 (2010.8.19)		ワイス・エルエルシー
(62) 分割の表示	特願2007-516690 (P2007-516690) の分割		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O 7 9 4 0. マジソン, ファイブ ジラルダ ファームズ
原出願日	平成17年6月15日 (2005.6.15)	(74) 代理人	100078282
(65) 公開番号	特開2010-265313 (P2010-265313A)		弁理士 山本 秀策
(43) 公開日	平成22年11月25日 (2010.11.25)	(74) 代理人	100062409
審査請求日	平成22年8月19日 (2010.8.19)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/580, 438	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成16年6月17日 (2004.6.17)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	マニンダー ケー. シドゥ
(31) 優先権主張番号	60/624, 983		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 9 5
(32) 優先日	平成16年11月3日 (2004.11.3)		6, ニューシティ, ローウェル ドラ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イブ 3 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3つの完全な転写単位を有するプラスミドおよびH I Vに対する免疫応答を誘発するための免疫原組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト免疫不全症ウイルス (H I V) に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、

(a) H I V の g a g - p o l 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなる単一転写ユニットからなる第1のDNAプラスミドであって、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；

(b) 第2のDNAプラスミドであって、以下：

(i) 第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、H I V の n e f - t a t - v i f 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなる第1の転写ユニット、

(i i) 第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、H I V のエンベロップポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなる第2の転写ユニットからなり、

ここで、該第1および第2のプロモーターは異なるものであり、かつ、それぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1および第2のポリアデニル化シグナルは異なるものであり、かつ、それぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニッ

10

20

トの転写方向と同じ方向であり、該第1および第2の転写ユニットが少なくとも1キロ塩基対のスペーサー領域によって隔てられる、第2のDNAプラスミド；ならびに

(c) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つ

を含む、免疫原組成物。

【請求項2】

前記トランスフェクション促進因子がブピバカインである、請求項1に記載の免疫原組成物。

【請求項3】

前記プロモーターが、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス（SCMV）プロモーター、マウスサイトメガロウイルス（MCMV）プロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV）潜伏期関連プロモーター-1（LAP1）、シミアンウイルス40プロモーター、ヒト伸長因子1 α プロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群から選択される、請求項1に記載の免疫原組成物。

10

【請求項4】

前記ポリアデニル化シグナルが、ウサギ β -グロビンポリ（A）シグナル、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA、ヒト α -グロビンポリA、SV40ポリA、ヒト β -グロビンポリA、ポリオーマウイルスポリAおよびウシ成長ホルモンポリAからなる群より選択される、請求項1に記載の免疫原組成物。

20

【請求項5】

前記第1のプラスミドにおける前記プロモーターがヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーターである、請求項3に記載の免疫原組成物。

【請求項6】

前記第1のプラスミドにおける前記ポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモンポリAのポリアデニル化シグナルである、請求項4に記載の免疫原組成物。

【請求項7】

前記第1のDNAプラスミドがHIVのgag-pol融合ポリペプチドをコードし、HIVのgag遺伝子およびpol遺伝子の前記融合体、または、gag-pol遺伝子がHIVの単離体HXB2に由来する、請求項1に記載の免疫原組成物。

30

【請求項8】

前記第2のプラスミドにおける前記第1のプロモーターがヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーターである、請求項3に記載の免疫原組成物。

【請求項9】

前記第2のプラスミドにおける前記第1のポリアデニル化シグナルがSV40ポリAのポリアデニル化シグナルである、請求項4に記載の免疫原組成物。

【請求項10】

前記HIV nef-tat-vif融合ポリペプチドが、HIVのnef遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子の融合体（ntv）から発現される、nef、tatおよびvifの融合タンパク質（NTV）である、請求項1に記載の免疫原組成物。

40

【請求項11】

HIVのnef遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子の前記融合体、または、ntv遺伝子がHIVの単離体NL4-3に由来する、請求項10に記載の免疫原組成物。

【請求項12】

前記第2のプラスミドにおける前記第2のプロモーターがサルサイトメガロウイルス（SCMV）プロモーターである、請求項3に記載の免疫原組成物。

【請求項13】

前記第2のプラスミドにおける前記第2のポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモン（BGH）のポリアデニル化シグナルである、請求項4に記載の免疫原組成物。

【請求項14】

50

前記H I VエンベロープポリペプチドがH I Vの初代単離体6 1 0 1に由来する、請求項1に記載の免疫原組成物。

【請求項15】

前記免疫原組成物が、生体内エレクトロポレーションを使用して哺乳動物に投与されることを特徴とする、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項16】

前記エレクトロポレーションが、約25V/cm～約800V/cmの範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激する工程を包含する、請求項15に記載の免疫原性組成物。

【請求項17】

前記第1のプラスミドにおける前記プロモーターがヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーターである、請求項15に記載の免疫原組成物。

【請求項18】

前記第1のプラスミドにおける前記ポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモンポリAのポリアデニル化シグナルである、請求項17に記載の免疫原組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（発明の分野）

本発明は、抗原に対する予防的免疫応答および治療的免疫応答を改善するためのプラスミド、免疫原組成物および方法に関連する。

【背景技術】

【0002】

（発明の背景）

プラスミドDNAに基づく免疫原組成物を使用する免疫化は、感染性疾患を防止または処置するための方法を開発するために、あるいは、進行中の疾患プロセスを処置することにおいて有用な強力なツールである。プラスミドDNA免疫化が動物モデルにおいて広範囲に試験されており、動物モデルでは、広範囲の様々な感染性媒介体および腫瘍抗原に対する細胞性免疫応答および体液性免疫応答の両方を誘発することにおいて効果的であることが見出されている。非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3を参照のこと。

【0003】

プラスミドDNA免疫化の重要な利点は、様々な遺伝子がクローン化され、改変され、かつ、関連した転写後修飾、発現レベル、適切な細胞内輸送および抗原提示を可能にするような方法で、可能性のあるプラスミドDNA発現ベクターに配置され得ることである。DNA免疫化のために有用なプラスミドDNAベクターは、レポーター遺伝子または治療遺伝子の送達のために用いられるプラスミドDNAベクターと類似する。プラスミドDNAに基づく免疫化では、被験者の細胞装置が、外来タンパク質を生じさせるために使用され、かつ、被験者の免疫系が、そのタンパク質抗原に対する免疫応答を仕掛けるために刺激される。そのようなプラスミドDNAベクターは一般には、広範囲の宿主細胞範囲において高レベルの遺伝子発現を行わせるための強力なウイルスプロモーター／エンハンサーエレメント、および、発現したmRNAの適切な終結を確実にするためのポリアデニル化シグナルである真核生物の転写制御エレメントを含有する。ウイルスの調節エレメントはプラスミドDNAベクターにおける使用に好都合である一方で、改変されていないウイルスベクターを、関連した遺伝子を発現させるために使用することは、プラスミドDNAでは遭遇しなかった安全上の問題および技術的な問題を引き起こす場合がある。

【0004】

しかしながら、現在のプラスミドDNA設計では、多数の遺伝子を1つのベクター骨格から1個の標的細胞において発現させることが制限される。従って、多数の遺伝子を移入および発現させるためには、別個のプラスミドによる標的細胞の同時トランスフェクションが要求される。細胞が多数のプラスミドにより同時トランスフェクションされなければ

10

20

30

40

50

ならないとき、すべてのコードされた遺伝子の最適な発現を達成することは、特に、プラスミドがインビボで使用されているときには困難である。これらの制限を克服し、かつ、2つ以上の遺伝子を発現させるための以前の試みには、下記の使用が含まれる：ウイルスベクター、プロウイルスDNAからの多数の選択的スプライシングされた転写物、遺伝子の融合、ウイルス由来のIRES配列（内部リボソーム進入部位）を含有する二シストロン性ベクター、および、二重発現ベクター。非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8を参照のこと。

【0005】

既存のプラスミド設計はどれも、3つ以上の独立したオープンリーディングフレームをヒト免疫原組成物において発現させるために好適なDNAプラスミドを提供するという問題を解決していない。二シストロン性ベクターの場合においては、多くの場合、IRESの上流側で転写された最初の遺伝子のみがプラスミドベクターまたはレトロウイルスベクターのいずれかから強く発現されるだけである。非特許文献9；非特許文献10を参照のこと。他方で、二重発現カセットがより良好な成績をもたらしている。例えば、2つの独立したカセットを有する1つのプラスミドを用いた、B7-1およびヒトガン胎児性抗原（CEA）についてのcDNAの同時送達、別々のプラスミドと比較したとき、はるかに優れた免疫応答をもたらしたことが見出されていた。非特許文献4を参照のこと。しかしながら、この場合、関与した2つの独立したカセットはともに、相同的なHCMVプロモーター配列およびウシ成長ホルモン（BGH）ポリアデニル化配列からなっていた。プラスミド骨格内における相同的な配列の存在は反復配列間の組換えの可能性を増大させ、ベクターの不安定性をもたらすので、プラスミド内の相同的な配列の存在はそのプラスミドをDNA免疫原組成物における使用に適さなくする。

プラスミドDNAベクターをヒト免疫原組成物における使用のために設計するときに直面するもう1つの制約では、プラスミドのサイズおよび構成が伴う。複数の転写ユニットがプラスミドに加えられるとき、転写ユニット間の干渉が、例えば、立体的障害の形態で生じ得る。細胞のRNA転写複合体は、多転写ユニットプラスミド上の多数の部位に結合し、DNAを解きほぐし、遺伝子を効果的に転写することができなければならない。単にプラスミドをより大きくすることは、プラスミドの不安定性、プラスミド製造における困難さ、および、最も重要なことではあるが、服用のための検討事項を含むいくつかの理由から、必ずしも最良の解決策ではない。改善されたプラスミドDNA多重転写ユニットベクターを設計するために、遺伝子の設置、オープンリーディングフレームの間隔および転写方向、発現レベル、製造の容易さ、安全性、ならびに、対象を免疫化するために必要なベクターの最終的な用量を考慮しなければならない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Donnelly J Jら、Ann. Rev. Immunol.、1997年、第15巻、p. 617～48

【非特許文献2】Iwasaki Aら、J Immunol、1997年、第158巻、第10号、p. 4591～601

【非特許文献3】Wayne C. L. およびBennett M.、Crit. Rev. Immunol.、1998年、第18巻、p. 449～484

【非特許文献4】Conry R. M. ら、Gene Therapy、1996年、第3巻、第1号、p. 67～74

【非特許文献5】Chen T T. ら、Journal of Immunology、1994年、第153巻、第10号、p. 4775～87

【非特許文献6】Ayyavoo V. ら、AIDS、2000年、第14巻、第1号、p. 1～9

【非特許文献7】Amaral R. R. ら、Vaccine、2002年、第20巻、第15号、p. 1949～55

10

20

30

40

50

【非特許文献8】Singh Gら、Vaccine、2002年、第20巻、p. 1400～1411

【非特許文献9】Sugimoto Y. ら、Hum. Gen. Ther.、1995年、第6巻、p. 905～915

【非特許文献10】Mizoguchi Hら、Mol. Ther.、2000年、第1巻、p. 376～382

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、多くのタンパク質に対する広範囲の免疫応答が要求される場合、HIVのような複雑な病原体に由来する多数のタンパク質を発現させることにおいて使用される革新的なプラスミドDNAの非ウイルスベクターの設計が依然として求められている。加えて、多数のHIV遺伝子の高レベルの発現を1個の細胞において行わせることができる多価のDNA型免疫原組成物が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

1つの実施形態において、本発明は、(a)第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニットと、(b)第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットと、(c)第3のプロモーターおよび第3のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第3のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第3の転写ユニットとを含み、該第1のプロモーター、該第2のプロモーターおよび該第3のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1のポリアデニル化シグナル、該第2のポリアデニル化シグナルおよび該第3のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来するDNAプラスミドを提供する。本発明の別の実施形態において、第1、第2および第3のポリペプチドが真核生物細胞において発現される。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

DNAプラスミドであって、以下：

(a)第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニット；

(b)第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニット；

(c)第3のプロモーターおよび第3のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第3のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第3の転写ユニット；

を含み、

該第1のプロモーター、該第2のプロモーターおよび該第3のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1のポリアデニル化シグナル、該第2のポリアデニル化シグナルおよび該第3のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第3の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、

10

20

30

40

50

該第 1 の転写ユニットについての転写方向が該第 2 の転写ユニットの転写方向とは反対方向であり、かつ、該第 3 の転写ユニットの転写方向とは反対方向である、DNA プラスミド。

(項目 2)

前記第 1、第 2 および第 3 のポリペプチドが真核生物細胞において発現される、項目 1 に記載のプラスミド。

(項目 3)

前記第 1、第 2 および第 3 のプロモーターが真核生物細胞において活性である、項目 1 に記載のプラスミド。

(項目 4)

前記第 1、第 2 および第 3 のプロモーターが、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス (SCMV) プロモーター、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) 潜伏期関連プロモーター-1 (LAP1)、シミアンウイルス 40 プロモーター、ヒト伸長因子 1 α プロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群より選択される、項目 1 に記載のプラスミド。

(項目 5)

前記第 1、第 2 および第 3 のポリアデニル化シグナルが、ウサギ β -グロビンポリ (A) シグナル、合成ポリ A、HSV チミジンキナーゼポリ A、ヒト α グロビンポリ A、SV 40 ポリ A、ヒト β グロビンポリ A、ポリオーマウイルスポリ A およびウシ成長ホルモンポリ A からなる群より選択される、項目 1 に記載のプラスミド。

(項目 6)

前記第 1 のプロモーターがサルサイトメガロウイルス (SCMV) プロモーターである、項目 4 に記載のプラスミド。

(項目 7)

前記第 1 のポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモン (BGH) のポリアデニル化シグナルである、項目 5 に記載のプラスミド。

(項目 8)

前記第 2 のプロモーターがヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 即時初期プロモーターである、項目 4 に記載のプラスミド。

(項目 9)

前記第 2 のポリアデニル化シグナルがシミアンウイルス 40 (SV 40) のポリアデニル化シグナルである、項目 5 に記載のプラスミド。

(項目 10)

前記第 3 のプロモーターが単純ヘルペスウイルス (HSV) 潜伏期関連プロモーター-1 である、項目 4 に記載のプラスミド。

(項目 11)

前記第 3 のポリアデニル化シグナルがウサギ β -グロビンのポリアデニル化シグナルである、項目 5 に記載のプラスミド。

(項目 12)

前記第 1 の転写ユニットが HIV の gag 遺伝子および pol 遺伝子の融合体から gag-pol 融合タンパク質を発現する、項目 1 に記載のプラスミド。

(項目 13)

HIV の gag 遺伝子および pol 遺伝子の前記融合体、または、gag-pol 遺伝子が HIV の単離体 HXB 2 に由来する、項目 12 に記載のプラスミド。

(項目 14)

前記第 2 の転写ユニットが HIV のエンベロープ遺伝子からエンベロープタンパク質を発現する、項目 1 に記載のプラスミド。

(項目 15)

前記エンベロープ遺伝子が HIV の初代単離体 6101 に由来する、項目 14 に記載のプ

10

20

30

40

50

ラスミド。

(項目16)

前記第3の転写ユニットが、HIVのnef遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子の融合体(ntv)から、nef、tatおよびvifの融合タンパク質(NTV)を発現する、項目1に記載のプラスミド。

(項目17)

HIVのnef遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子の前記融合体、または、ntv遺伝子がHIVの単離体NL4-3に由来する、項目16に記載のプラスミド。

(項目18)

プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、選択マーカーをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、項目1に記載のプラスミド。

10

(項目19)

前記選択マーカーが、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子およびクロラムフェニコール耐性遺伝子からなる群より選択される、項目18に記載のプラスミド。

(項目20)

前記選択マーカーの存在位置が、スペーサー領域1、スペーサー領域2およびスペーサー領域3からなる群より選択される、項目19に記載のプラスミド。

(項目21)

20

前記選択マーカーの存在位置がスペーサー領域2である、項目20に記載のプラスミド。

(項目22)

細菌の複製起点をさらに含む、項目1に記載のプラスミド。

(項目23)

前記複製起点の存在位置が、スペーサー領域1、スペーサー領域2およびスペーサー領域3からなる群より選択される、項目22に記載のプラスミド。

(項目24)

前記選択マーカーの存在位置がスペーサー領域3である、項目23に記載のプラスミド。

(項目25)

前記複製起点がpUCの複製起点である、項目22に記載のプラスミド。

30

(項目26)

前記プラスミドの全体的なサイズが約15キロ塩基対未満である、項目1に記載のプラスミド。

(項目27)

スペーサー領域1が約400塩基対未満である、項目1に記載のプラスミド。

(項目28)

スペーサー領域2が約1100塩基対未満である、項目1に記載のプラスミド。

(項目29)

スペーサー領域3が約1100塩基対未満である、項目1に記載のプラスミド。

(項目30)

40

選択された抗原に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、該免疫原組成物は、以下：

(a) DNAプラスミドであって、以下：

(i) 第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニット、

(ii) 第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニット、

(iii) 第3のプロモーターおよび第3のポリアデニル化シグナルを含む調節エレ

50

ントに作動可能に連結された、第3のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第3の転写ユニット、
を含み、

ここで、該第1、第2および第3のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1、第2および第3のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第3の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であり、かつ、該第3の転写ユニットの転写方向とは反対方向である、DNAプラスミド；および

(b) 薬学的に受容可能な希釈剤、アジュバント、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む、免疫原組成物。

(項目31)

前記トランスフェクション促進因子がブピバカインである、項目30に記載の免疫原組成物。

(項目32)

前記第1、第2および第3のプロモーターが、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス (SCMV) プロモーター、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) 潜伏期間連プロモーター-1 (LAP1)、シミアンウイルス40プロモーター、ヒト伸長因子1 α プロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群より選択される、項目30に記載の免疫原組成物。

(項目33)

前記第1、第2および第3のポリアデニル化シグナルが、ウサギ β -グロビンポリ (A) シグナル、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA、ヒト α -グロビンポリA、SV40ポリA、ヒト β -グロビンポリA、ポリオーマウイルスポリAおよびウシ成長ホルモンポリAからなる群より選択される、項目30に記載の免疫原組成物。

(項目34)

前記第1のポリペプチドが、HIVのgag遺伝子およびpol遺伝子の融合体から発現されたgag-pol融合タンパク質である、項目30に記載の免疫原組成物。

(項目35)

前記第2のポリペプチドが、HIVのエンベロープ遺伝子から発現されたエンベロープタンパク質である、項目30に記載の免疫原組成物。

(項目36)

前記第3のポリペプチドが、HIVのnef遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子の融合体 (ntv) から発現された、nef、tatおよびvifの融合タンパク質 (NTV) である、項目30に記載の免疫原組成物。

(項目37)

選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、

(a) DNAプラスミドであって、以下：

(i) 第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニット、

(ii) 第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第

10

20

30

40

50

2の転写ユニット、

(i i i) 第3のプロモーターおよび第3のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第3のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第3の転写ユニット、
を含み、

ここで、該第1、第2および第3のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1、第2および第3のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第3の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であり、かつ、該第3の転写ユニットの転写方向とは反対方向である、DNAプラスミド；および

(b) 薬学的に受容可能な希釈剤、アジュバント、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つ

を含む、免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を包含する、方法。

(項目38)

前記免疫原組成物が、生体内エレクトロポレーションを使用して哺乳動物に投与される、項目37に記載の方法。

(項目39)

前記エレクトロポレーションが、約25V/cm～約800V/cmの範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激する工程を包含する、項目38に記載の方法。

(項目40)

前記トランスフェクション促進因子がブピバカインである、項目37に記載の方法。

(項目41)

前記第1、第2および第3のプロモーターが、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス(SCMV)プロモーター、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)プロモーター、単純ヘルペスウイルス(HSV)潜伏期関連プロモーター-1(LAP1)、シミアンウイルス40プロモーター、ヒト伸長因子1αプロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群より選択される、項目37に記載の方法。

(項目42)

前記第1、第2および第3のポリアデニル化シグナルが、ウサギβ-グロビンポリ(A)シグナル、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA、ヒトαグロビンポリA、SV40ポリA、ヒトβグロビンポリA、ポリオーマウイルスポリAおよびウシ成長ホルモンポリAからなる群より選択される、項目37に記載の方法。

(項目43)

ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、

(a) HIVのgag-pol融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；

(b) 第2のDNAプラスミドであって、以下：

(i) 第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニット、

(i i) 第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメン

10

20

30

40

50

トに作動可能に連結された、H I Vのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットを含み、

ここで、該第1および第2のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1および第2のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向と同じ方向であり、該第1および第2の転写ユニットが少なくとも1キロ塩基対のスペーサー領域によって隔てられる、第2のDNAプラスミド；および

(c) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つ

を含む、免疫原組成物。

(項目44)

前記トランスフェクション促進因子がブピバカインである、項目43に記載の免疫原組成物。

(項目45)

前記プロモーターが、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス(SCMV)プロモーター、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)プロモーター、単純ヘルペスウイルス(HSV)潜伏期関連プロモーター-1(LAP1)、シミアンウイルス40プロモーター、ヒト伸長因子1 α プロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群から選択される、項目43に記載の免疫原組成物。

(項目46)

前記ポリアデニル化シグナルが、ウサギ β -グロビンポリ(A)シグナル、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA、ヒト α -グロビンポリA、SV40ポリA、ヒト β -グロビンポリA、ポリオーマウイルスポリAおよびウシ成長ホルモンポリAからなる群より選択される、項目43に記載の免疫原組成物。

(項目47)

前記第1のプラスミドにおける前記プロモーターがヒトサイトメガロウイルス(HCMV)即時初期プロモーターである、項目45に記載の免疫原組成物。

(項目48)

前記第1のプラスミドにおける前記ポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモンポリAのポリアデニル化シグナルである、項目46に記載の免疫原組成物。

(項目49)

前記第1のDNAプラスミドがH I Vのg a g-p o l融合ポリペプチドをコードし、H I Vのg a g遺伝子およびp o l遺伝子の前記融合体、または、g a g-p o l遺伝子がH I Vの単離体H X B 2に由来する、項目43に記載の免疫原組成物。

(項目50)

前記第2のプラスミドにおける前記第1のプロモーターがヒトサイトメガロウイルス(HCMV)即時初期プロモーターである、項目45に記載の免疫原組成物。

(項目51)

前記第2のプラスミドにおける前記第1のポリアデニル化シグナルがSV40ポリAのポリアデニル化シグナルである、項目46に記載の免疫原組成物。

(項目52)

前記H I V n e f-t a t-v i f融合ポリペプチドが、H I Vのn e f遺伝子、t a t遺伝子およびv i f遺伝子の融合体(n t v)から発現される、n e f、t a tおよびv i fの融合タンパク質(NTV)である、項目43に記載の免疫原組成物。

(項目53)

H I Vのn e f遺伝子、t a t遺伝子およびv i f遺伝子の前記融合体、または、n t v遺伝子がH I Vの単離体N L 4-3に由来する、項目52に記載の免疫原組成物。

10

20

30

40

50

(項目54)

前記第2のプラスミドにおける前記第2のプロモーターがサルサイトメガロウイルス (SCMV) プロモーターである、項目45に記載の免疫原組成物。

(項目55)

前記第2のプラスミドにおける前記第2のポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモン (BGH) のポリアデニル化シグナルである、項目46に記載の免疫原組成物。

(項目56)

前記HIVエンベロープポリペプチドがHIVの初代単離体6101に由来する、項目43に記載の免疫原組成物。

(項目57)

選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、該方法が、以下：

(a) HIVの gag-pol 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；

(b) 第2のDNAプラスミドであって、以下：

(i) 第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVの nef-tat-vif 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニット、

(ii) 第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニット、を含み、

ここで、該第1および第2のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1および第2のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向と同じ方向であり、該第1および第2の転写ユニットが少なくとも1キログラム塩基対のスペーサー領域によって隔てられる、第2のDNAプラスミド；および

(c) 薬学的に受容可能な希釈剤、アジュバント、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つ

を含む免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を包含する、方法。

(項目58)

前記免疫原組成物が、生体内電トロポレーションを使用して哺乳動物に投与される、項目57に記載の方法。

(項目59)

前記電トロポレーションが、約25V/cm～約800V/cmの範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激する工程を包含する、項目58に記載の方法。

(項目60)

前記トランスフェクション促進因子がブピバカインである、項目57に記載の方法。

(項目61)

前記プロモーターが、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス (SCMV) プロモーター、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) 潜伏期関連プロモーター-1 (LAP1)、シミアンウイルス40プロモーター、ヒト伸長因子1αプロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群より選択される、項目57に記載の方法。

(項目62)

前記ポリアデニル化シグナルが、ウサギβ-グロビンポリ (A) シグナル、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA、ヒトαグロビンポリA、SV40ポリA、ヒトβグロビンポリA、ポリオーマウイルスポリAおよびウシ成長ホルモンポリAからなる群より選択

10

20

30

40

50

される、項目 57 に記載の方法。

(項目 63)

前記第 1 のプラスミドにおける前記プロモーターがヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 即時初期プロモーターである、項目 61 に記載の免疫原組成物。

(項目 64)

前記第 1 のプラスミドにおける前記ポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモンポリ A のポリアデニル化シグナルである、項目 62 に記載の免疫原組成物。

(項目 65)

前記第 1 の DNA プラスミドが HIV の gag-pol 融合ポリペプチドをコードし、HIV の gag 遺伝子および pol 遺伝子の前記融合体、または、gag-pol 遺伝子が HIV の単離体 HXB2 に由来する、項目 57 に記載の方法。

10

(項目 66)

前記第 2 のプラスミドにおける前記第 1 のプロモーターがヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 即時初期プロモーターである、項目 61 に記載の方法。

(項目 67)

前記第 2 のプラスミドにおける前記第 1 のポリアデニル化シグナルが SV40 ポリ A のポリアデニル化シグナルである、項目 62 に記載の方法。

(項目 68)

前記 HIV nef-tat-vif 融合ポリペプチドが、HIV の nef 遺伝子、tat 遺伝子および vif 遺伝子の融合体 (ntv) から発現される、nef、tat および vif の融合タンパク質 (NTV) である、項目 57 に記載の方法。

20

(項目 69)

HIV の nef 遺伝子、tat 遺伝子および vif 遺伝子の前記融合体、または、ntv 遺伝子が HIV の単離体 NL4-3 に由来する、項目 68 に記載の方法。

(項目 70)

前記第 2 のプラスミドにおける前記第 2 のプロモーターがサルサイトメガロウイルス (SCMV) プロモーターである、項目 61 に記載の方法。

(項目 71)

前記第 2 のポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモン (BGH) のポリアデニル化シグナルである、項目 62 に記載の方法。

30

(項目 72)

前記 HIV エンベロープポリペプチドが HIV の初代単離体 6101 に由来する、項目 57 に記載の方法。

(項目 73)

ヒト免疫不全症ウイルス (HIV) に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、該免疫原組成物が、以下：

(a) HIV のエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 1 の DNA プラスミド；

(b) HIV の gag-pol 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 2 の DNA プラスミド；

40

(c) HIV の nef-tat-vif 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 3 の DNA プラスミド；

(d) アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 4 の DNA プラスミド；および

(e) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも 1 つ

50

を含む、免疫原組成物。

(項目 7 4)

選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、該方法が、以下：

(a) H I V のエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 1 の D N A プラスミド；

(b) H I V の g a g - p o l 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 2 の D N A プラスミド；

(c) H I V の n e f - t a t - v i f 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 3 の D N A プラスミド；

(d) アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 4 の D N A プラスミド；および

(e) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも 1 つ

を含む、免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を包含する、方法。

(項目 7 5)

前記免疫原組成物が、生体内エレクトロポレーションを使用して哺乳動物に投与される、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 7 6)

前記エレクトロポレーションが、約 2 5 V / c m ~ 約 8 0 0 V / c m の範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激する工程を包含する、項目 7 5 に記載の方法。

(項目 7 7)

H I V に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、該免疫原組成物が、以下：

(a) H I V のエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 1 の D N A プラスミド；

(b) H I V の g a g ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 2 の D N A プラスミド；

(c) H I V の p o l ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 3 の D N A プラスミド；

(d) H I V の n e f - t a t - v i f 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 4 の D N A プラスミド；

(e) アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 5 の D N A プラスミド；および

(f) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも 1 つ

を含む、免疫原組成物。

(項目 7 8)

選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、該方法が、以下：

(a) H I V のエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 1 の D N A プラスミド；

(b) HIVのgagポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第2のDNAプラスミド；

(c) HIVのpolポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第3のDNAプラスミド；

(d) HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第4のDNAプラスミド；

(e) アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第5のDNAプラスミド；および

(f) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つ

を含む、免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を包含する、方法。

(項目79)

前記免疫原組成物が、生体内エレクトロポレーションを使用して哺乳動物に投与される、項目78に記載の方法。

(項目80)

前記エレクトロポレーションが、約25V/cm～約800V/cmの範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激する工程を包含する、項目79に記載の方法。

(項目81)

ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、該免疫原組成物が、以下：

(a) HIVのgagポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；

(b) HIVのpolポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第2のDNAプラスミド；

(c) 第3のDNAプラスミドであって、以下：

(i) 第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニット、

(ii) 第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットを含み、

ここで、該第1および第2のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1および第2のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向と同じ方向であり、該第1および第2の転写ユニットが少なくとも1キロ塩基対のスペーサー領域によって隔てられる、第3のプラスミド；および

(d) アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第4のDNAプラスミド；および

(e) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つ

を含む、免疫原組成物。

10

20

30

40

50

(項目 8 2)

前記プロモーターが、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス (SCMV) プロモーター、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) 潜伏期関連プロモーター-1 (LAP1)、シミアンウイルス 40 プロモーター、ヒト伸長因子 1 α プロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群より選択される、項目 8 1 に記載の組成物。

(項目 8 3)

前記ポリアデニル化シグナルが、ウサギ β -グロビンポリ (A) シグナル、合成ポリ A、HSV チミジンキナーゼポリ A、ヒト α グロビンポリ A、SV 40 ポリ A、ヒト β グロビンポリ A、ポリオーマウイルスポリ A およびウシ成長ホルモンポリ A からなる群より選択される、項目 8 1 に記載の組成物。

10

(項目 8 4)

選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、該方法が、以下：

(a) HIV の gag ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 1 の DNA プラスミド；

(b) HIV の pol ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 2 の DNA プラスミド；

20

(c) 第 3 の DNA プラスミドであって、以下：

(i) 第 1 のプロモーターおよび第 1 のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIV の nef-tat-vif 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の転写ユニット、

(ii) 第 2 のプロモーターおよび第 2 のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIV のエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の転写ユニットを含み、

ここで、該第 1 および第 2 のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第 1 および第 2 のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、

30

該第 1 の転写ユニットについての転写方向が該第 2 の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第 1 の転写ユニットについての転写方向が該第 2 の転写ユニットの転写方向と同じ方向であり、該第 1 および第 2 の転写ユニットが少なくとも 1 キロ塩基対のスペーサー領域によって隔てられる、第 3 のプラスミド；および

(d) アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第 4 の DNA プラスミド；および

(e) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも 1 つ

を含む免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を包含する、方法。

40

(項目 8 5)

前記免疫原組成物が、生体内エレクトロポレーションを使用して哺乳動物に投与される、項目 8 4 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記エレクトロポレーションが、約 25 V/cm ~ 約 800 V/cm の範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激する工程を包含する、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記トランスフェクション促進因子がブピバカインである、項目 8 6 に記載の方法。

(項目 8 8)

選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化するための医薬品の製造における、項目 3

50

7～42、57～62、65～72、74～76、78～80または84～87のいずれか1項に記載される免疫原組成物の使用。

【0009】

別の実施形態において、本発明は、選択された抗原に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、(a)(i)第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニットと、(ii)第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットと、(iii)第3のプロモーターおよび第3のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第3のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第3の転写ユニットとを含み、該第1、第2および第3のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、該第1、第2および第3のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来するDNAプラスミド、および、(b)薬学的に受容可能な希釈剤、アジュバント、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を提供する。本発明の1つの具体的な実施形態において、トランスフェクション促進因子がブピバカインである。本発明の別の実施形態において、第1、第2および第3のポリペプチドが真核生物細胞において発現される。

【0010】

本発明の特定の実施形態において、免疫原組成物は、生体内エレクトロポレーションを使用して哺乳動物に投与される。1つの具体的な実施形態において、エレクトロポレーションは、約25V/cm～約800V/cmの範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激することを伴う。

【0011】

さらに別の実施形態において、本発明は、選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、(a)(i)第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニットと、(ii)第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットと、(iii)第3のプロモーターおよび第3のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、第3のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第3の転写ユニットとを含み、該第1、第2および第3のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、該第1、第2および第3のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来するDNAプラスミド；および(b)薬学的に受容可能な希釈剤、アジュバント、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を包含する方法を提供する。本発明の別の実施形態において、第1、第2および第3のポリペプチドが真核生物細胞において発現される。

【0012】

本発明の別の実施形態において、選択された抗原は、細菌、ウイルス、アレルゲンおよび腫瘍からなる群に由来する。1つの具体的な実施形態において、選択された抗原は、ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス1型、パラインフルエンザウイルス2型、パラインフルエンザウイルス3型、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルスおよびコロナウイルス(SARS)からなる群から選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である。

【0013】

本発明のさらに別の実施形態において、選択された抗原は、*Haemophilus influenzae*（インフルエンザ菌）（分類可能型および分類不能型の両方）、*Haemophilus somnus*、*Moraxella catarrhalis*、*Streptococcus pneumoniae*（肺炎連鎖球菌）、*Streptococcus pyogenes*（化膿連鎖球菌）、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus faecalis*（糞便連鎖球菌）、*Helicobacter pylori*、*Neisseria meningitidis*（髄膜炎菌）、*Neisseria gonorrhoeae*（淋菌）、*Chlamydia trachomatis*（トラコーマクラミジア）、*Chlamydia pneumoniae*（肺炎クラミジア）、*Chlamydia psittaci*（オウム病クラミジア）、*Bordetella pertussis*（百日咳菌）、*Alloiococcus otiditis*、*Salmonella typhi*（チフス菌）、*Salmonella typhimurium*（ネズミチフス菌）、*Salmonella choleraesuis*（豚コレラ菌）、*Escherichia coli*（大腸菌）、*Shigella*（赤痢菌属）、*Vibrio cholerae*（コレラ菌）、*Corynebacterium diphtheriae*（ジフテリア菌）、*Mycobacterium tuberculosis*（結核菌）、*Mycobacterium avium*—*Mycobacterium intracellulare*複合体、*Proteus mirabilis*、*Proteus vulgaris*、*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）、*Staphylococcus epidermidis*（表皮ブドウ球菌）、*Clostridium tetani*（破傷風菌）、*Leptospira interrogans*、*Borrelia burgdorferi*、*Pasteurella haemolytica*、*Pasteurella multocida*、*Actinobacillus pleuropneumoniae*および*Mycoplasma gallisepticum*からなる群から選択される細菌に由来する細菌抗原である。

【0014】

本発明の1つの実施形態において、脊椎動物宿主は、哺乳動物、鳥類および魚類からなる群から選択される。本発明の特定の実施形態において、脊椎動物宿主は、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌおよびネコの生物種からなる群から選択される哺乳動物である。

【0015】

本発明の1つの実施形態において、第1、第2および第3のプロモーターは真核生物細胞において活性である。本発明の他の実施形態において、第1、第2および第3のプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス（SCMV）プロモーター、マウスサイトメガロウイルス（MCMV）プロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV）潜伏期関連プロモーター-1（LAP1）、シミアンウイルス40プロモーター、ヒト伸長因子1 α プロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群から選択される。

【0016】

本発明の特定の実施形態において、第1、第2および第3のポリアデニル化シグナルは、ウサギ β -グロビンポリ（A）シグナル、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA、ヒト α -グロビンポリA、SV40ポリA、ヒト β -グロビンポリA、ポリオーマウイルスポリAおよびウシ成長ホルモンポリAからなる群から選択される。

【0017】

本発明の具体的な実施形態において、第1の転写ユニットはHIVのgag遺伝子およびpol遺伝子の融合体からgag-pol融合タンパク質を発現する。本発明の1つの実施形態において、HIVのgag遺伝子およびpol遺伝子の融合体、または、gag-pol遺伝子はHIVの単離体HXB2に由来する。

【0018】

本発明の特定の実施形態において、第2の転写ユニットはH I Vのエンベロープ遺伝子からエンベロープタンパク質を発現する。本発明の具体的な実施形態において、エンベロープ遺伝子はH I Vの初代単離体6 1 0 1に由来する。

【0019】

本発明の具体的な実施形態において、第3の転写ユニットは、H I Vのn e f 遺伝子、t a t 遺伝子およびv i f 遺伝子の融合体（n t v）から、n e f、t a t およびv i f の融合タンパク質（N T V）を発現する。本発明の特定の実施形態において、H I Vのn e f 遺伝子、t a t 遺伝子およびv i f 遺伝子の融合体（n t v）、または、n t v 遺伝子はH I Vの単離体N L 4-3に由来する。

【0020】

本発明の具体的な実施形態において、三転写ユニットプラスミドにおいて、第1の転写ユニットについての転写方向が第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向である。本発明の別の実施形態において、第1の転写ユニットについての転写方向が第3の転写ユニットの転写方向とは反対方向である。

【0021】

本発明の特定の実施形態において、本発明は、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、選択マーカをコードするヌクレオチド配列をさらに含む三転写ユニットプラスミドを提供する。1つの実施形態において、選択マーカは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子およびクロラムフェニコール耐性遺伝子からなる群から選択される。別の実施形態において、選択マーカの存在位置が、スパーサー領域1、スパーサー領域2およびスパーサー領域3からなる群から選択される。具体的な実施形態において、選択マーカの存在位置はスパーサー領域2である。

【0022】

本発明の別の実施形態において、本発明は、細菌の複製起点をさらに含む三転写ユニットプラスミドを提供する。別の実施形態において、複製起点の存在位置が、スパーサー領域1、スパーサー領域2およびスパーサー領域3からなる群から選択される。具体的な実施形態において、選択マーカの存在位置はスパーサー領域3である。特定の実施形態において、複製起点はp U Cの複製起点である。

【0023】

本発明の1つの実施形態において、本発明は、全体的なサイズが約15キロ塩基対未満である三転写ユニットプラスミドを提供する。本発明の別の実施形態において、スパーサー領域1が約400塩基対未満であり、スパーサー領域2が約1100塩基対未満であり、スパーサー領域3が約1100塩基対未満である。

【0024】

1つの実施形態において、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、（a）H I Vのg a g-p o l 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；（b）（i）第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、H I Vのn e f-t a t-v i f 融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニットと、（i i）第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、H I Vのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットとを含み、該第1および第2のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1および第2のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、また、第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向と同じ方向であり、該第1および第2の転写ユニットが少なくとも1キロ塩基対のスパーサー領域

10

20

30

40

50

によって隔てられる第2のDNAプラスミド；および（c）薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を提供する。本発明の具体的な実施形態において、トランスフェクション促進因子がブピバカインである。具体的な実施形態において、第1のプラスミドにおけるプロモーターがヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーターであり、第1のプラスミドにおけるポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモンポリAのポリアデニル化シグナルであり、第1のDNAプラスミドがHIVのgag-pol融合ポリペプチドをコードし、この場合、HIVのgag遺伝子およびpol遺伝子の融合体、または、gag-pol遺伝子はHIVの単離体HXB2に由来する。特定の実施形態において、第2のプラスミドにおける第1のプロモーターがヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーターであり、第2のプラスミドにおける第1のポリアデニル化シグナルがSV40ポリAのポリアデニル化シグナルであり、ポリペプチドが、HIVの単離体NL4-3に由来するnef遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子の融合体（ntv）から発現される、nef、tatおよびvifの融合タンパク質（NTV）である。具体的な実施形態において、第2のプラスミドにおける第2のプロモーターがサルサイトメガロウイルス（SCMV）プロモーターであり、第2のプラスミドにおける第2のポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモン（BGH）のポリアデニル化シグナルであり、コードされるエンベロープポリペプチドがHIVの初代単離体6101に由来する。

【0025】

さらにさらなる実施形態において、本発明は、選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、（a）HIVのgag-pol融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；（b）（i）第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニットと、（ii）第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットとを含み、該第1および第2のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1および第2のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、また、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向と同じ方向であり、該第1および第2の転写ユニットが少なくとも1キロ塩基対のスペーサー領域によって隔てられる第2のDNAプラスミド；および（c）薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を包含する方法を提供する。具体的な実施形態において、トランスフェクション促進因子はブピバカインである。具体的な実施形態において、第1のプラスミドにおけるプロモーターがヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーターであり、第1のプラスミドにおけるポリアデニル化シグナルがウシ成長ホルモンポリAのポリアデニル化シグナルであり、第1のDNAプラスミドがHIVのgag-pol融合ポリペプチドをコードし、この場合、HIVのgag遺伝子およびpol遺伝子の融合体、または、gag-pol遺伝子はHIVの単離体HXB2に由来する。特定の実施形態において、第2のプラスミドにおける第1のプロモーターがヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーターであり、第2のプラスミドにおける第1のポリアデニル化シグナルがSV40ポリAのポリアデニル化シグナルであり、ポリペプチドが、HIVの単離体NL4-3に由来するnef遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子の融合体（ntv）から発現される、nef、tatおよびvifの融合タンパク質（NTV）である。具体的な実施形態において、第2のプラスミドにおける第2のプロモーターがサルサイトメガロウイルス（SCMV）プロモーターであり、第2のプラスミドにおける第2のポリアデニル化シグナルが

ウシ成長ホルモン（BGH）のポリアデニル化シグナルであり、コードされるエンベロープポリペプチドがHIVの初代単離体6101に由来する。1つの実施形態において、免疫原組成物が、生体内エレクトロポレーションを使用して哺乳動物に投与される。具体的な実施形態において、エレクトロポレーションは、約25V/cm～約800V/cmの範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激することを伴う。1つの実施形態において、トランスフェクション促進因子がプピバカインである。

【0026】

1つの実施形態において、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、（a）HIVのgagポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；（b）HIVのpolポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第2のDNAプラスミド；（c）（i）第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニットと、（ii）第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットとを含み、該第1および第2のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1および第2のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、また、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向と同じ方向であり、該第1および第2の転写ユニットが少なくとも1キロ塩基対のスペーサー領域によって隔てられる第3のDNAプラスミド；および（d）アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第4のDNAプラスミド；および（e）薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を提供する。

【0027】

別の実施形態において、本発明は、選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、（a）HIVのgagポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；（b）HIVのpolポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第2のDNAプラスミド；（c）（i）第1のプロモーターおよび第1のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第1の転写ユニットと、（ii）第2のプロモーターおよび第2のポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、HIVのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第2の転写ユニットとを含み、該第1および第2のプロモーターはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、かつ、該第1および第2のポリアデニル化シグナルはそれぞれが、異なる転写ユニットに由来し、また、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向とは反対方向であるか、または、該第1の転写ユニットについての転写方向が該第2の転写ユニットの転写方向と同じ方向であり、該第1および第2の転写ユニットが少なくとも1キロ塩基対のスペーサー領域によって隔てられる第3のDNAプラスミド；および（d）アジュバントポリペプチド

をコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第4のDNAプラスミド；および（e）薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を提供する。具体的な実施形態において、エレクトロポレーションは、約25V/cm～約800V/cmの範囲での電場強度を有する電流により筋肉を電氣的に刺激することを伴う。1つの実施形態において、トランスフェクション促進因子がブピバカインである。

【0028】

1つの実施形態において、本発明は、HIVに対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、（a）HIVのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；（b）HIVのgag-pol融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第2のDNAプラスミド；（c）HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第3のDNAプラスミド；（d）アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第4のDNAプラスミド；および（e）薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を提供する。具体的な実施形態において、トランスフェクション促進因子がブピバカインである。別の実施形態において、ブピバカインを含有する免疫原組成物がエレクトロポレーションとの併用で投与される。具体的な実施形態において、HIVのエンベロープポリペプチド、gag-polポリペプチド、nef-tat-vifポリペプチドおよびアジュバントポリペプチドが真核生物細胞において発現される。1つの実施形態において、第1、第2、第3および第4のプラスミドは、真核生物細胞において活性であるプロモーターを含有する。

【0029】

1つの実施形態において、本発明は、免疫原組成物を脊椎動物宿主に投与する工程を包含する、選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法を提供し、この場合、免疫原組成物は、（a）HIVのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；（b）HIVのgag-pol融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第2のDNAプラスミド；（c）HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第3のDNAプラスミド；（d）アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第4のDNAプラスミド；および（e）薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む。具体的な実施形態において、トランスフェクション促進因子がブピバカインである。別の実施形態において、ブピバカインを含有する免疫原組成物がエレクトロポレーションとの併用で投与される。具体的な実施形態において、HIVのエンベロープポリペプチド、gag-polポリペプチド、nef-tat-vifポリペプチドおよびアジュバントポリペプチドが真核生物細胞において発現される。1つの実施形態において、第1、第2、第3および第4のプラスミドは、真核生

10

20

30

40

50

物細胞において活性であるプロモーターを含有する。

【0030】

本発明の特定の実施形態において、第1、第2、第3および第4のプラスミドは、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス（SCMV）プロモーター、マウスサイトメガロウイルス（MCMV）プロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV）潜伏期関連プロモーター-1（LAP1）、シミアンウイルス40プロモーター、ヒト伸長因子1 α プロモーターおよびヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群から選択されるプロモーターを含有する。本発明の特定の実施形態において、第1、第2、第3および第4のプラスミドは、ウサギ β -グロビンポリ（A）シグナル、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA、ヒト α グロビンポリA、SV40ポリA、ヒト β グロビンポリA、ポリオーマウイルスポリAおよびウシ成長ホルモンポリAからなる群から選択されるポリアデニル化シグナルを含有する。

10

【0031】

具体的な実施形態において、本発明は、上記で記載されるような4つのプラスミドを含み、かつ、それぞれのプラスミドがさらに、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子およびクロラムフェニコール耐性遺伝子からなる群から選択される選択マーカーを含む、HIVに対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物を提供する。別の実施形態において、それぞれのプラスミドはさらに細菌の複製起点を含む。さらに別の実施形態において、複製起点がpUCの複製起点である。

20

【0032】

本発明はまた、4つのDNAプラスミドが、調節エレメントに作動可能に連結された、2つのアジュバントポリペプチドをコードする2つのヌクレオチド配列を含む一次転写ユニットおよび二次転写ユニットを含む免疫原組成物を提供する。1つの実施形態において、一次転写ユニットは、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、IL-12のp35ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。別の実施形態において、二次転写ユニットは、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、IL-12のp40ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【0033】

別の実施形態において、本発明は、HIVに対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物であって、（a）HIVのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；（b）HIVのgagポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第2のDNAプラスミド；（c）HIVのpolポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第3のDNAプラスミド；（d）HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第4のDNAプラスミド；（e）アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第5のDNAプラスミド；および（f）薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を提供する。具体的な実施形態において、トランスフェクション促進因子がブピバカインである。別の実施形態において、ブピバカインを含有する免疫原組成物がエレクトロポレーションとの併用で投与される。1つの実施

40

50

形態において、H I Vのエンベロープポリペプチド、g a gポリペプチド、p o lポリペプチド、n e f - t a t - v i fポリペプチドおよびアジュバントポリペプチドが真核生物細胞において発現される。

【0034】

別の実施形態において、本発明は、選択された抗原に対して脊椎動物宿主を免疫化する方法であって、(a) H I Vのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアダニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第1のDNAプラスミド；(b) H I Vのg a gポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアダニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第2のDNAプラスミド；(c) H I Vのp o lポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアダニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第3のDNAプラスミド；(d) H I Vのn e f - t a t - v i f融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを含み、該単一転写ユニットが、プロモーターおよびポリアダニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第4のDNAプラスミド；(e) アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列が、プロモーターおよびポリアダニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結される第5のDNAプラスミド；および(f) 薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つを含む免疫原組成物を該脊椎動物宿主に投与する工程を包含する方法を提供する。具体的実施形態において、トランスフェクション促進因子がブピバカインである。別の実施形態において、ブピバカインを含有する免疫原組成物がエレクトロポレーションとの併用で投与される。

【0035】

本発明の1つの実施形態において、第1、第2、第3、第4および第5のプラスミドは、真核生物細胞において活性であるプロモーターを含有する。特定の実施形態において、第1、第2、第3、第4および第5のプラスミドは、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)即時初期プロモーター、サルサイトメガロウイルス(SCMV)プロモーター、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)プロモーター、および単純ヘルペスウイルス(HSV)潜伏期関連プロモーター-1(LAP1)、シミアンウイルス40プロモーター、ヒト伸長因子1 α プロモーターならびにヒト筋細胞特異的デスミンプロモーターからなる群から選択されるプロモーターを含有する。本発明の他の実施形態において、第1、第2、第3、第4および第5のプラスミドは、ウサギ β -グロビンポリ(A)シグナル、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA、ヒト α グロビンポリA、SV40ポリA、ヒト β グロビンポリA、ポリオーマウイルスポリAおよびウシ成長ホルモンポリAからなる群から選択されるポリアダニル化シグナルを含有する。

【0036】

具体的実施形態において、本発明は、上記で記載されるような5つのプラスミドを含み、かつ、それぞれのプラスミドがさらに、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子およびクロラムフェニコール耐性遺伝子からなる群から選択される選択マーカーを含む、H I Vに対する免疫応答を脊椎動物宿主において誘発するための免疫原組成物を提供する。別の実施形態において、それぞれのプラスミドはさらに細菌の複製起点を含み、この場合、複製起点はpUCの複製起点である。

【0037】

本発明はまた、第5のDNAプラスミドが、調節エレメントに作動可能に連結された、2つのアジュバントポリペプチドをコードする2つのヌクレオチド配列を含む一次転写ユ

ニットおよび二次転写ユニットを含む免疫原組成物を提供する。1つの実施形態において、一次転写ユニットは、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、I L-12のp35ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。別の実施形態において、二次転写ユニットは、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに作動可能に連結された、I L-12のp40ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

本発明の他の局面および実施形態が下記の詳細な説明において開示される。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、6つのHIV遺伝子またはHIV遺伝子構築物を真核生物細胞において3つの別個のオープンリーディングフレームから発現させるために組み立てられた例示的な三連転写ユニットDNAプラスミドの環状概略図を示す。図1は、同じプラスミドの線状の、しかし、より詳細な概略図を示す。下記の略号が使用される：SCMV：サルサイトメガロウイルスプロモーター、HCMV：ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、BGHPolA：ウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナル、kan：耐性のためのカナマイシンマーカー遺伝子、HSV1ap1：単純ヘルペスウイルス潜伏期関連プロモーター1、SV40PolA：シミアンウイルス40のポリアデニル化シグナル、SV40sd/sa：シミアンウイルス40のスプライスドナーおよびスプライスアクセプター、gag-pol：HIVのgag-pol融合体、ntv：HIVのnef-tat-vif融合体、env：HIVのエンベロープ。

【図2】図2は、293細胞におけるHIV gagの発現を示す。293細胞に2μgの示されたプラスミドDNA発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で、細胞と結合しているHIVタンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

【表34】

トランスフェクションされたプラスミド

- 102: HCMV-gag
- 201: HCMV-pol, SCMV-gag
- 203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
- 302: SCMV-gag/pol, HCMV-, Lap1-nef/tat/vif
- 204: HCMV-gag/pol, SCMV-env
- 303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif

001: インサートを含まないコントロールプラスミド

【図3】図3は、293細胞におけるHIV polの発現を示す。293細胞に2μgの示されたプラスミドDNA発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で、細胞と結合しているHIVタンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

【表 3 5】

トランスフェクションされたプラスミド

- 103: HCMV-pol
- 201: HCMV-pol, SCMV-gag
- 302: SCMV-gag/pol, HCMV-, Lap1-nef/tat/vif
- 203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
- 204: HCMV-gag/pol, SCMV-env
- 303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif

10

001: インサートを含まないコントロールプラスミド

【図 4】図 4 は、293 細胞における HIV nef / tat / vif (ntv) の発現を示す。293 細胞に 2 μg の示されたプラスミド DNA 発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で、細胞と結合している HIV タンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

【表 3 6】

トランスフェクションされたプラスミド

- 104: HCMV-ntv
- 105: Lap1-ntv
- 202: HCMV-ntv, SCMV-env
- 203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
- 302: SCMV-gag/pol, HCMV-, Lap1-nef/tat/vif
- 303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif

20

001: インサートを含まないコントロールプラスミド

【図 5】図 5 は、293 細胞における HIV env の発現を示す。293 細胞に 2 μg の示されたプラスミド DNA 発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で、細胞と結合している HIV タンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

30

【表 3 6】

トランスフェクションされたプラスミド

- 101: HCMV-env
- 202: HCMV-ntv, SCMV-env
- 203: HCMV-gag/pol/nef/tat/vif, SCMV-env
- 204: HCMV-gag/pol, SCMV-env
- 303: SCMV-gag/pol, HCMV-env, Lap1-nef/tat/vif

40

001: インサートを含まないコントロールプラスミド

【図 6】図 6 は、293 細胞における HIV gag の発現を示す。293 細胞に 1 μg の示されたプラスミド DNA 組合せをトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で、細胞と結合している HIV タンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

【表 3 7】

レーン	トランスフェクションされたプラスミド組合せ
1	301 (gag/pol) + 101(env) + 104(ntv)
2	201(gag, pol) + 202 (env, ntv)
3	203 (gag/pol/ntv, env)
4	303 (gag/pol, env, ntv)
5	101(env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (コントロール)

【図 7】図 7 は、293 細胞における HIV env の発現を示す。293 細胞に 1 μg の示されたプラスミド DNA 組合せをトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で、細胞と結合している HIV タンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

10

【表 3 8】

レーン	トランスフェクションされたプラスミド組合せ
1	152 (gag/pol) + 101(env) + 104(ntv)
2	201(gag, pol) + 202(env, ntv)
3	203(gag/pol/ntv, env)
4	303(gag/pol, env, env)
5	101(env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (コントロール)

20

【図 8】表 8 は、293 細胞における HIV ntv の発現を示す。293 細胞に 1 μg の示されたプラスミド DNA 組合せをトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で、細胞と結合している HIV タンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

【表 3 9】

レーン	トランスフェクションされたプラスミド組合せ
1	152 (gag/pol) + 101(env) + 104(ntv)
2	201(gag, pol) + 202(env, ntv)
3	203(gag/pol/ntv, env)
4	303(gag/pol, env, env)
5	101(env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (コントロール)

30

【図 9】図 9 は、293 細胞における HIV pol の発現を示す。293 細胞に、示されたプラスミド DNA 濃度および組合せをトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で、細胞と結合している HIV タンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

【表 4 0】

40

レーン	トランスフェクションされたプラスミド組合せ	トランスフェクションされた プラスミド濃度(マイクログラム)
1	001 (コントロール)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

【図 10】図 10 は、293 細胞における HIV gag の発現を示す。293 細胞に、示されたプラスミド DNA 濃度および組合せをトランスフェクションした。トランスフェ

50

クション後４８時間で、細胞と結合しているH I Vタンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

【表４１】

レーン	トランスフェクションされたプラスミド組合せ	トランスフェクションされた プラスミド濃度(マイクログラム)
1	001(コントロール)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

10

【図１１】表１１は、２９３細胞におけるH I V envの発現を示す。２９３細胞に、示されたプラスミドDNA濃度および組合せをトランスフェクションした。トランスフェクション後４８時間で、細胞と結合しているH I Vタンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

【表４２】

レーン	トランスフェクションされたプラスミド組合せ	トランスフェクションされた プラスミド濃度(マイクログラム)
1	001 (コントロール)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

20

【図１２】図１２は、２９３細胞におけるH I V ntvの発現を示す。２９３細胞に、示されたプラスミドDNA濃度および組合せをトランスフェクションした。トランスフェクション後４８時間で、細胞と結合しているH I Vタンパク質をウエスタンブロットによって可視化した。具体的なプラスミドについてのプロモーターおよびオープンリーディングフレームを下記に示す：

30

【表４３】

レーン	トランスフェクションされたプラスミド組合せ	トランスフェクションされた プラスミド濃度(マイクログラム)
1	001(コントロール)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

40

【発明を実施するための形態】

【００３９】

（発明の詳細な説明）

DNAに基づく免疫原組成物は、タンパク質抗原およびアジュバントの投与を含む従来の免疫原組成物の代替物を提供する。その代わり、DNAに基づく免疫原組成物では、１つまたは複数の抗原をコードするDNAを、その抗原が対象の組織の細胞によって発現される対象の組織に導入することが伴う。本明細書中で使用される場合、そのような免疫原組成物は「DNAに基づく免疫原組成物」または「核酸に基づく免疫原組成物」と呼ばれる。以前からの問題の１つは、多数の遺伝子が、保護免疫応答を生じさせるために要求されるとき、多数のプラスミドを、その多数の遺伝子を個々に発現させるために使用しなけ

50

ればならなかったことである。このことは製造および調節での負担を強いる。本発明の様々な実施形態は、この問題に対する解決策を、3つの独立したオープンリーディングフレームを同じ細胞において発現させることができるプラスミド設計により提供する。本発明の特定の実施形態では、遺伝子が、ポリタンパク質を作製するために融合され、このようにして、さらに多くのタンパク質を1つのプラスミドから発現させることができる。1つの実施形態において、6つのタンパク質が1つのプラスミドから発現させられる。

【0040】

非常に多数の要因が、抗原遺伝子の発現、および／または、DNAに基づく免疫原組成物の免疫原性に影響を及ぼし得る。そのような要因の例には、プラスミドベクターの構築、プラスミドベクターのサイズ、抗原遺伝子の発現を行わせるために使用されるプロモーターの選択、プラスミド上の転写ユニットの数およびサイズ、RNA転写物の安定性、プラスミド内での転写ユニットの配向、免疫化の再現性、ならびに、プラスミドにおける挿入された遺伝子の安定性が挙げられる。本発明の実施形態では、これらの重要なパラメーターの多くを最適化するプラスミド設計が提供される。

10

【0041】

多数の転写ユニットを有するプラスミドDNAベクターの設計および最適化は非常に重要である。免疫化された対象によって受け入れられる抗原の実際の用量を改善するために、プラスミドのサイズは最小限にしなければならない。その一方で、タンパク質生成物の数および産生されたタンパク質の量は最大にしなければならない。これらの事項をバランスさせるために、遺伝子の設置；転写ユニットの間隔；オープンリーディングフレームの転写方向；発現レベル；プロモーターのサイズ、配向および強さ；エンハンサーのサイズ、設置、配向および強さ；オープンリーディングフレームのサイズおよび構成；製造の容易さ；プラスミドの安定性；安全性；ならびに、対象を免疫化するために必要なベクターの最終的な用量を検討しなければならない。

20

【0042】

DNAプラスミドを免疫化のために使用することに関する重要な検討事項は、プラスミドの製造である。潜在的な安全性問題のために、製造プロセスおよび最終的な製造物は厳しい安全確保を受けなければならない。また、広範囲に及ぶ品質管理を受けなければならない。その結果はそのような手続きのための大きなコストで反映される。その結果として、多数のプラスミドを必要とするDNA免疫化はどれも、それに比例して費用がより大きくなり、効果的である可能性が低くなる。従って、本発明の特定の実施形態では、製造コストを抑制する必要がある場合、免疫応答を事実上任意の疾患プロセスにおいて誘発するために好適である適用あたり1つのプラスミドを含む免疫原組成物が提供される。

30

【0043】

一部の状況では、より大きな製造コストにもかかわらず、1つだけの転写ユニットまたは2つの転写ユニットをそれぞれが含有するプラスミドの組合せの使用により、より効果的な免疫原組成物がもたらされる場合がある。そのような場合、効果的な免疫応答を誘発するために必要な遺伝子のすべてをコードするプラスミドの最適な数を有するように免疫原組成物を設計することが重要である。1つだけの転写ユニットをそれぞれが含有する多数のプラスミドの代わりに、必要な遺伝子のすべてを発現する3つの転写ユニットを含有するプラスミドの使用は特定の抗原の免疫原性とバランスさせなければならない。一転写ユニットプラスミド法の組合せの利点の1つは、個々の遺伝子がそれぞれ、同じ強さのプロモーターによって駆動させられ得ることである。例えば、HCMVプロモーターを、三転写ユニットプラスミドでは当てはまるように、プラスミドあたり1回だけでなく、それぞれのプラスミドにおいて使用することができる。対照的に、三転写ユニットプラスミドを使用するとき、HCMVプロモーターは、内部での相同組換えおよびプラスミドの不安定性の可能性を防止するために1回のみ使用できる。例えば、一方のプラスミドが1つの転写ユニットを有し、第2のプラスミドが2つの転写ユニットを有する、2つの抗原発現プラスミドを有する組成物においてである。そのような組成物では、HCMVプロモーターを、1つの転写ユニットを有するプラスミドにおいて1つだけの抗原または融合タンパ

40

50

ク質の発現を行わせるために使用することができ、また、2つの転写ユニットを有するプラスミドにおいて複数のタンパク質または融合タンパク質のうちの1つの発現を行わせるために使用することもできる。

【0044】

病原体がヒト免疫不全ウイルス（HIV）である場合、HIVのエンベロープポリペプチド、HIVのgag-pol融合ポリペプチド、HIVのnef-tat-vif融合ポリペプチド、および、アジュバントポリペプチドをそれぞれコードするヌクレオチド配列を含有する4つの一転写ユニットプラスミドを伴う免疫原組成物が記載される。所望されるならば、HIVのgag-pol融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有する一転写ユニットプラスミドの代わりに、HIVのgagポリペプチドおよびHIVのpol融合ポリペプチドをそれぞれコードするヌクレオチド配列を含有する2つの一転写ユニットプラスミドを使用することができる（従って、この局面では、5つのプラスミドが使用される）。

10

【0045】

一般に、その起源に依存して、プロモーターは、mRNA合成を開始する際の組織特異性および効率が異なる[Xiang他、Virology、209：564～579（1994）；Chapman他、Nucle. Acids. Res.、19：3979～3986（1981）]。今日まで、哺乳動物系におけるほとんどのDNAに基づく免疫原組成物は、サイトメガロウイルス（CMV）に由来するウイルスプロモーターに依拠している。CMVは起源がヒトまたはサルであり得る。これらは数多くの哺乳動物種における筋肉免疫化および皮膚免疫化の両方で良好な効率を有する。DNA免疫化によって誘発される免疫応答に影響を及ぼすことが知られている別の要因は、DNAの送達方法である。例えば、非経口経路は低い割合の遺伝子移入をもたらし、かつ、遺伝子発現のかんりの変動を生じさせ得る。Montgomery他、DNA Cell Bio.、12：777～783（1993）を参照のこと。遺伝子銃を使用するプラスミドの高速接種では、おそらくはDNAトランスフェクションのより大きな効率および樹状細胞によるより効果的な抗原提示のために、マウスの免疫応答が高まった。Fynan他、Proc. Natl. Acad. Sci.、90：11478～11482（1993B）；Eisenbraun他、DNA Cell Biol.、12：791～797（1993）を参照のこと。本発明の核酸型免疫原組成物を含有するベクターはまた、この分野で知られている他の方法によって、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、顕微注入（マイクロインジェクション）、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション（リポソーム融合）またはDNAベクター輸送体によって所望の宿主に導入することができる。例えば、Wu他、J. Biol. Chem.、267：963～967（1992）；WuおよびWu、J. Biol. Chem.、263：14621～14624（1988）；Hartmut他、カナダ国特許出願第2,012,311号（1990年3月15日出願）を参照のこと。

20

30

【0046】

従って、本発明は、脊椎動物（例えば、哺乳動物、鳥類および魚類など）の遺伝子的免疫化のためのプラスミド、免疫原組成物および方法に関連する。本発明のプラスミド、免疫原組成物および方法は、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌおよびネコの生物種を含む哺乳動物対象のために特に有用であり得る。本発明のプラスミド、免疫原組成物および方法は、下記において詳しく、かつ、当業者に知られている詳細を提供するために参考として組み込まれる引用文献を参照して記載される。

40

【0047】

（A. DNAプラスミド、ベクター、構築物、免疫原組成物）

プラスミド、構築物およびベクターの各用語が本明細書全体を通して使用される。本明細書中で使用される用語「プラスミド」は、調節配列、オープンリーディングフレーム、クローニング部位、停止コドン、スペーサー領域、または、構造的領域もしくは機能的領域のために選択された他の配列をコードする様々な核酸分子が組み立てられ、遺伝子を脊

50

椎動物宿主において発現させるためのベクターとして使用される環状かつスーパーコイル状のDNA分子を示す。さらに、本明細書中で使用される「プラスミド」は細菌株において複製することができる。本明細書中で使用される用語「構築物」は、遺伝子および調節エレメントの指定された構成を有する特定のベクターまたはプラスミドを示す。核酸配列は、「外因性」（これは、核酸配列が、ベクターが導入されようとしている細胞に対して外来であることを意味する）、「異種」（これは、核酸配列が、異なる遺伝子源に由来することを意味する）、または、「同族」（これは、宿主細胞の核酸内の位置においてその配列が通常的には見出されないことを除いて、配列が細胞内の配列に対して構造的に近縁であることを意味する）であることが可能である。当業者は、標準的な組換え技術によってベクターを構築し、または、本発明のプラスミドを改変するために十分な素養を有している。そのような技術は、例えば、Sambrook他、Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989) およびその引用参考文献（例えば、3. 18頁～3. 26頁および16. 17頁～16. 27頁での引用参考文献）、ならびに、Ausubel他、Current Protocols in Molecular Biology (Wiley Interscience Publishers, New York, 1995) に記載される（両者は参考として本明細書中に組み込まれる）。

【0048】

用語「ベクター」は、1つまたは複数の抗原をコードする示された核酸分子が、その核酸分子を発現させることができる細胞への導入のために挿入され得るキャリア核酸分子を示すために使用される。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルスおよび植物ウイルス）、および、人工染色体（例えば、YAC）が挙げられる。用語「発現ベクター」は、転写させることができる、遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含有するベクターを示す。場合により、RNA分子が、その後、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳される。他の場合には、これらの配列は、例えば、発現した干渉性RNA（e i RNA）、短い干渉性RNA（s i RNA）、アンチセンス分子またはリボザイムの産生では翻訳されない。発現ベクターは様々な「制御配列」を含有することができ、この場合、「制御配列」は、特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の転写、および、可能ならば、その翻訳のために必要な核酸配列を指す。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能を同様に果たし、下記に記載される核酸配列を含有することができる。

【0049】

用語「核酸」および用語「オリゴヌクレオチド」は、多数のヌクレオチド（すなわち、リン酸基に連結し、かつ、置換ピリミジン（例えば、シトシン（C）、チミン（T）またはウラシル（U））または置換プリン（例えば、アデニン（A）またはグアニン（G））のいずれかである交換可能な有機塩基に連結した糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）を含む分子）を意味するために交換可能に使用される。本明細書中で使用される場合、これらの用語はオリゴリボヌクレオチドならびにオリゴデオキシリボヌクレオチドを示す。これらの用語はまた、ポリヌクレオチド（すなわち、リン酸基を除いたポリヌクレオチド）および任意の他の有機塩基含有ポリマーを包含するものとする。核酸分子は、既存の核酸源（例えば、ゲノムまたはcDNA）から得ることができ、しかし、合成的に製造することができる（例えば、オリゴヌクレオチド合成によって製造することができる）。

【0050】

本明細書中で使用される表現「それぞれが、異なる転写ユニットに由来する」は、類似する機能の調節制御エレメントのそれぞれ（例えば、プロモーターなど）がすべて異なる起源であり、かつ、組換えによる遺伝的不安定性がプラスミドにおいて生じ得るようなレベルに互いに相同的でないことを意味する。Herrera他、Biochem. Bio

10

20

30

40

50

phys. Res. Commun.、279:548~551(2000)を参照のこと。

【0051】

本発明の免疫原組成物は、免疫応答が所望される少なくとも3つの選択された抗原をコードするDNA配列を含む三連転写ユニットDNAプラスミドを含む。このプラスミドにおいて、選択された各抗原は、哺乳動物細胞または脊椎動物細胞におけるその発現を行わせる調節配列の制御下にある。本発明の免疫原組成物はまた、選択された抗原をコードするプラスミドの組合せを含む。そのような組合せは、さらなる選択された抗原をコードする2つ、3つまたは4つのプラスミドから構成され得る。1つ、2つまたは3つの転写ユニットが組合せ内の任意の特定のプラスミドにおいて存在し得る。さらに、アジュバント

10

【0052】

本発明において有用な非ウイルス性プラスミドベクターは、選択された免疫原および抗原をコードするDNA配列を含む単離および精製されたDNA配列を含有する。標的抗原をコードするDNA分子は、外因性または異種の核酸配列をコードするために設計されているウイルス性供給源または非ウイルス性供給源（例えば、細菌種または腫瘍抗原など）に由来し得る。そのようなプラスミドまたはベクターは、ウイルスまたはファージに由来する配列を含むことができる。様々な非ウイルス性ベクターがこの分野では知られており、これらには、限定されないが、プラスミド、細菌ベクター、バクテリオファージベクター、

20

【0053】

本発明のプラスミドの構成成分を既存のベクターから得ることができる。細菌ベクターの例には、特に、カルメット・ゲラン菌(BCG)、サルモネラ属、赤痢菌属、大腸菌およびリステリア属に由来する配列が挙げられるが、これらに限定されない。構成成分を得るための好適なプラスミドベクターには、例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、pACYC184、pUC8、pUC9、pUC18、pUC19、pLG339、pR290、pK37、pKC101、pAC105、pVA51、pKH47、

30

pUB110、pMB9、pBR325、ColE1、pSC101、pBR313、pML21、RSF2124、pCR1、RP4、pBAD18およびpBR328が挙げられる。

【0054】

他の構成成分を誘導可能な発現ベクターから得ることができる。好適な誘導可能な大腸菌発現ベクターの例には、pTrc(Amann他、Gene、69:301~315(1988))、アラビノース発現ベクター（例えば、pBAD18、Guzman他、J. Bacteriol.、177:4121~4130(1995)）およびpET11d(Studier他、Methods in Enzymology、185:60~89(1990))が挙げられる。pTrcベクターからの標的遺伝子の発現はハイブリッド型のtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依る。pET11dベクターからの標的遺伝子の発現は、同時発現したウイルスRNAポリメラーゼT7gnIにより媒介されるT7gn10-lac融合プロモーターからの転写に依る。このウイルスポリメラーゼは、T7gn1遺伝子をlacUV5プロモーターの転写制御下に有する常在性プロファージから宿主菌株のBL21(DE3)またはHMS174(DE3)によって供給される。pBADシステムは、araC遺伝子によって調節される誘導可能なアラビノースプロモーターに依る。このプロモーターはアラビノースの存在下で誘導される。

40

【0055】

調節性の構成成分を、外部から供給された化合物によって調節される誘導可能なプロモ

50

ーターから得ることができ、これらには、亜鉛誘導可能なヒツジメタロチオン (MT) プロモーター、デキサメタゾン (Dex) 誘導可能なマウス乳腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーター、テトラサイクリン誘導系 (Gossen 他、Science、268:1766~1769 (1995)) およびラパマイシン誘導系 (Magari 他、J Clin Invest、100:2865~2872 (1997)) が挙げられる。

【0056】

真核生物における転写制御シグナルはプロモーターエレメントおよびエンハンサーエレメントから構成される。本明細書中で使用される「プロモーター」および「エンハンサー」は、転写に関与するタンパク質と特異的に相互作用するDNA配列を示す。Maniatis, T. 他、Science、236:1237 (1987) を参照のこと。上記で議論されたように、5' 非翻訳領域を、選択された抗原の発現を高めるためにプロモーターおよびエンハンサーと組み合わせることができる。抗原の発現を所望の哺乳動物対象または脊椎動物対象において行わせるプロモーター、エンハンサーおよび他の調節配列は同様に、その目的のために有用であることが知られているプロモーターの広範囲のリストから選択することができる。様々なそのようなプロモーターが下記に開示される。下記に記載される免疫原性DNAプラスミド組成物の実施形態において、有用なプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) プロモーター/エンハンサー (例えば、米国特許第5,158,062号および同第5,385,839号 (これらは参考として本明細書中に組み込まれる) に記載される)、ヒトヘルペスウイルス潜伏期関連プロモーター1および2 (HSV Lp1 & HSV Lp2: これらは「潜伏期活性プロモーター1 & 2」と呼ばれることがある)、および、サルサイトメガロウイルス (SCMV) プロモーターエンハンサーである。Goins W. F. 他、J. Virology、68:2239~2252 (1994); Soares, K. J. 他、Virology、70:5384~5394; Goins W. F. 他、J. Virology、73:519~532 (1999) を参照のこと。マウスサイトメガロウイルス (MCMV) プロモーターもまた使用に好適である。

【0057】

他の有用な転写制御エレメントには、転写後制御エレメント、例えば、スプライシングされていないRNAまたは部分的にスプライシングされたRNAの細胞質への輸送を助ける構成的輸送エンハンサー (CTE) またはCTE様エレメント (例えば、RNA輸送エレメント (RTE) など) などが挙げられる。米国特許第5,585,263号 (Hammar skjold 他)、および、Zolotukhin 他、J. Virol.、68:944~7952 (1994) を参照のこと。CTEまたはRTEは、発現を改善することが示されているので、また、多くの遺伝子が転写後制御エレメントの存在を必要としているので望ましい。数タイプのCTEおよびCTE様エレメントが存在しており、それらは、異なる経路を使用して機能している。Taberner 他、J. Virol.、71:95~101 (1997) を参照のこと。国際特許出願公開WO99/61596もまた参照のこと (これは、CTEに取って代わることができる新しいタイプの転写後制御エレメントに記載する)。

【0058】

遺伝子発現はまた、mRNAの蓄積を支援するというレベルで、または、mRNAの安定性を増大させるというレベルで、または、リボソーム進入の円滑化 (そのような機構のすべてがより大きなレベルの翻訳をもたらす) によって機能するポリヌクレオチド配列を含むことによって高めることができる。本発明の特定の実施形態において、ある種の5' 非翻訳領域およびイントロンを、より高レベルの遺伝子発現を行わせることができる複合プロモーターまたはキメラなプロモーターを作製するためにプロモーターおよびエンハンサーと組み合わせることができる。

【0059】

遺伝子発現を高めるために有用な5' 非翻訳領域の例には、プロモーターの特異性を変化させることなく、翻訳を高めることによって遺伝子または導入遺伝子の発現を増大させ

10

20

30

40

50

るためにプロモーターの下流側に挿入することができるアデノウイルスの三成分リーダー配列 (Adtp) が挙げられる。W. Sheay 他、*Biotechniques*、15 (5) : 856~62 (1993) を参照のこと。チンパンジーおよびマウスの伸長因子 1 α (EF-1 α) mRNA の 5' UTR は、RNA 転写および/または RNA 安定性を増大することによって遺伝子発現を高めることが知られているイントロンを含有する。S. Y. Kim 他、*J. Biotechnol.*、14; 93 (2) : 183~7 (1993) を参照のこと。真核生物の開始因子 4g (eIF4g) をコードする mRNA の 5' UTR は、推定される内部リボソーム進入部位 (IRES) の存在によって特徴づけられ、強いプロモーター活性を示す。B. Han B. & J. T. Zhang、*Mol Cell Biol*、22 (21) : 7372~84 (2002) を参照のこと。加えて、ヒト熱ショックタンパク質 70 (Hsp70) mRNA の 5' UTR は、通常の細胞培養条件のもとで mRNA 翻訳の効率を 1 桁までも増大させるエレメントを含有する。S. Vivinus 他、*Eur J Biochem.*、268 (7) : 1908~17 (2001) を参照のこと。NF- κ B 抑制因子の 5' UTR は強力な IRES として作用し、また、モノシストロン mRNA の状況では翻訳エンハンサーとしても機能する。A. Oumard 他、*Mol Cell Biol*、20 (8) : 2755~9 (2000) を参照のこと。CAP と開始コドンとの間に結合されて付加された場合、SV40 の 5' UTR、および、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) タイプ I の長末端反復に由来する R 領域 (SUR) は、おそらくは mRNA 安定化により翻訳効率を増大させる。Y. Takebe 他、*Mol Cell Biol*、8 (1) : 466~472 (1988) を参照のこと。

10

20

【0060】

本発明の特定の実施形態において、本発明の核酸分子、DNA プラスミドまたはベクターに含められる調節配列には、限定されないが、プロモーター配列、エンハンサー配列、5' 非翻訳領域配列、イントロン、CTE、RTE、ポリアデニル化配列、スプライスドナー配列およびスプライスアクセプター配列、翻訳される遺伝子の開始部および末端部にそれぞれ配置される転写開始および転写終結のための部位、転写された領域における翻訳のためのリボソーム結合部位、エピトープタグ、核局在化配列、内部リボソーム進入部位 (IRES) エレメント、ゴールドバーグ・ホグネス「TATA」エレメント、制限酵素切断部位、ならびに、選択マーカーなどが含まれる。エンハンサー配列には、例えば、SV40 DNA の 72 bp のタンデム反復、または、レトロウイルスの長末端反復もしくはLTRなどが挙げられ、エンハンサー配列は、転写効率を増大させるために用いられる。Wasyllyk 他、*Nucleic Acid Res.*、12 : 5589~5608 (1984) を参照のこと。

30

【0061】

DNA プラスミドにおいて有用なこれらの他の構成成分には、例えば、複製起点、ポリアデニル化配列 (例えば、ウシ成長ホルモン (BGH) ポリA、シミアンウイルス40 (SV40) ポリA)、および、薬物耐性マーカー (例えば、カナマイシン耐性) など含まれ、これらの他の構成成分もまた、実施例において記載される配列および下記において具体的に言及される配列を含む、広く知られている配列の中から選択することができる。

40

【0062】

個々のプロモーターおよび他の一般的なプラスミドエレメントの選択は通常的であり、多くのそのような配列を、本発明において有用なプラスミドを設計するために利用可能である。例えば、Sambrook 他、*Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York、1989) およびその引用参考文献 (例えば、3. 18 頁~3. 26 頁および 16. 17 頁~16. 27 頁での引用参考文献)、ならびに、Ausubel 他、*Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons、New York、1989) を参照のこと。本発明において有用なプラスミドの構成成分のすべてを、この分野における知られて

50

いる材料、および、製薬業界から入手可能である、知られている材料の中から当業者によって容易に選択することができる。

【0063】

抗原またはポリペプチドを発現する好適な遺伝子の様々な例が下記の議論において特定される。本明細書中におけるプラスミドおよび免疫原組成物の1つの実施形態において、選択された抗原はH I V-1抗原であり、これらには、g a g、p o l、e n v、n e f、v p r、v p u、v i fおよびt a tの各遺伝子によって発現される抗原が含まれる。1つの実施形態において、DNAプラスミドのコード配列および非コード配列ならびに他の構成成分が、例えば、意図された宿主に対して適切なコドン選択によって、また、何らかの阻害配列の除去（これもまた、抗原調製に関して下記で議論される）によって最適化

10

【0064】

本発明の実施形態によれば、組成物は、少なくとも3つの選択された抗原を発現する1つのプラスミドを含有する。あるいは、プラスミド組成物はまた、少なくとも3コピーの同じ選択された目的とする抗原またはポリペプチドをコードするDNA配列を含む1つのDNAプラスミドを含む。本発明の1つの実施形態において、組成物は、多数の選択された抗原を多数のオープンリーディングフレームから発現する1つのプラスミドを含有する場合がある。別の実施形態において、プラスミド組成物は、多数の選択された抗原（例えば、異なるクレードに由来する多数のe n v遺伝子）をコードする多数コピーの類似するオープンリーディングフレームをコードするDNA配列を含む1つのDNAプラスミドを

20

【0065】

本発明の特定の実施形態において、それぞれが1つの抗原を発現するプラスミドの組合せの使用により、より効果的な免疫原組成物がもたらされる場合がある。例えば、1つの実施形態において、本発明は、それぞれがH I V免疫原またはアジュバントをコードする4つのプラスミドを含有する免疫原組成物を提供する。1つのそのような具体的な免疫原組成物は、4つのプラスミドの下記の組合せ：（a）H I Vのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを有する第1のDNAプラスミド；（b）H I Vのg a g-p o l融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する単一転写ユニットを含む第2のDNAプラスミド；（c）H I Vのn e f-t a t-v i f融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを有する第3のDNAプラスミド；（d）アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する第4のDNAプラスミドと、（e）薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアまたはトランスフェクション促進因子の少なくとも1つとを含有する。具体的な実施形態において、これらのH I V遺伝子のそれぞれの発現を行わせるプロモーターはH C M Vプロモーターであり、これらのH I V遺伝子のそれぞれについてのポリA配列はウシ成長ホルモンのポリAである。

30

【0066】

本発明の具体的な実施形態において、それぞれが1つの抗原を発現するプラスミドの組合せの使用が所望される場合、個々のポリペプチドをコードする個々の遺伝子をより多く含有し、かつ、融合ポリペプチドをコードする融合遺伝子をより少なく含有するプラスミドをより多く使用することが好都合である場合がある。例えば、1つの実施形態において、本発明は、それぞれがH I V免疫原またはアジュバントをコードする5つのプラスミドを含有する免疫原組成物を提供する。この実施形態において、免疫原組成物は、（a）H I Vのエンベロープポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを有する第1のDNAプラスミド；（b）H I Vのg a g融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを有する第2のDNAプラスミド；（c）H I Vのp o lポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを有する第3のDNAプラスミド；（d）H I Vのn e f-t a t-v i f融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一転写ユニットを有する第4のDNAプラスミド；（

40

50

e) アジュバントポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する第5のDNAプラスミド、を含む。具体的な実施形態において、これらのHIV遺伝子のそれぞれの発現を行わせるプロモーターはHCMVプロモーターであり、これらのHIV遺伝子のそれぞれについてのポリA配列はウシ成長ホルモンのポリAである。

【0067】

さらにさらなる実施形態において、DNAプラスミドおよび免疫原組成物はさらに、望ましいサイトカイン、リンホカインまたは他の遺伝子アジュバントをコードするヌクレオチド配列を個々のDNAプラスミド構成成分として、または、抗原含有DNAプラスミドの一部として含有することができる。核酸配列が利用可能であるそのような好適なアジュバントの記載が下記に示される。本発明において例示される実施形態において、本発明のDNAプラスミド組成物とともに投与される望ましいサイトカインはインターロイキン-12である。

【0068】

DNAプラスミド組成物は、薬学的に受容可能な希釈剤、賦形剤またはキャリア（例えば、下記で議論される希釈剤、賦形剤またはキャリアなど）において投与することができる。組成物は任意の選択された投与経路によって投与され得るが、1つの実施形態において、望ましい投与方法は、下記で記載されるトランスフェクション促進因子としてのプシパカインとの、プラスミド分子を含む組成物の筋肉内同時投与である。

【0069】

(B. プラスミド内におけるエレメントの物理的構成)

脊椎動物の免疫原組成物を設計するための実際的な検討事項は、対象を免疫化するときには効果的な投与され得るDNAの量である。用量が検討されるとき、プラスミドの全体的なサイズを制限し、その一方で、プラスミド内での完全な転写ユニットの数を同時に最大にすることは、プラスミドDNA設計をもたらし得るための方針を提供する。プラスミドのサイズを最小限に抑え、かつ、発現される遺伝子の数を最大にすることの利点は、1マイクログラムの注入されたDNAあたり送達される免疫原タンパク質の量が高まることである。加えて、ベクターのサイズが増大するに従い、ベクターの不安定性の可能性が増大することが知られている。Herrera他、Biochem. Biophys. Res. Commun.、279:548~551(2000)を参照のこと。従って、この目標を達成するために、個々の調節制御エレメント（例えば、プロモーターなど）のサイズを検討し、所与の発現レベルのために要求されるプロモーターの強さとバランスさせなければならない。同様に、オープンリーディングフレームのサイズがプラスミドの全体的なサイズの一因となる。本明細書中で使用される場合、転写ユニット間のDNA領域（これは、調節的な役割または選択された抗原をコードする役割を有しないDNAによって占められる）は、本明細書中では「スパーサー領域」として指される。スパーサー領域のサイズは、転写ユニット間の転写干渉のレベル、立体的障害のレベル、および、全体的なプラスミドサイズを決定することにおいて重要である。従って、各エレメントのサイズは、それがタンパク質コードであるか、または調節制御であるか、またはスパーサー領域であるとしても、慎重に検討しなければならない。また、最小の効果的な塩基対数に制限しなければならない。

【0070】

本発明の実施形態では、全長が約18キロ塩基対(kb)以下のDNAである三連転写ユニットDNAプラスミドが提供される。代わりの実施形態において、本発明は、全長が約17kb以下のDNAである三連転写ユニットDNAプラスミドを提供する。本発明の別の実施形態では、全長が約16kb以下のDNAである三連転写ユニットDNAプラスミドが提供される。本発明の特定の実施形態では、全長が約15kb以下のDNAである三連転写ユニットDNAプラスミドが提供される。本発明のさらに別の実施形態では、全長が約14kb以下のDNAである三連転写ユニットDNAプラスミドが提供される。本発明の具体的な実施形態では、全長が約13kb以下のDNAである三連転写ユニットDNAプラスミドが提供される。本発明の特定の実施形態では、全長が約12kb以下のD

NAである三連転写ユニットDNAプラスミドが提供される。本発明の別の実施形態では、全長が約11 kb以下のDNAである三連転写ユニットDNAプラスミドが提供される。

【0071】

本明細書中で使用される「約」または「およそ」は、示された値または範囲の20パーセント以内を一般に意味するものとする。

【0072】

図1において明らかにされるように、3つの転写ユニットの間における転写方向の配向はDNAプラスミド設計のためのもう1つの検討事項である。分子生物学の当業者は、環状DNAプラスミドにおいて、転写方向は2つしかないことを理解する。従って、3つの転写ユニットを有するプラスミドでは、それらのうちの少なくとも2つが同じ方向で進行する。本発明の特定の実施形態において、第1の転写ユニットについての転写方向が第2の転写ユニットの発現方向とは反対方向である。本発明の別の実施形態において、第1の転写ユニットについての転写方向が第2の転写ユニットの発現方向とは反対方向であり、かつ、第3の転写ユニットの転写方向が第2の転写ユニットと同じ方向である。本発明のさらに別の実施形態において、第1の転写ユニットについての転写方向が第2の転写ユニットの発現方向とは反対方向であり、かつ、第3の転写ユニットの転写方向が第1の転写ユニットと同じ方向である。

10

【0073】

当業者は、「第1」、「第2」および「第3」としての転写ユニットの番号付けが便宜上にすぎないことを理解する。これら3つの転写ユニットはプラスミドを周って任意の順で配置することができる。

20

【0074】

2つの転写ユニットを有するプラスミドでは、いくつかの制約が2つの転写ユニットの転写方向に関して存在する。2つの転写ユニットについての転写方向が反対方向であるならば、そのような2つの転写ユニットは200 bpもの小さいスペーサー領域によって互いに隔てることができ、あるいは、300 bpもの小さいスペーサー領域によって互いに隔てることができ、あるいは、400 bpもの小さいスペーサー領域によって互いに隔てることができる。

【0075】

2つの転写ユニットを有するプラスミドにおいて、2つの転写ユニットについての転写方向が同じ方向であるならば、そのような2つの転写ユニットは少なくとも約500 bpのスペーサー領域によって互いに隔てなければならない。別の実施形態では、そのような2つの転写ユニットは少なくとも約600 bpのスペーサー領域によって互いに隔てなければならない。さらに別の実施形態では、そのような2つの転写ユニットは少なくとも約700 bpのスペーサー領域によって互いに隔てなければならない。特定の実施形態では、そのような2つの転写ユニットは少なくとも約800 bpのスペーサー領域によって互いに隔てなければならない。別の実施形態では、そのような2つの転写ユニットは少なくとも約900 bpのスペーサー領域によって互いに隔てなければならない。さらに別の実施形態では、そのような2つの転写ユニットは少なくとも約1000 bpのスペーサー領域によって互いに隔てなければならない。

30

40

【0076】

本発明の別の実施形態において、第1の転写ユニットについての転写方向が第2の転写ユニットの発現方向と同じ方向である。本発明のさらに別の実施形態において、第1の転写ユニットについての転写方向が第2の転写ユニットの発現方向と同じ方向であり、かつ、第3の転写ユニットの転写方向が第2の転写ユニットと同じ方向である。本発明の特定の実施形態において、第1の転写ユニットについての転写方向が第2の転写ユニットの発現方向と同じ方向であり、かつ、第3の転写ユニットの転写方向が第1の転写ユニットとは反対方向である。

【0077】

50

スペーサー領域のサイズは、転写ユニット間の転写干渉を緩和し、立体障害を軽減し、かつ、全体的なプラスミドサイズを抑制するために操作することができる1つの変数である。図1に示される実施形態では、SCMVプロモーターとHCMVプロモーターとの間に配置されている、転写ユニット1および転写ユニット2を隔てるスペーサー領域が存在する。本明細書中で使用される場合、転写ユニット1および転写ユニット2を隔てるスペーサー領域が「スペーサー領域1」として理解される。図1に示される実施形態において、SV40polyAとHSV-Lap1プロモーターとの間に配置されている、転写ユニット2および転写ユニット3を隔てるスペーサー領域が存在する。本明細書中で使用される場合、転写ユニット2および転写ユニット3を隔てるスペーサー領域が「スペーサー領域2」として理解される。図1に示される実施形態において、BGHpolyAとウサギβグロビンpolyAとの間に配置されている、転写ユニット3および転写ユニット1を隔てる第3のスペーサー領域が存在する。本明細書中で使用される場合、転写ユニット3および転写ユニット1を隔てるスペーサー領域が「スペーサー領域3」として理解される。図1を参照のこと。

【0078】

本発明の別の特徴は、全体的なプラスミドサイズが、プラスミドおよび／またはアジュバントの機能を満たすために真核生物プラスミドのスペーサー領域を使用することによって最小限に抑えられ得ることである。例えば、図1に示される実施形態において、スペーサー領域3はまた、細菌の複製起点を含む。加えて、図1に示される実施形態において、スペーサー領域2はカナマイシン遺伝子を細菌における成長のために含む。他の実施形態において、スペーサー領域は、免疫応答を刺激するためにCpGアイランド配列を含む。別の実施形態において、スペーサー領域は、抗原の発現を高めるためにCTE配列および／またはRTE配列を含む。本発明のさらに別の実施形態において、スペーサー領域はエンハンサー配列を含むことができる。本発明の別の実施形態において、スペーサー領域は、発現を高めることにおいて有用であることが知られている非翻訳配列を含むことができる。

【0079】

本発明の1つの実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約5kb未満であり、あるいは約4kb未満である。本発明の別の実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約3kb未満であり、あるいは約2kb未満である。本発明の特定の実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約1kb未満である。本発明の特定の実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約800塩基対(bp)～約1000bpの間である。本発明の代わりの実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約600bp～約800bpの間である。本発明の特定の実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約400bp～約600bpの間である。本発明の別の実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約300bp～約400bpの間である。本発明の別の実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約400bp未満である。本発明の具体的な実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約200bp～約300bpの間である。本発明の特定の実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約100bp～約200bpの間である。本発明の別の実施形態において、スペーサー領域1はサイズが約10bp～約100bpの間である。

【0080】

本発明の1つの実施形態において、スペーサー領域2はサイズが約5kb未満であり、あるいは約4kb未満である。本発明の別の実施形態において、スペーサー領域2サイズが約3kb未満であり、あるいは約2kb未満である。本発明の特定の実施形態において、スペーサー領域2はサイズが約1kb未満である。本発明の特定の実施形態において、スペーサー領域2はサイズが約1100bp未満である。本発明の別の実施形態において、スペーサー領域2はサイズが約800塩基対(bp)～約1000bpの間である。本発明の代わりの実施形態において、スペーサー領域2はサイズが約600bp～約800bpの間である。本発明の特定の実施形態において、スペーサー領域2はサイズが約400

b p～約600bpの間である。本発明の別の実施形態において、スパーサー領域2はサイズが約300bp～約400bpの間である。本発明の具体的な実施形態において、スパーサー領域2はサイズが約200bp～約300bpの間である。本発明の特定の実施形態において、スパーサー領域2はサイズが約100bp～約200bpの間である。本発明の別の実施形態において、スパーサー領域2はサイズが約10bp～約100bpの間である。

【0081】

本発明の1つの実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約5kb未満であり、あるいは約4kb未満である。本発明の別の実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約3kb未満であり、あるいは約2kb未満である。本発明の特定の実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約1kb未満である。本発明の特定の実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約1100bp未満である。本発明の別の実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約800bp～約1000bpの間である。本発明の代わりの実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約600bp～約800bpの間である。本発明の特定の実施形態において、スパーサー領域3サイズが約400bp～約600bpの間である。本発明の別の実施形態において、スパーサー領域3サイズが約300bp～約400bpの間である。本発明の具体的な実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約200bp～約300bpの間である。本発明の特定の実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約100bp～約200bpの間である。本発明の別の実施形態において、スパーサー領域3はサイズが約10bp～約100bpの間である。

【0082】

(C. 本発明の免疫原組成物により発現される抗原)

本明細書中で使用される「ポリペプチド」は、本発明のプラスミドおよび免疫原組成物によってコードされる選択されたタンパク質抗原、糖タンパク質抗原、ペプチド抗原または他の改変されたタンパク質抗原を指す。本発明の実施形態では、選択された抗原に対して脊椎動物宿主における「ポリペプチド」に対する免疫応答を誘発するプラスミドおよび免疫原組成物が提供される。本明細書中で使用される用語「選択された抗原」はこのようなポリペプチドを指す。ポリペプチドを含む選択された抗原には、プラスミドDNAによって発現されるとき、病原性のウイルス、細菌、菌類、寄生虫、プリオンまたはそれらの組合せに由来するタンパク質、ポリタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、それらのフラグメントまたは融合体が挙げられ得る。あるいは、選択された抗原には、ガン細胞または腫瘍細胞に由来するタンパク質、ポリタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、それらのフラグメントまたは融合体が挙げられ得る。別の実施形態において、選択された抗原には、IgEの産生を妨害し、その結果、アレルゲンに対するアレルギー性応答を和らげるようにするために、アレルゲンに由来するタンパク質、ポリタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、それらのフラグメントまたは融合体が挙げられ得る。さらに別の実施形態において、選択された抗原には、望ましくない様式、量または存在位置で宿主によって産生される分子（自己分子）を表す分子またはその一部分に由来するタンパク質、ポリタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、それらのフラグメントまたは融合体が挙げられ得る（例えば、脊椎動物宿主におけるアミロイド沈着によって特徴づけられる疾患を防止または処置するようにするために、アミロイド前駆体タンパク質に由来する分子など）。本発明の1つの実施形態において、選択された抗原には、HIV-1に由来するタンパク質、ポリタンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたはフラグメントが含まれ得る。

【0083】

本発明の実施形態はまた、(1)脊椎動物宿主において免疫応答を誘発するために、病原性のウイルス、細菌、菌類または寄生虫に由来する選択された抗原、あるいは(2)哺乳動物対象において治療的または予防的な抗ガン作用を誘発するために、ガン細胞または腫瘍細胞由来のガン抗原または腫瘍関連抗原に由来する選択された抗原、あるいは(3)IgEの産生を妨害し、その結果、アレルゲンに対するアレルギー性応答を和らげるようにするために、アレルゲンに由来する選択された抗原、あるいは(4)望ましくない様式

、量または存在位置で宿主によって産生される分子（自己分子）を表す分子またはその一部分に由来する、そのような望ましくない作用を軽減するようにするために選択された抗原、をコードするプラスミドを含む免疫原組成物に関する。

【0084】

別の実施形態において、望ましい免疫原組成物は、ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス1型～3型、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、カリシウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、風疹ウイルス、アデノウイルス、狂犬病ウイルス、イヌジステンパーウイルス、牛痘ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、トリニューモウイルス（以前では、七面鳥鼻気管炎ウイルス）、ヘンドラウイルス、ニパーウイルス、コロナウイルス、パルボウイルス、感染性鼻気管炎ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ感染性腹膜炎ウイルス、トリ伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、マレック病ウイルス、ブタ呼吸繁殖症候群ウイルス、ウマ動脈炎ウイルスおよび様々な脳炎ウイルス、ならびに、コロナウイルス（例えば、SARSウイルスなど）のウイルス疾患のうちの1つを防止または処置することを目指した免疫応答を誘発するための選択された抗原をコードする本発明の三連転写ユニットプラスミドを利用することができる。

【0085】

特定の実施形態において、本発明の三連転写ユニットプラスミドを含む免疫原組成物は、新出現疾患を引き起こす病原体、例えば、重症急性呼吸器（SARS）ウイルス、ヒトヘルペスウイルス8（HHV-8）、ハンターウイルス、コレラ菌（*Vibrio cholera*）0139、ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）およびボレリア・ブルグドルフェリ（*Borrelia burgdorferi*）などに由来する選択された抗原をコードするプラスミドを含む。

【0086】

別の実施形態において、本発明のプラスミドを含む免疫原組成物は、*Haemophilus influenzae*（インフルエンザ菌）（分類可能型および分類不能型の両方）、*Haemophilus somnus*、*Moraxella catarrhalis*、*Streptococcus pneumoniae*（肺炎連鎖球菌）、*Streptococcus pyogenes*（化膿連鎖球菌）、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus faecalis*（糞便連鎖球菌）、*Helicobacter pylori*、*Neisseria meningitidis*（髄膜炎菌）、*Neisseria gonorrhoeae*（淋菌）、*Chlamydia trachomatis*（トラコーマクラミジア）、*Chlamydia pneumoniae*（肺炎クラミジア）、*Chlamydia psittaci*（オウム病クラミジア）、*Bordetella pertussis*（百日咳菌）、*Alloiococcus otiditis*、*Salmonella typhi*（チフス菌）、*Salmonella typhimurium*（ネズミチフス菌）、*Salmonella choleraesuis*（豚コレラ菌）、*Escherichia coli*（大腸菌）、*Shigella*（赤痢菌属）、*Vibrio cholerae*（コレラ菌）、*Corynebacterium diphtheriae*（ジフテリア菌）、*Mycobacterium tuberculosis*（結核菌）、*Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*複合体、*Proteus mirabilis*、*Proteus vulgaris*、*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）、*Staphylococcus epidermidis*（表皮ブドウ球菌）、*Clostridium tetani*（破傷風菌）、*Leptospira interrogans*、*Borrelia burgdorferi*、*Pasteurella haemolytica*、*Pasteurella multocida*、*Actinobacillus p*

10

20

30

40

50

leuropneumoniae および *Mycoplasma gallisepticum* (これらに限定されない) によって引き起こされる細菌疾患の防止および／または処置に向けられたプラスミドを含む。

【0087】

本発明の実施形態はまた、*Aspergillus* (アスペルギルス属)、*Blastomyces* (ブラストミセス属)、*Candida* (カンジダ属)、*Coccidioides* (コクシジオイデス属)、*Cryptococcus* (クリプトコックス属) および *Histoplasma* (ヒストプラスマ属) (これらに限定されない) に由来する選択された抗原をコードするプラスミドを含む免疫原組成物に関する。特定の実施形態において、菌類に由来する選択された抗原をコードするプラスミドを含むそのような免疫原組成物は、菌類疾患の防止および／または処置のために使用される。

10

【0088】

別の実施形態において、本発明はまた、*Leishmania major* (森林型熱帯リーシュマニア)、*Ascaris* (回虫属)、*Trichuris* (鞭虫属)、*Giardia* (ジアルディア属)、*Schistosoma* (住血吸虫属)、*Cryptosporidium* (クリプトスポリジウム属)、*Trichomonas* (トリコモナス属)、*Toxoplasma gondii* (トキソプラズマ) および *Pneumocystis carinii* (ニューモシスティス) (これらに限定されない) に由来する選択された抗原をコードするプラスミドを含む免疫原組成物に関する。特定の実施形態において、寄生虫の選択された抗原をコードするプラスミドを含むそのような免疫原組成物は寄生虫疾患の防止および／または処置のために使用される。

20

【0089】

特定の実施形態において、本発明は、前立腺特異的抗原、ガン胎児性抗原、MUC-1、Her2、CA-125 および MAGE-3 が非限定的に挙げられるガン抗原または腫瘍関連抗原などの選択された抗原をコードするプラスミドを含む、脊椎動物宿主における治療的または予防的な抗ガン作用を誘発するための免疫原組成物を提供する。一部の実施形態では、同じ抗原または抗原の変化種を、特定の標的抗原の転写および最終的な服用量を高めるために多数の転写ユニットに配置することができる。

【0090】

本発明の実施形態は、脊椎動物宿主においてアレルゲンに対する応答を和らげる際に使用される、アレルゲンである選択された抗原をコードするプラスミドを含む免疫原組成物もまた提供し、アレルゲンまたはそのフラグメントを含有する免疫原組成物を包含する。そのようなアレルゲンの様々な例が米国特許第 5,830,877 号および国際特許出願公開 WO 99/51259 に記載される (これらは本明細書により参考として組み込まれる)。そのようなアレルゲンには、限定されないが、花粉、昆虫毒、動物鱗屑、菌類胞子および薬物が挙げられる。本発明の免疫原組成物は、IgE 抗体の産生 (アレルギー性反応の知られている原因) を妨害するために使用することができる。

30

【0091】

本発明の実施形態はまた、脊椎動物宿主において自己分子に対する応答を和らげるための選択された抗原をコードするプラスミドを含む免疫原組成物に関する。そのような選択された抗原には、自己分子またはそのフラグメントを含有する抗原が挙げられる。そのような自己分子の例には、糖尿病に關与するインスリンのβ鎖、胃食道逆流疾患に關与する G17 分子、および、様々な疾患 (例えば、多発性硬化症、狼瘡およびリウマチ様関節炎など) において自己免疫応答をダウンレギュレーションする抗原が挙げられる。β-アミロイドペプチド (これはまた Aβ ペプチドと呼ばれる) もまた含まれ、これはアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の内部の 39 アミノ酸〜43 アミノ酸のフラグメントであり、このフラグメントはβセクレターゼ酵素およびγセクレターゼ酵素による APP のプロセッシングによって生じる。Aβ 1〜42 ペプチドは下記の配列を有する：

40

【0092】

【化 1】

Asp Ala Glu Phe Arg His**Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser****Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (配列番号 1)**

。

【0093】

選択された抗原をコードする遺伝子配列、ならびに、その遺伝子配列が挿入される DNA プラスミドのコードン使用を、抗原の発現を増大させ、かつ／または、それにおける阻害配列を除くために変更することもまた、本発明の DNA プラスミドを設計するための、選択された抗原をコードする配列の選択および使用において望ましい。阻害配列の除去を、米国特許第 5,965,726 号、同第 5,972,596 号、同第 6,174,666 号、同第 6,291,664 号および同第 6,414,132 号、ならびに、国際特許出願公開 WO 01/46408（これらは参考として本明細書中に組み込まれる）に詳しく議論される技術を使用することによって達成することができる。簡単に記載すると、この技術は、選択された遺伝子における特定された阻害因子／不安定性配列を好ましくは多数の点変異により変異させることを伴う。

10

【0094】

下記に例示される 1 つの具体的な実施形態として、本発明の DNA プラスミドおよび免疫原組成物では、望ましくは、HIV-1 の遺伝子（例えば、gag、pol、env、nef、tat および vif など）について最適化された 1 つまたは複数の配列が用いられる。

20

【0095】

本発明の三連転写ユニットプラスミドはまた、宿主細胞をトランスフェクションし、または形質転換し、または感染させて、3 つ以上のタンパク質またはポリペプチドをインビトロで発現させるための使用に好適である。

【0096】

(D. 転写ユニットにおいて有用なプロモーター)

本発明の DNA プラスミドは、1 つ、2 つまたは 3 つの転写ユニットを含む。それぞれの転写ユニットが少なくとも 1 つのプロモーターを含む。従って、本発明の特定の実施形態において、選択された抗原をコードする核酸はプロモーターの転写制御下にある。「プロモーター」は、遺伝子の特異的な転写を開始するために要求される、細胞の合成装置または導入された合成装置によって認識される DNA 配列を指す。表現「転写制御下」は、プロモーターが、遺伝子の RNA ポリメラーゼによる開始および転写を制御するために核酸に関して正しい存在位置および配向にあることを意味する。

30

【0097】

プロモーターの用語は、RNA ポリメラーゼのための開始部位の付近にクラスター化している一群の転写制御モジュールを指すために本明細書中では使用される。プロモーターがどのように構成されるかについての考えの多くは、HSV チミジンキナーゼ (tk) 転写ユニットおよび SV40 初期転写ユニットについてのプロモーターを含むいくつかのウイルスプロモーターの分析に由来する。これらの研究は、より近年の研究によって増大しているが、プロモーターがいくつかの異なった機能的モジュールから構成され、そのそれぞれがおおよそ 7bp ~ 20bp の DNA からなり、かつ、転写活性化因子タンパク質または転写抑制因子タンパク質のための 1 つまたは複数の認識部位を含有することを示している。

40

【0098】

それぞれのプロモーターにおける少なくとも 1 つのモジュールが、RNA 合成のための開始部位を設置するように機能する。このことの最もよく知られている例が TATA ボックスであり、しかし、TATA ボックスを有していない一部のプロモーター、例えば、哺

50

乳動物のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子についてのプロモーター、および、SV40後期遺伝子についてのプロモーターなどでは、開始部位そのものに重なる異なったエレメントが、開始場所を固定することを助ける。

【0099】

転写ユニットのいずれかにおいて使用される好適なプロモーターには、真核生物細胞において活性なすべてのプロモーターが含まれる。好適な真核生物プロモーターの例には、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）即時初期プロモーター（場合によりHCMVエンハンサーを伴う）（例えば、Boschart他、Cell、41：521～530（1985）を参照のこと）、サルサイトメガロウイルス（SCMV）プロモーター、マウスサイトメガロウイルス（MCMV）プロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV）LAP1プロモーター、シミアンウイルス40（SV40）プロモーター、ヒト伸長因子1αプロモーター、レトロウイルスの長末端反復（LTR）、筋細胞特異的なデスミンプロモーター、または、抗原提示細胞において活性な任意の他のプロモーターが挙げられる。

【0100】

加えて、好適な真核生物プロモーターは、構成的プロモーター、誘導可能なプロモーターおよび組織特異的なプロモーターなどの中から選択されるとして特徴づけることができる。活性において非特異的であり、かつ、選択された抗原をコードするDNAプラスミドにおいて用いられる構成的プロモーターの例には、限定されないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス（RSV）のプロモーター、レトロウイルスのLTRプロモーター（場合によりRSVエンハンサーを伴う）、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、β-アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーターおよびEF1αプロモーター（Invitrogen）が挙げられる。外部から供給された化合物によって調節される誘導可能なプロモーターには、限定されないが、アラビノースプロモーター、亜鉛誘導可能なヒツジメタロチオン（MT）プロモーター、デキサメタゾン（Dex）誘導可能なマウス乳腫瘍ウイルス（MMTV）プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系（国際特許出願公開WO98/10088）、エコジソン昆虫プロモーター（No他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93：3346～3351（1996））、テトラサイクリン抑制系（Gossen他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89：5547～5551（1992））、テトラサイクリン誘導系（Gossen他、Science、268：1766～1769（1995）；Harvey他、Curr. Opin. Chem. Biol.、2：512～518（1998）もまた参照のこと）、RU486誘導系（Wang他、Nat. Biotech.、15：239～243（1997））、および、Wang他、Gene Ther.、4：432～441（1997））、ならびに、ラパマイシン誘導系（Magari他、J. Clin. Invest. 100：2865～2872（1997））が挙げられる。

【0101】

本発明のDNAプラスミドにおいて有用であり得る誘導可能なプロモーターの他のタイプは、特定の生理学的状態（例えば、温度または急性期）によって調節されるプロモーター、または、複製中の細胞においてのみ調節されるプロモーターである。有用な組織特異的なプロモーターには、骨格β-アクチン、ミオシン軽鎖2A、ジストロフィン、筋肉クレアチンキナーゼをコードする遺伝子に由来するプロモーター、ならびに、天然に存在するプロモーターよりも大きい活性を有する合成された筋肉プロモーター（Li他、Nat. Biotech.、17：241～245（1999）を参照のこと）が挙げられる。組織特異的であるプロモーターの例が下記の組織について知られている：中でも、肝臓（アルブミン、Miyatake他、J. Virol.、71：5124～32（1997））；B型肝炎ウイルスのコアプロモーター、Sandig他、Gene Ther.、3：1002～9（1996）；α-フェトタンパク質（AFP）、Arbutnot他、Hum. Gene Ther.、7：1503～14（1996））、骨（オステオカルシン、Stein他、Mol. Biol. Rep.、24：185～96（1997））

10

20

30

40

50

；骨シアロタンパク質、Chen他、J. Bone Miner. Res.、11:654～64(1996))、リンパ球(CD2、Hansal他、J. Immunol.、161:1063～8(1988))；免疫グロブリン重鎖；T細胞受容体 α 鎖)、ニューロン(ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)プロモーター、Andersen他、Cell. Mol. Neurobiol.、13:503～15(1993))；ニューロフィラメント軽鎖遺伝子、Piccioli他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:5611～5(1991))；ニューロン特異的ngf遺伝子、Piccioli他、Neuron、15:373～84(1995))。この関連で有用な、知られているプロモーターのさらなる列挙については、例えば、国際特許出願公開WO00/55335を参照のこと。

10

【0102】

(E. 転写ユニットにおいて有用なポリアデニル化シグナル)

本発明のDNAプラスミドは3つの転写ユニットを含み、それぞれの転写ユニットが少なくとも1つのポリアデニル化シグナルを含む。本明細書中で定義される「ポリアデニル化シグナル」は、特定の転写ユニットの転写を終結させ、かつ、ポリペプチドをコードする核酸配列が適切に転写および翻訳されることを確実にする停止配列(または停止コドン)を指す。停止部位は合成または天然起源が可能である。停止部位の例には、ポリアデニル化シグナルおよび合成された二方向転写停止部位が挙げられるが、これらに限定されない。典型的には、ポリアデニル化シグナルにより、DNA配列の転写が停止する。

20

【0103】

転写ユニットのいずれかにおいて使用される好適なポリアデニル化シグナルには、真核生物細胞において活性なすべてのポリアデニル化シグナルが挙げられる。真核生物のポリアデニル化シグナルの例には、ウサギ β -グロビンポリ(A)シグナルが挙げられ、これは、強いとして文献において特徴づけられているシグナルである(GilおよびProudfoot、Cell、49:399～406(1987))；GilおよびProudfoot、Nature、312:473～474(1984))。その重要な特徴の1つが、UGリッチドメインおよびUリッチドメインの両方を含有するその下流側エレメントの構造である。他のポリAシグナルには、合成ポリA、HSVチミジンキナーゼポリA(Cole C. N. およびT. P. Stacy、Mol. Cell. Biol.、5:2104～2113(1985)を参照のこと)、ヒト α グロビンポリA、SV40ポリA(Schek、N.、Cooke、C. およびJ. C. Alwine、Mol. Cell Biol.、12:5386～5393(1992)を参照のこと)、ヒト β グロビンポリA(Gil、A. およびN. J. Proudfoot、Cell、49:399～406(1987)を参照のこと)、ポリオーマウイルスポリA(Batt、D. B. およびG. G. Carmichael、Mol. Cell. Biol.、15:4783～4790(1995)を参照のこと)、ウシ成長ホルモンポリA(Gimmi、E. R.、Reff、M. E. およびI. C. Deckman、Nucleic Acid Res. (1989))が挙げられる。多くの他のポリアデニル化シグナルがこの分野では知られており、これらもまた本発明の実施形態において有用である。

30

【0104】

SV40の初期ポリアデニル化シグナルおよび後期ポリアデニル化シグナルはともに本発明の様々な実施形態において有用である。Schek他、Mol. Cell Biol.、12:5386～5393(1992)を参照のこと。これらの配列は、SV40ゲノムのヌクレオチド2533におけるBamHI部位と、ヌクレオチド2770におけるBclI部位との間の237塩基対のフラグメントにおいてコードされる(CarswellおよびAlwine、Mol. Cell. Biol.、9:4248；1989)。CarswellおよびAlwineは、最も考えられることには、効率的な切断およびポリアデニル化を容易にする下流側配列エレメントおよび上流側配列エレメントの両方を含むので、SV40のこれら2つのポリアデニル化シグナルのうち、後期シグナルの方が効率的であると結論していた。

40

50

【0105】

さらなるポリアデニル化部位を、この分野で知られている方法を使用して特定または構築することができる。最小限のポリアデニル化部位が、AAUAAAと、約30ヌクレオチド下流側で見出される第2の認識配列（一般には、G/Uリッチ配列）とから構成される。本明細書中で使用される場合、配列は、発現ベクターへの組み込みのための好適なDNAの調製を容易にするために、RNAではなく、DNAとして提供される。DNAとして提供されるとき、ポリアデニル化部位は、例えば、G/Tリッチ領域を下流側に伴うAATAAAから構成される。両方の配列が、効率的なポリアデニル化部位を形成するために存在しなければならない。これらの部位の目的は、特異的なRNA結合タンパク質をRNAに呼び寄せることである。AAUAAAは切断ポリアデニル化特異性因子（CPSF；Murthy K. G. およびManley J. L. (1995)、Genes Dev、9：2672～2683）と結合し、第2の部位（頻繁には、G/U配列）は切断刺激因子（CstF；Takagaki Y. およびManley J. L. (1997)、Mol Cell Biol、17：3907～3914）に結合する。CstFは数個のタンパク質から構成され、しかし、RNA結合を担うタンパク質はCstF-64であり、これはリボ核タンパク質ドメインファミリーのタンパク質の1つである（Takagaki他(1992)、Proc Natl Acad Sci USA、89：1403～1407）。

10

【0106】

（F. 本発明の免疫原組成物のために有用なキャリア、希釈剤、促進因子、アジュバントおよび配合物）

20

本発明において有用なDNAプラスミドおよび免疫原組成物はさらに、薬学的に受容可能な希釈剤、賦形剤または薬学的に受容可能なキャリアを含む。1つの実施形態において、前記薬学的に受容可能な希釈剤は、無菌水、無菌の等張性生理的食塩水、または生物学的緩衝液である。抗原性組成物はまた、そのような希釈剤またはキャリアと従来の様式で混合することができる。本明細書中で使用される表現「薬学的に受容可能なキャリア」は、ヒトまたは他の脊椎動物宿主に対する投与との適合性を有するありとあらゆる溶媒、分散媒体、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張性薬剤および吸収遅延剤などを包含することが意図される。適切なキャリアは当業者には明白であり、主として投与経路に依存する。

30

【0107】

本発明の免疫原組成物に存在させることができるさらにさらなる賦形剤が、アジュバント、促進因子、保存剤、表面活性剤、および、化学的安定化剤、懸濁化剤または分散化剤である。典型的には、安定化剤、アジュバントおよび保存剤が、ヒト対象または動物対象における効力のための最良の配合物を決定するために最適化される。

【0108】

（1. アジュバント）

アジュバントは、免疫原または抗原と一緒に投与されたときに免疫応答を高める物質である。数多くのサイトカインまたはリンホカインが免疫調節活性を有することが示されており、従って、アジュバントとして使用することができ、それらには、インターロイキン1- α 、インターロイキン1- β 、インターロイキン2、インターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン6、インターロイキン7、インターロイキン8、インターロイキン10、インターロイキン12（例えば、米国特許第5,723,127号を参照のこと）、インターロイキン13、インターロイキン14、インターロイキン15、インターロイキン16、インターロイキン17およびインターロイキン18（およびその変異形態）、インターフェロン- α 、インターフェロン- β およびインターフェロン- γ 、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（例えば、米国特許第5,078,996号およびATCCアクセション番号39900を参照のこと）、マクロファージコロニー刺激因子（MCSF）、顆粒球コロニー刺激因子（GCSF）、ならびに、腫瘍壊死因子 α および腫瘍壊死因子 β （TNF）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において有

40

50

用なさらに他のアジュバントには、ケモカインが挙げられ、これには、限定されないが、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESが挙げられる。接着分子（例えば、セ렉チン（例えば、L-セ렉チン、P-セ렉チンおよびE-セ렉チン）など）もまたアジュバントとして有用である場合がある。さらに他の有用なアジュバントには、限定されないが、ムチン様分子（例えば、CD34、GlyCAM-1およびMa dCAM-1）、インテグリンファミリーのメンバー（例えば、LFA-1、VLA-1、Mac-1およびp150.95など）、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバー（例えば、PECAM、ICAM（例えば、ICAM-1、ICAM-2およびICAM-3）、CD2およびLFA-3など）、共刺激分子（例えば、CD40およびCD40Lなど）、増殖因子（血管成長因子、神経成長因子、繊維芽細胞増殖因子、上皮増殖因子、B7.1、B7.2、PDGF、BL-1および血管内皮細胞増殖因子が挙げられる）、受容体分子（Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2およびDR6が挙げられる）が挙げられる。さらに別のアジュバント分子には、カスパーゼ（ICE）が挙げられる。国際特許出願公開WO98/17799および同WO99/43839もまた参照のこと（これらは参考として本明細書中に組み込まれる）。

10

【0109】

1つの実施形態において、所望されるアジュバントは、プラスミドから発現されるIL-12タンパク質である。例えば、米国特許第5,457,038号、同第5,648,467号、同第5,723,127号および同第6,168,923号を参照のこと（これらは参考として本明細書中に組み込まれる）。1つの実施形態において、サイトカインはタンパク質として投与することができる。特定の実施形態において、IL-12が、本発明のDNAプラスミドの3つの転写ユニットのうちの1つまたは2つから発現される。あるいは、IL-12は別個のプラスミドから独立的に発現される。別の実施形態において、IL-15をコードし、かつ、発現するプラスミドが、IL-12をコードし、かつ、発現するプラスミドの代わりに投与される。

20

【0110】

免疫応答を高めるために使用される好適なアジュバントには、限定されないが、米国特許第4,912,094号（これは本明細書により参考として組み込まれる）に記載されるMPLTM（3-O-脱アセチル化モノホスホリル脂質A；Corixa、Hamilton、MT）が挙げられる。アジュバントとしての使用のために同様に好適なものが、Corixa（Hamilton、MT）から入手可能であり、かつ、米国特許第6,113,918号（これは本明細書により参考として組み込まれる）に記載される合成された脂質Aアナログまたはアミノアルキルグルコサミンホスフェート化合物（AGP）、あるいは、その誘導体またはアナログである。1つのそのようなAGPが2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]エチル 2-デオキシ-4-O-ホスホノ-3-O-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル]-2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル-アミノ]-b-D-グルコピラノシドであり、これはまた、529（以前にはRC529として知られていた）として知られている。この529アジュバントは水性形態または安定なエマルションとして配合される。

30

40

【0111】

さらに他のアジュバントには、鉱油および水のエマルション、アルミニウム塩（ミョウバン）（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなど）、Amphigen、Avridine、L121/スクアレン、D-ラクチド-ポリラクチド/グリコシド、プルロニックポリオール、ムラミルジペプチド、死菌化Bordetella、サポニン（例えば、米国特許第5,057,540号（これは本明細書により参考として組み込まれる）に記載されるStimulonTMQS-21（Antigenics、Framingham、MA.）など）、および、それらから作製される粒子（例えば、ISCO

50

MS（免疫刺激複合体）など）、結核菌、細菌リポ多糖、合成ポリヌクレオチド（例えば、CpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチド（米国特許第6,207,646号、これは本明細書により参考として組み込まれる）、百日咳毒素（PT）、または、大腸菌の熱不安定毒素（LT）（特に、LT-K63、LT-R72、PT-K9/G129；例えば、国際特許出願公開WO93/13302および同WO92/19265（これらは参考として本明細書中に組み込まれる）を参照のこと）が挙げられる。

【0112】

アジュバントして同様に有用なものが、コレラ毒素およびその変異体であり、これらには、国際特許出願公開WO00/18434に記載されるもの（この場合、アミノ酸位置29のグルタミン酸が別のアミノ酸（アスパラギン酸以外）（好ましくは、ヒスチジン）によって置換される）が挙げられる。類似するCT毒素または変異体が国際特許出願公開WO02/098368に記載され、この場合、アミノ酸位置16のイソロイシンが、単独で、または、アミノ酸位置68のセリンを別のアミノ酸によって置換することとの組合せでのいずれかで別のアミノ酸によって置換され、かつ／あるいは、アミノ酸位置72のバリンが別のアミノ酸によって置換される。他のCT毒素が国際特許出願公開WO02/098369に記載され、この場合、アミノ酸位置25のアルギニンが別のアミノ酸によって置換され、かつ／または、アミノ酸がアミノ酸位置49において挿入され、かつ／または、2つのアミノ酸がアミノ酸位置35およびアミノ酸位置36において挿入される。

【0113】

一部の実施形態において、アジュバントをコードするDNAプラスミドを免疫原組成物において投与することができる。そのような場合、本発明の免疫原組成物に含まれるためにそのDNAがプラスミドに挿入されるアジュバントには、インターロイキン-1（IL-1）、IL-5、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、TNF- α 、TNF- β およびBL-1（これらは国際特許出願公開WO98/17799に記載される）；B7.2（これは国際特許出願公開WO00/514312に記載される）；IL-8、RANTES、G-CSF、IL-4、変異型IL-18、IL-7、TNF-R（これらは国際特許出願公開WO99/43839に記載される）；および変異型CD80（これは国際特許出願公開WO00/66162に記載される）が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される用語「IL-12タンパク質」は、単鎖のIL-12タンパク質（この場合、その2つのサブユニットが1つのコード配列によってコードされ、2つのサブユニットをつなぐリンカー配列を有する1つのタンパク質として発現される）を含めて、ヒトIL-12の一方のサブユニットまたは両方のサブユニットを指すことが意味される。

【0114】

特定の実施形態において、サイトカインが、哺乳動物細胞におけるその発現を行わせる調節配列の制御下でサイトカインをコードするDNA配列を含む核酸組成物として投与される。さらに別の実施形態において、サイトカイン発現プラスミドが、免疫原組成物において、選択された抗原をコードするDNAプラスミドとともに投与される。さらに別の実施形態において、サイトカインが、初回免疫刺激用の免疫原組成物の投与と、追加抗原投与用の免疫原組成物の投与との間で投与される。さらに別の実施形態において、サイトカインが追加抗原投与工程とともに投与される。さらに別の実施形態において、サイトカインが初回免疫刺激用組成物および追加抗原投与用組成物の両方とともに投与される。

【0115】

本発明の特定の実施形態において、CpG DNAをアジュバントとしてプラスミドに含むことができる。本明細書中で使用される場合、CpG DNAは、非メチル化シトシン-グアニンジヌクレオチド配列（すなわち、「CpG DNA」）を含み、すなわち、5'シトシンと、それに続く3'グアノシンとを含み、かつリン酸エステル結合によって連結されたDNAを含有し、そして免疫系を活性化し、少なくとも1つの非メチル化CpGジヌクレオチド核酸分子を含有するオリゴヌクレオチドを指す。米国特許第6,406,705号（Davis他）および米国特許第6,207,646号（Krieg他）

を参照のこと（これらは本明細書によりその全体が参考として組み込まれる）。脊椎動物DNAからではなく、細菌DNAから得られたCpG DNAは、末梢血単核細胞（PBMC）に対する直接的な免疫刺激作用をインビトロで有する。このリンパ球活性化は非メチル化CpGジヌクレオチドのためであり、この非メチル化CpGジヌクレオチドは、細菌DNAでは予想された頻度（1/16）で存在するが、脊椎動物DNAでは低く表され（CpG抑制、1/50～1/60）、そしてメチル化されている。CpG DNAに対する応答における迅速な免疫活性化が、微生物の分子に対して特異的な構造的パターンを認識する生来的な免疫防御機構の1つの構成要素として進化してきたかもしれないことが示唆されている。米国特許第6,406,705号（Davis他）および米国特許第6,207,646号（Krieg他）を参照のこと（これらは本明細書によりその全体が

10

【0116】

特定の実施形態において、対象にはアジュバントの組合せが投与され、この場合、アジュバントの組合せは、少なくとも1つの非メチル化CpG DNAジヌクレオチドを含有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドと、少なくとも1つの非核酸アジュバント（例えば、IL-12など）とを含む。

【0117】

（2．促進因子または共薬剤）

ポリヌクレオチド分子から構成される免疫原組成物は望ましくは、ポリヌクレオチドトランスフェクション促進因子または「共薬剤」などの、場合により使用される賦形剤、例えば、細胞へのポリヌクレオチド移入を容易にする、局所麻酔剤、ペプチド、脂質（カチオン性脂質、リポソームまたは脂質粒子が含まれる）、ポリカチオン（例えば、ポリリンなど）、枝分かれした三次元ポリカチオン（例えば、デンドリマーなど）、炭水化物、カチオン性の両親媒性物質、界面活性剤、ベンジルアンモニウム系界面活性剤または別の化合物などを含有する。そのような促進因子には、局所麻酔剤のブピバカインまたはテトラカインが挙げられる（米国特許第5,593,972号、同第5,817,637号、同第5,380,876号、同第5,981,505号および同第6,383,512号、ならびに、国際特許出願公開WO98/17790を参照のこと；これらは本明細書により参考として組み込まれる）。本発明において有用なそのような促進因子または共薬剤の他の非網羅的な例が、米国特許第5,703,055号、同第5,739,118号、同第5,837,533号；国際特許出願公開WO96/10038（1996年4月4日公開）および国際特許出願公開WO94/16737（1994年8月8日公開）に記載される（これらはそれぞれが参考として本明細書中に組み込まれる）。

20

30

【0118】

より好ましくは、トランスフェクション促進因子が、核酸分子との1つまたは複数の複合体を形成する量で存在する。トランスフェクション促進因子が本発明の核酸分子またはプラスミドと混合されるとき、トランスフェクション促進因子は、DNAを詰め込み、かつ、均一である様々な小さい複合体または粒子を形成する。従って、本発明の免疫原組成物の1つの実施形態において、複合体が、トランスフェクション促進因子を本発明の少なくとも1つのプラスミドと混合することによって形成される。

40

【0119】

特定の実施形態において、本発明の免疫原組成物が2つ以上のタイプのプラスミドから構成される場合がある。あるいは、本発明の組成物の別の実施形態において、トランスフェクション促進因子がそれぞれのプラスミドと別々に予備混合される場合がある。その後、別個の混合物は、すべてのプラスミドが1回のボーラス投与で投与される場合に、プラスミドの所望する比率が1つの免疫原組成物に存在することを確保するために1つの組成物において一緒にされる。あるいは、トランスフェクション促進因子および各プラスミドを別々に混合し得、所望する比率が得られるように別々に投与することができる。

【0120】

以降、「複合体」または「1つまたは複数の複合体」または「複合体」の用語が、免疫

50

原組成物のこの実施形態を定義するために使用される場合、この用語は1つまたは複数の複合体を包含することが理解される。それぞれの複合体がプラスミドを含有する。好ましくは、複合体は直径が約50nm～約150nmの間である。使用される促進因子が局所麻酔剤（好ましくは、ブピバカイン）である場合、ポリヌクレオチド組成物の総重量に基づいて約0.1重量パーセント～約1.0重量パーセントの量が好ましい。国際特許出願公開WO99/21591もまた参照のこと。これは本明細書により参考として組み込まれ、好ましくは約0.001重量パーセント～0.03重量パーセントの間での量で投与される共薬剤としてのベンジルアンモニウム系界面活性剤の配合を教示する。本発明によれば、局所麻酔剤のそのような量が、約1μg/ml～10μg/mlの核酸に対して約0.01%（w/v）～2.5%（w/v）の局所麻酔剤の前記核酸分子に対する比率で存在する。別のそのような範囲は約100μg/ml～1mg/mlの核酸に対して約0.05%（w/v）～1.25%（w/v）の局所麻酔剤である。

10

【0121】

（3．免疫原組成物に対する他の添加剤）

他の賦形剤を本発明の免疫原組成物に含めることができ、そのような賦形剤には、保存剤、安定化成分および表面活性剤などが含まれる。

【0122】

好適な例示的保存剤には、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化イオウ、没食子酸プロピル、パラベン類、エチルバニリン、グリセリン、フェノールおよびパラクロロフェノールが含まれる。

20

【0123】

使用することができる好適な安定化成分には、例えば、カザミノ酸、スクロース、ゼラチン、フェノールレッド、N-乙アミン、ニリン酸一カリウム、ラクトース、ラクトアルブミン加水分解物および粉乳が含まれる。

【0124】

好適な表面活性剤には、限定されないが、フロイント不完全アジュバント、キノンアナログ、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、オクタデシルアミノ酸エステル、リゾレシチン、臭化ジメチルジオクチルアンモニウム、メトキシヘキサデシルグリセロールおよびプルロニックポリオール；ポリアミン、例えば、ピラン、硫酸デキストラン、ポリIC、カルボポール；ペプチド、例えば、ムラミルペプチドおよびムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、タフトシン；オイルエマルジョン；および無機ゲル、例えば、リン酸アルミニウムなど、ならびに、免疫刺激複合体（ISCOM）が含まれる。プラスミドはまた、免疫原組成物として使用されるリポソームに組み込むことができる。免疫原組成物はまた、免疫原組成物の選択された投与様式のために好適な他の添加剤を含有することができる。本発明の免疫原組成物はまた、凍結乾燥ポリヌクレオチドを伴い得、これは、粉末、液体または懸濁物の投薬形態を開発するための他の薬学的に受容可能な賦形剤とともに使用され得る。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy（第2巻、第19版（1995）、例えば、第95章エアロゾル）および国際特許出願公開WO99/45966を参照のこと（それらの教示は、参考として本明細書に援用される）。

30

40

【0125】

これらの免疫原組成物は、任意の従来の投与経路での投与に適した添加剤を含有することができる。一部の実施形態において、本発明の免疫原組成物は、例えば、液体、粉末、エアロゾル、錠剤、カプセル、腸溶性被覆の錠剤またはカプセル、あるいは坐薬の形態でのヒト被験体への投与のために調製される。従って、免疫原組成物にはまた、懸濁物、溶液、油性ビヒクルまたは水性ビヒクル中のエマルジョン、ペースト、および、埋め込み可能な持続放出处方物または生分解性処方物が含まれ得るが、これらに限定されない。本発明の1つの実施形態において、免疫原組成物が非経口投与のための処方物として調製され、有効成分が、再構成された組成物の非経口投与に先立って好適なビヒクル（例えば、無菌の発熱因子非含有水）により再構成される乾燥形態（すなわち、粉末または顆粒）で提

50

供される。他の有用な非経口投与可能な処方物には、有効成分を微結晶形態で、またはリポソーム調製物で、または生分解性ポリマー系の構成成分として含む処方物が含まれる。持続放出または埋め込みのための組成物は、薬学的に受容可能なポリマー材料または疎水性材料（例えば、エマルション、イオン交換樹脂、難溶性ポリマーまたは難溶性塩など）を含むことができる。

【0126】

本発明の免疫原組成物は、従来の生理学的に許容され得るキャリア、希釈剤および賦形剤（例えば、上記で記載されたタイプの医薬調製物において有用な溶媒、緩衝剤、アジュバント、促進因子または他の成分など）の選択によって制限されない。適切なpH等張性、安定性および他の従来の特徴を有し、上記で記載された構成成分からこれらの薬学的に受容可能な組成物を調製することはこの技術分野の技術の範囲内である。

10

【0127】

（F. 免疫原組成物のための投薬量および投与経路、エレクトロポレーション）

一般に、本発明の免疫原組成物の構成成分についての適切な「有効量」または投薬量の選択はまた、用いられる免疫原組成物中の選択された抗原の正体、ならびに、被験体の身体状態（特にとりわけ、免疫化被験体の全身の健康状態、年齢および体重が含まれる）に基づく。投与方法および投与経路、ならびに、免疫原組成物中のさらなる構成成分の存在もまた、DNAプラスミド組成物の投薬量および量に影響を及ぼし得る。有効用量のそのような選択および上方調節または下方調節はこの技術分野の技術の範囲内である。免疫応答（好ましくは、保護応答）を誘発するために、または、著しい有害な副作用を伴うことなく患者において外因性の作用を生じさせるために要求されるプラスミドの量は、これらの要因に依存して変化する。好適な用量が当業者によって容易に決定される。

20

【0128】

本発明の免疫原組成物はヒトまたは非ヒト脊椎動物に様々な経路によって投与され、そのような経路には、鼻腔内、経口、膣、直腸、非経口、皮内、経皮（例えば、国際特許出願公開WO98/20734（これは、参考として本明細書に援用される）を参照のこと）、筋肉内、腹腔内、皮下、静脈内および動脈内が含まれるが、これらに限定されない。適切な経路が、使用される免疫原組成物の性質、ならびに、患者の年齢、体重、性別および全身の健康状態の評価、ならびに、免疫原組成物中に存在する抗原、ならびに、類似する様々な要因に依存して主治医によって選択される。

30

【0129】

免疫原組成物の投与順序および個々の投与の間隔期間を、その方法の適用に対する受容者の身体的特徴および正確な応答に基づいて主治医または当業者によって選択することができる。そのような最適化は十分にこの技術分野の技術の範囲内であることが予想される。

【0130】

別の実施形態において、別個の遺伝子産物の、1つ、2つまたは3つのオープンリーディングフレームを1つの細胞においてインビボで同時発現させるための方法が提供され、この方法は、約0.1 μ g～約100mgのポリヌクレオチドを哺乳動物の組織に導入する工程を包含する。

40

【0131】

免疫原組成物は、投与時のエレクトロポレーションの使用によって投与され得、そして、プラスミドの取り込みを投与時のエレクトロポレーションの使用によって高めることができる。エレクトロポレーションを行うために、電極が、ポリヌクレオチドが注入される領域の近くに約1mm～4mm離して設置される。電極の正確な位置または設計は、電流が、注入されたポリヌクレオチドの領域内のそれらの方向に対して筋繊維を直交して通過し得る限り様々であり得る。米国特許第5,273,525号（G. A. Hoffmann）、米国特許第5,869,326号（G. A. Hoffmann）、米国特許第5,993,434号（S. B. Dev他）、米国特許第6,014,584号（G. A. Hoffmann他）、米国特許第6,068,650号（G. A. Hoffmann他）、米国特

50

許第6,096,020号(G. A. Hofmann)、米国特許第6,233,482号(G. A. Hofmann他)、米国特許第6,241,701号(G. A. Hofmann)、米国特許第6,418,341号(G. A. Hofmann他)、米国特許第6,451,002号(S. B. Dev他)、米国特許第6,516,223号(G. A. Hofmann)、米国特許第6,763,264号(G. A. Hofmann)、米国特許第6,110,161号(I. Mathiesen他)を参照のこと(これらのすべてがその全体について参考として援用される)。

【0132】

電極が所定の位置に置かれると、筋肉がエレクトロポレーションされ、すなわち、電氣的に刺激される。刺激は、所定の振幅および持続時間を有するパルスとして送達される。トランスフェクション効率を最適化するために、パルスの持続時間、電圧、キャパシタンス、電場の強さ、数、波形のパラメーターを変化させることができ、トランスフェクション効率を比較することができる。電気パルスは、エレクトロポレーションにより加えられたパルス状の電場である。パルスは、単極性、双極性、指数的または矩形の波形が可能である。電圧はおよそ0ボルト〜1000ボルトの範囲を有する；パルスの持続時間は5マイクロ秒〜5ミリ秒の範囲を有する；パルスの数は単パルス〜30,000パルスの範囲を有する；一連のパルス列におけるパルス振動数は0.5Hz〜1000Hzの範囲を有する。電場の強さについての有用な範囲は約25V/cm〜約800V/cmの範囲である。本発明の実施における使用のために意図される電気パルスには、エレクトロポレーションを生じさせるための十分な電圧および持続時間のそのようなパルスが含まれる。Hofmann, G. A.、Cells in electric fields (E. Neumann, A. E. Sowers & C. A. Jordan (編)、Electroporation and electrofusion in cell biology (389頁〜407頁)、Plenum Publishing Corporation (1989))を参照のこと。

【0133】

(G. キット構成成分)

さらに別の実施形態において、本発明は、選択された抗原に対する免疫応答が所望される上記の疾患または状態のいずれかを処置するための免疫原レジメン、予防的レジメンまたは治療的レジメンを即座に施すための医薬用キットを提供する。このようなキットは、高レベルの抗原特異的な免疫応答を哺乳動物被験体または脊椎動物被験体において誘発する方法で使用するために設計される。キットは、1セットの選択された抗原またはペプチドをコードする3つの転写ユニットを含むDNAプラスミドを含む少なくとも1つの免疫原組成物を含有する。免疫原組成物の多数回分の事前に包装された投薬量を多数回投与のためにキットにより提供することができる。

【0134】

DNAプラスミドを含む上記の免疫原組成物によっても、サイトカインまたは他のアジュバント(例えば、IL-12など)が発現されない場合、キットはまた必要に応じて、別個のサイトカイン/アジュバント組成物を含有するか、または、多数回分の事前に包装された投薬量のサイトカイン/アジュバント組成物を多数回の投与のために含有する。これらのサイトカイン組成物は一般に、選択されたサイトカインを、哺乳動物細胞または脊椎動物細胞におけるその発現を誘導する調節配列の制御下にコードするDNA配列を含む核酸組成物である。他のアジュバントを必要に応じて、事前に包装されたバイアルにより、溶液、液体または固体のいずれかとして提供することができる。

【0135】

キットはまた、免疫原組成物を初回免疫/追加抗原投与法において使用するための説明書を含有する。キットはまた、特定のアッセイを行うための説明書、上記で記載された様々なキャリア、賦形剤、希釈剤およびアジュバントなど、ならびに、組成物を投与するための装置(例えば、シリンジ、スプレーデバイスなど)を含むことができる。他の構成成分には、他の組成の中でも特に、使い捨て手袋、汚染除去説明書、アプリケーションスティー

ックまたはアプリケーション容器が含まれ得る。

【0136】

本発明がより良く理解され得るために、下記の実施例が示される。実施例は例示目的のためだけであり、本発明の範囲を限定するとは解釈されるべきではない。下記の実施例において引用されているすべての文書、刊行物および特許は参考として本明細書中に援用される。

【実施例】

【0137】

(実施例1. HIV遺伝子の選択および改変)

当業者は、多くのウイルスおよび細菌からの配列情報がこの技術分野では利用できるところを理解する。より具体的には、配列情報を、ポリペプチドを本発明のプラスミドにおいて発現させる際に使用される遺伝子をクローン化するために使用することができる。HIVおよび他の病原体に由来する多くの配列に関する情報を、Los Alamos National Laboratory (ロスアラモス国立研究所)、および、United States National Library of Medicine (国立医学図書館) (8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894)でのNational Center for Biotechnology Information (国立バイオテクノロジー情報センター)におけるHIV配列データベースから入手することができる。

【0138】

本発明の1つの実施形態において、下記のHIV遺伝子が、HIVゲノムのほとんどを発現する1つの例示的なDNAプラスミドに含むために選択された：単離体HXB2に由来するgag遺伝子、および、単離体HXB2に由来するpol遺伝子。完全なHXB2配列が登録番号K03455でGenBankコンピューターデータベースに登録されている。nef遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子が単離体NL4-3に由来した。完全なNL4-3配列が登録番号M19921でGenBankコンピューターデータベースに登録されている。HIVエンベロップ遺伝子が、David Montefiore博士から得られた初代単離体6101に由来した。完全なHIVエンベロップ配列が登録番号AY612855および同bankit625244でGenBankコンピューターデータベースに登録されている。

【0139】

HIVゲノムのほとんどを1つの発現プラスミドに含むことを可能にするために、遺伝子融合体を、全長のgag-pol遺伝子およびほぼ全長のnef-tat-vif遺伝子を使用して調製した。加えて、gag遺伝子とpol遺伝子との間のプロテアーゼ切断部位を除いた。本発明の実施形態で使用されたすべてのHIV遺伝子は、高レベルのタンパク質発現のために最適化された(配列改変された)RNAであった。米国特許第5,965,726号、同第5,972,596号、同第6,174,666号、同第6,291,664号および同第6,414,132号を参照のこと。

【0140】

あるいは、これらのHIV遺伝子を米国特許出願第60/576,819号(2004年6月4日出願)に提供される方法に従って最適化することができる。この方法に従って、遺伝子の発現が、特定の野生型コドンを「代用」コドンにより置換することによって高められる。ポリヌクレオチドの強化された配列が、好適な代用コドンを選択することによって決定される。代用コドンは、天然に存在する(野生型)遺伝子の、AおよびT(あるいは、RNAの場合にはAおよびU)の含有量を変更させるために選択される。代用コドンは、アラニン、アルギニン、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、セリン、トレオニンおよびバリンのアミノ酸をコードするコドンである。従って、改変された核酸配列は配列全体を通してこれらのアミノ酸のそれぞれについての代用コドンを有する。残る11個のアミノ酸については、変化を行わず、それにより、対応する天然に存在するコドンがその位置に残っている。

【0141】

標準的な技術を用いて、上記のHIV遺伝子を、それらの安全性を改善し、かつ、それらの発現を最適化するために改変した。Sambrook J、Fritsch EFおよびManiatis T、Molecular cloning: A laboratory manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor NY (1989))を参照のこと。例えば、下記の遺伝子改変を、安全性を高めるために(すなわち、ウイルス酵素を不活性化することによって)、また、その後のベクターに含まれるHIV遺伝子の大きさを最大限にするために使用した。

【0142】

1) HIV-1のgag-polの融合ポリペプチドを、gag終結因子およびpol開始因子をそれぞれの遺伝子から除くことによって1つのオープンリーディングフレームで作製し、変異を、2つの個々のタンパク質が形成されないようにするために野生型のフレームシフト領域に導入した。融合構築物のこの例では、野生型gag-polにおけるフレームシフト「すべる(slippery)」配列TTTTTT(配列番号2)をcTTC Tg(配列番号3)に変化させている。gag-pol融合遺伝子を構築することに関する情報については、Megede, J. Z. 他、J. Virology、77:6197~6207(2003)を参照のこと(この開示は本明細書によりその全体が参考として組み込まれる)。野生型gag-pol融合タンパク質は、gag遺伝子およびpol遺伝子を隔てる、機能を有しない56アミノ酸のオープンリーディングフレームのポリペプチドを含有する。この構築物の全体的なサイズを最小限に抑えるために、(Lys-Gly-Arg-Pro)(配列番号4)の最後の4残基を有するgagポリタンパク質を、短縮した10アミノ酸の遺伝子間領域(Asp-Arg-Gln-Gly-Thr-Val-Ser-Phe-Asn-Phe)(配列番号5)が続くように改変した。polポリタンパク質の最初の4残基はそのままである(Pro-Gln-Ile-Thr)(配列番号6)。三連転写ユニットプラスミドでの発現を容易にするために、gag遺伝子およびpol遺伝子の野生型コード領域からの逸脱を行わなかった。

【0143】

2) HIV-1プロテアーゼのすべてのタンパク質分解活性を、3つの活性部位アミノ酸(25位~27位のAsp-Thr-Gly)をコードするヌクレオチドを欠失させることによって不活性化した。Loeb他、Nature、340:397(1989); Wu他、J. Virol、70:3378(1996)を参照のこと。

【0144】

3) 逆転写酵素(RT)を、下記の4つのアミノ酸をコードするヌクレオチドを欠失させることによって不活性化した: Tyr183、Met184、Asp185、Asp186。Larder他、Nature、327:716~717(1987); Larder他、PNAS、86:4803~4807(1989)を参照のこと。

【0145】

4) RNase活性を、1個のアミノ酸(glu478)をコードするヌクレオチドを欠失させることによって失わせた。Davies他、Science、252:88~95(1991); Schatz他、1989、FEBS Lett.、257:311~314(1989)を参照のこと。

【0146】

5) インテグラーゼ機能を、下記の3つのアミノ酸をコードするヌクレオチドを欠失させることによって失わせた: Asp626、Asp678およびGlu714。Wiskerchen他、J. Virol、69:376~386(1995); Leavitt他、J. Biol. Chem.、268:2113~2119(1993)を参照のこと。

【0147】

6) 1つのオープンリーディングフレームを、1つのポリタンパク質をコードするよう

10

20

30

40

50

に読み枠を合わせて下記のコード領域（n e f アミノ酸残基 4～206；t a t アミノ酸残基 2～80；v i f アミノ酸残基 2～192）を融合することによって、H I V-1 の n e f 遺伝子、t a t 遺伝子および v i f 遺伝子について作製した。このポリタンパク質は n e f - t a t - v i f または n t v として示される。

【0148】

7) 安全上の措置として、n e f タンパク質および t a t タンパク質を、n e f のミリスチル化シグナル（残基 1～3、M G G）の除去および t a t からの 2 つのシステイン（C 30 & C 34）の欠失によって不活性化した。

【0149】

（実施例 2．単一転写ユニットプラスミド、二連転写ユニットプラスミドおよび三連転写ユニットプラスミドの構築）

これらの例において議論されるプラスミドを表 1 および表 2 に示す。

【0150】

三連転写ユニット発現カセットを、環状の二本鎖 DNA プラスミドにおいて様々な構成成分を使用することによって構築した。図 1 を参照のこと。第 1 の構成成分は、サルサイトメガロウイルス（S C M V）プロモーターと、クローニング部位と、ウシ成長ホルモン（B G H）ポリ A シグナルとから構成される、ポリペプチドを真核生物細胞において発現させるための第 1 の転写ユニットであった。第 2 の構成成分は、ポリペプチドを真核生物細胞において発現させるための第 2 の転写ユニットであり、これは、ヒトサイトメガロウイルス（H C M V）即時初期プロモーターと、クローニング部位と、S V 40 ポリアデニル化（ポリ A）シグナルとから構成される。第 1 の転写ユニットと第 2 の転写ユニットとを隔てるのがスペーサー領域 1 である。第 3 の構成成分は、ポリペプチドを真核生物細胞において発現させるための第 3 の転写ユニットであり、単純ヘルペスウイルス L a p 1 プロモーターと、S V 40 のスプライスドナー／アクセプターと、クローニング部位と、ウサギの β グロビンポリ A シグナルとから構成される。Go i n s W. F. 他、J. V i r o l o g y、68：2239～2252（1994）；S o a r e s, K. J. 他、V i r o l o g y、70：5384～5394；Go i n s W. F. 他、J. V i r o l o g y、73：519～532（1999）を参照のこと。第 2 の転写ユニットと第 3 の転写ユニットとを隔てるのがスペーサー領域 2 である。細菌由来のキメラなカナマイシン耐性（k m^r）遺伝子（アデニル 4' -ヌクレオチジルトランスフェラーゼタイプ 1 a）もまたスペーサー領域 2 とともに含まれる。S h a w K J 他、M i c r o b i a l . R e v i e w s、57：138～163（1993）、および、S a d a l e, Y. 他、J. B a c t e r i o l.、141：1178～1182（1980）を参照のこと。この遺伝子は、プラスミドを含有する細菌の選択を可能にしながら、限定された数のアミノグリコシドに対する耐性を与えるために考案されている。第 3 の転写ユニットと第 1 の転写ユニットとを隔てるのがスペーサー領域 3 である。スペーサー領域 3 は、細菌におけるプラスミドの増殖のために必要とされる p U C の細菌複製起点を含む。

【0151】

（実施例 3．6 つの H I V 遺伝子を含有する三連転写ユニットプラスミド）

三転写ユニットプラスミド DNA ベクターの使用の実例として、3 つの真核生物オープンリーディングフレームを同時発現することができるプラスミドベクターを作製した。三転写ユニットプラスミド DNA ベクターを、H I V-1 抗原をコードする下記の選択された遺伝子を実施例 2 に記載される三連転写ユニット発現カセットに挿入することによって作製した。すべてのクローニング技術を通常的な手順（S a m b r o o k 他、1989）に従って行った。

【0152】

最初に、H I V-1 の g a g - p o l 融合遺伝子を第 1 の転写ユニットの S C M V 部位と B G H ポリ A 部位との間にある P m e I - X h o I クローニング部位に挿入した。g a g 遺伝子は単離体 H X B 2 に由来し、同様に、p o l 遺伝子もまた単離体 H X B 2 に由来した。完全な H X B 2 配列が登録番号 K 0 3 4 5 5 で G e n B a n k コンピューターデー

10

20

30

40

50

データベースに登録されている。当業者は、他のクレードに由来する他のHIV-1のgag遺伝子およびpol遺伝子、あるいは、他のウイルス遺伝子または細菌遺伝子が同様の様式で挿入され得ることを理解する。HIVおよび他の病原体に関する配列情報は、Los Alamos National Laboratory（ロスアラモス国立研究所）、および、United States National Library of Medicine（国立医学図書館）（8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894）でのNational Center for Biotechnology Information（国立バイオテクノロジー情報センター）におけるHIV配列データベースから入手することができる。

【0153】

10

次に、HIV-1の初代単離体（6101）に由来する全長のエンベロープ遺伝子（gp160）を第2の真核生物転写ユニットのHCMV部位とSV40ポリA部位との間にあるMluIクロニング部位に挿入した。6101のエンベロープ配列は、登録番号AY612855および同bankit625244でGenBankコンピューターデータベースにおいて得ることができる。

【0154】

最後に、tatの残基2～80に融合され、かつ、vifの残基2～192に融合されたnefの残基4～206を含む、HIVのnef-tat-vif（NTV）融合タンパク質をコードする遺伝子構築物を、HSV-Lap1プロモーターとウサギβ-グロビンポリAシグナルとの間にあるKpnI-EcoRVクロニング部位に挿入した。nef 20
遺伝子、tat遺伝子およびvif遺伝子はHIV-1の単離体NL4-3に由来した。HIV-1 NL4-3の完全な配列が登録番号M19921でGenBankコンピューターデータベースに登録されている。

【0155】

従って、構築されたように、gag-polのオープンリーディングフレームが第1の転写ユニットにおけるSCMVプロモーターおよびBGHポリA部位の制御下に置かれ、エンベロープのオープンリーディングフレームが第2の真核生物転写ユニットにおけるHCMVプロモーターおよびSV40ポリAシグナルの制御下に置かれ、nef-tat-vif融合体のオープンリーディングフレームが第3の真核生物転写ユニットにおけるHSV-Lap1/SV40イントロンおよびウサギβ-グロビンポリAシグナルの制御下に 30
置かれた。

【0156】

（実施例4．単一転写ユニットプラスミド、二連転写ユニットプラスミドおよび三連転写ユニットプラスミドからのHIV遺伝子の発現）

材料および方法；細胞およびトランスフェクション

実施例3で記載された6つのHIV遺伝子を発現するプラスミドを、コードされたタンパク質を発現する能力についてインビトロで評価した。すべてのインビトロ発現研究のために使用した細胞は、American Type Culture Collection（ATCC）から得られた293細胞およびRD細胞であった。HIVタンパク質をこれらの細胞において発現させるための手順は下記の通りであった：細胞をトランスフェ 40
クションの24時間前に直径35mmのウェルあたり 2×10^5 細胞の密度でプレートし、精製したプラスミドDNAによりトランスフェクションした。トランスフェクションのために、2μgのプラスミドをFugeneトランスフェクション試薬（Roche Diagnostics, Indianapolis, IN）と混合し、100μlの総体積で細胞に重層した。次いで、細胞を、10%のFBSを含む2mlのDMEM培地（BRL）により48時間インキュベーションした。最後に、細胞溶解物をさらなる分析のために集めた。

【0157】

（発現タンパク質の検出）

HIVタンパク質の特異的な検出を、ウェスタンブロットアッセイを使用して達成した 50

。例えば、gagタンパク質、polタンパク質、エンベロープタンパク質およびvifタンパク質のそれぞれについてのウェスタンブロットアッセイを、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用してタンパク質混合物を分離することによって行った。次いで、分離したタンパク質をPVDFメンブラン（Invitrogen、Carlsbad、CA）に転写した。事前に染色された分子量マーカー、ならびに、HIV-1の組換えp24（gag）タンパク質、組換えp66（pol）タンパク質、組換えgp160（env）タンパク質および組換えvifタンパク質（Invitrogen）をサイズ標準物およびポジティブコントロールとしてそれぞれ使用した。gag、pol、envおよびvifの発現の検出を免疫染色によって達成し、結合している分離されたタンパク質を有するPVDFメンブランをそれぞれのタンパク質に対して特異的な抗体とインキュベーションした。アルカリホスファターゼに結合体化された二次抗体（Invitrogen）を使用し、発色検出を、発色検出キット（Invitrogen）を使用することによって行った。

10

【0158】

（単一転写ユニットプラスミド、二連転写ユニットプラスミドおよび三連転写ユニットプラスミドからのHIV遺伝子の発現）

三連転写ユニットプラスミドからのHIV遺伝子の発現を評価し、単一転写ユニットプラスミドおよび二連転写ユニットプラスミドのそれぞれからの同じ遺伝子の発現と比較した。単一転写ユニットプラスミドは、HCMVプロモーターおよびBGHポリAシグナルを発現調節エレメントとして含有する単一の真核生物転写ユニットを有していた。単一転写ユニットプラスミドには、表1に示されるように、101～105、ならびに、110および111の番号が付けられている。例えば、プラスミド101はHIVのenv遺伝子を単一転写ユニットにおけるオープンリーディングフレームとして含有していた。同様に、プラスミド102はHIVのgag遺伝子を単一転写ユニットにおけるオープンリーディングフレームとして含有していた。加えて、プラスミド103はHIVのpol遺伝子を単一転写ユニットにおけるオープンリーディングフレームとして含有し、プラスミド104はHIVのnef-tat-vif（ntv）融合遺伝子を単一転写ユニットにおけるオープンリーディングフレームとして含有していた。プラスミド101はまた、プラスミド104内のHCMVではなく、Lap1プロモーターによって駆動されることを除いて、HIVのnef-tat-vif（ntv）融合遺伝子を単一転写ユニットにおけるオープンリーディングフレームとして含有していた。最後に、プラスミド110はHIVのgag-pol-nef-tat-vif融合遺伝子を単一転写ユニットにおけるオープンリーディングフレームとして含有し、プラスミド111はHIVのgag-pol融合遺伝子を単一転写ユニットにおけるオープンリーディングフレームとして含有していた。

20

30

【0159】

二連転写ユニットプラスミドは2つの完全な真核生物転写ユニットを有していた。二連転写ユニットプラスミドには、表1に示されるように、201～204および212の番号が付けられた。二連転写ユニットプラスミドのための発現調節エレメントは、第1の転写ユニットではSV40ポリAと共役したHCMVプロモーターから構成され、第2の転写ユニットではBGHポリAシグナルと共役したSCMVプロモーターから構成された。この実施形態において、プラスミド201はHIVのpol遺伝子を第1の転写ユニットに含有し、HIVのgag遺伝子を第2の転写ユニットに含有した。プラスミド202はHIVのnef-tat-vif融合遺伝子の遺伝子を第1の転写ユニットに含有し、HIVのenv遺伝子を第2の転写ユニットに含有した。プラスミド203はHIVのgag-pol-nef-tat-vif融合遺伝子の遺伝子を第1の転写ユニットに含有し、HIVのenv遺伝子を第2の転写ユニットに含有した。プラスミド204はHIVのgag-pol融合遺伝子の遺伝子を第1の転写ユニットに含有し、HIVのenv遺伝子を第2の転写ユニットに含有した。

40

【0160】

50

一部の実施形態において、アジュバントが、アジュバントをプラスミドから発現させることによって提供される。そのような場合、プラスミドは適切な数の転写ユニットを含有しなければならない。明確化のために、また、抗原プラスミドと区別するために、一次、二次および三次の用語法が、1つまたは2つまたは3つの転写ユニットを有するアジュバントプラスミドを示すために使用される。例えば、IL-12は、2つのポリペプチドから構成されるアジュバントである。適切なプラスミドがプラスミド212であり、これは、一次転写ユニットにおいてHCMV即時初期プロモーターおよびSV40ポリAデニル化シグナルの制御下で発現させられるIL-12のp35サブユニットと、二次転写ユニットにおいてサルCMV (SCMV) プロモーターおよびBGHポリAデニル化シグナルの制御下で発現させられるIL-12のp40サブユニットとを含有した。

10

【0161】

三連転写ユニットプラスミドは3つの完全な真核生物転写ユニットを有し、301、302および303の番号が付けられた。表2を参照のこと。これら3つのプラスミドの間の違いは、挿入されているHIVのオープンリーディングフレームの数であった。三連転写ユニットプラスミドのための発現調節エレメントは、第1の転写ユニットではBGHポリAシグナルと共役したSCMVプロモーターから構成され、第2の転写ユニットではSV40ポリAと共役したHCMVプロモーターから構成され、第3の転写ユニットではウサギβグロビンポリAシグナルと共役したHSVLa p1プロモーターから構成された。表2に示されるように、プラスミド番号301は三連転写ユニットプラスミドであるが、挿入されたオープンリーディングフレームを有する転写ユニットが1つだけである。具体的には、プラスミド301はgag-pol融合遺伝子のオープンリーディングフレームを第1の転写ユニットに含有した。プラスミド番号302は、挿入されたオープンリーディングフレームを有する転写ユニットが2つである三連転写ユニットプラスミドである（第1の転写ユニットにおけるgag-pol、および、第3の転写ユニットにはHIVのnef-tat-vif融合遺伝子のオープンリーディングフレーム）（第2の転写ユニットには遺伝子が挿入されなかった）。最後に、プラスミド番号303は、3つの転写ユニットのすべてが、挿入されたオープンリーディングフレームを有する三連転写ユニットプラスミドである（第1の転写ユニットにはgag-pol融合遺伝子のオープンリーディングフレーム、第2の転写ユニットにはenv遺伝子のオープンリーディングフレーム、および、第3の転写ユニットにはnef-tat-vif融合遺伝子のオープンリーディングフレーム）。

20

30

表1. 単一転写ユニットプラスミドおよび二連転写ユニットプラスミド*

【0162】

【表 1】

プラスミド番号	HIV 構築物	タイプ
001	空ベクターコントロール	コントロール/転写ユニットなし
101	HCMV-env-BGH ポリ A	単一型
102	HCMV-gag-BGH ポリ A	単一型
103	HCMV-pol-BGH ポリ A	単一型
104	HCMV-ntv-BGH ポリ A	単一型
105	Lap1-ntv- ウサギベータグロビン ポリ A	単一型
110	HCMV-gag-pol-ntv-BGH ポリ A	単一型/融合
111	HCMV-gag-pol-BGH ポリ A	単一型/融合
201	HCMV-pol-SV40 ポリ A, SCMV-gag-BGH polyA	二連型
202	HCMV-ntv-SV40 ポリ A, SCMV-env-BGH polyA	二連型
203	HCMV-gag-pol-ntv-SV40 ポリ A, SCMV-env-BGH ポリ A	二連型
204	HCMV-gag-pol-SV40 ポリ A, SCMV-env-BGH ポリ A	二連型
212	***HCMV-mIL-12 p35-SV 40 ポリ A, SCMV-mIL-12 p40-BGH ポリ A	アジュバント

* 下記の略号が使用される：SCMV：サルサイトメガロウイルスプロモーター、HCMV：ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、HSV1ap1：単純ヘルペス潜伏期関連プロモーター1、gag-pol：HIVのgag-pol融合体、ntv：HIVのnef-tat-vif融合体、env：HIVのエンベロップ、mIL-12：マウスインターロイキン-12。

表 2. 三連転写ユニットプラスミド*

【0163】

【表 2】

プラスミド番号	HIV 構築物	ORFの数
301	SCMV-gag-pol-BGH ポリ A, HCMV-[none], Lap1-[none]	1
302	SCMV-gag-pol-BGH ポリ A, HCMV-[none], Lap1:ntv- ウサギベータグロビン ポリ A	2
303	SCMV-gag-pol-BGH ポリ A, HCMV-env-SV40 ポリ A, Lap1:ntv- ウサギベータグロビン ポリ A	3

* 下記の略号が使用される：SCMV：サルサイトメガロウイルスプロモーター、HCMV：ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、HSV1ap1：単純ヘルペス潜伏期関連プロモーター1、gag-pol：HIVのgag-pol融合体、ntv：HIVのnef-tat-vif融合体、env：HIVのエンベロップ、HCMV-[none]、Lap1-[none] は、転写ユニットがオープンリーディングフレームを含有しなかったことを示す（プラスミド301を参照のこと）；

** IL-12 はマウスまたはアカゲザルまたはヒトのいずれかに由来し得る。

【0164】

上記で議論されたように、多数の単一転写ユニットプラスミドおよび二連転写ユニット

プラスミドを、三連転写ユニットプラスミドの発現と比較するために構築した。表1および表2を参照のこと。これらのgag含有構築物、pol含有構築物、env含有構築物、nef-tat-vif含有構築物、gag-pol含有構築物およびgag-pol-nef-tat-vif含有構築物の発現パターンを、293細胞および/またはRD細胞を、単一転写ユニットプラスミド、二連転写ユニットプラスミドおよび三連転写ユニットプラスミドで一過的にトランスフェクションし、細胞溶解物を、適切な抗体を使用するウェスタンブロットによって分析することによって評価した。

【0165】

様々な構築物からの細胞溶解物におけるgagのインビトロ発現を行い、その結果を、ウェスタンブロットを使用して検出した。図2および表1を参照のこと。gagタンパク質およびpolタンパク質がマウス抗gagモノクローナル血清およびヒトポリクローナル血清によりそれぞれ検出された。分子量マーカーおよびHIV p24を標準物として最初の2つのレーンに含めた。gagを発現した単一転写ユニットプラスミド102を最初のサンプルレーンにおいて泳動した。2つの転写ユニット、すなわち、挿入されたオープンリーディングフレームを伴う2つの転写ユニットを有するプラスミドが、プラスミド201、プラスミド203およびプラスミド204であり、すべてがかなりの量のgagまたはgag含有ポリタンパク質（例えば、gag-pol-nef-tat-vifなど）またはgag-polを発現した。gag-pol融合構築物において、gagとpolとの間におけるフレームシフト配列を、同じ読み枠からのgagおよびpolの発現を可能にするように変異させた。二転写ユニットプラスミドの201、203および204は、単一転写ユニットプラスミド102よりも少ないgagを産生した。gag-pol融合体をコードした二連転写ユニットプラスミドおよび三連転写ユニットプラスミドは、約180kdの予想サイズで移動した等しい量のgag-polポリタンパク質を発現した。大型のgag-pol-ntvポリタンパク質をコードするプラスミド203からのgagの発現もまた、トランスフェクションされた細胞の細胞溶解物において検出され、このタンパク質は約220kdの予想サイズで移動した。しかしながら、この大型の融合体（プラスミド203）からの発現は、gag-polをコードするプラスミド302およびプラスミド303の発現よりも低かった。三転写ユニットプラスミド303もまた、かなりの量のgagをgag-polポリタンパク質の形態で産生したが、gagは単一転写ユニットプラスミドよりも少なく、また、二連転写ユニットプラスミドから産生されたレベルとほぼ等しかった。挿入された2つのオープンリーディングフレームと、オープンリーディングフレームを含まない1つの転写ユニットとを有した三転写ユニットプラスミド302は二転写ユニットプラスミドとほぼ同じレベルでgagを産生した。図2を参照のこと。

【0166】

様々な構築物からの細胞溶解物におけるpolのインビトロ発現プロフィールを行い、ウェスタンブロットを使用して検出されたときの結果は、gagの場合に観測されたものと類似するパターンであった。図3および表1を参照のこと。この場合、polタンパク質がヒトポリクローナル血清により検出された。分子量マーカーおよびHIV逆転写酵素を標準物として最初の2つのレーンに含めた。polを発現した単一転写ユニットプラスミド103を最初のサンプルレーンにおいて泳動した。次に、2つの転写ユニット、すなわち、挿入されたオープンリーディングフレームを伴う2つの転写ユニットを有するプラスミド201、プラスミド203およびプラスミド204はすべてが、かなりの量のpolまたはpol含有ポリタンパク質（例えば、gag-pol-nef-tat-vifなど）またはgag-polを発現した。gagに関する状況とは対照的に、二転写ユニットプラスミドの201、203および204は、単一転写ユニットプラスミド103とほぼ同じレベルのpolを産生した。polおよびgag-pol融合物は、polについてはおよそ110kdの予想サイズで、gag-polについてはおよそ180kdの予想サイズで、gag-pol-nef-tat-vifについてはおよそ250kdの予想サイズで移動したpolポリタンパク質を発現した。三転写ユニットプラスミド30

3もまた、p o lをg a g-p o lポリタンパク質の形態で産生したが、単一転写ユニットプラスミドおよび二連転写ユニットプラスミドよりも少ないp o lを産生した。再度ではあるが、挿入された2つのオープンリーディングフレームと、オープンリーディングフレームを含まない1つの転写ユニットとを有した三転写ユニットプラスミド302は二転写ユニットプラスミドの201および203とほぼ同じレベルでp o lをg a g-p o lポリタンパク質の形態で発現した。図3を参照のこと。この実施例では、プラスミド204が他の二転写ユニットプラスミド（201および203）よりも高いレベルのp o lを発現した。図3を参照のこと。

【0167】

同様の分析を、n e f-t a t-v i fまたはNTVとして知られているH I V調節タンパク質の融合体の細胞溶解物においてインビトロ発現について行った。図4および表1を参照のこと。NTVタンパク質がマウス抗v i fモノクローナル抗体により検出された。分子量マーカーおよび組換えH I V v i f p 23を標準物として最初の2つのレーンにそれぞれ含めた。NTVをHCMVプロモーターまたはL a p 1プロモーターのいずれかからそれぞれ発現した2つの単一転写ユニットプラスミド（104および105）を最初の2つのサンプルレーンにおいて泳動した。図4を参照のこと。両方のプラスミドからのn e f-t a t-v i fの発現レベルはほぼ同じであった。次に、挿入されたオープンリーディングフレームを有する2つの完全な転写ユニットを有する2つのプラスミド（プラスミド202およびプラスミド203）はともにかなりの量のn e f-t a t-v i fポリタンパク質を産生した。n e f-t a t-v i fタンパク質の発現レベルは、プラスミド203についてはより少ないようであったが、このことは、発現しているポリタンパク質が非常に大きかった（g a g-p o l-n e f-t a t-v i f、約220kD）ためであると予想された。挿入された2つのオープンリーディングフレームと、オープンリーディングフレームを含まない1つの転写ユニットとを有した三転写ユニットプラスミド302は単一転写ユニットプラスミドとほぼ同じレベルのn e f-t a t-v i fを産生した。図4を参照のこと。挿入された3つのオープンリーディングフレームを有した三転写ユニットプラスミド303もまた、かなりの量のn e f-t a t-v i fポリタンパク質を産生した。具体的には、三転写ユニットプラスミド303は単一転写ユニットプラスミド（104および105）よりも少ないn e f-t a t-v i fを産生し、二重転写ユニットプラスミド（202および203）から産生されたn e f-t a t-v i fポリタンパク質のレベルとほぼ等しいか、または、それよりも良好にn e f-t a t-v i fを産生した。図4を参照のこと。

【0168】

様々な単一転写ユニットプラスミド、二連転写ユニットプラスミドおよび三連転写ユニットプラスミドがH I Vのエンベロップ遺伝子を発現する能力を細胞溶解物において評価した。図5および表1を参照のこと。エンベロップタンパク質がマウス抗e n vモノクローナル抗体により検出された。分子量マーカーおよび組換えH I V g p 120を標準物として最初の2つのレーンにそれぞれ含めた。最初のサンプルレーンは、単一転写ユニットプラスミド101（これは、e n vをHCMVプロモーターから発現する）から発現したタンパク質を含有する。図5を参照のこと。かなりの量のエンベロップ糖タンパク質が発現した。次に、2つの挿入されたオープンリーディングフレームを有する2つの完全な転写ユニットを有する3つのプラスミド（プラスミド202、プラスミド203およびプラスミド204）はかなりの量のエンベロップ糖タンパク質を産生した。それぞれの場合において、エンベロップ遺伝子はSCMVプロモーターによって制御されていた。三転写ユニットプラスミド303もまた、かなりの量のe n v糖タンパク質を産生したが、発現レベルは、単一転写ユニットプラスミドおよび二連転写ユニットプラスミド（101、202、203および204）と比較したとき、1/2〜1/3ほど低下していた。図5を参照のこと。

【0169】

（結論）

10

20

30

40

50

半定量的なインビトロ発現分析に基づいて、データは、g a g-p o l、e n vおよびn t vを含む、挿入されたH I V遺伝子のすべてが、3つの独立した転写ユニットを保持する三連プロモータープラスミドから著しいレベルで発現したことを示している。

【0170】

(実施例5：プラスミドあたり一定のDNA濃度での、多数のプラスミドを介するか、または、単一のプラスミドによる多数の遺伝子の発現)

次に、多数の遺伝子をコードする1つの三連転写ユニットプラスミドからの発現を、それぞれが1つの遺伝子を同じ遺伝子アレイから発現する多数のプラスミドからの発現と比較した。この場合、プラスミドあたりのDNAを1 μ gで一定に保った。それぞれの場合において、DNAの総量もまた、オープンリーディングフレームのインサートを有しないプラスミドDNAを補充することによって4 μ gで一定に保った。H I V g a gの発現を、1 μ gのそれぞれのプラスミドで一過的にトランスフェクションされた培養細胞を使用して評価し、細胞溶解物をウェスタンブロットによって分析した。図6に示されるように、H I V g a gの発現が、レーン2 (2つのプラスミド)、レーン3 (1つのプラスミド)、レーン4 (1つのプラスミド) およびレーン5 (4つのプラスミド) において容易に検出された。H I V g a gの発現がレーン1 (3つのプラスミド) では低かった。再度ではあるが、三転写ユニットプラスミド303はかなりの量のg a gタンパク質を産生したが、2つ以上のプラスミドを含有する組合せよりも少なかった。

【0171】

1つのプラスミドまたは複数のプラスミドからのH I V e n vの発現を評価した。結果を図7に示す。再度ではあるが、1 μ gのそれぞれのプラスミドを培養細胞に一過的にトランスフェクションし、細胞溶解物をウェスタンブロットによって分析した。結果は、H I V e n vの発現が、レーン1 (3つのプラスミド)、レーン2 (2つのプラスミド)、レーン3 (1つのプラスミド)、レーン4 (1つのプラスミド) およびレーン5 (4つのプラスミド) において容易に検出されたことを明らかにしている。それぞれの場合において、DNAの総量を、オープンリーディングフレームのインサートを有しないプラスミドDNAを補充して、DNAの総量を4 μ gにすることによって4 μ gで一定に保った。再度ではあるが、三転写ユニットプラスミド303はかなりの量のe n v糖タンパク質を産生した。図7を参照のこと。この場合、1つの三転写ユニットプラスミド303は、4つのプラスミドが使用されたレーン5において産生された量と匹敵する量のe n v糖タンパク質を産生した。

【0172】

図8に示されるように、1つのプラスミドまたは複数のプラスミドからのH I V n e f-t a t-v i fの発現を、培養細胞に一過的にトランスフェクションさせ、1 μ gのそれぞれのプラスミドを使用して評価し、細胞溶解物をウェスタンブロットによって分析した。図8を参照のこと。結果は、H I V n e f-t a t-v i fの発現が、レーン1 (3つのプラスミド)、レーン2 (2つのプラスミド)、レーン3 (1つのプラスミド)、レーン4 (1つの三転写ユニットプラスミド) およびレーン5 (4つのプラスミド) において検出されたことを明らかにしている。図8を参照のこと。DNAの総量を4 μ gで一定に保った。三転写ユニットプラスミド303はかなりの量のn e f-t a t-v i fタンパク質を産生したが、2つのプラスミドを含有する組合せよりも少なかった。

【0173】

(結論)

図6、図7および図8に示されるように、三転写ユニットプラスミド(303)を使用して、g a g-p o lタンパク質、e n vタンパク質およびn t vタンパク質をコードする3つのオープンリーディングフレームのすべてが、類似したレベルで同時に発現された。従って、このことから、このプラスミドの機能性が確認される。

【0174】

(実施例6：一定の総DNA濃度での、2つのプラスミドを介するか、または、単一のプラスミドによる多数の遺伝子の発現)

gag、pol、envおよびnef-tat-vifのHIV遺伝子の発現を、2 μgの濃度での三連転写ユニットプラスミドと、それぞれ1 μgのDNAの2つのプラスミドの組合せとの間で比較した。総DNA濃度を、図9、図10、図11および図12に示されるように2 μgで一定に保った。

【0175】

図9は、polタンパク質の発現が、2つのプラスミドの組合せのいずれかからであっても、または、三連転写ユニットプラスミドからであっても類似していたことを示す。レーン2は、プラスミド201およびプラスミド202 (gag、pol、nef-tat-vifおよびenvの完全なHIV遺伝子アレイを発現させるために構築された2つの二連転写ユニットプラスミド) の組合せから発現したpolタンパク質のウェスタンブロットを示す。次に、二連転写ユニットプラスミドおよび単一転写ユニットプラスミド (これらは、gag、pol、envおよびnef-tat-vifを様々な構成で発現している) の2つの組合せからのpolタンパク質の発現を、polタンパク質のウェスタンブロットを使用して評価した。図9のレーン3 (プラスミド204およびプラスミド104) およびレーン5 (プラスミド302およびプラスミド101) を参照のこと。それぞれの場合において、検出可能なpol発現が認められる。レーン4は、プラスミド203 (これは、gag-pol-nef-tat-vifおよびenvの完全なHIV遺伝子アレイを発現する二連転写ユニットプラスミドである) から発現したpolタンパク質のウェスタンブロットを含む。図9を参照のこと。レーン6は、プラスミド303 (これは、実施例2および実施例3で記載されるように、gag-pol、envおよびnef-tat-vifの完全なHIV遺伝子アレイを発現する三連転写ユニットプラスミドの一例である) から発現したpolタンパク質のウェスタンブロットを含む。図9を参照のこと。

【0176】

図10および図11では、2つのプラスミドの組合せからのgagおよびエンベロープのタンパク質発現と三連転写ユニットプラスミドからのタンパク質発現とを比較する。レーン2は、プラスミド201およびプラスミド202 (これらは、gag、pol、nef-tat-vifおよびenvの完全なHIV遺伝子アレイを発現するために構築された2つの二連転写ユニットプラスミドであった) の組合せから発現したgagタンパク質およびenvタンパク質のウェスタンブロットを示す。次に、二連転写ユニットプラスミドおよび単一転写ユニットプラスミドの組合せからのgagタンパク質およびenvタンパク質の発現を、ウェスタンブロットを使用して評価した。図10および図11を参照のこと：レーン3 (プラスミド204およびプラスミド104) およびレーン5 (プラスミド302およびプラスミド101)。プラスミド302は、2つの挿入されたオープンリーディングフレームのみを有するので、二転写ユニットプラスミドとして機能する三転写ユニットプラスミドである。表2を参照のこと。検出可能なgag発現およびenv発現がそれぞれの場合に認められた。図10を参照のこと。レーン4は、プラスミド203 (これは、gag-pol-nef-tat-vifおよびenvの完全なHIV遺伝子アレイを発現する二連転写ユニットプラスミドであった) から発現したgagタンパク質およびenvタンパク質のウェスタンブロットを例示する。図10および図11を参照のこと。レーン6は、実施例2および実施例3で記載される三連転写ユニットプラスミド303から発現したgagタンパク質およびenvタンパク質のウェスタンブロットを含む。図10および図11を参照のこと。三連転写ユニットプラスミド303からのgagタンパク質およびenvタンパク質の発現は、プラスミドの組合せからのgagタンパク質およびenvタンパク質の発現と匹敵していた。

【0177】

図12では、様々なプラスミドの組合せからのnef-tat-vifポリタンパク質の発現と、三連転写ユニットプラスミドからのタンパク質発現とを、ウェスタンブロット検出を使用して比較する。レーン2は、プラスミド201およびプラスミド202 (これらは、gag、pol、nef-tat-vifおよびenvのHIV遺伝子が発現する

ように設計された2つの二連転写ユニットプラスミドであった)の組合せから発現したnef-tat-vifポリタンパク質のウェスタンブロットを示す。レーン3およびレーン5は、ウェスタンブロットを使用して検出される、二連転写ユニットプラスミドおよび単一転写ユニットプラスミドの2つの異なる組合せからのnef-tat-vifポリタンパク質の発現を示す。図12を参照のこと：レーン3(プラスミド204およびプラスミド104)およびレーン5(プラスミド302およびプラスミド101)。上記で議論されたように、プラスミド302は、2つの挿入されたオープンリーディングフレームのみを有するので、二転写ユニットプラスミドとして機能する三転写ユニットプラスミドである。表2を参照のこと。この場合、レーン5において見られるプラスミド302からのnef-tat-vifタンパク質の発現は、201および202のプラスミドの組合せ(レーン2)または204および104のプラスミドの組合せ(レーン3)よりも低いレベルであった。図12を参照のこと。レーン4は、プラスミド203(これは、gag-pol-nef-tat-vifおよびenvの完全なHIVタンパク質アレイを発現する二連転写ユニットプラスミドであった)から発現したnef-tat-vifポリタンパク質を示す。図12を参照のこと。レーン6は、三連転写ユニットプラスミド303から発現したnef-tat-vifポリタンパク質を示す。図12を参照のこと。303からのnef-tat-vifの発現はプラスミド302からのものよりも著しく多かった。特筆すべきことに、大型のgag-pol-nef-tat-vifポリタンパク質を1つのプロモーターから発現し、かつ、envタンパク質をもう一方のプロモーターから発現する二転写ユニットプラスミド(203)からの発現は、3つの独立した転写ユニットからの同じ遺伝子をコードするプラスミド303からの発現よりもかなり低かった。

【0178】

まとめると、三連転写ユニットプラスミドを使用して、3つのオープンリーディングフレームをほぼ等しいレベルで同時に発現させることができ、かつ、全体的なレベルが、そのような遺伝子をコードする単一のプロモーター構築物および二連でのプロモーター構築物の両方と匹敵していた。このインビトロ発現データは、多数のHIV遺伝子が三重転写ユニットプラスミドから発現されるとき、著しいプロモーター干渉がないことを示す。従って、個々の転写ユニットがベクター内に適切に設置されている。

【0179】

(実施例7：総DNA濃度を一定に保つことなく、多数のプラスミドを介するか、または、単一のプラスミドによる多数の遺伝子の発現)

多数の遺伝子をコードする1つの三連転写ユニットプラスミドからの発現を、同じ遺伝子アレイを発現する多数のプラスミドと比較した。この場合、プラスミドあたりのDNAが1μgで一定に保たれた。実施例5とは対照的に、DNAの総量は、DNAの総量を補うため、オープンリーディングフレームのインサートを有しないプラスミドDNAにより補充しなかった。データを示さないが、下記にまとめる。

【0180】

本実施例では、HIV gag、pol、envおよびntvの発現を、1μgのそれぞれのプラスミドで一過的にトランスフェクションした培養293細胞を使用して評価し、細胞溶解物をウェスタンブロットによって分析した。HIV gagの発現が、3つのプラスミド(101、104、301)、2つのプラスミド(201および202)、1つのプラスミド(203)、1つのプラスミド(303)、および、4つのプラスミド(101、102、103、104)との様々な組合せによるトランスフェクションから検出された。三転写ユニットプラスミド303は、より多くのプラスミドを必要とする組合せと比較したとき、かなりの量のgagタンパク質を産生した。具体的には、三転写ユニットプラスミド303は、6個すべてのHIV遺伝子を有する二転写ユニットプラスミド203よりも多くのgagタンパク質を産生し、そして6個すべてのHIV遺伝子を有する二転写ユニットプラスミドの201および202の組合せよりもわずかに少ないgagタンパク質を産生した。gagが、SCMVプロモーターによって駆動されるgag-pol融合体として発現された場合、3つのプラスミド(101、104、301)の組合

せからの g a g の発現は乏しかった。

【0181】

単一のプラスミドまたは複数のプラスミドからのH I V e n v の発現もまた評価した。結果は、H I V e n v の発現が、3つのプラスミド（301、101および104）、2つのプラスミド（201および202）、1つのプラスミド（203）、1つのプラスミド（303）、および、4つのプラスミド（101、102、103、104）による様々な組合せから容易に検出されたことを明らかにしている。DNAの総量は、使用されているプラスミドの数に依存し、プラスミドあたり1 μ g のDNAをトランスフェクションした。この場合、三転写ユニットプラスミド303は、あらゆる他のプラスミドまたはプラスミドの組合せよりも多くのe n v タンパク質を産生した。

10

【0182】

単一のプラスミドまたは複数のプラスミドからのH I V n e f - t a t - v i f の発現を、培養細胞に一過的にトランスフェクションさせた、1 μ g のそれぞれのプラスミドを使用して評価し、細胞溶解物をウェスタンブロットによって分析した。H I V n e f - t a t - v i f の発現が、3つのプラスミド（301、101および104）、2つのプラスミド（201および202）、1つのプラスミド（203）、1つのプラスミド（303）、および、4つのプラスミド（101、102、103、104）による様々な組合せから検出された。三転写ユニットプラスミド303はかなりの量のn e f - t a t - v i f タンパク質を産生した。

20

【0183】

（結論）

高レベルの特定のタンパク質をr e v 非依存的様式で発現する、多数のH I V 遺伝子をコードする三連転写ユニットプラスミドを設計し、構築した。これにより、単一のプラスミド構築物により、3つの転写物が独立かつ効率的に発現したことが確認された。本実施例では、三連転写ユニットプラスミドからのH I V 遺伝子の発現を、単一転写ユニット構築物または二連転写ユニット構築物のいずれかからの同じ遺伝子の発現と比較した。データは、一発現カセットまたは二連発現カセットによって発現された遺伝子発現と比較したとき、三連転写ユニットプラスミドからの遺伝子発現の方が低かったことを示している。しかしながら、上記実施例では、H C M V プロモーターに駆動される遺伝子発現がS C M V プロモーターよりも高く、H S V - l a p 1 プロモーターがそれに続いたことが見出された。三連転写ユニット構築物におけるプロモーターの強さにおけるこの違いは、より低い免疫原性の抗原に対してより高い免疫原性の抗原を発現させるための遺伝子をプラスミドに配置するときには考慮しなければならない。

30

【0184】

（実施例8．1つ、2つまたは3つの完全な転写ユニットを含有するプラスミドベクターを用いたマウス免疫化研究）

マウス研究を、g a g 、p o l 、e n v 、n e f 、t a t およびv i f を含む6つのH I V - 1 遺伝子からタンパク質を発現する三転写ユニットプラスミドベクターの免疫原機能性を明らかにし、かつ、比較するために行った。具体的には、様々な1個、2個または3個のプラスミドDNAに基づく免疫原組成物が、多重抗原特異的な細胞媒介性免疫応答をB a l b / c マウスにおいて誘発する、相対的な能力を比較した。

40

【0185】

B a l b / c マウスを、表3に概略されるように、100 μ g 総用量のDNAにより皮下に免疫化した。すべての場合において、免疫原組成物を0.25%ブピバカインにより処方し、大腿四頭筋に100 μ l の体積で注射した。2回目の免疫化の10日後、動物を屠殺し、血清および脾臓を免疫アッセイのために単離した。免疫化マウスの血清を抗g a g 特異的抗体力価および抗e n v 特異的抗体力価について分析した。脾臓を使用して、下記に記載されるようなE L I S P O T アッセイを使用して抗原特異的なI F N - γ 分泌細胞を測定した。

【0186】

50

(動物)

これらの研究のために、4週齢～6週齢のメスのBalb/cマウスを使用した。マウスを、研究室動物の管理および使用のための指針(National Research Council、National Academic Press、Washington, D. C.、1996)に従って飼育した。加えて、マウスの使用および管理のための手順はWyeth Researchの施設内動物管理使用委員会によって承認された。

【0187】

(免疫原組成物および免疫化)

HIVのenv gp160、gag p55、polまたはnef-tat-vif融合タンパク質をコードする様々なプラスミドDNA発現ベクターを実験用免疫原組成物として使用し、空の発現ベクターバックボーンをコントロールの免疫原組成物ベクターとして使用した。研究設計については下記の表3を参照のこと。様々な発現ベクターによるHIV遺伝子の発現を、ヒト横紋筋肉腫(RD)細胞の一過的トランスフェクションの後、ウェスタンブロットによって確認した。実施例4～実施例7を参照のこと。

10

【0188】

これらの研究のために使用されたアジュバントもまた、DNAプラスミドによって送達した。本実施例では、すべての動物に、IL-12を発現するプラスミド番号212の25 µgを同時注射した。このアジュバントプラスミドは、マウスIL-12のp35遺伝子およびp40遺伝子をコードする二転写ユニット発現プラスミド(表1におけるプラスミド番号212)である。表1を参照のこと。IL-12のp35サブユニットをHCMV即時初期プロモーターおよびSV40ポリアデニル化シグナルの制御下で発現させ、同時に、IL-12のp40サブユニットをサルCMVプロモーター(SCMV)およびBGHポリアデニル化シグナルの制御下で発現させた。RD細胞の一過的トランスフェクションの後、マウスIL-12の産生を、抗マウスIL-12 p70捕獲ELISA(Endogen、Woburn、MA)を使用して細胞上清をスクリーニングすることによって確認した(データは示していない)。

20

表3. マウス研究設計-2回の免疫化

【0189】

【表 3】

群番号	プラスミド番号	プラスミドの説明	総DNA (ug)	マウスの数	免疫化スケジュール (週)
1	303	HCMV-env; SCMV-gag/pol; lap-ntv	100	9	0-3
1a	203	HCMV-gag/pol; SCMV-env;	100	9	0-3
2b	101 + 110	HCMV-env HCMV-gag-pol-ntv	50 50	9	0-3
2c	104 + 204	HCMV-ntv HCMV-gag-pol, SCMV-env	50 50	9	0-3
2d	111 + 202	HCMV-gag-pol HCMV-ntv, SCMV-env	50 50	9	0-3
2e	201 + 202	HCMV-pol, SCMV-gag HCMV-ntv, SCMV-env	50 50	9	0-3
3a	111 101 104	HCMV-gag/pol HCMV-env HCMV-ntv	33 33 33	9	0-3
3b	101 104 201	HCMV-env HCMV-ntv HCMV-pol, SCMV-gag	33 33 33	9	0-3
3c	102 103 202	HCMV-gag HCMV-pol HCMV-ntv, SCMV-env	33 33 33	9	0-3
4	001	ベクターコントロール	100	6	0-3

免疫化用の発現プラスミドを Puresyn, Inc. (Malvern, PA) によって作製した。プラスミドを大腸菌において増殖させ、アルカリ溶解によって単離し、カラムクロマトグラフィーによって精製した。このプラスミドを、DNA:ブピバカイン複合体の形成を可能にするための促進因子として 0.25% のブピバカインを含有する等張性クエン酸塩緩衝液 (29.3 mM のクエン酸ナトリウム、0.67 mM のクエン酸、150 mM の NaCl、0.34 mM の EDTA、pH=6.4~6.7) により 2.5 mg/mL の濃度で個別に処方した。すべての群について、アジュバントプラスミドを免疫原組成物の一部として抗原発現プラスミドと混合した。最終的なプラスミド調製物は、90% を越えるスーパーコイル状プラスミド DNA からなることが示され、残留エンドトキシンが 30 EU/mg DNA 未満であることが示された (データは示していない)。免疫化直前に、免疫原組成物を、適切なプラスミド発現ベクター処方物を混合することによって調製した。得られた免疫原組成物を、18 ゲージのニードルおよび 0.3 mL のシリンジを使用して両方の大腿四頭筋に筋肉内注射によって投与した (部位あたり 0.05 cc による 0.1 cc の総注射体積)。

【0190】

(マウス IFN- γ ELISPOT アッセイ)

ELISPOT (または Elisa Spot、これは酵素結合免疫スポットアッセイの省略形である) は最初、抗体を分泌する B 細胞を検出するための方法として開発された。この方法は現在、特定の抗原に対する T 細胞の反応 (通常、百万個あたりの活性化細胞の数として表される) を明らかにするために適合化されている。本実施例では、インターフェロン- γ (IFN- γ) の産生を単一の細胞の活性化についての読み取りとして使用した。

【0191】

この分析では、ELISPOT が、特定の HIV 抗原を発現する免疫原組成物によって誘発される細胞傷害性 T 細胞の活性を明らかにするために役立った。IFN- γ の ELI

S P O T 応答を測定するために、マウス I F N - γ E L I S P O T キット（製品番号 5 5 1 0 8 3、B D B i o s c i e n c e s、S a n D i e g o、C A）を使用した。E L I S P O T アッセイを、各ウェルにメンブランの底部を有する 9 6 ウェルマイクロタイタープレートで行った。具体的には、9 6 ウェル平底 E L I S P O T プレート（I m m u n o S p o t、C e l l u l a r T e c h n o l o g y L i m i t e d、C l e v e l a n d、O h i o）を、精製抗マウス γ -インターフェロン（m I F N - γ ）モノクローナル抗体（製品番号 5 1 - 2 5 2 5 K C、B D - B i o s c i e n c e s、S a n D i e g o、C A）により 1 0 m c g / m L の濃度で一晩被覆し、その後、プレートを滅菌した 1 $\times$ リン酸緩衝化生理食塩水（1 $\times$ P B S）により 3 回洗浄し、次いで、R 1 0 完全培養培地（1 0 % の熱不活化（H I）ウシ胎児血清（F B S）および 2 m M の L - グルタミン、1 0 0 ユニット / m L のペニシリン、1 0 0 m c g / m L の硫酸ストレプトマイシン、1 m M のピルビン酸ナトリウム、1 m M の H E P E S、1 0 0 m c M の非必須アミノ酸を含有する R P M I - 1 6 4 0）により 2 時間ブロッキング処理した。まずマウスの脾臓を、2 枚の滅菌された顕微鏡用スライドガラスのすりガラス端の間で脾臓をすりつぶすことによって処理した。得られたホモジネートを 1 0 m l の不完全 R 0 5 培養培地（5 % の F B S、2 m M の L - グルタミン、1 0 0 ユニット / m L のペニシリン、1 0 0 m c g / m L の硫酸ストレプトマイシン、1 m M のピルビン酸ナトリウム、1 m M の H E P E S、1 0 0 m c M の非必須アミノ酸を補充した R P M I 1 6 4 0 培地）に再懸濁し、続いて脾臓細胞を F i c o l l - H y p a q u e 密度勾配遠心分離によって単離し、2 m c g / m L の C o n - A（S i g m a）、または、H I V の g a g p 5 5、H I V - 1 6 1 0 1 e n v g p 1 6 0、p o l、n e f、t a t、v i f にわたるペプチドプール（1 1 アミノ酸が重複する 1 5 m e r 体；各 2. 5 m c M の最終ペプチド濃度）、または、培地単独のいずれかを含有する完全 R 1 0 培養培地で再懸濁した。投入細胞数はウェルあたり 4 $\times$ 1 0 ⁵ 個の脾臓細胞（1 m L あたり 4 $\times$ 1 0 ⁶ 個の脾臓細胞）であり、二連のウェルでアッセイした。脾臓細胞を 3 7 $^{\circ}$ C で 2 2 時間 ~ 2 4 時間インキュベーションし、その後、まず脱イオン水で 3 回洗浄して、そして氷上での 1 0 分間 ~ 2 0 分間のインキュベーションによって E L I S P O T プレートから除いた。その後、プレートを、0. 1 % の T w e e n - 2 0 を含有する 1 $\times$ P B S により 6 回洗浄した。その後、プレートを、R 1 0 で希釈した抗マウス I F N - γ ビオチン化検出抗体（5. 0 m c g / m l、製品番号 5 1 - 1 8 1 8 K Z、B D - B i o s c i e n c e s、S a n D i e g o、C A）で処理し、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベーションした。その後、E L I S P O T プレートを、0. 1 % の T w e e n - 2 0 を含有する 1 $\times$ P B S により 1 0 回洗浄し、R 1 0 で 1 : 1 0 0 希釈した 1 0 0 m c L / ウェルのストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体（カタログ番号 5 1 - 9 0 0 0 2 0 9、B D - B i o s c i e n c e s、S a n D i e g o、C A）で処理し、室温でさらに 1 時間インキュベーションした。結合していないストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を、プレートを、0. 1 % の T w e e n - 2 0 を含有する 1 $\times$ P B S により 6 回、次いで、1 $\times$ P B S により 3 回すすぎ洗いにすることによって除いた。次に、ペルオキシダーゼ基質を、A E C 基質溶液中の 2 0 m c L / m L の A E C 発色原（カタログ番号 5 5 1 9 5 1、B D - B i o s c i e n c e s、S a n D i e g o、C A）を希釈することによって調製した。発色を、1 0 0 m c L / ウェルの基質溶液を 3 分間 ~ 5 分間加えることによって開始させた。最後に、プレートを水によりすすぎ洗いし、風乾した。結果を、E L I S P O T プレートの 1 個のウェルを写真撮影する E L I S P O T アナライザーまたは画像化装置を使用して測定し、スポットを数えた。この場合、生じたスポットを、I m m u n o s p o t R e a d e r（C T L I n c.、C l e v e l a n d、O H）を使用して計数した。ペプチド特異的な I F N - γ E L I S P O T 応答は、応答（一培地バックグラウンド）が培地応答の 3 倍以上であり、かつ、1 0 ⁶ 個の脾臓細胞あたりの、インターフェロン- γ を分泌するスポット形成細胞（# S F C / 1 0 ⁶ 脾臓細胞）が 5 0 個以上であったならば、陽性であると見なした。

【0192】

表 4 に示されるように、多プラスミド D N A 免疫化後のマウスにおける個々の H I V -

1 抗原応答および全体的なH I V特異的I F N- γ E L I S P O T応答を、表3に示されるプラスミドから構成された免疫原組成物による2回の免疫化の後で測定した。

表4. 2回の免疫化の後でのマウス免疫応答

【0193】

【表4】

群ID	g a g 特異的 応答*	p o l 特異的 応答	e n v 特異的 応答	n t v # 特異 的応答	全体的な H I V 特異的 応答
コントロール	2	0	3	0	5
1a	46	43	238	4	331
2e	29	138	181	12	360
2c	102	118	203	44	467
1	20	39	468	2	529
3b	16	109	404	20	548
2d	188	185	251	8	632
2b	43	65	548	6	662
3a	139	105	802	18	1064
3c	174	378	616	11	1179

* 抗原特異的なI F N- γ E L I S P O T応答が、 10^6 個の脾臓細胞あたりの、インターフェロン- γ を分泌するスポット形成細胞(# S F C / 10^6 脾臓細胞)として報告された。

【0194】

n t v、n e f - t a t - v i f 融合タンパク質

すべての場合において、n e f - t a t - v i f 特異的な応答は比較的低かった。n e f - t a t - v i f が l a p 1 プロモーターの制御下にある群1マウスでは最も低かった。しかしながら、上記の実施例4～実施例7では、H C M V プロモーターに駆動される遺伝子発現が S C M V プロモーターの場合よりも大きく、S C M V プロモーターに駆動される遺伝子発現が H S V - l a p 1 プロモーターの場合よりも大きいことが見出されていた。三連プロモーター構築物において利用されているプロモーターの強さのこの違いが、この構築物が免疫原組成物において使用されたときに観測された、誘発された免疫応答がより低いことの原因であると考えられる。

【0195】

融合タンパク質の使用に関して、3 a および 3 c においてH I V p o l に対するE L I S P O T 応答を比較すると、単一のポリペプチドではなく、融合ポリペプチドを使用したときには免疫原性がある程度低下しているようである。

【0196】

別の検討事項は、調べられているタンパク質の相対的な免疫原性である。例えば、(H C M V プロモーターに駆動される遺伝子発現により、単一の転写ユニットを含有する単一のプラスミドにおけるその遺伝子のそれぞれ(e n v、g a g、p o l および n e f - t a t - v i f) が作動する場合) 3 b を 3 c に対して調べることによって、おおまかには e n v > p o l > g a g > n e f - t a t - v i f である免疫原性の序列が依然として存在する。上記で議論されたように、プロモーターの強さおよび相対的な免疫原性はともに、個々のプラスミドの設計、および、免疫原組成物で使用されるプラスミドの組合せにおいて考慮しなければならない。

【0197】

次に、別の研究を、1つ、2つおよび3つのプラスミド免疫原組成物を使用する3回の免疫化のときの免疫応答に対する影響を評価するために行った。表5を参照のこと。6匹のマウスからなる群を、3週間間隔で2回ではなく、3週間間隔で3回免疫化したことを除いて、上記で記載されたように免疫化した。表5を参照のこと。群1、群2 eおよび群3 aでは、表3の場合と同じ免疫原組成物を用いる。加えて、3回の免疫化を使用するこの研究では、新しいプラスミド（これは301と称される）を構築し、gag/pol融合タンパク質のHCMVプロモーターに駆動される遺伝子発現とgag/pol融合タンパク質のSCMVプロモーターに駆動される遺伝子発現とを直接比較した。表5および表6における群3 aおよび群4 bを比較のこと。このプラスミドはまた、三連転写ユニットプラスミドから発現されているgag-pol融合体の潜在的な免疫原能力を、類似するプロモーターにより駆動される3つの単一転写ユニットプラスミドから発現されているgag-pol融合遺伝子およびenv遺伝子と比較することを可能にした。表5および表6における群1および群4 bを比較のこと。脾臓組織を最後の追加抗原投与の17日後に集め、個々のHIVタンパク質に対する抗原特異的なELISPOT応答について分析した。

表5. マウス研究設計－3回の免疫化

【0198】

【表5】

¹ 群番号	プラスミド番号	プラスミドの説明	総DNA (ug)	マウスの数	免疫化スケジュール (週)
1	303	HCMV-env; SCMV-gag/pol; lap-ntv	100	9	0-3-6
2e	201 + 202	HCMV-pol, SCMV-gag HCMV-ntv, SCMV-env	50 50	9	0-3-6
3a	111 101 104	HCMV-gag/pol HCMV-env HCMV-ntv	33 33 33	9	0-3-6
4b	101 104 301	HCMV-env HCMV-ntv SCMV-gag/pol, HCMV-[none], Lap1-[none]	33 33 33	9	0-3-6
コントロール	001	ベクターコントロール	100	6	0-3-6

¹ 群1、群2 eおよび群3 aでは、3回の免疫化が行われたことを除いて、表3の場合と同じ免疫原組成物が用いられる。

【0199】

三転写ユニットプラスミドから誘発された全体的な細胞性免疫応答は、単一転写ユニットプラスミドおよび二連転写ユニットプラスミドを含有する免疫原組成物によって誘発された細胞性免疫応答とほぼ同じであったか、または、それらよりも大きかった。表6を参照のこと。

表6. マウスの細胞性免疫応答－3回の免疫化

【0200】

【表 6】

群 I D	g a g 特異的 応答 *	p o l 特異的 応答	e n v 特異的 応答	n t v # 特異 的応答	全体的な H I V 特異的応答
1	34	58	986	1	1077
2e	32	363	431	69	895
3a	174	162	713	82	1131
4b	47	35	722	79	883
コントロール	0	0	3	2	5

10

* 抗原特異的な I F N - γ E L I S P O T 応答が # S F C / 10^6 脾臓細胞として報告された。

n t v、n e f - t a t - v i f 融合タンパク質

免疫原組成物による3回の免疫化後の E L I S P O T 結果は、三転写ユニットプラスミドに基づく免疫原組成物による3回の免疫化の後における H I V 細胞性免疫応答が3回目の免疫化の後で 100% 増大したことを示した。しかしながら、応答のバランスは、関与したプロモーターの強さ、および、抗原の相対的な免疫原性に依存して、依然として変化し得る。明らかではあるが、製造上の利点が必要であるいくつかの状況では、三連転写ユニットプラスミドは、3つ以上の遺伝子を免疫原組成物により投与するための良好なビヒクルである。

20

【0201】

免疫原組成物によりこれまでに調べられたすべてのプラスミド設計体は、その抗原を正しく発現し、かつ、免疫原性であり、細胞性免疫応答を3回の免疫化の後で活性化していることが見出されている。しかしながら、n e f、t a t および v i f に特異的な応答は、三連転写ユニットプラスミドにおいて H S V L a p 1 プロモーターの制御下に置かれたときには検出することができなかった。

【0202】

いくつかの状況のもとでは、様々な抗原に対する広範囲で、かつ、バランスの取れた細胞性免疫応答を誘発する免疫原組成物が好ましい。この場合、表3および表4に示されるような2つおよび3つの p D N A 免疫原組成物の設計 (2 d、3 a および 3 c) が、強力 (> 600 S F C / 10^6 細胞)、かつ、バランスの取れた H I V 特異的な E L I S P O T 応答を誘発することができるようであり、これらを非ヒト霊長類でのさらなる試験のために選択した。実施例9を参照のこと。

30

【0203】

(実施例9. 1つまたは2つの完全な転写ユニットを含有するプラスミドベクターを用いたマカク免疫化研究)

実施例8の表3および表4において、3つの p D N A 免疫原組成物、特に、群2 d、群3 a および群3 c で使用された免疫原組成物は、6個すべての H I V タンパク質に対する強力 (> 600 S F C / 10^6 細胞)、かつ、バランスの取れた H I V 特異的な E L I S P O T 応答を誘発することができるようであった。これらを非ヒト霊長類でのさらなる試験のために選択した。

40

【0204】

(実験設計)

この研究のために、合計で30頭の M a m u - A * 01 陰性の、自家繁殖させたオスのインド産アカゲザル (M a c a c a m u l a t t a) を使用した。マカクを New I b e r i a R e s e a r c h C e n t e r (New I b e r i a, L A) に収容し、研究室動物の管理および使用に関する指針 (N a t i o n a l R e s e a r c h C o u n c i l, N a t i o n a l A c a d e m i c P r e s s, W a s h i n g t o n, D. C., 1996) に従って飼育した。加えて、マカクの使用および管理に関する

50

手順はWyeth Researchの施設内動物管理使用委員会によって承認された。

【0205】

(免疫化)

免疫化用の発現プラスミドをPuresyn, Inc (Malvern, PA) によって作製した。プラスミドを大腸菌により増殖させ、アルカリ溶解によって細胞から単離し、カラムクロマトグラフィーによって精製した。その後、プラスミドを個々に、DNA: ブピバカイン複合体の形成を可能にするために0.25%のブピバカインを含有する等張性クエン酸塩緩衝液(29.3mMのクエン酸ナトリウム、0.67mMのクエン酸、150mMのNaCl、0.34mMのEDTA、pH=6.4~6.7)により2.5mg/mLの濃度で処方した。最終的なプラスミド調製物は、90%を超えるスーパーコイル状プラスミドDNAからなることが示され、残留エンドトキシンは30EU/mg DNA未満であることが示された(データは示していない)。

10

【0206】

このアカゲザル研究のために使用されたアジュバントは、免疫原組成物の一部として送達されたDNAプラスミドであった。このアジュバントプラスミドは、アカゲザルのIL-12のp35遺伝子およびp40遺伝子をコードする二転写ユニット発現プラスミドである(表1におけるプラスミド番号212)。表7を参照のこと。IL-12のp35サブユニットをHCMV即時初期プロモーターおよびSV40ポリアデニル化シグナルの制御下で発現させ、同時に、IL-12のp40サブユニットをサルCMVプロモーター(SCMV)およびBGHポリアデニル化シグナルの制御下で発現させた。プラスミド発現によるアカゲザルIL-12の生物活性を、一過的にトランスフェクションしたRD細胞由来の上清が、アカゲザルの休止末梢血リンパ球(PBL)にIFN- γ 分泌を誘導する能力についてアッセイすることによって確認した(データは示していない)。

20

表7. マカク研究設計

【0207】

【表 7】

群番号	プラスミド 番号	¹ プラスミドの説明	総DNA (ug)	動物の数
2d	111 + 202 212	HCMV-gag-pol HCMV-ntv, SCMV-env HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40	4.25 4.25 1.5	6
3a	111 101 104 212	HCMV-gag/pol HCMV-env HCMV-ntv HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40	2.8 2.8 2.8 1.5	6
3c	102 103 202 212	HCMV-gag HCMV-pol HCMV-ntv, SCMV-env HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40	2.8 2.8 2.8 1.5	6
3cE ²	102 103 202 212	HCMV-gag HCMV-pol HCMV-ntv, SCMV-env HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40	0.56 0.56 0.56 0.30	6
4a ³	102 101 103 104 212	HCMV-gag HCMV-env HCMV-pol HCMV-ntv HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40	2.1 2.1 2.1 2.1 1.5	6
4 -- コントロール	001 212	ベクターコントロール HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40	8.5 1.5	6

¹ すべての群に、アカゲザルの IL-12 (rIL-12) をコードするプラスミド番号 212 (HCMV-IL-12 p35, SCMV-IL-12 p40) の 1.5 mg をアジュバントとして与えた。

【0208】

² 別の一群 3c が含められ、この群では、エレクトロポレーションが投与プロトコルに加えられた。

【0209】

³ さらに群 (4a) が、示された 4 つのベクターワクチン設計の免疫原性を明らかにするために後日、このマカク研究に加えられた。

【0210】

すべてのマカクを 0 週間、4 週間および 8 週間のスケジュールで免疫化した。免疫化直前に、適切なプラスミド発現ベクター処方物を、免疫原組成物を作製するために混合し、18 ゲージのニードルおよび 3 mL のシリンジを使用した両方の三角筋および両方の大腿四頭筋への筋肉内注射 (1 mL の注射体積、部位あたり 2.5 mg の DNA) によって投与した (群 2d、群 3a、群 3c およびコントロール)。

【0211】

群 3cE のマカクは、標準的な 1 mL のシリンジを使用し、21 ゲージのニードル (Braun) を 8.0 mm 離して配置して両方の三角筋および両方の大腿四頭筋への筋肉内注射を行い、その直後、電気刺激 (すなわち、エレクトロポレーション) を行うことによって、pDNA により免疫化された。注射体積は 0.2 mL であり、これにより、合計で 2 mg の総 DNA のための部位あたり、注射あたり 0.5 mg のプラスミド DNA が与えられた。従って、エレクトロポレーション群 (3cE) には、それ以外の群に投与された総 DNA の 1/5 を与えた。

10

20

30

40

50

【0212】

本実施例において、エレクトロポレーション条件は下記の通りであった：250 mA かつ約100 V/cmでの6回の20 ms単極性パルス。各パルスの間には250 msの中断があった。

【0213】

エレクトロポレーションがない場合、表8に示される結果は、単一の転写ユニットを有するプラスミドの組合せに基づく免疫原組成物（群3a）が、2つ以上の転写ユニットを有する少なくとも1つのプラスミドを含有するプラスミドの組合せに基づく免疫原組成物と比較した場合、10週間後または16週間後、最も大きい全体的な細胞性免疫応答を生じさせたことを示した。3aを2dおよび3cと比較のこと。

表8. 多プラスミドDNAワクチン接種の後での経時的な全体的なHIV特異的IFN- γ ELISPOT応答

【0214】

【表8】

群ID	全体的なHIV特異的IFN- γ ELISPOT応答*						
	ベースライン	第2週	第4週	第6週	第8週	第10週	第16週
2d	43.8 ±10.5	286.5 ±234.9	278.7 ±104.5	403.1 ±89.9	348.3 ±108.8	769.9 ±340.4	407.5 ±82.2
3a	29.5 ±12.8	61.5 ±23.2	204.8 ±26.4	635.0 ±230.5	365.8 ±47.1	1652.5 ±563.3	1015.3 ±584.8
3c	35.5 ±9.0	56.5 ±12.3	138.3 ±32.5	892.5 ±277.5	300.0 ±95.9	786.7 ±213.1	816.3 ±330.6
3cE	41.5 ±13.6	1405.0 ±422.0	346.3 ±72.7	1287.9 ±365.6	3349.6 ±1575.9	3637.8 ±863.7	8140.8 ±1819.0
4a	18.8 ±8.2	52.1 ±13.3	43.3 ±16.6	272.9 ±60.0	230.0 ±40.5	190.6 ±38.9	nd ¹
コントロール	32.0 ±12.5	10.2 ±2.7	33.2 ±12.0	24.2 ±9.3	16.7 ±4.0	12.1 ±4.1	47.1 ±13.7

* 全体的なHIV特異的IFN- γ ELISPOT応答が平均#SFC/10⁶PBL ±標準誤差として報告される。

【0215】

¹ nd、測定されず

驚くべき結果は、エレクトロポレーションにより、全体的な細胞性免疫応答が10週で450%より高く増大し、16週で990%より高く増大したことであった。3cEを3cと比較のこと。表8に示される結果は、2つ以上の転写ユニットを有する少なくとも1つのプラスミドを含有するプラスミドの組合せに基づく免疫原組成物が、エレクトロポレーションと組み合わされたとき、単一の転写ユニットを有するプラスミドの組合せに基づく免疫原組成物と比較して、最大の全体的な細胞性免疫応答を10週間後または16週間後に生じさせていたことを示していた。群3cおよび群3aを比較のこと。

【0216】

このマカク研究において、エレクトロポレーションの使用を除いた場合、群3aは、10週または16週での最大の全体的なHIV抗原特異的なELISPOT応答を発達させていた（1,652 SFC/10⁶細胞および1015 SFC/10⁶細胞）。この応答は群2d（770 SFC/10⁶細胞）または群3c（787 SFC/10⁶細胞）に対して統計学的に異なっていなかった。表8を参照のこと。しかしながら、最大のELISPOT応答がエレクトロポレーションの使用により達成された。表8において群3cEを

参照のこと。

【0217】

興味深いことに、エレクトロポレーションを使用した追加抗原投与免疫化の後におけるピーク免疫応答は非エレクトロポレーション群の場合よりも後であった。例えば、群3aの動物についての全体的なHIV特異的IFN- γ ELISPOT応答は、第4週の免疫化または追加抗原投与の後の第6週前後でピークに達した。表8を参照のこと。対照的に、エレクトロポレーション群については、ピークは第10週により近かった。表8を参照のこと。

【0218】

細胞性免疫応答を、6個のHIVタンパク質に対するIFN- γ ELISPOT応答としてさらに分析した。表9は、HIVのenvタンパク質、gagタンパク質、polタンパク質、および、nef-tat-vifタンパク質の融合タンパク質に対するIFN- γ ELISPOT応答を示す。このマカク研究において、再度ではあるが、エレクトロポレーションの使用を除いた場合、群3aは、envおよびnef-tat-vifに対する10週での最大のHIV抗原特異的なELISPOT応答を発達させた。表9を参照のこと。群3cの動物はgagに対する最大のELISPOT応答を発達させ、群2dはpolタンパク質に対する最大のELISPOT応答を発達させた。表9において3aを2dおよび3cと比較のこと。今までにないほどの最大のELISPOT応答がエレクトロポレーションの使用により達成された。表9において群3cEを参照のこと。

表9. 多プラスミドDNAワクチン接種の後での第10週における個々のHIV抗原特異的なIFN- γ ELISPOT応答

【0219】

【表9】

群ID	抗原特異的なIFN- γ ELISPOT応答*				
	Env	Gag	Pol	ntv	合計
2d	360.4 ±111.8	107.9 ±45.2	204.0 ±182.6	97.6 ±67.6	769.9 ±340.4
3a	1170.4 ¹ ±427.0	43.8 ±17.5	173.8 ±97.7	264.6 ³ ±113.8	1652.5 ±563.3
3c	412.1 ±131.7	246.3 ² ±59.7	106.7 ±60.5	21.7 ±8.9	786.7 ±213.1
3cE	861.1 ±292.5	1147.9 ±356.9	1023.1 ±384.0	605.7 ±159.3	3637.8 ±863.7
4a	132.9 ±33.9	29.4 ±6.5	9.1 ±5.4	19.2 ±7.9	190.6 ±38.9
コントロール	7.1 ±3.4	1.7 ±0.8	2.5 ±1.1	0.8 ±0.5	12.1 ±4.1

* 個々のHIV抗原特異的なIFN- γ ELISPOT応答が平均#SFC/10⁶PBL±標準誤差として報告される。

【0220】

¹ 群2dに対して統計学的により大きいenv特異的なELISPOT応答 ($p < 0.05$)。

【0221】

² 群3aに対して統計学的により大きいgag特異的なELISPOT応答 ($p < 0.05$)。

【0222】

³ 群 3 c に対して統計学的により大きい n t v 特異的な E L I S P O T 応答 ($p < 0.05$)。

【0223】

表 10 は、第 16 週（最後の免疫化の 8 週間後）での、H I V の e n v タンパク質、g a g タンパク質、p o l タンパク質、および、n e f - t a t - v i f タンパク質の融合タンパク質に対する I F N - γ E L I S P O T 応答を示す。エレクトロポレーションの使用を除いた場合、群 3 a は、e n v および n e f - t a t - v i f に対する 16 週での最大の H I V 抗原特異的な E L I S P O T 応答を発達させ、一方で、群 3 c の動物は g a g および p o l に対する 10 週での最大の H I V 抗原特異的な E L I S P O T 応答を発達させた。最大の E L I S P O T 応答がエレクトロポレーションの使用により達成された。表 10 において群 3 c E を参照のこと。

【0224】

表 9 および表 10 は、抗原発現プラスミドの数を免疫原組成物中で 3 から 4 へ増やすことにより、これら H I V タンパク質のすべてに対する免疫応答が低下したことを示している。表 9 および表 10 を参照のこと。

【0225】

表 9 および表 10 はまた、免疫原組成物中に 2 つの抗原発現プラスミド（この場合、一方のプラスミドが 2 つの転写ユニットを有する）を含む群 2 d のプラスミドが、これら H I V タンパク質のすべてに対する最も広く、かつ、最もバランスの取れた免疫応答を誘発したことを示す。表 9 および表 10 を参照のこと。

表 10. 多プラスミド DNA ワクチン接種の後での第 16 週における個々の H I V 抗原特異的な I F N - γ E L I S p o t 応答

【0226】

【表 10】

群 I D	抗原特異的な I F N - γ E L I S p o t 応答*				
	Env	Gag	Pol	ntv	合計
2d	217.5 ±33.3	76.3 ±25.8	81.3 ±32.2	32.5 ±14.3	407.5 ±82.2
3a	831.0 ±457.8	39.7 ±35.6	80.2 ±68.7	64.3 ±25.6	1015.3 ±584.8
3c	437.5 ±187.9	250.0 ±88.2	96.3 ±68.0	32.5 ±10.7	816.3 ±330.6
3cE	1984.7 ±698.1	1975.3 ±567.2	2305.6 ±786.2	1875.3 ±624.4	8140.8 ±1819.0
4a	nd ¹	nd	nd	nd	nd
コントロール	22.5 ±7.2	5.0 ±2.3	9.2 ±3.6	10.4 ±4.4	47.1 ±13.7

* 個々の H I V 抗原特異的な I F N - γ E L I S p o t 応答が平均 # S F C / 10^6 P B L ± 標準誤差として報告される。

【0227】

¹ n d、測定されず

表 11 は、30 週（最後の免疫化の 22 週間後）での、H I V の e n v タンパク質、g a g タンパク質、p o l タンパク質、および、n e f - t a t - v i f タンパク質の融合タンパク質に対する I F N - γ E L I S P O T 応答を示す。このマカク研究において、再度ではあるが、エレクトロポレーションの使用を除いた場合、群 3 a は、e n v、p o l

および nef-tat-vif に対する最大の HIV 抗原特異的な ELISPOT 応答を
 発達させた。表 11 を参照のこと。群 3c の動物は gag に対する最大の ELISPOT
 応答を発達させた。表 11 において 3a を 2d および 3c と比較のこと。最大の ELISPOT
 応答がエレクトロポレーションの使用により達成された。表 11 において群 3cE
 を参照のこと。

【0228】

マウス研究およびマカク研究の両方において、抗原特異的な ELISPOT 応答は一般
 に、HCMV プロモーターの制御下でそれぞれの個々の遺伝子を単独で受け入れている群
 において最も大きかった。マカク研究では、エレクトロポレーションが、免疫応答を生じ
 させることにおいて、免疫原組成物が、2つの完全な転写ユニットに対して、1つの完全
 な転写ユニットを有するプラスミドを含有するかどうかよりも、または、融合タンパク質
 が使用されたかどうかよりも重要な要因であった。

表 11. 多プラスミド DNA ワクチン接種の後での第 30 週における個々の HIV 抗原特
 異的な IFN- γ ELISPOT 応答

【0229】

【表 11】

群 ID	抗原特異的な IFN- γ ELISPOT 応答 *				
	Env	Gag	Pol	ntv	合計
2d	44.2 ±11.6	6.7 ±3.1	8.8 ±6.3	4.6 ±3.6	64.2 ±16.0
3a	184.0 ±105.4	5.6 ±3.7	14.0 ±6.9	10.2 ±4.7	213.9 ±119.1
3c	52.5 ±11.7	25.4 ±6.6	2.9 ±2.0	0.8 ±0.8	81.7 ±19.6
3cE	831.3 ±339.1	768.9 ±216.7	907.4 ±476.5	886.4 ±371.8	3,393.9 ±920.4
4a ¹	nd	nd	nd	nd	nd
コントロール	9.6 ±4.8	0.0 ±0.0	1.6 ±1.2	0.0 ±0.0	11.3 ±5.8

* 個々の HIV 抗原特異的な IFN- γ ELISPOT 応答が平均 # SFC / 10^6 P
 BL ± 標準誤差として報告された。

【0230】

¹ 測定されず

個々の HIV タンパク質に対する経時的な細胞性免疫応答

IFN- γ ELISPOT 応答を、表 7 に記載されるプラスミドによる免疫化の後、e
 nv、gag、pol、nef、tat および vif の個々の HIV タンパク質に対して
 、第 2 週、第 4 週、第 6 週、第 8 週、第 10 週および第 16 週で測定した。結果を表 12
 ~ 表 17 に示す。

表 12: 多プラスミド DNA ワクチン接種の後での経時的な HIV env 特異的な IFN- γ ELISPOT 応答

【0231】

【表 1 2】

群 I D	H I V e n v 特異的な I F N - γ E L I S p o t 応答*						
	ベースライン	第 2 週	第 4 週	第 6 週	第 8 週	第 1 0 週	第 1 6 週
2d	17.7 ±4.5	204.0 ±162.8	182.3 ±64.8	295.1 ±60.9	209.6 ±66.1	360.4 ±111.8	217.5 ±33.3
3a	5.3 ±2.2	43.8 ±19.6	165.3 ±20.6	577.9 ±224.5	308.8 ±38.6	1170.4 ±427.0	831.0 ±457.8
3c	21.0 ±8.4	26.3 ±7.1	84.8 ±20.2	538.3 ±174.2	192.1 ±71.1	412.1 ±131.7	437.5 ±187.9
3cE	23.2 ±9.5	598.3 ±203.9	144.2 ±30.9	382.9 ±87.2	1165.8 ±647.7	861.1 ±292.5	1984.7 ±698.1
4a	14.6 ±8.7	24.2 ±10.1	22.1 ±9.6	254.2 ±57.5	169.2 ±33.5	132.9 ±33.9	nd ¹
コントロール	13.7 ±5.4	3.0 ±1.6	17.2 ±9.0	17.1 ±6.0	9.2 ±2.6	7.1 ±3.4	22.5 ±7.2

* H I V e n v 特異的な I F N - γ E L I S p o t 応答が平均 # S F C / 1 0 ⁶ P B L ± 標準誤差として報告された。 20

【 0 2 3 2 】

¹ n d、測定されず

表 1 3：多プラスミド DNA ワクチン接種の後での経時的な H I V g a g 特異的な I F N - γ E L I S p o t 応答

【 0 2 3 3 】

【表 1 3】

群 I D	H I V g a g 特異的な I F N - γ E L I S p o t 応答*						
	ベースライン	第 2 週	第 4 週	第 6 週	第 8 週	第 1 0 週	第 1 6 週
2d	6.8 ±1.5	23.5 ±16.7	36.0 ±18.3	28.1 ±5.7	59.6 ±31.2	107.9 ±45.2	76.3 ±25.8
3a	2.2 ±1.0	9.0 ±3.4	21.5 ±4.9	17.5 ±11.5	10.0 ±2.7	43.8 ±17.5	39.7 ±35.6
3c	4.5 ±2.1	19.0 ±6.7	51.7 ±15.6	229.6 ±67.0	86.7 ±21.8	246.3 ±59.7	250.0 ±88.2
3cE	4.8 ±2.9	709.6 ±244.1	161.3 ±38.3	381.7 ±78.5	1169.6 ±551.6	1147.9 ±356.9	1975.3 ±567.2
4a	2.1 ±8.7	12.4 ±3.7	5.4 ±2.4	10.0 ±4.0	27.5 ±6.2	29.4 ±6.5	nd ¹
コントロール	3.2 ±2.2	1.0 ±0.6	7.7 ±4.5	1.7 ±0.8	2.1 ±1.2	1.7 ±0.8	5.0 ±2.3

* H I V g a g 特異的な I F N - γ E L I S p o t 応答が平均 # S F C / 1 0 ⁶ P B L ± 標準誤差として報告される。 30

【 0 2 3 4 】

¹ n d、測定されず

表 1 4：多プラスミド DNA ワクチン接種の後での経時的な H I V p o l 特異的な I F 40

10

30

40

50

N-γELISpot 応答

【0235】

【表14】

群ID	HIV pol 特異的なIFN-γELISpot 応答*						
	ベースライン	第2週	第4週	第6週	第8週	第10週	第16週
2d	12.2 ±4.3	33.8 ±31.3	27.7 ±7.6	53.3 ±32.3	41.7 ±25.1	204.0 ±182.6	81.3 ±32.2
3a	7.3 ±4.1	1.8 ±0.9	7.3 ±2.9	17.5 ±7.9	15.0 ±4.5	173.8 ±97.7	80.2 ±68.7
3c	6.5 ±3.4	3.5 ±2.1	1.8 ±1.3	102.1 ±42.3	17.1 ±6.8	106.7 ±60.5	96.3 ±68.0
3cE	3.7 ±2.4	54.6 ±30.5	22.1 ±9.1	316.3 ±215.8	497.9 ±179.7	1023.1 ±384.0	2305.6 ±786.2
4a	1.7 ±1.1	9.3 ±6.8	2.5 ±1.3	5.4 ±2.0	13.8 ±4.8	9.1 ±5.4	nd ¹
コントロール	10.7 ±4.4	3.2 ±2.8	4.7 ±3.0	2.1 ±1.6	4.2 ±2.7	2.5 ±1.1	9.2 ±3.6

* HIV pol 特異的なIFN-γELISpot 応答が平均#SFC/10⁶PBL±標準誤差として報告される。

【0236】

¹ nd、測定されず

表15：多プラスミドDNAワクチン接種の後での経時的なHIV nef 特異的なIFN-γELISpot 応答

【0237】

【表15】

群ID	HIV nef 特異的なIFN-γELISpot 応答*						
	ベースライン	第2週	第4週	第6週	第8週	第10週	第16週
2d	4.8 ±3.2	16.3 ±16.3	22.5 ±16.7	12.4 ±6.0	32.9 ±14.4	43.7 ±27.6	24.6 ±12.3
3a	20.1 ±9.8	2.5 ±2.0	7.9 ±3.6	13.8 ±5.2	22.5 ±9.8	192.1 ±76.7	54.8 ±25.4
3c	4.2 ±4.2	0.4 ±0.4	0.0 ±0.0	10.4 ±7.5	3.3 ±2.5	10.0 ±8.1	18.3 ±9.6
3cE	5.1 ±3.4	11.9 ±7.2	11.7 ±7.7	67.1 ±56.6	281.7 ±207.0	403.2 ±158.3	1276.2 ±516.3
4a	0.4 ±0.4	1.7 ±1.4	5.4 ±3.1	2.1 ±2.1	10.4 ±5.0	8.3 ±4.4	nd ¹
コントロール	3.6 ±2.8	0.8 ±0.8	0.8 ±0.8	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.9 ±1.5

* HIV nef 特異的なIFN-γELISpot 応答が平均#SFC/10⁶PBL±標準誤差として報告される。

【0238】

¹ nd、測定されず

表16：多プラスミドDNAワクチン接種の後での経時的なHIV tat特異的なIFN- γ ELISpot 応答

【0239】

【表16】

群ID	HIV tat特異的なIFN- γ ELISpot 応答*						
	ベースライン	第2週	第4週	第6週	第8週	第10週	第16週
2d	7.1 ± 3.3	0.8 ± 0.5	7.1 ± 4.2	8.5 ± 3.3	2.9 ± 2.1	4.6 ± 2.1	3.8 ± 1.4
3a	10.0 ± 5.3	3.8 ± 2.3	2.9 ± 1.2	4.2 ± 2.0	8.8 ± 7.3	14.6 ± 8.2	1.7 ± 1.2
3c	6.2 ± 4.5	6.3 ± 2.9	0.4 ± 0.4	8.3 ± 3.5	0.4 ± 0.4	1.3 ± 1.3	2.9 ± 1.2
3cE	7.6 ± 5.2	22.4 ± 13.8	2.1 ± 1.0	25.0 ± 17.8	75.0 ± 42.4	29.3 ± 19.9	190.0 ± 88.4
4a	0.0 ± 0.0	1.8 ± 1.5	5.8 ± 2.9	1.3 ± 1.3	5.8 ± 3.7	10.3 ± 6.1	nd ¹
コントロール	5.1 ± 4.5	0.8 ± 0.5	2.1 ± 1.6	3.3 ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.1 ± 1.2

* HIV tat特異的なIFN- γ ELISpot 応答が平均# SFC / 10^6 PB L $\pm$ 標準誤差として報告される。

【0240】

¹ nd、測定されず

表17：多プラスミドDNAワクチン接種の後での経時的なHIV vif特異的なIFN- γ ELISpot 応答

【0241】

【表17】

群ID	HIV vif特異的なIFN- γ ELISpot 応答*						
	ベースライン	第2週	第4週	第6週	第8週	第10週	第16週
2d	9.4 ± 3.9	7.9 ± 7.9	3.3 ± 2.9	5.8 ± 2.7	1.7 ± 1.2	8.7 ± 8.1	4.2 ± 1.9
3a	12.9 ± 8.5	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.4	4.2 ± 2.3	0.8 ± 0.8	12.1 ± 12.1	7.8 ± 2.7
3c	6.4 ± 4.8	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0	3.8 ± 2.0	0.4 ± 0.4	2.5 ± 2.5	11.3 ± 3.3
3cE	8.9 ± 5.9	8.2 ± 5.1	5.0 ± 2.6	115.0 ± 51.6	159.6 ± 64.8	173.2 ± 103.6	409.1 ± 129.9
4a	0.0 ± 0.0	2.8 ± 1.8	2.1 ± 0.8	0.0 ± 0.0	3.3 ± 1.1	0.6 ± 0.2	nd ¹
コントロール	6.8 ± 2.2	1.2 ± 0.8	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0	5.4 ± 3.1

* HIV vif特異的なIFN- γ ELISpot 応答が平均# SFC / 10^6 PB L $\pm$ 標準誤差として報告される。

【0242】

¹nd、測定されず

表12～表17は、個々のタンパク質に対する免疫応答を経時的に示しており、抗原発現プラスミドの数を免疫原組成物中で3から4へ増やすことにより、投与されたDNAのこの所定の濃度では、これらHIVタンパク質のすべてに対する免疫応答の低下がもたらされたことを示している。表12～表17を参照のこと。

【0243】

(実施例10：HIV特異的CTLおよびヘルパー細胞の割合の推定)

HIV特異的CTLおよびヘルパー細胞の相対的な量を、全体的なHIV特異的IFN- γ ELISpot応答を、CD4+細胞またはCD8+細胞の未分画の末梢血リンパ球(PBL)をまず枯渇化させ、その後第10週および第16週で測定することによって推定した。

10

【0244】

(ビーズ枯渇化PBLの調製)

CD4+細胞またはCD8+細胞を、抗ヒトCD4特異的マウスモノクローナル抗体または抗ヒトCD8特異的マウスモノクローナル抗体で被覆された磁性ポリスチレンビーズを製造者の説明書(Dynal Biotech, Oslo、ノルウェー)に従って使用して未分画PBLから枯渇させた。簡単に記載すると、新しく単離されたアカゲザルPBLを洗浄し、2%のFBSを含有する氷冷した1×PBSにより 2×10^6 細胞/mLの最終濃度に再懸濁した。抗ヒトCD4特異的マウスモノクローナル抗体または抗CD8特異的マウスモノクローナル抗体のいずれかで被覆されたDynalマイクロビーズを、2%のFCSを含有する1×PBSにより3回洗浄し、その後、未分画PBLに5:1のビーズ対細胞の比率で加え、回転/傾斜装置において4℃で1時間インキュベーションした。インキュベーション後、ビーズ/細胞懸濁物を磁性カラムに入れ、CD4+細胞枯渇化PBLまたはCD8+細胞枯渇化PBLのいずれかを含有する貫流したもの(flow through)を集めた。細胞を、5%のFBSが補充された完全培養培地により1回洗浄し、5%のFBSを補充した完全培養培地により元の体積に再懸濁した。等体積の未分画のビーズ枯渇化PBLをELISpotアッセイでそのまま使用した。

20

【0245】

続いて、CD4+細胞サブセット枯渇化およびCD8+細胞サブセット枯渇化の効率、ならびに、ELISpotプレートに加えられたCD4+細胞およびCD8+細胞の正確な数をフローサイトメトリーによって定量化した。簡単に記載すると、ビーズ枯渇化PBLを、2%のFBSを含有する1×PBSにより1回洗浄し、下記のモノクローナル抗体により室温で15分間染色した：抗アカゲザルCD3-フルオレセインイソチオシアナート(FITC、クローンSP34；BD Pharmingen、San Jose、CA)；抗ヒトCD4-フィコエリトリン(PE、クローンM-T477；BD Pharmingen、San Jose、CA)；抗ヒトCD8-ペリジニクロフィルタンパク質(PerCP；クローンSK1；BD Pharmingen、San Jose、CA)；および抗ヒトCD20-アロフィコシアニン(APC、クローンL27；BD Pharmingen、San Jose、CA)。その後、細胞を、2%のFBSおよび0.02%のアジ化物を含有する1×PBSにより1回洗浄し、1%のパラホルムアルデヒドを含有する1×PBSに再懸濁した。FACS分析をFACSCalibur Flow Cytometer(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ)で行い、CellQuestソフトウェアを使用して分析した。CD4+細胞またはCD8+細胞の枯渇化率は通常、95%を越えていた(データは示していない)。

30

40

表18：未分画のCD4+細胞またはCD8+細胞を枯渇させたPBLにおける第10週および第16週での全体的なHIV特異的IFN- γ ELISpot応答

【0246】

【表 18】

群 I D	未分画	第 10 週		未分画	第 16 週	
		CD4 枯渇化	CD8 枯渇化		CD4 枯渇化	CD8 枯渇化
2d	1,501 ±632	1,494 ±801	364 ±77	902 ±173	758 ±141	431 ±93
3a	2,524 ±789	1,239 ±662	997 ±222	1,821 ±906	1,059 ±689	539 ±175
3c	1,484 ±359	908 ±268	536 ±147	1,532 ±556	856 ±308	607 ±203
3cE	6,651 ±1,326	10,563 ±3,388	1,921 ±274	13,361 ±2,770	21,051 ±7,067	2,754 ±543
4a	1,591 ±281	688 ±119	954 ±248	nd ¹	nd	nd
コントロール	6 ±2	31 ±10	34 ±15	187 ±12	107 ±31	118 ±24

* 全体的な HIV 特異的 IFN- γ ELISpot 応答が平均 # SFC / 10^6 未分画の CD4 + 枯渇化 PBL または CD8 + 枯渇化 PBL $\pm$ 標準誤差として報告される。

【0247】

¹ nd、測定されず

表 18 に示される結果は、特定の誘発された免疫応答に関与する HIV 特異的 CTL 細胞対ヘルパー細胞の相対的な百分率の推定を示す。2、3 の一般的な観察をデータから引き出すことができる。第 1 に、群 2d、群 3a および群 3c は、HIV に対する同様な強度の細胞性免疫応答を誘発している。群 3a はより高レベルの免疫応答を誘発するようであり、しかし、アッセイにおける変動量もまた、その群に関してはより大きい。エレクトロポレーションを免疫化と組み合わせて使用した場合、群 3c におけるプラスミドに対する免疫応答の強度が約 5 倍～約 10 倍高まった。表 18 を参照し、3cE および 3c を比較のこと。より多くの細胞が、エレクトロポレーションを免疫化とともに使用したことの結果として免疫応答に関係していたこともまた注目に値する。

【0248】

(実施例 11：多プラスミド免疫化により誘発される HIV 特異的な抗体力価)

プラスミド DNA を含有する免疫原組成物 (IC) は、現在使用中の免疫原組成物技術の他のタイプを上回る利点をいくつか提供する。例えば、DNA に基づく IC は、タンパク質に基づく従来のサブユニット IC とは対照的に、コードされた抗原が主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 抗原プロセッシング経路によって効率的にプロセッシングおよび提示されることを可能にする。クラス I 抗原プロセッシング経路は、CD8 + T 細胞により媒介される免疫応答の誘発のために非常に重要である。しかしながら、タンパク質に基づく従来のサブユニット IC は、典型的には、抗原特異的な抗体応答を誘発するその能力に関して、DNA に基づく IC よりも効率がよい。

【0249】

HIV ウイルス溶解物に特異的な抗体力価を測定するために、ELISA プレート、界面活性剤により破壊された HIV-1_{MN} により 20 ng / ウェルで、4 °C で 18 時間被覆した (Advanced Biotechnologies、Columbia、MD)。界面活性剤により破壊された HIV-1_{MN} を炭酸塩 / 重炭酸塩緩衝液 (15 mM Na₂CO₃、35 mM NaHCO₃、pH 9.6) で希釈した。HIV の env に特異的な抗体の力価を測定するために、ELISA プレート、1 × PBS に希釈された精製 HIV-1_{6101 gp120} (これは Larry Liao (Duke 大学

10

30

40

50

）によって譲渡された；20 ng／ウエル）により被覆した。HIVタンパク質との18時間のインキュベーションの後、ELISAプレートを、0.1%のTween 20を含有する1×PBSにより5回洗浄し、その後、0.1%のTween 20および3%のBSAを含有する1×PBSにより室温で2時間ブロッキング処理した。免疫化動物およびコントロール動物から得られた血清サンプルを、1%のBSAおよび0.1%のTween-20を含有する1×PBSで希釈し、1：100の開始希釈度でELISAプレートに加え、プレート上でさらに3倍希釈した。希釈された血清サンプルをタンパク質被覆プレートとともに4℃で一晩インキュベーションした。抗原特異的な免疫グロブリンの検出を、霊長類IgGに対して特異的なビオチン結合体化一次抗体を室温で2時間インキュベーションすることによって達成した。この抗体は、0.1%のTween-20、1%のBSAが補充された1×PBSにより1：30,000希釈された（Accurate Scientific, Westbury, NY）。次いで、一次抗体を洗い流し、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化抗ビオチン二次抗体（500ユニット／mlのストック液（0.1%のTween-20、1%のBSAが補充された1×PBSで1：10,000希釈される）、Roche Immunochemical, Indianapolis, IN）の1時間の室温でのインキュベーションを続けた。最後に、100 μL／ウエルのTMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、Sigma）の添加によって発色させた。抗原特異的な抗体力価を、同じ動物の未投薬血清（すなわち、第0週）+3標準偏差よりも大きいO.D.₄₅₀を与える最終血清希釈度の逆数として定義した。

【0250】

多プラスミドDNA免疫化の最初の16週間での特定の時点についてのHIVエンベロープ力価を決定し、表19に示す。HIV-1 6106のenv gp120のELISA力価を、同じ動物の未投薬血清（すなわち、第0週）+3標準偏差よりも大きいO.D.₄₅₀を与える最終血清希釈度の逆数として計算した。表19（ならびに下記の表20）におけるデータを平均log₁₀力価±平均の標準誤差として示された。この場合、2.00以下のHIV-1のenv力価は1：100未満のエンドポイント（end point）力価を表しており、これは検出限界未満であった。

表19：多プラスミドDNA免疫化の後での経時的なHIV-1 6106のenv gp120特異的なELISA抗体力価

【0251】

【表19】

群ID ¹	HIV-1 envのELISA力価*					
	第2週	第4週	第6週	第8週	第10週	第16週
2d	2.00 ±0.00	2.00 ±0.00	2.08 ±0.035	2.43 ±0.21	2.73 ±0.27	2.59 ±0.20
3a	2.00 ±0.00	2.00 ±0.00	2.16 ±0.10	2.64 ±0.32	2.95 ±0.28	2.56 ±0.29
3c	2.00 ±0.00	2.00 ±0.00	2.16 ±0.16	2.48 ±0.21	2.80 ±0.32	2.95 ±0.37
3cE	2.16 ±0.16	2.72 ±0.16	4.39 ±0.49	3.67 ±0.44	5.18 ±0.20	4.78 ±0.23
4a	nd ¹	nd	nd	nd	nd	nd
コントロール	2.00 ±0.00	2.08 ±0.08	2.00 ±0.00	2.16 ±0.10	2.16 ±0.16	2.32 ±0.16

* データが平均log₁₀力価±平均の標準誤差として報告された。2.00以下のH

I V-1 の e n v 力価は 1 : 1 0 0 未満のエンドポイント力価を表し、これは検出限界未満であった。

【0252】

¹ n d は、測定されなかったことを示す。

【0253】

表 19 に示されるように、2 つ以上の転写ユニットを有する少なくとも 1 つのプラスミドを含有するプラスミドの組合せに基づく免疫原組成物により免疫化された群 3 c の動物は第 16 週で最大の非エレクトロポレーション力価を達成した。しかしながら、群 2 d および群 3 a についての結果はある程度類似していたが、群 3 a の動物は第 8 週および第 10 週で最大の力価を示した。表 19 を参照し、3 a を 2 d および 3 c と比較のこと。2 つ以上の転写ユニットを有する少なくとも 1 つのプラスミドを含有するプラスミドの組合せに基づく免疫原組成物により免疫化され、かつ、エレクトロポレーションー電気刺激を免疫化とともに受けた動物は、H I V エンベロープタンパク質に対するこれまでにない最大の力価を発達させた。表 19 を参照し、3 c を 3 c E と比較のこと。

【0254】

ウイルス溶解物全体に対する総 H I V 力価を、多プラスミド D N A 免疫化の第 2 週、第 4 週、第 6 週、第 8 週、第 10 週および第 16 週について測定した。その総 H I V 力価を表 20 に示す。H I V-1_{M N} ウイルス溶解物に特異的な E L I S A 力価を、同じマカクの未投薬血清（すなわち、免疫前）+ 3 標準偏差よりも大きい O. D. ₄₅₀ を与える最終血清希釈度の逆数として決定した。この表において、データは平均 $\log_{10}$ 力価 ± 平均の標準誤差として報告された。1.70 以下の抗体力価は 1 : 50 未満のエンドポイント力価を表し、これは検出限界未満であったことには留意すること。第 16 週での表 20 における結果は、表 19 に示された結果と類似していた。

表 20：多プラスミド D N A ワクチン接種の後での経時的かつ全体的な H I V-1 特異的 E L I S A 抗体力価

【0255】

【表 20】

群 I D	全体的な H I V-1 E L I S A 力価*					
	第 2 週	第 4 週	第 6 週	第 8 週	第 10 週	第 16 週
2d	1.70 ±0.00	1.70 ±0.00	1.75 ±0.05	1.75 ±0.05	2.04 ±0.28	1.70 ±0.00
3a	1.75 ±0.05	1.75 ±0.05	1.70 ±0.00	1.70 ±0.00	1.70 ±0.00	1.70 ±0.00
3c	2.06 ±0.19	2.11 ±0.18	1.75 ±0.05	1.88 ±0.13	1.85 ±0.07	1.90 ±0.06
3cE	1.88 ±0.13	1.88 ±0.13	3.46 ±0.53	2.38 ±0.34	4.36 ±0.16	3.75 ±0.29
4a	nd ¹	nd	nd	nd	nd	nd
コントロール	1.70 ±0.00	1.75 ±0.05	1.70 ±0.00	1.70 ±0.00	1.91 ±0.21	1.91 ±0.21

* データが平均 $\log_{10}$ 力価 ± 平均の標準誤差として報告された。1.70 以下の抗体力価は 1 : 50 未満のエンドポイント力価を表し、これは検出限界未満であった。

【0256】

¹ n d は、測定されなかったことを示す。

【0257】

(実施例12：マカクにおける様々な血清学的パラメーターおよび体重に対する多プラスミド免疫化の影響)

研究で使用されたマカクにおける末梢血白血球数(WBC)を完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均WBC($\times 1000/\text{ml}$) $\pm$ 標準誤差として報告した。表21を参照のこと。

表21：エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミドDNAワクチンにより免疫化されたマカクにおける総WBC数($\times 1000$)

【0258】

【表21】

10

群ID	-2	0	2	週	4	6	8	10	16
2d	10.3 ± 1.1	8.8 ± 1.4	8.1 ± 1.0	7.2 ± 0.7	7.1 ± 1.0	8.6 ± 0.7	6.9 ± 0.9	6.6 ± 0.4	
3a	8.6 ± 1.4	5.5 ± 0.8	7.9 ± 1.3	6.0 ± 0.9	6.3 ± 1.0	7.3 ± 1.1	7.8 ± 1.1	8.0 ± 1.6	
3c	9.4 ± 1.4	6.3 ± 0.6	8.0 ± 0.8	7.0 ± 0.8	7.3 ± 0.9	9.9 ± 0.9	8.4 ± 1.4	7.8 ± 1.2	
3cE	11.0 ± 1.7	12.1 ± 1.5	8.2 ± 1.1	18.4 ± 2.0	11.0 ± 1.3	13.1 ± 1.3	9.3 ± 0.9	7.9 ± 0.5	
4a	11.6 ± 0.8	10.3 ± 1.4	8.9 ± 0.8	8.0 ± 0.8	8.2 ± 0.5	7.9 ± 0.5	8.3 ± 0.7	nd ¹	
コントロール	7.6 ± 0.9	5.6 ± 0.7	7.1 ± 0.9	5.7 ± 0.6	5.9 ± 0.7	7.6 ± 1.3	5.6 ± 0.5	6.6 ± 0.7	

20

* 完全血球計数分析によって測定された末梢血白血球数(WBC)が平均WBC($\times 1000/\text{ml}$) $\pm$ 標準誤差として報告される。

【0259】

¹ nd、測定されず

研究で使用された動物における末梢血赤血球数(RBC)を完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均RBC($\times 10^6/\text{ml}$) $\pm$ 標準誤差として報告した。表22を参照のこと。

30

【0260】

研究で使用された動物における末梢血ヘモグロビンレベル(g/dL)を完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均ヘモグロビンレベル $\pm$ 標準誤差として報告した。表23を参照のこと。

【0261】

表7に記載されるプラスミドおよび免疫原組成物による多プラスミド免疫化は、この研究で使用された動物において、WBC、RBCおよびヘモグロビンレベルに対する有害な影響を何ら生じさせなかった。表21～表23を参照のこと。1つの明確なポジティブな効果が、群3cEを免疫化するために使用された免疫原組成物とともにエレクトロポレーションを使用したときに検出された。この群では、WBCの数が研究期間中を通して著しく上昇していた。表21を参照のこと。

40

表22：エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミドDNAワクチンにより免疫化されたマカクにおける総RBC数($\times 10^6$)

【0262】

【表 2 2】

				週				
群 I D	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	5.60 ±0.12	5.64 ±0.03	5.62 ±0.08	5.69 ±0.09	5.70 ±0.11	5.67 ±0.11	5.74 ±0.06	5.91 ±0.08
3a	5.61 ±0.19	5.36 ±0.17	5.39 ±0.17	5.40 ±0.13	5.39 ±0.15	5.53 ±0.18	5.32 ±0.14	5.70 ±0.16
3c	5.39 ±0.13	5.32 ±0.14	5.43 ±0.09	5.46 ±0.13	5.38 ±0.14	5.45 ±0.10	5.52 ±0.13	5.69 ±0.09
3cE	5.63 ±0.15	5.91 ±0.09	5.80 ±0.07	5.60 ±0.21	5.87 ±0.10	5.57 ±0.13	5.70 ±0.07	5.75 ±0.11
4a	5.99 ±0.11	5.68 ±0.09	5.97 ±0.08	5.77 ±0.11	5.84 ±0.07	5.79 ±0.12	5.54 ±0.10	nd ¹
コントロール	5.69 ±0.18	5.49 ±0.13	5.57 ±0.09	5.63 ±0.09	5.61 ±0.08	5.66 ±0.09	5.73 ±0.12	5.94 ±0.13

* 末梢血赤血球数 (RBC) が完全血球計数分析によって経時的に測定され、平均 RBC ($\times 10^6 / \text{ml}$) $\pm$ 標準誤差として報告された。

表 2 3 : エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミド DNA ワクチンにより免疫化されたマカクにおける総ヘモグロビンレベル

【0 2 6 3】

【表 2 3】

				週				
群 I D	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	12.5 ±0.3	12.7 ±0.2	12.5 ±0.2	12.6 ±0.2	12.5 ±0.1	12.6 ±0.2	12.9 ±0.2	13.1 ±0.2
3a	13.1 ±0.3	12.6 ±0.3	12.6 ±0.3	12.5 ±0.3	12.6 ±0.3	13.0 ±0.3	12.8 ±0.4	13.4 ±0.2
3c	12.7 ±0.3	12.6 ±0.2	12.7 ±0.2	12.7 ±0.2	12.6 ±0.4	13.0 ±0.3	13.2 ±0.3	13.5 ±0.3
3cE	12.8 ±0.3	13.4 ±0.2	13.0 ±0.2	13.1 ±0.3	13.4 ±0.2	12.9 ±0.2	13.0 ±0.1	13.3 ±0.2
4a	13.5 ±0.3	13.1 ±0.2	13.5 ±0.2	13.1 ±0.2	13.2 ±0.2	13.1 ±0.2	12.5 ±0.2	nd ¹
コントロール	13.3 ±0.3	12.8 ±0.3	13.0 ±0.2	12.9 ±0.2	13.0 ±0.2	13.2 ±0.1	13.6 ±0.3	13.9 ±0.3

* 完全血球計数分析によって測定された末梢血ヘモグロビンレベル (g/dL) が平均ヘモグロビンレベル $\pm$ 標準誤差として報告される。

【0 2 6 4】

¹ nd、測定されず

この研究で使用された動物において測定される末梢血血小板レベルを完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均血小板レベル ($\times 1000$) $\pm$ 標準誤差として報告した。

表 2 4 を参照のこと。

【0 2 6 5】

この研究で使用された動物におけるパーセントヘマトクリットレベルを完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均パーセントヘマトクリットレベル $\pm$ 標準誤差として報告した。表 2 5 を参照のこと。

【0 2 6 6】

この研究で使用された動物において測定される末梢血総リンパ球数を完全血球計数分析

10

20

30

40

50

によって経時的に測定し、平均総リンパ球数±標準誤差として報告した。表26を参照のこと。

【0267】

この研究で使用された動物における末梢血総CD3⁺Tリンパ球数を完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均総CD3⁺Tリンパ球数±標準誤差として報告した。表27を参照のこと。

【0268】

この研究で使用された動物における末梢血総CD3⁺CD4⁺Thリンパ球数を完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均総CD3⁺CD4⁺Thリンパ球数±標準誤差として報告した。表28を参照のこと。

10

【0269】

この研究で使用された動物における末梢血総CD3⁺CD8⁺Tリンパ球数を完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均総CD3⁺CD8⁺Tリンパ球数±標準誤差として報告した。表29を参照のこと。

【0270】

この研究で使用された動物における末梢血総CD20⁺リンパ球数を完全血球計数分析によって経時的に測定し、平均総CD20⁺リンパ球数±標準誤差として報告した。表30を参照のこと。

表24：エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミドDNAワクチンにより免疫化されたマカクにおける総血小板数(×1000)

20

【0271】

【表24】

群ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	404 ±42	433 ±19	399 ±21	411 ±16	392 ±30	420 ±13	448 ±17	394 ±21
3a	419 ±41	418 ±31	399 ±28	441 ±25	402 ±30	411 ±20	450 ±35	380 ±17
3c	454 ±19	404 ±13	418 ±21	405 ±19	391 ±13	423 ±41	381 ±23	381 ±27
3cE	384 ±29	389 ±30	414 ±31	389 ±33	431 ±33	315 ±33	400 ±24	347 ±24
4a	364 ±21	373 ±9	339 ±16	368 ±15	355 ±16	357 ±16	360 ±19	nd ¹
コントロール	458 ±39	412 ±33	386 ±47	383 ±14	386 ±43	414 ±35	409 ±27	378 ±34

30

* 完全血球計数分析によって測定された末梢血血小板レベルが平均血小板レベル(×1000)±標準誤差として報告される。

【0272】

40

¹ nd、測定されず

表25：エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミドDNAワクチンにより免疫化されたマカクにおけるパーセントヘマトクリット

【0273】

【表 2 5】

				週				
群 I D	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	38.3 ±0.9	38.5 ±0.5	37.8 ±0.6	38.6 ±0.4	38.4 ±0.4	38.6 ±0.5	38.9 ±0.4	40.2 ±0.5
3a	39.9 ±1.0	37.7 ±0.8	38.4 ±1.1	38.3 ±0.9	38.0 ±0.8	39.7 ±1.1	38.3 ±1.1	40.7 ±0.7
3c	38.9 ±0.8	37.8 ±0.8	38.7 ±0.5	38.8 ±1.1	38.4 ±1.1	39.3 ±0.9	39.7 ±0.9	40.6 ±0.8
3cE	39.1 ±0.9	40.6 ±0.5	39.7 ±0.6	39.6 ±0.9	40.9 ±0.5	39.0 ±0.6	40.0 ±0.3	39.9 ±0.5
4a	41.3 ±0.8	38.8 ±0.6	40.8 ±0.5	39.6 ±0.4	40.1 ±0.6	39.8 ±0.6	37.9 ±0.5	nd ¹
コントロール	40.3 ±1.0	38.5 ±0.6	39.3 ±0.4	39.4 ±0.4	39.6 ±0.5	40.3 ±0.5	40.8 ±0.7	41.8 ±0.7

* 完全血球計数分析によって測定されたパーセントヘマトクリットレベルが平均パーセントヘマトクリットレベル±標準誤差として報告される。

【0 2 7 4】

¹ nd、測定されず

表 2 6：エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミド DNA ワクチンにより免疫化されたマカクにおける総リンパ球数

【0 2 7 5】

【表 2 6】

				週				
群 I D								
	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	3444 ±554	4399 ±521	3952 ±578	4038 ±462	3646 ±677	4631 ±574	3600 ±581	3018 ±422
3a	2955 ±613	2901 ±452	2706 ±405	2910 ±434	2804 ±459	3631 ±714	3186 ±775	3814 ±736
3c	3213 ±448	3097 ±369	3192 ±407	3343 ±559	3417 ±699	4268 ±667	3098 ±678	3925 ±805
3cE	3157 ±331	3737 ±718	4441 ±608	2737 ±383	4835 ±822	5286 ±987	4927 ±575	4385 ±612
4a	4850 ±348	3763 ±381	4268 ±339	3471 ±149	4544 ±363	3494 ±248	3408 ±248	nd ¹
コントロール	2638 ±230	3685 ±784	3280 ±349	3037 ±334	3828 ±456	4392 ±465	3451 ±358	3470 ±220

* 完全血球計数分析によって測定された末梢血総リンパ球数が平均総リンパ球数±標準誤差として報告される。

【0 2 7 6】

¹ nd、測定されず

表 2 7：エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミド DNA ワクチンにより免疫化されたマカクにおける総 CD 3⁺ T リンパ球数

【0 2 7 7】

【表 2 7】

				週				
群 I D	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1778 ±356	2469 ±265	2167 ±306	2299 ±257	2051 ±356	2917 ±313	2261 ±318	1852 ±218
3a	1697 ±291	1796 ±269	1681 ±255	1910 ±327	1822 ±322	2536 ±450	2344 ±619	2772 ±523
3c	1862 ±215	1815 ±175	1862 ±187	1949 ±279	2080 ±341	2679 ±313	2019 ±385	2458 ±426
3cE	1716 ±223	1926 ±421	2718 ±427	1417 ±241	3139 ±560	3437 ±680	3229 ±360	2928 ±457
4a	2848 ±240	2141 ±263	2481 ±265	1881 ±95	2851 ±328	2153 ±212	2141 ±224	nd ¹
コントロール	1455 ±85	2188 ±484	1883 ±218	1749 ±258	2334 ±382	2789 ±334	2352 ±341	2291 ±197

* 末梢血

表 2 8 : エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミ
ド DNA ワクチンにより免疫化されたマカクにおける総 CD 3⁺ CD 4⁺ T h リンパ球数
【 0 2 7 8 】

【表 2 8】

				週				
群 I D	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1117 ±226	1463 ±197	1348 ±219	1371 ±190	1317 ±225	1770 ±208	1435 ±225	1457 ±266
3a	934 ±143	1007 ±158	986 ±156	1084 ±191	1078 ±198	1425 ±242	1291 ±322	1535 ±287
3c	1132 ±167	1108 ±130	1178 ±129	1195 ±176	1283 ±209	1598 ±208	1229 ±224	1480 ±256
3cE	1034 ±155	1115 ±194	1622 ±267	827 ±124	1752 ±271	1917 ±347	1673 ±165	1628 ±165
4a	1774 ±220	1362 ±202	1528 ±202	1171 ±91	1743 ±247	1363 ±163	1360 ±174	nd ¹
コントロール	877 ±79	1292 ±259	1162 ±117	1109 ±155	1430 ±239	1659 ±226	1437 ±178	1353 ±139

* 完全血球計数分析によって測定された末梢血総 CD 3⁺ CD 4⁺ T h リンパ球数が平
均総 CD 3⁺ CD 4⁺ T h リンパ球数 ± 標準誤差として報告される。

表 2 9 : エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用でのプラスミ
ド DNA ワクチンにより免疫化されたマカクにおける総 CD 3⁺ CD 8⁺ T リンパ球数
【 0 2 7 9 】

【表 2 9】

				週				
群 I D	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	627 ±141	1008 ±105	807 ±96	908 ±87	729 ±147	1137 ±131	811 ±103	678 ±92
3a	729 ±159	778 ±118	691 ±94	823 ±139	729 ±120	1111 ±224	1041 ±285	1254 ±251
3c	663 ±61	661 ±69	635 ±61	709 ±102	744 ±122	1023 ±111	712 ±151	884 ±149
3cE	626 ±78	774 ±229	1067 ±169	542 ±114	1409 ±334	1431 ±348	1528 ±206	1270 ±294
4a	1005 ±47	721 ±70	901 ±74	628 ±53	994 ±95	699 ±64	718 ±58	nd ¹
コントロール	540 ±92	876 ±252	695 ±151	625 ±141	870 ±172	1104 ±184	872 ±215	880 ±131

* 完全血球計数分析によって測定された末梢血総CD3⁺CD8⁺Tリンパ球数が平均総CD3⁺CD8⁺Tリンパ球数±標準誤差として報告される。

【0280】

¹ nd、測定されず

表30：エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用での多プラスミドDNAワクチンにより免疫化されたマカクにおける総CD20⁺リンパ球数

【0281】

【表 3 0】

				週				
群 I D	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1468 ±309	1287 ±347	1369 ±403	1131 ±328	1337 ±391	1300 ±331	993 ±301	918 ±275
3a	1071 ±296	857 ±204	859 ±218	767 ±175	782 ±195	799 ±229	575 ±115	746 ±189
3c	1143 ±269	994 ±205	1155 ±264	1089 ±283	1083 ±340	1322 ±380	902 ±295	1175 ±356
3cE	1081 ±140	968 ±139	1221 ±156	923 ±125	1147 ±201	1080 ±173	1006 ±138	966 ±118
4a	1332 ±186	1127 ±162	1247 ±113	1255 ±148	1051 ±104	938 ±100	987 ±91	nd ¹
コントロール	984 ±161	1134 ±296	1171 ±169	1027 ±183	1206 ±221	1223 ±204	912 ±144	945 ±164

* 完全血球計数分析によって測定された末梢血総CD20⁺リンパ球数が平均総CD20⁺リンパ球数±標準誤差として報告される。

【0282】

¹ nd、測定されず

表7に記載されるプラスミドおよび免疫原組成物による多プラスミド免疫化はまた、この研究で使用された動物において、血小板数（表24）、パーセントヘマトクリット（表25）、総リンパ球数（表26）、総CD3⁺Tリンパ球数（表27）、総CD3⁺CD4⁺Thリンパ球数（表28）、総CD3⁺CD8⁺Tリンパ球数（表29）および総CD20⁺Tリンパ球数（表30）に対する有害な影響を何ら生じさせなかった。再度ではあるが、これらの分析において、総リンパ球数（表26）、総CD3⁺Tリンパ球数（表27）、総CD3⁺CD4⁺Thリンパ球数（表28）、総CD3⁺CD8⁺Tリンパ球

数（表 2 9）に対するポジティブな効果が、群 3 c E を免疫化するためにブピバカイン処方免疫原組成物と組み合わせてエレクトロポレーションを使用したときに検出された。この群において、これらのカテゴリーのそれぞれにおけるリンパ球の数が研究期間中の様々な時点で著しく上昇していた。

【0 2 8 3】

この研究で使用された動物の体重を毎週モニターした。体重（k g）を平均体重±標準誤差として報告した。表 3 1 を参照のこと。

表 3 1：エレクトロポレーション併用およびエレクトロポレーション非併用での多プラスミド DNA ワクチンにより免疫化されたマカクの体重（k g）

【0 2 8 4】

【表 3 1】

群 I D	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	3.74 ±0.27	3.63 ±0.27	3.84 ±0.29	3.93 ±0.28	3.98 ±0.29	4.16 ±0.29	4.00 ±0.28	4.05 ±0.28
3a	3.63 ±0.19	3.56 ±0.19	3.74 ±0.22	3.75 ±0.22	3.83 ±0.25	3.98 ±0.23	3.85 ±0.25	3.96 ±0.25
3c	3.70 ±0.23	3.65 ±0.20	3.87 ±0.24	3.97 ±0.25	4.16 ±0.25	4.26 ±0.29	4.14 ±0.26	4.28 ±0.30
3cE	3.67 ±0.23	3.91 ±0.23	4.03 ±0.28	3.99 ±0.26	4.04 ±0.28	4.12 ±0.25	4.06 ±0.27	4.14 ±0.30
4a	3.67 ±0.19	3.72 ±0.21	3.83 ±0.22	3.77 ±0.19	3.85 ±0.18	3.71 ±0.18	3.72 ±0.14	nd ¹
コントロール	3.61 ±0.23	3.66 ±0.20	3.91 ±0.18	4.03 ±0.19	4.15 ±0.18	4.24 ±0.19	4.21 ±0.20	4.29 ±0.21

* 体重（k g）が平均体重±標準誤差として報告される。

【0 2 8 5】

¹ n d、測定されず

最後に、この分析は、表 7 に記載されるプラスミドおよび免疫原組成物による多プラスミド免疫化がまた、この研究で使用された動物の体重（表 3 1）に対する有害な影響を何ら生じさせなかったことを示している。

【0 2 8 6】

（実施例 1 3：単一の転写ユニットをそれぞれ有する 4 つのプラスミドを含む免疫原組成物を使用するマウス免疫化研究）

前記実施例は、全体的な免疫応答を最大限にしなければならない状況では、プラスミドあたり 1 つの抗原を発現する単一の転写ユニットを有するプラスミドの組合せに基づく免疫原組成物を使用することが好都合であり得ることを示唆している。本実施例では、マウス免疫化研究を、4 つのプラスミドに基づく免疫原組成物の免疫原機能性と 3 つのプラスミドに基づく免疫原組成物のそれとを比較するために行った。より具体的には、g a g 遺伝子、p o l 遺伝子、e n v 遺伝子、および、n e f - t a t - v i f 遺伝子の融合体のみを含む 6 個の H I V - 1 遺伝子の発現を誘導する 4 つの個々のプラスミドに基づく免疫原組成物の免疫原機能性を、e n v 遺伝子、g a g - p o l 遺伝子の融合体、および、n e f - t a t - v i f 遺伝子の第 2 の融合体を含む 6 個の H I V - 1 遺伝子の発現を行わせる 3 つの個々のプラスミドに基づく免疫原組成物と比較した。免疫原機能性を、多重抗原特異的な細胞媒介性免疫応答を B a l b / c マウスにおいて誘発する様々な 3 つおよび 4 つのプラスミド DNA に基づく免疫原組成物の相対的な能力として評価した。H I V 遺伝子および配列を実施例 1 に記載した。群 3 a および群 3 c からの 3 つのプラスミド免疫原組成物は実施例 8 および実施例 9 に記載されるものと同じであった。表 1 および表 3 2 を参照のこと。

【0287】

(免疫原組成物および免疫化)

H I Vのenv gp160、gag p55、pol (もしくはgag-pol融合体) またはnef-tat-vif融合タンパク質をコードするプラスミドDNA発現ベクターを実験用免疫原組成物として使用し、空の発現ベクターバックボーンをコントロールの免疫原組成物ベクターとして使用した。研究設計については下記の表32を参照のこと。様々な発現ベクターによるH I V遺伝子の発現を、ヒト横紋筋肉腫(RD)細胞の一過的トランスフェクションの後、ウェスタンブロットによって確認した。実施例4～実施例7を参照のこと。

【0288】

10

群3aは、プラスミドあたり単一の転写ユニットをそれぞれが有する3つのプラスミドを有するが、抗原の2つが融合タンパク質(gag-polおよびnef-tat-vif)である。群3cもまた3つのプラスミドを有するが、これらのプラスミドのうちの2つが単一の転写ユニットを有し、第3のプラスミドが2つの完全な転写ユニットを有する。表32を参照のこと。抗原の1つのみが融合タンパク質として発現される(nef-tat-vif)。群4aは、単一転写ユニットプラスミドである4つのプラスミドをそれぞれ有するが、これらの抗原のうちの1つのみが融合タンパク質(nef-tat-vif)であった。

【0289】

これらの研究のために使用されたアジュバントもまた、DNAプラスミドによって送達された。本実施例では、すべての動物が、マウスIL-12のp35遺伝子およびp40遺伝子をコードし、マウスIL-12を発現するプラスミド番号212の25μgにより同時注入された。表1を参照のこと。

20

【0290】

Balb/cマウスを、表32に概略されるように100μgの総用量のDNAにより筋肉内に免疫化した。すべての場合において、免疫原組成物を0.25%ブピバカインと処方し、大腿四頭筋に100μlの体積で注射した。2回目の免疫化の10日後、動物を屠殺し、血清および脾臓を免疫アッセイのために単離した。脾臓を使用して、抗原特異的なIFN-γ分泌細胞を、下記に記載されるようなELISPOTアッセイを使用して測定した。

30

【0291】

(動物)

これらの研究のために、4週齢～6週齢のメスのBalb/cマウスを使用した。マウスを研究室動物の管理および使用に関する指針(National Research Council、National Academic Press、Washington, D. C.、1996)に従って飼育した。加えて、マウスの使用および管理についての手順はWye Researchの施設内動物管理使用委員会によって承認された。

表32. マウス研究設計-2回の免疫化

【0292】

40

【表 3 2】

群番号	プラスミド番号	プラスミドの説明	総DNA (ug)	マウスの数	免疫化スケジュール (週)
3a	111	HCMV-gag/pol	33	8	0-3
	104	HCMV-ntv	33		
	101	HCMV-env	33		
3c	102	HCMV-gag	33	8	0-3
	103	HCMV-pol	33		
	202	HCMV-ntv, SCMV-env	33		
4a	101	HCMV-env	25	8	0-3
	102	HCMV-gag	25		
	103	HCMV-pol	25		
	104	HCMV-ntv	25		
5	001	ベクターコントロール	100	4	0-3

¹ 群 3 a および 群 3 c では、表 3 と同じ免疫原組成物を用いる。

【0293】

表 3 3 に示されるデータは、免疫原組成物中の抗原発現プラスミドの数を 3 から 4 へ増やすことにより、H I V タンパク質に対する免疫応答に劇的な増大は何ら生じなかったことを示している。表 3 3 を参照のこと。

表 3 3 . 2 回の免疫化の後におけるマウス免疫応答

【0294】

【表 3 3】

群 ID	g a g 特異的 応答 *	p o l 特異的 応答	e n v 特異的 応答	n t v # 特異的応答	全体的な H I V 特異的 応答
コントロール	3	0	9	1	13
3a	163	247	1564	116	2090
3c	436	1155	671	83	2345
4a	294	662	1150	123	2229

* 抗原特異的な I F N - γ E L I S P O T 応答が、 10^6 個の脾臓細胞あたりの、インターフェロン - γ を分泌するスポット形成細胞 (# S F C / 10^6 脾臓細胞) として報告される。

【0295】

n t v 、 n e f - t a t - v i f 融合タンパク質

本明細書中で引用されるすべての文書は参考として援用される。方法および構成要素における様々な改変および小さな変更が当業者には明らかであると考えられる。

【図 1】

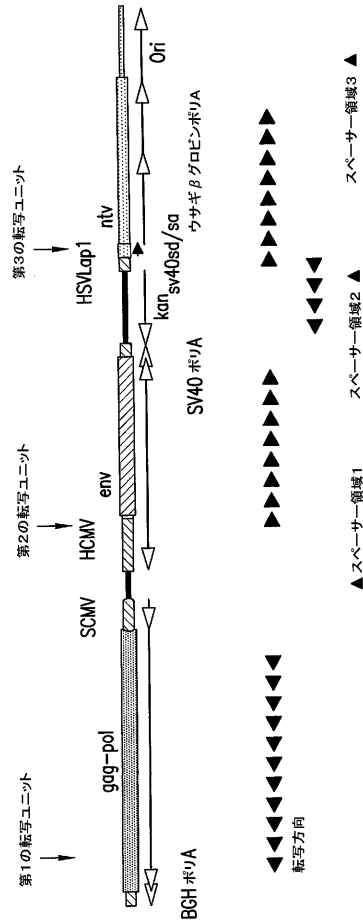


FIG.1

【図 2】

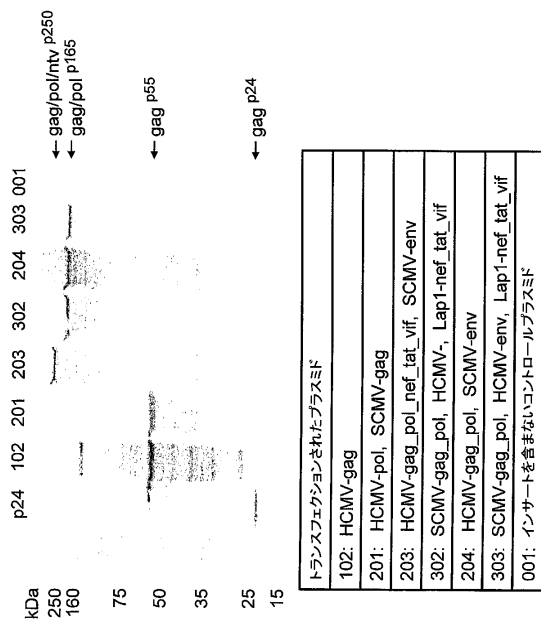


FIG.2

【図 3】

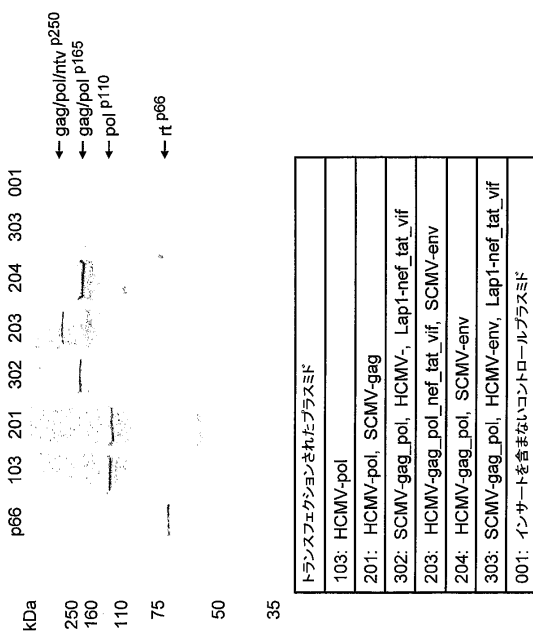


FIG.3

【図 4】

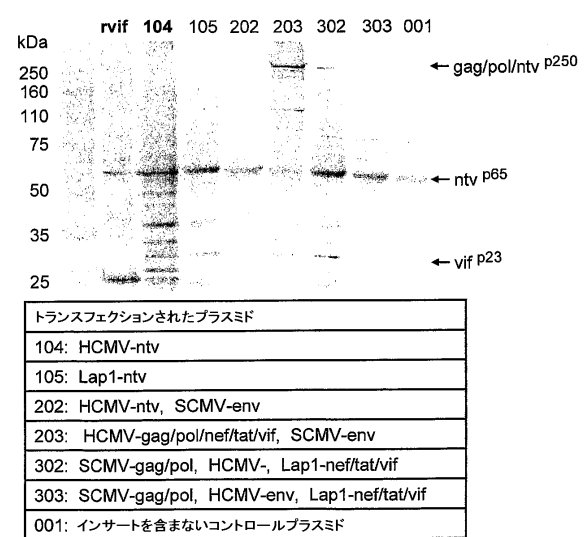


FIG.4

【図 5】

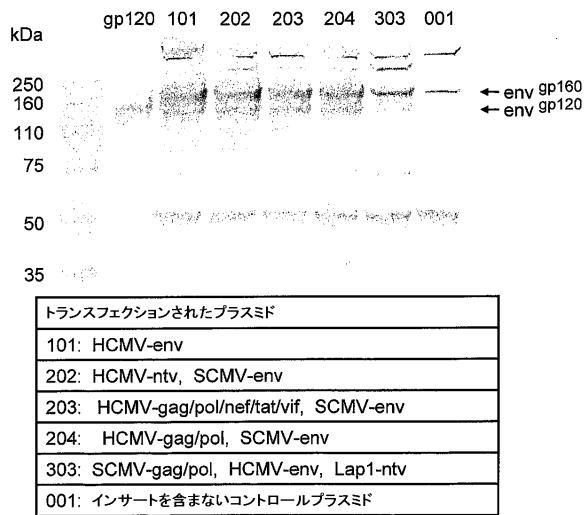


FIG.5

【図 6】

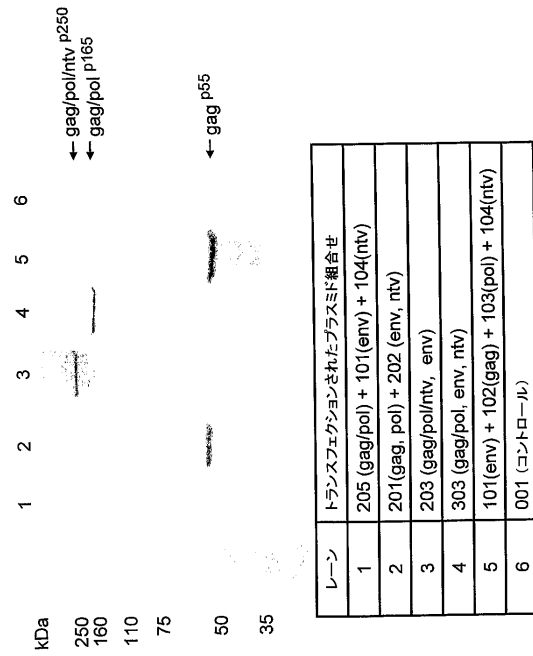


FIG.6

【図 7】

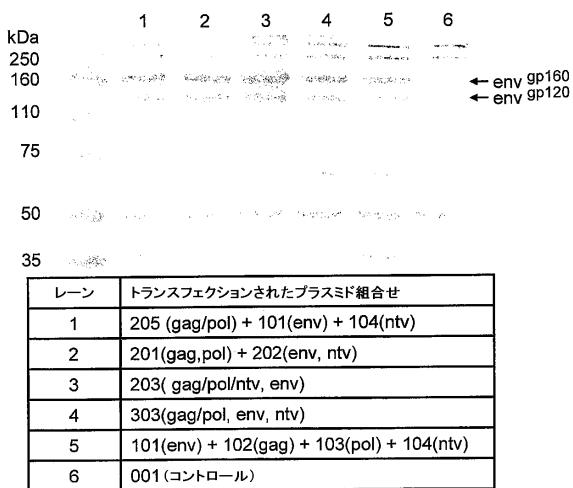


FIG.7

【図 8】

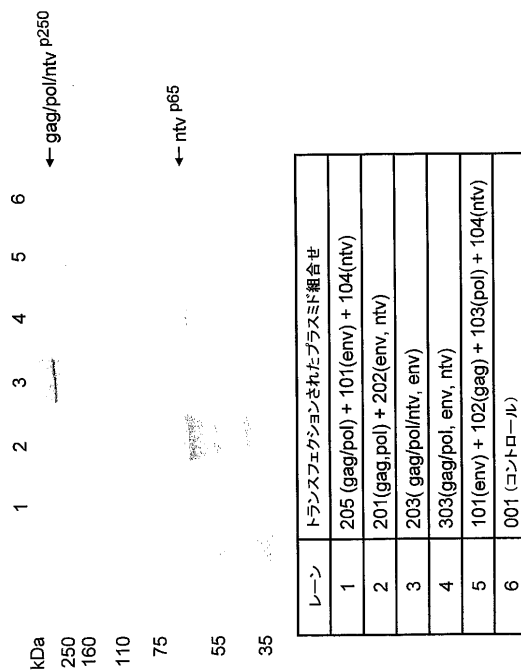


FIG.8

【図 9】

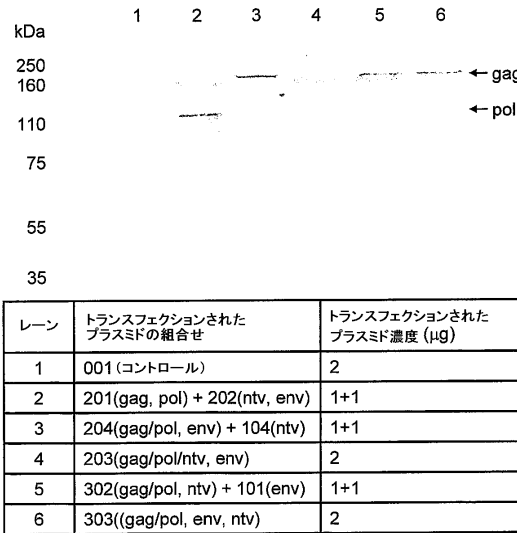


FIG.9

【図 10】

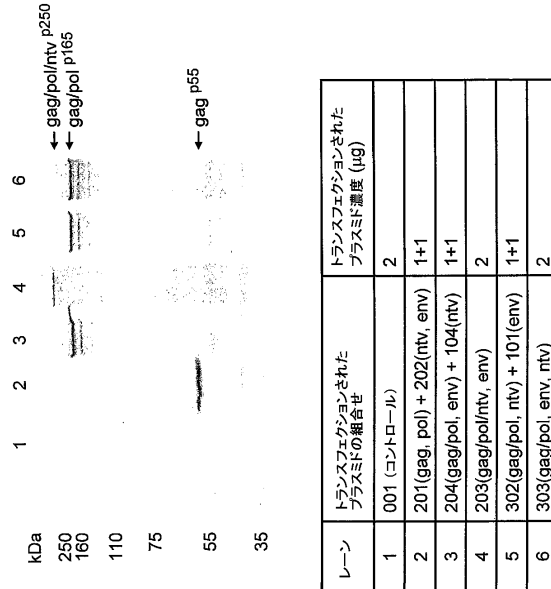


FIG.10

【図 11】

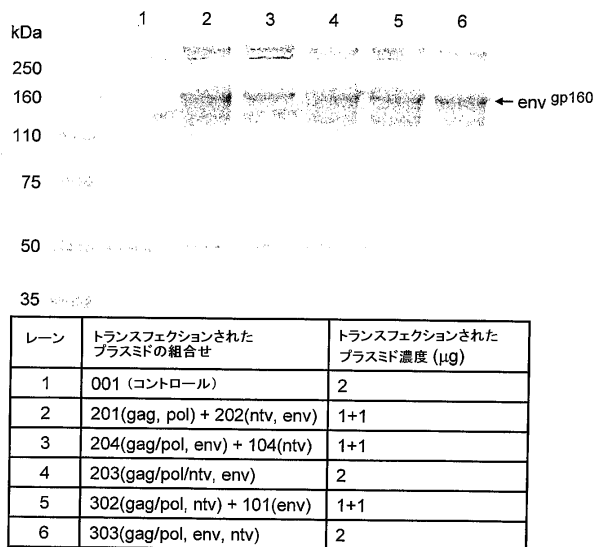


FIG.11

【図 12】

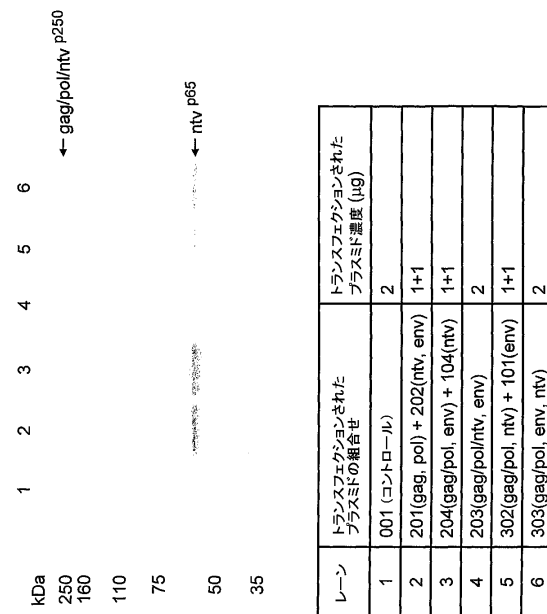


FIG.12

【配列表】

0005264840000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/662,275

(32)優先日 平成17年3月16日(2005.3.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ジョン エイチ. エルドリッジ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10589, サマーズ, ウェリントン レーン 16

(72)発明者 マイケル イーガン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10992, ワシントンビル, カーディナル ドライブ 3
6

(72)発明者 ジムラ イスラエル

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10069, ニューヨーク, リバーサイド ブールバード
200, アpartment 402

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 国際公開第2004/035006 (WO, A1)

国際公開第03/048366 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/711

A61K 39/21

A61K 47/22

A61P 31/18

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)