(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-535495
(P2010-535495A)
(43)公表日　平成22年11月25日(2010.11.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 7/00	(2006.01)	C12N	7/00		4B065
A61K 35/76	(2006.01)	A61K	35/76		4C084
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00		4C085
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	H	4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 134 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-519544 (P2010-519544)
(86)(22)出願日　平成20年8月1日 (2008.8.1)
(85)翻訳文提出日　平成22年4月2日 (2010.4.2)
(86)国際出願番号　PCT/IB2008/002930
(87)国際公開番号　WO2009/019612
(87)国際公開日　平成21年2月12日 (2009.2.12)
(31)優先権主張番号　07290979.9
(32)優先日　平成19年8月3日 (2007.8.3)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　07290980.7
(32)優先日　平成19年8月3日 (2007.8.3)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　07291251.2
(32)優先日　平成19年10月12日 (2007.10.12)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　593218462
インスティチュート・パスツール
ＩＮＳＴＩＴＵＴ　ＰＡＳＴＥＵＲ
フランス国、７５７２４　パリ・セデュ・１５、リュー・デュ・ドクトール・ルー、２５－２８
(71)出願人　595040744
サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シャンティフィク
ＣＥＮＴＲＥ　ＮＡＴＩＯＮＡＬ　ＤＥ　ＬＡ　ＲＥＣＨＥＲＣＨＥ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＱＵＥ
フランス国、７５７９４　パリ・セデックス　１６、リュ・ミシェル・アンジュ　３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】レンチウイルス遺伝子導入ベクター及びそれらの医薬品への適用

(57)【要約】
本発明は、遺伝子導入ベクターのデザインに関し、特に、宿主における単回投与又は反復投与のいずれかに適したレンチウイルス遺伝子導入ベクターを提供し、そして、それらの医薬品への適用に関する（例えば、免疫不全ウイルスに対するワクチン接種、特にヒト宿主において適する）。遺伝子導入ベクターは、それらの使用目的に依存して、組込み又は非組込み（ＮＩ）ベクターのいずれかである。本発明は、それを必要とする宿主中への単回又は複数回のインビボ投与のための遺伝子導入ベクターの使用に関する。本願の適用の分野は、特に、インビボでの動物の処置もしくはヒトの処置（例えば、予防的又は治療的又は対症的又は根治的処置）、遺伝子治療又はワクチン接種に関する。これらのベクターを使用して、ウイルス感染（例えば、免疫不全ウイルスに対する、特にＡＩＤＳに対する処置又は予防）、寄生虫及び細菌感染又は癌を含む、発症状態の予防又は処置のための免疫応答を誘発しうる、好ましくは防御的な持続性免疫応答を誘発しうる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
免疫不全ウイルスによる感染に対する防御的で特異的な細胞性免疫応答を誘発するための哺乳動物宿主への連続投与のための化合物の組み合わせであって、以下：
（ｉ）第１の決定された異種ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子；
（ｉｉ）第１の決定されたエンベロープタンパク質とは異なる、第２の決定された異種ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子；
を少なくとも含み、
ここで（ｉ）及び（ｉｉ）のレンチウイルスベクター粒子は、そのゲノム中に、免疫不全ウイルスのＧＡＧ抗原に由来する少なくとも１つの抗原を含む１つ又は複数のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドを含み；
ここで第１及び第２のウイルスエンベロープタンパク質は、互いに血清中和せず、そして哺乳動物細胞のインビボでの形質導入に適する、
組み合わせ。
【請求項２】
請求項１記載の化合物の組み合わせであって、以下：
（ｉｉｉ）第３の決定された異種ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子
をさらに含み、
ここで第３のウイルスエンベロープタンパク質は、第１及び第２のウイルスエンベロープタンパク質と血清中和しない、
組み合わせ。
【請求項３】
ベクター粒子のゲノムの組換えポリヌクレオチドが、生物学的に活性なＰＯＬポリタンパク質をコードしない、請求項１又は２記載の化合物の組み合わせ。
【請求項４】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のウイルスエンベロープタンパク質が、ヒトウイルスに由来する、請求項１～３のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項５】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のウイルスエンベロープタンパク質が、ＲＮＡウイルスに由来する、請求項１～４のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項６】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のウイルスエンベロープタンパク質が、以下のウイルス目又は科：ラブドウイルス科（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、アレナウイルス科（Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）、フラビウイルス科（Ｆｌａｖｉｒｉｒｉｄａｅ）、トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）、コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、パラミクソウイルス科（Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）を含むモノネガウイルス目（Ｍｏｎｏｎｅｇａｖｉｒａｌｅｓ）、又はフィロウイルス科（Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ）の１つ又は複数において選択されるウイルスに由来する、請求項１～５のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項７】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のウイルスエンベロープタンパク質が、ＲＮＡウイルス、及び特にパラミクソウイルス科、もしくはラブドウイルス科、特に水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）を含むベジクロウイルス（Ｖｅｓｉｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）、もしくは麻疹ウイルス（ＭＶ）、もしくは呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ：Ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ　Ｓｙｎｃｙｔｉａ　Ｖｉｒｕｓ）、又は、非ヒトレトロウイルス、特にマウスレトロウイルス、又はインフルエンザウイルスなどのオルトミクソウイルス科に由来する、請

求項２記載の化合物の組み合わせ。
【請求項８】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のエンベロープタンパク質が、同じウイルス科のウイルスに由来する、請求項１～４のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項９】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のエンベロープタンパク質が、異なる属のウイルスに由来する、請求項５記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１０】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のエンベロープタンパク質が、異なる血清型のウイルスに由来し、そして特に、ＣＮＣＭにｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－３８４２として、又は、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）、ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５６、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－３８４３の代わりのバージョンとして、又は、代わりのバージョンｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５８として、又はｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＯＣＡＬ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５５、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＳＦＡ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５７、及びｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＳＶＣＶ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５９として寄託されたプラスミドにより発現されるエンベロープより選択される、請求項５記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１１】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のエンベロープタンパク質が、同じ属又は同じ血清型で、しかし、異なる株に由来する、請求項５記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１２】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のウイルスエンベロープタンパク質の少なくとも１つが、単量体又は多量体のタンパク質として産生される、請求項１～８のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１３】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のウイルスエンベロープタンパク質が、樹状細胞による取り込みが可能である、請求項１～８のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１４】
第１及び第２の両方の、ならびに、あれば第３のウイルスエンベロープタンパク質が、ＶＳＶウイルスの膜貫通グリコシル化（Ｇ）タンパク質であり、Ｇタンパク質が、異なるＶＳＶ型特異性を有する、請求項１～９のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１５】
第１及び第２のウイルスエンベロープタンパク質が、それぞれインディアナ株のＶＳＶ－Ｇ及びニュージャージー株のＶＳＶ－Ｇであるか、又はその反対である、請求項１～１１のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１６】
１つ又は複数のレンチウイルスベクターが、参照の決定した天然ウイルスエンベロープタンパク質に関して改変されるエンベロープタンパク質でシュードタイピングされる、請求項４～１５のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１７】
１つ又は複数のレンチウイルスベクターが、異なるウイルス、特に異なる属のベシクロウイルス又は異なる種のＶＳＶの異なるエンベロープタンパク質に由来するドメイン又はフラグメントを含む組換えエンベロープタンパク質でシュードタイピングされる、請求項１６記載の化合物の組み合わせ。
【請求項１８】
第１及び第２のエンベロープタンパク質の少なくとも１つが、ＶＳＶの組換えエンベロープタンパク質であり、そして組換えエンベロープタンパク質が、インディアナ血清型株のＶＳＶ－Ｇの搬出決定基ＹＴＤＩＥを含む、請求項１７記載の化合物の組み合わせ。

【請求項１９】
第３の及び／又はさらなるエンベロープタンパク質が、ＶＳＶの組換えエンベロープタンパク質であり、そして組換えエンベロープタンパク質が、インディアナ血清型株のＶＳＶ－Ｇの搬出決定基ＹＴＤＩＥを含む、請求項１８記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２０】
組換えエンベロープタンパク質が、インディアナ血清型株のＶＳＶ－Ｇの細胞質側末端を含む、請求項１７又は１８記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２１】
１つ又は複数のレンチウイルスベクターが、インディアナＶＳＶの膜貫通ドメイン及び異なるＶＳＶ血清型の株の外部ドメインを含む組換えエンベロープタンパク質でシュードタイピングされる、請求項１７～２０のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２２】
インディアナＶＳＶの膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインならびにニュージャージーＶＳＶの外部ドメインを含む、請求項２０又は２１記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２３】
１つ又は複数のレンチウイルスベクターが、特に、参照の決定した天然ウイルスエンベロープタンパク質に関して、１つ又は複数のアミノ酸残基の置換、付加又は欠失により突然変異されるエンベロープタンパク質でシュードタイピングされる、請求項１３～１９のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２４】
突然変異されたエンベロープタンパク質が、突然変異されたＶＳＶ－Ｇタンパク質であり、突然変異が、ＶＳＶ－Ｇ膜貫通ドメインの１つ又は複数のアミノ酸残基に影響を及ぼす、請求項２３記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２５】
１つ又は複数のレンチウイルスベクターが、そのグリコシル化を増加させる、又はレンチウイルス粒子によるその発現能力又はその取り込み能力を増加させるために改変されるエンベロープタンパク質でシュードタイピングされる、請求項１３～２４のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２６】
ベクター粒子をシュードタイピングするエンベロープタンパク質が、コドン最適化された核酸分子の発現の結果として、ベクター粒子を産生する産生細胞中で得られる、請求項１～２５記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２７】
第１及び第２の、ならびに、あれば第３のＧタンパク質の少なくとも１つが、天然Ｇタンパク質に関して改変される、請求項１２～２６記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２８】
第１及び第２のエンベロープタンパク質が、異なり、そして番号Ｉ－３８４２で寄託されるプラスミドｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＩＮＤ－ｃｏ）もしくは番号Ｉ－４０５６で寄託されるそのバリアント、又は、番号Ｉ－３８４３で寄託されるプラスミドｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＮＪ－ｃｏ）もしくは番号Ｉ－４０５８で寄託されるそのバリアントに含まれる核酸分子によりコードされる、請求項１～２７のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項２９】
第１又は第２のエンベロープタンパク質が、図６、７、又は１９の配列を含む核酸分子によりコードされる、請求項１～２７のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項３０】
第１及び第２のエンベロープタンパク質が、異なり、そして図６、７又は１９に表わされるものより選択されるアミノ酸配列を有する、請求項１～２７のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項３１】

第３の又はさらなるエンベロープタンパク質が、図６～１３又は１４～１８に表わされる核酸分子によりコードされるタンパク質より選択されるか、又はアミノ酸配列を有する、請求項１～２８のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項３２】

シュードタイピングされたレンチウイルスベクターが、ヒトレンチウイルスベースのベクターである、請求項１～３１のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項３３】

シュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子が、ＨＩＶベースのベクター、特にＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２ベースのベクターである、請求項３２記載の化合物の組み合わせ。

【請求項３４】

シュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子が、複製能を欠くレンチウイルスベクターである、請求項３２又は３３記載の化合物の組み合わせ。

【請求項３５】

シュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子が、特にインテグラーゼタンパク質における突然変異の結果として、インテグラーゼが、ベクターが宿主細胞において粒子として産生される場合、又はレンチウイルスベクターが患者に投与された後に、レンチウイルスベクターにおいて発現されないか、又は機能的に発現されないような、組込み能を欠くレンチウイルスベクターである、請求項２６～２８のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項３６】

レンチウイルスベクターゲノムが、特にはＨＩＶ－１の、機能的レンチウイルスＤＮＡＦｌａｐを含む、請求項１～３５のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項３７】

レンチウイルスベクターゲノムの３’ＬＴＲ配列が、Ｕ３領域の少なくともアクチベーター（エンハンサー）を欠く、請求項３２～３６のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項３８】

３’ＬＴＲが、Ｕ３領域を欠くか、又はＵ３領域の部分の欠失を有する、請求項３６記載の化合物の組み合わせ。

【請求項３９】

レンチウイルスベクターゲノムが、図２（Ａ）、２３、２４、２５に描写する配列特性を有する、請求項１～３４のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４０】

ＬＴＲ５’のＵ３領域が、非レンチウイルスＵ３により、又はｔａｔ非依存性一次転写を促進するために適したプロモーターにより置換されている、請求項３２～３８のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４１】

レンチウイルスベクター粒子のレンチウイルスゲノムベクターが、ＣＮＣＭに番号Ｉ－２３３０で１９９９年１０月１１日に寄託されたプラスミドｐＴＲＩＰΔＵ３．ＣＭＶ－ＧＦＰ、又は、ＣＮＣＭに番号Ｉ－３８４１で２００７年１０月１０日に寄託されたプラスミドｐＴＲＩＰΔＵ３．ＣＭＶ－ＳＩＶ－ＧＡＧｃｏ－ＷＰＲＥ、又は、ＣＮＣＭに番号Ｉ－３８４０で２００７年１０月１０日に寄託されたプラスミドｐＴＲＩＰΔＵ３．ＣＭＶ－ＳＩＶ－ＧＡＧ－ＷＰＲＥに由来し、特にＧＦＰ又はＳＩＶ－ＧＡＧコード配列のＨＩＶ－ＧＡＧ由来抗原による置換によるこれらのプラスミドの１つに由来する、請求項１～３５のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４２】

ポリヌクレオチドが、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）の抗原に由来するポリペプチドをコードする、請求項１～４１のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４３】

ポリヌクレオチドが、ＨＩＶ、特にＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２、ＳＩＶ、特にＳＩＶ$_{MAC}$、又はＦＩＶのＧＡＧ抗原に由来する抗原をコードする、請求項１～４２のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４４】

ポリヌクレオチドが、免疫不全ウイルスのＧＡＧに由来する抗原をコードし、そして天然ＧＡＧ抗原の、特にＧＡＧポリタンパク質もしくはマトリクスタンパク質もしくはキャプシドタンパク質もしくはヌクレオキャプシドタンパク質のアミノ酸配列を有するか、又はそのようなポリタンパク質もしくはそのようなタンパク質のフラグメントであるか、又はアミノ酸配列中に１つもしくは複数のアミノ酸残基の欠失、置換もしくは付加を含む、特に突然変異により、天然ＧＡＧ抗原に関して改変されているか、又は翻訳後修飾により改変されているＧＡＧ抗原であって、改変されたＧＡＧ抗原が、生物学的に機能的であるか、又は生物学的に非機能的であるかのいずれかから選択される、請求項１～４１のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４５】

組換えポリヌクレオチドが、ＨＩＶ又はＳＩＶ又はＦＩＶのＧＡＧ抗原に由来する生物学的に非機能的なポリペプチドをコードし、ポリペプチドがレンチウイルスベクターで形質導入された細胞からのＧＡＧ偽粒子又はＧＡＧ－ＰＯＬ偽粒子の形成を可能にしない、請求項１～４１のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４６】

ＧＡＧ由来抗原が、ミリスチル化に欠けるＧＡＧΔｍｙｒタンパク質である、請求項１～４２のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４７】

ＧＡＧ由来抗原が、図２１、２６又は３８のアミノ酸配列を有する、請求項１～４３のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４８】

ＧＡＧポリタンパク質又はそれに由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、コドン最適化されたヌクレオチド配列により発現され、天然遺伝子のヌクレオチド配列に関して、哺乳動物細胞での、特にヒト細胞での翻訳を改善することが可能になる、請求項１～４４のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項４９】

組換えポリヌクレオチドが、さらに、免疫不全ウイルスのＮＥＦ抗原、ＴＡＴ抗原、ＲＥＶ抗原、免疫不全ウイルスのＰＯＬ抗原、又はその組み合わせに由来するポリペプチドより選択されるポリペプチドをコードする、請求項１～４５のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項５０】

組換えポリヌクレオチドが、図２１の配列を有するＧＡＧ由来抗原、図２１のアミノ酸配列を含むか、又は有するＰＯＬ抗原、及び図２１に開示するアミノ酸配列を含むか、又は有するＮＥＦ由来抗原を含む融合タンパク質をコードし、融合タンパク質が、以下の構造：５’ ＧＡＧ ＰＯＬ ＮＥＦ ３’、又は５’ ＰＯＬ ＮＥＦ ＧＡＧ ３’もしくは５’ ＰＯＬ ＧＡＧ ＮＥＦ ３’、又は５’ ＮＥＦ ＧＡＧ ＰＯＬ ３’もしくは５’ ＮＥＦ ＰＯＬ ＧＡＧ ３’もしくは５’ ＧＡＧ ＮＥＦ ＰＯＬ ３’の１つを有する、請求項１～４９のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項５１】

レンチウイルスベクター（ｉ）及び／又は（ｉｉ）が、免疫応答のアジュバントを欠く組成物中で製剤化される、請求項１～５０のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項５２】

免疫調節剤をさらに含む、請求項１～５１のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項５３】

レンチウイルスベクターが、宿主への注射、特に皮下注射に適した組成物中で製剤化される、請求項１～５２のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項５４】
哺乳動物宿主における免疫応答のプライミング及び続く免疫応答のブーストを包含する投与計画における使用のための組み合わせであって、ここで（ｉ）の第１のウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを、（ｉｉ）の第２のウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター、及び、あれば（ｉｉｉ）の第３のウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターとは別々に時間内に投与し、レンチウイルスベクター（ｉ）及び（ｉｉ）ならびにあれば（ｉｉｉ）の各々を免疫応答のプライミング又はブーストのいずれかのために投与する、請求項１～５３のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項５５】
インディアナ株のＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターをプライミングのために使用し、そしてニュージャージー株のＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターをブーストのために使用する、請求項１５～５４のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項５６】
ニュージャージー株のＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターをプライミングのために使用し、そしてインディアナ株のＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターをブーストのために使用する、請求項１２～５１のいずれか一項記載の化合物のセット。
【請求項５７】
ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、特にＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２に感染したヒト宿主の治療的処置のための、請求項１～５６のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項５８】
ヒト免疫不全ウイルス、特にＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２による感染に対するヒト宿主の予防的処置のための、請求項１～５４のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。
【請求項５９】
免疫不全ウイルスによる感染に対する防御的で特異的な細胞性免疫応答を誘発又はブーストする組成物の調製に適した、請求項１～５８のいずれか一項で定義するレンチウイルスベクター粒子。
【請求項６０】
ゲノム中に、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）のＧＡＧ抗原に由来する抗原をコードするヒトコドン最適化配列を有する組換えポリヌクレオチドを含む、請求項１～５９のいずれか一項で定義するレンチウイルスベクター。
【請求項６１】
組換えポリヌクレオチドが、非ミリスチル化ＧＡＧ抗原であるＨＩＶ－１コンセンサスＢ株のＧＡＧ抗原に由来する抗原をコードする、請求項６０記載のレンチウイルスベクター。
【請求項６２】
組換えポリヌクレオチドが、ヒト細胞での発現のためにコドン最適化されており、ＧＡＧポリタンパク質ならびにＨＩＶのＮＥＦ抗原のエピトープのクラスター及び任意にＨＩＶのＰＯＬポリタンパク質のエピトープのクラスターに由来する抗原、及び特には図２１の配列を有するＧＡＧ由来抗原、図２１のアミノ酸配列を含むか、又は有するＰＯＬ由来抗原、及び図２１に開示するアミノ酸配列を含むか、又は有するＮＥＦ由来抗原の間の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を有し、融合タンパク質が、以下の構造：５’　ＧＡＧ　ＰＯＬ　ＮＥＦ　３’、又は５’　ＰＯＬ　ＮＥＦ　ＧＡＧ　３’又は５’　ＰＯＬ　ＧＡＧ　ＮＥＦ　３’、又は５’　ＮＥＦ　ＧＡＧ　ＰＯＬ　３’又は５’　ＮＥＦ　ＰＯＬ　ＧＡＧ　３’又は５’　ＧＡＧ　ＮＥＦ　ＰＯＬ　３’の１つを有する、請求項６０又は６１のいずれか記載のレンチウイルスベクター。
【請求項６３】

請求項２７～３０で定義するエンベロープタンパク質ＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされる、請求項５６～５８のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

【請求項６４】

治療的プロトコールでの使用のために、レトロウイルス複製を阻止する抗レトロウイルス薬の投与も含む、請求項１～５９のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ、又は、請求項５８～６２のいずれか一項記載のレンチウイルスベクター。

【請求項６５】

抗レトロウイルス薬が、レトロウイルスの逆転写酵素（ＲＴ）のインヒビター及びレトロウイルスのプロテアーゼのインヒビターより選択される、請求項６４記載の化合物の組み合わせ又はレンチウイルスベクター。

【請求項６６】

レトロウイルスの逆転写酵素の１つ又は複数のインヒビター及びレトロウイルスプロテアーゼの１つ又は複数のインヒビターを投与のために使用する、請求項６５記載の化合物の組み合わせ又はレンチウイルスベクター。

【請求項６７】

抗レトロウイルス薬と同時に時間内に使用するための、請求項６４～６６のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ又はレンチウイルスベクター。

【請求項６８】

化合物の投与が、抗レトロウイルス薬の投与を止めた後に延長される、請求項６４～６７のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ又はレンチウイルスベクター。

【請求項６９】

抗レトロウイルス薬の投与が、化合物の投与中の決定された時間期間で数回中断される、請求項６４～６７のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ又はレンチウイルスベクター。

【請求項７０】

レンチウイルスベクターの調製に適したプラスミドベクター組成物であって、以下：

ａ．以下を含むレンチウイルスベクタープラスミド：

ｉ．レンチウイルスゲノムのシス作用配列を含むポリヌクレオチドであって、５’　ＬＴＲ又は改変５’　ＬＴＲを含み、プロモーターが置換された、キャプシド形成シグナル（Ψ）、ＲＲＥ配列、ＤＮＡ　Ｆｌａｐ、及び３’　ＬＴＲ配列であって、３’　ＬＴＲ配列が少なくともＵ３領域のエンハンサー及びウイルスプロモーターについて、ならびに任意に完全Ｕ３領域について欠失されており、ベクタープラスミドが以下をさらに含む、

ｉｉ．ヒト免疫不全ウイルスのＧＡＧ抗原に由来する少なくとも１つの抗原を含む１つ又は複数のポリヌクレオチドをコードし、ポリヌクレオチドがヒト宿主におけるインビボでの使用に適した内部プロモーターの制御下にあるポリヌクレオチド；

ｂ．（ｉ）ヒト宿主におけるインビボでの使用に適した内部プロモーター及び（ｉｉ）レンチウイルスのＧＡＧ、ＰＯＬ、ならびに任意にＴＡＴ及びＲＥＶのタンパク質をコードするレンチウイルスのポリヌクレオチドを含むパッケージングプラスミドであって、ここで、該パッケージングプラスミドが、レンチウイルスΨキャプシド形成シグナルを欠き、末端のポリＡテイルを有する、パッケージングプラスミド及び；

ｃ．（ｉ）ヒト宿主におけるインビボでの使用に適した内部プロモーター及び（ｉｉ）ＶＳＶ－Ｇエンベロープタンパク質又はそれに由来するタンパク質より選択される異種ウイルスエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド及びポリＡ末端、特にｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－３８４２又はｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ，　ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５６、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－３８４３の代わりのバージョン、又は代わりのバージョンｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５８、又はｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＯＣＡＬ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５５、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＳＦＡ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５７、及びｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＳＶＣＶ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５９としてＣＮＣＭに寄託されたプラスミドより選択されるプラスミドにより発現されるエンベロープタ

ンパク質又はそれに由来するタンパク質を含むエンベローププラスミド
を含む、組成物。
【請求項７１】
ポリヌクレオチドを提供するレンチウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス、特にＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２である、請求項７０記載のプラスミドベクターの組成物。
【請求項７２】
プラスミドの少なくとも１つ及び有利なことには全てのプラスミドが、ヒト細胞中での発現のために最適化されたコドンであるコードポリヌクレオチドを有する、請求項７０又は７１記載のプラスミドベクターの組成物。
【請求項７３】
少なくとも１つ、好ましくは全てのプラスミドの内部プロモーターが、エンハンサー活性を有しない、請求項７０～７２記載のプラスミドベクターの組成物。
【請求項７４】
内部プロモーターが、以下の遺伝子のプロモーター：ＥＦ１α、ヒトＰＧＫ、ＰＰＩ（プレプロインシュリン）、チオデキストリン（ｔｈｉｏｄｅｘｔｒｉｎ）、ＨＬＡ　ＤＲ不変鎖（Ｐ３３）、ＨＬＡ　ＤＲアルファ鎖、フェリチンＬ鎖又はフェリチンＨ鎖、ベータ２ミクログロブリン、キモシンベータ４、キモシンベータ１０、又はシスタチンリボソームタンパク質Ｌ４１より選択される、請求項７０～７３のいずれか一項記載のプラスミドベクターの組成物。
【請求項７５】
ＰＯＬタンパク質をコードするキャプシド形成プラスミドが、細胞のゲノム中のベクターゲノムのコードポリヌクレオチドの組込みを阻止する欠損インテグラーゼをコードする、請求項７０～７４のいずれか一項記載のプラスミドベクターの組成物。
【請求項７６】
ＧＡＧ抗原に由来する抗原をコードするポリヌクレオチドが、請求項４３～５０のいずれか一項で定義される通りである、請求項７０～７４のいずれか一項記載のプラスミドベクターの組成物。
【請求項７７】
シュードタイピングするエンベロープタンパク質が、請求項２８～３０のいずれか一項で定義される通りである、請求項７０～７６のいずれか一項記載のプラスミドベクターの組成物。
【請求項７８】
請求項７０～７７のいずれか一項で定義するプラスミドベクターの１つ。
【請求項７９】
免疫不全ウイルスによる感染に対する防御的で特異的な細胞性免疫応答を誘発又はブーストする組成物の調製に適した、請求項７０～７７のいずれか一項記載のプラスミドベクターの組成物の発現産物である、レンチウイルスベクター粒子。
【請求項８０】
ＨＩＶ－１ウイルス株のＮＥＦ、ＰＯＬ、ＴＡＴもしくはＲＥＶに由来する抗原又はそのような抗原の組み合わせを伴う、図２１の配列を有するＧＡＧ由来抗原の組み合わせを含む、又は、それからなる融合タンパク質である、キメラＨＩＶ－１由来抗原。
【請求項８１】
ＰＯＬ由来抗原が、図２１のアミノ酸配列を含む、又は、有する、請求項８０記載のキメラＨＩＶ－１由来抗原。
【請求項８２】
ＮＥＦ由来抗原が、図２１で開示するアミノ酸配列を含む、又は、有する、請求項８０又は８１記載のキメラＨＩＶ－１由来抗原。
【請求項８３】
図１４～２０の配列より選択されるアミノ酸配列を有するか、又はＣＮＣＭにｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－３８４２として、又は、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ

．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）、ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５６、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－３８４３の代わりのバージョンとして、もしくは代わりのバージョンｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５８として、又はｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＯＣＡＬ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５５、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＳＦＡ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５７、及びｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＳＶＣＶ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５９として寄託されたプラスミドより選択されるプラスミドにより発現される、ＶＳＶ－Ｇエンベロープタンパク質。

【請求項８４】

図１４～２０の配列より選択されるアミノ酸配列を有するＶＳＶ－Ｇエンベロープタンパク質の１つをコードする核酸分子であって、核酸分子が、ヒト細胞中での発現のためにコドン最適化されているか、又はＣＮＣＭにｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－３８４２、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）、ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５６の代わりのバージョン、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－３８４３又は代わりのバージョンｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５８、又はｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＯＣＡＬ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５５、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＳＦＡ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５７、及びｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＳＶＣＶ－ＣＯ）ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５９として寄託されたプラスミドより選択されるプラスミドにより発現されるエンベロープをコードするインサートであるか、又は図６～１２の核酸配列より選択される配列を有する、核酸分子。

【請求項８５】

核酸分子が、ＧＡＧ抗原に由来する少なくとも１つの抗原をコードするか、又は核酸分子がストリンジェントな条件で核酸分子にハイブリダイズし、そしてＨＩＶ－１もしくはＨＩＶ－２　ＧＡＧ抗原又はそのフラグメントをコードできる、請求項２８～４１のいずれか一項記載のプラスミド中に含まれる核酸分子。

【請求項８６】

哺乳動物宿主においてＨＩＶ－１もしくはＨＩＶ－２感染又はＳＩＶもしくはＦＩＶ感染をインビボで阻害するために適する、請求項１～５８のいずれか一項で定義するレンチウイルス粒子を含む免疫原性組成物。

【請求項８７】

以下：

－　レトロウイルス、特にＨＩＶへの暴露後又は感染後のウイルス血症の制御、特に宿主におけるウイルス負荷の制限又は低下；及び／又は

－　宿主におけるレトロウイルス、特にＨＩＶに対する防御的な細胞性免疫の誘導；及び／又は

－　ＨＩＶレトロウイルスへの暴露又は感染後のウイルス複製に対する防御；及び／又は

－　特に、レトロウイルス、特にＨＩＶによる感染の急性期における中央記憶ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の欠乏に対する防御；及び／又は

－　特に、レトロウイルス、特にＨＩＶによる感染の慢性期における中央記憶ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の保存；及び／又は

－　レトロウイルス、特にＨＩＶによる一次感染期の未感作の中央記憶ＣＤ８＋　Ｔ細胞応答のより早く及び／又はより高いリバウンド；及び／又は

－　免疫圧力からのウイルス回避に対する阻止、これによるレトロウイルス、特にＨＩＶによる感染の長期制御

のために、哺乳動物宿主において免疫応答をプライミングし、続いて免疫応答をブーストすることを包含する投与計画における、請求項１～８６のいずれか一項記載の化合物の組み合わせ。

【請求項８８】

欠損インテグラーゼタンパク質を含み、そしてさらには少なくとも１つの抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、免疫原性組成物を投与された宿主において、少なくとも１つのポリペプチドに対する免疫応答を誘発するための免疫原性組成物を産

生する、レンチウイルスベクターの使用。
【請求項８９】
免疫応答が、液性免疫応答、特に防御的な液性免疫応答である、請求項８８記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９０】
免疫応答が、細胞性免疫応答、例えばＣＤ８媒介性細胞性免疫応答又はＣＤ４媒介性細胞性免疫応答である、請求項８８又は８９記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９１】
レンチウイルスゲノムが、ｇａｇ、ｐｏｌ及び／又はｅｎｖレンチウイルス遺伝子を欠く、好ましくは機能的なｇａｇ、ｐｏｌ及び／又はｅｎｖレンチウイルス遺伝子を欠く、請求項８８～９０のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９２】
レンチウイルスゲノムが、全ての内因性のコードレンチウイルス配列を欠く、請求項８８～９１のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９３】
少なくとも１つのポリペプチドが、ウイルス、特にレトロウイルス、レンチウイルス、フラビウイルスもしくはコロナウイルス、細菌又は寄生虫のゲノムに由来する配列によりコードされる、請求項８８～９２のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９４】
少なくとも１つのポリペプチドが、ＨＩＶ－１もしくはＨＩＶ－２を含むＡＩＤＳウイルスのエンベロープ、ＨＩＶのキャプシド、又は黄熱病ウイルス、ウエスト・ナイル・ウイルス、デングウイルス（ＤＶ）、日本脳炎ウイルス（ＪＥＶ）もしくはＳＡＲＳ関連コロナウイルスのエンベロープに由来する、請求項９３記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９５】
少なくとも１つのポリペプチドが、腫瘍性エピトープ又は抗原を含む、請求項８８～９２のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９６】
レンチウイルスベクターが、ＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされる、請求項８８～９５のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９７】
免疫応答が、初期免疫応答である、請求項８８～９６のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９８】
免疫応答が、持続的免疫応答である、請求項８８～９７のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項９９】
宿主での免疫応答が、単回投与で達する、請求項８８～９８のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項１００】
ウイルス、細菌又は寄生虫などの病原体により引き起こされる感染又は感染の有害な結果を処置するための、請求項８８～９９のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項１０１】
悪性状態を処置するための、請求項８８～９９のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項１０２】
ウイルス、細菌又は寄生虫などの病原体による宿主の感染を予防するための、請求項８８～９９のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。
【請求項１０３】

悪性状態を予防するための、請求項８８～９９のいずれか一項記載のレンチウイルスベクターの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、遺伝子導入ベクターのデザインに関し、特に、宿主における単回投与又は反復投与のいずれかに適したレンチウイルス遺伝子導入ベクターを提供し、それらの医薬品への適用に関する。

【０００２】

特定の実施態様において、本発明は、特に、５ヶ月間を超える期間にわたる追跡調査を伴う、同種モデルにおいてレンチウイルス遺伝子導入ベクターで実施された前臨床試験で得られた結果に依存し、特にヒト宿主において適した、免疫不全ウイルスに対するワクチン接種のための候補をデザインする。

【０００３】

本発明は、特に、それを必要とする宿主中への単回又は複数回のインビボ投与のための遺伝子導入ベクターの使用に関する。本出願の適用の分野は、特に動物の処置又はヒトの処置（例、予防的又は治療的又は対症的又は根治的処置）に関する。

【０００４】

本発明のレンチウイルスベクターの組み合わせは、特に、インビボでの遺伝子治療又はワクチン接種の分野における使用に適する。それは、しかし、より一般的に、インビボでの単回又は複数回のベクターの注射が必要となる任意の医薬処置にも適する。

【０００５】

本発明は、特に、哺乳動物宿主、特にヒトにおける疾患の予防又は処置のいずれかのための、反復投与におけるレンチウイルスベクターの使用に適する手段を提供する。これらのベクターの特定の適用は、ウイルス感染、寄生虫及び細菌感染又は癌を含む、発症状態の予防又は処置のための免疫応答を誘発するため、及び好ましくは防御的な持続性免疫応答を誘発することである。本発明の特定の実施態様によると、デザインされたベクターは、特に、免疫不全ウイルス、特にＡＩＤＳに対する処置又は予防の分野における関心である。

【０００６】

本発明の別の局面は、遺伝子導入ベクターが組込み又は非組込み（ＮＩ）ベクターのいずれかであることである。いずれの形態のベクターの選択も、それらの使用目的に依存的であるはずである。

【０００７】

ウイルス、特にＲＮＡウイルス、及び特にレンチウイルスが、非分裂標的細胞において効率的に複製することを可能にする有糸分裂に非依存的な核内輸送を達成するレンチウイルスの能力により、遺伝子導入ベクターをデザインするために過去に使用されてきた。従って、レンチウイルスベースのベクターが、予防的又は治療的ワクチン接種を含む種々の適用のために、又は、これらのベクターを遺伝子治療のためのツールとして使用する目的で、探索されてきた。

【０００８】

インビボでレンチウイルスベクターをテストすると、しかし、インビボ注射の数が、ベクター粒子のシュードタイピングのために使用されるエンベロープタンパク質に対して誘発される宿主の液性応答により制限されることが観察されている。

【０００９】

シュードタイピングされたベクター粒子のエンベロープに対して宿主において誘発される応答は、従って、インビボでの複数回投与が必要な場合、そのようなベクターの効率的な使用において欠点である。

【００１０】

本発明は、予防又は処置との関連で宿主に数回投与される場合、少なくとも部分的に、

シュードタイピングされたベクター粒子のエンベロープに対する免疫応答による欠点に対する改善措置を意図する手段を提案する。

【００１１】

本発明は、このように、レンチウイルスベクターの様々な構造、及び、また、特に、レンチウイルスベクターの単回又は反復投与のいずれかを可能にする条件で、それを必要とする宿主における使用に適した、化合物（別名、化合物のキット）の組み合わせとの関連に関する。

【００１２】

特に、本発明は、宿主にトランスジーンを送達するための異なるレンチウイルスベクターの連続使用を利用する。

【００１３】

本発明のレンチウイルスベクター及び特にそれらの組み合わせは、特に、医薬処置の分野における使用に適し、ここでは特に内因的に発現させた抗原により誘発される、細胞性免疫応答を含む、免疫応答が有益である、又は、必要である；従って、本発明は、ウイルス、特にレトロウイルスを含む細胞内病原性微生物に対する、又はより一般的に、発症状態に対する、インビボでの遺伝子治療の実施を含む、予防又は根治処置の必要な宿主での使用のためのワクチン接種プロトコールのデザインのためのツールを提供する。それは、特に、インビボでのベクターの複数回の注射を必要とする任意の医薬処置に適する。

【００１４】

本発明者らは、本明細書において定義するレンチウイルスベクターが、特に組み合わせで使用された場合、非ヒト霊長類モデルにおいて細胞性免疫応答を誘発するために適切であり、レンチウイルスベクターがウイルスの抗原を発現する場合、ウイルスチャレンジとの関連で防御的でありうるとの証拠を提供している。

【００１５】

本発明の特定の実施態様において、本発明者らは、特に、細胞性の防御的免疫応答が、非ヒト霊長類モデルにおいて、サル免疫不全ウイルスでのウイルスチャレンジに関連して得られていることを示している。本発明者らは、特に、２つの非交差反応性ＶＳＶ血清型からの糖タンパク質Ｇでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを使用したプライム・ブースト戦略において、これらのベクターが、ベクターによりコードされる抗原に対する強固で広範な細胞性免疫応答を誘発することを示している。これは、カニクイザル（ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ　ｍａｃａｑｕｅ）からなるモデルにおいて示されており、適応ベクターは、このように、特にベクターによりコードされる抗原に関してデザインされており、特にヒト宿主での適用に適したベクターを提供する。

【００１６】

これらの結果を考慮し、本発明者らは、宿主に投与される場合に、特にウイルス感染の予防又は処置の状況において、及び、特にヒト宿主において、効率的で好ましくは防御的な免疫応答を誘発するために適しうるツールをデザインしており、そのようなウイルス感染、特にレトロウイルス感染、例えばヒト免疫不全ウイルスを含むレンチウイルス感染に対する免疫応答を提供し、そして、恐らくは感染に関連する病原性の発生を予防する。

【００１７】

従って、本発明のレンチウイルスベクターの組み合わせによって、特に、反復投与での使用のための効率的なプライム・ブースト・システムを提供し、特にそれを必要とする宿主での注射後に、宿主において免疫応答を連続的にプライミング及びブーストすることを可能にする。「反復」は、活性成分、即ち、本発明のレンチウイルスベクターに含まれる異種ポリペプチドを、本明細書において開示するレンチウイルスベクターの投与の結果として、２回又はそれ以上、特に３回宿主に投与することを意味する。

【００１８】

本発明は、従って、少なくとも以下：

（ｉ）第１の決定された異種ウイルスエンベロープタンパク質（単数又は複数）でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子（別名、レンチウイルスベクター）；

（ｉｉ）第１の決定されたエンベロープタンパク質とは異なる第２の決定された異種ウイルスエンベロープタンパク質（単数又は複数）でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子（別名、「レンチウイルスベクター」）；
ここで（ｉ）及び（ｉｉ）のレンチウイルスベクター粒子は、特に１つ又は複数のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチド（又はトランスジーン）である異種の決定されたポリヌクレオチドをコードする（即ち、含む）、及び；
ここで第１及び第２のウイルスエンベロープタンパク質は互いに血清中和せず、哺乳動物細胞のインビボでの形質導入に適する
を含む化合物の組み合わせに関する。

【００１９】

レンチウイルスベクター粒子によりコードされる（含まれる）ポリヌクレオチドは、それをインサートとしてベクターゲノムコンストラクト中に取り込ませるため、「異種」である。特定の実施態様において、ゲノムベクター及びポリヌクレオチドは、同じ群のレンチウイルス、さらには同じ型に由来してよい。

【００２０】

本発明の特定の実施態様において、異種の決定されたポリヌクレオチドは、免疫不全ウイルスのＧＡＧ抗原に由来する少なくとも１つの抗原を含む１つ又は複数のポリヌクレオチドをコードする。特に、抗原は、１つ又は複数の免疫原性エピトープである、又は、それを含む。ＧＡＧに由来する抗原を本出願において定義し、実施例において例示する。それはＧＡＧの特定のフラグメントを包含する。実施例において例示するＧＡＧ抗原はＳＩＶに由来し、ＳＩＶ感染に対する防御をアッセイするためのモデルのデザインに従う。ヒト宿主に適したベクターのデザインを意図する場合、ＧＡＧ抗原は、ヒト免疫不全ウイルス、特にＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２のＧＡＧポリタンパク質に由来する。

【００２１】

本発明の特定の実施態様において、１つ又は複数のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチド（又はトランスジーン）である異種の決定されたポリヌクレオチドは、免疫不全ウイルスの生物学的に活性なＰＯＬ抗原をコードしない。

【００２２】

特定の実施態様において、ＧＡＧに由来するコードされる抗原、特にＧＡＧに由来する免疫原性エピトープは、生物学的に機能的なＧＡＧ抗原ではなく、そのような生物学的に機能的なＧＡＧを含まない；換言すると、抗原は生物学的に非機能的なＧＡＧである。

【００２３】

本発明において定義するレンチウイルスベクターは、（特定のポリタンパク質のエンベロープの）エンベロープタンパク質を持つベクター粒子（従って、別名「レンチウイルスベクター粒子」）からなるシュードタイピングされたレンチウイルスベクターであり、ここでエンベロープタンパク質はレンチウイルスベクターのベクターゲノムを提供する特定のレンチウイルスとは異なるウイルスに由来する。従って、エンベロープタンパク質は、いわゆる「異種ウイルスエンベロープタンパク質」である。以下の頁において、本発明を実施するのに適した任意の型のエンベロープタンパク質を包含するために、「エンベロープタンパク質」も参照する。

【００２４】

本発明のレンチウイルスベクターは置換ベクターであり、レンチウイルスタンパク質をコードする元のレンチウイルスの配列が、本質的にベクターのゲノムから欠失しており、又は、存在する場合、改変されており、特に、生物学的に活性なＰＯＬ抗原及び任意にさらにレンチウイルスの構造及び／又はアクセサリー及び／又は調節タンパク質の発現を阻止することを意味する。

【００２５】

ベクター粒子の「ベクターゲノム」は、目的のポリヌクレオチド又はトランスジーンも包含する。特定の実施態様において、トランスジーンは、また、生物学的に活性なＰＯＬタンパク質をコードするポリヌクレオチドを欠く。結果として、ベクターゲノムは、生物

学的に活性なＰＯＬ抗原の回収を可能にしない。生物学的に活性なＰＯＬ抗原は、ＧＡＧ－ＰＯＬポリタンパク質の切断により産生される、ウイルス酵素プロテアーゼ（ＲＴ）、逆転写酵素（ＲＴ及びＲＮａｓｅ　Ｈ）、及びインテグラーゼ（ＩＮ）を含む。ＰＯＬ抗原は、これらの酵素の少なくとも１つの生物学的活性が可能にならない場合、生物学的に活性ではない。生物学的活性は、Fields（Virology - Vol 2 Chapter 60, pages 1889-1893 Edition 1996）において、これらの酵素と共に記載される。

【００２６】

特定の実施態様において、ベクターゲノム中のポリヌクレオチド又はトランスジーンは、機能的なｐｏｌ遺伝子に欠け、及び特に完全なｐｏｌ遺伝子を含まない。

【００２７】

本明細書において定義するベクターゲノムは、適切な調節配列の制御下に置かれた治療目的のいわゆる異種ポリヌクレオチドとは別に、ゲノムの非コード領域であるレンチウイルスゲノムの配列を含み、ＤＮＡ又はＲＮＡ合成及びプロセシングのための認識シグナルを提供するために必要である。これらの配列はシス作用配列である。本発明のレンチウイルスベクターを調製するために使用するベクターゲノムの構造及び組成は、当技術分野において記載される原理に基づく。そのようなレンチウイルスベクターの例は、（Zennou et al, 2000; Firat H. et al, 2002; VandenDriessche T. et al）において開示される。特に、最小レンチウイルス遺伝子送達ベクターがベクターゲノムから調製でき、それは、適切な調節配列の制御下にある治療目的の異種ポリヌクレオチドとは別に、ＤＮＡ又はＲＮＡの合成及びプロセシングのための認識シグナルを提供するために必要であるゲノムの非コード領域であるレンチウイルスゲノムの配列を含むだけである。

【００２８】

故に、ベクターゲノムは、２つの末端反復配列（ＬＴＲ）の間の全てのウイルスタンパク質コード配列が、目的のポリヌクレオチドにより置換されている置換ベクターでよい。

【００２９】

特記なき場合、又は技術的に無関連ではない場合、レンチウイルスベクターの構造又は使用の種々の特性、実施態様、又は実施例のいずれかに関する、特にそれらのエンベロープタンパク質、又は異種ポリヌクレオチドに関し、本出願において開示する特徴は、任意の可能な組み合わせに従って組み合わせてよい。

【００３０】

「化合物の組み合わせ」又は「化合物のキット」という表現は、キット又は組み合わせの活性成分を構成するレンチウイルスベクターが、キット又は組み合わせ中の別々の化合物として提供され、宿主への投与、特に時間内での別々の投与が意図される。従って、本発明は、それを必要とする宿主におけるプライム－ブースト投与の実施を可能にし、ここで第１投与工程によって免疫、特に細胞性免疫応答が誘発され、そして後の投与工程によって免疫応答がブーストされる。

【００３１】

キットの化合物は、このように、それを必要とする宿主に、特に哺乳動物宿主に、特にヒト患者に別々に提供される。

【００３２】

従って、レンチウイルスベクターは別々のパッケージ中で提供でき、又は、その別々の使用のために共通のパッケージ中で提示できる。

【００３３】

従って、パッケージ中に含まれ、使用のための指示を含む注意は、異なるエンベロープタンパク質でシュードタイピングされるレンチウイルスベクター粒子が、時間内での別々の投与のためであり、特に宿主における免疫応答のプライミング及び続くブーストのためであることを示しうる。

【００３４】

本発明に従って、それは、提供される第１の決定された異種ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされるレンチウイルスベクター粒子、及び第２の決定された

異種ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされるレンチウイルス属ウイルスベクター粒子である。従って、第１及び第２の異種ウイルスエンベロープタンパク質は異なり、特に異なるウイルス株に由来する。このように、本発明の化合物のキットのレンチウイルスベクター粒子は、少なくとも、ベクター粒子をシュードタイピングするために使用される特定のエンベロープタンパク質により、異なる。

【００３５】

本発明の特定の実施態様において、化合物の組み合わせは、第３の、又は、さらなる型のレンチウイルスベクター粒子を含み、ここで第３のレンチウイルスベクターのエンベロープタンパク質は、第１及び第２のエンベロープタンパク質とは異なり、特に異なるウイルス株に由来する。

【００３６】

それらのシュードタイピング・エンベロープタンパク質とは別に、本発明のレンチウイルスベクターは同一でありうる、及び、特に同一のベクターゲノムを有しうる。

【００３７】

あるいは、それらのベクターゲノムは、それらが同じ異種の決定されたポリヌクレオチド（別名、トランスジーン）、特に治療目的を有する同じポリヌクレオチドを保有するという条件で、異なりうる。

【００３８】

本発明の別の実施態様において、レンチウイルスベクターのベクターゲノムは、異なるポリヌクレオチドが共通の抗原決定基、又は共通のエピトープを有するポリペプチドをコードするという条件で、異なるポリヌクレオチドを有することにより異なる。故に、異なるポリヌクレオチドは、互いにバリアントでありうる。

【００３９】

上に特定する通り、「ベクターゲノム」という表現は、核酸、即ち、レンチウイルス由来の核酸を指し、レンチウイルスベクター粒子のゲノムを構成する。従って、発現は、任意の適当な核酸、即ち、二本鎖又は一本鎖のいずれかで、三本鎖配列としてＤＮＡ　Ｆｌａｐを含む形態を含む、ＤＮＡ又はＲＮＡに関する。核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ）の性質及びその組成は、粒子のサイクルの段階に依存し、そして、粒子の発現のためのベクタープラスミド（キャプシド形成プラスミド及びエンベローププラスミドとの細胞のコトランスフェクションのために使用される）、又は、形成される場合には粒子のＲＮＡゲノム、又は、組込み前ベクター複合体を含む粒子が投与される宿主の形質導入細胞中でのこのゲノムの核酸の種々の形態（ゲノムｍＲＮＡ転写産物、直鎖非組込みＤＮＡレトロ転写産物、又は非組込みの１つ又は２つのＬＴＲ　ＤＮＡ円形態又は組込みプロウイルスを含む）（Fields Virologyを参照のこと）を含む。

【００４０】

宿主への粒子の投与の結果として、異種ポリヌクレオチドは、それがレンチウイルスベクターにより形質導入される宿主の細胞中でコードするポリペプチドの内因性発現を可能にする。

【００４１】

第１及び第２のウイルスの、ならびに、もしある場合、第３の、ならびに、恐らくはさらなるエンベロープタンパク質が、互いに血清中和しない（即ち、交差反応しない）それらの能力について選択される。従って、組み合わせでベクター粒子をシュードタイピングするために使用する、第１及び第２のウイルスの、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるエンベロープタンパク質の各々が、第１及び第２のウイルスの、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるエンベロープタンパク質の他に対する抗体と反応せず、そして、特にそれにより認識されない。従って、レンチウイルスベクター内で投与される場合、第１及び第２の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるウイルスエンベロープタンパク質の各々が、他のウイルスエンベロープタンパク質を認識する抗体の産生を誘発せず、ここで抗エンベロープ抗体のそのような産生（いわゆる、抗ベクター免疫）は、ポリヌクレオチドから発現される産物に対する免疫応答の誘発に失敗しうる

。
【００４２】
特定の実施態様において、化合物のキットでは、第１及び第２のウイルスの、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるエンベロープタンパク質は、ＤＮＡウイルス又はＲＮＡウイルスのいずれかのヒトウイルスに由来する。
【００４３】
本発明の化合物のキットの特定の実施態様において、第１及び第２の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるエンベロープタンパク質は、同じウイルス科のウイルスに由来する。
【００４４】
本発明の特定の実施態様に従って、第１及び第２のエンベロープウイルスタンパク質は、同じウイルスの異なる株型、又は同じウイルスの非交差反応性血清型に由来する。
【００４５】
化合物のキットの別の実施態様において、第１及び第２の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるエンベロープタンパク質は、異なる属のウイルスに由来する。
【００４６】
化合物のキットの別の実施態様において、第１及び第２の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるエンベロープタンパク質は、同じ属又は同じ血清型で、しかし、異なる株型に、又は、ウイルスの非交差反応性血清型に由来する。
【００４７】
本発明は特に化合物のキットに関し、ここで第１及び第２の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるウイルスエンベロープタンパク質は、ラブドウイルス科（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅ）（狂犬病ウイルスを含む）、特にパラミクソウイルス科からの水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）を含むベシクロウイルス属、特に麻疹ウイルス（ＭＶ）呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、又は非ヒトレトロウイルスもしくはインフルエンザウイルスなどのオルソミクソウイルス科に由来する。
【００４８】
上に引用したウイルスは、哺乳動物宿主、特にヒト宿主に感染できるＲＮＡウイルスである。それらの部分、例えばモノネガウイルス目のウイルス、及び特にラブドウイルス科、特にベシクロウイルス属のウイルス、特にＶＳＶが、エンベロープタンパク質、別名、表面タンパク質を提供し、ウイルスベクター、特にレンチウイルスベクター粒子をシュードタイピングするために提案されている。
【００４９】
水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）は、野生型ウイルス粒子の表面コートとして機能する膜貫通タンパク質である。それは、また、組換えレンチウイルスベクターでの共通のコートタンパク質である。現在、９つのウイルス種がＶＳＶジェンダーに明確に分類され、そして１９のラブドウイルス科が暫定的にこのジェンダーに分類され（以下を参照のこと）、全てが種々の程度の交差中和を示す。配列決定すると、プロテインＧ遺伝子は配列類似性を示す。ＶＳＶ－Ｇタンパク質は、Ｎ末端の外部ドメイン、膜貫通領域、及びＣ末端細胞質側末端を提示する。それは、トランスゴルジネットワーク（小胞体及びゴルジ装置）を経て細胞表面に搬出される。
【００５０】
ＶＳＶ株には、レンチウイルスベクターの調製のためのエンベロープタンパク質を提供しうるいくつかの血清型が含まれる：ＶＳＶ－Ｇ糖タンパク質は、特に、ベシクロウイルス属において分類される種の中から選んでよい：カラジャス（Ｃａｒａｊａｓ）ウイルス（ＣＪＳＶ）、チャンディプラ（Ｃｈａｎｄｉｐｕｒａ）ウイルス（ＣＨＰＶ）、Ｃｏｃａｌウイルス（ＣＯＣＶ）、イスファハン（Ｉｓｆａｈａｎ）ウイルス（ＩＳＦＶ）、マラバ（Ｍａｒａｂａ）ウイルス（ＭＡＲＡＶ）、Ｐｉｒｙウイルス（ＰＩＲＹＶ）、水疱性口内炎アラゴアスウイルス（ＶＳＡＶ）、水疱性口内炎インディアナウイルス（ＶＳＩＶ）及び水疱性口内炎ニュージャージーウイルス（ＶＳＮＪＶ）及び／又はソウギョラブ

ドウイルス（Ｇｒａｓｓ ｃａｒｐ ｒｈａｂｄｏｖｉｒｕｓ）としてベシクロウイルス属において暫定的に分類される株、ＢｅＡｎ １５７５７５ウイルス（ＢｅＡｎ １５７５７５）、ボテケ（Ｂｏｔｅｋｅ）ウイルス（ＢＴＫＶ）、カルチャキ（Ｃａｌｃｈａｑｕｉ）ウイルス（ＣＱＩＶ）、Ｅｅｌ ｖｉｒｕｓ Ａｍｅｒｉｃａｎ（ＥＶＡ）、グレイロッジ（Ｇｒａｙ Ｌｏｄｇｅ）ウイルス（ＧＬＯＶ）、ユロナ（Ｊｕｒｏｎａ）ウイルス（ＪＵＲＶ）、クラマス（Ｋｌａｍａｔｈ）ウイルス（ＫＬＡＶ）、クワッタ（Ｋｗａｔｔａ）ウイルス（ＫＷＡＶ）、ラ・ホージャ（Ｌａ Ｊｏｙａ）ウイルス（ＬＪＶ）、マルパイススプリング（Ｍａｌｐａｉｓ Ｓｐｒｉｎｇ）ウイルス（ＭＳＰＶ）、エルゴン山（Ｍｏｕｎｔ Ｅｌｇｏｎ）コウモリウイルス（ＭＥＢＶ）、ペリネ（Ｐｅｒｉｎｅｔ）ウイルス（ＰＥＲＶ）、パイク（Ｐｉｋｅ）ハエラブドウイルス（ＰＦＲＶ）、ポートン（Ｐｏｒｔｏｎ）ウイルス（ＰＯＲＶ）、ラジ（Ｒａｄｉ）ウイルス（ＲＡＤＩＶ）、コイ春ウイルス血症（Ｓｐｒｉｎｇ ｖｉｒｅｍｉａ ｏｆ ｃａｒｐ）ウイルス（ＳＶＣＶ）、ツバイ（Ｔｕｐａｉａ）ウイルス（ＴＵＰＶ）、潰瘍性疾患ラブドウイルス（ＵＤＲＶ）、及びユグボグダノヴァツ（Ｙｕｇ Ｂｏｇｄａｎｏｖａｃ）ウイルス（ＹＢＶ）。

【００５１】

水疱性口内炎インディアナウイルス（ＶＳＩＶ）及び水疱性口内炎ニュージャージーウイルス（ＶＳＮＪＶ）が、本発明のレンチウイルスベクターをシュードタイピングするための、又は、レンチウイルスベクターをシュードタイピングするための組換えエンベロープタンパク質をデザインするための好ましい株である。しかし、イスファハン及びＳＶＣＶのエンベロープも、シュードタイピングされた粒子の調製のための良好な候補を提供する。Ｃｏｃａｌも興味深い（最初に投与されうる、及び、特にプライム・ブースト計画において後期又は最後の投与に好まれうる粒子中で使用されない範囲内で）。異なるシュードタイピングエンベロープを有する粒子が連続的に投与される場合、エンベロープに関して以下の投与の順番が好まれうる：インディアナ；ニュージャージー；イスファハン；ＳＶＣＶ／Ｃｏｃａｌ。Ｃｏｃａｌシュードタイピングされたレンチウイルスベクターはいくつかの他のエンベロープを血清中和するため、ワクチン接種の時間順序において、Ｃｏｃａｌエンベロープを粒子の調製において使用し、それらを最後の１つとして投与することが好ましい。

【００５２】

インディアナ及びニュージャージー血清型のＶＳＶ株が、本発明のレンチウイルスベクターにおいて使用するために特に興味深い。それらのＶＳＶ－Ｇタンパク質はGenebankにおいて開示され、ここでいくつかの株が提示される。ＶＳＶ－Ｇニュージャージー株について、特にアクセッション番号Ｖ０１２１４を有する配列を参照する。

【００５３】

ＶＳＶの中で、チャンディプラウイルス（ＣＨＰＶ）、Ｃｏｃａｌウイルス（ＣＯＣＶ）、ペリネ（Ｐｅｒｉｎｅｔ）ウイルス（ＰＥＲＶ）、Ｐｉｒｙウイルス（ＰＩＲＹＶ）、ＳＶＣＶ又はイスファハンウイルスが、代替のエンベロープタンパク質をデザインするため、特に第３のエンベロープタンパク質、又はさらなるエンベロープタンパク質をデザインするための良好な候補になりうる。しかし、チャンディプラウイルス（ＣＨＰＶ）及びＰｉｒｙウイルス（ＰＩＲＹＶ）は、異なるエンベロープで調製された粒子で得られたベクターの力価を比較した場合に低いシュードタイピング能を有するエンベロープタンパク質を提供することが示されている。従って、第１のアプローチにおいて、効率的な形質導入能力を伴う粒子を調製するために、これらのエンベロープをエンベロープの選択肢から除外できる。

【００５４】

別の実施態様によると、ウイルスエンベロープタンパク質は、他のＲＮＡウイルス、例えば、マウスレトロウイルスなどの非ヒトレトロウイルス、又はインフルエンザウイルスに由来する。

【００５５】

レンチウイルスのシュードタイピングに適したエンベロープタンパク質の他の例を、後の記載において、特に、宿主中でのそれらの標的細胞を参照して与える。

【００５６】

別の実施態様によると、本発明の化合物のキットでは、ラブドウイルス科、特にＶＳＶ又はパラミクソウイルスに由来する、第１及び第２の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるウイルスエンベロープタンパク質を使用し、ここで第１及び第２の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるエンベロープタンパク質が異なる属のウイルスに由来し、又は、同じ血清型における、特に水疱性口内炎血清型における異なるウイルス株に由来し、又は、代わりに、同じ属の異なる血清型に由来する。

【００５７】

本発明の特定の実施態様において、化合物のキットのシュードタイピングされたレンチウイルスベクターのデザインにおける使用に適したタンパク質又は糖タンパク質は、特に単量体又は多量体のタンパク質として産生される。

【００５８】

本発明の特定の実施態様において、第１及び第２の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるウイルスエンベロープタンパク質は、融合及び／又はエンドサイトーシスによって、抗原提示細胞による、及び、特に樹状細胞による取り込みが可能になる。特定の実施態様において、取り込みの効率を、シュードタイピングのためのＶＳＶのエンベロープを選択するための特性として使用できる。この点において、形質導入の相対力価（ＤＣの力価／他の形質導入細胞、例、２９３Ｔ細胞の力価）を検討でき、ＤＣとの相対的に良好な融合力を有するエンベロープが好まれうる。形質導入の相対力価を実施例において例示する。

【００５９】

抗原提示細胞（ＡＰＣ）及び特に樹状細胞（ＤＣ）は、予防的又は治療的いずれかの目的で、ワクチン組成物として使用されるシュードタイピングされたレンチウイルスベクターのための適切な標的細胞である。

【００６０】

レンチウイルスベクター粒子をシュードタイピングするために使用するエンベロープタンパク質は、このように、宿主中の標的細胞に関して選択できる。

【００６１】

ＶＳＶエンベロープタンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）をコードするポリヌクレオチドも、脾細胞、特に抗原提示細胞（ＡＰＣ）もしくは樹状細胞（ＤＣ）、又は肝細胞もしくは非実質細胞を含む肝臓細胞を標的にする。

【００６２】

他の標的細胞は、活性化された又は増殖性の心筋細胞でありうる。

【００６３】

決定した細胞を標的とし、そして、本発明のレンチウイルスベクターをシュードタイピングするために適したエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、以下に例示する：ＶＳＶ（ＶＳＶ－Ｇ）、ＬＣＭＶ（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス）、又はＲＲＶ（ロスリバーウイルス）のエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチドを使用して、肝臓細胞を標的とするために適したベクターを調製できる（Park 2003）（Kang et al, 2002）。

【００６４】

エボラウイルス又はマールブルグウイルスのエンベロープタンパク質を使用して、尖端表面の気道上皮を標的にできる（Kobinger et al, 2001）。

【００６５】

ラブドウイルス科（モコラ（Ｍｏｋｏｌａ）ウイルスなどの狂犬病又は狂犬病関連ウイルスを含む）又はＶＳＶ科のウイルスのエンベロープタンパク質は、向神経性レンチウイルスベクターを提供しうる。

【００６６】

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）などのアレナウイルスのエンベロープ糖タンパク質を使用して、繊維芽細胞、上皮細胞、造血細胞、神経芽細胞腫、及びグリオーマ細胞株に形質導入できる。

【００６７】

ＲＲＶ又はＳＦＶ（セムリキ森林ウイルス（Ｓｅｍｌｉｋｉ Ｆｏｒｅｓｔ Ｖｉｒｕｓ））のタンパク質などのアルファウイルスエンベロープタンパク質は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）、神経細胞、又は筋肉細胞を標的にしうる。

【００６８】

他のエンベロープタンパク質を使用して、例えば、ＨＡタンパク質（インフルエンザ赤血球凝集素）、ＲＤ１１４タンパク質、トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）（インフルエンザウイルスなど）、コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）、フラビウイルス科（Ｆｌａｖｉｒｉｄａｅ）、フィロウイルス科（Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ）のエンベロープタンパク質などの本発明のレンチウイルスベクターをシュードタイピングできる。

【００６９】

エンベロープタンパク質は、場合により別名が特定のウイルスにおける表面タンパク質であり、異なる生物、特に異なるＲＮＡウイルス株に「由来」すると言われ、タンパク質において、決定されたＲＮＡウイルスにおいて発現される対応するタンパク質の必須の特性が維持されることを意味する。必須の特性は、タンパク質の構造又は機能に関連し、特に、得られたタンパク質を、ベクターをシュードタイピングするために、ベクター粒子の表面での発現を可能にするものである。エンベロープタンパク質はその後、ベクター粒子上に存在する場合、宿主の標的細胞において認識され、そして内在化されうる。

【００７０】

特定の実施態様において、化合物のキットのシュードタイピングされたレンチウイルスベクターのデザインにおける使用に適したタンパク質又は糖タンパク質を、三量体であるＶＳＶ－Ｇタンパク質などの多量体タンパク質として使用する。

【００７１】

エンベロープタンパク質は、タンパク質のコード配列を含むポリヌクレオチドから発現され、そのポリヌクレオチドは、本発明のレンチウイルスベクターの調製のために使用するプラスミド（エンベロープ発現プラスミド又はシュードタイピングされたｅｎｖプラスミド）中に挿入する。エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、コード配列（任意に、InvitrogenからのＷＰＲＥ配列などのポリヌクレオチドを含む）の転写及び／又は発現のための調節配列の制御下にある。

【００７２】

本発明は、このように、哺乳動物、特にヒト細胞におけるインビボでの使用に適した内部プロモーター及びプロモーターの制御下のエンベロープタンパク質をコードする核酸を含む核酸コンストラクトに関する。本発明は、また、このコンストラクトを含むプラスミドに関する。プロモーターは、特に、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、又は誘導的プロモーターとしてのそれらの特性について選択できる。適したプロモーターの例として、以下の遺伝子を含むプロモーターが包含される：ＥＦ１α、ヒトＰＧＫ、ＰＰＩ（プレプロインシュリン）、チオデキストリン（ｔｈｉｏｄｅｘｔｒｉｎ）、ＨＬＡ ＤＲ不変鎖（Ｐ３３）、ＨＬＡ ＤＲアルファ鎖、フェリチンＬ鎖又はフェリチンＨ鎖、ベータ２ミクログロブリン、キモシンベータ４、キモシンベータ１０、又はシスタチンリボソームタンパク質Ｌ４１。

【００７３】

レンチウイルスベクター粒子をシュードタイピングするために必要なエンベロープタンパク質の発現のために使用するヌクレオチド配列を、参照として使用する天然エンベロープタンパク質をコードする核酸に関して、改変してよい。改変を実施して、ベクター粒子の調製のための細胞及び／又は宿主の形質導入細胞におけるコドン使用頻度を改善できる（コドン最適化）。それを改変して、天然タンパク質とは異なるタンパク質、特に改善し

たシュードタイピング能力、産生レベルにおける改善した能力、又は化合物のキットにおいて使用する他のエンベロープタンパク質との血清中和の阻止に関する改善した能力を有するものを発現する。

【００７４】

エンベロープタンパク質のそのような改変は、恐らくはシュードビリオンに結合したエンベロープタンパク質の密度を改善することにより、細胞宿主におけるそれらの産生レベル又はベクター粒子をシュードタイピングするそれらの能力に影響を及ぼし、特に改善しうる。改変は、例えば、１つ又は複数のヌクレオチド又はヌクレオチドフラグメントの付加、欠失、又は置換によるタンパク質のアミノ酸配列における突然変異に由来しうるか、又は、翻訳後修飾及び特にエンベロープタンパク質のグリコシル化状態に関連しうる。

【００７５】

本発明のレンチウイルスベクターをシュードタイピングするために使用するエンベロープタンパク質は、実際に、特に糖タンパク質である。

【００７６】

水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）でウイルスベクターをシュードタイピングすることによって異なる種からの広い範囲の細胞型の形質導入が可能になることが既に示されている。このＶＳＶ－Ｇ糖タンパク質は、その広範な向性に加えて、ベクターシュードタイピングのために使用した場合に興味深い安定性を有する。従って、ＶＳＶ－Ｇは、他のシュードタイプの効率を評価するための基準として使用されてきた（Cronin J. et al, 2005）。従って、ＶＳＶ－Ｇは、本発明のレンチウイルスベクターをシュードタイピングするための適切な候補である。

【００７７】

本発明は、特に、本出願において定義する化合物のキットに関し、ここで第１及び第２の両方の、ならびに、もしある場合、第３の、又は、さらなるウイルスエンベロープタンパク質は、ＶＳＶウイルスの膜貫通グリコシル化（Ｇ）タンパク質であり、Ｇタンパク質はキットのレンチウイルスベクターにおいて異なるＶＳＶ型特異性を有する。

【００７８】

特に、第１のＧタンパク質はＶＳＶ－インディアナ血清型に由来し、そして第２のＧタンパク質はＶＳＶ－ニュージャージー血清型に由来するか、又は、逆も同様である。

【００７９】

以下の実施例において、Ｇタンパク質のいずれかでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを連続的に使用して、それらが投与された宿主において反応を誘発させる場合、キットにおいてシュードタイピングされたウイルス粒子に頼ることによって（ここでエンベロープタンパク質は、それぞれＶＳＶ－インディアナ血清型及びＶＳＶ－ニュージャージー血清型のＧタンパク質である）、免疫学的反応のプライミング及びブーストが可能になることが示されている。そのような場合において、無液性応答（交差反応性の液性応答なし）又は低液性応答（低い交差反応性の液性応答）が、使用される第１のエンベロープタンパク質に対して産生されることが示されており、第２の異なるエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターが投与される場合に、ポリヌクレオチドの発現産物に対して宿主において誘発される応答を害しうる。これは、異なるエンベロープタンパク質が交差中和せず、又は、互いに有意に交差反応せず、従って、抗ベクター免疫応答を生じないという事実により可能になる。

【００８０】

特定の実施態様において、本発明は、その天然形態に関して改変したＶＳＶに由来するＧタンパク質に関し、及び／又は、シュードタイピングを改善するために、天然のものに関して改変した核酸分子によりコードされる。それは、レンチウイルス粒子によるエンベロープタンパク質の取り込みの改善の結果でありうるが、それによって、それらが投与された宿主の細胞によるレンチウイルス粒子の形質導入の改善が可能になる。

【００８１】

化合物の特定のキットはレンチウイルスベクターを含み、ここでそれらの１つ又は２つ

又はそれ以上を、様々なウイルス、特にＶＳＶの様々な種の様々な属の様々なエンベロープタンパク質に由来するドメイン又はフラグメントを含む組換えエンベロープタンパク質でシュードタイピングする。

【００８２】

本発明の特定の実施態様において、少なくとも１つの第１及び第２の、ならびに、もしある場合、任意の第３の、又は、さらなるエンベロープタンパク質は、インディアナ株のＶＳＶ－Ｇの搬出決定基を含む組換えエンベロープタンパク質である。

【００８３】

インディアナ株のＶＳＶ－Ｇの搬出決定基は、エンベロープのオープンリーディングフレームの細胞質側フラグメントによりコードされるポリペプチドである。

【００８４】

インディアナ株のＶＳＶ－Ｇの搬出決定基は、細胞質側末端におけるアミノ酸配列ＹＴＤＩＥを含む、又は、有するポリペプチドである（Nishimua N. et al. 2002）。

【００８５】

組換えエンベロープタンパク質は、疎水性膜貫通ドメインにより区切られたＶＳＶ－Ｇの細胞内部分である、インディアナ株のＶＳＶ－Ｇの細胞質側末端を含みうる。

【００８６】

化合物の特定のキットはレンチウイルスベクターを含み、ここでそれらの１つ又は２つ又はそれ以上を、インディアナＶＳＶの細胞質側ドメイン及び異なるＶＳＶ血清型の株の外部ドメインを含む組換えエンベロープタンパク質でシュードタイピングする。膜貫通ドメインは、また、インディアナＶＳＶ－Ｇの１つでよい。

【００８７】

化合物の特定のキットはレンチウイルスベクターを含み、ここでそれらの１つ又は両方を、インディアナＶＳＶの膜貫通ドメイン及び細胞質側ドメインならびにニュージャージーＶＳＶの外部ドメインを含む組換えエンベロープタンパク質でシュードタイピングする。

【００８８】

適切な他の改変として、シュードタイピングを改善する、突然変異、特に点突然変異が包含される。ＶＳＶ－Ｇタンパク質についてのそのような突然変異は、１つ又は複数のアミノ酸残基を置換又は欠失させることにより膜貫通ドメインにおいて行ってよい。適切な突然変異の他の例が、Fredericksen B.L. et al(1995)又はNishimura N. et al(2003)に開示される。

【００８９】

本記載において「フラグメント」に言及する場合、それぞれ、少なくとも２つの、又は、それより長いアミノ酸残基の、少なくとも６つの、又は、それより長いヌクレオチドのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列をそれぞれ有するポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。

【００９０】

宿主に投与する場合、これらのＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターの形質導入効率を改善するために、ＶＳＶ－Ｇのグリコシル化状態を改変することも特には可能である。

【００９１】

ＶＳＶの種々の株からのＶＳＶ－Ｇタンパク質が図に開示され、それらの配列はデータベース、特にGenebankに由来してもよい。

【００９２】

ＶＳＶのニュージャージー株及びインディアナ株の糖タンパク質を考慮すると、２つのアスパラギン残基（Ｎ１８０及びＮ３３６）でのグリコシル化が、レンチウイルスベクターの効率的なシュードタイピングに有利であることが提案されている。この特定の特性は、本発明のレンチウイルスベクターの調製において適用できる。

【００９３】

本発明は、特に、ＶＳＶ－Ｇ由来のエンベロープタンパク質をコードする以下のコンストラクト、及び、本発明のレンチウイルスベクター粒子の組み合わせの調製におけるそれらの使用に関する。本発明は、また、コンストラクトによりコードされるエンベロープタンパク質に関する：

【００９４】

コドン最適化されたＶＳＶ－Ｇインディアナ遺伝子が図６に開示され、本発明の部分である。本発明は、また、ＶＳＶ－Ｇインディアナのためのエンベロープ遺伝子を含むキャプシド形成プラスミドに関する。特定のキャプシド形成プラスミドはｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）であり、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、２００７年１０月１０日に番号Ｉ－３８４２で、又は、プラスミドコンストラクトの代わりのバージョンが２００８年７月３１日に番号ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５６で寄託されている。他のコンストラクトは、特にプロモーターを、本出願において列挙するプロモーターのうちのプロモーターで置換することにより、この特定のプラスミドに由来してよい。

【００９５】

コドン最適化されたＶＳＶ－Ｇニュージャージー遺伝子が図７に開示され、本発明の部分である。本発明は、また、ＶＳＶ－Ｇニュージャージーのためのエンベロープ遺伝子を含むキャプシド形成プラスミドに関する。特定のキャプシド形成プラスミドはｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）であり、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、２００７年１０月１０日に番号Ｉ－３８４３で、又は、プラスミドコンストラクトの代わりのバージョンが２００８年７月３１日に番号ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５８で寄託されている。他のコンストラクトは、特にプロモーターを、本出願において列挙するプロモーターのうちのプロモーターで置換することにより、この特定のプラスミドに由来してよい。本発明は、これらのプラスミド、及びこれらが含む、ＶＳＶ－Ｇエンベロープタンパク質をコードするインサートに関する。

【００９６】

本発明を行うために適し、コドン最適化配列を有する他のエンベロープを、図６～１２及び１４～１９において例示し、特にＶＳＶ－Ｇチャンディプラ遺伝子及びその発現産物、ＶＳＶ－Ｇ　Ｃｏｃａｌ遺伝子及びその発現産物、ＶＳＶ－Ｇ　Ｐｉｒｙ遺伝子及びその発現産物、ＶＳＶ－Ｇイスファハン遺伝子及びその発現産物、ＶＳＶ－Ｇコイ春ウイルス血症遺伝子及びその発現産物を包含する。特定のキャプシド形成プラスミドは、ＶＳＶ－Ｇ　Ｃｏｃａｌのためのエンベロープ遺伝子を含み、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＯＣＡＬ－ＣＯ）であり、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、２００８年７月３１日に番号ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５５で寄託されている。別の特定のキャプシド形成プラスミドは、ＶＳＶ－Ｇイスファハンのためのエンベロープ遺伝子を含み、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＳＦＡ－ＣＯ）であり、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、２００８年７月３１日に番号ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５７で寄託されている。別の特定のキャプシド形成プラスミドは、ＶＳＶ－Ｇコイ春ウイルス血症のためのエンベロープ遺伝子を含み、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＳＶＣＶ－ＣＯ）であり、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、２００８年７月３１日に番号ＣＮＣＭ　Ｉ－４０５９で寄託されている。本発明は、これらのプラスミド、及び、それらが含む、ＶＳＶ－Ｇエンベロープタンパク質をコードするインサートに関する。

【００９７】

本発明は、また、融合エンベロープタンパク質、特に異なるウイルスのＶＳＶ－Ｇタンパク質のいくつかの異なるフラグメントを含む融合タンパク質、及び、そのようなタンパク質をコードする核酸コンストラクトに関する。特定の融合エンベロープは、図に例示する通り、ニュージャージーエンベロープタンパク質の外部ドメインとインディアナエンベロープタンパク質の膜貫通ドメイン及び細胞質側ドメインの間の融合物である。

【００９８】

本発明の別の融合エンベロープタンパク質は、ＶＳＶ－Ｇチャンディプラ、ＶＳＶ－Ｇ　Ｃｏｃａｌ、ＶＳＶ－Ｇ　Ｐｙｒｉ、ＶＳＶ－Ｇイスファハン、又はＶＳＶ－Ｇ　ＳＶＣＶより選択される１つのＶＳＶ－Ｇタンパク質の外部ドメイン、ならびに、ＶＳＶ－Ｇ

インディアナの膜貫通及び細胞質側ドメインを含む。本発明は、また、図に例示するの融合タンパク質をコードする核酸分子、及び特に、同じく図に記載する融合タンパク質をコードするコドン最適化核酸に関する。

【００９９】

本発明は、また、発現ベクター、特に融合タンパク質をコードする核酸コンストラクトを含むプラスミドに関する。

【０１００】

本発明のシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子の構築において使用するベクターゲノムを特性付けする基本的で必須の特性が、上に記載されている。適したベクターゲノム（別名、導入ベクター）の調製のための追加の特性が、実施例及び図面を含む、以下に開示される。

【０１０１】

本発明の特定の実施態様において、シュードタイピングされたレンチウイルスベクターはヒトレンチウイルスベースのベクターである。従って、それらのゲノムは、ヒトレンチウイルス、特にＨＩＶレンチウイルスに由来する。特に、シュードタイピングされたレンチウイルスベクターは、ＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２ベースのベクターなどのＨＩＶベースのベクターであり、特に、ＨＩＶ－１Ｍ、例えばＢＲＵ又はＬＡＩ分離株に由来する。

【０１０２】

別の実施態様において、シュードタイピングされたレンチウイルスベクターは霊長類又はネコのレンチウイルスベースのベクターである。

【０１０３】

上記の通り、それを、それが最終的に含むトランスジーンとは別に考慮する場合、ベクターゲノムは、元のレンチウイルスゲノム中の２つの末端反復配列（ＬＴＲ）の間の核酸を、ＤＮＡ又はＲＮＡの合成及びプロセシングのためのシス作用配列に制限した、又は、少なくとも、生物学的に機能的なＧＡＧポリタンパク質ならびに恐らくはＰＯＬ及びＥＮＶタンパク質を含むレンチウイルス構造タンパク質の発現を可能にしうる必須の核酸セグメントについて欠失又は突然変異させた置換ベクターである。

【０１０４】

特定の実施態様において、ベクターゲノムは、生物学的に機能的なＧａｇの発現、及び有利なことに、生物学的に機能的なＰＯＬ及びＥＮＶタンパク質が欠損している。

【０１０５】

レンチウイルスの５’　ＬＴＲ及び３’　ＬＴＲ配列をベクターゲノムにおいて使用するが、しかし、３’－ＬＴＲは、少なくともＵ３領域において元のレンチウイルスの３’ＬＴＲに関して少なくとも改変する。５’ＬＴＲは、また、特にそのプロモーター領域中で改変させてよい。

【０１０６】

特定の実施態様において、ベクターゲノムは、従って、Ｖｉｆ－、Ｖｐｒ、Ｖｐｕ－、及びＮｅｆ－アクセサリー遺伝子のための（ＨＩＶ－１レンチウイルスベクターのための）コード配列、又はそれらの完全なもしくは機能的な遺伝子を欠く。

【０１０７】

好ましい実施態様において、レンチウイルスベクター粒子のベクターゲノムは、挿入されたシス作用フラグメントとして、ＤＮＡ　Ｆｌａｐからなる、又は、そのようなＤＮＡ　Ｆｌａｐを含む少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む。特定の実施態様において、ＤＮＡ　Ｆｌａｐを目的のポリヌクレオチドの上流に挿入し、有利なことに、しかし、必ずしもベクターゲノム中のおおよその中心位置に位置しない。本発明に適したＤＮＡ　Ｆｌａｐは、レトロウイルス、特にレンチウイルス、特にヒトレンチウイルス、又はレトロトランスポゾンなどのレトロウイルス様生物から得てよい。それは、代わりに、ＣＡＥＶ（ヤギ関節炎脳炎ウイルス）ウイルス、ＥＩＡＶ（ウマ伝染性貧血ウイルス）ウイルス、ＶＩＳＮＡウイルス、ＳＩＶ（サル免疫不全ウイルス）ウイルス、又はＦＩＶ（ネコ免疫不全ウイルス）ウイルスから得てよい。ＤＮＡ　Ｆｌａｐは、合成（化学合成）的に、又

は、ＤＮＡの増幅のいずれでも調製でき、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの上に定義する適切な材料からＤＮＡ　Ｆｌａｐを提供する。より好ましい実施態様において、ＤＮＡ　Ｆｌａｐは、ＨＩＶレトロウイルス、例えばＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２ウイルス（これらの２つの型の任意の分離株を含む）から得られる。

【０１０８】

ＤＮＡ　Ｆｌａｐ（Zennou V. et al., 2000, Cell vol 101, 173-185において、又は、ＷＯ　９９／５５８９２及びＷＯ　０１／２７３０４において定義される）は、一部のレンチウイルス、特にＨＩＶのゲノムの中央にある構造であり、ここでそれは、通常、特にＨＩＶ逆転写中に合成され、そしてＨＩＶゲノム核内輸送のシス決定基として作用する３本鎖ＤＮＡ構造を生じる。ＤＮＡ　Ｆｌａｐによって、逆転写中のセントラルポリプリントラクト（ｃＰＰＴ：ｃｅｎｔｒａｌ　ｐｏｌｙｐｕｒｉｎｅ　ｔｒａｃｔ）及びセントラルターミネーション配列（ＣＴＳ：ｃｅｎｔｒａｌ　ｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）によりシスで制御される中央鎖置換事象を可能にする。レンチウイルス由来ベクターに挿入された場合、ＤＮＡ　Ｆｌａｐの逆転写中での産生を可能にするポリヌクレオチドは、遺伝子導入効率を刺激し、核内輸送のレベルを野生型レベルにまで補完する（Zennou et al., Cell, 2000）。

【０１０９】

ＤＮＡ　Ｆｌａｐの配列は先行技術において、特に、上に引用する特許出願において開示されている。これらの配列を、また、添付図に配列番号１～配列番号７として開示する。それらは、好ましくは、ベクターゲノムの中央近くである位置にベクターゲノム中の追加隣接配列を恐らくは伴うフラグメントとして挿入される。あるいは、それらを、本発明のポリヌクレオチドの発現を制御するプロモーターから直ぐ上流に挿入してよい。ＤＮＡ　Ｆｌａｐを含むフラグメントは、ベクターゲノム中に挿入され、その由来及び調製に応じて、約８０～約２００bpの配列を有しうる。

【０１１０】

特定の実施態様によると、ＤＮＡ　Ｆｌａｐは、約９０～約１４０ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有する。

【０１１１】

ＨＩＶ－１において、ＤＮＡ　Ｆｌａｐは、安定な９９ヌクレオチド長のプラス鎖重複である。本発明のレンチウイルスベクターのゲノムベクターにおいて使用する場合、それは、特にＰＣＲフラグメントとして調製する場合、より長い配列として挿入できる。ＤＮＡ　Ｆｌａｐを提供する構造を含む特定の適切なポリヌクレオチドは、ＨＩＶ－１　ＤＮＡのｃＰＰＴ及びＣＴＳ領域を包含する、１７８塩基対のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）フラグメントである（Zennou et al 2000）。

【０１１２】

このＰＣＲフラグメントは、ヌクレオチド４７９３～４９７１までの配列に対応するフラグメントとして、ＨＩＶ－１　ＬＡＩ、特にＨＩＶ１のｐＬＡＩ３の感染性ＤＮＡクローンに特に由来しうる。適切な場合、制限酵素部位を、クローニングのために、得られたフラグメントの１つ又は両方の末端に加える。例えば、Ｎａｒ　Ｉ制限酵素部位を使用するプライマーの５’末端に加えて、ＰＣＲ反応を実施できる。

【０１１３】

従って、ＤＮＡ　Ｆｌａｐを使用し、本発明において、ｐｏｌ遺伝子の不要な５’及び３’部分から欠失させ、異なる由来の配列と組換える。ＤＮＡ　Ｆｌａｐは、合成（化学合成）的に、又は、ＤＮＡの増幅により調製でき、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの上に定義する適切な材料からＤＮＡ　Ｆｌａｐを提供する。より好ましい実施態様において、ＤＮＡ　Ｆｌａｐは、ＨＩＶレトロウイルス、例えばＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２ウイルス（これらの２つの型の任意の分離株を含む）から得られる。

【０１１４】

ゲノムベクター中で使用するＤＮＡ　Ｆｌａｐ及びＧＡＧ及びＰＯＬポリタンパク質をコードするキャプシド形成プラスミドのポリヌクレオチドは、同じレンチウイルスのサブ

ファミリー又は同じレトロウイルス様生物に由来すべきであることが明記されている。
【０１１５】
好ましくは、ゲノムベクターの他のシス活性化配列は、また、ＤＮＡ　Ｆｌａｐを提供するものとして、同じレンチウイルス又はレトロウイルス様生物に由来する。
【０１１６】
ベクターゲノムは、さらに、目的のポリヌクレオチドをクローニングするための１つ又は複数の独自の制限酵素部位を含んでよい。
【０１１７】
本発明によると、シュードタイピングされたレンチウイルスベクターは、ｇａｇ及びｐｏｌの機能遺伝子がもっぱらトランスで提供され、従ってベクターゲノム上に存在しないとの事実の結果として、複製能を欠くレンチウイルスベクターである。そのような場合において、レンチウイルスベクターを宿主に投与した場合、それは宿主細胞中で複製できない。従って、それは、治療目的のポリヌクレオチドを発現用の宿主細胞中に提供するが、しかし、さらなるレンチウイルスベクター粒子を形成しない。この複製能を欠くレンチウイルスベクターの状態は、特に、レンチウイルスのｇａｇ、ｐｏｌ、ｅｎｖ遺伝子をベクターゲノム中に提供しない、又は、機能遺伝子として提供しない場合に達成される。「機能的」により、正確に転写される、及び／又は、正確に発現される遺伝子を意味する。このように、この実施態様における本発明のレンチウイルスベクターゲノムは、転写されない、又は、不完全に転写されるｇａｇ、ｐｏｌ及びｅｎｖ遺伝子の少なくとも１つを含み；「不完全に転写される」という表現は、転写産物ｇａｇ、ｇａｇ－ｐｒｏ又はｇａｇ－ｐｒｏ－ｐｏｌにおける変化を指し、これらの１つ又はこれらの複数が転写されない。レンチウイルス複製に関与する他の配列は、この状態を達成するために、ベクターゲノムにおいて突然変異させてもよい。
【０１１８】
好ましい実施態様において、ベクターゲノム中で、レンチウイルスベクターゲノムの３’　ＬＴＲ配列はＵ３領域の少なくともアクチベーター（エンハンサー）及び恐らくはプロモーターを欠く。別の特定の実施態様において、３’　ＬＴＲ領域はＵ３領域を欠く（デルタＵ３）。この点において、ＷＯ　０１／２７３００及びＷＯ　０１／２７３０４を参照にする。
【０１１９】
特定の実施態様において、ベクターゲノム中で、ＬＴＲ　５’のＵ３領域は、非レンチウイルスＵ３により、又は、ｔａｔ非依存性一次転写を促進するために適したプロモーターにより置換する。そのような場合、ベクターはｔａｔトランスアクチベーターに非依存である。
【０１２０】
ベクターゲノムはｐｓｉ（Ψ）パッケージングシグナルも含む。パッケージングシグナルは、ｇａｇ　ＯＲＦのＮ末端フラグメントに由来する。特定の実施態様において、その配列は、ｇａｇペプチドの起こりうる転写／翻訳の任意の、トランスジーンのそれとの干渉を阻止するために、フレームシフト突然変異により改変できうる。
【０１２１】
ベクターゲノムは、任意に、スプライスドナー部位（ＳＤ）、スプライスアクセプター部位（ＳＡ）、及び／又はＲｅｖ応答性エレメント（ＲＲＥ）から選択されるエレメントも含んでよい。
【０１２２】
特定の実施態様によると、ベクタープラスミド（又は付加ゲノムベクター）は、トランスジェニック発現カセットのための以下：
１．逆転写、ウイルスＤＮＡ組込み及び転写に必要なＬＴＲ配列（末端反復配列）。２つの主な理由から、遺伝子導入に必要な機能を混乱させることなく、３’　ＬＴＲはＵ３領域において欠失させる：第１に、ひとたびＤＮＡがゲノムに組み込まれると宿主遺伝子のトランス活性化が回避され、第２に、レトロ転写後にウイルスシス配列の自己活性化を可

能にする。任意に、ゲノムの転写を促進する５’－ＬＴＲからのｔａｔ依存性Ｕ３配列をプロモーター配列により置換する。このように、標的細胞において、内部プロモーターからの配列だけが転写される（トランスジーン）（図２３及び２４）。
２．ウイルスＲＮＡキャプシド形成に必要なΨ領域。
３．Ｒｅｖタンパク質の結合後にウイルスメッセンジャーＲＮＡの核から細胞質への搬出を可能にするＲＲＥ配列（ＲＥＶ応答性エレメント）。
４．核内輸送を促進するためのＤＮＡ　Ｆｌａｐ配列（ｃＰＰＴ／ＣＴＳ、通常はＰｏｌ中に含まれる）。
５．任意に、また、ｍＲＮＡの安定性を最適化するために付加するＷＰＲＥシス活性配列（ウッドチャックＢ型肝炎ウイルスのポスト応答性エレメント（Ｐｏｓｔ－Ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ　Ｅｌｅｍｅｎｔ））（Zufferey et al., 1999）。ＷＰＲＥは翻訳されない。のシス作用配列を含む。

【０１２３】
特定の実施態様において、レンチウイルスのコード領域に由来しうる治療目的のポリヌクレオチドとは別に、上に引用するシス作用配列に関して開示するベクタープラスミドは、他のレンチウイルスヌクレオチド配列を欠く。

【０１２４】
本発明のレンチウイルスベクターは非複製型であり、即ち、ベクター及びレンチウイルスベクターゲノムは感染宿主細胞から出芽する新たな粒子を形成できない。これは、上のパラグラフにおいて示す通り、ｇａｇ、ｐｏｌ又はｅｎｖ遺伝子のレンチウイルスゲノムの非存在により達成でき；これは、また、他のウイルスコード配列及び／又は粒子形成に必要なシス作用遺伝子エレメントを欠失させることにより達成できる。レンチウイルスベクターの複製の非存在は、レンチウイルスゲノムの複製とは区別すべきである。実際に、先に記載した通り、レンチウイルスゲノムは、必ずしもベクター（又は粒子）の複製を確保せず、レンチウイルスベクターゲノムの複製を確保する複製の起点を含みうる。

【０１２５】
さらなる実施態様において、特に少なくとも１つの抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがレンチウイルスに由来する場合、レンチウイルスベクターゲノムは完全なレンチウイルスのｇａｇ、ｐｏｌ又はｅｎｖコードポリヌクレオチドを含まず、レンチウイルスベクターゲノムがレンチウイルスのｇａｇ、ｐｏｌ又はｅｎｖ遺伝子よりも短いポリヌクレオチドを含むことを意味する。従って、ｇａｇコード配列はＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２について１５００bpより短く；ｐｏｌコード配列はＨＩＶ－１については３０００bp、そしてＨＩＶ－２については３３００bpより短く；ｅｎｖコード配列はＨＩＶ－１については２７００bp、そしてＨＩＶ－２について２５００bpより短い。このサイズは、天然レンチウイルスゲノムにおいて見出される最長の連続ヌクレオチド配列を指す。しかし、別の実施態様において、レンチウイルスゲノムは全ての内因性コードレンチウイルス配列を欠く。

【０１２６】
本発明のレンチウイルスベクターを得るために、ベクターゲノムを（ベクタープラスミドとして）粒子又は疑似粒子中にキャプシド形成する必要がある。従って、レンチウイルスタンパク質は、エンベロープタンパク質を除き、ベクターゲノムと一緒に、産生システム中、特に産生細胞中のベクターゲノムにトランスで提供しなければならず、ｇａｇ及びｐｏｌレンチウイルス遺伝子又は組込み能のないｐｏｌ遺伝子を保有する少なくとも１つのキャプシド形成プラスミドを頼りにして、そして好ましくは、Ｖｉｆ、Ｖｐｒ、Ｖｐｕ、及びＮｅｆアクセサリー遺伝子のための（ＨＩＶ－１レンチウイルスベクターのための）コード配列を欠く。

【０１２７】
さらなるプラスミドを使用し、それは各レンチウイルスベクターをシュードタイピングするために選択されるエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する。

【０１２８】
好ましい実施態様において、パッケージングプラスミドは、ウイルス粒子合成に必須のレンチウイルスタンパク質だけをコードする。プラスミド中でのその存在によって安全性の懸念を生じうるアクセサリー遺伝子は、従って除去される。トランスで持ち込んだウイルスタンパク質は、それぞれＨＩＶ－１について例示する通りである：
１．マトリクス（ＭＡ、見掛け上の分子量ｐ１７）、キャプシド（ＣＡ、ｐ２４）、及びヌクレオキャプシド（ＮＣ、ｐ６）の構築のためのｇａｇタンパク質。
２．ｐｏｌコード酵素：インテグラーゼ、プロテアーゼ、及び逆転写酵素。
３．Ｔａｔ及びＲｅｖコード調節タンパク質、ＴａｔはＬＴＲ媒介性転写の開始に必要であり；５’ＬＴＲのＵ３領域がｔａｔ非依存性転写を促進するプロモーターについて置換される場合、なくてよい。
ウイルス粒子中のパッケージングプラスミドに含まれる遺伝子から生成されるｍＲＮＡの任意のパッケージングを回避するために、Ψ領域をパッケージングプラスミドから除去する。異種プロモーターをプラスミド中に挿入して組換えの問題を回避し、そして、ポリＡ末端を、タンパク質をコードする配列から３’に付加する。
【０１２９】
エンベローププラスミドは、内部プロモーターの制御下で、本明細書において開示するシュードタイピングのためのエンベロープタンパク質をコードする。
【０１３０】
本発明のレンチウイルスベクター粒子の調製のための任意の又は全ての記載されるプラスミドを、タンパク質をコードするセグメントにおいてコドン最適化（ＣＯ）してよい。本発明のコドン最適化は、好ましくは、プラスミド中、哺乳動物細胞中、特にヒト細胞中に含まれるコード配列の翻訳を改善するために実施する。本発明によると、コドン最適化は、ベクター粒子の調製を直接的又は間接的に改善するためか、又はそれらが投与される宿主の細胞によるそれらの取り込みを改善するためか、又は宿主の形質導入細胞のゲノム中の目的のポリヌクレオチド（トランスジーン）の導入効率を改善するために特に適している。コドンを最適化するための方法は、当技術分野において周知であり、コドン最適化は利用可能なプログラムをその効果に使用することで特に実施する。コドン最適化は、図に例示する本発明の記載のｐＴＲＩＰプラスミド及びｐＴｈＶプラスミド中に含まれるコード配列について例示される。
【０１３１】
本発明の特定の実施態様において、シュードタイピングされたレンチウイルスベクターは、また、又は代わりに、組込み能がない。そのような場合において、ベクターゲノムひいては治療目的の異種ポリヌクレオチドは、形質導入された細胞の、又はそれが投与された宿主の細胞中のゲノムには組込まれない。
【０１３２】
本発明はレンチウイルスベクターの使用に関し、ここで、発現されたインテグラーゼタンパク質は欠損しており、少なくとも１つの抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、それを必要とする宿主において、少なくとも１つのポリペプチドに対する免疫応答を誘発するために適した免疫原性組成物を産生する。ポリヌクレオチドは本明細書において開示する特性を有するものである。
【０１３３】
ポリヌクレオチド（又はレンチウイルスベクターゲノム）は、少なくとも１つの抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの核内輸送及び正確な発現のために必要な全てのエレメントを含む。本発明のレンチウイルスベクターのレンチウイルスゲノム中に挿入できるエレメントの例は、ＬＴＲ５’及びＬＴＲ３’などの少なくとも１つの（好ましくは２つの）末端反復配列（ＬＴＲ）、レンチウイルスゲノムのキャプシド形成に関与するｐｓｉ配列、及び任意にｃＰＰＴ及びＣＴＳドメインを含む少なくとも１つのＤＮＡ　Ｆｌａｐである。レンチウイルスベクターゲノムは、また、スプライスドナー部位（ＳＤ）、スプライスアクセプター部位（ＳＡ）、及び／又はＲｅｖ応答性エレメント（ＲＲＥ

）から選択されるエレメントを含んでよい。
【０１３４】
特定の実施態様において、レンチウイルスベクターを、本明細書において記載の通りに、ＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングする。
【０１３５】
「欠損している」により、好ましくはレンチウイルス由来のインテグラーゼが宿主細胞のゲノム中へのレンチウイルスゲノムの組込み能力を欠いている、即ち、そのインテグラーゼ活性を特異的に変化させるように突然変異させたインテグラーゼタンパク質を意味する。
【０１３６】
組込み能のないレンチウイルスベクターは、インテグラーゼをコードするｐｏｌ遺伝子を改変することにより得られ、組込み欠損インテグラーゼをコードする突然変異ｐｏｌ遺伝子をもたらし、改変ｐｏｌ遺伝子はキャプシド形成プラスミド中に含まれる。そのような組込み能のないレンチウイルスベクターは、特許出願ＷＯ　２００６／０１０８３４に記載されている。従って、タンパク質のインテグラーゼ能力を変化させても、ＧＡＧ、ＰＲＯ及びＰＯＬタンパク質のキャプシド形成プラスミドからの正確な発現及び／又はキャプシドひいてはベクター粒子の形成、ならびに、逆転写、核内輸送などの組込み工程に先行する、又は、それに続く、ウイルスサイクルの他の工程は、無傷のままである。インテグラーゼは、それが可能にするはずである組込みが、対応する野生型インテグラーゼを含むレンチウイルスベクターと比較して、組込み工程が１０００にわたり１未満で、好ましくは１００００にわたり１未満で起こる様な方法で変化する場合、欠損型である。
【０１３７】
本発明の特定の実施態様において、欠損インテグラーゼは、クラス１の突然変異、好ましくは欠損インテグラーゼの発現の必要条件を満たすアミノ酸の置換（１アミノ酸置換）又は短い欠失に起因する。突然変異はｐｏｌ遺伝子内で行う。これらのベクターは、酵素の触媒ドメイン中に突然変異Ｄ６４Ｖを伴う欠損インテグラーゼを保有してよく、それによって組込み工程のＤＮＡ切断及び連結反応が特異的に遮断される。Ｄ６４Ｖ突然変異は、シュードタイピングされたＨＩＶ－１の組込みを野生型の１／１０，０００まで減少させるが、しかし、非分裂細胞に形質導入するそれらの能力は維持され、効率的なトランスジーン発現を可能にする。
【０１３８】
ＨＩＶ－１のインテグラーゼのインテグラーゼ能力に影響を及ぼすために適しているｐｏｌ遺伝子における他の突然変異は以下：Ｈ１２Ｎ、Ｈ１２Ｃ、Ｈ１６Ｃ、Ｈ１６Ｖ、Ｓ８１　Ｒ、Ｄ４１Ａ、Ｋ４２Ａ、Ｈ５１Ａ、Ｑ５３Ｃ、Ｄ５５Ｖ、Ｄ６４Ｅ、Ｄ６４Ｖ、Ｅ６９Ａ、Ｋ７１Ａ、Ｅ８５Ａ、Ｅ８７Ａ、Ｄ１１６Ｎ、Ｄ１１６Ｉ、Ｄ１１６Ａ、Ｎ１２０Ｇ、Ｎ１２０Ｉ、Ｎ１２０Ｅ、Ｅ１５２Ｇ、Ｅ１５２Ａ、Ｄ－３５－Ｅ、Ｋ１５６Ｅ、Ｋ１５６Ａ、Ｅ１５７Ａ、Ｋ１５９Ｅ、Ｋ１５９Ａ、Ｋ１６０Ａ、Ｒ１６６Ａ、Ｄ１６７Ａ、Ｅ１７０Ａ、Ｈ１７１Ａ、Ｋ１７３Ａ、Ｋ１８６Ｑ、Ｋ１８６Ｔ、Ｋ１８８Ｔ、Ｅ１９８Ａ、Ｒ１９９Ｃ、Ｒ１９９Ｔ、Ｒ１９９Ａ、Ｄ２０２Ａ、Ｋ２１１Ａ、Ｑ２１４Ｌ、Ｑ２１６Ｌ、Ｑ２２１　Ｌ、Ｗ２３５Ｆ、Ｗ２３５Ｅ、Ｋ２３６Ｓ、Ｋ２３６Ａ、Ｋ２４６Ａ、Ｇ２４７Ｗ、Ｄ２５３Ａ、Ｒ２６２Ａ、Ｒ２６３Ａ、及びＫ２６４Ｈである。
【０１３９】
特定の実施態様において、ｐｏｌ遺伝子における突然変異は、以下の位置Ｄ６４、Ｄ１１６又はＥ１５２のいずれか、又はタンパク質の触媒部位中にあるこれらの位置のいくつかで実施する。上に記載するものを含む、これらの位置での任意の置換が適している。
【０１４０】
別の提案する置換は、アミノ酸残基ＲＲＫ（位置２６２～２６４）のアミノ酸残基ＡＡＨによる置換である。
【０１４１】
本発明の特定の実施態様において、レンチウイルスベクターに組込み能がない場合、レ

ンチウイルスゲノムは複製起点（ｏｒｉ）をさらに含み、その配列は、レンチウイルスゲノムを発現させるべき細胞の性質に依存する。複製起点は真核生物由来、好ましくは哺乳動物由来、最も好ましくはヒト由来でよい。それは、代わりにウイルス由来、特にＳＶ４０又はＲＰＳなどのＤＮＡ円形エピソームウイルス（ＤＮＡ　ｃｉｒｃｕｌａｒ　ｅｐｉｓｏｍｉｃ　ｖｉｒｕｓ）由来でありうる。本発明のレンチウイルスベクターのレンチウイルスゲノム中に挿入される複製起点を有することは、本発明の有利な実施態様である。実際に、レンチウイルスゲノムは細胞宿主ゲノム中に組込まれないため（欠損インテグラーゼのため）、レンチウイルスゲノムは頻回の細胞分裂を経た細胞において失われ；これは、特に、Ｂ又はＴ細胞などの免疫細胞に当てはまる。複製起点の存在によって、少なくとも１つのレンチウイルスゲノムが、細胞分裂後でさえ、各細胞中に存在することが確保され、免疫応答の効率が最大になる。

【０１４２】

本発明の特定の実施態様において、レンチウイルスベクターゲノムはＨＩＶベースのゲノムであり、図２又は２３～２５に表わす配列特性を有し、ここで目的配列は、その治療目的について選択し、その発現を可能にする内部プロモーター（ＣＭＶプロモーターにより図中に表わされる）は、ヒトにおける投与に適するように選択すると有利である。

【０１４３】

ベクターゲノムのトランスジーン中又は発現カセット中に含まれる内部プロモーターは、以下の遺伝子のプロモーターより選択してよい：ＥＦ１α、ヒトＰＧＫ、ＰＰＩ（プレプロインシュリン）、チオデキストリン（ｔｈｉｏｄｅｘｔｒｉｎ）、ＨＬＡ　ＤＲ不変鎖（Ｐ３３）、ＨＬＡ　ＤＲアルファ鎖、フェリチンＬ鎖又はフェリチンＨ鎖、ベータ２ミクログロブリン、キモシンベータ４、キモシンベータ１０、又はシスタチンリボソームタンパク質Ｌ４１。

【０１４４】

本発明のレンチウイルスベクターのレンチウイルスベクターゲノムは、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、１９９９年１０月１１日に番号Ｉ－２３３０で寄託されたＨＩＶ－１プラスミドｐＴＲＩＰΔＵ３．ＣＭＶ－ＧＦＰに由来しうる。プラスミドに含まれる種々の配列の構造及び制限酵素部位を図２Ｄに示す。ｐＴＲＩＰΔＵ３．ＣＭＶ－ＧＦＰの配列を図６に提供する。

【０１４５】

本発明の特定の実施態様において、レンチウイルスベクターゲノムは、ＣＮＣＭに、１９９９年１０月１１日に番号Ｉ－２３２８で寄託されたＨＩＶ－１プラスミドｐＴＲＩＰ［ｄｅｌｔａ］Ｕ３ＥＦ１［ａｌｐｈａ］－ＧＦＰに由来しうる。プラスミドの構成配列の記載を、種々の配列の制限酵素部位と共に、図２Ｅに描写する。

【０１４６】

ベクターゲノムがこれらの特定のプラスミドに由来する場合、本出願において開示する異種ポリヌクレオチドの配列を、ＧＦＰコードフラグメントに加えて、又は、それと置き換えて、その中に挿入する。ＧＦＰコード配列は、また、異なるマーカーにより置換してよい。ＣＭＶプロモーターは、また、別のプロモーター、特に上に開示するプロモーターの１つ、特にトランスジーンの発現に関連する、プロモーターにより置換してよい。

【０１４７】

本発明を行うために適した他のレンチウイルスベクターゲノムは、後に列挙する寄託された材料中に含まれるものであり、又は、特に目的の異なるポリヌクレオチド及び／又は異なる内部プロモーターのいずれかについてトランスジーンを置換することにより、これらの寄託されたプラスミドに由来する。同じく特定の寄託されたｐＴＲＩＰベクター中に含まれるＷＰＲＥ配列も欠失させてよい。

【０１４８】

本発明は、このように、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、２００７年１０月１０日に番号Ｉ－３８４１で寄託されたプラスミドｐＴＲＩＰＤｅｌｔａＵ３－ＣＭＶ－ＳＩＶ－ＧＡＧｃｏ－ＷＰＲＥにより提供されるレンチウイルスベクターゲノムに関する。プラスミ

ドの組成を図中に開示し、その配列を提供する。このプラスミドは、非ミリスチル化（ｎｏｎ－ｍｙｒｉｓｔｉｌａｔｅｄ）タンパク質としてＳＩＶのＧＡＧタンパク質を発現する。トランスジーンのＯＲＦは、ヒト細胞中での発現のためにコドン最適化している。

【０１４９】

本発明は、また、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、２００７年１０月１０日に番号Ｉ－３８４０で寄託されたプラスミドｐＴＲＩＰＤｅｌｔａ　Ｕ３－ＣＭＶ－ＳＩＶ－ＧＡＧ－ＷＰＲＥにより提供されるレンチウイルスベクターゲノムに関する。プラスミドの組成を図中に開示し、その配列を提供する。このプラスミドは、非ミリスチル化（ｎｏｎ－ｍｙｒｉｓｔｉｌａｔｅｄ）タンパク質としてＳＩＶのＧＡＧタンパク質を発現する。トランスジーンのＯＲＦは、コドン最適化していない。

【０１５０】

ベクター粒子は、プラスミドによる、２９３　Ｔ細胞などの適切な細胞のトランスフェクション後、又は他のプロセスにより産生できる。レンチウイルス粒子の発現のために使用する細胞において、プラスミドの全て又は一部を使用して、それらのコードポリヌクレオチドを安定的に発現でき、又は、それらのコードポリヌクレオチドを一過性に、もしくは、半安定的に発現できる。

【０１５１】

産生された粒子の濃度は、細胞上清のＰ２４含量（ＨＩＶ－１でのキャプシドタンパク質）を測定することにより決定できる。

【０１５２】

本発明のレンチウイルスベクターは、ひとたび宿主に投与されると、それがシュードタイピングされたエンベロープタンパク質に応じて、宿主の細胞、恐らくは特定の細胞に感染する。この感染は、レトロ転写が起こる宿主細胞の細胞質へのレンチウイルスゲノムの放出をもたらす。ひとたび三本鎖の形態になると（ＤＮＡ　Ｆｌａｐを経て）、レンチウイルスゲノムは核内に輸送され、そこで目的のポリヌクレオチドが細胞機構を経て発現する。非分裂細胞（ＤＣなど）に形質導入される場合、発現は安定的になりうる。Ｂ細胞などの分裂細胞に形質導入される場合、発現は、核酸希釈及び細胞分裂のため、レンチウイルスゲノム中の複製起点の非存在下で一時的である。発現は、細胞分裂後にレンチウイルスゲノムの娘細胞への適切な拡散を確保する複製起点を提供することにより長くなりうる。安定性及び／又は発現は、また、ＭＡＲ（マトリクス関連領域（Ｍａｔｒｉｘ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　Ｒｅｇｉｏｎ））又はＳＡＲ（足場関連領域（Ｓｃａｆｆｏｌｄ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　Ｒｅｇｉｏｎ））エレメントの挿入により増加できる。

【０１５３】

実際に、これらのＳＡＲ又はＭＡＲ領域はＡＴリッチ配列であり、細胞染色体のマトリクスへのレンチウイルスゲノムの固定が可能になり、こうして少なくとも１つの抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの転写を調節し、及び特にトランスジーンの遺伝子発現を刺激し、そしてクロマチンへの接近性を改善する。

【０１５４】

レンチウイルスゲノムが非組込みである場合、それは宿主細胞ゲノム中に組込まれない。それにもかかわらず、トランスジーンによりコードされる少なくとも１つのポリペプチドは十分に発現され、プロセシングされるために十分に長く、ＭＨＣ分子に結合し、最終的に細胞表面に向かう。目的のポリヌクレオチドの性質に応じて、ＭＨＣ分子と結合した少なくとも１つのポリペプチドエピトープは、液性又は細胞性免疫応答の引き金となる。組込み能のないレンチウイルスベクターの調製が、本明細書において開示されている：ベクターゲノムをトランス補完（ｔｒａｎｓｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ）するために使用するキャプシド形成プラスミドを、インテグラーゼタンパク質の領域において突然変異させ、レンチウイルスベクターを患者に投与した後に、ベクターが細胞宿主中のシュードタイピングされた粒子として産生される場合に、インテグラーゼがレンチウイルスベクターにおいて発現されない、又は、機能的に発現されないようになる。

【０１５５】

「免疫原性組成物」という表現は、活性成分として本発明の少なくともレンチウイルスベクターを含む組成物を指し、組成物が宿主中への投与に適している。この組成物は、全身又は局所投与のために使用される場合、さらなる薬学的に適した賦形剤あるいは担体及び／又は媒体を含んでよい。「薬学的に許容可能な担体」は、非毒性固体、半固体又は液体充てん剤、希釈剤、封入材料、又は任意の従来型の補助製剤を指す。「薬学的に許容可能な担体」は、用いる用量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、製剤の他の成分と適合する；適した担体として、限定はされないが、リン酸緩衝生理食塩水、蒸留水、油／水乳剤などの乳剤、種々の型の湿潤剤、滅菌溶液など、デキストロース、グリセロール、生理食塩水、エタノール、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【０１５６】

本発明の免疫原性組成物は、宿主細胞のゲノム中へのトランスジーンの組込みの非存在にもかかわらず、免疫応答、即ち、少なくとも１つのポリペプチド（トランスジーンによりコードされる）に対する宿主の免疫システムによる任意の反応を誘発する能力を有する。

【０１５７】

免疫応答は液性応答でありうる。即ち、組成物により誘発される抗体が、レンチウイルスベクターの少なくとも１つのポリペプチドに対して産生される。特定の実施態様において、液性応答は防御液性応答である。防御液性応答は、ＩｇＧなど、それらの抗原に高親和性を有する成熟抗体を主にもたらす。特定の局面において、防御液性応答はＴ細胞依存性である。特定の実施態様において、防御液性応答は中和抗体の産生を誘導する。

【０１５８】

免疫応答は、細胞性免疫応答（Ｔ細胞免疫応答）、特にＣＤ８媒介性細胞性免疫応答又はＣＤ４媒介性細胞性免疫応答、即ち、ＣＤ８又はＣＤ４レセプターを持つ活性化細胞、好ましくは細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）により媒介される免疫応答でありうる。

【０１５９】

本発明の特定の実施態様において、本発明のレンチウイルスベクターは、欠損インテグラーゼにもかかわらず、初期免疫応答を誘発できる。「初期免疫応答」という表現は、組成物の投与後の約１週間以内に与えられる防御免疫応答（少なくとも１つのポリペプチドを持つ病原体又は腫瘍細胞に対する防御）を指す。

【０１６０】

別の実施態様において、本発明の組成物により与えられる免疫応答は、持続性免疫応答であり、即ち、免疫応答が組成物の投与後から少なくとも２ヶ月間、好ましくは３ヶ月間、最も好ましくは少なくとも６ヶ月間依然として検出できる。免疫応答が液性である場合、持続性応答は、特定の抗体の検出により、ＥＬＩＳＡ、免疫蛍光（ＩＦＡ）、フォーカス低下（ｆｏｃｕｓ　ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ）中和テスト（ＦＲＮＴ）、免疫沈降、又はウエスタンブロッティングなどの任意の適した方法により示すことができる。

【０１６１】

別の実施態様において、上記とは無関係に、本発明の組成物により与えられる免疫応答の強度は、レンチウイルスベクターの注射用量に依存的であり；用量が高くなるほど、免疫応答の強度は高くなる。

【０１６２】

興味深いことに、免疫応答（液性又は細胞性のいずれも）、初期免疫応答及び／持続性免疫応答が、本発明の組成物の単回投与後に、非組込み遺伝子導入ベクターにより誘発される。

【０１６３】

医薬品処置プロトコールのデザインにおけるレンチウイルスベクター粒子及び特に化合物のキットの使用を目的として、本発明のレンチウイルスベクターは、それらのベクターゲノム中に、治療目的を有する異種ポリヌクレオチド（又はトランスジーン）を保有する。「異種ポリヌクレオチド」という表現により、それは、レンチウイルスゲノムに由来し、ベクター活性のために必要又は有用であるベクターゲノム中のシス作用配列とは無関係

に、ベクター活性に必要ではない、又は、有用ではないが、しかし、生物学的効果、特に、宿主、特にヒト宿主において発現させた場合に医薬効果を得るために適している少なくとも１つのポリヌクレオチドを含むことを意味する。好ましい実施態様において、目的のポリヌクレオチドはポリペプチドをコードし、好ましくは発現カセットに含まれる。

【０１６４】

本発明の異種ポリヌクレオチドは、宿主において免疫応答を誘発するために適した１つのポリペプチド又は複数のポリペプチドをコードし、免疫応答は細胞性免疫応答及び恐らくは液性免疫応答である。コードされるポリペプチド（即ち、抗原）は、１つもしくは複数のエピトープを含む、又は、抗原のエピトープにある。特定の実施態様において、それはポリエピトープでよい。それ（それら）は、宿主のＡＰＣ、特にＤＣによる提示のために宿主の細胞においてプロセシングされて、免疫応答を生じうる、又は、それ（それら）は免疫応答を直接的に誘発しうる。従って、目的のポリヌクレオチドは、１つ又は複数の抗原のＢエピトープ及び／又はＴエピトープの配列を含む、又は、それからなり、両方のカテゴリーのエピトープの結合を含み、恐らくはキメラ（非自然）ポリペプチドを生じる。

【０１６５】

エピトープは、特定の三次元抗原立体構造（立体構造エピトープ）に依存しうる、又は、単純な一次配列領域（直線状エピトープ）に対応しうる。ポリペプチドのサイズは、少なくとも９アミノ酸～５００アミノ酸までの範囲であり、好ましくは２００アミノ酸未満である。

【０１６６】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、ウイルス、特にレトロウイルス、レンチウイルス、フラビウイルスもしくはコロナウイルス、細菌もしくは寄生虫などの病原性生物、又は、病原性物質もしくは化合物のエピトープ（Ｂ及び／又はＴエピトープ）を含む、１つの抗原もしくは複数の抗原又はそのフラグメントをコードする。それは、レンチウイルスベクターが投与された際に、それが病原性生物の発現を可能にしない範囲内で、病原性生物の抗原又は組換え抗原をコードしうる。

【０１６７】

異種ポリヌクレオチドは、特に、宿主細胞のゲノムにおけるポリヌクレオチドの導入後、宿主の細胞において内因性抗原として発現され、ＭＨＣ分子との結合での提示のために細胞中でプロセシングされうる。

【０１６８】

目的のポリヌクレオチドは、恐らくはＡＰＣによる提示後にベクターにより誘発される免疫応答が、特に、Ｔヘルパー又はＣＴＬ細胞（細胞傷害性）を含む、Ｔリンパ球応答の誘発を包含しうるように選んでよい。宿主における、ポリヌクレオチドのプロセシングされた発現産物に対するＣＤ８＋Ｔ細胞応答が、特に目的である。

【０１６９】

ＣＤ４＋Ｔ細胞応答も発現（誘導又は誘発）されうる。

【０１７０】

本発明のレンチウイルスベクター（組込み又は非組込みバージョンのいずれも）により標的とされる特定の細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）、従来型ＤＣ（ｃＤＣ）又は形質細胞様（ｐＤＣ）を含む樹状細胞（ＤＣ）、ＣＤ４＋又はＣＤ８＋を含むＴ細胞、Ｂ細胞、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、内皮細胞及び上皮細胞など、免疫応答に関与する細胞である。興味深いことに、Ｂ細胞は、循環中の成熟ＤＣと相互作用することが最近示されており、こうしてこれらのＢ細胞を活性化し、次に未感作Ｔ細胞に抗原を効率的に提示する（成熟ＡＰＣ集団の増幅）；従って、これは、細胞性免疫応答に関与する細胞、特に未感作ＣＤ８＋　Ｔ細胞をプライミングする際のＢ細胞の決定的な役割を指摘する（Diaz de Durana; 2006）。

【０１７１】

目的のポリヌクレオチドは、本発明のレンチウイルスベクターも、又は、その代わりに

使用して、宿主における、ポリヌクレオチドの発現産物に対する液性免疫応答、特に中和液性免疫応答を誘発しうるように選んでよい。

【０１７２】

本発明の特定の実施態様において、ここでレンチウイルスベクター粒子は、非レンチウイルス感染の予防又は処置を意図しており、生物学的又は治療的な目的を有する異種ポリヌクレオチドは、ベクターゲノムを構成するポリヌクレオチドとは異なる由来である。特に、それは、ベクターゲノムの配列を提供するレンチウイルスとは異なる生物に由来する。

【０１７３】

レンチウイルス感染の予防又は処置が求められる特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、特にレンチウイルスベクター粒子がＨＩＶベースのレンチウイルスベクターである場合、ベクターを提供するレンチウイルスの同じ科又は同じ血清型に由来しうる。

【０１７４】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、レンチウイルスタンパク質に由来する抗原又はその抗原フラグメント又はそのような抗原の組み合わせをコードする。そのような場合において、それに由来するレンチウイルスタンパク質抗原又はその抗原フラグメントを、天然又は複製能のあるレンチウイルス粒子の形成を阻止する条件において使用する。

【０１７５】

特定の実施態様において、それは、ＧＡＧ又はＧＡＧ－ＰＯＬ疑似粒子などのレンチウイルス疑似粒子の形成も阻止する条件において使用する。これらの抗原は、レンチウイルスベクターのデザインのために使用するものと同じレンチウイルス、特にＨＩＶ、特にＨＩＶ－１に由来しうる。

【０１７６】

従って、ポリヌクレオチドは、宿主において細胞性、特に細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答、及び恐らくはＴヘルパー応答を誘発するために適した、１つ又は複数のＨＩＶポリペプチド又はポリエピトープ、特にＨＩＶ－１ポリペプチド又はポリエピトープのコード配列でありうる。

【０１７７】

本発明の好ましい実施態様において、レンチウイルスベクターは、それらのゲノム中に、免疫不全ウイルスの、特にＨＩＶ、ＳＩＶ、又はＦＩＶからのＧＡＧ抗原又はポリタンパク質に由来する少なくとも１つの抗原を含む１つ又は複数のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドを含む。

【０１７８】

ＧＡＧポリタンパク質は、マトリクスタンパク質（ＭＡ）、キャプシドタンパク質（ＣＡ）、及びヌクレオキャプシドタンパク質（ＮＰ）を包含する。それは、また、ｐ７タンパク質を含んでよい。

【０１７９】

上に定義するＧＡＧ由来抗原は、そのフラグメント又はその突然変異（欠失、置換、又は付加による）バージョンを含む、これらのタンパク質の各々に由来するポリペプチドを包含する。それは、また、これらのタンパク質の各々に由来するそのようなポリペプチドの組み合わせを包含する。

【０１８０】

特定の実施態様において、免疫不全ウイルスのＧＡＧに由来する抗原は、天然ＧＡＧ抗原の、特にＧＡＧポリタンパク質もしくはマトリクスタンパク質もしくはキャプシドタンパク質もしくはヌクレオキャプシドタンパク質のアミノ酸配列を有するか、又はそのようなポリタンパク質もしくはそのようなタンパク質のフラグメントであるか、又はアミノ酸配列中の１つもしくは複数のアミノ酸残基の欠失、置換もしくは付加を含む、特に突然変異により、天然ＧＡＧ抗原に関して改変されるか、もしくは翻訳後修飾により改変される

ＧＡＧ抗原である。改変したＧＡＧ抗原は、生物学的に機能的又は生物学的に非機能的のいずれかになるように選択する。

【０１８１】

特定の実施態様において、免疫不全ウイルスのＧＡＧポリタンパク質に由来する少なくとも１つの抗原を含む１つ又は複数のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、ＳＩＶ、特にSIV_{MAC}、又はＦＩＶ、又はＨＩＶ、特にＨＩＶ－１もしくはＨＩＶ－２の生物学的に非機能的なＧＡＧポリペプチド（ＧＡＧの抗原フラグメントを含む）であり、及び、レンチウイルスベクターで形質導入された細胞内で生物学的に機能的なキャプシドタンパク質を形成できず、そして特に、ＧＡＧ疑似粒子又はＧＡＧ－ＰＯＬ疑似粒子の形成を可能にしうるこれらの細胞からのキャプシドタンパク質の分泌を誘導しないポリペプチドをコードする。

【０１８２】

特定の実施態様において、ＧＡＧに由来する抗原をコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、ＰＯＬ生物学的活性型ポリペプチド（ポリタンパク質、別名、前駆体）の発現を可能にせず、ひいてはｐｏｌ天然遺伝子又は等価の機能的遺伝子を含まない。

【０１８３】

特定の実施態様において、免疫不全ウイルスのＧＡＧ抗原に由来する少なくとも１つの抗原を含む１つ又は複数のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、また、免疫不全ウイルスのＮＥＦ、ＴＡＴもしくはＲＥＶ抗原、及び／又は任意に免疫不全ウイルスのＰＯＬ抗原、又はその組み合わせに由来するポリペプチドをコードする。これらのポリペプチドは、特に抗原の抗原フラグメントである。

【０１８４】

（ＨＩＶ－１の）ＧＡＧに由来する抗原をコードする組換えポリヌクレオチド及び融合タンパク質においてＨＩＶ－１の他の抗原をコードするさらなるヌクレオチドフラグメントの例は、図２１に例示するＧＡＧタンパク質をコードするもの、ならびに、同じく図２１に記載するＰＯＬフラグメント又は／及びＮＥＦフラグメントあるいはそのようなＰＯＬフラグメント及びＮＥＦフラグメントの融合物である。これらのフラグメントはＧＡＧ抗原の５’及び／又は３’に融合させてよく、互いに、及び／又は、ＧＡＧ抗原に近接しうる、あるいは、ピコナウイルスからの２Ａペプチドなどのペプチドにより分離されうる。そのようなコンストラクトを図に例示する。２Ａペプチドの配列は以下である：ＡＰＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ。融合タンパク質の構造の特定の組成は、以下の１つである：５’ ＧＡＧ ＰＯＬ ＮＥＦ ３’、又は５’ ＰＯＬ ＮＥＦ ＧＡＧ ３’又は５’ ＰＯＬ ＧＡＧ ＮＥＦ ３’、又は５’ ＮＥＦ ＧＡＧ ＰＯＬ ３’又は５’ ＮＥＦ ＰＯＬ ＧＡＧ ３’又は５’ ＧＡＧ ＮＥＦ ＰＯＬ ３’。

【０１８５】

好ましい実施態様において、ＧＡＧ及び／又はＮＥＦ及び／又はＰＯＬ抗原に由来する抗原は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、特にＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２に由来する。

【０１８６】

特定の実施態様において、ＧＡＧ抗原に由来するポリペプチドは、天然ＧＡＧとは対照的に、ミリスチル化されていないＧＡＧΔｍｙｒタンパク質である。

【０１８７】

非ミリスチル化ＨＩＶ－１ ＧＡＧは、コドン２のＧＡＧのコード配列を突然変異させて、Ｇｌｙ残基［ＧＧＡ］からＡｌａ残基［ＧＣＡ］に変化させることにより、又はコドン２の欠失により得てよい。

【０１８８】

本発明のための目的の抗原に由来する他のＧＡＧは、ＧＡＧのマトリクス、キャプシド、及びヌクレオキャプシドタンパク質の少なくとも１つのフラグメントで形成される抗原であり、特に、タンパク質の各々のフラグメントの融合物で形成される。

【０１８９】

コードされる由来する抗原は、ＨＩＶ－１、特にＨＩＶ－１サブタイプＢのＧＡＧ抗原又はＨＩＶ－１グループＯに由来し（図２１）、化合物の組み合わせで使用されて、異なるＨＩＶ－１サブタイプ、ＨＩＶ－１及び恐らくはＨＩＶ－２を含む種々のＨＩＶグループに対する免疫応答を誘発しうることが観察される。

【０１９０】

本発明は、また、本明細書において定義するレンチウイルスベクターに関し、そのゲノム中に、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）のＧＡＧポリタンパク質に由来する抗原をコードするか、又はＧＡＧ及び本明細書において開示するＮＥＦ、ＴＡＴ、ＲＥＶもしくはＰＯＬの少なくとも抗原フラグメントに由来する抗原を含む融合抗原をコードする、ヒトコドン最適化配列を有する組換えポリヌクレオチドを含む。

【０１９１】

本発明のキメラＨＩＶ－１由来抗原は、特定の実施態様において、ＨＩＶ－１ウイルス株のＮＥＦ、ＰＯＬ、ＴＡＴもしくはＲＥＶに由来する抗原又はそのような抗原の組み合わせを伴う、図２１の配列を有するＧＡＧ由来抗原の組み合わせを含むか、又は、それからなる融合タンパク質である。

【０１９２】

上に開示する特定の融合タンパク質は、ＰＯＬ由来抗原が図２１のアミノ酸配列を含むか、又はそれを有するものである。

【０１９３】

上に開示する特定の融合タンパク質は、ＮＥＦ由来抗原が図２１のアミノ酸配列を含むか、又はそれを有するものである。

【０１９４】

ベクターゲノムのポリヌクレオチドによりコードされる抗原、及び特にＧＡＧ由来抗原は、天然、合成又は組換え由来であり、従って、任意の従来方法により発現させてよい。

【０１９５】

本発明は、また、哺乳動物における、特にヒト細胞における発現のためのそれらのコドン最適化バージョンで含まれる、そのような融合抗原をコードするヌクレオチドコンストラクトに関する。

【０１９６】

特定の実施態様によると、組換えポリヌクレオチドは、ＨＩＶ－１コンセンサスＢ株のＧＡＧポリタンパク質に由来する抗原をコードする。

【０１９７】

別の特定の実施態様において、組換えポリヌクレオチドは、ＧＡＧポリタンパク質に由来する抗原及びＨＩＶのＮＥＦ抗原のエピトープのクラスター及び任意にＨＩＶのＰＯＬポリタンパク質のエピトープのクラスターをコードする。

【０１９８】

本発明は、本明細書において開示する抗原をコードする核酸分子に関する。それは、特に、ＣＮＣＭに寄託されたプラスミド、及び特にＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＴＲＩＰＤｅｌｔａ　Ｕ３－ＣＭＶ－ＳＩＶ－ＧＡＧ－ＷＰＲＥもしくはｐＴＲＩＰＤｅｌｔａ　Ｕ３－ＣＭＶ－ＳＩＶ－ＧＡＧ　ｃｏ－ＷＰＲＥ、又は、ＣＮＣＭに寄託されたプラスミドｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＩＮＤ－ｃｏ）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＮＪ－ｃｏ）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＣＯＣＡＬ－ｃｏ）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＩＳＦＡ－ｃｏ）もしくはｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＳＶＣＶ－ｃｏ）中に挿入されている核酸分子、又はストリンジェントな条件においてこれらの核酸分子とハイブリダイズし、特に同じ長さを有するか、又はより短い配列に関する。特定の核酸は、少なくともＧＡＧ抗原又はそのフラグメントをコードし、及び特にＨＩＶ－１もしくはＨＩＶ－２　ＧＡＧ抗原又はそのフラグメントをコードする。

【０１９９】

細胞応答の特異性は、ＨＩＶの抗原又はそれに由来する抗原をコードする異種ポリヌクレオチドを発現するレンチウイルスベクターで得られる応答を、抗原を発現しない粒子で

得られる応答と比較する際に測定される。ＨＩＶ抗原又はＨＩＶ由来抗原を発現できる粒子の投与によって、抗原を発現しない粒子で誘発されないＴ細胞免疫応答が誘発されることが観察される。

【０２００】

これは、実施例において、ＳＩＶ由来抗原を発現する粒子で例示する。

【０２０１】

応答は有利なことに防御的であり、それによってウイルス負荷の減少を達成し、免疫不全ウイルスに感染した宿主の血漿中で測定されるウイルス負荷を制御することが可能になることを意味しており、宿主は、少なくともプライミング、及び、免疫不全ウイルス、特にヒト宿主におけるＨＩＶによる、又は、非ヒト霊長類宿主におけるＳＩＶＭＡＣによる感染に対する予防的又は治療的な使用のための化合物の組み合わせの化合物の１回又は複数回のブースト投与を受けている。

【０２０２】

換言すると、免疫不全ウイルス、特にＨＩＶによる感染の予防的又は治療的な処置のために使用される場合、投与した化合物の組み合わせによって、身体からのウイルスの除去、又はウイルス負荷の制御が、長時間にわたり持続的に可能になり（６ヶ月間を超える）、好ましくはインビボでＡＩＤＳ疾患に対する防御を可能にする。本発明者らは、特に、免疫不全ウイルスに感染した宿主に投与された場合、本発明の化合物の組み合わせによって、感染の急性期に中央記憶ＣＤ４＋　Ｔ細胞応答の保存が可能になり、それは、レトロウイルスの病原性、即ち、ヒト宿主におけるＡＩＤＳの発生に対する防御との貴重な相関関係であることを示している（Letvin, N.L., et al, 2006）。

【０２０３】

ヒト宿主において防御的で特異的な細胞性免疫応答を誘発するためのツールを提供するための化合物の組み合わせの能力は、ヒト／ＨＩＶ－１状況において観察されるものと本質的に似た条件におけるマカク／ＳＩＶｍａｃ非ヒト霊長類モデルにおいて得られている実験結果に由来する。

【０２０４】

従って、本発明は、哺乳動物宿主への連続投与のための医薬産物の調製のための化合物の組み合わせの使用に関し、免疫不全ウイルス、特にＨＩＶに対する防御的で特異的な細胞性免疫応答を誘発する。

【０２０５】

特定のレンチウイルスベクターが本発明に従ってデザインされており、ウイルスチャレンジとの関連で防御的であることが示される特異的な細胞性免疫応答を誘発する。明白な理由のために、この実証はヒトにおいて未だに行われていないが、非ヒト霊長類での開示した結果は、ヒトにおける類似の予測を大いに支持する。

【０２０６】

得られた特定のレンチウイルスベクターは、ＡＩＤＳに対する治療用ワクチン接種のため、又は、予防的ワクチン接種のための特定の興味深い候補を提供する。

【０２０７】

本発明の特定の局面において、病原性生物に由来するＢエピトープ及び／又はＴエピトープをコードするポリヌクレオチドは、ウエスト・ナイル・ウイルス（ＷＮＶ）のエンベロープＥ糖タンパク質（E_{WNV}）、又は、黄熱病ウイルスもしくはデングウイルス（ＤＶ）、日本脳炎ウイルス（ＪＥＶ）もしくはＳＡＲＳ関連コロナウイルスのエンベロープをコードするポリヌクレオチドである。他の興味深いウイルスポリペプチドは、ＨＩＶのキャプシドからである。

【０２０８】

特定の実施態様において、少なくとも１つのポリペプチドが、レンチウイルス由来のポリヌクレオチドにより（例えば、上に開示するｇａｇもしくはｐｏｌ、又は例えばｅｎｖから）コードされる。特定の実施態様において、コードポリヌクレオチドは、完全なｇａｇもしくはｐｏｌ遺伝子ではなく、又は、完全なｅｎｖ遺伝子ではなく、あるいは、これ

らの遺伝子の機能的バージョン、即ち、機能的タンパク質をコードする遺伝子ではない。例えば、それらは３０～１０００まで、好ましくは３０～５００bpまで、好ましくは３０～３００bpまで、より好ましくは３０～１００bpまでの範囲のサイズ、もしくはその可溶型を有し、又はそのエピトープをコードする。ＷＮＶの可溶性Ｅ糖タンパク質（sE_{WNV}）のコード配列の挿入は、Reimann et al.（J. Virol.; 2005）における開示に従って、Hel et al.（J. immunol.; 2006）において記載されるsE_{WNV}を使用して達成してよい。

【０２０９】

本発明の別の特定の局面によると、異種ポリヌクレオチドは、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）又はそのフラグメントであるポリペプチドをコードする。

【０２１０】

ＴＡＡの非限定的な公知の例は特に以下：

－　β－カテニン、ＭＡＲＴ－２などのメラノーマにおいて、又はｂｒｃ－ａｂｌなどの白血病において見出される突然変異型ペプチド、

－　メラノーマにおいて見出されるｇｐ１００、ＭＡＲＴ－１、チロシナーゼ、又は前立腺癌において見出されるＰＳＡ、ＰＡＰ、ＰＳＭ、ＰＳＭＡなどの組織特異的タンパク質、

－　ＭＡＧＥなどの癌－精巣抗原、

－　種々の癌において見出される、Ｓｕｒｖｉｖｉｎ、ｈＴＥＲＴなどの腫瘍形成に関連する分子、

－　乳房、卵巣、又は前立腺の癌において見出されるＭＵＣ－１などのムチン、

－　ＨＰＶ１６－Ｅ７抗原（子宮頸癌における発現が見出される）を含む、ＨＰＶ（ヒト・パピローマ・ウイルス）、特にＨＰＶ１６又はＨＰＶ１８、ＥＢＶ－ＥＢＭＡタンパク質を含むリンパ腫を起こすＥＢＶ（エプスタイン・バー・ウイルス）（リンパ球において）、ＨＢＶ（Ｂ型肝炎ウイルス）、ＨＣＶ（Ｃ型肝炎ウイルス）、ＨＨＶ８などのＨＨＶ（ヒトヘルペスウイルス）、又はＨＴＬＶ－１　ｔａｘタンパク質（急性Ｔ白血病において）など、ＨＴＬＶ－１などのＨＴＬＶ（ヒトＴリンパ球ウイルス）のものを含む、腫瘍細胞において正常細胞を形質転換するウイルス（腫瘍ウイルス）のウイルスタンパク質である。

【０２１１】

より一般的に、これらのポリヌクレオチドは、癌免疫と表題の付いたペプチドデータベースにおいて開示されるペプチド配列に由来してよい。ポリヌクレオチドは、特に、共有される腫瘍特異的抗原、分化抗原、腫瘍において過剰発現される抗原、又は突然変異に起因する腫瘍抗原から選択してよい。これらのポリペプチド（又はその部分）は、野生型又は突然変異型のいずれかの細胞に由来してよい（自己ペプチド）。

【０２１２】

特定の実施態様において、目的のポリヌクレオチドはヒト抗原をコードする。

【０２１３】

本発明の別の実施態様において、目的のポリヌクレオチドは、発現又は機能的発現が、検討する病理に罹患した宿主において害されるポリペプチドをコードしうる。特定の実施態様において、本発明のレンチウイルスベクターを使用して、ポリヌクレオチドを宿主の標的細胞に送達し、遺伝子治療、例えば、血清タンパク質の欠乏を招く遺伝子疾患の医薬処置における遺伝子補正、又は癌もしくは感染性、ウイルス性もしくは自己免疫性の疾患に対する遺伝子ワクチン接種戦略を求める。別の実施態様において、糖尿病などの他の病理を、本発明の化合物のキットで処置してよい。

【０２１４】

最後に、少なくとも１つのポリペプチドは、人工（非天然）ポリペプチド、好ましくはマルチエピトープポリペプチドでよい。このマルチエピトープポリペプチドは、ウイルスを含む病原性生物に由来する、及び／又は腫瘍由来の少なくとも２つのエピトープをコードする。特定の実施態様において、少なくとも２つのエピトープは、同じウイルス又は同

じ腫瘍細胞に由来し；その場合において、少なくとも２つのエピトープは、それらの異なるＣＭＨ（ＨＬＡ）制限について選択してよい。別の実施態様において、少なくとも２つのエピトープは、異なるウイルス、又は異なる腫瘍細胞に由来する。エピトープは連続的に配置でき、即ち、エピトープの３’末端が第２エピトープの５’末端（など）に直接的に連結され、もっぱら連続エピトープで構成されるペプチド配列をコードするポリヌクレオチドに対応する。本発明の少なくとも２つのエピトープは、代わりに、１アミノ酸スペーサー又はペプチドスペーサーにより分離でき、即ち、異なるポリヌクレオチド単位が、１又は複数のアミノ酸をそれぞれコードする１又は複数のコドンにより分離されることを意味する。複数のエピトープのプロセシングを改善するスペーサーとして、Ｃ末端の位置におけるアルギニン（Ｒ）及び他の位置における親水性残基（Ａ、Ｋ、Ｄ及び／又はＴ）で構成される４アミノ酸ペプチドが好ましい。特に、Ｃ末端の位置に正荷電を持つ残基又は酸性残基を有する４アミノ酸ペプチドを、他の位置における親水性残基（Ａ、Ｋ、Ｄ及び／又はＴ）に依存的又は非依存的に、使用してよい。特定の実施態様において、スペーサーは、エンドソーム又はリソソームのプロセシング配列などの内部プロセシング配列であり、複数のエピトープのより良好なプロセシングを可能にし、重複切断に起因する新たなペプチドのプロセシングを回避する。スペーサーに頼るそのような分離を使用して、エピトープの全て又は部分を分離できる。

【０２１５】

異種ポリヌクレオチドを、プロモーター及び恐らくはエンハンサーを含む転写及び発現のための調節配列の制御下で、ベクターゲノム中に挿入する。特定の実施態様において、調節配列はレンチウイルス由来ではない。適したプロモーターとして、ＣＭＶ、別名ＣＭＶｉｅプロモーター、又はＥＦ１αプロモーター、ＣＧＡプロモーター、ＣＤ１１ｃプロモーター及びハウスキーピング遺伝子、例えばＰＧＫプロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、ヒストンプロモーター、アルファ－チューブリンプロモーター、ベーター－チューブリンプロモーター、スーパーオキシドジスムターゼ１（ＳＯＤ－１）プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）プロモーター、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）プロモーター、アデノシンデアミナーゼプロモーター、チミジル酸合成酵素プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素Ｐ１プロモーター、グルコース－６－リン酸脱水素酵素プロモーター、又はヌクレオリンプロモーターが包含される。他の適したプロモーターとして以下の遺伝子のプロモーターが包含される：ＥＦ１α、ヒトＰＧＫ、ＰＰＩ（プレプロインシュリン）、チオデキストリン、ＨＬＡ　ＤＲ不変鎖（Ｐ３３）、ＨＬＡ　ＤＲアルファ鎖、フェリチンＬ鎖又はフェリチンＨ鎖、ベータ２ミクログロブリン、キモシンベータ４、キモシンベータ１０、又はシスタチンリボソームタンパク質Ｌ４１。

【０２１６】

本発明の化合物のキットは、特に、医薬処置における使用に適しており、ここで、第１ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを、第２ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターとは時間内に別々に投与し、そして、適切な場合、プライミング及び第１ブーストの後に、時間内の後期に、１回又は複数回のブースト工程が続く。

【０２１７】

従って、本発明の化合物のキットは、特にプライミング－ブースト型反応において、活性成分の反復投与に特に適し、恐らくはいくつかのブースト工程を包含する。

【０２１８】

特に、キットの化合物は、第１ウイルスエンベロープタンパク質又は第２ウイルスエンベロープタンパク質のいずれかでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを、それを必要とする宿主において、免疫原性反応をプライミングのため、又は、代わりに、免疫原性反応をブーストするためにそれぞれ使用する。免疫反応は、本明細書において記載する第３のエンベロープタンパク質を有するレンチウイルスベクターを使用することにより、及び任意に、他のレンチウイルスベクターの１つで血清中和しないさらなるエンベ

ロープタンパク質での追加ブースト工程によりさらにブーストしてよい。

【０２１９】

特定の実施態様において、インディアナ株のＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを、免疫学的反応をプライミングするために最初に投与し、本明細書において開示するニュージャージー株のＶＳＶ－Ｇ又は組換えもしくは改変ＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを、第２の例において投与し、免疫学的反応をブーストする。

【０２２０】

別の特定の実施態様において、本明細書において開示するニュージャージー株のＶＳＶ－Ｇ又は組換えもしくは改変ＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを、免疫学的反応をプライミングするために最初に投与し、インディアナ株のＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを、第２の例において投与し、免疫学的反応をブーストする。

【０２２１】

本発明は、特に、キットの両化合物の１回投与での投与プロトコールに対応する実施態様に関し、強い応答を誘発するために十分でありうる。

【０２２２】

恐らくは応答の強度又はスペクトル又は持続時間を改善するためにさらなる投与工程を実施してよい。特に、本明細書において記載する、ＶＳＶ－Ｇ、Ｃｏｃａｌ、Ｐｅｒｉｎｅｔ、ＳＶＣＶもしくはイスファハンウイルスから選ばれるエンベロープ又はこれらのエンベロープの１つのドメインを含む組換えエンベロープでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを使用できる。

【０２２３】

本発明の化合物のキットは、ウイルス疾患に対する、又は、感染性もしくは腫瘍性疾患に対する予防的処置又は治癒的を含む、治療的処置における使用に適し、ここでレンチウイルスベクターは、免疫応答を誘発するために適した１つ又は複数のウイルス抗原あるいはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。

【０２２４】

免疫不全ウイルスで感染した哺乳動物宿主、特にＨＩＶで感染したヒト宿主又はＳＩＶＭＡＣで感染した非ヒト霊長類宿主又はＦＩＶで感染した動物の治療的処置のための化合物の組み合わせを調製するために適していることに加えて、本明細書において開示するレンチウイルスベクターは、また、ヒト宿主における免疫不全ウイルスによる、特にＨＩＶによる、又は、非ヒト霊長類宿主におけるＳＩＶ$_{ＭＡＣ}$による、又は、動物におけるＦＩＶによる感染に対する予防的使用のための化合物の組み合わせのデザインのためのツールを提供する。

【０２２５】

本明細書において開示する化合物の組み合わせは、特に、ＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２で感染したヒト宿主の治療的処置のために使用してよい。

【０２２６】

本明細書において開示する化合物の組み合わせは、特に、ＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２による感染に対するヒト宿主の予防的処置のために使用してよい。

【０２２７】

以後の実験のセクションにおいて提供するデータは、ヒトにおける医薬適用への転置のためのデザインしたレンチウイルスベクターの関連性の実際に強い証拠を提供する。実施例において描写する非ヒト霊長類モデルで達成される防御レベルは、他のワクチン候補で文献において報告される結果よりも強く、それが特定の高用量の感染性ＳＩＶｍａｃウイルスでのウイルスチャレンジに関連して得られたことは注目すべきである。

【０２２８】

得られた実験データから、免疫不全ウイルスに対する防御的で特異的な細胞性免疫応答の誘発のための化合物の組み合わせが、免疫応答のアジュバントを加えることなしに調製

してよいことがさらに観察される。

【０２２９】

当業者は、しかし、レンチウイルスベクターの全て又は部分に関連して、又は／及び、さらに別の化合物として、免疫調節剤を化合物の組み合わせに含むことを決めてよい。例えば、ＩＩ１２などのサイトカインを組み合わせに含めてよい。

【０２３０】

本発明は、特に、化合物の組み合わせを提供し、ここでレンチウイルスベクターは、宿主への注射、特に皮下注射に適した組成物中で製剤化する。別の実施態様において、本発明の化合物の投与は、有利なことに、筋内経路、特に注射により行ってよい。本発明者らは、実験マウスモデルにおいて、ＳＩＶ　ＧＡＧ抗原を発現する遺伝子導入ベクター粒子を含む化合物が筋内経路を通じて投与される場合に誘発される免疫応答が、それらを同じモデルにおいて皮下注射により投与される場合よりも高くなることを示している。

【０２３１】

化合物の組み合わせは、このように、特に、宿主への注射を含み、ならびに、哺乳動物宿主における免疫応答のプライミング及び続く免疫応答のブーストを包含する投与計画における使用のためであり、ここで（ｉ）の第１のウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを、（ｉｉ）の第２のウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター、及び、あれば（ｉｉｉ）の第３のウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターとは別々に時間内に投与し、レンチウイルスベクター（ｉ）及び（ｉｉ）ならびにあれば（ｉｉｉ）の各々を免疫応答のプライミング又はブーストのいずれかのために投与する。

【０２３２】

投与計画の選択は、使用する選択用量及び行うブースト工程の数で得られる応答の強度及びスペクトラムの観点から、当業者が調整してよい。

【０２３３】

特定の実施態様において、本発明は、ＨＩＶに対する防御的で特異的な細胞性免疫応答を誘発するためのヒト宿主への連続投与のための化合物の組み合わせに関し、投与計画は、プライミング及びブースト工程のための同じ用量のレンチウイルスベクターを投与することを包含する。

【０２３４】

別の実施態様において、化合物のキットは、インビボでの遺伝子治療における使用に適する。インビボでの遺伝子治療のための本発明のキットの化合物で処置してよい疾患の例は、運動ニューロン疾患であるパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）などの神経変性疾患である。本発明の化合物のキットで処置できる疾患の別の例は、脊髄損傷である。

【０２３５】

本発明の化合物のキットは、また、癌の処置に適しており、ここでレンチウイルスベクターの反復投与が必要になりうる。

【０２３６】

本発明は、また、本出願において定義するレンチウイルス粒子を含む免疫原性組成物に関し、哺乳動物宿主においてＨＩＶ－１もしくはＨＩＶ－２感染又はＳＩＶもしくはＦＩＶ感染をインビボで阻害するために適する。

【０２３７】

本発明は、また、それを必要とする宿主又は患者の処置の方法に関し、宿主への以下：（ｉ）第１の決定された異種ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター；それに続く、

（ｉｉ）第１の決定したエンベロープタンパク質とは異なる、第２の決定された異種ウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター；

ここで（ｉ）及び（ｉｉ）のレンチウイルスベクターは、治療目的を有する異種ポリヌク

レオチドをコードする
の連続投与を含む。
【０２３８】
特定の実施態様において、本明細書において開示する第３のエンベロープタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターの宿主への投与の第３工程を行う。
【０２３９】
本発明の特定の実施態様によると、免疫反応をさらにブーストするために、追加の投与工程を実施する。
【０２４０】
２つの第１投与工程の間の残り時間は、プライミングへの応答に応じて、３～１２週間又はそれ以上の範囲でよい。第ブースト及び最後のブースト工程の間の残り時間は、数週間、特に１２週間超、例えば６ヶ月間の範囲でよく、さらに１年又は数年でさえよい。
【０２４１】
別の実施態様において、本発明の遺伝子導入ベクターを、単一の活性成分として、即ち、宿主への１回投与のために使用してよい。
【０２４２】
従って、遺伝子導入ベクターの特性又はそれらの性状の、本発明の実施態様での記載は、（組み合わせとは対照的に）単回投与した化合物として使用した場合、特にそれらの非組込みバージョンで、ベクターに適用する。
【０２４３】
本発明の処置又は医薬処置は、病原体により感染した（初感染の段階も）、又は、病理状態を患っていると診断された、それを必要とする患者、特にヒトの臨床状態を改善させることを目的とし、あるいは、この処置は、疾患の原因となる物質もしくは生物の除去、又は、物質もしくは生物の低減を目的とする。ウイルス感染の状況において、処置は、宿主の血漿中のウイルス負荷及び恐らくは血漿ウイルス負荷の有意な減少をもたらし、測定時に、又は、ある場合には腫瘍のサイズもしくは発生の低減時に検出できるもの未満でありうる。
【０２４４】
医薬処置は、病理状態を伴うと診断された患者に言及する場合、患者の臨床状態を改善すること、及び、好ましい実施態様において、健康を回復することを含む。
【０２４５】
それは、また、それを必要とする宿主の予防的処置、特に、宿主における病的状態の発生を阻止するためのワクチン接種を包含する。
【０２４６】
本発明者らにより得られた実験結果によって、化合物、キット、方法の組み合わせのための特定の使用、及び、本出願において開示する一般的な治療的又は予防的な適用を、特に、免疫不全ウイルス、特にＨＩＶ及び特にＨＩＶ－１又はＨＩＶ－２に関連する医薬適用の分野において定義することが可能になる。
【０２４７】
本発明のこれらの特定の使用は、互いに非依存的に、又は組み合わせで、以下：
－　レトロウイルスへの暴露後ならびに特に感染後のウイルス血症の制御、及び特に宿主におけるウイルス負荷の制限又は低下；
－　宿主におけるレトロウイルスに対する、特にヒト宿主におけるＨＩＶに対する防御的な細胞性免疫の誘導；
－　レトロウイルス、特にＨＩＶレトロウイルスへの暴露又は感染後のウイルス複製に対する防御；
－　特に、レトロウイルス、特にＨＩＶによる感染の急性期における中央記憶ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の欠乏に対する防御；
－　特に、レトロウイルス、特にＨＩＶによる感染の慢性期における中央記憶ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の保存；

－　レトロウイルス、特にＨＩＶによる一次感染中での未感作の中央記憶ＣＤ８＋　Ｔ細胞応答のより早く及び／又はより高いリバウンドの誘発；
－　免疫圧力からのウイルス回避に対する阻止、これによりレトロウイルス、特にＨＩＶによる感染の長期制御を可能にする
の指標を含み、恐らくは、免疫不全ウイルスによる、特にＨＩＶによる感染の異なる段階と、又は感染前もしくはレトロウイルスへの暴露前に、関連する。

【０２４８】

これらの特定の使用は、免疫不全ウイルスによる感染の分野における、予防的又は治療的適用における効率的な免疫応答の発生のために有益である。それらは、それらの臨床プロファイルに応じて、レトロウイルスによる感染（レトロウイルスへの感染又は暴露前を含む）又は病原性の段階に関連し、種々のカテゴリーの宿主に本発明の適用を標的とすることを可能にし、なぜなら、それらは、免疫システムの種々のコンパートメントに影響を及ぼすためであり、それらは、感染の段階に応じて、免疫応答の様々な段階に関与する。

【０２４９】

ＳＩＶ又はＨＩＶ抗原を発現するレンチウイルスベクターを投与する場合には必要ないと思われるが、他の適用において、全身又は局所投与のために使用される場合、化合物、アジュバント、及び／又は媒体の組み合わせにさらに含むことを決めてよく、あるいは、そのような構成成分を欠いてよい。

【０２５０】

いずれの場合においても、医薬組成物の製剤化のための適した賦形剤を添加してよい。

【０２５１】

上に引用した組成物は、様々な経路を経て宿主に注射できる：皮下（ｓ．ｃ．）、皮内（ｉ．ｄ．）、筋内（ｉ．ｍ．）、又は静脈内（ｉ．ｖ．）注射、経口投与及び粘膜投与、特に鼻腔内投与又は吸入。投与する量（投与量）は処置する被験者に依存し、患者の状態、個別の免疫システムの状態、投与経路、及び宿主のサイズを考慮することを含む。（ＨＩＶ－１レンチウイルスベクターについて）ベクター粒子の等価のｐ２４抗原中での含量に関連して表わされる適した投与量の範囲を決定できる。

【０２５２】

単回投与のために使用される場合、本発明のベクターは、１～１００μg、好ましくは１～５０μg、及び最も好ましくは１～１０μgの範囲に及ぶ投与量で投与してよく、状況に応じて、当業者が改変できる。皮下注射用に製剤化される場合、本発明の免疫原性組成物は、好ましくは、宿主の体重当たり１～１００μgのレンチウイルスベクター、より好ましくは１～３０μg／用量、特に１０μg／用量前後を、１回の注射において含む。

【図面の簡単な説明】

【０２５３】

本発明の他の例及び特性は、実施例及び図において明らかになる。

【図１】種々のウイルスに由来するＤＮＡ　Ｆｌａｐ配列の様々な例。

【図２Ａ】（Ａ）典型的なＨＩＶ－１ゲノム配列に基づく、本発明の目的のためのベクターゲノムコンストラクト組成；（Ｂ）ＴＲＩＰ／ｓＥ$_{WNV}$ベクターの略図；（Ｃ）ＴＲＩＰ／Ｅｓ（ＷＮＶ）の略図；（Ｄ）プラスミドｐＴＲＩＰΔＵ３．ＣＭＶ－ＧＦＰの略図；（Ｅ）プラスミドｐＴＲＩＰ［ｄｅｌｔａ］Ｕ３ＥＦ１［ａｌｐｈａ］－ＧＦＰの略図。以下の省略を使用する：Ｕ３、Ｒ及びＵ５は、ＬＲＴのドメインを表わす；ΔＵ３：Ｕ３ドメインの欠失；ＲＲＥ：Ｒｅｖ応答性エレメント；ψ：キャプシド形成シグナル；ｃＰＰＴ及びＣＴＳは、ＤＮＡ　Ｆｌａｐを表わす；ＣＭＶｉｅ：サイトメガロウイルス前初期プロモーター。コンストラクト及び特にＤＮＡ　Ｆｌａｐ及びＨＩＶ－１ベースのゲノム中でのその挿入についての詳細は（Zennou et al. 2000）において入手可能である。

【図２Ｂ】（Ａ）典型的なＨＩＶ－１ゲノム配列に基づく、本発明の目的のためのベクターゲノムコンストラクト組成；（Ｂ）ＴＲＩＰ／ｓＥ$_{WNV}$ベクターの略図；（Ｃ）ＴＲＩＰ／Ｅｓ（ＷＮＶ）の略図；（Ｄ）プラスミドｐＴＲＩＰΔＵ３．ＣＭＶ－ＧＦＰの略

図；（Ｅ）プラスミドｐＴＲＩＰ［ｄｅｌｔａ］Ｕ３ＥＦ１［ａｌｐｈａ］－ＧＦＰの略図。以下の省略を使用する：Ｕ３、Ｒ及びＵ５は、ＬＲＴのドメインを表わす；ΔＵ３：Ｕ３ドメインの欠失；ＲＲＥ：Ｒｅｖ応答性エレメント；ψ：キャプシド形成シグナル；ｃＰＰＴ及びＣＴＳは、ＤＮＡ　Ｆｌａｐを表わす；ＣＭＶｉｅ：サイトメガロウイルス前初期プロモーター。コンストラクト及び特にＤＮＡ　Ｆｌａｐ及びＨＩＶ－１ベースのゲノム中でのその挿入についての詳細は（Zennou et al. 2000）において入手可能である。

【図２Ｃ】（Ａ）典型的なＨＩＶ－１ゲノム配列に基づく、本発明の目的のためのベクターゲノムコンストラクト組成；（Ｂ）ＴＲＩＰ／ｓＥ$_{ＷＮＶ}$ベクターの略図；（Ｃ）ＴＲＩＰ／Ｅｓ（ＷＮＶ）の略図；（Ｄ）プラスミドｐＴＲＩＰΔＵ３．ＣＭＶ－ＧＦＰの略図；（Ｅ）プラスミドｐＴＲＩＰ［ｄｅｌｔａ］Ｕ３ＥＦ１［ａｌｐｈａ］－ＧＦＰの略図。以下の省略を使用する：Ｕ３、Ｒ及びＵ５は、ＬＲＴのドメインを表わす；ΔＵ３：Ｕ３ドメインの欠失；ＲＲＥ：Ｒｅｖ応答性エレメント；ψ：キャプシド形成シグナル；ｃＰＰＴ及びＣＴＳは、ＤＮＡ　Ｆｌａｐを表わす；ＣＭＶｉｅ：サイトメガロウイルス前初期プロモーター。コンストラクト及び特にＤＮＡ　Ｆｌａｐ及びＨＩＶ－１ベースのゲノム中でのその挿入についての詳細は（Zennou et al. 2000）において入手可能である。

【図３Ａ】（Ａ）ＶＳＶ種でのベシクロウイルス属において公知の種々の血清型からのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列のアラインメント：インディアナ（ＮＣＢＩアクセッション番号Ｊ０２４２８）、チャンディプラ（Ｊ０４３５０）、Ｐｉｒｙ（Ｄ２６１７５）、ニュージャージー、Ｃｏｃａｌ（ＡＦ０４５５５６）、イスファハン（ＡＪ８１００８４）、及びコイ春ウイルス血症ウイルス（ＳＶＣＶ）（ＡＹ５２７２７３）。インディアナタンパク質及びニュージャージータンパク質は、実施例において使用するものである。（Ｂ）ＶＳＶ種でのベシクロウイルス属において公知の種々の血清型からのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列：インディアナ、チャンディプラ、Ｐｉｒｙ、ニュージャージー、Ｃｏｃａｌ、イスファハン、及びコイ春ウイルス血症ウイルス（ＳＶＣＶ）。

【図３Ｂ】（Ａ）ＶＳＶ種でのベシクロウイルス属において公知の種々の血清型からのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列のアラインメント：インディアナ（ＮＣＢＩアクセッション番号Ｊ０２４２８）、チャンディプラ（Ｊ０４３５０）、Ｐｉｒｙ（Ｄ２６１７５）、ニュージャージー、Ｃｏｃａｌ（ＡＦ０４５５５６）、イスファハン（ＡＪ８１００８４）、及びコイ春ウイルス血症ウイルス（ＳＶＣＶ）（ＡＹ５２７２７３）。インディアナタンパク質及びニュージャージータンパク質は、実施例において使用するものである。（Ｂ）ＶＳＶ種でのベシクロウイルス属において公知の種々の血清型からのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列：インディアナ、チャンディプラ、Ｐｉｒｙ、ニュージャージー、Ｃｏｃａｌ、イスファハン、及びコイ春ウイルス血症ウイルス（ＳＶＣＶ）。

【図４Ａ】ＴＲＩＰｓＥ$_{ＷＮＶ}$ベクターのヌクレオチド配列。ｃＰＰＴ／ＣＴＳ領域に下線を引いている。この領域において、ｃＰＰＴ及びＣＴＳドメインは小文字で現れる。ｓＥ$_{ＷＮＶ}$配列は、太字で表しており、ＢｓｉＷｉ－ＢｓｓＨＩＩ　ＤＮＡインサートである。このベクターは、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、番号Ｉ－３０７６で２００３年８月２７日に寄託されている。

【図４Ｂ】ＴＲＩＰｓＥ$_{ＷＮＶ}$ベクターのヌクレオチド配列。ｃＰＰＴ／ＣＴＳ領域に下線を引いている。この領域において、ｃＰＰＴ及びＣＴＳドメインは小文字で現れる。ｓＥ$_{ＷＮＶ}$配列は、太字で表しており、ＢｓｉＷｉ－ＢｓｓＨＩＩ　ＤＮＡインサートである。このベクターは、ＣＮＣＭ（Paris, France）に、番号Ｉ－３０７６で２００３年８月２７日に寄託されている。

【図５Ａ】ＴＲＩＰ　ＧＦＰベクターのヌクレオチド配列。ｃＰＰＴ／ＣＴＳ領域に下線を引いている。この領域において、ｃＰＰＴ及びＣＴＳドメインは小文字で現れる。ＧＦＰ配列はヌクレオチド２８１６～３５７３の間に位置する。このベクターは、ＣＮＣＭに、番号Ｉ－２３３０で１９９９年１０月１１日に寄託されている（ｐＴＲＩＰ　［ｄｅｌｔａＵ３］　ＣＭＶ　ＧＦＰ）。

【図５Ｂ】ＴＲＩＰ　ＧＦＰベクターのヌクレオチド配列。ｃＰＰＴ／ＣＴＳ領域に下線を引いている。この領域において、ｃＰＰＴ及びＣＴＳドメインは小文字で現れる。ＧＦＰ配列はヌクレオチド２８１６～３５７３の間に位置する。このベクターは、ＣＮＣＭに、番号Ｉ－２３３０で１９９９年１０月１１日に寄託されている（ｐＴＲＩＰ　［ｄｅｌｔａＵ３］　ＣＭＶ　ＧＦＰ）。

【図６】図６～１２は、ＶＳＶの種々の株についてのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列（下線を引いた膜貫通ドメインを伴う）（Ａ）及びコードするコドン最適化核酸（Ｂ）。各々のコドン最適化配列を含むエンベローププラスミドを記載する（Ｃ）。プラスミドはｐＴｈＶプラスミドに由来し、以下を含む。－　別のプロモーターにより置換してよいＣＭＶプロモーター；－　ＶＳＶ－Ｇをコードするコドン最適化ポリヌクレオチド；－　最適であるＷＰＲＥ（ΔＡＴＧ）配列；－　ポリＡ配列－　置換又は欠失してよいｋａｎＲ（カナマイシン耐性遺伝子）－　複製起点（ｐＵＣ　ＯＲＩ）。表したＶＳＶ－Ｇエンベロープはそれぞれ以下である：図６：インディアナＶＳＶ－Ｇ。このエンベロープを、Ｉ－３８４２で寄託されたプラスミドｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）中に挿入している。

【図７】図６～１２は、ＶＳＶの種々の株についてのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列（下線を引いた膜貫通ドメインを伴う）（Ａ）及びコードするコドン最適化核酸（Ｂ）。各々のコドン最適化配列を含むエンベローププラスミドを記載する（Ｃ）。プラスミドはｐＴｈＶプラスミドに由来し、以下を含む。－　別のプロモーターにより置換してよいＣＭＶプロモーター；－　ＶＳＶ－Ｇをコードするコドン最適化ポリヌクレオチド；－　最適であるＷＰＲＥ（ΔＡＴＧ）配列；－　ポリＡ配列－　置換又は欠失してよいｋａｎＲ（カナマイシン耐性遺伝子）－　複製起点（ｐＵＣ　ＯＲＩ）。表したＶＳＶ－Ｇエンベロープはそれぞれ以下である：図７：ニュージャージーＶＳＶ－Ｇ。このエンベロープを、Ｉ－３８４３で寄託されたプラスミドｐＴｈＶ－ＶＳＶ－Ｇ（ＮＪ－ＣＯ）中に挿入している。寄託したプラスミドは大腸菌細胞中である。それらの適した増殖培地はＬＢカナマイシン１０μg/mlであり、インキュベーション温度は３７℃である。保存のために、それらを５０％　ＬＢ及び５０％グリセロールを伴う液体中に懸濁してよい。

【図８】図６～１２は、ＶＳＶの種々の株についてのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列（下線を引いた膜貫通ドメインを伴う）（Ａ）及びコードするコドン最適化核酸（Ｂ）。各々のコドン最適化配列を含むエンベローププラスミドを記載する（Ｃ）。プラスミドはｐＴｈＶプラスミドに由来し、以下を含む。－　別のプロモーターにより置換してよいＣＭＶプロモーター；－　ＶＳＶ－Ｇをコードするコドン最適化ポリヌクレオチド；－　最適であるＷＰＲＥ（ΔＡＴＧ）配列；－　ポリＡ配列－　置換又は欠失してよいｋａｎＲ（カナマイシン耐性遺伝子）－　複製起点（ｐＵＣ　ＯＲＩ）。表したＶＳＶ－Ｇエンベロープはそれぞれ以下である：図８：チャンディプラＶＳＶ－Ｇ。

【図９】図６～１２は、ＶＳＶの種々の株についてのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列（下線を引いた膜貫通ドメインを伴う）（Ａ）及びコードするコドン最適化核酸（Ｂ）。各々のコドン最適化配列を含むエンベローププラスミドを記載する（Ｃ）。プラスミドはｐＴｈＶプラスミドに由来し、以下を含む。－　別のプロモーターにより置換してよいＣＭＶプロモーター；－　ＶＳＶ－Ｇをコードするコドン最適化ポリヌクレオチド；－　最適であるＷＰＲＥ（ΔＡＴＧ）配列；－　ポリＡ配列－　置換又は欠失してよいｋａｎＲ（カナマイシン耐性遺伝子）－　複製起点（ｐＵＣ　ＯＲＩ）。表したＶＳＶ－Ｇエンベロープはそれぞれ以下である：図９：Ｃｏｃａｌ　ＶＳＶ－Ｇ。

【図１０】図６～１２は、ＶＳＶの種々の株についてのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列（下線を引いた膜貫通ドメインを伴う）（Ａ）及びコードするコドン最適化核酸（Ｂ）。各々のコドン最適化配列を含むエンベローププラスミドを記載する（Ｃ）。プラスミドはｐＴｈＶプラスミドに由来し、以下を含む。－　別のプロモーターにより置換してよいＣＭＶプロモーター；－　ＶＳＶ－Ｇをコードするコドン最適化ポリヌクレオチド；－　最適であるＷＰＲＥ（ΔＡＴＧ）配列；－　ポリＡ配列－　置換又は欠失してよいｋａｎＲ（カナマイシン耐性遺伝子）－　複製起点（ｐＵＣ　ＯＲＩ）。表したＶＳＶ－Ｇエンベロープはそれぞれ以下である：図１０：Ｐｉｒｙ　ＶＳＶ－Ｇ。

【図１１】図６～１２は、ＶＳＶの種々の株についてのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列（下線を引いた膜貫通ドメインを伴う）（Ａ）及びコードするコドン最適化核酸（Ｂ）。各々のコドン最適化配列を含むエンベローププラスミドを記載する（Ｃ）。プラスミドはｐＴｈＶプラスミドに由来し、以下を含む。－　別のプロモーターにより置換してよいＣＭＶプロモーター；－　ＶＳＶ－Ｇをコードするコドン最適化ポリヌクレオチド；－　最適であるＷＰＲＥ（ΔＡＴＧ）配列；－　ポリＡ配列－　置換又は欠失してよいｋａｎＲ（カナマイシン耐性遺伝子）－　複製起点（ｐＵＣ　ＯＲＩ）。表したＶＳＶ－Ｇエンベロープはそれぞれ以下である：図１１：イスファハンＶＳＶ－Ｇ。

【図１２】図６～１２は、ＶＳＶの種々の株についてのＶＳＶ－Ｇタンパク質配列（下線を引いた膜貫通ドメインを伴う）（Ａ）及びコードするコドン最適化核酸（Ｂ）。各々のコドン最適化配列を含むエンベローププラスミドを記載する（Ｃ）。プラスミドはｐＴｈＶプラスミドに由来し、以下を含む。－　別のプロモーターにより置換してよいＣＭＶプロモーター；－　ＶＳＶ－Ｇをコードするコドン最適化ポリヌクレオチド；－　最適であるＷＰＲＥ（ΔＡＴＧ）配列；－　ポリＡ配列－　置換又は欠失してよいｋａｎＲ（カナマイシン耐性遺伝子）－　複製起点（ｐＵＣ　ＯＲＩ）。表したＶＳＶ－Ｇエンベロープはそれぞれ以下である：図１２：ＳＶＣＶ－ＶＳＶ－Ｇ。

【図１３Ａ】図１３は、ＶＳＶ－Ｇニュージャージー遺伝子とＶＳＶ－Ｇインディアナ遺伝子の間の融合遺伝子を表わす。膜貫通ドメインは太字であり、下線を引いている。融合遺伝子の調製のためのＰＣＲ戦略を開示する。プライマーとして使用するオリゴヌクレオチドを記載する。

【図１３Ｂ】図１３は、ＶＳＶ－Ｇニュージャージー遺伝子とＶＳＶ－Ｇインディアナ遺伝子の間の融合遺伝子を表わす。膜貫通ドメインは太字であり、下線を引いている。融合遺伝子の調製のためのＰＣＲ戦略を開示する。プライマーとして使用するオリゴヌクレオチドを記載する。

【図１４Ａ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１４：ＶＳＶ－Ｇチャンディプラ／インディアナの融合タンパク質。

【図１４Ｂ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１４：ＶＳＶ－Ｇチャンディプラ／インディアナの融合タンパク質。

【図１４Ｃ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１４：ＶＳＶ－Ｇチャンディプラ／インディアナの融合タンパク質。

【図１５Ａ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１５：ＶＳＶ－Ｇ　Ｃｏｃａｌ／インディアナの融合タンパク質。

【図１５Ｂ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１５：ＶＳＶ－Ｇ　Ｃｏｃａｌ／インディアナの融合タンパク質。

【図１５Ｃ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１５：ＶＳＶ－Ｇ　Ｃｏｃａｌ／インディアナの融合タンパク質。

【図１６Ａ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中で

の発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１６：ＶＳＶ－Ｇ　Ｐｉｒｙ／インディアナの融合タンパク質。
【図１６Ｂ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１６：ＶＳＶ－Ｇ　Ｐｉｒｙ／インディアナの融合タンパク質。
【図１６Ｃ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１６：ＶＳＶ－Ｇ　Ｐｉｒｙ／インディアナの融合タンパク質。
【図１７Ａ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１７：ＶＳＶ－Ｇイスファハン／インディアナの融合タンパク質。
【図１７Ｂ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１７：ＶＳＶ－Ｇイスファハン／インディアナの融合タンパク質。
【図１７Ｃ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１７：ＶＳＶ－Ｇイスファハン／インディアナの融合タンパク質。
【図１８Ａ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１８：ＶＳＶ－Ｇ　ＳＶＣＶ／インディアナの融合タンパク質。
【図１８Ｂ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１８：ＶＳＶ－Ｇ　ＳＶＣＶ／インディアナの融合タンパク質。
【図１８Ｃ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１８：ＶＳＶ－Ｇ　ＳＶＣＶ／インディアナの融合タンパク質。
【図１９Ａ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１９：ＶＳＶ－Ｇニュージャージー／インディアナの融合タンパク質。
【図１９Ｂ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１９：ＶＳＶ－Ｇニュージャージー／インディアナの融合タンパク質。
【図１９Ｃ】図１４～１９は、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質の異なるドメインを組換えることにより得られる融合タンパク質を開示する。各タンパク質について、（ヒト細胞中での発現のために）コドン最適化された核酸（Ａ）を、核酸を含むプラスミド（Ｂ）と一緒に提供する。図１９：ＶＳＶ－Ｇニュージャージー／インディアナの融合タンパク質。
【図２０】ニュージャージーＶＳＶ－Ｇ－糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターに及ぼすコドン最適化の効果を示す。ＶＳＶ－Ｇ遺伝子（ＮＪ血清型）のヒトコドン最適化は、遺伝子導入を１００×倍で刺激する。
【図２１】本発明のための目的の抗原の配列を例示する。これらの抗原をコードする核酸

は、特にヒト細胞のためのコドン最適化バージョンにおいて、ベクターゲノムの異種ポリヌクレオチドに挿入してよい。例示する抗原は以下である：ＨＩＶ－１　ＬＡＩ単離株（サブタイプＢ）の天然ＧＡＧ抗原（Ｄ）及び対応する核酸配列（Ｅ）；改変ＨＩＶ－１ＧＡＧ、ミリスチル化を阻止し、そして、Ｂサブタイプのコンセンサス配列に由来するｄｅｌｔａ　Ｍｙｒ－ＧＡＧ抗原である（Ａ）；ＨＩＶ－１　ＰＯＬに由来する抗原、ＰＯＬポリタンパク質のフラグメントである（Ｂ）；ＨＩＶ－１　ＮＥＦに由来する抗原、ＮＥＦタンパク質のフラグメントである（Ｃ）。これらの抗原を、融合タンパク質における組み合わせで使用してよい。ＰＯＬ及び／又はＮＥＦフラグメントは、ＧＡＧ由来抗原の５’又は３’に挿入してよい。それらは互いに近接し、ＧＡＧ由来抗原の５’又は３’に挿入してよい。それらは、１つをＧＡＧ由来抗原の５’、他を３’に分離及び挿入してよい。ＰＯＬ、ＮＥＦ及びＧＡＧ抗原は、ペプチドにより、特に自己切断を可能にするものにより分離していてよく、又は、していなくてもよい。適した分離ペプチドは、以下の配列を含むピコナウイルスからの２Ａペプチドである：ＡＰＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ。

【図２２】ＡＩＤＳに対するワクチン接種のためのヒトＨＩＶ－１抗原のデザインのための、図２１による種々の抗原コンストラクトを例示する。

【図２３】図２３～２７は、ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧポリタンパク質に由来する抗原を発現するレンチウイルスベクター粒子の調製のためのＴＲＩＰレンチウイルスベクター生成及び適用の原理。同じ原理を他の抗原に適用しうる。図には特に以下の特性が記載される：図２３：ＴＲＩＰレンチウイルスベクター生成の原理。ＨＩＶ－１ゲノム（Ａ）は、シス作用配列（ＬＴＲ、キャプシド形成シグナル、ＲＲＥ、ＤＮＡ　Ｆｌａｐ）及び異種プロモーター（ＣＭＶ）又は別のプロモーターの制御下の目的遺伝子を含むベクタープラスミド（Ｂ）、（ベクター粒子産生中での）キャプシド形成及び（形質導入細胞における）ウイルス複製サイクルの初期工程に必要な、ｇａｇ、ｐｏｌ、ｔａｔ及びｒｅｖ遺伝子を含むパッケージングプラスミド（Ｃ）、及びＶＳＶからの糖タンパク質Ｇのインディアナ血清型を含むエンベローププラスミド（Ｄ）に分割する。パッケージングプラスミド及びエンベローププラスミドは、ＣＭＶからの異種転写調節エレメントを有し、キャプシド形成配列、ｃＰＰＴ及びＣＴＰにおいて欠失している。

【図２４】図２３～２７は、ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧポリタンパク質に由来する抗原を発現するレンチウイルスベクター粒子の調製のためのＴＲＩＰレンチウイルスベクター生成及び適用の原理。同じ原理を他の抗原に適用しうる。図には特に以下の特性が記載される：図２４：Ｕ３’欠失レンチウイルスベクターの原理。ウイルス一本鎖ＲＮＡの逆転写中、Ｕ３’及びＵ５’配列の重複が存在し、それにより二本鎖ＤＮＡ中で５’ＬＴＲ及び３’ＬＴＲを形成することを可能にする。ウイルスＤＮＡの転写は、細胞において、ＬＴＲ　５’から開始する。Ｕ３’領域をベクタープラスミドにおいて欠失させた場合（ΔＵ３）、ウイルスＲＮＡもΔＵ３であり、結果的に、逆転写後、ウイルスＤＮＡは５’ＬＴＲにおいてＵ３配列を失い、ウイルスＬＴＲプロモーターから転写は開始できない。結果として、転写は、トランスジーンの内部プロモーターだけを経て媒介される。

【図２５】図２３～２７は、ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧポリタンパク質に由来する抗原を発現するレンチウイルスベクター粒子の調製のためのＴＲＩＰレンチウイルスベクター生成及び適用の原理。同じ原理を他の抗原に適用しうる。図には特に以下の特性が記載される：図２５：ＴＲＩＰベクター産生のために使用する２つのベクタープラスミドの略図。Ａ：ＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ．このベクタープラスミドは、抗原ＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇをコードする配列を含み、ミリスチン化配列において欠失している。これはＬ１、Ｐ１バイオセーフティーレベルでだけ働くことを可能にし、なぜなら、それはトランスフェクト細胞及び形質導入細胞におけるタンパク質分泌を抑止するためである。Ｂ：ＴＲＩＰ－ＧＦＰ．このベクタープラスミドは、無関係の抗原緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を含む。両方のベクタープラスミドは、上流に抗原発現のためのＣＭＶプロモーター、及び、下流に抗原発現を改善するためのＷＰＲＥ配列を含む。それらは、形質導入細胞におけるベクター粒子形成及びウイルス複製の初期工程に必要なウイルス配列も

含む：末端反復配列（ＬＴＲ）、ＤＮＡ　Ｆｌａｐ（ｃＰＰｔ、ＣＴＳ）、ＲＲＥ、キャプシド形成シグナルΨ。Ｃ．ベクターゲノムのｐＴＲＩＰ　ＤｅｌｔａＵ３－ＣＭＶ－ＳＩＶＧａｇ－ＷＰＲＥ制限酵素地図（Ｃ１）及びその核酸配列（Ｃ２）。ベクターコンストラクトはＣＮＣＭにＩ－３８４０で寄託されている。Ｄ．ベクターゲノムのｐＴＲＩＰ　ＤｅｌｔａＵ３－ＣＭＶ－ＳＩＶＧａｇ　ｃｏ－ＷＰＲＥ制限酵素地図（Ｄ１）及びその核酸配列（Ｄ２）。ベクターコンストラクトはＣＮＣＭにＩ－３８４１で寄託されている；寄託のプラスミドを大腸菌細胞に導入する。細胞の培養液はＬＢアンピシリン１００μg/mlであり、インキュベーションは３７℃である。保存は、５０％　ＬＢ　５０％グリセロールを伴う懸濁液中である。

【図２６】図２３～２７は、ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧポリタンパク質に由来する抗原を発現するレンチウイルスベクター粒子の調製のためのＴＲＩＰレンチウイルスベクター生成及び適用の原理。同じ原理を他の抗原に適用しうる。図には特に以下の特性が記載される：図２６：１５ｍｅｒ長ペプチドに分割したＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧタンパク質の略図ＳＩＶ　ｍａｃ２３９　ＧＡＧタンパク質は５１１アミノ酸長である。このタンパク質を１２５のペプチドに分割した。これらのペプチドは１５アミノ酸長であり；連続ペプチドの間に１１アミノ酸の重複が存在する。ペプチドは、５～１２のペプチドを含む、Ｍ～Ｗの文字で名前を付けた１１プール中に送った。

【図２７】図２３～２７は、ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧポリタンパク質に由来する抗原を発現するレンチウイルスベクター粒子の調製のためのＴＲＩＰレンチウイルスベクター生成及び適用の原理。同じ原理を他の抗原に適用しうる。図には特に以下の特性が記載される：図２７：（Ａ）ベクタータイトレーションのために使用するプライマー及びプローブの配列ならびにｑＰＣＲプログラム；（Ｂ）プローブ及びプライマーのアニーリング部位の局在化を伴うＱ－ＰＣＲベクタータイトレーションにおける標準曲線の構築のために使用する標準化プラスミドの模式図。

【図２８（１）】プライミング／ブースト・レンチウイルスベクター・ベースのワクチン接種戦略は、強い細胞性免疫を誘導する。ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ特異的Ｔ細胞応答の長期的な追跡調査を、プライミング後、ブースト後、及びチャレンジ後の種々の時点に、ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ　ｐ５５を包含する重複ペプチドのプールでの全ＰＢＭＣの再刺激後でのＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより実施した。ＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧを注射した全６匹のワクチン接種動物（低用量：２００２２、２００８９；中用量：２０２９３、２００５６；高用量、２０１９５及び２０１５８、図２８ａ）、高ｐ２４用量の無関係抗原（ＴＲＩＰ－ＧＦＰ）で免疫化した２匹の対照動物（２１５４４及び２０４５６、図２８ｂ）、及びワクチン未接種動物（１５６６１、１４１８４、１５８８５及び１４４６８、図２８ｃ）での個別のＧＡＧ特異的な累積応答を示す。簡単に説明すると、１ウェル当たり０．２　10^6　ＰＢＭＣを、インビトロで４０時間、５～１２の重複する１５－ｍｅｒペプチド（２μg/mlの各ペプチド）の１１プールで再刺激した。ＰＢＭＣ１００万個当たりのＩＦＮ－γスポット形成細胞（ＳＦＣ）の平均数を、対照ウェル（無ペプチド）から１つのウェルを引いた後、３ウェルから算出した。示した累積応答は、ペプチドの各プールで得られたＩＦＮ－γＳＦＣ／１００万個ＰＢＭＣの合計に対応する。シンボル＋は、少なくとも１つのペプチドのプールでの飽和ＥＬＩＳＰＯＴウェルに起因する累積応答の過小評価を示す（図２９（２）を参照のこと）。チャレンジ後２週目、対照ウェル中のスポット数を定量し、ひいては動物２００２２（＋＋で記入）での累積応答を算出することは可能ではなかった（ｎｄ、決定せず）。

【図２８（２）】レンチウイルスベクターの皮下注射は、全身炎症を招かなかった。皮下注射のすぐ後での血漿中のＩＦＮ－α（PBL Biomedical Laboratories）（図２８（２）ａ）、ＩＬ－６（U-Cytech Bioscience）（図２８（２）ｂ）、及びＴＮＦ－α（U-Cytech Bioscience）（図２８（２）ｃ）の存在をＥＬＩＳＡにより測定した。それらのレベルにおける有意な（ＩＦＮ－α及びＴＮＦ－α）又は大幅な（ＩＬ－６）増加の非存在は、高用量（２．５　10^8 TU/動物）でさえ、レンチウイルスベクター粒子のインビボ投与により誘導される全身炎症が存在しないことを示唆した。これらのデータは、内因性ＰＡ

ＭＰが引き金となる可能性が高い局所炎症を除外しなかった（Brown B, D et al, 2007; Pichlmair A et al, 2007; Georgel P. et al , 2007）。

【図２９（１）】ワクチン接種されたマカクは、ワクチン未接種又は対照の動物と比較して、ウイルス血症の改善された制御を有する。血漿ウイルス負荷をチャレンジ後５ヶ月間にわたり追跡調査した（最初の３週間は週２回、その後、次の３週間は週１回、そして最後に月１回）。ワクチン未接種（図２９ａ　１５６６１；１４１８４；１５８８５；１４４６８系統、□；◇；△；▽の印を付けている）、対照（図２９ａ　２１５４４、ｘ）、及びワクチン接種の動物（図２９ｂ）でのウイルス血症、ならびに、未感作及び対照群（黒色）対ワクチン接種群（灰色）での平均値（図２９ａ、２９ｂ及び２９ｃ）を示す。ウイルス複製レベルの平均値は、テストした全ての時点でワクチン接種群において低かった（図２９ｃ）。Ｐ値＜０．０５を記入する＊。ウイルス血症の平均２　ｌｏｇ１０倍の低下が、初感染のピークに観察された（図２９ｅ）。ワクチン接種動物（灰色）の平均ウイルス血症も、進行動物（１４１８４－２１５４４－２０４５６）の平均ウイルス血症（オレンジ色）及び非進行動物（１５６６１－１５８８５－１４４６８）の平均ウイルス血症（薄青色）と比較した（図２９ｄ）。ポスト急性ウイルス血症は、進行動物と比較して、ワクチン接種動物において低かった。Ｐ値＜０．０５を記入する＊。感染後の最初の１５４日間でのウイルス複製の測定値は、０日目と１５４日目の間のウイルス負荷（曲線下面積、ＡＵＣ）を積分することにより決定し、ワクチン接種動物を未感作の対照動物と比較する（図２９ｆ）。簡単に説明すると、ウイルスＲＮＡを血漿（２００μｌ）からTRI Reagent BD（Molecular Research Center）で単離する。ＲＮＡコピー数は、定量的ワンステップＲＴ－ＰＣＲにおいて、Taqman EZ RT-PCR（Applied Biosystem）及びMastercycler ep realplex（Eppendorf）を使用して決定する。プライマーは、ＳＩＶｍａｃ２５１　ＧＡＧ　ｍＲＮＡゲノムの３８９及び４５６の位置にそれぞれある（フォワード、ＴＧＴＣＣＡＣＣＴＧＣＣＡＴＴＡＡＧＣＣＣＧＡ；リバース、ＧＣＡＧＡＧＧＡＧＧＡＡＡＴＴＡＣＣＣＡＧＴＡＣ）。Ｔａｑｍａｎ定量化方法は、Ｆａｍ及びＴａｍｒａフルオロフォアをそれぞれ５’及び３’に含む内部プローブを伴い選んだ（ＴＧＴＣＣＡＣＣＴＧＣＣＡＴＴＡＡＧＣＣＣＧＡ）。ウイルスＲＮＡコピーの量は、ＳｐｅＩで線形化したｐＧＥＭ－５Ｚｆ（＋）ＧＡＧプラスミドのMAXIscript kit（Ambion）でのインビトロ転写により得られるＲＮＡのｄＨ$_2$Ｏ中での連続希釈物から調製される内部標準曲線への閾値蛍光値の外挿により評価した。検出閾値は３７５　ＲＮＡコピー/ml（２．５７　ｌｏｇ１０　ＲＮＡコピー/ml）であった。

【図２９（２）】ＥＬＩＳＰＯＴアッセイの飽和。ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイはＰＢＭＣの連続希釈物を使用して実施し、ＥＬＩＳＰＯＴリーダーの飽和曲線を決定した（２００，０００個の細胞を使用しているため、２８０スポット／ウェルは１４００スポット／１００万個ＰＢＭＣに相当する）（図２９（２）ａ）。特定のＴ細胞の頻度が高く、スポットが重複する（取得）場合、ＩＦＮ－γ　ＳＦＣ／１００万個の数は、従って、バックグラウンド（分析）を引く前に１４００まで過小評価された。チャレンジ後２週目でのＳＩＶｍａｃ３３９　ＧＡＧ：３８５－４４３及びＳＩＶｍａｃ３３９　ＧＡＧ：４４３－４９１を包含するペプチドプールで再刺激した動物２００５６からのＰＢＭＣの例を与える（図２９（２）ｂ）。

【図３０（１）】中央記憶ＣＤ４＋　Ｔ細胞コンパートメントをワクチン接種マカクにおいて良好に保存する。末梢血中での中央記憶（ＣＭ）ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞の数における変化（進行との強い相関）をチャレンジ後５ヶ月間にわたり追跡調査した。他の細胞コンパートメント（全ＣＤ４$^+$、未感作ＣＤ４$^+$全ＣＤ８、未感作ＣＤ８$^+$、ＣＭ　ＣＤ８$^+$、及びエフェクター記憶（ＥＭ）ＣＤ８$^+$　Ｔ細胞）の動態を図３２（２）で利用可能である。未感作（図３０ａ　１５６６１－１４１８４－１５８８５－１４４６８）、対照（図３０ａ　２１５４４－２０４５６、○又はｘの印を付けている）、及びワクチン接種の動物（図３０ｂ、１つを除く全ての系統に◆を付けている）でのベースラインＣＭ　ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞の%、ならびに、未感作及び対照群（黒色で▲の印を付けている）対ワクチン接種群（灰色で◆の印を付けている）での平均値（図３０ａ、３０ｂ及び３０ｃ）を示す。

ワクチン接種動物は、未感作動物及び対照動物（図３０ｃ）ならびに▲を伴う進行動物（１４１８４－２１５４４－２０４５６）（図３０ｄ）とは対照的に、初感染中にそれらのＣＭ　ＣＤ４＋　Ｔ細胞コンパートメントの完全な保存を示し、慢性期における穏やかな欠乏を示さなかった（ｐ値＜０．０５を記入する＊）。全ての動物でのＣＭ　ＣＤ４＋　Ｔ細胞を、初感染のピークに比較する（図３０ｅ）。絶対リンパ球カウントの定量化、ＣＤ３＋ＣＤ４＋　Ｔ細胞ならびに未感作、ＥＭ及びＣＭ　Ｔ細胞（ＣＤ２８＋ＣＤ９５－、ＣＤ２８＋ＣＤ９５＋、及びＣＤ２８－ＣＤ９５＋細胞と定義する）の割合が以前に記載された（Karlsson I et al 2007）。

【図３０（２）】ワクチン誘導性Ｔ細胞応答は広範で、それらはＡＴ２不活化ＳＩＶに由来する抗原を認識した。ＧＡＧによりコードされるタンパク質（マトリクスＭＡ、キャプシドＣＡ、ヌクレオキャプシドＮＣ、及びｐ６）の多様性並びにワクチン誘導性、ウイルス誘導性、及びウイルスリコール性ＧＡＧ特異的Ｔ細胞応答への相対的寄与率を、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより、一次応答（プライミング後２週目、図３０（２）ａ）、ブースト後１週目（図３０（２）ｂ）、及び感染の急性期中（チャレンジ後３週目、図３０（２）ｃ）のピークに試験した。ＡＴ－２不活化ＳＩＶｍａｃ２５１（５μg/ml全ウイルスタンパク質）も使用して、全ＰＢＭＣ　ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにおいて、ブースト後２週目にＧＡＧ特異的ＣＤ４＋及びＣＤ８＋　Ｔ細胞を再刺激した（図３０（２）ｄ）。対照微小胞を伴う共培養後のバックグラウンドを引いた。飽和応答を＋で示した。ＡＴ－２不活化ＳＩＶｍａｃ　２５１及びその対照微小胞を、JD Lifson（Frederick, MA）から、EU Program EVA Centralized Facility for AIDS Reagents（NIBSC, Potters Bar, UK）を通じて得た。

【図３１（１）】免疫は防御と相関する。初感染のピークでの血漿ウイルス負荷の対照を、ＧＡＧ特異的Ｔ細胞との相関関係についてテストした（スピアマンの順位相関）。プライミング注射後（図３１ａ）、ブースト注射後（図３１ｂ）、及びチャレンジ後（図３１ｃ）の高頻度なＩＦＮ－γ分泌Ｔ細胞は、初感染のピークにウイルス血症のより良好な制御と相関した。相関関係の意義は、ＥＬＩＳＰＯＴウェルの偶発的な飽和のために過小評価される。急性期中の中央記憶ＣＤ４＋　Ｔ細胞（ＣＭ）の保存も、初感染のピークでのウイルス負荷の低下と強く相関した（図３１ｄ）。

【図３１（２）】注射された動物は、ベクター粒子をシュードタイピングするために使用したＶＳＶからの糖タンパク質Ｇへの液性応答を発生した。シュードタイピングのために使用したエンベロープに対する中和抗体の存在を、インビトロ形質導入アッセイで測定した。Ｐ４細胞（ＨｅＬａ由来）を、種々の時点で採取した免疫化動物からの１：２０で希釈した血漿とプレインキュベートされた、ＶＳＶ－Ｇインディアナ（図３１（２）ａ）又はＶＳＶ－Ｇニュージャージー（図３１（２）ｂ）でシュードタイピングされた、ＧＦＰをコードするレンチウイルスベクターの存在下で培養した。形質導入効率をフローサイトメトリーにより評価した。血漿の非存在下で、及び、使用したベクターの用量で、Ｐ４細胞の６１％及び２３％が、ＶＳＶ－Ｇインディアナ及びニュージャージーでそれぞれシュードタイピングされた、ＧＦＰをコードするレンチウイルスベクターでの形質導入後にＧＦＰ＋であった。

【図３２】ワクチン被接種者における全、未感作及び記憶ＣＤ４＋及びＣＤ８＋　Ｔ細胞の動態は、感染後のワクチン未接種及び対照マカクのものとは異なった。ベースラインの全ＣＤ４＋　Ｔ細胞（図３２ａ）、未感作ＣＤ４＋　Ｔ細胞（図３２ｂ）、全ＣＤ８＋　Ｔ細胞（図３２ｃ）、未感作ＣＤ８＋　Ｔ細胞（図３２ｄ）、中央記憶（ＣＭ）ＣＤ８＋　Ｔ細胞（図３２ｅ）、及びエフェクター記憶（ＥＭ）ＣＤ８＋　Ｔ細胞（図３２ｆ）の％を追跡調査した。未感作及び対照群（黒色三角）対ワクチン接種群（灰色ひし形）での平均値を示す。Ｐ値＜０．０５を記入する＊。

【図３３】コドン最適化によって、ＴＲＩＰ．ＮＩ　ＬＶベースのワクチンにより誘導されるＣＴＬ応答が決定的に改善される。免疫優性ｇａｇ　ＣＤ８＋　Ｔ細胞エピトープに対するｇａｇ特異的な細胞性免疫応答を、四量体染色（Ａ）又はＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ（Ｂ）により評価した。ＳＦＣ、スポット形成細胞。（Ｃ）ｇａｇのＣＤ８＋　Ｔ細

胞免疫優性エピトープ及びＣＤ４＋　Ｔ細胞エピトープに反応するＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ。マウスを、１００ngのＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＬＶ又はＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＣＯ　ＬＶで腹腔内プライミングした。１０日後、免疫化マウスからの脾細胞を、対応するペプチドで刺激し、ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより分析した。バックグラウンドの頻度を、プロット前に引いた、エラーバーは、１群当たりマウス３匹でのＳＤを表わす。（Ｄ）ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＬＶ対ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＣＯ　ＬＶの免疫化により誘導されるｇａｇ特異的な溶解活性の比較。ＣＴＬ活性を、材料及び方法において記載する２０時間インビボＣＴＬアッセイを使用して免疫化後の１０日目に測定した。マウス３匹での平均＋／－ＳＤを示す。

【図３４】ＴＲＩＰ．ＮＩ　ＧＡＧΔｍｙｒ　ＣＯ粒子での単回免疫化によって、強い持続性の細胞性免疫応答が誘導される。注射後８週目にＴＲＩＰ．ＮＩ　ＧＡＧΔｍｙｒ　ＣＯ又はＴＲＩＰ．Ｉ　ＧＡＧΔｍｙｒ野生型粒子で免疫化した、又は、免疫化しなかったマウスからの脾細胞（Ａ）又は骨髄細胞（Ｂ）でのＥＬＩＳＰＯＴアッセイ。

【図３５】マウスを、ＶＳＶ－ＧインディアナでシュードタイピングされたＴＲＩＰ．ＮＩ　ＧＡＧΔｍｙｒ　ＣＯ又はＴＲＩＰ．Ｉ　ＧＡＧ野生型粒子で免疫化し、そして１３週間後、ＶＳＶ－ＧニュージャージーでシュードタイピングされたＴＲＩＰ．ＮＩ　ＧＡＧΔｍｙｒ　ＣＯ又はＴＲＩＰ．Ｉ　ＧＡＧ野生型粒子でそれぞれブーストした。プライミング－ブーストプロトコールのための対照群には、ＶＳＶ－ＧインディアナでシュードタイピングされたＴＲＩＰ粒子（灰色図表）又はＶＳＶ－ＧニュージャージーでシュードタイピングされたＴＲＩＰ粒子（青色図表）をそれぞれ１回だけ注射したマウスが含まれた。全てのマウスを免疫化後１０日目に屠殺し、ＧＡＧに対する細胞性免疫応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ（Ａ）又は四量体染色（Ｂ）により評価した。

【図３６】ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧａｇΔｍｙｒ　ＷＰＲＥをコードするレンチウイルスベクターでのマウスのワクチン接種。２～５群：マウス１２９匹をマウス１匹当たり１．１０^{e}７　ＴＵで１回ワクチン接種した。単回投与後１０日目、特定の免疫応答を、標的細胞として、ＣＦＳＥで染色し、１５－ｍｅｒペプチド（亜優性又は免疫優性ＣＴＬエピトープを含むＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（７３－８７）及びＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（３０９－３２３））でパルスしたコンジェニック未感作脾細胞を使用したインビボ細胞毒性アッセイにより分析した。ｉ．ｄ．、皮内；ｉ．ｐ．、腹腔内；ｓ．ｃ．、皮下。

【図３７】ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧａｇΔｍｙｒ　ＷＰＲＥをコードするレンチウイルスベクターでのマウスのワクチン接種。２～３群：マウス１２９匹をマウス１匹当たり３００ngのｐ２４で１回ワクチン接種した。単回投与後１０日目、特定の免疫応答を、標的細胞として、ＣＦＳＥで染色し、１５－ｍｅｒペプチド（亜優性又は免疫優性ＣＴＬエピトープを含むＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（７３－８７）及びＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（３０９－３２３））でパルスしたコンジェニック未感作脾細胞を使用したインビボ細胞毒性アッセイにより分析した。ｔ．ｃ．ｉ．、経皮；ｉ．ｄ．、皮内；ｉ．ｐ．、腹腔内。

【図３８】ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧａｇΔｍｙｒ　ＷＰＲＥをコードするレンチウイルスベクターでのマウスのワクチン接種。５～６群：Ｃ５７ＢＬ／６ｊマウスをマウス１匹当たり１．１０^{e}７TUで１回ワクチン接種した。単回投与後１０日目、特定の免疫応答を、標的細胞として、ＣＦＳＥで染色し、１５－ｍｅｒペプチド（亜優性又は免疫優性ＣＴＬエピトープを含むＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（７３－８７）及びＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（３０９－３２３））でパルスしたコンジェニック未感作脾細胞を使用したインビボ細胞毒性アッセイにより分析した。ｉ．ｍ．、筋内；ｉ．ｐ．、腹腔内；ｓ．ｃ．、皮下。

【図３９】ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧａｇΔｍｙｒ　ＷＰＲＥをコードするレンチウイルスベクターでのマウスのワクチン接種。６群：Ｃ５７Ｂｌ／６ｊマウスをマウス１匹当たり２．１０^{e}６　ＴＵで１回ワクチン接種した。単回投与後１２日目、特定の免疫応答を、１５－ｍｅｒペプチド（亜優性又は免疫優性ＣＴＬエピトープを含むＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（７３－８７）及びＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（３０９－３２３））で細胞を

刺激するＩＮＦガンマＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより分析した。ｉ．ｐ．、腹腔内；ｉ．ｍ．、筋内。「星」印は、飽和ＥＬＩＳＰＯＴウェルに起因する応答の過小評価を示す。

【図４０】インディアナＶＳＶ－Ｇ又はニュージャージーＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターでの細胞の形質導入のインビトロ中和（細胞は、未感作マウス又はインディアナＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターで以前に免疫化されたマウスからである）。

【図４１】ペプチド（Ａ）を含む免疫優性ＣＤ８エピトープに対する、又は、ペプチド（Ｂ）を含む亜優性ＣＤ８エピトープに対するインビボでの特異的融解。プライミング又はプライミング－ブースト反応を、個別のマウスで、プライミング及びブースト反応において同じＶＳＶ－Ｇエンベロープを有するレンチウイルスベクター又は異なるＶＳＶ－Ｇエンベロープを有するレンチウイルスベクターのいずれかで実施した。

【図４２】ペプチド（Ａ）を含む免疫優性ＣＤ８エピトープに対する、又は、ペプチド（Ｂ）を含む亜優性ＣＤ８エピトープに対する、又はペプチド（Ｃ）を含むＣＤ４に対するＣＴＬ活性を決定するためのＩＦＮガンマＥｌｉｓｐｏｔテスト。プライミング又はプライミング－ブースト反応を、個別のマウスで、プライミング及びブースト反応において同じＶＳＶ－Ｇエンベロープを有するレンチウイルスベクター又は異なるＶＳＶ－Ｇエンベロープを有するレンチウイルスベクターのいずれかで実施した。

【図４３】組込みが欠損したＬＶでの非分裂細胞の効率的な形質導入。アフィジコリン処置ＨｅＬａ細胞を、段階用量（培地１ml当たり１～１００ngのｐ２４抗原）のｅＧＦＰ組込みＬＶ（ｅＧＦＰ－ＩＬＶ）又はｅＧＦＰ非組込みＬＶ（ｅＧＦＰ－ＮＩＬＶ）で形質導入した。形質導入後４８時間目、ｅＧＦＰ発現をフローサイトメトリーにより分析した。上パネルはＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージを示し、下パネルはＧＦＰ陽性細胞のＭＦＩ（平均蛍光強度）を示す。

【図４４Ａ】レンチウイルスベクターの形質導入は、従来型樹状細胞（ｃＤＣ）及び形質細胞様樹状細胞（ｐＤＣ）の両方における効果的な抗原発現をもたらす。（Ａ）ｅＧＦＰ組込みＬＶ（ｅＧＦＰ－ＩＬＶ）もしくはｅＧＦＰ非組込みＬＶ（ｅＧＦＰ－ＮＩＬＶ）での、又は、３００ng/mlの熱不活化（ＨＩ）ｅＧＦＰ－ＩＬＶもしくはｅＧＦＰ－ＮＩＬＶでの用量応答形質導入実験（０～３００ng/ml）。６日目、ＦＬ－ＤＣをベクター粒子に４８時間暴露させ、ＣＤ１１ｃ陽性細胞の形質導入を、フローサイトメトリーによりｅＧＦＰ発現を測定することにより評価した。数字は、ｅＧＦＰを発現するＣＤ１１ｃ細胞のパーセンテージを示す。（Ｂ）ＬＶによるｐＤＣ及びｃＤＣの形質導入。ｃＤＣ（ＣＤ１１ｃ$^{+}$　Ｂ２２０$^{-}$）及びｐＤＣ（ＣＤ１１ｃ$^{+}$　Ｂ２２０$^{+}$）によるｅＧＦＰの発現を示す。細線、対照細胞（Ｃｔｌ）；記入済みプロファイル、３００ng/mlのベクター粒子で形質導入されたＦＬ－ＤＣ。

【図４４Ｂ】レンチウイルスベクターの形質導入は、従来型樹状細胞（ｃＤＣ）及び形質細胞様樹状細胞（ｐＤＣ）の両方における効果的な抗原発現をもたらす。（Ａ）ｅＧＦＰ組込みＬＶ（ｅＧＦＰ－ＩＬＶ）もしくはｅＧＦＰ非組込みＬＶ（ｅＧＦＰ－ＮＩＬＶ）での、又は、３００ng/mlの熱不活化（ＨＩ）ｅＧＦＰ－ＩＬＶもしくはｅＧＦＰ－ＮＩＬＶでの用量応答形質導入実験（０～３００ng/ml）。６日目、ＦＬ－ＤＣをベクター粒子に４８時間暴露させ、ＣＤ１１ｃ陽性細胞の形質導入を、フローサイトメトリーによりｅＧＦＰ発現を測定することにより評価した。数字は、ｅＧＦＰを発現するＣＤ１１ｃ細胞のパーセンテージを示す。（Ｂ）ＬＶによるｐＤＣ及びｃＤＣの形質導入。ｃＤＣ（ＣＤ１１ｃ$^{+}$　Ｂ２２０$^{-}$）及びｐＤＣ（ＣＤ１１ｃ$^{+}$　Ｂ２２０$^{+}$）によるｅＧＦＰの発現を示す。細線、対照細胞（Ｃｔｌ）；記入済みプロファイル、３００ng/mlのベクター粒子で形質導入されたＦＬ－ＤＣ。

【図４５】単回用量のｓＥ$_{ＷＮＶ}$－ＮＩＬＶは、強く特異的な抗体応答を誘発する。成体マウス群に段階用量のｓＥ$_{ＷＮＶ}$－ＮＩＬＶ（１～１００ngのｐ２４抗原）（Ａ、Ｂ）又はｓＥ$_{ＷＮＶ}$－ＩＬＶ（Ｂ）で腹腔内免疫化した。対照マウスに熱不活化ｓＥ$_{ＷＮＶ}$－ＬＶ　ＮＩ（Ａ、Ｂ）又はＩ（Ｂ）（ＨＩ　１００）を注射した。２１日後、プール血清（マウス６匹／群）をＷＮＶ特異的抗体について評価した。

【図４６】ｓＥ$_{WNV}$－ＮＩＬＶ免疫化により与えられるＷＮＶ感染に対する迅速防御。マウス６匹／群に１００ngのｓＥ$_{WNV}$－ＮＩＬＶ又は１００ngの$_{s}$Ｅ$_{WNV}$－ＩＬＶをワクチン接種した。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を接種した対照群のマウスが含まれた。ワクチン接種後１週目、マウスを１，０００ ｉ．ｐ． ＬＤ$_{50}$ｓのＷＮＶ株ＩＳ－９８－ＳＴ１でチャレンジした。生存を２１日間記録した。

【図４７】ＷＮＶ感染に対するｓＥ$_{WNV}$－ＮＩＬＶによる効率的な長期防御。段階用量のｓＥ$_{WNV}$－ＮＩＬＶ（１－１００ngのｐ２４抗原）（Ａ、Ｂ）又はｓＥ$_{WNV}$－ＩＬＶ（Ｂ）での免疫化後２ヶ月目、マウスに１，０００ ｉ．ｐ． ＬＤ$_{50}$ｓのＷＮＶ株ＩＳ－９８－ＳＴ１を接種した。生存を２１日間記録した。

【図４８】ｇａｇΔｍｙｒの発現レベルに及ぼすコドン最適化の影響。２９３ Ｔ細胞を、ｇａｇΔｍｙｒの野生型配列（左パネル）又はコドン最適化配列（右パネル）のいずれかを含むＴＲＩＰベクタープラスミド、キャプシド形成プラスミドｐ８．７ Ｄ６４Ｖ、及びＶＳＶ－Ｇ発現プラスミドでコトランスフェクトした。

【図４９】マウス群（Ｎ＝５）を、ＶＳＶ－ＧインディアナでシュードタイピングされたＴＲＩＰ．ＮＩ ＧＡＧΔｍｙｒ ＣＯ（１００ng）又はＴＲＩＰ．Ｉ ＧＡＧ野生型粒子（１００ng）で免疫化し、又は、免疫化せず（未感作）、そして１３週間後、ＶＳＶ－ＧニュージャージーでシュードタイピングされたＴＲＩＰ．ＮＩ ＧＡＧΔｍｙｒ ＣＯ（１００ng）又はＴＲＩＰ．Ｉ ＧＡＧ野生型粒子（１００ng）でそれぞれブーストした。全てのマウスを免疫化後１０日目に屠殺し、そして、ＧＡＧに対する細胞性免疫応答をＩＦＮ－γ ＥＬＩＳＰＯＴ（Ａ）又は四量体染色（Ｂ）により評価した。

【図５０】利用可能な場合、種々のＶＳＶ－Ｇ血清型（コドン最適化（ＣＯ）又は野生型（ＷＴ））によりシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子のタイトレーション。

【図５１Ａ】血清中和活性の定量化のためのインビトロアッセイ。マウス血清を、異なる血清型のＶＳＶ．Ｇタンパク質によりシュードタイピングされた、１回の注射当たり３００ngのＰ２４レンチウイルスベクター粒子を２ヶ月間間隔で２回注射した動物から採取した。種々の血清型のＶＳＶ．Ｇタンパク質で再びシュードタイピングされたベクター粒子をコードするルシフェラーゼを、血清の希釈物の存在下で、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーション後、レンチウイルスベクター粒子をコードするルシフェラーゼを使用して、１ウェル当たり1ngのＰ２４で９６ウェルプレート中の２９３Ｔ細胞に形質導入した。４８時間のインキュベーション後、ルシフェラーゼ活性を、使用説明書に従って発光検出キット（Boehringer）を使用して測定した。結果は、血清なしでのインキュベーション後、発光活性のパーセンテージとして表わした。

【図５１Ｂ】血清中和活性の定量化のためのインビトロアッセイ。マウス血清を、異なる血清型のＶＳＶ．Ｇタンパク質によりシュードタイピングされた、１回の注射当たり３００ngのＰ２４レンチウイルスベクター粒子を２ヶ月間間隔で２回注射した動物から採取した。種々の血清型のＶＳＶ．Ｇタンパク質で再びシュードタイピングされたベクター粒子をコードするルシフェラーゼを、血清の希釈物の存在下で、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーション後、レンチウイルスベクター粒子をコードするルシフェラーゼを使用して、１ウェル当たり1ngのＰ２４で９６ウェルプレート中の２９３Ｔ細胞に形質導入した。４８時間のインキュベーション後、ルシフェラーゼ活性を、使用説明書に従って発光検出キット（Boehringer）を使用して測定した。結果は、血清なしでのインキュベーション後、発光活性のパーセンテージとして表わした。

【図５２】異なるマウス血清でのレンチウイルスベクター粒子の交差中和：異なるＶＳＶ．Ｇタンパク質でシュードタイピングされたウイルス粒子を、種々のマウス血清の存在下での形質導入実験によりテストする。Ａ：形質導入は、完全に阻害される（＋＋）、部分的に阻害される（＋もしくは＋／－）、又は阻害されない（－）のいずれかである。Ｂ：これらの実験の詳細。

【図５３】種々のサル血清の存在下でのインディアナシュードタイピング粒子の活性。Ａ：免疫化前のサルからの血清、Ｂ：種々の用量でインディアナシュードタイピング粒子を

注射（プライミング）したサルからの血清、及びＣ：ニュージャージーシュードタイピング粒子を注射（ブースト）後のサル血清。
【図５４】種々のサル血清の存在下でのニュージャージーシュードタイピング粒子の活性。Ａ：免疫化前のサルからの血清、Ｂ：種々の用量でインディアナシュードタイピング粒子を注射（プライミング）したサルからの血清、及びＣ：ニュージャージーシュードタイピング粒子を注射（ブースト）後のサル血清。
【図５５】種々のサル血清の存在下でのＣｏｃａｌシュードタイピング粒子の活性。Ａ：免疫化前のサルからの血清、Ｂ：種々の用量でインディアナ・シュードタイピング・レンチウイルスベクター粒子を注射（プライミング）したサルからの血清、及びＣ：ニュージャージー・シュードタイピング・レンチウイルスベクター粒子を注射（ブースト）後のサル血清。
【図５６】種々のサル血清の存在下でのイスファハンシュードタイピング粒子の活性。Ａ：免疫化前のサルからの血清、Ｂ：種々の用量でインディアナシュードタイピング粒子を注射（プライミング）したサルからの血清、及びＣ：ニュージャージーシュードタイピング粒子を注射（ブースト）後のサル血清。
【図５７】種々のサル血清の存在下でのＳＶＣＶシュードタイピング粒子の活性。Ａ：免疫化前のサルからの血清、Ｂ：種々の用量でインディアナシュードタイピング粒子を注射（プライミング）したサルからの血清、及びＣ：ニュージャージーシュードタイピング粒子を注射（ブースト）後のサル血清。
【図５８】ヒト血清中のＶＳＶ．Ｇタンパク質に対する抗体の保有率。ＶＳＶ－Ｇタンパク質に対する中和抗体の存在は、Ａ：ＶＳＶ－Ｇインディアナ、Ｂ：ＶＳＶ－Ｇニュージャージー、Ｃ：ＶＳＶ－Ｇ　Ｃｏｃａｌ、Ｄ：ＶＳＶ－Ｇ　ＳＶＣＶ、及びＥ：ＶＳＶ－Ｇイスファハンでシュードタイピングされた粒子の形質導入アッセイにより、加熱した、又は、加熱しない種々のヒト血清の存在下で決定した。
【図５９Ａ】ヒト血清中のＣｏｃａｌ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質に対する抗体の保有率。９６のヒト血清（加熱した、及び、加熱しない）を、形質導入実験（１／２希釈）において、Ａ：インディアナ、Ｂ：ニュージャージー、Ｃ：Ｃｏｃａｌ、Ｄ：イスファハン、及びＥ：ＳＶＣＶ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質でシュードタイピングされたウイルス粒子の存在下でテストした。これらの実験は各条件について２回行っている。
【図５９Ｂ】ヒト血清中のＣｏｃａｌ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質に対する抗体の保有率。９６のヒト血清（加熱した、及び、加熱しない）を、形質導入実験（１／２希釈）において、Ａ：インディアナ、Ｂ：ニュージャージー、Ｃ：Ｃｏｃａｌ、Ｄ：イスファハン、及びＥ：ＳＶＣＶ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質でシュードタイピングされたウイルス粒子の存在下でテストした。これらの実験は各条件について２回行っている。
【図５９Ｃ】ヒト血清中のＣｏｃａｌ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質に対する抗体の保有率。９６のヒト血清（加熱した、及び、加熱しない）を、形質導入実験（１／２希釈）において、Ａ：インディアナ、Ｂ：ニュージャージー、Ｃ：Ｃｏｃａｌ、Ｄ：イスファハン、及びＥ：ＳＶＣＶ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質でシュードタイピングされたウイルス粒子の存在下でテストした。これらの実験は各条件について２回行っている。
【図５９Ｄ】ヒト血清中のＣｏｃａｌ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質に対する抗体の保有率。９６のヒト血清（加熱した、及び、加熱しない）を、形質導入実験（１／２希釈）において、Ａ：インディアナ、Ｂ：ニュージャージー、Ｃ：Ｃｏｃａｌ、Ｄ：イスファハン、及びＥ：ＳＶＣＶ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質でシュードタイピングされたウイルス粒子の存在下でテストした。これらの実験は各条件について２回行っている。
【図５９Ｅ】ヒト血清中のＣｏｃａｌ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質に対する抗体の保有率。９６のヒト血清（加熱した、及び、加熱しない）を、形質導入実験（１／２希釈）において、Ａ：インディアナ、Ｂ：ニュージャージー、Ｃ：Ｃｏｃａｌ、Ｄ：イスファハン、及びＥ：ＳＶＣＶ　ＶＳＶ．Ｇタンパク質でシュードタイピングされたウイルス粒子の存在下でテストした。これらの実験は各条件について２回行っている。
【図６０－１】ＶＳＶ－Ｇタンパク質を中和する、患者からのヒト血清の分析。血清がＶ

ＳＶ－Ｇタンパク質に対する中和活性を提示する患者を、形質導入アッセイにより検討した（連続希釈中のＡ：インディアナ、Ｂ：ニュージャージー、Ｃ：ＳＶＣＶ、Ｄ：Ｃｏｃａｌ、及びＥ：イスファハン粒子）。
【図６０－２】ＶＳＶ－Ｇタンパク質を中和する、患者からのヒト血清の分析。血清がＶＳＶ－Ｇタンパク質に対する中和活性を提示する患者を、形質導入アッセイにより検討した（連続希釈中のＡ：インディアナ、Ｂ：ニュージャージー、Ｃ：ＳＶＣＶ、Ｄ：Ｃｏｃａｌ、及びＥ：イスファハン粒子）。
【図６１】異なるＶＳＶ－Ｇエンベロープによりシュードタイピングされたベクター粒子が、ｍＤＣｈに融合する、又は、融合しない能力。ヒト単球由来ＤＣ（ｍＤＣ）を、インディアナ、ニュージャージー、イスファハン、ＳＶＣＶ、Ｃｏｃａｌ及びチャンディプラのＶＳＶ－ＧエンベロープによりシュードタイピングされたＧＦＰベクター粒子で形質導入した。形質導入後５日目、ｍＤＣをフローサイトメトリーにより分析し、力価を決定した。相対力価を、ｍＤＣで決定した力価と２９３Ｔ細胞において決定した力価の間の比率として表わす。
【０２５４】
ＨＩＶ感染に対するワクチン接種の例示のためのモデルとして、ＳＩＶ感染に対するワクチン接種戦略におけるＴＲＩＰレンチウイルスベクターの適用。
Ｉ．ＴＲＩＰベクターがマウスモデルにおいて抗ＳＩＶ特異的Ｔ細胞応答を誘導する潜在能力。
ＶＳＶウイルスに由来するエンベロープタンパク質を持つレンチウイルスベクターを改変して、免疫応答をブーストできるか否かを決定するために、本発明者は、交差反応性がないと予測される様々なＶＳＶ血清型からの糖タンパク質を発現するレンチウイルスベクターに基づく新たなベクター戦略を開発した。
【０２５５】
水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）の分離株は、ラブドウイルス科中のベシクロウイルス属に属するエンベロープ化した非セグメント化マイナス鎖ＲＮＡウイルスである。ＶＳＶは、ウシ、ブタ及びウマなどの家畜に感染し、舌、口腔組織、乳房及び蹄において水疱性病巣の原因となる。ＶＳＶゲノムは宿主細胞の細胞質に送達され、レセプター媒介性のウイルス粒子のエンドサイトーシス及びそれに続くウイルスエンベロープとエンドソーム膜とのｐＨ誘導性融合を経て複製が起こる。ＶＳＶ　Ｇタンパク質は、唯一のウイルス表面糖タンパク質であり、付着及び融合に必要とされる。ＶＳＶの２つの主な血清型、インディアナ及びニュージャージーが存在し、Ｇ糖タンパク質に対する中和抗体により区別する。それらの抗原構造に加えて、インディアナ及びニュージャージー糖タンパク質は、アミノ酸の数（それぞれ５１１及び５１７）及び組成（わずか５０％の同一性）、翻訳後修飾、及び折り畳みにおいても異なる。対応して、インディアナ及びニュージャージー株は、ＶＳＶ病原性に関して等しく重要ではない。ニュージャージー株が原因の大流行は、インディアナ株が原因のものよりも高頻度で、重篤である。
【０２５６】
材料及び方法
マウス。雌Ｃ５７ＢＬ／６マウス（elevage Janvier, France）をPasteur Instituteの施設で飼育した。
【０２５７】
細胞培養。ＨｅＬａ（ECACCで入手可能なヒト子宮頸部腺癌）及びヒト胚性腎細胞２９３Ｔ細胞（ATCCで入手可能）は、レンチウイルスベクター産生に使用され、１０％熱不活化ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）及び抗生物質（ペニシリン－ストレプトマイシン）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）Glutamax（GIBCO）中で増殖させた。
【０２５８】
ベクターの構築及び産生
【０２５９】
ベクタープラスミドｐＴＲＩＰ．ΔＵ３．ＣＭＶ．ＳＩＶｍａｃ２３９ｇａｇΔｍｙｒ

は、サイトメガロウイルス前初期プロモーター（ＣＭＶｉｅ）の制御下に非ミリストイル型のＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇ配列を含む。
ベクター粒子を、ベクタープラスミド、キャプシド形成プラスミド（ｐ８．７）、及びＶＳＶ－Ｇエンベロープ発現プラスミド、インディアナ血清型（ｐＨＣＭＶ－Ｇ）（１０）対ニュージャージー血清型（ｐｃＤＮＡ３．１（－）ＮＪ－Ｇ）（Invitrogenから入手可能な市販ｐｃＤＮＡ３．１プラスミドに由来する）での２９３Ｔ細胞の一過性リン酸カルシウムコトランスフェクションにより産生した。タンパク質配列を図３に開示する。
【０２６０】
クローニング戦略には以下の工程が包含された：ニュージャージーＶＳＶ血清型（ｐＢＳ　ＶＳＶ－Ｇ　ＮＪ）からの糖タンパク質からの遺伝子を含むプラスミドが使用されている。
それを、ＸｈｏＩ／ＮｏｔＩ消化後、ｐｃＤＮＡ　３．１（－）ベクター（Invitrogen）中へクローン化した。この方法により由来するプラスミドをｐｃＤＮＡ３．１（－）ＶＳＶ－Ｇ　ＮＪと名付けた。
ＷＰＲＥ配列（ウッドチャック肝炎ウイルスのポスト調節エレメント）（１１）は、遺伝子発現を有意に増加させることが知られている転写後調節エレメントである。それをＴＯＰＯ（登録商標）クローニングベクター（Invitrogen）中へクローン化した。
ＷＰＲＥ配列を、ＥｃｏＲＩ消化及び脱リン酸化後のｐｃＤＮＡ３．１（－）ＶＳＶ－Ｇ　ＮＪ中へクローン化した。この方法により由来するプラスミドをｐｃＤＮＡ３．１（－）ＶＳＶ－Ｇ　ＮＪ　ＷＰＲＥと名付けた。
ＷＰＲＥ：濃縮ベクター粒子のｐ２４抗原含量の定量化は、市販のＨＩＶ－１　ｐ２４ＥＬＩＳＡキット（Perkin-Elmer Life Sciences）で行った。ベクターストックのタイトレーションのために、２９３Ｔ細胞を様々なベクター濃度で７２時間にわたり形質導入し、そして溶解させた。溶解液をＲＮａｓｅ及びプロテイナーゼＫで処理し、その後、定量的ＰＣＲ（Lightcycler）に使用した。
【０２６１】
インビトロ形質導入阻害アッセイ。ＨｅＬａ細胞を、９６ウェルプレート当たり１０，０００個細胞で蒔いた。１日後、細胞を、１：６に希釈した脱補体化マウス血清との３０分間のプレインキュベーション後、ｅＧＦＰ（増強ＧＦＰ（ｅｎｈａｎｃｅｄ　ＧＦＰ））をコードし、ＶＳＶインディアナ又はニュージャージー血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターで形質導入した。マウスは、未感作マウス、又は、非ミリストイル化形態のＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇをコードし、ＶＳＶインディアナ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされた０．２５　10^7形質導入単位（TU）のレンチウイルスベクターで１回免疫化されたマウスのいずれかであり、免疫化後１４日目に放血させた。７２時間後、形質導入をフローサイトメトリーによりアッセイした。形質導入中和のパーセンテージを、血清の非存在下での形質導入と比較して算出した。
【０２６２】
マウスの免疫化。全ての動物実験を、Pasteur InstituteのOffice Laboratory of Animal Careのガイドラインに従って実施した。９週齢のマウスを、０．２mlのダルベッコＰＢＳ中の０．２５　10^7形質導入単位（TU）のｐＴＲＩＰ．ΔＵ３．ＣＭＶ．ＳＩＶｍａｃ２３９ｇａｇΔｍｙｒベクター粒子で、０日目、そしてその後、２１日目と、２回腹腔内（ｉ．ｐ．）接種した。マウスを１４日目に放血させた。免疫応答を２８日目に分析した。
【０２６３】
プライミングのために、非ミリストイル化形態のＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇをコードし、ＶＳＶインディアナ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを投与したのに対し、ブーストのために、同じであるが、しかし、ＶＳＶニュージャージー血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたベクターを注射した。

【０２６４】
比較は、ＶＳＶインディアナ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターの２回の続く注射を使用した同種のプライミング／ブースト戦略で行った。対照として、一次（７日目）及び記憶（２８日目）応答を、ＶＳＶインディアナ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターの単回注射後に特性付けした。ＶＳＶニュージャージー血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターで１回だけ免疫化されたマウスの一次（７日目）応答もアッセイした。
【０２６５】
ＩＦＮ－γ　Ｅｌｉｓｐｏｔアッセイ
ニトロセルロースマイクロプレート（MAHA S4510、Millipore）を捕捉抗体（Mouse IFN-γ Elispot pair、BD Pharmingen）で一晩コーティングし、１０％　ＦＣＳ、抗生物質、ＨＥＰＥＳ、非必須アミノ酸、ｂ－メルカプトエタノール、及びピルビン酸ナトリウムを添加したＲＰＭＩ１６４０　Ｇｌｕｔａｍａｘで構成される完全培地でブロックした。ベクター免疫化マウスからの脾細胞を３枚のプレートに０．２５×10^6個細胞／ウェルで加え、ＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇペプチド（NIH AIDS Research and Reference Reagent Program）、コンカナバリンＡ（１μg/ml）で刺激した。４０時間後、スポットを、ビオチン抱合抗体（Mouse IFN-γ Elispot pair、BD Pharmingen）、続いてストレプトアビジン－ＡＰ（Roche）及びＢＣＩＰ／ＮＢＴ基質溶液（Promega）で明らかにした。スポットをBioreader 2000（Biosys, Karben, Germany）を使用してカウントし、結果を脾細胞１００万個当たりのＩＦＮ－ｇスポット形成細胞（ＳＦＣ）として表わした。
【０２６６】
インビボ細胞毒性アッセイ
標的細胞の調製のために、未感作マウスからの脾細胞を種々の濃度（高、５μＭ；中、１μＭ；低、０．２μＭ）のＣＦＳＥ（カルボキシフルオセイン二酢酸スクシンイミジルエステル、Vybrant CFDA-SE cell-tracer kit、Molecular Probes）で標識した。脾細胞をその後、５μg/mlのペプチドでパルスした。各マウスは、後眼窩静脈を通じて、各分画からの等しい数の細胞を含む混合物の10^7個のＣＦＳＥ標識細胞を受けた。１５～１８時間後、脾臓からの単一細胞の懸濁液をフローサイトメトリー（Becton Dickingson、CellQuest software）により分析した。ペプチドパルスした細胞の消失を、免疫化マウス対未感作マウスにおいてパルス集団（高／中ＣＦＳＥ蛍光強度）と非パルス（低ＣＦＳＥ蛍光強度）集団の比率を比較することにより決定した。特異的な死滅のパーセンテージを以下の計算に従って定めた：［１－［（$CFSE_{low}$naive／$CFSE_{high/medium}$naive）／（$CFSE_{low}$immunized／$CFSE_{high/medium}$immunized）］］×１００。
【０２６７】
結果（図４０～４２）
本発明者は、ＶＳＶインディアナ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされた低用量（０．２５　１０ｅ7TU/マウス、このバッチについて６５０ngのｐ２４に相当する）のレンチウイルスベクターで１回だけ免疫化されたマウスが、同じエンベロープでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターでの細胞のインビトロ形質導入を中和する強い液性応答を確かに発生することを初めて示した。それとは逆に、検出可能なＶＳＶニュージャージー血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたベクターによる形質導入は低い血清中和だけであった。
【０２６８】
非ミリストイル化形態のＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇをコードし、ＶＳＶインディアナ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを使用した予備用量応答実験によって、免疫応答を特性付けし、免疫優性ＣＤ８エピトープ（ＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇ：３０９－３２３（ＱＴＤＡＡＶＫＮＷＭＴＱＴＬＬ））ならびに亜優性ＣＤ８エピトープ（ＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇ：７３－９７（ＥＮＬＫＳＬＹ

ＮＴＶＣＶＩＷＣ））を含むペプチドを同定することが可能になった（データ示さず）。０．４５　１０^{7}TU/マウスという低い用量は、免疫優性ＣＤ８エピトープ含有ペプチドについてほぼ１００％の特異的溶解を伴う１００％応答マウスのプラトーに達するために十分であった。対照的に、高用量（最高２３　１０^{7}TU/マウスまで）であっても、亜優性ＣＤ８エピトープ含有ペプチドの場合において１００％のインビボ細胞溶解活性を刺激するために十分ではない。

【０２６９】

並行して、同じ抗原をコードするアデノウイルスベクターを使用して最近発表された論文では、ＣＤ４エピトープを含むペプチドが特性付けされた（ＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇ：２９７－３１１（ＹＶＤＲＦＹＫＳＬＲＡＥＱＴＤ））。

【０２７０】

従って、応答マウスの数及び応答の大きさの両方に関してブースト効果を検出できるようにするために、これらの３つのペプチドに対する免疫をモニターし、そして、最適以下の用量のベクター（０．２５　１０^{7}TU/マウス）でマウスを免疫化することを選んだ。

【０２７１】

ＩＩ　－　非ヒト霊長類モデルにおけるＳＩＶＭＡＣに対する防御応答

序論

１．ＨＩＶ感染及びＡＩＤＳ

１．１．ＨＩＶ及びその影響

１．１．１．疫学

後天性免疫不全症候群の最初の症例が１９８１年に報告されて以来、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）の世界的広がりは大流行の割合に達しており、現在、世界的な発生及び公衆衛生上の脅威を表わす（Girard et al., 2006）。実際に、世界中でＨＩＶを伴い生きている人々の数は、今日、約３９５０万であり、依然として指数関数的に増加しており、前年では４３０万の人々が感染し、毎日１４，０００の人々が感染している（ｈｔｔｐ／／ｗｗｗ．ｕｎａｉｄｓ．ｏｒｇ）。

【０２７２】

１．１．２．ＨＩＶの生物学

感染の生理病理学は、ＨＩＶの特徴と直接的に相関する。このウイルスは、レトロウイルス科、レンチウイルス属に属する。それは直径約１１０～１２０nmのエンベロープウイルスである。ｇｐ１２０糖タンパク質はウイルス向性に関与する；実際に、それによって細胞レセプターＣＤ４及びコレセプターＣＣＲ５又はＣＸＣＲ４への固定を可能にし、このようにしてＣＤ４＋リンパ球をその主な標的細胞にする。ひとたびウイルスがＣＤ４$^{+}$リンパ球に付着すると、ウイルスサイクルが２つの主な工程に分けられる；初期工程及び後期工程。細胞質中で、ウイルスＲＮＡはウイルスキャプシド内で二本鎖に逆転写され、そして、核に能動輸送され、そこで細胞ゲノムに組込むことができる（Arhel et al., 2007）。ウイルスＤＮＡの転写及びウイルスｍＲＮＡの翻訳によって新たなウイルス粒子の形成が可能になる。

【０２７３】

ＡＩＤＳの病原性に関する大半の研究が、非ヒト霊長類において、ＨＩＶサル等価物：ＳＩＶで行われる。実際に、ＳＩＶウイルス構造及び生物学は、ＨＩＶのものと密接に関係する。

【０２７４】

１．１．３．ＨＩＶ感染の生理病理学

疾患進行は、血漿ＨＩＶ－１　ＲＮＡ及びＣＤ４＋リンパ球の組み合わせ測定により正確に定義される。自然ＨＩＶ感染は３つの主な時期に分けることができる：初感染又は急性感染で、ウイルス負荷のピーク（約１０^{6}コピーＲＮＡ/ml血液）及び迅速であるが、一過性の循環Ｔ　ＣＤ４$^{+}$の減少により特徴付けられる（Weber, 2001）。さらに、感染のこの初期段階で、ＨＩＶ特異的ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞はウイルスの主な標的であり、任意の処置の非存在下で優先的に破壊される（Rosenberg et al., 2000）。しかし、ウイルス負

荷のこの増加は、一般的に、特異的な免疫応答、主に細胞性応答により十分に制御される。実際に、ＨＩＶ特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞の出現と一次ウイルス血症の低下の間の一時的な相関関係の証拠が存在する（Koup et al., 1994）。結果として、Ｔ　ＣＤ４$^{+}$数が高レベル（感染前の数に劣る）に戻り、ウイルス血症が安定化する（１０^{3}～１０^{6}　ＲＮＡコピー/ml）：セットポイント（ＳＰ）に達する；そのレベルはしばしば疾患の進化と相関する（Mellors, 1996）。感染個体はその後、無症候期間に入り、それはおよそ数ヶ月から数年持続しうる。この期間は、免疫システムとＨＩＶ複製の間の平衡に起因する、循環ＣＤ４$^{+}$数の遅い線形の減少により特徴付けられる。処置の非存在下で、この無症候時期の後にＡＩＤＳが続く。この時点で、ウイルス血症は進行的に高レベルに戻り、ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞欠乏の傾きでの感染が観察される（２００個細胞/mm^{3}血液に劣るＣＤ４カウント）。最終的に、免疫システムが崩壊し、通常は完全に制御される、又は、容易に取り除かれる病原物質が潜在的に致死的となる。

【０２７５】

２．医学的処置

２．１．単剤療法からＨＡＡＲＴ

疾患のＡＩＤＳへの進行を遅らせるために、新医薬が１９８６年に発売された。それらは抗レトロウイルス薬品と呼ばれ、それらの目的はＨＩＶ複製を阻止して、ひいてはＣＤ４＋　Ｔ細胞欠乏を遅らせる。これらの薬品で最も有名なのは間違いなくＡＺＴ（Zidovudine）、即ち、ウイルス逆転写酵素のインヒビターであった。しかし、この単剤療法アプローチは、最終的に、効果が限られていることが見出された。なぜなら、ＨＩＶは、あらゆる抗レトロウイルス医薬に耐性を（突然変異を通じて）迅速に発生する潜在能力を有するウイルスであるからである。１９９６年、ＲＴの新たなインヒビターが市販された；それらはＡＺＴ様インヒビターとは化学的に異なった。最終的に、新たなクラスのＨＩＶ医薬が１９９５年に現れた（プロテアーゼインヒビター（ＰＩ））。今日、抗ＨＩＶ治療の「スタンダード」である組み合わせは、高活性抗レトロウイルス療法（ＨＡＡＲＴ）と呼ばれ、３クラスの抗レトロウイルス医薬の組み合わせからなり、通常は２つの異なるＲＴインヒビター及び１つのＰＩである。ＨＡＡＲＴによって、強力な持続性のウイルス負荷の減少が可能になり（図５Ｂ）、患者の大半で、血液中のウイルスコピーはさらに検出不可能になりうる（Gulick et al., 2000）。結果として、ＣＤ４カウントが増加し、免疫システムが部分的に回復し、日和見病原体を再び押し戻すことができる（Autran et al., 1997）。処置を利用可能な患者では、ＨＡＡＲＴによってＡＩＤＳ関連の罹患率の目覚ましい低下が可能になっている（Palella et al., 1998）。

【０２７６】

２．２．ＨＡＡＲＴ限界

ＨＡＡＲＴでの成功には反論の余地はないが、それはいくつかの限界を提示し、その長期使用に関して疑問が生じうる。まず第１に、ＨＡＡＲＴ処置は現実には費用がかかり、依然として開発途上国では利用できない。また、これらの医薬の毒性は比較的高く、それらはしばしば主な副作用（糖尿病、脂肪異栄養症、下痢、頭痛・・・）の引き金となる。さらに、ＨＩＶがＨＡＡＲＴ処置に対する耐性を発生できたことが示されている。突然変異はしばしば処置により制約された領域中に現れる。ＨＡＡＲＴ処置は、また、ＨＩＶ抗原の産生を、見掛け上、ＨＩＶ特異的エフェクターＴ細胞を刺激するため、又は、ＨＩＶ特異的な未感作Ｔ細胞を増大させるために必要とされる未満の閾値まで制限する。ＨＩＶへの免疫記憶は、しかし、依然として持続する。免疫システムを処置中断後にウイルスへ再暴露させた時のＨＩＶへのＣＤ４及びＣＤ８免疫応答の一過性の回復により示唆される通りである（Autran et al., 2004）。

【０２７７】

２．３．ＨＩＶワクチン接種

２．３．１．予防的／治療的ワクチン

薬品の効率は依然として限定され、ＨＡＡＲＴは生涯にわたる治療であり、大半の第三世界の環境において費用がかかり過ぎ、困難であるため投与できないはずであるため、永

続的にＡＩＤＳの発症を予防するための他の戦略を見出さなければならない。ＨＩＶワクチンの開発は、大流行を遅らせる唯一の方法を表わしうる。ワクチン接種の２つの異なる戦略がテストされている。一方で、予防的ワクチンは殺菌免疫を誘導できるはずであり、感染及びその合併症の両方を予防しうる。そのようなワクチンはウイルスの侵入時、及び、感染の非常に初期段階、ウイルスがリンパ器官に播種できる前に、機能することが可能であるはずである。他方で、治療的ワクチンがＨＡＡＲＴ処置下の慢性感染患者のためにデザインされている（Autran et al., 2004）。それは、最初にＨＡＡＲＴで患者を処置し、免疫能力を回復させ、その後、免疫化し、続いて、処置を中断する前にＨＩＶに対する静止免疫応答をブーストさせることからなりうる。最終的に、ウイルスの免疫制御を増強できる場合、疾患進行は減弱されて、処置中断を、そして結果的にＨＡＡＲＴの使用の制限を可能にして、このようにしてそれらの毒性及びコストを最小限にする。

【０２７８】

２．３．２．現在のＡＩＤＳワクチン研究の状況

何の戦略を選ぼうと、ワクチン開発は膨大な科学的困難、例えば、ウイルスの高い遺伝的変動性、既存の動物モデルでの防御及び制限の免疫相関の欠如などに直面している。今まで、５０を上回るワクチン候補がＩ／ＩＩ相臨床試験でテストされている（www.iavi.org）（進行中の抗ＨＩＶ－１試験の概要については添付文書１を参照のこと）。複数のワクチン接種戦略が今までにテストされている（Tonks, 2007）。最初に、従来の弱毒生ワクチンを、天然痘、ポリオ、又は麻疹に対するそれらの過去の成功のため、テストした。Ｎｅｆ遺伝子（ＳＩＶ－Δｎｅｆ）中の欠失を伴う弱毒生ワクチンは、ＳＩＶ／マカクモデルにおける最も効果的なワクチンである。しかし、その適用は制限され、なぜなら、ワクチンウイルスは低レベルで、無制限にワクチン接種マカク中で持続し、新生児の病原となりうる。また、ＳＩＶ－□ｎｅｆは、ワクチン接種後数年間は成体で疾患の原因となりうる。しかしながら、これらの弱毒生ワクチンは、ＨＩＶワクチン開発の実施可能性のための原理の決定的な証拠を提供し、防御免疫の性質の特性付けを可能にする（Koff et al., 2006）。別の従来のワクチン戦略は、広範で持続性の中和抗体を誘導し、ウイルスの侵入を無効にし、感染を予防した。この目的のために、サブユニットワクチンを開発した。それらはＨＩＶタンパク質又はペプチドで構成され、しばしば組換えであった。本発明者は、ミョウバン中で投与した単量体ｇｐ１２０をベースとするワクチンで、米国で第ＩＩ相において評価した、ＶａｘＧｅｎ試験を引用できる。しかし、これらのサブユニットワクチン試験のいずれも、ワクチン接種体においてＨＩＶ感染の統計的に有意な低下は示さなかった。ワクチン誘発性応答は有望な結果を与えなかったため、研究者らは代わりに細胞媒介性の治療群に変えている。実際に、ＣＤ８＋細胞傷害性エフェクターＴ細胞によってそれらのクラスＩ　ＭＨＣ分子上にウイルス粒子を呈する感染細胞を取り除くことができることが以前に示された。さらに、ＣＤ８＋　Ｔ細胞はＳＩＶ及びＨＩＶ感染を制御する際に重要であることが知られている。なぜなら、（ｉ）サルでの慢性ＳＩＶ感染中のＣＤ８＋　Ｔ細胞の欠乏によりウイルス負荷が増加する（Jin et al., 1999）、（ｉｉ）クラスＩ　ＨＬＡ遺伝子座が異種であるＨＩＶ陽性患者はより遅い疾患進行速度を有し（Carrington et al., 1999）、及び（ｉｉｉ）ウイルスはＣＤ８＋　Ｔ細胞エピトープ中に突然変異を蓄積する（Goulder and Watkins, 2004）からである。Ｔ細胞応答を刺激するワクチンは、従来の方法では感染を予防しえないが、しかし、少なくともＡＩＤＳの発症を予防するには十分に長期間にわたりそれを抑制できうる。Ｔ細胞ワクチンのうち、ＤＮＡワクチンが、現在、第Ｉ相試験において、プラスミドによりコードされる単離ＨＩＶ遺伝子を使用して見出されるが、しかし、免疫原性の問題に直面している。Ｔ細胞応答を誘発するために最も共通して使用される戦略は、組換えベクターの１つである。それは、単離ＨＩＶ遺伝子をヒト細胞中へ輸送するためのウイルスベクター（ポックス、ワクシニア、又はアデノウイルスに由来する）の使用からなる。

【０２７９】

最後に、また、樹状細胞ベースのワクチン接種技術に言及する価値があり、ＳＩＶチャレンジに対するその結果は非常に有望であった。それは、化学的不活化ＳＩＶ（アルドリ

チオール－２、ＡＴ－２で不活化）でパルスされた自己樹状細胞（ＤＣ）でマカクを免疫化することからなる。

不活化ウイルスは逆転写できず、しかし、ウイルス粒子はそれらのインタクトな構造及び全ての融合能力の大半を保存する。この技術をさらにテストし、慢性感染させた非処置ヒトにおいて、不活化自己ＨＩＶでパルスした自己ＤＣで成功した（Andrieu and Lu, 2007）。その効率にもかかわらず、この技術はかなり費用がかかり、時間がかかる。

【０２８０】

２．３．３．事前のワクチン戦略により遭遇する問題

多くの型のワクチンがテストされており、依然としてテスト中であるが、それらのいずれも今日まで完全に成功していない。実際に、ウイルス負荷に及ぼす長期効果は、ＣＴＬ特異的応答が刺激された場合でさえ、ＤＮＡワクチンでは観察されていない。液性応答を誘発するワクチンはウイルスの膨大な変動性を受け、抗体が生成された場合でさえ、それらはＨＩＶの遺伝的多様性に対処できるほど万能では決してなかった。ＨＩＶ感染個体の中和モノクローナル抗体での受動免疫化でさえ失敗し、ＨＩＶ－１感染の制御における液性免疫の限界を明確に示した（Trkola et al., 2005）。ポックスベクターでは、特異的なＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞応答の誘発に成功したが、しかし、何週間ものＨＡＡＲＴ中断後でのウイルス負荷の良好な制御は可能にしなかった。結果的に、他のワクチン接種戦略をテストする必要がある。本発明者らは、本明細書において、候補ワクチンとしてＨＩＶ－１に由来するレンチウイルスベクター（ＬＶ）の使用に基づく、新たなＨＩＶ－１ワクチン戦略をテストすることを提案する。

【０２８１】

３．ＨＩＶワクチン接種のための候補としてのレンチウイルスベクター

３．１．レンチウイルスベクターの技術

ＬＶは２０年前に最初に記載された（Poznansky et al., 1991）。組換えベクターとして、ＬＶはトランスジーン（８－１０kbまで）を宿主細胞のＤＮＡ中へ組込むことができる。ＨＩＶ－１由来ベクター及び全てのＬＶの独自の特殊性は、非分裂細胞に形質導入するそれらの能力である。実際に、レンチウイルスなどのＬＶは、細胞有糸分裂に非依存的に組込むことができる。この能力は、宿主細胞の核膜を通じたウイルスＤＮＡ（又はベクターＤＮＡ）の能動的核内輸送に由来する。この能動的核内輸送についての１つの説明は、ｐｏｌ配列中の２つのシス活性配列を経たＤＮＡ　Ｆｌａｐ又はＴｒｉｐｌｅｘと呼ばれる、独自の三本鎖ＤＮＡの形成である：実験室で発見されたｃＰＰＴ（セントラルポリプリントラクト）及びＣＴＳ（セントラルターミネーション配列）（Zennou et al., 2000）。

【０２８２】

本発明者らのワクチンプロジェクトでは、共通してＴＲＩＰと名付けられたＨＩＶ－１由来ＬＶを使用する（なぜならそれは中央ＤＮＡ　Ｆｌａｐ／Ｔｒｉｐｌｅｘ構造を含む）。このベクターは、第三世代ＬＶに属し、デザイン、産生、形質導入効率、及びバイオセイフティーのパラメーターの点で最適化されている（Delenda, 2004）。

【０２８３】

ＨＩＶ－１を遺伝子導入ベクターとして使用することの１つの主な関心は、レトロウイルスは、プラス鎖ＲＮＡウイルス又はＤＮＡウイルスとは対照的に、直接的な感染性がないことである。実際に、プラス鎖ＲＮＡゲノムは、インビボで逆転写ならびにウイルス複製及び病原性を開始するための多くのアクセサリータンパク質を必要とする。しかし、遺伝子導入ベクターとして使用するために、ＨＩＶ－１ゲノムを、トランスジーンの発現及びパッケージングに必要な最小限の配列に減らしている（図８）。トランスジェニック発現カセットに必要なシス作用配列は以下のものである：

【０２８４】

ＬＴＲ配列（末端反復配列）は、逆転写、ウイルスＤＮＡ組込み、及び転写に必要とされる。この３’ＬＴＲは、２つの主な理由のため、遺伝子導入に必要な機能を混乱させることなくＵ３領域中で欠失させている：第１に、ひとたびＤＮＡがゲノム中に組込まれた

ら、宿主細胞のトランス活性化を回避するため、第２に、レトロ転写後にウイルスシス配列の自己不活化を可能にするためである。このように、標的細胞において、内部プロモーターからの配列だけが転写される（トランスジーン）（図９）。

【０２８５】

Ψ領域がウイルスＲＮＡキャプシド形成に必要である。

【０２８６】

ＲＲＥ配列（ＲＥＶ応答性エレメント）によって、Ｒｅｖタンパク質の結合後、核から細胞質へのウイルスメッセンジャーＲＮＡの搬出が可能になる。

【０２８７】

ＤＮＡ　Ｆｌａｐ配列（ｃＰＰＴ／ＣＴＳ、通常Ｐｏｌ中に含まれる）によって核内輸送が促進される。

【０２８８】

ＷＰＲＥシス活性配列（ウッドチャックＢ型肝炎ウイルスのポスト応答性エレメント）も加えて、ｍＲＮＡの安定性を最適化する（Zufferey et al., 1999）。ＷＰＲＥは翻訳されない。

【０２８９】

目的の遺伝子（即ち、抗原をコードする）を、強い、及び、しばしば偏在性のプロモーターの制御下にある導入ベクタープラスミド中に挿入する。

【０２９０】

ウイルス粒子（ＲＮＡ、キャプシド、及びエンベロープ）を生成するために、特定のＨＩＶ－１ヘルパーパッケージングタンパク質を産生細胞内に同時に持ち込まなければならない。それらは、パッケージング又はキャプシド形成プラスミド及びエンベロープ発現プラスミドと呼ばれる２つの追加プラスミドによりコードされる。パッケージングプラスミドは、ウイルス粒子合成に必須のウイルスタンパク質だけをコードする。プラスミド中でのその存在によって安全性の懸念を生じうるアクセサリー遺伝子は、除去した。トランスで持ち込むウイルスタンパク質はそれぞれ以下である：

【０２９１】

マトリクス（ＭＡ、ｐ１７）、キャプシド（ＣＡ、ｐ２４）、及びヌクレオキャプシド（ＮＣ、ｐ６）の構築のためのｇａｇタンパク質。

【０２９２】

ｐｏｌコード酵素：インテグラーゼ、プロテアーゼ、及び逆転写酵素。

【０２９３】

Ｔａｔ及びＲｅｖコード調節タンパク質、ＴａｔはＬＴＲ媒介性転写の開始に必要である。

【０２９４】

ウイルス粒子中のこれらの生成ｍＲＮＡの任意のパッケージングを回避するために、Ψ領域を除去した。異種プロモーターを選んで、組換えの問題を回避した。

【０２９５】

エンベロープ発現プラスミドは、ＨＩＶ－１自然ｅｎｖタンパク質（ｇｐ１２０、ｇｐ４１）をコードしない。実際に、これらのタンパク質は不安定すぎるため、ベクター粒子の超遠心分離による効率的な産生及び濃縮を可能にしない。さらに、ＨＩＶ－１のｅｎｖタンパク質は限られた向性を有する（ＣＤ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ４）。これらの問題に対応するために、ＬＶ産生ではシュードタイピングと呼ばれるプロセスを使用する。それは、異種エンベロープ糖タンパク質でウイルス粒子を生成することにある。ＬＶをシュードタイピングするための第１の依然としてもっとも広く使用される糖タンパク質は、インディアナ血清型からの水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質Ｇ（ＶＳＶ－Ｇ）である。ＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされたベクターは、ＶＳＶ－Ｇが細胞上の偏在性の細胞性受容体と相互作用し、広範な宿主細胞の範囲を伴うベクターを賦与する点で、重要な利点を提供する。さらに、ＶＳＶ－Ｇは高いベクター粒子の安定性を与え、ウイルス粒子の下流でのプロセシングを可能にする：主に超遠心分離による濃縮。

【０２９６】
３．２．なぜレンチウイルスベクターはＨＩＶ－１に対するワクチン接種のための有望な候補なのか？
３．２．１．ＤＣの形質導入
ＬＶは最初に遺伝子治療において使用された。遺伝子導入システムとしてのそれらの独自の能力は今日否定できない。
【０２９７】
第１に、アデノウイルス及びワクシニアウイルス由来ベクターとは対照的に、レンチウイルス属ウイルスに対するヒトにおける既存の免疫が存在しない。それらの出現以降、ＬＶは、遺伝子治療プロトコールとの関連で、肝臓、脳、及び樹状細胞（ＤＣ）を含む、治療的に重要な多種類の細胞及び組織においてインビトロでテストされ、成功している。
【０２９８】
ＤＣは抗原提示細胞（ＡＰＣ）の異種グループであり、先天性免疫において、ならびに、適応免疫応答の開始において重要な役割を果たす。ＤＣは、抹消組織中で抗原を持続的に捕捉することにより、免疫システムのセンチネルとして作用する。ひとたび微生物産物又は炎症シグナルにより活性化されると、それらは成熟化を受け、排出リンパ組織に移り、そこでは、続いて、ＭＨＣ　Ｉ及びＩＩに関連する捕捉抗原をプロセシングし、ＣＤ８＋及びＣＤ４＋　Ｔ細胞に提示する。興味深いことに、ＬＶにより効率的に形質導入できた細胞型のうち、有糸分裂活性の低いヒトＣＤ３４＋及び単球由来のＤＣならびにマウス骨髄由来ＤＣが見出された。ＬＶによるインビトロ形質導入は、それらの生存率に影響を及ぼさなかった。最終的に、ＤＣの安定的な形質導入によって、細胞の全寿命中での抗原の内因性の提示が可能になる。このように、ＬＶは良好な候補ワクチンとなる。
【０２９９】
３．２．２．ワクチン接種の目的のためのＬＶの使用の歴史
トランスジェニックタンパク質の効率的な発現の他、インビトロで、ＬＶで形質導入したＤＣは、タンパク質に由来するペプチドを効率的にプロセシングし、提示することが示された。実際に、ヒト及びマウスのいずれのレンチウイルス形質導入ＤＣも、インビトロで特定のＴ細胞株又はクローンを再刺激できた。より重要なことに、いくつかのグループによって、ヒトＤＣを使用した場合、関連抗原に対する未感作Ｔ細胞のインビトロでのプライミングが報告された。
【０３００】
多くのグループが、その後、インビボ、主にマウスモデルにおいて、またより最近では霊長類モデルにおいて、免疫療法薬としてのレンチウイルス形質導入ＤＣの使用を評価した。それは、エクスビボのレンチウイルス形質導入ＤＣで動物を免疫化すること、そして、結果として得られるＣＤ８＋　Ｔ細胞応答をインビトロで分析することにある。可能な場合、防御の能力は、チャレンジに関連して、インビボでもテストした。これらの試験の大多数で、モデルとして腫瘍抗原が使用され、腫瘍細胞を除去するための誘導ＣＴＬ応答の能力がテストされた。ごく少数の研究チームが、ウイルス感染に対するエクスビボのレンチウイルス形質導入ＤＣの適切性を証明している。Zarei et al.は、例えば、ウイルス糖タンパク質をコードするＬＶで形質導入したＤＣで免疫化されたマウスにおけるＬＣＭＶチャレンジに対する防御の能力を実証した（Zarei et al., 2004）。
【０３０１】
しかし、この技術は、ヒトのワクチン接種プロトコールにおける適用が困難に思われ、結果的に、ＬＶは直接的なインビボ投与を経て迅速にテストされた。多くのグループが、トランスジーン特異的な免疫応答を誘発するために、マウスにおいてＬＶのインビボ注射の効率を実証している。再度、腫瘍抗原を主に使用した。例えば、実験室により、ＨＬＡ－Ａ＊０２０１トランスジェニックマウスにおけるレンチウイルスをコードするメラノーマポリエピトープの直接的なインビボ接種によって、コードされるメラノーマエピトープの大半に対する活発なＣＴＬ応答を誘発できることが示された（Firat et al., 1999）。ＬＶの注射が、ＣＴＬ応答の大きさ及び寿命の両方の点で、エクスビボで形質導入された

ＤＣよりも優れていることがさらに実証されている（Esslinger et al., 2003）。さらに、機能的ＣＤ８＋　Ｔ細胞記憶応答は、ＴＲＩＰベクターでの直接的なインビボ免疫化後に、ＣＤ４＋　Ｔ細胞の非存在下でさえ生成できうるが、ＨＩＶワクチン接種に対する否定できない利点である（Iglesias et al., 2007）。多くの研究チームが、現在、ＬＶのワクチン接種ツールとしての高い潜在能力に寄与しうる複雑なメカニズムを研究している。特にＤＣ中での持続性の抗原発現、ならびに、先天性免疫の活性化は、決定的役割を果たしうる（Breckpot et al., 2003）。

【０３０２】

４．カニクイザルにおけるワクチン試験

４．１．実験室での以前の研究、プロジェクトの初期

実験室において、免疫原性試験によって、非ミリストイル化形態のＳＩＶｍａｃ２３９Ｇａｇ（上記）をコードするＴＲＩＰベクターで免疫化した近交系マウスでの抗ＳＩＶ特異的Ｔ細胞応答の潜在能力が実証されている。これらのマウスモデルによって、ＨＩＶに対するワクチン接種のための候補としてのＴＲＩＰベクターの潜在能力を明確に示すことが可能になった。しかし、それらによって、ウイルスチャレンジと関連するＴＲＩＰベクター免疫化の防御能力をテストすることは可能にならなかった。

【０３０３】

４．２．マカクモデル

この目的のために、非ヒト霊長類モデル、特にカニクイザルを、防御効率の試験のために選んだ。ヒト／ＨＩＶ－１モデルを、マカク／ＳＩＶｍａｃ非ヒト霊長類モデルに置き換えた。マカクはＳＩＶｍａｃ感染に高度に感受性であり、進行性に免疫不全症候群を発生し、ヒトＡＩＤＳを模倣する。興味深いことに、一次及び慢性感染中の血漿ウイルス負荷は、ヒトにおいて観察されるものに匹敵する。なぜなら、ＨＩＶ－１感染者において、長期非進行者ならびに迅速進行者が観察できるからである。ＨＩＶ－１に感染したヒトと同様に、一次及び慢性感染中のＳＩＶｍａｃへの細胞性免疫応答は有意に異なり、そして、免疫回避の証拠は容易に記録される。ＨＩＶ－１感染個体と同様に、腸管関連リンパ組織が、ウイルス複製及びＣＤ４＋　Ｔ細胞の欠乏の主な部位である。

【０３０４】

今日、ＡＩＤＳワクチン／チャレンジのデータは、本質的に、３つの主なマカク種において生成される：主に、インディアン由来のアカゲザル、また中国由来のアカゲザル及びカニクイザル。各種のモデルは、ウイルス感染への応答の試験における利点及び欠点を提示する。カニクイザルを本発明者らの試験のために選んだ。なぜなら、それらはヨーロッパにおいてアカゲザルよりも容易に入手可能であるからである。Reinman et al.は、ＳＩＶの病原性が、インドアカゲザルと比較して、カニクイザルにおいて減弱されることを示した（より低い血漿ウイルス血症、ＣＤ４＋　Ｔ細胞数の保存、生存時間の増加）。この減弱した病原性は、アカゲザル種においてよりも、ＧＡＧ及びＥＮＶへのより早く、より強いＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答と関連した。これらの知見は、このように、初期Ｔ細胞免疫応答の役割を裏付ける。最後に、より低い血漿ウイルス負荷にもかかわらず、チャレンジ後のウイルス血症はカニクイザルにおける実験エンドポイントとして有意に使用でき、チャレンジのために使用したウイルス用量が十分に高く、未感作群が十分に大きく、自然発生的な制御因子の統計的有意性を制限すると想定される。興味深いことに、カニクイザルは、ヒト感染でみられるものとより類似したウイルス負荷を呈する（Reimann et al., 2005）。

【０３０５】

４．３．抗原の選択

非ヒト霊長類でのワクチン試験に関連して、抗原選択の疑問が生じるはずである。ＧＡＧ　ＳＩＶｍａｃ２３９非ミリスチル化タンパク質を抗原として選んだ。自然ＨＩＶ－１感染及びウイルス構造に関する以前の結果及び知見、ならびにデータによって、潜在的に効率的な抗原としてのこのタンパク質の選択を正当化できうる。まず第１に、ＨＩＶ－１株における重要な変動性によって、本発明者らは、様々なＨＩＶ－１／ＳＩＶ株間で十分

に保存されているタンパク質を選ぶように制限された。ＧＡＧ、ＰＯＬ、及びＮＥＦだけがこの基準を満たしうる。しかし、ＣＴＬが主にｇａｇ及びｎｅｆ上に位置するエピトープを認識することが示されている（Addo et al., 2003）。より最近では、標的となるＨＩＶ－１タンパク質のうち、ＧＡＧ特異的応答だけがウイルス血症の低下に関連し、特定のＨＬＡ型に非依存的であることが実証された（Kiepiela et al., 2007）。また、ＧＡＧ特異的応答が多様化するほど、血漿ウイルス血症は低下した。さらに、それがウイルスマトリクスを構成するため、ＧＡＧはプロセシングされ、ＭＨＣクラスＩにより提示される第１タンパク質である（Sacha et al., 2007）。なぜなら、侵入／捕捉が十分であり、ウイルス複製の必要がないからである。ＧＡＧは、また、ＨＩＶ－１タンパク質（１０００－１５００　ＣＡ）のうちで最も代表的である（Briggs et al., 2004）。全てのこれらのデータによって、本発明者らの第１ワクチン試験での関連抗原としてのこのタンパク質の選択が正当化された。また、この試験は、ＴＲＩＰベクターのワクチン接種ツールとしての効率の概念の証拠を与えるようにデザインされた。この目的のために、単純な抗原を、ベクター自体が果たす防御的な役割（遺伝子導入効率）を強調するために、自発的に選んだ。さらに、単純ＧＡＧタンパク質を抗原として有することによって、以前のワクチン試験との比較を可能にする。

【０３０６】

４．４．ワクチン接種プロトコール

一次応答を強化するために、プライミング－ブースト戦略を選んだ。第２注射は、応答者の数、抗原特異的Ｔ細胞の頻度及び結合力ならびにＴ細胞応答の強度を増加すると思われる。それは、また、応答の多様性ならびに死滅又は抹消への移動などのＴ細胞の機能を改善するはずである。

【０３０７】

プライミングのために、２匹のマカクの３群を、３つの異なる用量で、インディアナ血清型ＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされたレンチベクター　ＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇで免疫化した。２匹の動物が、無関係ベクターとして、インディアナ血清型ＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされた　ＴＲＩＰ－ＧＦＰベクターを受けた。ブーストのために、プライミング後３ヶ月目に、全ての免疫化動物が、インディアナ非交差反応性血清型でシュードタイピングされた類似用量のＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ又はＴＲＩＰ－ＧＦＰを受けた。

【０３０８】

このＴＲＩＰベクターベースのワクチンが引き金となる防御能力をテストするために、ブースト後２ヶ月目に８匹の動物を、５００　Ａｎｉｍａｌ　Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　Ｄｏｓｅ　５０（ＡＩＤ５０）のＳＩＶｍａｃ２５１で直腸内チャレンジした。チャレンジのための接種経路及び非常に高用量のウイルスは、コホートのサイズにより正当化されたが、実際に、感染用量を増加させることにより、本発明者らは、わずか４匹のマカクで構成される試験の未感作動物の治療群において自然発生的な制御因子の数を制限することを期待した。

【０３０９】

ＰＢＭＣでのＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴによるプライミング、ブースト、及びチャレンジ後の細胞性免疫応答の長期的な追跡調査が実施されている。

【０３１０】

材料及び方法

１．材料

１．１．抗原

ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧΔｍｙｒタンパク質を抗原として選んだ。それは５１１のアミノ酸のタンパク質である。タンパク質のミリスチル化ドメインを欠失させて、バイオセーフティーレベルＬ１での操作を可能にし、そして、ＡＰＣによるクラスＩ提示を促進させた。ＳＩＶ　ｍａｃ２３９からのＧＡＧ糖タンパク質の完全配列は、タンパク質ＩＤ：　ＡＡＡ４７６３２を経て見出すことができる。ＧＦＰタンパク質は無関係抗原として

選んだ。

【０３１１】

１．２．プラスミド

トランスフェクションに使用した全てのプラスミドは、ＪＭ１０９大腸菌株Ｋ１２細菌（Ｆ’ ｔｒａＤ３６ ｐｒｏＡ$^{+}$Ｂ$^{+}$ ｌａｃＩ^{q} Δ（ｌａｃＺ）Ｍ１５／ Δ（ｌａｃ－ｐｒｏＡＢ）ｇｌｎＶ４４ ｅ１４$^{-}$ ｇｙｒＡ９６ ｒｅｃＡ１ ｒｅｌＡ１ ｅｎｄＡ１ ｔｈｉ ｈｓｄＲ１７）中で産生させ、アンピシリンを添加したＬＢ培地中で増殖させ、Macherey-Nagel（Hoerdt, France）からのMaxi-prep Nucleoboundキットで抽出した。

【０３１２】

これらのプラスミドコンストラクトを使用して、ＴＲＩＰ－ΔＵ３－ＣＭＶ－Ｇａｇ Δｍｙｒ－ＷＰＲＥ（本明細書においてＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９ Ｇａｇと名付ける、図２５ Ａ）又はＴＲＩＰ－ΔＵ３－ＣＭＶ－ｅＧＦＰ－ＷＰＲＥ（本明細書においてＴＲＩＰ－ＧＦＰと名付ける、図２５ Ｂ）の粒子を生成した。異種転写調節エレメント：サイトメガロウイルスプロモーターの制御下に、ＨＩＶ－１シス活性遺伝子（ＬＴＲ、３’にΔＵ３、キャプシド形成シグナルΨ、ＲＲＥ及びＤＮＡ Ｆｌａｐ、即ち、ｃＰＰＴ／ＣＴＳ）、及びＳＩＶｍａｃ２３９ ＧＡＧ Δｍｙｒタンパク質又はＧＦＰのいずれかをコードするトランスジーンを含むベクタープラスミド。ＷＰＲＥ（ウッドチャック肝炎ウイルスのポスト応答性エレメント）（Donella J.E. et al, 1998）配列を加えて、トランスジーン発現を増加させた。

【０３１３】

産生細胞株中でのウイルス粒子の構築に必要なＨＩＶ－１遺伝子ｇａｇ、ｐｏｌ、ｅｎｖを含むパッケージングプラスミドで、Zufferey et al, 1998においてｐ． ８．７．１としてデザインできる。

【０３１４】

水疱性口内炎ウイルスからの糖タンパク質Ｇ（ＶＳＶ－Ｇ）をコードするエンベローププラスミド（エンベロープ発現プラスミド）、血清型インディアナ（ｐｈ ＣＭＶ ＶＳＶ－Ｇ）（Yee J. et al, 1994, Genebank AJ318514）又は血清型ニュージャージーなどのインディアナ非交差反応性血清型（ｐｃＤＮＡ３．１（－）ＮＪ－Ｇ ＷＰＲＥ）。ｐｃＤＮＡ ３．１（－）ＮＪＧは、Invitrogenから入手可能なｐｃＤＮＡ３．１プラスミドに由来する。特に、ｐｃＤＮＡ３．１（－）ＮＪ ＷＰＲＥを構築するために、ｐＢＳ－ＮＪＧ（Genebank V01214）[17]をＸｈｏＩ及びＮｏｔＩで消化し、ｐｃＤＮＡ３．１（－）ベクター（Invitrogen）中にクローン化した。発現を増加させるために、ＰＣＲにより事前に増幅させ、TOPO TA Cloningベクター中へクローン化したＷＰＲＥ（ウッドチャック転写後調節エレメント）配列を、ＥｃｏＲＩ消化により付加した。

【０３１５】

パッケージングプラスミド及びエンベローププラスミドは、異種転写エレメント（ＣＭＶプロモーター、及びポリアデニル化シグナル）を有する。全てのプラスミドが、細菌中での増殖選択を容易にするためのアンピシリン耐性遺伝子を含む。

【０３１６】

１．３．細胞培養

ヒト胚腎細胞株（ヒト２９３Ｔ）をＴＲＩＰベクター産生のために使用した。形質導入アッセイでの阻害のために、Ｐ４細胞株、ＨｅＬａ由来細胞株を使用した。

【０３１７】

これらの細胞は、１０％熱不活化ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）（PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria）及びペニシリン、ストレプトマイシン（１００ ユニット/mlペニシリンＧ（ナトリウム塩）及び１００U/ml硫酸ストレプトマイシン、GIBCO、Invitrogen）を添加した、グルタミン（DMEM, GlutaMAX-I Supplement, GIBCO）を含むダルベッコ改変イーグル培地で構成される完全培地中で増殖させた。マカク初代細胞をRPMI GlutaMAX-I完全培地（１０％ ＦＣＳ及び抗生物質、ＤＭＥＭ中と類似の濃度）中で培養した。

【０３１８】
１．４．非ヒト霊長類
１２匹の成体カニクイザル（Ｍａｃａｃａ　ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）、インド洋モーリシャス島からの雄を、ワクチン接種試験に含めた。それらは、本試験に含める前、ＳＩＶ、ヘルペスウイルスＢ、フィロウイルス、ＳＴＬＶ－１、ＳＲＶ－１、ＳＲＶ－２、麻疹、肝炎Ｂ－ＨｂｓＡｇ、及び肝炎Ｂ－ＨＢｃＡｂに陰性であった。免疫化、チャレンジ、及び血液採取は、非ヒト霊長類を使用した実験のためのＥＣガイドラインに従って扱った。
【０３１９】
１．５．チャレンジのためのＳＩＶウイルス
ＳＩＶｍａｃ２５１株（完全プロウイルスゲノム及び隣接配列：アクセッション番号：Ｍ１９４９９）をチャレンジのために使用した。
【０３２０】
１．６．ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ及びＳＩＶｍａｃ２５１　ＮＥＦペプチドセット
ＥＬＩＳＰＯＴでのインビトロ再刺激におけるＰＢＭＣを、１２５のペプチド又は６４のペプチドをそれぞれ含むＳＩＶ　ｍａｃ２３９　ＧＡＧ又はＳＩＶｍａｃ２５１　ＮＥＦのいずれかのペプチドセットで行った（NIH AIDS Research and Reference Reagent Program）。これらのペプチドは１５アミノ酸長であり、連続ペプチドの間に１１アミノ酸が重複する。ＧＡＧペプチドは、順番にＭ～Ｗの文字で名前を付けられ、ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧタンパク質を回収する５～１２の連続の重複ペプチドを含む、１１プール中に送った（図２６）。ＮＥＦペプチドをＮＥＦ　ＳＩＶ　ｍａｃ２５１タンパク質を回収する８ペプチドの１２プール中に分け、順番にａ～ｈの文字で名付けた。ペプチドの大半が８０%を上回り純粋であった。それらは、各々１mgで凍結乾燥し、配達した。受理時、それらを、ペプチド含量のパーセンテージ及びＨＰＬＣ純度に基づき、２mg/mlでＧＡＧペプチド用の５%　ＤＭＳＯ及び１mg/mlでＮＥＦペプチド用の純粋ＤＭＳＯ中に再懸濁した。
【０３２１】
２．方法
２．１．ベクター産生
ベクター粒子を、２９３Ｔ細胞の一過性リン酸カルシウムコトランスフェクション（$CaCl_2$　０．１２５mM、１×ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水（ｐＨ　７．１０）、７０mM ＮａＣｌ、０．７５mM Na_2HPO_4　$2H_2O$、２５mM　ＨＥＰＥＳ）により産生した。ＧＡＧΔｍｙｒ又はＧＦＰのいずれかをコードする１０μgのベクタープラスミドが、Zennou et al 2000により以前に記載された通りに、ＶＳＶ－Ｇ糖タンパク質エンベロープをコードする５～１０μgのプラスミド、及び１０μgのパッケージングプラスミドと共に必要とされた（Zennou et al., 2000）。細胞を、１０ｃｍ^{2}ポリスチレン処理組織培養ペトリ皿中に、トランスフェクションの２４時間前に完全培地中に６．１０^{6}で播蒔し、そして、培地をトランスフェクション前に変えた。細胞は少なくとも８０%コンフルエントであった。トランスフェクション後２４時間目に、ＦＣＳを伴わない完全培地を細胞に小容積で加え、粒子を濃縮した。トランスフェクション後４８時間目に、上清をペトリ皿から採取し、沈殿浮遊細胞に遠心分離し（２５００rpm、５分間）、そして、残留プラスミドＤＮＡを除去するために、ＤＮＡｓｅ　Ｉ（Roche Boehringer、２０U）及び$MgCl_2$（Sigma、１mM）で３７℃、１５分間処理した。ベクターを上清の超遠心分離（２２　０００rpm；１時間）後に採取し、冷ＰＢＳ中に再懸濁した。ベクターを小容積の一定分量中に－８０℃で保存した。
【０３２２】
２．２．ｐ２４　ＧＡＧ抗原産生の測定
ベクターＨＩＶ－１　ｐ２４　ＧＡＧ抗原含量を、酵素結合免疫吸着検定法（Perkin-Elmer Life Sciences, Paris, France）により決定した。ｐ２４濃度をng（ベクター）/mlで示した。

【０３２３】
２．３．ベクターのタイトレーション
タイトレーションは、３つの異なる容積のベクターでの２９３Ｔ細胞の形質導入により実施した（６ウェルペトリ皿中に５．１０^{5}細胞／ウェルでの形質導入前２４時間目に蒔いた）。細胞は、また、先に７０℃で熱不活化した同量のベクターで形質導入した。形質導入後７２時間目に、細胞を、ＲＮＡｓｅを含み、Ｄｎａｓｅ不含の溶解緩衝液１×（Ｔｒｉｓ　２０　ｍＭ　ｐＨ＝８．８；ＮＰ４０　０．１%；Ｔｗｅｅｎ　０．１%最終）（Roche Boehringer、５０μg/ml最終）で溶解した。細胞タンパク質をプロテイナーゼＫ（最終１００μg/mlで安定化したプロテイナーゼＫ、Eurobio）の添加により分解した。
【０３２４】
ベクターの力価を、Light Cycler機器（Roche Diagnostics, Meylan France）を使用して、細胞溶解液でリアルタイムＰＣＲを実施することにより評価した。全ＨＩＶ－１　ＤＮＡコピー数を、ＬＴＲ　Ｕ５領域中に局在化する、ウイルスＤＮＡ配列の検出により決定した（プライマーＡＡＳＭリバース及びＭ６６７フォワード）。２つのハイブリダイゼーションプローブを各々のＰＣＲ実行で使用し、１つのプローブは３’末端ドナーとしてフルオレセイン（ＦＬ）で標識され、そして、他は５’アクセプターとしてＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　Ｒｅｄ　６４０（ＦＣ）で標識した。細胞数への標準化は、プライマー３’中のＣＤ３及び５’中のＣＤ３ならびにプローブＦＬ及びＦＣで、ＣＤ３配列（ハウスキーピング遺伝子）を検出することにより行った。ＰＣＲでは、５μlの溶解液を、各々の条件について２回、１５μＬ PCR-mix（Ｑ－ＰＣＲ用のJumpstart taq readmix、Sigma　１×、$MgCl_2$　１．９mM、１．５U Taqポリメラーゼ（Invitrogen）、１．５μMフォワード及びリバースプライマーならびに０．２μM蛍光発生ハイブリダイゼーションプローブ）中でテストした。コピー数は、マウス細胞溶解液（３Ｔ３）中で一致する配列（Ｕ５Ｒ及びＣＤ３）と共に希釈した、10^{2}～10^{8}のクローン化プラスミドの増幅により作成した標準曲線を参照して決定した（図２７）。
【表１】

PCR	オリゴ	配列 5’→3‘
U5R フォワードプライマー	M667	GGCTAACTAGGGAACCCACTG
U5R リバースプライマー	AASM	GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA
U5R 3’エンドドナープローブ	LTR FL	CACAACAGACGGGCACACACTACTTGA-FL
U5R 5’エンドドナープローブ	LTR LC	LC-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC
CD3 フォワードプライマー	CD3 in 5’	GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA
CD3 リバースプライマー	CD3 in 3’	CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA
CD3 3’エンドドナープローブ	CD3 FL	GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-FL
CD3 5’エンドドナープローブ	CD3 LC	LC-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCCTTC

工程及びサイクル数		温度	持続時間
1サイクル	1: 変性	95°C	3分
40サイクル	2: 変性	95°C	5秒
	3: アニーリング	57°C	10秒
	4: 伸長	72°C	8秒

【０３２５】
２．４．マカクの免疫化
マカクを２匹の動物の４群に分けて（表Ａ）、そして、２点において、３つの異なる用量（高用量２，５．１０^{8}形質導入単位（ＴＵ）、６８６３ng　ｐ２４；中用量１．１０

^{8}TU、２７４５ng　ｐ２４、又は、低用量２．５　１０^{7}TU、６８６ng　ｐ２４）の、ＶＳＶ－Ｇエンベロープ血清型インディアナでシュードタイピングされたＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇで、又は、高用量のＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ（６８６３ng　ｐ２４）と同じｐ２４用量のＴＲＩＰ－ＧＦＰで、皮下注射した。

【０３２６】

プライミング後８７日目に実施した第２の免疫化では、４点において、インディアナ非交差反応性ＶＳＶ－Ｇ糖タンパク質血清型（ＶＳＶ－Ｇ血清型ニュージャージー）でシュードタイピングされたベクターで皮下注射した。マカクは、ＧＡＧｄｅｌｔａｍｙｒ抗原でプライミングした場合には１．１０^{8}TUのＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇ、６０１８５ng　ｐ２４を、又は、ＧＦＰ抗原でプライミングした場合には６０１８５ng　ｐ２４のＴＲＩＰ－ＧＦＰベクターを受けた。

【表２】

カニクイザル入れ墨番号	プライミング時に受けたベクター	カテゴリー
20022	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10^7 TU	低用量
20089	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10^7 TU	
20293	TRIP-SIVmac239 Gag 1 10^8 TU	中用量
20056	TRIP-SIVmac239 Gag 1 10^8 TU	
20195	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10^8 TU	高用量
20158	TRIP-SIVmac239 Gag 2.5 10^8 TU	
21544	TRIP-GFP 6862 ng p24	対照
20456	TRIP-GFP 6862 ng p24	
15661	なし	ワクチン未接種
14184	なし	
15885	なし	
14468	なし	

表Ａ：ＴＲＩＰワクチン接種試験において使用するカニクイザルの配分
動物を、入れ墨番号及びプライミング免疫化時に受けたＴＲＩＰベクターの性質／用量に従って分類する。

【０３２７】

２．５．ＳＩＶ　ｍａｃ２５１チャレンジ

免疫化した未感作マカク（合計１２匹のマカク）をブースト後５７日目（即ち、プライミング後１３６日目）に1ml（５０%の動物に感染するために十分な動物感染用量）の病原性ＳＩＶｍａｃ　２５１（A.M. AUBERTIN, Universite Louis Pasteur, Strasbourg, FranceからＡＮＲＳ－による分配されるストック又はＮＩＨから入手可能な等価ストック）中の５００　ＡＩＤ５０の単回用量で直腸内チャレンジした。動物を１０～２０mg/kgのケタミン（Imalgene, Rhone-Merieux）で麻酔し、そして、全手順をＥＵ規制及びAnimal Care and Useのガイドラインに従って行った。接種後、マカクを別々に飼育し、注意をレベル3バイオセキュリティーの畜舎に制限した。

【０３２８】

２．６．ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ

動物を、血液採取のために、１０～２０mg/kgのケタミン（Imalgene, Rhone-Merieux）で麻酔した。8mlの血液を、各々のマカクについて、細胞調製チューブ中に、ＰＢＭＣ及びクエン酸血漿採取のためにクエン酸ナトリウム（BD Vacutainer（商標）　ＣＰＴ（商標））により、3mlを、血清採取のために血清分離チューブ（Ｖａｃｕｅｔｔｅ（登録商標））中のに採取した。遠心分離（１０分間、Vacuette（登録商標）チューブでは２５００rpm及びＣＰＴ（商標）では３０分間、３０００rpm、ブレーキなし）、及び3～5ml１×溶解緩衝液（IOtest（登録商標）１０×溶解緩衝液、Beckman-Coulter）赤血球の溶解後、ＰＢＭＣを１０分間、１６００rpmの遠心分離により沈殿させ、その後、Kova’ｓ chamber Hycor（登録商標）で数え、そして、十分な細胞が利用可能な場合には2.10^5細胞／ウェルで3枚の９６ウェルＥＬＩＳＰＯＴプレートに分布させた。

【０３２９】

Immobilon（登録商標）－Ｐ（ポリフッ化ビニリデン、ＰＶＦＤ）メンブレン（MultiScreen HTS Assay System, MSIP; Millipore）を伴う９６ウェルプレートを、事前に湿らせ（エタノール３５%）、そして、捕捉抗体（精製したマウスＩｇＧ１抗ヒトサルＩＦＮ－γモノクローナル抗体ＧＺ－４（Mabtech）、最終ＰＢＳ中１０μg/ml；1ウェル当たり５０μl）と共に４℃でコーティングした。プレートをＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ＰＢＳ１×中で４回洗浄し、完全ＲＰＭＩでブロックした。

【０３３０】

細胞を、陽性対照（４０００個細胞/ウェル）としてＡＴ－２不活化ＳＩＶｍａｃ２５１（５μg/mlの全ウイルスタンパク質）、又はＰＭＡ－ｉｏｎｏ（0，1μM　ＰＭＡ及び1μMイオノマイシン）のいずれかの1プールのペプチド（２ug/ml）の添加により再刺激し、又はＤＭＳＯ／ＲＰＭＩで偽刺激した。

【０３３１】

４０時間後、スポットをビオチン抱合抗体（精製したマウスＩｇＧ１抗ヒトサルインターフェロンγモノクローナル抗体７－Ｂ６－１（Mabtech）；最終ＰＢＳ　0，5%　ＦＣＳ中1μg/ml；1ウェル当たり１００μl、３７℃で2時間）、続いてストレプトアビジン－ＡＰ（1時間、ＰＢＳ　0，5%　ＦＣＳ中で1／５０００、1ウェル当たり１００μl、３７℃で1時間）及びＢＣＩＰ／ＮＢＴ基質溶液（調製済み混合液、1ウェル当たり６０μl；１５分間、室温、暗所）で明らかにした。スポットをBioreader 4000（Biosys, Karben, Germany）を使用して数えた。結果を、１００万個のＰＢＭＣ当たりのＩＦＮ－γスポット形成細胞（ＳＦＣ）で表した。5%　ＤＭＳＯ／ＲＰＭＩ刺激に起因するＩＦＮ－γ　ＳＦＣ／１００万個ＰＢＭＣを、バックグラウンドシグナルとして結果から引いた。

【０３３２】

２．７．ＥＬＩＳＡ

生得サイトカインの定量化（ＩＬ６；ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－αは市販のキット（U-Cytech Bioscience（Utrech, Netherlands）からのサルＩＬ－６及びＴＮＦ－ａ　ＥＬＩＳＡキット、PBL Biomedical Laboratories（New Jersey, United States）からのヒトＩＦＮ－αキット）を使用してＥＬＩＳＡにより実施した）。血漿を、各々の動物について、

プライミング注射前４０日目、プライミング注射後１時間、６時間、２４時間、及び７日目にテストした。

【０３３３】

２．８．インビトロ血清中和アッセイ

Ｐ４細胞を、形質導入前２４時間目に、９６ウェルプレート中の完全培地に1.10^5／ウェルで蒔いた。形質導入の当日、細胞を、血漿の異なる希釈物でプレインキュベートしたＴＲＩＰ－ＧＦＰ（インディアナ血清型ＶＳＶ－Ｇ又はニュージャージーＶＳＶ－Ｇなどのインディアナ非交差反応性ＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされた）と共に培養した。細胞を、同容積の完全培地で偽形質導入した。形質導入後７２時間目、形質導入の効率を、FACScalibur（ＢＤ）を使用したフローサイトメトリーによりＧＦＰ蛍光を分析することにより評価した。

【０３３４】

２．９．ウイルス負荷の決定

簡単に説明すると、ウイルスＲＮＡを、RocheからのHigh Pure Viral RNA Kitでクエン酸血漿（合計２００μl）から単離した。溶出は、５０μl溶出緩衝液（ヌクレアーゼ不含、無菌、二回蒸留水）中で行った。血漿から単離したＳＩＶ－ＲＮＡの数は、InvitrogenからのPlatinium qRT-PCRを使用した定量的１段階ＲＴ－ＰＣＲで決定した。反応は、ＡＢｇｅｎｅ（ＡＢ１１００）からのMastercycler ep realplex（Eppendorf）において９６ウェルプレート中で、最終容積２５μl（１０μl　ＲＮＡ抽出物及び１５μl　Ｍｉｘ）で２回実施した。Taqman定量化方法を選び、内部プローブ（最終５００nm）が５’及び３’にそれぞれＦａｍ及びＴａｍｒａフルオロフォアを含んだ。プライマー（最終４５０nm）は、ＳＩＶｍａｃ　２５１　ＧＡＧ　ｍＲＮＡゲノムのそれぞれ３８９及び４５６の位置であった（表Ｂ）。

【０３３５】

最初に存在するウイルスＲＮＡコピーの量は、「分岐ＤＮＡ」の技術により以前にタイトレーションしたウイルスストックＳＩＶｍａｃ２５１のdH_2O中での連続希釈物から作成した内部標準曲線上への閾値蛍光値の外挿により評価した。ＰＣＲでの陽性対照として、ＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　Ｇａｇベクタープラスミドを使用した（10^4コピー/μl）。

【表３】

名前	配列 5’➔ 3’	サイズ
プライマーフォワード: SIVmac389F	GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC	24 bp
プライマーリバース: SIVmac456R	CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT	25 bp
Taqman プローブ: SIVmac TM	Fam-TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA-Tamra	23 bp

工程及びサイクル数		温度	持続時間
1 サイクル	1: 逆転写 (1サイクル)	46°C	30 分
	2: 酵素不活化	95°C	4 分
50 サイクル	3: 工程１，ＰＣＲ変性	95°C	15 秒
	3: 工程２，ＰＣＲ変性及び伸長	60°C	1 分
1 サイクル	4: 冷却	20°C	保持

表Ｂ：血漿ウイルス負荷の決定に使用したプライマー及びプローブの配列ならびにTaqman RT-PCRプログラム

結果：レンチウイルスプライミング－ブーストワクチン接種によって、マカクにおける多量のＳＩＶｍａｃ　２５１チャレンジに対する強い防御が与えられる。

【０３３６】

多くの試験で、ＨＩＶ感染を制御する際にＣＤ８＋　Ｔ細胞が果たす決定的な役割が強調されており、効果的なワクチンが活発で広範な持続性ＣＤ８＋　Ｔ細胞応答を誘導する

はずであることが示唆されている。それにもかかわらず、特異的ＳＩＶ　ＣＤ８＋　Ｔ細胞応答を誘発することが示されているいくつかのウイルスベクターでは、その後にＳＩＶ／マカクモデルにおいてウイルス血症を制御できていない（Schoenly, K.A. & Weiner, 2007）。本発明者らは、レンチウイルスベクターが細胞性免疫を誘導するために非常に強力であることを実証しているため（He, Y. & Falo, L.D., 2007により、及び、Breckpot, K, Aerts, J.L. & Thielemans, K., 2007により概説される）、本発明者らは、それらがＳＩＶ感染及びサルＡＩＤＳに対して防御的な細胞性免疫を与えうるか否かを評価した。本発明者らは、ヒトにおけるＨＩＶ－１感染で見られるものと類似のウイルス負荷レベル及び種々の進行速度を呈するカニクイザルのＳＩＶｍａｃ２５１感染のモデルを選んだ（Karlsson, I. et al, 2007及びReimann, K.A., et al, 2005）。

【０３３７】

６匹のカニクイザルを、その天然配列において非分泌ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧタンパク質をコードするＨＩＶ－１由来レンチウイルスベクター（ＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ）の皮下注射により２回免疫化した。この単一の非最適化抗原を選び、ワクチン接種のためのレンチウイルスベクターシステムの潜在能力を強調した。中和抗ベクター抗体の存在を迂回し、ひいては効率的なブースト効果を可能にするために、エンベロープ交換の戦略をデザインした。実際に、マウスでの予備実験では、２つの非交差反応性血清型（インディアナとそれに続くニュージャージー）からのＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされた ＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ粒子を使用したプライミング－ブースト計画が、同種のプライミング－ブーストよりも効率的であることが示されていた。免疫化群及び実験デザインを以下の表１にまとめる。

【０３３８】

レンチウイルスベクターの単回注射は、受けた用量にかかわらず（図２８ａ）、そして全身性炎症の刺激なく（図２８（２））、各免疫化動物において強固な細胞性免疫を誘導するために十分であった。ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ特異的Ｔ細胞応答はプライミング後１６日目にピークに達し、高頻度のＩＦＮ－γ分泌細胞に達し（最高３，０００　ＩＦＮ－γ　ＳＦＣ／１００万個ＰＢＭＣまで）、免疫化後２ヶ月目に免疫化前のレベルに戻った（図２８（１）ａ及び図２８（１）ｂ）。一次応答の強固さに加えて、これらは広範であることも見出され、いくつかのペプチドプールを包含した（図３０（２）ａ及び表２ａ）。本発明者らの非近交系コホートにおいて、本発明者らは、ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ特異的ＩＦＮ－γ応答が、優先的に、ｐ２７　ＣＡ及びｐ９　ＮＣの部分を包含するＧＡＧのＣ末端領域内の２つのプールに対することを観察した。全ての６つのワクチンがプールＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ：　３３７－３９５に対して、そして、６つのうち４つがプールＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ：　３８５－４４３に対して活発な応答を高めた。

【０３３９】

動物はＶＳＶ血清型インディアナに対する中和液性応答も発生したが（図３１（２）ａ）、しかし重要なことに、ワクチン接種された動物からの血清は、ＶＳＶ－Ｇニュージャージーでシュードタイピングされたベクターをインビトロで中和しなかった（図３１（２）ｂ）。マカクを、従って、その後、プライミング後１１週目にＶＳＶ－Ｇニュージャージーでシュードタイピングされた中用量のＴＲＩＰ－ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ粒子で注射した。ＳＩＶｍａｃ２３９ＧＡＧ（１５－ｍｅｒｓ）Ｐｅｐｔｉｄｅｓ－Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｓｅｔを、AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH) を通じて得た。

【０３４０】

ＳＩＶｍａｃ２３９　ＧＡＧ特異的Ｔ細胞応答が、２回目の注射により効率的に再刺激された（図２８（１）ａ）。応答の大きさは二次応答に典型的な動態、即ち、より速い発症及びより長い持続性で増加した。ＩＦＮ－γ分泌細胞が、２回目の免疫化後１週目という早期から２ヶ月間以上まで検出された。細胞応答の幅は改善されなかった（図３０（２）ｂ又は表２ｂ）。感染細胞において抗原提示のために起こるが、しかし、ペプチドパル

スによりバイパスされるプロセシング及びトラフィッキングの工程をより厳密に模倣するために、ＡＴ２不活化ＳＩＶｍａｃ２５１も抗原として使用した。弱（マカク２００８９）から強（マカク２００２２、２０１９５、及び２００５６）の応答が観察された（図３０（２）ｄ）。ブースト後１０週目に実施された細胞内染色は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の両方が、ペプチドプールに応答するＩＦＮ－γ産生に寄与することを示した（データ示さず）。

【０３４１】

ワクチンにより誘導される強固で広範な細胞性免疫応答を考慮して、本発明者らはＳＩＶ感染に対するその防御効率をテストした。マカクを、ブースト後１１週目に、高用量のＳＩＶｍａｃ２５１（５００　ＡＩＤ５０）の直腸内接種によりチャレンジした（表１）。多量の既往のＳＩＶ　ＧＡＧ特異的応答が、ワクチン未接種の対照動物とは対照的に、チャレンジ後すぐに（１週間以内）に免疫化動物の抹消血中で観察された。これらの応答は、より早くより活発にピークに達した（４，０００　ＳＩＶ　ＧＡＧ特異的ＩＦＮ－γＳＦＣ／１００万個ＰＢＭＣを上回る）（図２８）。全部の未感作の中央記憶ＣＤ８＋Ｔ細胞のより早く及び／又はより高いリバウンドも、ワクチン未接種の対照（ＴＲＩＰ　ＧＦＰ）のものと比較して、ワクチン接種動物での一次感染中に記録された（図３２（２））。免疫化後にマッピングされるＧＡＧ領域がチャレンジによりリコールされ、新たな免疫原性領域も感染後に検出された。ＧＡＧ特異的応答の多様性は、ワクチン接種動物とワクチン未接種動物又は対照動物の間で同程度であった（図３０（２）ｃ及び表２ｃ）。

【０３４２】

ウイルスチャレンジは全ての動物において感染を招いたが、免疫化は、急性期中にウイルス複製及び中央記憶ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞の欠乏に対する強い防御を与えた。ＴＲＩＰ　ＧＦＰ注射された対照動物は、ワクチン未接種マカクと非常に同程度の感染経過を有し、従って、単一群として集められた。これらの未感作の対照動物の血漿中で、ウイルス複製のピークは高く、平均１．０２　１０^{7}　ＲＮＡコピー/mlであった。ウイルス負荷はその後、全６匹のワクチン未接種の対照動物において減少し、低から中程度のセットポイント血漿ウイルスＲＮＡレベルに達し（７０～１５４日目）、平均３．４４　１０^{5}　ＲＮＡコピー/mlであった（図２９（１）ａ及び２９（１）ｃ）。対照的に、全６匹の免疫化動物での初感染のピークでのウイルス血症は、未感作の対照動物において、少なくとも２桁の大きさで低く、平均９．２５　１０^{4}　ＲＮＡコピー/mlであった（図２９（１）ｂ及び２９（１）ｃ）。６匹のワクチン接種マカクから、４匹で２　ｌｏｇ１０倍（２００２２、２０２９３、２０１５８）を超えて、２匹が３　ｌｏｇ１０倍を超えて（２０２９３及び２０１５８）、及び１匹が４　ｌｏｇ　１０倍を超えて（２０１９５）ピークウイルス血症が抑制された（図２９（１）ａ）。ピークウイルス血症の消散後、ウイルス負荷は減少し、持続性にワクチン未接種の対照動物のものを約１０倍下回ったままであり、感染後４９日目に統計的に低かった（図２９（１）ｃ）。感染の最初の１５４日間での累積複製（時間の関数としてのウイルス負荷の曲線下面積で表わす）を比較した場合、ワクチン接種により提供される恩恵は統計的に有意であった（図２９（１）ｆ）。

【０３４３】

本発明者らは、感染経過中での末梢血におけるＣＤ４＋　Ｔ細胞の進化、及び特に中央記憶（ＣＭ）ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞もモニターした。なぜなら、それらの欠乏は血漿ウイルス負荷と相関し（Karlsson, I. et al, 2007）、そして、急性及び慢性ＳＩＶ感染中でのそれらの保存によって、セットポイントウイルス負荷レベルよりも良く、ワクチン接種サルの長期生存が予測される（Mattapallil, J.J. et al, 2006 and Letvin, N.L., et al, 2006）。

【０３４４】

急性感染中、ワクチン未接種の対照動物の末梢血中でＣＭ　ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞の迅速で著しい低下が存在した（図３０ａ）。ＣＭ　ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞カウントは、それらの３つ（２１５４４、１４１８４、及び２０４５６）では低いままであり、緩やかな欠乏の徴候

を伴ったのに対し、他の3つ（１５６６１、１５８８５、及び１４４６８）では欠乏は一過性であり、ベースラインへの戻りが続いた。これら２つのサブグループでは、さらに、対応して中及び低ポスト急性ウイルス血症が実証され、従って、進行動物（１４１８４－２１５４４－２０４５６）及び非進行動物（１５６６１－１５８８５－１４４６８）として分類された。

【０３４５】

対照的に、ワクチン接種動物は、ピークウイルス血症中にそれらのＣＭ　ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞の十分な保存又はわずかに低い欠乏を示し、マカク２００８９を除き、全てがそれらのＣＭ　ＣＤ４＋　Ｔリンパ球を迅速に回復した（図３０（１）ｂ及び３０（１）ｃ）。

【０３４６】

全ての未感作の対照動物が、初感染のピークに著しいＣＭ　ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞の喪失及び高ウイルス血症を経験したが、しかし、それらの半数がそれらのＣＭ　ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞コンパートメントを迅速に回復したのに対し、他の半数は、それとは逆に、ＣＭ　ＣＤ４＋　Ｔ細胞数の遅い低下を示した。これら２つのサブグループでは、対応して低及び中ポスト急性ウイルス血症が実証され、従って、非進行動物（１５６６１－１５８８５－１４４６８）及び進行動物（１４１８４－２１５４４－２０４５６）として分類された。重要なことに、遅い時間点でのワクチン接種動物のウイルス血症は、進行ワクチン未接種動物と比較して、約２　ｌｏｇ１０倍低下したのに対し、ポスト急性ウイルス血症及びＣＭ　ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞カウントは、ワクチンと非進行ワクチン未接種動物の間で類似していた（図２９ｄ及び３０ｄ）。

【０３４７】

ワクチン誘導性の免疫応答とウイルス負荷の間の相関関係が、一部のＥＬＩＳＰＯＴウェルでの飽和に起因する細胞性応答の過小評価にもかかわらず、見出された（図２９（２））。重要なことに、ピークウイルス血症のレベルと、プライミング後２週目、ブースト後１週目、及びチャレンジ後１週目に測定したＧＡＧ特異的ＩＦＮ－γ応答の大きさの間に逆相関関係が存在した（図３２ａ、３２ｂ、及び３２ｃ）。これらの知見は、ＨＩＶ６１　ＧＡＧ特異的ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞と低ウイルス負荷及び遅い疾患進行の間の相関関係を示す大きなＨＩＶ－１感染患者コホートにおける試験と完全に一致している（Kiepiela, P. et al, 2007）。本発明者らは、急性感染中でのＣＭ　ＣＤ４＋　Ｔ細胞の保存とウイルス負荷の間の強い相関関係も観察した（図３２ｄ）。

【０３４８】

まとめると、この試験により、レンチウイルスベクターベースのプライミング／ブーストワクチン接種計画によって強く広範な細胞性免疫がカニクイザルにおいて誘発され、そして、ウイルス血症を低下させることにより、及び、初感染のピークでのＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞及びＣＭ　ＣＤ４＋　Ｔ細胞の喪失を完全に阻止することにより多量のＳＩＶｍａｃ２５１感染に対する効率的な防御を与えるとの証拠が提供される。

【０３４９】

長期間の追跡調査によって、免疫圧力からのウイルスの回避がこのマカクコホートにおいて起こりうるか否かが分かる。５ヶ月間の追跡調査後、ワクチン接種動物におけるＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞数の安定性及びウイルス負荷の減少傾向によって長期間の制御が支持される。この１回目の前臨床試験は、限られたマカクコホート中ではあるが、防御が非最適化ＧＡＧ抗原に対する応答にだけ依存することを考慮すると、非常に有望である。本発明者らは、抗原発現を増加させることによる複製の制御の改善、ならびにコドン最適化（Deml, L. et al, 2001 and zur Megede, J. et al, 2000）、及び他のＳＩＶ抗原をＧＡＧと融合させることにより細胞性応答の多様性を増加させること（Wilson, N.A. et al, 2006 and Hel, Z. et al, 2006）による免疫原性の改善を予測する。この点について、一部の結果が、その後にマウスモデルにおいて、このワクチン接種戦略の最適化バージョンで提示され、効率及び安全性の両方の必要条件を完全に満たしており、その後、ヒトでの治療的ワクチン接種の臨床試験に入る。

表１：免疫化群及び実験デザイン

グループ	ワクチン	サブグループ	動物番号	プライミング VSV-Gインディアナで シュートタイピング された粒子 ０日目	ブースト VSV-Gニュージャージーで シュートタイピング された粒子 プライミング後79日目	攻撃 ブースト後76日目
ワクチン接種 n=6	TRIP-SIVmac239 GAG	低用量 中用量 高用量 20195,20158	20022, 20089 20293, 20056	2.5 10^7TU 1 10^8 TU 2.5 10^8TU	1.2 10^8TU	500 AID_{50} SIVmac251
対照 n=2	TRIP-GFP		21544,20456	6863 ng p24	6018 ng p24	500 AID_{50} SIVmac251
ワクチン未接種 n=4	なし		15661, 14184 15885, 14468	なし	なし	500 AID_{50} SIVmac251

インド洋モーリシャス島からの12匹の非近交系の雄及び成体カニクイザル（Macaca fascicularis）を前臨床試験に含めた。それらは、試験に含める前に、SIV、ヘルペスウイルスB、フィロウイルス、STLV-1、SRV-1、SRV-2、麻疹、肝炎B-HbsAg、及び肝炎B-HBcAbに陰性であった。免疫化、血液採取、及び攻撃は、非ヒト霊長類を使用した実験のためのECガイドライン（décret N° 2001-486）に従って取り扱った。免疫化は、２つの異なるエンベロープ、即ち、VSVの2つの非交差反応性血清型、インディアナ及びニュージャージーからの糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルス粒子の0日目及び79日目での皮下注射により行った。レンチウイルスベクター粒子の用量は、形質導入単位（TU）/動物及びng p24/動物として表わした。6匹の動物を、非分泌形態のSIVmac239 GAG（ミリストイル化欠損）をコードする3用量のレンチウイルスベクターで免疫化した。1回目の注射後での用量応答の非存在のため、全ての6匹のワクチン接種動物が、2回目の注射のために全く同じ中用量のベクターを受けた。2匹の対照動物を、高用量の関連サブグループと同じp24用量で、無関係な抗原GFPをコードするレンチウイルスベクターで免疫化した。ワクチン接種マカク、対照マカク、及びワクチン未接種マカクを、ブースト後76日目に、ワクチンと厳密に一致するGAGタンパク質を発現する高用量の病原性SIVmac251（A-M Aubertin, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France）で直腸内攻撃した（同種攻撃）。高用量のウイルス（ワクチンの防御効率の試験で通常使用される20-50 AID_{50}と比較して500 AID_{50}）を選んで、自然発生制御因子の数を制限した[5]。

【表５】

表２：ワクチン誘導性Ｔ細胞応答は広範であった。

表 2a

		p17 MA 1-132			p27 CA:133-380					p9 NC and p6:381-511			
低用量		GAG:	GAG 49-	GAG:	GAG:14	GAG:19	GAG:24	GAG:28	GAG:33	GAG:38	GAG:	GAG:481	
	20022	140	113	90	160	17	100	63	743	613	1190	23	3/11
中用量	20049	158	133	11	138	0	0	1	433	185	70	68	1/11
	20293	28	542	27	180	0	10	45	388	265	37	62	2/11
高用量	20056	100	35	102	405	77	60	15	1280	843	325	0	3/11
	20195	255	1060	32	245	28	203	95	690	543	31	24	3/11
	20058	92	150	165	297	55	47	218	900	503	128	8	2/11
		0/6	2/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	6/6	4/6	1/6	0/6	

表 2b

		p17 MA 1-132			p27 CA:133-380					p9 NC and p6:381-511			
低用量		GAG: 1-59	GAG 49-107	GAG 97-155	GAG 145-203	GAG 193-251	GAG:241-295	GAG 289-347	GAG 337-395	GAG 385-443	GAG 433-491	GAG 481-511	
	20022	173	153	207	132	93	123	85	623	402	1347	65	3/11
中用量	20049	321	291	150	198	59	176	49	449	434	135	72	2/11
	20293	167	41	0	3	49	0	27	140	302	45	79	0/11
高用量	20056	168	82	88	160	222	125	109	1275	1150	308	62	2/11
	20195	84	430	2	21	11	4	9	432	432	432	432	5/11
	20058	197	70	24	134	279	30	88	1029	909	177	46	2/11
		0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	5/6	2/6	1/6	

表 2c

		p17 MA.1-132			p27 CA:133-380					p9 NC and p6:381-511			
低用量		GAG 1-59	GAG 49-107	GAG 97-155	GAG 145-203	GAG:193-251	GAG:241-295	GAG 289-347	GAG 337-395	GAG:385-443	GAG 433-491	GAG 481-511	
	2002	190	85	78	82	182	103	55	850	873	1197	92	3/11
中用量	2004	735	161	93	52	523	322	106	513	550	187	110	4/11
	2029	0	495	40	12	0	40	240	510	520	40	128	3/11
高用量	2005	60	0	4	270	0	117	33	602	788	530	9	3/11
	2019	99	34	0	16	0	3	172	58	14	60	62	0/11
対照	2005	142	135	4	447	65	58	192	586	658	633	178	4/11
	2154	147	178	142	647	70	118	147	513	807	198	192	3/11
未感作	2045	13	252	18	205	105	119	272	217	152	123	59	0/11
	15661	288	911	408	228	0	513	161	906	893	503	102	6/11
	14184	170	173	78	268	33	88	403	312	288	137	292	1/11
	15885	148	136	159	251	188	598	326	491	331	229	12	2/11
	14468	0	46	122	72	29	0	153	37	320	1033	92	1/11
		1/12	2/12	1/12	2/12	1/12	2/12	1/12	8/12	7/12	5/12	0/12	

【０３５０】

ＧＡＧによりコードされるタンパク質（マトリクスＭＡ、キャプシドＣＡ、ヌクレオキャプシドＮＣ、及びｐ６）の多様性及びワクチン誘導性、ウイルス誘導性、及びウイルスリコール性ＧＡＧ特異的Ｔ細胞応答への相対的寄与率を、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより、一次応答（プライミング後２週目、補足表１ａ）、ブースト後１週目（補足表１ｂ）、及び感染の急性期中（チャレンジ後３週目、補足表１ｃ）のピークに、表の２行目に示す１１プールのペプチドを使用して試験した。第１の２つのカラムは動物識別子を示す。数字はＩＦＮ－Ｙ　ＳＦＣ／１００万個ＰＢＭＣに相当する。強調は飽和したＥＬＩＳＰＯＴウェルを示す。薄灰色影付きボックスは陽性応答に対応し（＞３７５　ＩＦＮ－ｇ　ＳＦＣ／１００万個ＰＢＭＣ）、濃灰色影付きボックスは個別の動物における最も強い応答を表わす。右端カラムが、各々の動物により認識されるペプチドのプール数を示すのに対し、下側の列は、ペプチドの各々の個別プールに対する応答を高めたコホートの動物数を表わす。

【０３５１】

ＧＡＧ抗原又はコドン最適化形態の抗原をコードするレンチウイルスベクターで免疫化されたマウスにおいて得られた免疫応答の比較

１．抗原をコードするポリヌクレオチドのコドン最適化によってＣＴＬ応答が改善される。

未感作マウス（ｎ＝３／群）は、コドン最適化形態のｇａｇ　ｄｅｌｔａ　ｍｙｒ（ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＣＯ）をコードする種々の用量のＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇ　ｄｅｌｔａ　ｍｙｒ又はＴＲＩＰ．ＮＩ　ＬＶの単回注射で腹腔内免疫化された。免

疫化後１０日目、免疫優性ｇａｇ　ＣＤ８＋　Ｔ細胞エピトープに対するｇａｇ特異的な細胞性免疫応答を、四量体染色（Ａ）又はＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ（Ｂ）により評価した（図３３）。ＳＦＣスポット形成細胞（Ｃ）ｇａｇのＣＤ８＋　Ｔ細胞免疫優性エピトープ及びＣＤ４＋　Ｔ細胞エピトープに応答するＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ。マウスを、１００ngのＴＲＩＰ．Ｎ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＬＶ又はＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇＡｍｙｒ　ＣＯ　ＬＶで腹腔内プライミングした。１０日後、免疫化マウスからの脾細胞を対応するペプチドで刺激し、ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより分析した。バックグラウンドの頻度をプロット前に引いた。エラーバーは１群当たり３匹のマウスでのＳＤを表わす。（Ｄ）ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＬＶ対ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＣＯ　ＬＶの免疫化により誘導されるｇａｇ特異的溶解活性の比較。ＣＴＬ活性を、免疫化後１０日目に、材料及び方法に記載する２０時間のインビボＣＴＲＬアッセイを使用して測定した。平均値＋／－ＳＤ（マウス３匹）を示す。

【０３５２】

得られた結果は、コドン最適化によって、ＴＲＩＰ．ＮＩ　ＬＶベースのワクチンにより誘導されるＣＴＬ応答が決定的に改善されることを示す。

【０３５３】

２．コドン最適化された抗原をコードするレンチウイルスベクター粒子によって、単回注射後でさえ強い持続性の細胞性免疫応答が誘導される。

得られた結果は、コドン最適化によって、ＴＲＩＰ．ＮＩ　ＬＶベースのワクチンにより誘導されるＣＴＬ応答が決定的に改善されることを示す。

【０３５４】

非組込みレンチウイルスベクターにより誘導される記憶Ｔ細胞応答を、マウスにおいて、ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇ　Δｍｙｒ又はＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇ　Δｍｙｒ　ＣＯ粒子の単回注射後にアッセイした。図３４は、コドン最適化された抗原をコードするレンチウイルスベクター粒子によって、単回注射後でさえ強い持続性の細胞性免疫応答が誘導されることを示す。

【０３５５】

３．非交差反応性ＶＳＶ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされたＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＣＯ粒子に基づくプライミング－ブースト戦略によって細胞性免疫応答が増強される。

マウスを、ＶＳＶ－Ｇインディアナでシュードタイピングされた ＴＲＩＰ．ＮＩ　ＧＡＧΔｍｙｒ　ＣＯ又はＴＲＩＰ．Ｉ　ＧＡＧ野生型粒子で免疫化し、そして１３週間後、ＶＳＶ－ＧニュージャージーでシュードタイピングされたＴＲＩＰ．ＮＩ　ＧＡＧΔｍｙｒ　ＣＯ又はＴＲＩＰ．Ｉ　ＧＡＧ野生型粒子でそれぞれブーストした。プライミング－ブーストプロトコールのための対照群には、ＶＳＶ－ＧインディアナでシュードタイピングされたＴＲＩＰ粒子（灰色図表）又はＶＳＶ－ＧニュージャージーでシュードタイピングされたＴＲＩＰ粒子（青色図表）をそれぞれ１回だけ注射したマウスが含まれた。全てのマウスを免疫化後１０日目に屠殺し、そして、ＧＡＧに対する細胞性免疫応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ（Ａ）又は四量体染色（Ｂ）により評価した（図３５）。得られた結果は、レンチウイルスベースの粒子のコドン最適化によってプライミング－ブーストワクチン計画が増強されることを示す。

【０３５６】

マウスで得られたデータは、レンチウイルスベクター粒子中で抗原をコードするポリヌクレオチドのコドン最適化が、単回注射後、又は、プライミング－ブースト注射後に、宿主において細胞性免疫応答及び特にＣＴＬ応答のレベルの改善を提供することを示す。また、得られた応答は強く持続的である。

【０３５７】

様々な経路を通じて免疫化されたマウスにおいて得られる免疫応答の比較

２つの異なる型のマウスのいくつかの群を、ＳＩＶｍａｃ２３９ＧａｇΔをコードするレンチウイルスベクター粒子でワクチン接種した。誘発された免疫応答を、筋内（ｉ．ｍ

．）、皮内（ｉ．ｄ．）、腹腔内（ｉ．ｐ．）、皮下（ｓ．ｃ．）、又は経皮的（ｔ．ｃ．ｉ．）のいずれかで実施した粒子の単回注射後１０日目に各々の群において分析した。

【０３５８】

特に、応答を、インビボ細胞毒性アッセイ（図３６～３８）又はＩＦＮｇａｍｍａ　ＥＬＩＳＰＯＴで分析した。

【０３５９】

注射を、筋内経路を通じて実施したマウス（Ｃ５７ＢＩ／６ｊ）の群では、注射を別の経路を通じて行った場合よりも強い応答が誘発された。

【０３６０】

ワクチン計画における防御のために投与された際、免疫応答の誘発のために使用される非組込みレンチウイルスベクター

材料及び方法

【０３６１】

細胞培養及びウイルス調製

【０３６２】

Ｈｅｌａ細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２）、ヒト２９３Ｔ細胞、及びアフリカミドリサル腎臓Ｖｅｒｏ細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－８１）を　、１０％（Ｈｅｌａ細胞、２９３Ｔ細胞）又は5％（Ｖｅｒｏ細胞）熱不活化ウシ胎児血清（ＦＣＳ）、ペニシリン、ストレプトマイシン、及びGlutamax（GIBCO）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で培養した。ウエスト・ナイル・ウイルス（ＷＮＶ）株ＩＳ－９８－ＳＴ１（GenBankアクセッション番号ＡＦ　４８１　８６４）は、ＮＹ９９株[１０]の厳密に関連するバリアントであり、蚊アエデス・シュードスキュテラリス（Ａｅｄｅｓ　ｐｓｅｕｄｏｓｃｕｔｅｌｌａｒｉｓ）ＡＰ６１細胞単層で増殖させた。ショ糖密度勾配での精製及び抗ＷＮＶ過免疫マウス腹水（ＨＭＡＦ）を使用したフォーカス免疫検出アッセイ（ＦＩＡ：ｆｏｃｕｓ　ｉｍｍｕｎｏｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ａｓｓａｙ）によるＡＰ６１（アエデス・シュードスキュテラリス細胞）上でのウイルスタイトレーションを以前に記載の通りに実施した。感染力価はフォーカス形成単位として表わした。

【０３６３】

レンチウイルスベクターの産生

【０３６４】

$TRIP_{sEWNV}$（図２）及び$TRIP_{GFP}$ベクタープラスミドを以前に記載の通りに構築した（Iglesias et al. J. Gene Med. 2006 Mar; 8(3): 265-74）。これらの２つのベクターのヌクレオチド配列を図４及び５にそれぞれ提示する。ベクター粒子を、以前に記載の通りに、２９３Ｔ細胞のベクタープラスミド$pTRIP_{sEWNV}$又は$pTRIP_{GFP}$、ＶＳＶ－Ｇエンベロープ発現プラスミド（ｐＨＣＭＶ－Ｇ）及びキャプシド形成プラスミド（それぞれ組込み能のある、又は、組込み能のないベクターの産生のためのｐ８．７４又はｐＤ６４Ｖ）での一過性リン酸カルシウムコトランスフェクションにより産生した。濃縮ベクター粒子のｐ２４抗原含量の定量化を、市販のＨＩＶ－１　ｐ２４酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）キット（Perkin Elemer Life Sciences）で実施した。ＴＲＩＰ．Ｉ及びＴＲＩＰ．ＮＩ粒子のベクターの力価を、以前にIglesias et al.（J. Gene Med. 2006 Mar; 8(3): 265-74）に記載の通りに、アフィジコリンで処理したＨｅＬａ細胞に形質導入し、そして、定量的ＰＣＲを実施することにより決定した。組込み及び非組込みレンチウイルスベクターの力価は、増殖停止細胞中で測定したｐ２４含量及び定量的ＰＣＲに従い類似していた。

【０３６５】

骨髄由来ＤＣの調製

【０３６６】

骨髄細胞を、マウス大腿骨及び脛骨を１０％　ＦＣＳを添加したＲＰＭＩで洗い流すことにより単離した。細胞をその後、４５μＭセルストレーナーに通し、遠心分離し、IOtest（登録商標）３溶解液（赤血球溶解液、塩化アンモニウム、炭酸水素カリウム、及びエ

チレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）の混合液；Beckman Coulter）に再懸濁し、そして、４℃で５分間インキュベートし、赤血球を溶解させた。細胞を遠心分離し、１０％　ＦＣＳ、Ｌ－グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、１mMピルビン酸ナトリウム、１０mM　ＨＥＰＥＳ、及び５０μＭ　２－メルカプトエタノールを伴う、１００ng/ml組換えマウスＦＬＴ３リガンド（R&D Systems）を添加したＲＰＭＩからなる培養液中に１ｘ１０^{6}個細胞/mlで８日間培養した。

【０３６７】

形質導入実験及びフローサイトメトリー分析

【０３６８】

非分裂細胞での形質導入実験では、Ｈｅｌａ細胞を４８ウェルプレート中に４０，０００個細胞／ウェルで８μMアフィジコリン（Sigma）の存在下で蒔いた。形質導入時に培地中に補充したアフィジコリンブロック後の２４時間目に、細胞に１～１００ng/mlの範囲の濃度で、レンチウイルスベクターで形質導入した。形質導入後２日目、細胞を収集し、そして、ｅＧＦＰ発現をフローサイトメトリーにより分析した。

【０３６９】

ＤＣ形質導入実験では、５００，０００個のＦＬＴ３Ｌ生成骨髄由来ＤＣ（ＦＬ－ＤＣ）を、分化の６日目に、５０～３００ng/mlの範囲の濃度のレンチウイルスベクターで形質導入した。形質導入後２日目、ＦＬ－ＤＣを収集し、そして、２％　ＦＣＳ及び０．０１％アジ化ナトリウム（染色緩衝液）を伴うＰＢＳ中に再懸濁した。細胞をＡＰＣ（アロフィコシアニン）抱合抗ＣＤ１１ｃ抗体及びＰｅｒＣＰ（ペリジニンクロロフィルタンパク質）抱合抗Ｂ２２０抗体で染色し、２回洗浄し、そして、FACSCalibur（BD biosciences, Franklin Lakes, NJ）でのフローサイトメトリーにより分析した。

【０３７０】

マウスの免疫化

【０３７１】

全ての動物実験を、Pasteur InstituteのOffice Laboratory of Animal Careのガイドラインに従って実施した。６週齢のＣ５７／Ｂｌ６マウスに、緩衝化０．２％ウシ血清アルブミン（ＤＰＢＳ／０．２％　ＢＳＡ，　Sigma）を添加した０．１mlダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ；ｐＨ　７．５）中の変動用量のＴＲＩＰ／ｓＥＷＮＶベクター粒子（１～１００ng/ml）を腹腔内（ｉ．ｐ．）接種した。

【０３７２】

血清抗体応答の測定

【０３７３】

マウスを、眼窩周囲経路から放血させ、そして、血清サンプルを５６℃で３０分間熱不活化させた。抗ＷＮＶ抗体を、ＥＬＩＳＡにより、ショ糖精製ＷＮＶ　ＩＳ－９８－ＳＴ１でコーティングしたマイクロタイタープレートの使用により検出した。ペルオキシダーゼヤギ抗マウス免疫グロブリン（Ｈ＋Ｌ）（Jackson Immuno Research）を、二次抗体として１：４，０００希釈で使用した。エンドポイント力価を、非免疫化マウスからの血清の光学密度（ＯＤ）を２回誘発する最後の希釈率の逆数として算出した。

【０３７４】

ＷＮＶチャレンジ

【０３７５】

ＷＮＶチャレンジを、以前に記載した通り、神経毒性ＷＮＶ株ＩＳ－９８－ＳＴ１（ｉ．ｐ．　ＬＤ　５０＝１０　ＦＦＵ）のｉ．ｐ．接種により、レンチウイルスベクターのワクチン接種後１週目又は２ヶ月目のいずれかに実施した。チャレンジしたマウスを、ＷＮＶ株の接種後２１日目まで、罹患及び死亡の徴候について毎日モニターした。

【０３７６】

結果

【０３７７】

組込み欠損したＴＲＩＰベクターでの非分裂細胞の形質導入は、高いトランスジーン発

現レベルをもたらす。

【０３７８】

組込み欠損ＬＶ（ＴＲＩＰ．ＮＩベクター）が、抗原（Ａｇ）をＤＣなどの非分裂ＡＰＣに送達するための効率的なツールでありうるとの仮説をテストするために、本発明者らは増殖停止細胞のそれらの形質導入効率を最初に評価した。この目的のために、細胞周期の特異的インヒビターであるアフィジコリンで処理したＨｅＬａ細胞を、ｅＧＦＰをコードする段階用量のＴＲＩＰ．ＮＩ又はＴＲＩＰ．Ｉ粒子に暴露させた。形質導入効率をその後、フローサイトメトリーにより決定した。図４３（上パネル）に示す通り、ＴＲＩＰ．ＮＩベクターを非分裂細胞に、高効率及び用量依存的に形質導入した。さらに、ｅＧＦＰ陽性細胞のパーセントの分析によって、ＴＲＩＰ．Ｉベクターのものと比較したＴＲＩＰ．ＮＩベクターの形質導入の能力における限界差が明らかになった。ＴＲＩＰ．ＮＩ粒子での形質導入によって高レベルのトランスジーン発現も生じたが（図４３、下パネル）、ＴＲＩＰ．Ｉ形質導入細胞と比較して２倍有意に低かった。

【０３７９】

ＴＲＩＰ非組込みレンチウイルスベクターの形質導入は、従来型樹状細胞及び形質細胞様樹状細胞の両方における効果的な抗原発現をもたらす。

【０３８０】

本発明者らは、次に、ＤＣに形質導入するためのＴＲＩＰ．ＮＩの能力を試験した。ＤＣは従来型（ｃＤＣ）（ＣＤ１１ｃ＋Ｂ２２０－）と形質細胞様（ｐＤＣ）（ＣＤ１１ｃ＋Ｂ２２０＋）として分類され、両方のこれらのＤＣサブタイプがＡｇ特異的免疫応答を刺激できる。本発明者らはその後、Ｆｌｔ３Ｌの存在下で分化する骨髄由来ＤＣ（ＦＬ－ＤＣ）の形質導入を研究し、それによって多数のｐＤＣ及びｃＤＣの生成が可能になる。ＦＬ－ＤＣを段階用量のＴＲＩＰ．ＮＩ$_{ＧＦＰ}$又はＴＲＩＰ．Ｉ$_{ＧＦＰ}$粒子に暴露させた。図４４Ａに示す通り、ＴＲＩＰ．Ｉ及びＴＲＩＰ．ＮＩベクターのいずれもＦＬ－ＤＣに形質導入でき、形質導入の最高効率はそれぞれ６０％及び５６％であった。興味深いことに、本発明者らは、ＴＲＩＰ．Ｉ粒子での形質導入によって高レベルのｅＧＦＰを発現する少ない割合のＤＣがもたらされたのに対し、ＴＲＩＰ．ＮＩでの形質導入実験によってはもたらされなかったことを観察した（ＨＩベクターと比較して、本発明のレンチウイルスベクターで細胞に形質導入した実験における、ドットブロットの右上端におけるドットの存在を参照のこと）。ベクターストックに混入する残留ｅＧＦＰタンパク質により与えられる偽形質導入の可能性を除外するために、本発明者らは、熱処理前に出された粒子への暴露後での形質導入ＤＣのパーセンテージも評価した。熱処理は異なる細胞型でのＬＶの形質導入の能力を抑止することが示されている。予測通り、熱処理によってｅＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージが劇的に減少した（図２Ａ）。

【０３８１】

本発明者らは次にＣＤ１１ｃ＋Ｂ２２０＋樹状細胞及びＣＤ１１ｃ＋Ｂ２２０－樹状細胞についてゲートし、ＬＶが各ＤＣサブセットに形質導入する能力を評価した。図４４Ｂに示す通り、組込み能力にかかわらず、ＦＬ由来ｃＤＣだけでなく、ＦＬ由来ｐＤＣも効率的にＬＶで形質導入できた。

【０３８２】

ＴＲＩＰ．ＮＩ粒子での形質導入効率は、用量依存的であったが、しかし、ＴＲＩＰ．Ｉ粒子で得られたものより非有意に低かった。興味深いことに、本発明者らは、ＴＲＩＰ．Ｉベクターでの形質導入によって高レベルのトランスジーンを発現する少ない割合のＤＣがもたらされたのに対し、ＴＲＩＰ．ＮＩベクターへのＤＣの暴露によってはもたらされなかったことを観察した（図４４Ａ）。ＴＲＩＰ．Ｉベクターでの形質導入実験においてだけ観察されたこの細胞集団は、ゲノムの活性転写領域における複数のベクターの組込みの結果でありうる。

【０３８３】

ＴＲＩＰ非組込みレンチウイルスベクターによってＡｇ特異的抗体の産生が誘導される。

【０３８４】
ＴＲＩＰ．ＮＩによって外来遺伝子をＤＣに効率的に送達できたことを考慮に入れ、本発明者らは次に特異的免疫応答を高めるためのそれらの能力を検討した。最近の試験では、本発明者らは、中和エピトープを保有する分泌形態のＷＮＶエンベロープ（ＴＲＩＰ．Ｉ　E_{WNV}）をコードするＴＲＩＰ．Ｉベクターをデザインしており、そして、本発明者らは、ＴＲＩＰ．Ｉ　E_{WNV}がＷＮＶ感染のマウスモデルにおいて抗体ベースの防御免疫を刺激できることを実証している。ＴＲＩＰ．ＮＩベクターがＢ細胞応答を開始するための能力を研究するために、動物を、マウス１匹当たり１～１００ngのｐ２４抗原の範囲での種々の用量のＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}粒子で免疫化した。対照として、マウスに、それらの形質導入能力を阻止するために加熱（ＨＩ）により不活化した１００ngのＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}粒子を接種した。免疫化後３週目、マウスを眼窩周囲から放血させて、個別の又はプールした血清を抗ＷＮＶ全抗体についてのＥＬＩＳＡによりテストした。予測通り、熱不活化ＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}ベクターでの免疫化後に、Ａｂの産生は続かなかった（図４５Ａ）。対照的に、１０ngという低い用量のＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}ベクターで免疫化されたマウスは、検出可能なレベルの抗ＷＮＶ抗体を提示し、そして、１００ngのｓＥ－ＮＩＬＶでの免疫化は抗ＷＮＶ　Ｉｇの多量の分泌を誘導し、平均力価は８×１０４に達した。

【０３８５】
本発明者らは次にＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}及びＴＲＩＰ．Ｉ　E_{WNV}ベクターにより誘発される免疫応答の強度を比較した。図４５Ｂに示す通り、３　ｎｇという低い用量の粒子のＴＲＩＰ．Ｉ　E_{WNV}でのワクチン接種によって抗ＷＮＶ抗体の非常に高い分泌が生成され、そして、力価は３～１００ngの免疫化用量の範囲内で比較的一定であり、用量応答は見られなかった。対照的に、そして、全ての予測に反して、ＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}ベクターで免疫化されたマウスからの血清中の力価は、注射した粒子の用量に比例した。ＴＲＩＰ．Ｉベクターは、３０ng未満の用量で、ＴＲＩＰ．ＮＩベクターよりも高い免疫応答を誘発したが、１００ngのいずれかのベクターでのワクチン接種は等価の応答をもたらした。

【０３８６】
まとめると、これらの結果によって、ＴＲＩＰ．ＮＩベクターでの単回免疫化が液性の特異的免疫応答を誘発するために十分であり、強度はＴＲＩＰ．Ｉベクターで得られるものと同程度であり、粒子の閾値用量を上回ることが実証された。興味深いことに、そして、驚くべきことに、非組込みベクターの使用によって、強度が注射されたレンチウイルスベクターの用量に依存的である免疫応答を得ることが可能になる。

【０３８７】
単回用量のＴＲＩＰ．ＮｉｓＥ$_{WNV}$でのマウスの免疫化によって以下の抗体力価が与えられる：

【表６】

用量	WNV 特異的抗体力価 (O.D.)
HI NI 100	0
NI 1	0
NI 3	0
NI 10	152
NI 30	569
NI 100	83000

【０３８８】
図４５Ａに示す通り、特異的ＷＮＶ抗体の強力な分泌が得られ、平均力価が１００ngのｐ２４抗原の用量で8×10^4に達する。この用量で、ＴＲＩＰ．ＮＩでの免疫化は、ＴＲＩＰ．Ｉで得られるものと等価の応答をもたらした。しかし、用量応答実験によって、

Ｂ細胞応答の誘導に必要な最小用量が、ＴＲＩＰ．ＮＩ粒子と比較して、ＴＲＩＰ．Ｉ粒子でより低いことが明らかになった。この結果についての１つの可能な説明は、Ａｇ高発現ＤＣを生成するためのＴＲＩＰ．Ｉベクターの能力に関連しうる。なぜなら、理論的根拠として、ＤＣにおけるＡｇの高発現レベルは、抗原ペプチドのより持続的な提示を支持しうるが、これにより、なぜ低用量のＴＲＩＰ．Ｉ粒子が特異的な免疫応答を誘発するために十分であったのかを説明しうるからである。この仮説によって、ＴＲＩＰ．Ｉベクターでの用量応答免疫化実験で観察されるＷＮＶ抗体の産生の非線形性も説明されうる（図４５Ｂ）。実際に、ＤＣで実施したインビトロでの用量応答実験によって、Ａｇ高発現ＤＣの外観がＴＲＩＰ．Ｉ粒子の用量と相関するとは思われないことが明らかになった（図４４Ａ）。このように、Ａｇ高発現ＤＣを生成するための能力は、注射される低用量の粒子によりＴＲＩＰ．ＩとＴＲＩＰ．ＮＩの間で観察される差の説明に寄与しうる。別の可能性は、ＶＳＶ－Ｇシュードタイピングされたレンチウイルスベクターが大きな細胞向性を有し、ひいては、注射部位で、分裂細胞を含む、ＤＣ以外の他の細胞型に形質導入しうるとの事実と関連する。これは、ＴＲＩＰ．Ｉ粒子でのワクチン接種実験においてＡｇのより持続的な発現をもたらしうる。どの細胞型をＬＶのインビボ注射後に形質導入し、そして、どの程度それらがＴＲＩＰ．Ｉ及びＴＲＩＰ．ＮＩベクターにより誘発される免疫応答の大きさに関与するのかが進行中の研究の課題である。

【０３８９】

ＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}ベクターでの免疫化は、ＷＮＶチャレンジに対する早期防御を与える。

【０３９０】

本発明者らは、以前に、ＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}がＷＮＶチャレンジに対する早期防御を与えることを示している。ＴＲＩＰ．ＮＩベクターにより誘発される免疫応答が迅速な防御ももたらすことができるか否かを決定するために、マウスを１００ngのＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}粒子で免疫化し、そして７日後に１０，０００　ＦＦＵの高病原性ＷＮＶ株ＩＳ－９８－ＳＴ１でチャレンジした（感染動物の５０％を死滅させるために必要な用量の１０００倍）。本発明者らは、このチャレンジ実験において、防御の陽性対照として１００ngのＴＲＩＰ．Ｉ　E_{WNV}で免疫化されたマウスの群及び陰性対照としてＤ－ＰＢＳを接種したマウスの別の群も含めた。予測通り、Ｄ－ＰＢＳを受けた全てのマウスがチャレンジ後１２日間以内に死亡した（図４６）。対照的に、単回用量のＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}で免疫化された全てのマウスが、ＴＲＩＰ．Ｉ　E_{WNV}で免疫化されたマウスと同様に、チャレンジから防御された。ＷＮＶチャレンジから防御されたマウスは、３週間のチャレンジ後観察期間中に病気の臨床徴候を発生しなかった。これらの結果は、ＷＮＶに対する早期の防御的免疫がＴＲＩＰの単回投与で達成されることを実証した。組込みが欠損したE_{WNV}。

【０３９１】

ＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}によって持続的防御が誘導される。

【０３９２】

先に実証した通り、ＴＲＩＰ．Ｉ　E_{WNV}でのマウスの免疫化は、ＷＮＶチャレンジに対する長期防御免疫の確立をもたらした。ＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}により誘発される防御免疫の持続期間、及び長期防御を誘導するために必要とされる粒子の最小用量を評価するために、マウスを異なる量の粒子（１、３、１０、３０、及び１００ngのｐ２４抗原）で免疫化し、そして、免疫化後２ヶ月間の待ち時間後にチャレンジした。図４７Ａに示す通り、投与されるＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}粒子の用量と防御の程度の間には用量依存的な関係が存在し、十分な防御が注射された１００ngの用量のワクチン粒子で達成された。

【０３９３】

このように、ＴＲＩＰ．ＮＩ　E_{WNV}ベクターは、ＷＮＶ感染に対する持続的免疫を誘導した。

【０３９４】

考察

【０３９５】

本実験の重要な結果は、ＴＲＩＰ．ＮＩ粒子でのワクチン接種が、投与されたレンチウイルスゲノムの組込みの非存在にもかかわらず、早期の持続的な免疫応答であり、さらに抗原用量依存的である効率的で強い免疫応答を提供できることの実証である。従って、致死用量のＷＮＶでのチャレンジに対する十分な防御が実証された。

【０３９６】

予測通り、記憶防御免疫は、ＴＲＩＰ．ＮＩ粒子により誘導される抗ＷＮＶ抗体の力価と直接的に相関した（図４５及び図４７）。実際に、特異的抗体が感染の散在を限定するため、液性免疫が、ＷＮＶに対する十分な防御免疫の確立のための決定的な構成成分であることが十分に確立されている。興味深いことに、熱不活化ＴＲＩＰ．ＮＩ粒子ならびにＨＩ－ＴＲＩＰ．Ｉ粒子は、ＷＮＶチャレンジに対する部分的な（３０％）防御を与えることができるが（データ示さず）、ＷＮＶ抗体は、ＨＩ－ＴＲＩＰ粒子の注射後３週目に動物の血清中で検出されなかった（図４５Ａ、Ｂ）。これは、細胞性免疫がＷＮＶに対する防御の確立において部分的な役割も果たしうることを示唆する。この仮説と一致して、ＣＤ８＋細胞を欠くマウスはＷＮＶ感染後に増加した死亡率を有する（Shoresta and Diamonds、未発表データ）。さらに、細胞傷害性Ｔ細胞エピトープは、いくつかのフラビウイルスのエンベロープのドメインＩＩＩ中で定められている。追加の研究が、ＴＲＩＰ．ＮＩ及びＴＲＩＰ．Ｉワクチンにより与えられる長期防御に対するＣＴＬ応答の相対的寄与を明確にするために必要とされる。さらに、ＤＣにおいてＨＩ－ＴＲＩＰ粒子の侵入を可能にする分子機構を定義するためにさらなる試験も必要とされる。なぜなら、熱処理によってＶＳＶ－Ｇエンベロープが変性し、そして、異なる細胞株におけるＬＶの形質導入能力が抑止されることが示されているからである。しかし、ＤＣの例外的な内在化能力に関して、ＨＩ　ＴＲＩＰ粒子の部分がＤＣにおいてＶＳＶ－Ｇ非依存的な機構により取り込まれ、低いが、しかし、十分なＡｇ発現を可能にし、ＨＩ－ＴＲＩＰ粒子により与えられる部分的防御を説明しうることを推測することは魅力的である。

【０３９７】

ワクチン接種マウスでの動態チャレンジ実験によって、ＴＲＩＰ．ＮＩワクチンが長期防御免疫を与えるだけでなく、粒子の単回注射後１週目という早期に防御も誘発することが明らかにされた。この早期防御に関与する正確な機構は十分に理解されていないが、本発明者らはＴＲＩＰ．ＮＩ及びＴＲＩＰ．Ｉ粒子での免疫化後１週目に特異的ＷＮＶ抗体を検出している。本発明者らは、以前に、抗体のこの早期の波が、注射後４日目のマウス、即ち、ＷＮＶ感染に対して完全に防御されたマウスに由来する特異的ＩｇＭでもっぱら構成されたことを示している。

【０３９８】

本発明者らの試験では、単回用量のＴＲＩＰ．ＮＩ粒子の直接注射に基づくワクチン接種計画によって、強固で迅速な長期の特異的免疫応答が誘発され、ＷＮＶに対する十分な防御が達成された。このように、ＴＲＩＰ．ＮＩベースのワクチン戦略は、Ｂ細胞免疫を必要とするフラビウイルスなどの病原物質に対するワクチンの開発のための安全で有効なプラットフォームを表わす。

【０３９９】

コドン最適化によって非組込みベクターの細胞性免疫応答を改善することが可能になる。さらなる改善がプライミング－ブースト計画により得られる。

材料及び方法

ｇａｇ　ｐ２７の細胞内染色。２９３　Ｔ細胞を、ｇａｇΔｍｙｒの野生型配列又はコドン最適化配列のいずれかを含むＴＲＩＰベクタープラスミド、キャプシド形成プラスミドｐ８．７　Ｄ６４Ｖ、及びＶＳＶ－Ｇインディアナ発現プラスミドでコトランスフェクトした。４８時間後、細胞を洗浄し、Cytofix-Cytoperm溶液（BD Pharmingen）中で２０分間透過処理した。PermWash緩衝液（BD Pharmingen）での２回の洗浄後、透過処理した細胞を抗ｇａｇＳＩＶ　ｐ２７抗体（55-2F12, AIDS Research and Reference Reagent P

rogram）と４℃で３０分間、PermWash緩衝液中での１：３希釈でインキュベートした。細胞を、ＦＩＴＣ抱合ラットＩｇＧ２ｂカッパモノクローナル抗体（５５３９８８，　BD Biosciences）と４℃で３０分間、PermWash緩衝液中での１：３希釈でインキュベートした。２回の追加洗浄後、細胞をフローサイトメトリーにより分析した。

【０４００】

マウスの免疫化。プライミング実験のために、マウスの群に、ＶＳＶインディアナ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされた種々の用量のＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ野生型粒子又はコドン最適化（ＣＯ）粒子を腹腔内接種した。プライミング－ブースト実験のために、マウスの群に、ＶＳＶインディアナ血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされた１００ngのｐ２４のＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒコドン最適化（ＣＯ）粒子又は１００ngのｐ２４のＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒ粒子を腹腔内接種した。１３週間後、ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＣＯ粒子でプライミングしたマウスを、ＶＳＶニュージャージー血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされた１００ngのｐ２４のＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒ　ＣＯ粒子でブーストした。並行して、ＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒ粒子でプライミングしたマウスを、ＶＳＶニュージャージー血清型からの糖タンパク質でシュードタイピングされた１００ngのｐ２４のＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒ粒子でブーストした。

【０４０１】

Ｅｌｉｓｐｏｔアッセイ。ニトロセルロースマイクロプレート（MAHA S4510、Millipore）を捕捉抗体（Mouse IFNg Elispot pair、BD Pharmingen）で一晩コーティングし、１０％　ＦＣＳ、抗生物質、ＨＥＰＥＳ、非必須アミノ酸、ｂ－メルカプトエタノール、及びピルビン酸ナトリウムを添加したRPMI1640 Glutamaxで構成される完全培地でブロックした。ベクター免疫化マウスからの脾細胞を３枚のプレートに０．２５×１０６個細胞／ウェルで加え、ＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇペプチド（NIH AIDS Research and Reference Reagent Program）で刺激した。４０時間後、スポットを、ビオチン抱合抗体（Mouse IFNg Elispot pair、BD Pharmingen）、続いてストレプトアビジン－ＡＰ（Ｒｏｃｈｅ）及びＢＣＩＰ／ＮＢ基質溶液（Promega）で明らかにした。スポットをBioreader 2000（Biosys, Karben, Germany）を使用してカウントし、結果を脾細胞１００万個当たりのＩＦＮｇスポット形成細胞（ＳＦＣ）として表わした。

【０４０２】

インビボでの細胞傷害アッセイ。標的細胞の調製のために、未感作マウスからの脾細胞を種々の濃度（高、５μＭ；低、１μＭ）のＣＦＳＥ（カルボキシフルオセイン二酢酸サクシニミジルエステル、Vybrant CFDA-SE cell-tracer kit、Molecular Probes）で標識した。高濃度のＣＦＳＥで標識した脾細胞を、５μg/mlのペプチドでパルスした。低用量のＣＦＳＥで染色した対照集団を、ペプチドのない培地中でインキュベートした。各マウスは、後眼窩静脈を通じて、各分画からの等しい数の細胞を含む混合物の１０７個のＣＦＳＥ標識細胞を受けた。１５～１８時間後、脾臓からの単一細胞の懸濁液をフローサイトメトリー（Becton Dickingson、CellQuest software）により分析した。ペプチドパルスした細胞の消失を、免疫化マウス対未感作マウスにおけるパルス集団（高ＣＦＳＥ蛍光強度）と非パルス（低ＣＦＳＥ蛍光強度）集団の比率を比較することにより決定した。特異的な死滅のパーセンテージを以下の計算に従って定めた：（１－（（$CFSE_{low}$ ｎａｉｖｅ／$CFSE_{high}$ ｎａｉｖｅ）／（$CFSE_{low}$ ｉｍｍｕｎｉｚｅｄ／$CFSE_{high}$ ｉｍｍｕｎｉｚｅｄ））＊１００。

【０４０３】

四量体染色。免疫化されたマウスからの２×１０６個の脾細胞を、室温で５分間、抗ＣＤ３－ＦＩＴＣ（Becton Dickinson）、抗ＣＤ８－ＡＰＣ（Becton Dickinson）、及びＧＡＧＳＩＶの免疫優性ペプチドに特異的なＰＥ四量体で染色した。データはFACSCaliburを使用して収集し、そして、CellQuestを使用して分析した。

【０４０４】

結論

本発明は、以下の使用による、非組込みレンチウイルスベクターで誘導される細胞性免疫応答を改善するための溶液を提供する：
１．抗原をコードするトランスジーンのコドン最適化形態、及び／又は
２．プライミング－ブースト計画
１．本発明者らは、ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ野生型抗原をコードする非組込みレンチウイルスベクターが、同じ抗原をコードする組込みレンチウイルスベクターよりも特異的Ｔ細胞応答の誘導時の強力さがずっと少ないことを実証している。より重要なことに、本発明者らは、この不良な免疫原性が、ＧａｇΔｍｙｒＳＩＶをコードするコドン最適化形態のトランスジーンの使用により克服できることを実証している。強いＴ細胞応答を誘導するための非組込みレンチウイルスベクターを伴うコドン最適化抗原の絶対的な必要条件は、予想できなかった。この結果は予測されていなかった。なぜなら、本発明者らは、非組込みレンチウイルスベクター、ならびに、組込みレンチウイルスベクターが、非分裂細胞及び特に樹状細胞、即ち、最も効率的な抗原提示細胞に効率的に形質導入できることを実証しているからである。しかし、非コドン最適化トランスジーンの発現は、非組込みレンチウイルスベクターでの形質導入細胞において、組込みレンチウイルスベクターで形質導入された細胞と比較して、２倍低かった。この結果は、インビボで、非組込みレンチウイルスベクターにより誘導される応答が、組込みレンチウイルスベクターにより誘導される応答と比較して、２倍強さ少なくなりうることを示唆した。そして、さらに２回の非組込みレンチウイルスベクターの注射が、組込みレンチウイルスベクターで得られるものに対して類似の応答を与えうることが予想できた。事実は全く異なった。なぜなら、非組込みレンチウイルスベクターにより誘発される特異的Ｔ細胞応答は、組込みレンチウイルスベクターで観察されるものより５～１０倍低いからである。さらに、非組込みレンチウイルスベクターでの特異的Ｔ細胞応答の誘導は、高用量の注射粒子でだけ達成できた（非組込みレンチウイルスベクターで定量化可能なＴ細胞応答を誘導するために必要とされる最小用量は、組込みレンチウイルスベクターで必要とされる最小用量より少なくとも１０倍高い）。コドン最適化（ＣＯ）によってこの不良な免疫原性が克服される。このように、１００ngの用量で、コドン最適化形態のｇａｇΔｍｙｒＳＩＶを持つ非組込みレンチウイルスベクターが抗原に対する記憶Ｔ細胞応答を誘導したのに対し、野生型形態を持つベクターはしなかった。しかし、ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ　ＣＯにより誘発される応答は、依然として、ＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ野生型により誘発されるものより２倍低い。
２．ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ　ＣＯに基づくプライミング－ブースト計画は、強度の点で、ＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ野生型に基づくプライミング－ブースト計画と類似の応答を誘発する。プライミング－ブースト実験において、マウスを１００ngのＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ　ＣＯ又は１００ngのＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ野生型で免疫化した。レンチウイルスベクターをＶＳＶ－Ｇインディアナエンベロープでシュードタイピングした。１３週間後、ＴＲＩＰ．ＮＩ粒子で免疫化されたマウスを、非交差反応性ＶＳＶ－Ｇニュージャージーエンベロープでシュードタイピングされた１００ngのＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ　ＣＯ粒子でブーストした。並行して、ＴＲＩＰ．Ｉ粒子でプライミングしたマウスを、ＶＳＶニュージャージーエンベロープでシュードタイピングされた１００ngのＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ野生型でブーストした。免疫化マウスからの脾細胞で実施されたＧａｇΔｍｙｒＳＩＶ特異的な免疫応答の分析（ＩＦＮｇ　ＥＬＩＳＰＯＴ、四量体染色）によって、ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ　ＣＯに基づくプライミング－ブースト計画が、大きさの点で、ＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ野生型粒子に基づくプライミング－ブースト計画と類似の応答を少なくとも誘発することが明らかとなった。この結果は以前に発表されておらず、予想できなかった。なぜなら、ＴＲＩＰ．ＮＩ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ　ＣＯ粒子での単回注射によって、ＴＲＩＰ．Ｉ　ｇａｇΔｍｙｒＳＩＶ野生型粒子の単回注射と比較してより低い応答を誘導されたからである。
【０４０５】

レンチウイルスベクター粒子をシュードタイピングするための異なる血清型のＶＳＶ－Ｇエンベロープタンパク質の使用

インディアナ血清型の水疱性口内炎ウイルスのＧ糖タンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）は、レンチウイルスベクターを操作するためのコートタンパク質として一般的に使用される膜貫通タンパク質である。

【０４０６】

現在、９つのウイルス種がＶＳＶジェンダーに明確に分類され、そして１９のラブドウイルス科が暫定的にこのジェンダーに分類され、全てが種々の程度の交差中和を示す。配列決定した場合、プロテインＧ遺伝子は配列類似性を示す。ＶＳＶ－Ｇタンパク質は、Ｎ末端の外部ドメイン、膜貫通領域、及びＣ末端細胞質側末端を提示する。それは、トランスゴルジネットワーク（小胞体及びゴルジ装置）を経て細胞表面に搬出される。

【０４０７】

コドン最適化遺伝子を生成し、ｐＴｈＶベクターのＢａｍＨ１及びＥｃｏＲ１の部位の間にクローン化し、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＮＤ－ＣＯ）を生成した（図６）。ヒト細胞中でのＶＳＶ－Ｇタンパク質の発現のためのコドン最適化は、ニュージャージー血清型の場合に示される通り、遺伝子導入効率を１００倍刺激できる（図２０）。本発明者らは、ＶＳＶ－Ｇタンパク質のいくつかの血清型が、シュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子との特定の関連において、インビボ注射後に交差中和抗体を誘導しないことをさらに示す。

【０４０８】

さらなるＶＳＶ－Ｇ血清型が、少なくとも１つのブースト注射を含むワクチンアッセイでの使用のための適した組み合わせをデザインするために必要とされる場合、他のＶＳＶ－Ｇ血清型が粒子コーティングについてテストされている。使用される第１のものはＶＳＶ－Ｇニュージャージー血清型であった。コドン最適化遺伝子を合成し、そして、ｐＴｈＶプラスミドのＢａｍＨ１及びＥｃｏＲ１の部位の間にクローン化し、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＮＪ　ＣＯ）ベクターを生成した（図７）。

【０４０９】

現在、５つの他のＶＳＶ－Ｇ遺伝子が配列決定されており（チャンディプラ、Ｃｏｃａｌ、Ｐｉｒｙ、イスファハン、及びコイ春ウイルス血症、図３）、そして、コドン最適化バージョンで調製されている。

【０４１０】

材料及び方法

１．材料

１．１．プラスミド

コドン最適化遺伝子を、Gene Art AG（Germany）により、５つの特性付けされたＶＳＶ－Ｇ血清型について生成している。遺伝子をｐＴｈＶプラスミドのＢａｍＨ１及びＥｃｒｏＲ１の部位の間にクローン化し、以下のベクターを生成した：ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＨＡＮＤＩ－ＣＯ；図８）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＯＣＡＬ－ＣＯ；図９）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＰＩＲＹ－ＣＯ；図１０）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＳＦＡ－ＣＯ；図１１）、及びｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＳＶＣＶ－ＣＯ；図１２）。

【０４１１】

２．方法

２．１．交差中和アッセイ

マウス：Ｃ５７Ｂｌ／６マウス（ハプロタイプＨ２ｂ、１２～２３週齢）に、ＶＳＶ－Ｇ血清型（インディアナ、ニュージャージー、イスファハン、Ｃｏｃａｌ、及びＳＶＣＶ、１群当たり６匹、４５０μl/マウス）でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子で腹腔内注射した。４週間後、マウスを同じ粒子（５００μl/マウス）でブーストした。１回目の後眼窩血液採取（Capijectチューブ中）をブースト後１５日目に、そして、２回目をブースト後２１日目に行う。血液を３５００rpmで６分間遠心分離し、血清を採取し、－２０℃に保った。

【０４１２】
形質導入アッセイを、これらの血清の種々の希釈物の存在下で作成した。
【０４１３】
２．２．ヒト単球由来ＤＣの生成
バフィーコートが、French Blood Bank（EFS-Rungis）から、全ての被験者からインフォームドコンセントと共に、倫理ガイドラインに従って得られた。ＰＢＭＣをフィコール密度遠心分離により単離した。単球細胞を、組織－培養物－処理プレート上での付着により濃縮した。付着工程後、細胞を、１０％　ＦＣＳ、ペニシリン－ストレプトマイシン、ピルビン酸０．１mM　＋　Ｈｅｐｅｓ　１mMを含み、顆粒球－マクロファージｒｈＧＭ－ＣＳＦ（５０ng/ml、R&D systems）及びｒＩＬ－４（２０ng/ml、R&D systems）を添加したＲＰＭＩ培地中で培養する。この培地を、４日後に、ｒｈＧＭ－ＣＳＦ（５０ng/ml）及びｒｈＩＬ－４（２０ng/ml）を含む新鮮培地と交換した。７日目、細胞をシュードタイピングし、レンチウイルスベクターで形質導入した。形質導入後２時間目、ｒｈＧＭ－ＣＳＦ及びｒｈＩＬ－４を含むＲＰＭＩ（Invitrogen）培地を加えた。細胞を形質導入後５日目に収集し、ＬＳＲ　ＩＩフローサイトメトリー（Becton Dickinson）により分析した。ＤＣによるＧＦＰの発現を、フルオレセインイソチオシアネートチャネルにおいてフローサイトメトリーにより直接的に調べた。
【０４１４】
２．３．ヒト単球由来ＤＣの表現型分析
表現型分析のために、ＤＣ（１００μl中の1×10^{6}個細胞）を、０．１μg/μlの濃度のＦＩＴＣ－又はＰＥ（Becton Dickinson）で標識した抗ＣＤ１４、ＣＤ８６、ＣＤ１ａ、及びＨＬＡ－ｄｒ抗体で、５分間室温でインキュベートした。染色された細胞をＬＳＲ　ＩＩフローサイトメトリー（Becton Dickinson）により分析した。
【０４１５】
結果
１．様々なＶＳＶ－Ｇ血清型のシュードタイピング能力の評価
ヒトコドン最適化遺伝子を５つの特性付けしたＶＳＶ－Ｇ血清型について生成し、ｐＴｈＶプラスミド内にクローン化し、以下のベクターを生成する：ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＨＡＮＤＩ－ＣＯ）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＣＯＣＡＬ－ＣＯ）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＰＩＲＹ－ＣＯ）、ｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＩＳＦＡ－ＣＯ）、及びｐＴｈＶ－ＶＳＶ．Ｇ（ＳＶＣＶ－ＣＯ）（図８～１２）。これらのエンベローププラスミドをレンチウイルスベクター粒子の産生のために使用し、それらのシュードタイピング能力をベクターの力価（ＴＵ／ｍｌ）を決定することにより評価している。図５０に示す通り、ＶＳＶ－Ｇインディアナ及びニュージャージーに加えて、５つのＶＳＶ－Ｇタンパク質のうち３つだけが、本発明者らのレンチウイルスベクター粒子を効率的にシュードタイピングすることが可能である：Ｃｏｃａｌ、イスファハン、及びＳＶＣＶ血清型。最良の力価がインディアナ血清型で観察される（有意差は、野生型タンパク質とコドン最適化タンパク質の間で観察できない）。他の血清型は、インディアナの力価の５４％（ニュージャージー）、２５％（Ｃｏｃａｌ）、２２％（ＳＶＣＶ）、及び７％（イスファハン）を生じる。
【０４１６】
チャンディプラ及びＰｉｒｙ　ＶＳＶ－Ｇ血清型はいずれもインディアナの力価のわずか０．０７％を生じる。それらの非常に低い融合活性は、本発明者らのレンチウイルスベクター粒子をシュードタイピングするためのそれらの効果的な使用を妨げうると思われる。なぜなら、それらは標的細胞を十分に形質導入することが可能ではないからである。チャンディプラＶＳＶ－Ｇタンパク質のこの低効率は、ＶＳＶ－Ｇシュードタイピングされた複製能が欠損したヒト免疫不全ウイルス粒子との関連で、それが免疫応答をブーストする能力に欠けるとの報告を説明できる（Baliga CS, et al, Molecular Therapy, 2006）。
【０４１７】
２．交差中和アッセイ

中和抗体を生成するための本発明者らのＶＳＶ－Ｇタンパク質の適性を特性付けすること、及び、これらの抗体が異種ＶＳＶ－Ｇ血清型を潜在的に交差中和するか否かをチェックすることは、シュードタイピングされたベクターがワクチン接種試験において注射されるべき好ましい順番に決まるために有用となりうる。

【０４１８】

効率的なＶＳＶ－Ｇタンパク質（インディアナ、ニュージャージー、Ｃｏｃａｌ、イスファハン、及びＳＶＣＶ）でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子を、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスにおいて２回注射し、注射の間は４週間間隔であった。２回目の注射後の１５日目、血液をマウスから採取し、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子を中和するその能力をテストした。図５１及び５２に示す通り、ＶＳＶ－Ｇインディアナ、ニュージャージー、ＳＶＣＶ、及びイスファハンのシュードタイプは、任意の他のＶＳＶ－Ｇタンパク質に対して検出可能な抗体を誘導しない。故に、それらを１回目の注射のために任意の順番で使用できる。対照的に、抗Ｃｏｃａｌ抗体は、インディアナ及びＳＶＣＶでシュードタイピングされた粒子を強く阻害する。従って、使用する場合、ワクチン接種の効果を阻害する任意の中和反応を回避するために、Ｃｏｃａｌシュードタイピングされた粒子を最後の注射のために使用すべきである。まとめると、種々のテストされたＶＳＶ－Ｇタンパク質をプライミング－ブースト計画において連続的に使用する場合、シュードタイピングされた粒子の組み合わせでは、特に、ＶＳＶ－Ｇシュードタイピングされた粒子を以下の順番で注射すべきであるとの事実を考慮に入れる：インディアナ　－　ニュージャージー　－　イスファハン　－　ＳＶＣＶ／Ｃｏｃａｌ。

【０４１９】

３．サル及びヒトの血清中での抗体の保有率

ＶＳＶ－Ｇタンパク質を中和することが可能である抗体のヒト血清中での存在は、本発明者らのベクター粒子をシュードタイピングするためのそれらの使用前に決定すべきである。ヒト血清で得られうる中和応答の強度を評価するために、本発明者らは、本発明者らの試験において使用した動物から得られた種々のサル血清の存在下で、選択したＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされた本発明者らの粒子をテストすることを最初に決めた。故に、本発明者らは、４匹のサル（１匹はワクチン接種せず、３匹はＶＳＶ－Ｇインディアナでシュードタイピングされた種々の用量　－　低、中、及び高用量　－　の粒子でワクチン接種し、単独用量のＶＳＶ－Ｇニュージャージーシュードタイピング粒子でブーストした）から、種々の時間（注射前、プライミング後、及びブースト後）に血清を採取した。これらのサル血清が、選択されたＶＳＶ－Ｇタンパク質（インディアナ、ニュージャージー、Ｃｏｃａｌ、イスファハン、及びＳＶＣＶ）でシュードタイピングされた粒子を中和する能力をその後にテストし、結果を図５３～５７にそれぞれ示す。予測通り、強い中和活性が、ＶＳＶ－Ｇインディアナに対して、インディアナシュードタイピング粒子でワクチン接種されたサルからの血清において用量依存的に見出され（図５３）、また、ニュージャージー粒子に対して、ニュージャージーシュードタイピング粒子でブーストされたサルからの血清において見出された（図５４）。故に、本発明者らは、同種の中和活性が約１／１０２４血清希釈（全活性の５０％が１／１０２４の血清希釈で得られる）でのＩＣ　５０により特徴付けられる。図５５において、本発明者らは、ＶＳＶ－ＧＣｏｃａｌ血清型に対する中和活性が、高用量のインディアナ粒子を受けたサルにより特異的に発生していることが分かる（この応答は低用量のインディアナ粒子では観察されない）。しかしながら、イスファハン又はＳＶＣＶ血清型のいずれに対する特異的な中和活性も、事前に免疫化したサル、又は、ワクチン接種されたサルからの血清において見出されていない（図５６及び５７）。

【０４２０】

ＶＳＶ－Ｇタンパク質を中和することが可能な抗体のヒト血清中での存在を、無作為に選択した９６のヒト血清中で決定している。選択されたＶＳＶ－Ｇタンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスベクター粒子での形質導入実験を、（加熱した、及び、

加熱していない）ヒト血清の存在下で行った。図５８にまとめた結果（実験の詳細を図５９に示す）は、一部の患者の血清がＶＳＶ－Ｇタンパク質に対して強い中和活性を提示することを示す（インディアナに対して患者２人、ニュージャージーに対して４人、そして、Ｃｏｃａｌに対して３人）。この中和活性が同種又は特異的でないかを決定するために、これらの患者をさらに研究し、異なるＶＳＶ－Ｇでシュードタイピングされた粒子の形質導入アッセイをこれらの血清の連続希釈物の存在下で行った。図６０に示す通り、血清の２倍希釈物の存在下でＶＳＶ－Ｇインディアナに対する中和活性を提示した患者（患者＃３９、４７、５４、８３、９４、及び９９）が、さらなる希釈倍数でもはや中和活性を示さなかった。同じ観察が、ニュージャージーＶＳＶ－Ｇタンパク質（患者＃７、９、６３、７０、８４、及び８８）、ＳＶＣＶ　ＶＳＶ－Ｇタンパク質（患者１０、７８、９４、３９、８４、及び９８）、及びイスファハンＶＳＶ－Ｇタンパク質（患者＃１０、７８、９、９４、７０、８４、及び９８）に対して中和活性を以前に示した患者で行うことができた。対照的に、Ｃｏｃａｌ　ＶＳＶ－Ｇタンパク質に対して中和活性を提示する患者のうち（患者＃９、５７、６７、８０、８８、５４、６２、６９、８３、及び９３）、２人が依然として高い血清希釈物で中和活性を提示しており（患者＃６７及び６９）、ＩＣ５０は約１／５１２血清希釈であった。これらの結果は、Ｃｏｃａｌ血清型を本発明者らのレンチウイルスベクター粒子のシュードタイピングのために使用する場合、抗Ｃｏｃａｌ保有率を患者において決定しなければならないであろうことを示す。

【０４２１】

４．異なるＶＳＶ－Ｇエンベロープによりシュードタイピングされたベクター粒子でのヒト単球由来樹状細胞の形質導入

本発明の提案されたワクチン接種プロトコールにおいて、インディアナＶＳＶ－Ｇシュードタイプでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターを最初に注射し、免疫学的反応をプライミングする。免疫学的反応をブーストするために、以前に記載されたＶＳＶ－Ｇ血清型の１つでシュードタイピングされたレンチウイルスベクターをレンチウイルスベクター粒子の２回目の注射のために使用する。樹状細胞は、先天性免疫及び適応免疫において中心的な役割を果たす。故に、本発明者らは、異なるＶＳＶ－Ｇタンパク質によりシュードタイピングされたベクター粒子がヒトＤＣに融合する能力を特性付けした。従って、ヒト単球由来樹状細胞（ｍＤＣ）を、種々のＶＳＶ－Ｇタンパク質（ニュージャージー、イスファハン、ＳＶＣＶ、Ｃｏｃａｌ、又はチャンディプラ）でシュードタイピングされたレンチウイルスベクターで形質導入し、様々な粒子での力価（ＴＵ／ｍｌ）の決定をもたらし、それは各ＶＳＶ－Ｇの融合能と直接的に相関する。その上、古典的には２９３　Ｔ細胞で行われるベクター粒子の力価も特性付けし、形質導入の相対力価（力価ＤＣ／力価２９３Ｔ）を定めた。実験によって、テストされた全てのＶＳＶ－ＧエンベロープがｍＤＣに融合する相対的能力を提示し、顕著な例外はＶＳＶ－Ｇのチャンディプラ血清型であった（図６１）。ＶＳＶ－Ｇインディアナは、テストされた他と比較して、最も強い融合能を持つエンベロープであると思われる。しかしながら、ＶＳＶ－Ｇニュージャージー、イスファハン、ＳＶＣＶ、及びＣｏｃａｌも、ｍＤＣと融合する良好な能力を提示する。様々なエンベロープを考慮すると、２つの異なる実験により提供されたデータ（図６１）は、相対力価（ＤＣ力価／２９３　Ｔ力価）の値が何であれ、同じパターンの融合能を示した。これは、形質導入時に使用されるｍＤＣの生理学的状態における差に起因する。

【０４２２】

【表７】

BIBLIOGRAPHY

Addo, M. M., Yu, X. G., Rathod, A., Cohen, D., Eldridge, R. L., Strick, D., Johnston, M. N., Corcoran, C., Wurcel, A. G., Fitzpatrick, C. A., *et al.* (2003). Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. J Virol *77*, 2081-2092.

Andrieu, J. M., and Lu, W. (2007). A dendritic cell-based vaccine for treating HIV infection: background and preliminary results. J Intern Med *261*, 123-131.

Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prevost, M. C., Allen, T. D., and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. Embo J *26*, 3025-3037.

Autran, B., Carcelain, G., Combadiere, B., and Debre, P. (2004). Therapeutic vaccines for chronic infections. Science *305*, 205-208.

Autran, B., Carcelain, G., Li, T. S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debre, P., and Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. Science *277*, 112-116.

Andreas Bergthaler, Nicolas U. Gerber, Doron Merkler, Edit Horvath, Juan Carlos de la Torre, Daniel D. Pinschewer, 3- PloS Pathogens Vol. 2, No. 6, e51, Envelope Exchange for the Generation of Live-Attenuated Arenavirus Vaccines

Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., Lederman, M. M., Benito, J. M., Goepfert, P. A., Connors, M., *et al.* (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood *107*, 4781-4789.

Breckpot, K., Dullaers, M., Bonehill, A., van Meirvenne, S., Heirman, C., de Greef, C., van der Bruggen, P., and Thielemans, K. (2003). Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy. J Gene Med *5*, 654-667.

(3) Breckpot, K., Aerts, J. L. & Thielemans, K. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. Gene Ther

14, 847-62 (2007).

Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., *et al.* (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med *12*, 1365-1371.

Briggs, J. A., Simon, M. N., Gross, I., Krausslich, H. G., Fuller, S. D., Vogt, V. M., and Johnson, M. C. (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. Nat Struct Mol Biol *11*, 672-675.

Brown, B. D. et al. In vivo administration of lentiviral vectors triggers a type I interferon response that restricts hepatocyte gene transfer and promotes vector clearance. Blood 109, 2797-805 (2007).

Carrington, M., Nelson, G. W., Martin, M. P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J. J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., and O'Brien, S. J. (1999). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. Science *283*, 1748-1752.

Cronin J. et al, Curr Gene Ther. 2005, August; 5(4) : 387-398 *Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping*

Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., *et al.* (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. Nature *443*, 350-354.

Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. J Gene Med *6 Suppl 1*, S125-138.

(9) Deml, L. et al. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. J Virol 75, 10991-1001 (2001).

Despres P. et al. Infect Dis. 2005; 191: 207-214

Donello J.E. et al, J. Virol. 1998, June; 72(6): 5085-92

Dullaers, M., and Thielemans, K. (2006). From pathogen to medicine: HIV-1-derived lentiviral vectors as vehicles for dendritic cell based cancer immunotherapy. J Gene Med *8*, 3-17.

Esslinger, C., Chapatte, L., Finke, D., Miconnet, I., Guillaume, P., Levy, F., and MacDonald, H. R. (2003). In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. J Clin Invest *111*, 1673-1681.

Firat, H., Garcia-Pons, F., Tourdot, S., Pascolo, S., Scardino, A., Garcia, Z., Michel, M. L., Jack, R. W., Jung, G., Kosmatopoulos, K., *et al.* (1999). H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. Eur J Immunol *29*, 3112-3121.

Firat H. et al. The Journal of Gene Medicine 2002; 4: 38-45

Frank, I., Santos, J. J., Mehlhop, E., Villamide-Herrera, L., Santisteban, C., Gettie, A., Ignatius, R., Lifson, J. D., and Pope, M. (2003). Presentation of exogenous whole inactivated simian immunodeficiency virus by mature dendritic cells induces CD4+ and CD8+ T-cell responses. J Acquir Immune Defic Syndr *34*, 7-19.

Fredericksen B.L. et al .J. Virol. (1995) 69: 1435-1443

Gauduin, M. C., Yu, Y., Barabasz, A., Carville, A., Piatak, M., Lifson, J. D., Desrosiers, R. C., and Johnson, R. P. (2006). Induction of a virus-specific effector-memory CD4+ T cell response by attenuated SIV infection. J Exp Med *203*, 2661-2672.

Girard, M. P., Osmanov, S. K., and Kieny, M. P. (2006). A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). Vaccine *24*, 4062-4081.

Goulder, P. J., and Watkins, D. I. (2004). HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. Nat Rev Immunol *4*, 630-640.

Gulick, R. M., Mellors, J. W., Havlir, D., Eron, J. J., Meibohm, A., Condra, J. H., Valentine, F. T., McMahon, D., Gonzalez, C., Jonas, L., *et al.* (2000). 3-year suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine, and lamivudine. Ann Intern Med *133*, 35-39.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science *302*, 415-419.

He, Y. & Falo, L. D., Jr. Lentivirus as a potent and mechanistically distinct vector for genetic immunization. Curr Opin Mol Ther 9,439-46 (2007).

Hel, Z. et al. improved vaccine protection from simian AIDS by the addition of nonstructural simian immunodeficiency virus genes. J Immunol 176,85-96 (2006).

Iglesias, M. C., Mollier, K., Beignon, A. S., Souque, P., Adotevi, O., Lemonnier, F., and Charneau, P. (2007). Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. Mol Ther *15*, 1203-1210.

Iglesias, M.C. et al. A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. J Gene Med 8, 265-74 (2006).

Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Safrit, J. T., Mittler, J., Weinberger, L., *et al.* (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. J Exp Med *189*, 991-998.

Karlsson, I. et al. Dynamics of T-cell responses and memory T cells during primary simian immunodeficiency virus infection in cynomolgus macaques. J Virol Si, 13456-68 (2007).

Kiepiela, P., Ngumbela, K., Thobakgale, C., Ramduth, D., Honeyborne, I., Moodley, E., Reddy, S., de Pierres, C., Mncube, Z., Mkhwanazi, N., *et al.* (2007). CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. Nat Med *13*, 46-53.

Koff, W. C., Johnson, P. R., Watkins, D. I., Burton, D. R., Lifson, J. D., Hasenkrug, K. J., McDermott, A. B., Schultz, A., Zamb, T. J., Boyle, R., and Desrosiers, R. C. (2006). HIV vaccine design: insights from live attenuated SIV vaccines. Nat Immunol *7*, 19-23.

Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D. D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. J Virol *68*, 4650-4655.

Gallione, C.J. and Rose, J.K. – J. Virol. 46(1), 162-169.

Georgel, P. et al. Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. Virology 362,304-13 (2007).

Iglesias, M. C. et al. Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. Mol Ther 15, 1203-10 (2007).
Iglesias MC, et al, A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective protective humoral immunity against West Nile virus. J. Gene Med. 2006 Mar; 8(3):265-274.
Iglesias MC et al, Polyepitopes Induce Broad CTL Responses *In Vivo*. Mol Ther. 2007 Jun, 15(6) : 1203-10.
Isidoro Martinez and Gail W. Wertz, The Journal of Virology, Mar. 2005, p. 3578-3585 Vol. 79, No. 6, Biological Differences between Vesicular Stomatitis Virus Indiana and New Jersey Serotype Glycoproteins: Identification of Amino acid Residues Modulating pH-Dependent Infectivity
Kiepiela, P. et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. NatMed 13, 46-53 (2007).
Letvin, N. L. et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. Science 312, 1530-3 (2006).
Mattapallil, J. J. et al. Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. J Exp Med 203, 1533-41 (2006).
zur Megede, J. et al. Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. J Virol 74,2628-35 (2000).
Mellors, J. W. (1996). Closing in on human immunodeficiency virus-1. Nat Med *2*, 274-275.
Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., *et al.* (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. Nat Biotechnol *24*, 687-696.
Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J., and Holmberg, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N Engl J Med *338*, 853-860.
Pichlmair, A. et al. Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral

responses via Toll-Uke receptor 9. J Virol 81,539-47 (2007).

Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. J Virol *65*, 532-536.

Reimann, K. A., Parker, R. A., Seaman, M. S., Beaudry, K., Beddall, M., Peterson, L., Williams, K. C., Veazey, R. S., Montefiori, D. C., Mascola, J. R., *et al.* (2005). Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses. J Virol *79*, 8878-8885.

Rose, N. F, et al. An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. Cell 106, 539-49 (2001).

Nina F. Rose, Anjeanette Roberts, Linda Buonocore, and John K. Rose, The Journal of Virology, Dec. 2000, p. 10903-10910 Vol. 74, No. 23, Glycoprotein Exchange Vectors based on Vesicular Stomatitis Virus Allow Effective Boosting and Generation of Neutralizing Antibodies to a Primary Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1

Nina F. Rose, Preston A. Marx, Amara Luckay, Douglas F. Nixon, Walter J. Moretto, Sean M. Donahoe, David Montefiori, Anjeanette Roberts, Linda Buonocore, and John K. Rose, Cell, Vol. 106, 539-549, September 7, 2001, An Effective AIDS Vaccine Based on Live Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Recombinants

Nishimura N. et al (PNAS (2002) 99: 6755-6760

Rosenberg, E. S., Altfeld, M., Poon, S. H., Phillips, M. N., Wilkes, B. M., Eldridge, R. L., Robbins, G. K., D'Aquila, R. T., Goulder, P. J., and Walker, B. D. (2000). Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. Nature *407*, 523-526.

Saag, M. S. (1997). Use of virologic markers in clinical practice. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol *16 Suppl 1*, S3-13.

Sacha, J. B., Chung, C., Rakasz, E. G., Spencer, S. P., Jonas, A. K., Bean, A. T., Lee, W., Burwitz, B. J., Stephany, J. J., Loffredo, J. T., *et al.* (2007). Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. J Immunol *178*, 2746-2754.

Schoenly, K. A. & Weiner, D. B. HIV-1 Vaccine Development: Recent Advances in

the CTL Platform "Spotty Business". J Viral (2007).

Steven AC. And Spear PG, Viral Glycoproteins and an Evolutionary Conundrum.

Tonks, A. (2007). Quest for the AIDS vaccine. Bmj *334*, 1346-1348.

Trkola, A., Kuster, H., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Huber, M., Rehr, M., Oxenius, A., *et al.* (2005). Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. Nat Med *11*, 615-622.

VandenDriessche T. et al. Blood, 1 August 2002- vol. 100, n° 3, p. 813-822

Vargas, J., Jr., Gusella, G. L., Najfeld, V., Klotman, M. E., and Cara, A. (2004). Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. Hum Gene Ther *15*, 361-372.

Weber, J. (2001). The pathogenesis of HIV-1 infection. Br Med Bull *58*, 61-72.

Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., and et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature *373*, 117-122.

Wilson, N. A. et al. Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239. J Virol 80,5875-85 (2006).

Wiseman, R. W., Wojcechowskyj, J. A., Greene, J. M., Blasky, A. J., Gopon, T., Soma, T., Friedrich, T. C., O'Connor, S. L., and O'Connor, D. H. (2007). Simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection of major histocompatibility complex-identical cynomolgus macaques from Mauritius. J Virol *81*, 349-361.

Yee J. et al, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9564-9568.

Zarei, S., Abraham, S., Arrighi, J. F., Haller, O., Calzascia, T., Walker, P. R., Kundig, T. M., Hauser, C., and Piguet, V. (2004). Lentiviral transduction of dendritic cells confers protective antiviral immunity in vivo. J Virol *78*, 7843-7845.

Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. Cell *101*, 173-185.

Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., and Hope, T. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. J Virol *73*, 2886-2892.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. J Virol *72*, 9873-9880.

【図１】

CAEV

GTTCCAGCCACAATTTGTCGCTGTAGAATCAGCCATAGCAGCAGCCCTAGTCGC
CATAAATATAAAAAGAAAGGGTGGGCTGGGGACAAGCCCTATGGATATTTTTAT
ATATAATAAAGAACAGAAAAGAATAAATAATAAATATAATAAAAATTCTCAAAA
AATTCAATTCTGTTATTACAGAATAAGGAAAAGAGGAC （配列番号１）

EIAV

CTTGTAACAAAGGGAGGGAAAGTATGGGAGGACAGACACCATGGGAAGTATTTA
TCACTAATCAAGCACAAGTAATACATGAGAAACTTTTACTACAGCAAGCACAAT
CCTCCAAAAAATTTTGTTTTTACAAAATCCCTGGTGAACATGATTGGAAGGGAC
CTACTAGGGTGCTGTGGAAGGGTGATGGTGCAGTAGTA （配列番号２）

VISNA

GGACCCTCATTACTCTAAATATAAAAAGAAAGGGTGGGCTAGGGACAAGCCCTA
TGGATATATTTATATTTAATAAGGAACAACAAAGAATACAGCAACAAAGTAAAT
CAAAACAAGAAAAAATTCGATTTTGTTATTACAGAACAAGAAAAAGAGGGCATC
CAGGAGAGTGGCAAGGACCAACACAGGTACTTTGGGGC （配列番号３）

SIV_{AGM}

TACTGATGGCTTGCATACTTCACAATTTTAAAAGAAAGGGAGGAATAGGGGGAC
AGACTTCAGCAGAGAGACTAATTAATATAATAACAACACAATTAGAAATACAAC
ATTTACAAACCAAAATTCAAAAAATTTTAAATTTTAGAGTCTACTACAGAGAAG
GGAGAGACCCTGTGTGGAAAGGACCGGCACAATTAATC （配列番号４）

HIV-2 ROD

TGCATGAATTTTAAAAGAAGGGGGGGAATAGGGGATATGACTCCATCAGAAAGA
TTAATCAATATGATCACCACAGAACAAGAGATACAATTCCTCCAAGCCAAAAAT
TCAAAATTAAAAGATTTTCGGGTCTATTTCAGAGAAGGCAGAGATCAGTTGTGG
AAAGGACCTGGGGAACTACTGTGGAAAGGAGAAGGAGC （配列番号５）

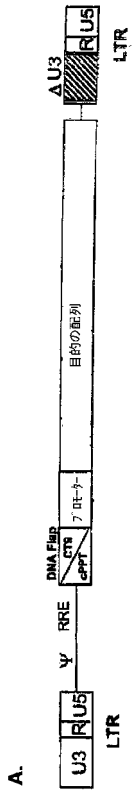
HIV-1 LAI

CAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAG
GGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAA
AACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATC
CACTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGT （配列番号６）

HIV1

TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA
CATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAAT
TCAAAATTTTC （配列番号７）

【図２Ａ】



【図２Ｂ】

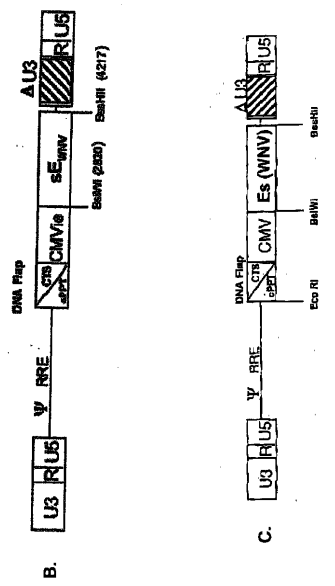


Fig. 2B

【図２Ｃ】

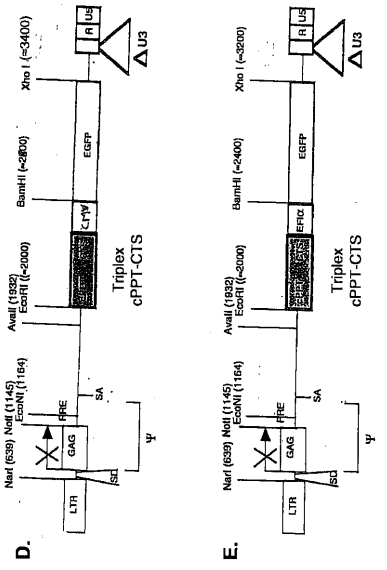


Fig. 2C

【図３Ａ】



【図３Ｂ】

インディアナウイルス

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPKSHKAIQADGWMCHAGKWVTT
CDFRWYGPKYITQSIASFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFIN
GKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPS
GVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAF
TIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLS
SKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLFFGDTGLSKNPIELVEGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKLKHTKKR
QIYTDIEMNRLGK

チャンディプラウイルス

MTSSVTISVVLLISFITPLYSYLSIAFPENTKLDWKPVTKNIRVCPMGGEWFLEPGLQEESFLSSTPIGATPSKSDGFLCHAA
KWVTTCDFRWYGPKYITHSINIKPTRSDCDTALASYKSGTLVSLGFPPESCGYASVTDSEFLVIMITPHHVGVDDYRGHWVD
PLFVGGECDQSYCDTIHNSSVWIPADQTKKNICGQSFTPLTVTVAYDKTKEIAAGGIVFKSKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGI
KFPNGEWVSLMLKLRSKRNLYFPCLKMCPTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRILDYSLCQNTWDKVERKEPLSPLDLSYLASX
SPGKGLAVTVINGTLSAHAKYIRTWIDYGEMKEIKGGRGEYSKAPELLWSQWFDFGPFKIQPNGLLHTGKTFKFPLYLIGAGIIDS
DLHELDEAAPIDHPQMPDASVLPEDEIIFFGDTGVSKNPIELIQGWFSNWRESVMAIVGIVLLIVVTFLAIKTVRVLNCLWR
PRKKAIVRQEVDVESRLNHFEMRGFPEYVKR

Piry ウイルス

MGLFFILVWVLMTDTVLGKFQIVFPDQNELEWRPVVGDSRHCPQSSEMQFDGSRSQTILTGKAFVGITPSKSDGFICHAAKWV
TTCDFRWYGPKYITHSIHHLRPTTSDCETALQRVKDGSLINLGFPPESCGYATVTDSEAVLVQVTPHHVGVDDYRGHWIDPLF
PGGECSTNFCDTVHNSSVWIPKSQKTDICAQSFKNIKMTASYPSEGALVSDRFAFHSAYHPNMPGSTVCIMDPCHQPGLRFTN
GEWVGLNVEQSIREKKISAIFPNCVAGTEIRATLESEGARTLTWETQRMLDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPLDLSYLSPRAPGX
GMAYTVINGTLNSAHAKYIRTWIDYGEMKEIKGGRGEYSKAPELLWSQWFDFGPFKIQPNGLLHTGKTFKFPLYLIGAGIIDS
DLHELDEAAPIDHPQMPDASVLPEDEIIFFGDTGVSKNPIELIQGWFSNWRESVMAIVGIVLLIVVTFLAIKTVRVLNCLWR
PRKKAIVRQEVDVESRLNHFEMRGFPEYVKR

ニュージャージーウイルス

MLSYLIFALAVSFILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNYCPTSADKNSHGTQTGIPVELTMPKGLITHQVEGFMCHSALWMTT
CDFRWYGPKYITHSIMNEEPTDYQCLEAIKSYKDGVSFNGFPPQSCGYGTVTDAEAHIVTVTPHSVKVDEYTGEWIDSQFP
GRCKGQICETVHNSTKWFTSSDGESVCSQLFTLVGGIFFSDSEEITSMGLPETGIRSNYFPYISTEGICKMPFCRKQGYKLKN
DLWFQ:MDPDLDKTVRDLPMIKDCDLSSSIITPGEHATDISLISVDVERILDYALCQNTWSKIESGEPITPVDLSYLGPKNPGV
GPVFTINGSLMYFSKYLRVELESPVIPAMEGKVAGTRIVRQLWDQWFPFGEVEIGPNGVLKTKQGYKFPLHIIGTGEVDSD
IKMERVVMHWEHPHIEAAQTFLKKDDTGEVLVYGDTGVSKNPVELVEGWFSGWRSSLMGVLAVIIGFVILMFLIXLIGVLSSL
FRPKRRPIYKSDVEMAHFR

Cocal ウイルス

MNFLLLTPIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWIT
TCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSVAVVVQATPHHVLVDEYTGEWIDSQFP
NGKCETEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKDKVCKMNYCKHAGVRLPS
GVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATTESAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAF
TIINGTLKYFSTRYIRIDINPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLHKT
SQAEVFEMPHLAEAPKQLPEEETLFPGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNX
RIYNDIEMSRFRK

イスファハンウイルス

MTSVLFWVGVLLGAFGSTHCSIQIVFPSETKLVWKPVLKGTRYCPQSAELNLSPDLKTMAFDSKVPIGITPSNSDGYLCHAAK
WVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFPPESCGYASITDSEFYVVLVTPHPVGVDDYRGHWVDP
LFPTSECNSNFCETVNNATMWIPKDLKTHDVCSQDFQTIRVSVMYPQTKPCKGADLTLKSKFHAHHXGDRVCKMKPCKNKYGLR
LGNGEWIEVGDEVMLDNSKLLSLFPDCLVGSVVKSTLLSEGVQTALWETDRLLDYSLCQNTWEKIRKEPLSAVDLSYLAPS
PGKGMAYIVANGSLMSAPARYIRVWIDSPILKEIKGKKESASGIDTVLWEQWLPFNGMELGPNGLIKTKSGYKFPLYLLGMGI
VDQDLQELSGVNPVDMPHVPIAQAFVSEGEVFFGDTGVSKMPIELISGWFSDWKETAAALGFAAISVILIIGLMRLLPLLCR
RRKQKKVIYKDVELNSFDPRQAFHR

SVCV ウイルス

MSIISYIAFLLLIDSTFGIPIFVPSGQNISWQPVIQPFDYQCPIHGNLPNTMGLSATKLTIKSPSVFSTCKVSGWICHAASWK
TTCDYRWYGPQYITHSIHPISPTIDECKRIISRIASGTDEDLGFPPQSCGWASVTTVSNTNYKVVPHSVHLEFYGGHKVIDHEF
NGGECREKVCEMKGNMSINWTTETVQHECEKHIEEVEGIMYGNAPRGDAIYINNFIIDKHHRVYRFGGSCRMKFCNKDGIKFT
RGDWVEKTAETLTNIYANIPECADGTLVSGHRPGLDLIDTVFNLENVVEYTLCEGTKRKINNQEKLTSVDLSYLAPRIGGFGS
VFRVRNGTLERGSTYYIKIEVEGPIVDSLNGTDPRTNASRVFWDDWELDGNIYQGFNGVYKGKDGKIHIPLNMIESGIIDSE
QHAFQADIIPHPHYDDDEIREDDIFFDNTGENSNPVDAVVEWVSGWGYSLKFFGTTLVALILIFLLIRCCVACTYLMKKSKRP
ATESHEMRSFV

【図４Ａ】



Fig. 4A

【図４Ｂ】

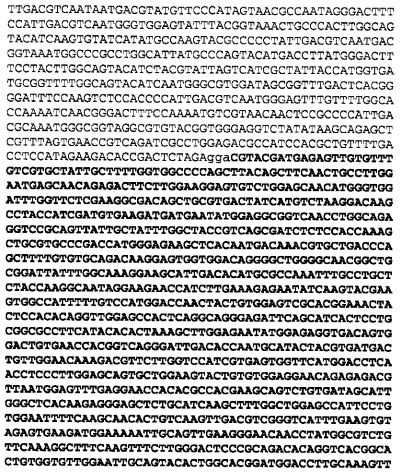


Fig. 4B

【図５Ａ】

TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGG
ATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGG
GCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTAC
CAGTTGAGCCAGAGAAGTTAGAAGAAGCCAACAAAGGAGAAGAACACCAGC
TTGTTACAACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAGAAGT
GTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGGTGGCCCGA
GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGATATCGAGCTTGCTACAA
GGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACT
GGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCT
GTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC
TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCT
TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC
TCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACA
GGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACT
CGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAG
TACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCG
AGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATT
CGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATG
GGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAG
ACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTA
TTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACA
AGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCC
GCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTG
AATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCC
ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAAT
AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA
GTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT
GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG
CTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC
TCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAG
TAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGG
ACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAA
TCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAA
ATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATA
TAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTT
TTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATT
ATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAG
GAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTA
GTGAACGGATCTCGACGGTATCGCCGAATTCACAAATGGCAGTATTCATC
CACAATTTTaaaagaaaagggggggATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAG
AATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAAC
AAATTACaaaaattcaaaatttttCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGAT
CCACTTTGGGGCGATAAGCTTGGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA
AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAAT

Fig. 5A

【図５Ｂ】

AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG
TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG
CAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAG
TCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGC
GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAA
CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAA
GACACCGACTCTAGAggatccccaccggtcgccaccatggtgagcaaggg
cgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcg
acgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgcc
acctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcc
cgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgct
tcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgcc
atgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacgg
caactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtga
accgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctg
gggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggc
cgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaaca
tcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccca
atcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaacctacctgagcaccca
gtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgc
tggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtac
aagtaaagcggccggactctagctcgagACCTAGAAAAACATGGAGCAAT
CACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAG
CACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTA
AGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGA
AAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGatcgtc
gagAGATGCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCT
GGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCA
CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGC
CCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT
CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT

Fig. 5B

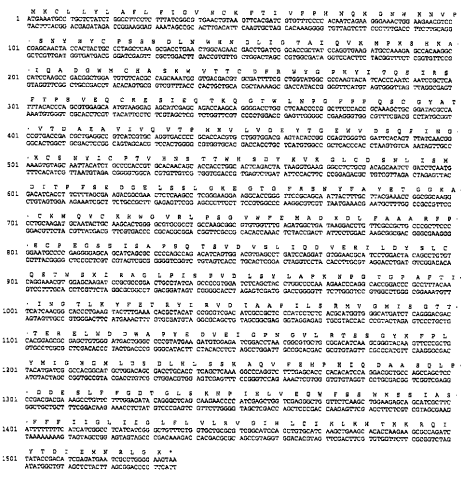
【図６Ａ】

A.

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLVGTALQVKMPKSHKAIQ
ADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDA
EAAIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLISMDITFFSE
DGELSSLGKKGTGFRSNYFAYETGDKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSIS
APSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPVFTIINGTLKYFETR
YIRVDIAAPILSRMVGMISGTTTERVLWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHL
SSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDETLFFGDTGLSKNPIEFVEGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLR
VGIYLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK (GenBank # ML11048)

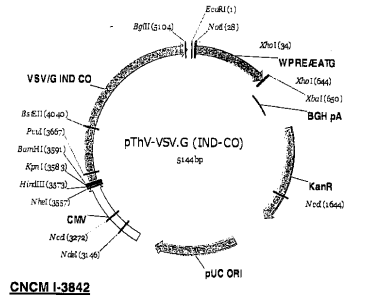
【図６Ｂ】

B.

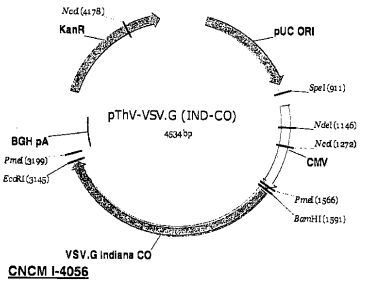


【図６Ｃ】

C.



CNCM I-3842



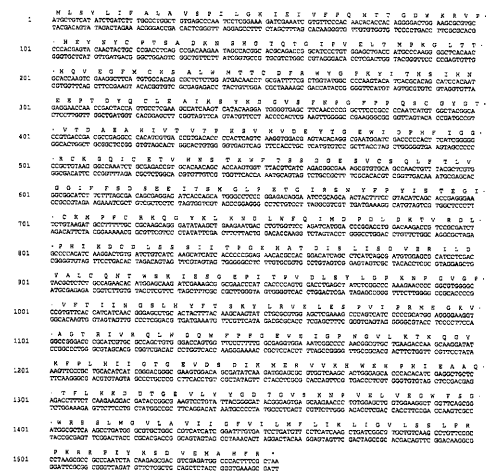
CNCM I-4056

【図７Ａ】

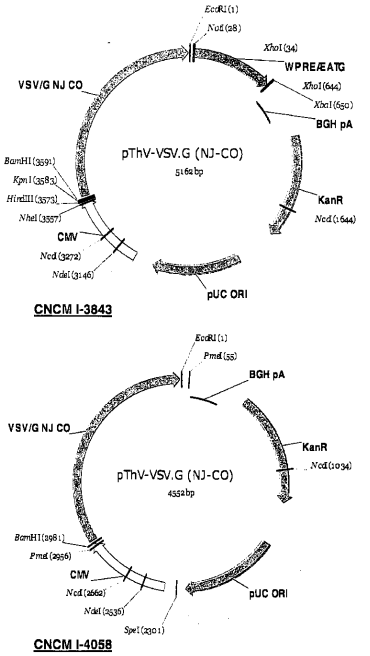
A.

MLSYLILAIVVSPILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNVCPTSADKNSHGTQTGIPIELTMPKGLTTHQ
VDGFMCHSALWMTTCDFRWYGPKYITHSIHNEEPTDYQCLEAIKAYKDGVSFNPGFPPQSCGYGTVTDA
EAHIITVTPHSVKVDEYTGEWIDPHFIGGRCKGQICETVHNSTKWFTSSDGSSVCSQLFTLVGGTFFSD
SEEITSMGLPETGIRSNYFPYISTEGICKMPFCRKPGYKLKNDLWFQITDPDLDKTVRDLPHIKDCDLS
SSIITPGEHATDISLISDVERILDYSLCQNTWSKIEAGEPITPVDLSYLGPKNPGVGPVFTIINGSLHY
FTSKYLRVELENPVIPRMEGRVAGTRIVRQLWDQWFPPGEAEIGPNGVLKTKQGYKFPLHIIGTGEVDS
DIKMERVVKHWEHPHIEAAQTFLKKDDTGEVLYYGDTGVSKNPVELVEGWFSGWRSSIMGVLAVIIGFV
ILIFLIRLIGVLSSLFRPKRRPIYKSDVEMAHFR (GenBank # AF170624)

【図７Ｂ】



【図７Ｃ】

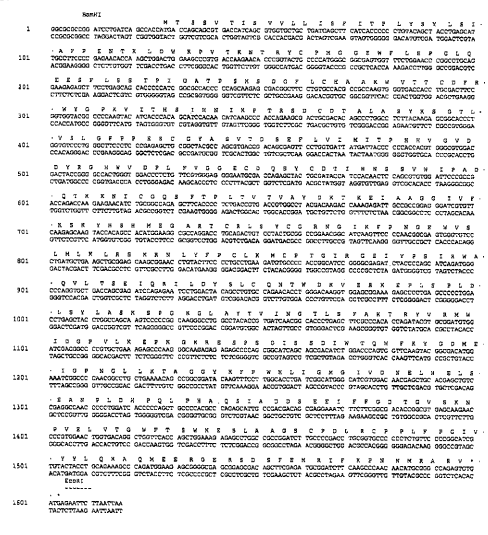


【図８Ａ】

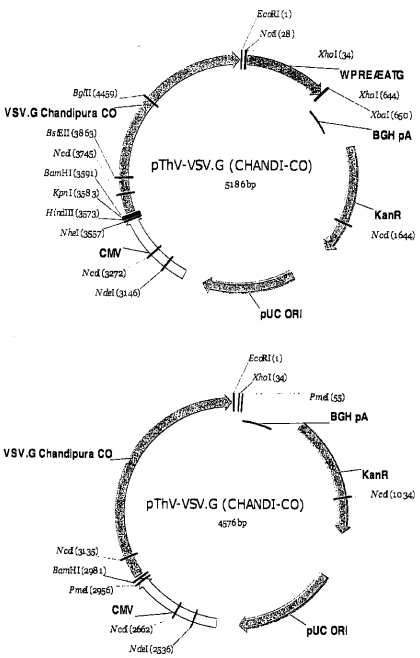
A.

MTSSVTISVVLLISFITPLYSYLSIAFPENTKLDWKPVTKNTRYCPMGGEWFLEPGLQEESFLSSTPIG
ATPSKSDGFLCHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSIHNIKPTRSDCDTALASYKSGTLVSLGFPPESCGYA
SVTDSEFLVIMITPHHVGVDDYRGHWVDPLFVGGECDQSYCDTIHNSSVNIPADQTKKNICGQSFTPLT
VTVAYDKTKEIAAGGIVFKSKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGIKFFNGEWVSLMLKLRSKRNLVFPCLKM
CPTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRILDYSLCQNTWDKVERKEPLSPLDLSYLASKSPGKGLAYTVING
TLSFAHTRYVRMWIDGPVLKEPKGKRESPSGISSDIWTQWFKYGDMEIGPNGLLKTAGGYKFPWHLIGM
GIVDNELHELSEANPLDHPQLPHAQSIADDSEEIFFGDTGVSKNPVELVTGWFTSWKESLAAGSCPDLR
CPPLFPGIVYYLQKAQMEERGERSDSFEMRIFKPNNMRARV (GenBank # J04350)

【図８Ｂ】



【図８Ｃ】



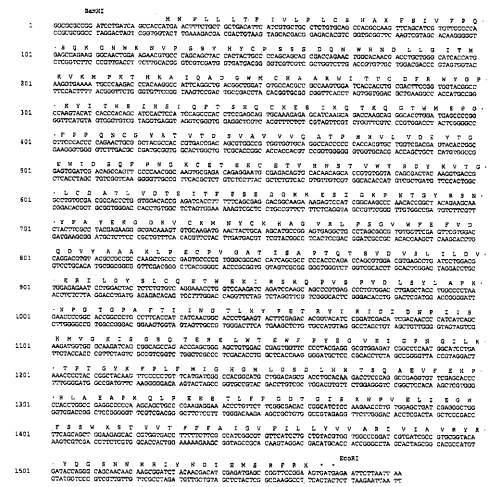
【図９Ａ】

A.

MNFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAI
QADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTD
SVAVVVQATPHHVLVDEYTGEWIDSQFPNGKCETEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFS
EDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKGDKVCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATI
SAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFET
RYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLH
KTSQAEVFEHPHLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVA
RIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK (GenBank # AF045556)

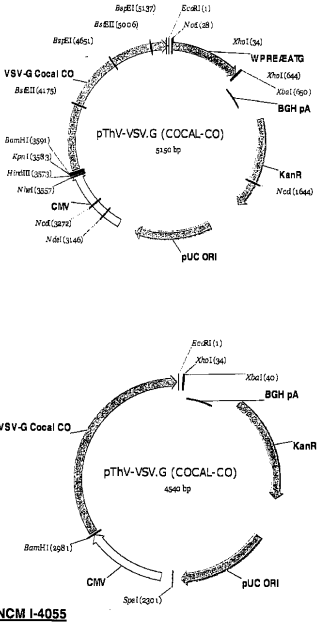
【図９Ｂ】

B.



【図９Ｃ】

C.



CNCM I-4055

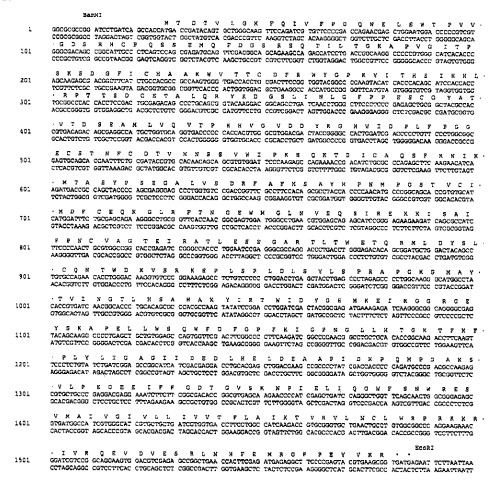
【図１０Ａ】

A.

MTDTVLGKFQIVFPDQNELEWTPVVGDSRHCPQSSEMQFDGSRSQTILTGKAPVGITPSKSDGFICHAA
KWVTTCDFRWYGPKYITHSIHHLRPTTSDCETALQRYKDGSLINLGFPPESCGYATVTDSEAMLVQVTP
HHVGVDDYRGHWIDPLFPGGECSINFCDTVHNSSVWIPKSQKTDICAQSFKNIKMTASYPSEGALVSDR
FAPHSAYHPNMPGSTVCIMDFCEQKGLRFTNGEWMGLNVEQSIREKKISAIFPNCVAGTEIRATLESEG
ARTLTWETQRMLDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPDLDLSYLSPRAPGKGMAYTVINGTLHSAHAKYIRTWID
YGEMKEIKGGRGEYSKAPELLWSQWFDFGPFKIGPNGLLHTGKTFKFFLYLIGAGIIDEDLHELDEAAP
IDHPQMPDAKSVLPEDEEIFFGDTGVSKNPIELIQGWFSNWRESVMAIVGIVLLIVVTFLAIKTVRVLN
CLWRPRKKRIVRQEVDVESRLNHFEMRGFPEYVKR (GenBank # D26175)

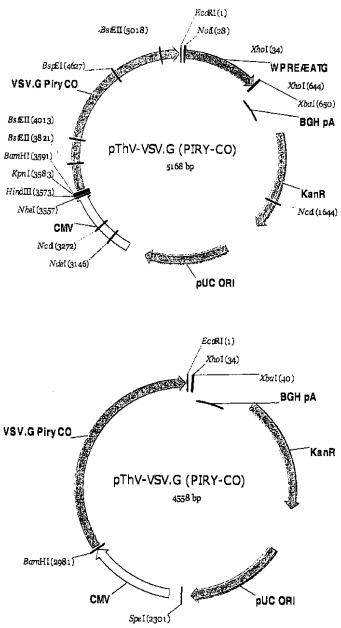
【図１０Ｂ】

B.



【図１０Ｃ】

C.



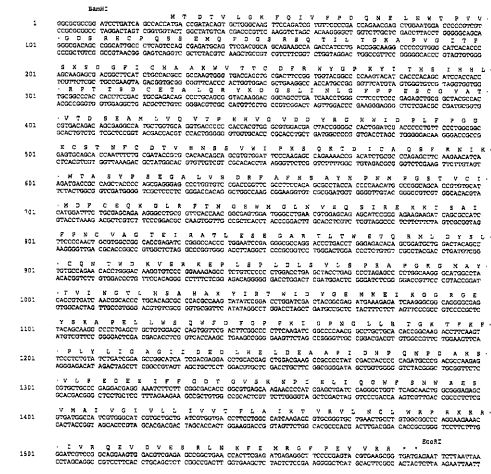
【図１１Ａ】

A.

MTSVLFMVGVLLGAFGSTHCSIQIVFPSETKLVWKPVLKGTRYCPQSAELNLEPDLKTMAFDSKVPIG
ITPSNSDGYLCHAAKWVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFPPESCGY
ASITDSEFYVMLVTPHPVGVDDYRGHWVDPLFPTSECNSNFCETVHNATMWIPKDLKTHDVCSQDFQT
IRVSVMYPQTKPTKGADLTLKSKFHAHMKGDRVCKMKFCNKNGLRLGNGEWIEVGDEVMLDNSKLLSL
FPDCLVGSVVKSTLLSEGVQTALWETDRLLDYSLCQNTWEKIDRKEPLSAVDLSYLAPRSPGKGMAYI
VANGSLMSAPARYIRVWIDSPILKEIKGKKESASGIDTVLWEQWLPFNGMELGPNGLLIKTKSGYKFPL
YLLGMGIVDQDLQELSSVNPVDHPHVPIAQAFVSEGEEVFFGDTGIlVSKNPIELISGWFSDWKETAA
ALGFAAISVILIIGLMRLLPLLCRRRKQKKVIYKDVELNSFDPRQAFHR (genBank # AJ810084)

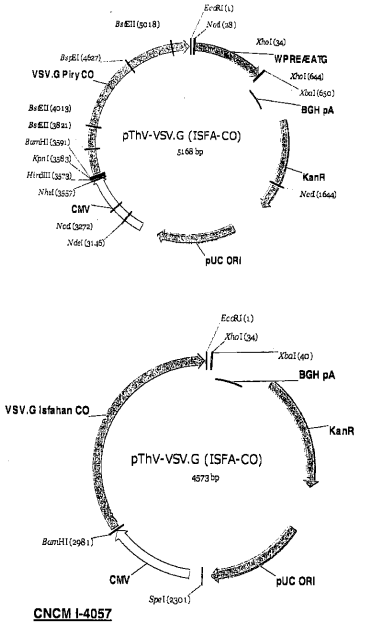
【図１１Ｂ】

B.



【図１１Ｃ】

C.



CNCM I-4057

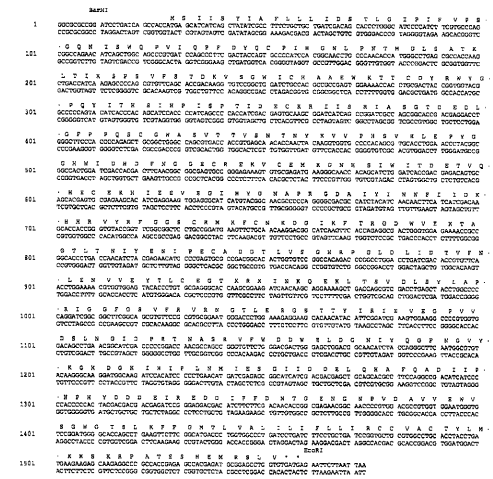
【図１２Ａ】

A.

MSIISYIAFLLLIDSTLGIPIFVPSGQNISWQPVIQPFDVQCPIHGNLPNTMGLSATKLTIKSPSVFSTDKVSGW
ICHAAEWKTTCDYRWYGPQYITHSIRPISPTIDECKRIISIASGTDEDLGFPPQSCGWASVTTVSNTNVKVVPH
SVHLEPYGGHWIDHDFNGGECREKVCEMKGNHSIWITDETVQHECEKHIEEVEGIMYGNAPRGDAIYINNFIIDK
HHRVYRFGGSCRMKFCNKDGIKFTRGDWVEKTAGTLTNIYENIPECADGTLVSGHRPGLDLIDTVFNLENVVEYT
LCEGTKRKINKQEKLTSVDLSYLAPRIGGFGSVFRVRNGTLERGSTTYIRIEVEGPVVDSLNGIDPRTNASRVFW
DDWELDGNTYQGFNGVYKGKDGKIHIPLNMIESGIIDDELQHAFQADIIPHPHYDDDERDDIFFDNTGENGNP
VDAVVEWVSGWGTSLKFFGMTLVALILFLLIRCCVACTYLMKKSKRPATESHEMRSLV (GenBank #AAZ20272)

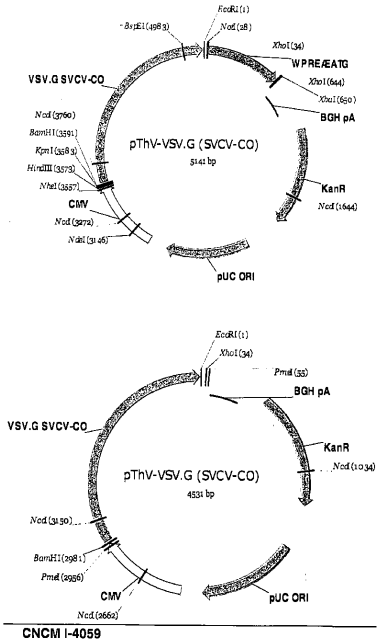
【図１２Ｂ】

B.



【図１２Ｃ】

C.



CNCM I-4059

【図１３Ａ】

1- インディアナPCRフラグメント

VSV-G$_{インディアナ}$ 配列（最適化コドン）

BamH1

5'CTCGGATCCTGATCAGCCACCATGAAATGCCTGCTCTATCTGGCCTTCCTCTTTATCGGCGTGAACTGTAAGTTCACGATC
GTGTTTCCCCACAATCAGAAGGGAAACTGGAAGAACGTCCCGAGCAACTACCACTACTGCCCTAGCTCAAGCGACCTGAACTG
GCACAACGACCTGATCGGCACCGCTATCCAGGTGAAGATGCCAAAGAGCCACAAGGCCATCCAAGCCGACGGCTGGATGTGTC
ACGCCAGCAAATGGGTGACGACGTGCGATTTTCGCTGGTGATGGCCCCAAGTACATCACCAATCAGTCGCTCATTTACACCC
AGCGTGGAGCAATGTAAGGAGAGCATCGAGCAGACCAAGCAGGGGACCTGGCTCAACCCCGGCTTCCCACCGCAAAGCTGCGG
ATACGCCACCGTGACCGACGCTGAGGCCGTCATCGTGCAGGTGACCCCGCACCACGTGCTGGTGGACGAGTACACCGGCGAGT
GGGTGGATTCACAGTTTATCAACGGAAAGTGTAGCAATTACATTGCCCCACGTGCACAACAGCACCACCTGGCACTCAGAC
TATAAGGTGAAGGCCTCTGCGACAGCAATCTGATCTCAATGGACATCACCTTCTTTAGCGAAGACGGCGAACTCTCAAGCCT
CGGGAAGCAAGGCACCGGGTTCCGCAGCAATTACTTTGCTTACGAAACCGGCGGCAAGGCCTGCAAGATGCAATACTGCAAGC
ACTGGGGCGTGCGCCTGCCAAGCGGCGTGTGGTTTGAGATGGCTGATAAGGACCTGTTCGCCGCTGCCGCGCTTCCCGGAATGC
CCCGAGGGGGAGCAGCATCAGCGCCCCAGCCAGACATCAGTGGACGTGAGCCTGATCCAGGATGTGGAACGCATCCTGGACTA
CAGCCTGTGTCAGGAAACGTGGAGCAAGATCCGCGGCCGGACTGCCTATCAGCCCGTGGATCTCAGCTACCTGGCCCCAAAGA
ACCCAGGCACCGGCAGCCTCGTTTACAATCATCAACGGCACCCTGAAGTACTTTGAAACACGCTACATCCGCGTCGACATCCCC
GCTCCCATCCTCTCACGCATGGTGGGCATGATCTCAGGGACGACCACGGAGGCGGAGCTGTGGGATGACTGGGCCCCGTATGA
AGATGTGGAGATCGGACCTAACGGCGTGCTGCGCACATCAAGCGGGTACAAGTTCCCGCTGTACATGATCGGCCACGGCATGC
TGGACAGCGACCTGCACCTCAGCTCAAAGGCCCAGGTGTTTGAGCACCCACACATCCAGGACGCTGCCAGCCAGCCCCCGAC
GACGAAAGCCTGTTCTTTGGAGATACAGGGCTCAGCAAGAACCCATCGAGCTGGTCGAGGGCTGGTTCTCAAGCCGGAAGAG
CAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGCCTCATCATCGGGCTGTTCTGGTGCTGCGCGTCGGCATCCACCTGTGCATCA
AGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGGGAAGTAAGAATTCTGCAGATATCCA
GCA-3'
EcoRI

オリゴヌクレオチドインディアナ

- 1 (5'-AGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGG-3')
- 2 (5'-GCTGGATATCTGCAGAATTCTTACTTCCCCAGGCG-3')

PCRフラグメント(160bp):

インディアナ膜貫通ドメイン

5'AGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGGCTGTTCTGGTGCTGCGCGTCGGCATCCACCTGTGC
ATCAAGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGGGAAGTAAGAATTCTGCA3'

2. ニュージャージーPCRフラグメント

VSV-G$_{ニュージャージー}$ 配列（最適化コドン）

BamH1

5'TACCGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTCCATCTGATCTTTGCCCTGGCTGTGAGCCCAATCCTCTGGAAAGAT
CGAAATCGTGTTTCCCACAACACACCACAGGGGACTGGAAGCCGCGTGCCCCACGAGTACAACTACTGCCCGACCTCAGCCGACA
AGAATAGCCACGGCACGCAGACGGCATCCCTGTGGAGCTGACCATGCCCAAGGGGCTCACAACGCACCAAGTCGAAGGCTTC
ATGTGCCACAGCGCCTCTCTGGATGACAACCTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCCAAGTACATCACGCACAGCATCCACAATGA
GGAACCAACCGACTACCAGTGCCTCGAAGCCATCAAGTCATACAAGGATGGGGTGAGCTTCAACCCGGCTTCCCGCCCCAAT
CATGTGGCTACGGCACCGTGACCGACGCCGAGGCCCACATCGTGCAGGTGACACCCCACTCAGTCAAGGTGGACGAGTACACA
GGCGAATGGATCGACCCCCACTTCATCGGGGGCCGCTGTAAGGGCCAAATCTGCGAGACCGTGCACAACAGCACCAAGTGGTT
TACGTCATCAGACGGCGAAAGCGTGTGCAGCCAACTGTTCACGCTCGTGGGCGGCATCTTCTTAGCGACAGCGAGGAGATCACCAG
CATGGGCTCCCGGAGACAGGAATCGCAGCAACTACTTTCCGTACATCAGCACCGAGGGAATCTGTAAGATGCCTTTTGGC
GCAAGCAGGGATATAAGCTGAAGAATGACCTGTGGTTCCAGATCATGGACCCGGACCTGGACAAGACCGTCCGCGATCCTGCCC
CACATCAAGGACTGTGATCTGTCATCAAGCATCACCCCCGGAGAACACGCCACGGACATCAGCCTCATCAGCGATGTGGA
GCGCATCCTCGACTACGCTCTCTGCCAGAACACATGGAGCAAGATCGAAAGCGGCGAACCCATCACCCCAGTGGACCTGAGCT
ATCTCGGCCCAAAGAACCCGGCGTGGGGCCCGTGTTCACCATCATCAACGGGAGCCTGCACTACTTTACAAGCAAGTATCTG
CGCGTGGAGCTCGAAAGCCCAGTCATCCCCCGCATGGAGGGGAAGGTGGCCGGGACCCGCATCGTGCGCCAGCTGTGGGACCA
GTGGTTCCCTTTTGGCGAGGTGGAAATCGGCCCCAACGGCGTGCTGAAGACCAAGCAAGGATATAAGTTCCCGCTGCACATCA
TCGGGACGGGCGAAGTGGACAGCGATATCAAGATGGAGCGCGTGGTCAAGCACTGGGAGCACCCACACATCGAGGCTGCTCAG
ACCTTCTCAAGAAGGACGATACCGGCGAAGTCCTGTATTACGGGGATACGGGAGTGAGCAAGAACCCTGTGGAGCTGGTGGA
AGGCTGGTTCAGCGGATGGCGCAGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGGCTGTTCTGGTGCTTGCGCATCCACCTGTG
CATCAAGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGGGAAGTAAGAATTCTGCAGATA
TCCA
EcoRI
オリゴ 2

【図１３Ｂ】

オリゴヌクレオチドニュージャージー：

- 3 (5'-CGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTC-3')
- 4 (5'-GAAAAAAATGAAGCGATGCTGCTGCGCGCATCCGCTGAACCAGCCTTCCAC-3').

オリゴ4の太字及び下線を引いた部分は、２８の最初のインディアナ膜貫通ドメインヌクレオチドに対応する。

PCR ニュージャージー (1446bp):

BamH1

5'CGAGCTCGGATCCTGATCAGCCACCATGCTGTCACATCTGATCTTTGCCCTGGCTGTGAGCCCAATCCTCGGAAAGATCGA
AATCGTGTTTCCCACAACACACCACAGGGGACTGGAAGCGCGTGCCCCACGAGTACAACTACTGCCCGACCTCAGCCGACAAGA
ATAGCCACGGCACGCAGACGGCATCCCTGTGGAGCTGACCATGCCCAAGGGGCTCACAACGCACCAAGTCGAAGGCTTCATG
TGCCACAGCGCTCTCTGGATGACAACCTGCGATTTTCGCTGGTATGGCCCCAAGTACATCACGCACAGCATCCACAATGAGGAA
ACCAACCGACTACCAGTGCCTCGAAGCCATCAAGTCATACAAGGATGGGGTGAGCTTCAACCCGGCTTCCCGCCCCAATCAT
GTGGCTACGGCACCGTGACCGACGCCGAGGCCCACATCGTGCAGGTGACACCCCACTCAGTCAAGGTGGACGAGTACACAGGC
GAATGGATCGACCCCCACTTCATCGGGGGCCGCTGTAAGGGCCAAATCTGCGAGACCGTGCACAACAGCACCAAGTGGTTTAC
GTCATCAGACGGCGAAAGCGTGTGCAGCCAACTGTTCACGCTCGTGGGCGGCATCTTCTTAGCGACAGCGAGGAGATCACCAG
CATGGGCTCCCGGAGACAGGAATCGCAGCAACTACTTTCCGTACATCAGCACCGAGGGAATCTGTAAGATGCCTTTTGGCGC
GCAAGCAGGGATATAAGCTGAAGAATGACCTGTGGTTCCAGATCATGGACCCGGACCTGGACAAGACCGTCCGCGATCCTGCCC
CACATCAAGGACTGTGATCTGTCATCAAGCATCACCCCCGGAGAACACGCCACGGACATCAGCCTCATCAGCGATGTGGA
GCGCATCCTCGACTACGCTCTCTGCCAGAACACATGGAGCAAGATCGAAAGCGGCGAACCCATCACCCCAGTGGACCTGAGCT
ATCTCGGCCCAAAGAACCCGGCGTGGGGCCCGTGTTCACCATCATCAACGGGAGCCTGCACTACTTTACAAGCAAGTATCTG
CGCGTGGAGCTCGAAAGCCCAGTCATCCCCCGCATGGAGGGGAAGGTGGCCGGGACCCGCATCGTGCGCCAGCTGTGGGACCA
GTGGTTCCCTTTTGGCGAGGTGGAAATCGGCCCCAACGGCGTGCTGAAGACCAAGCAAGGATATAAGTTCCCGCTGCACATCA
TCGGGACGGGCGAAGTGGACAGCGATATCAAGATGGAGCGCGTGGTCAAGCACTGGGAGCACCCACACATCGAGGCTGCTCAG
ACCTTCTCAAGAAGGACGATACCGGCGAAGTCCTGTATTACGGGGATACGGGAGTGAGCAAGAACCCTGTGGAGCTGGTGGA
AGGCTGGTTCAGCGGATGGCGCAGCAGCATCGCTTCATTTTTTTTCATCATCGGGCTGTTCTGGTGCTTJ
CGCGTGCGGCATCCACCTGTGCATCAAGCTGAAGCACACCAAGAAGCGCCAGATCTATACCGACATCGAGATGAATCGCCTGGG
GAAGTAAGAATGTGTGCA-3'
EcoRI
オリゴ 2

【図１４Ａ】

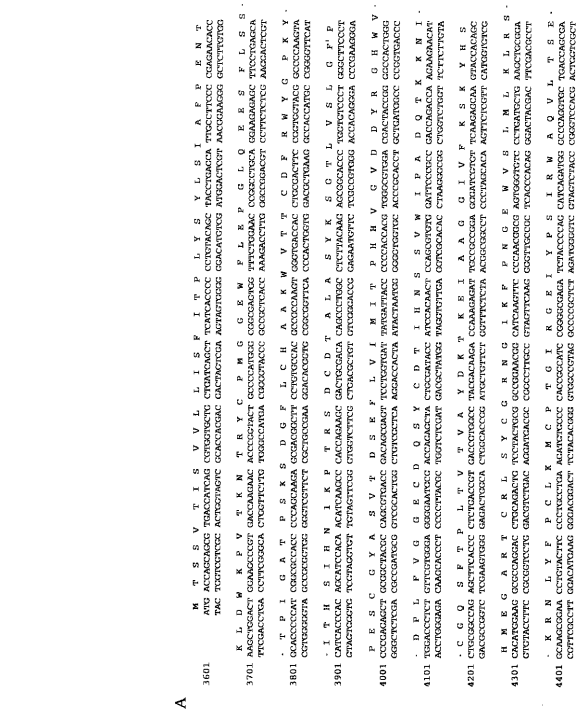


Fig. 14A

【図１４Ｂ】

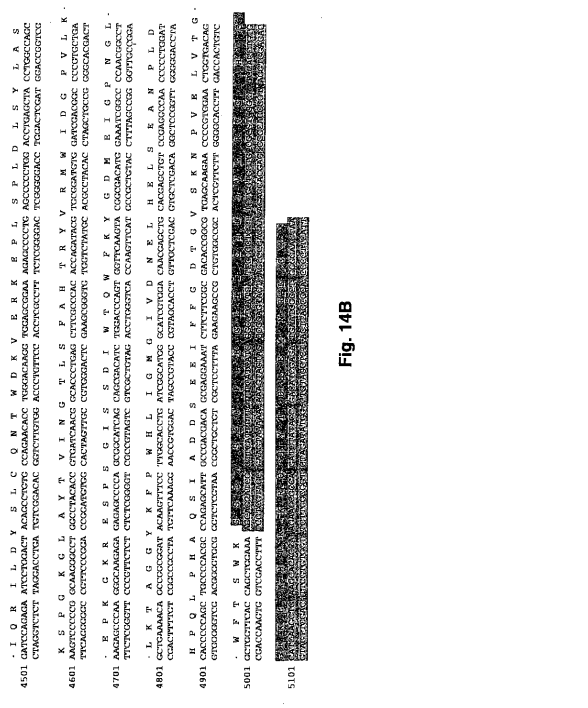


Fig. 14B

【図１４Ｃ】

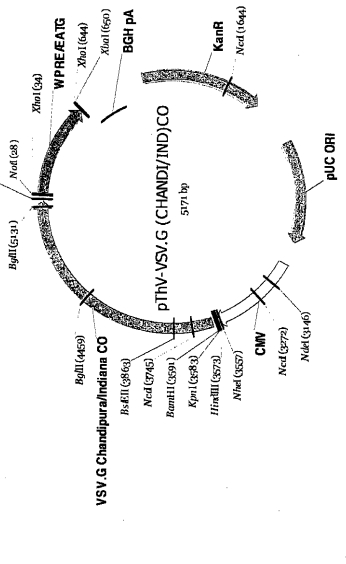


Fig. 14C

【図１５Ａ】

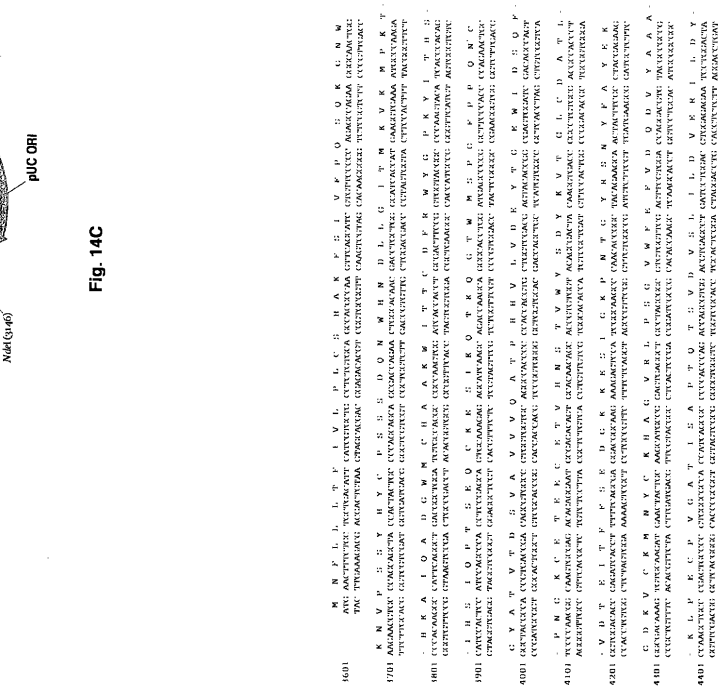


Fig. 15A

【図１５Ｂ】

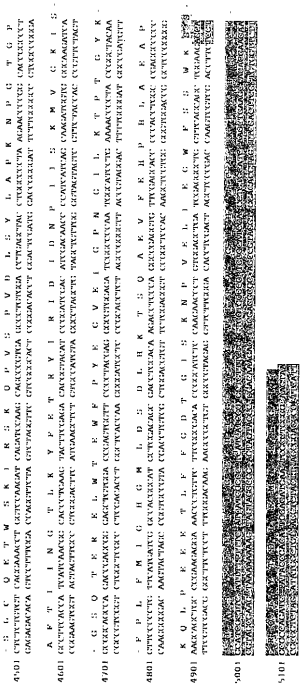


Fig. 15B

【図１５Ｃ】

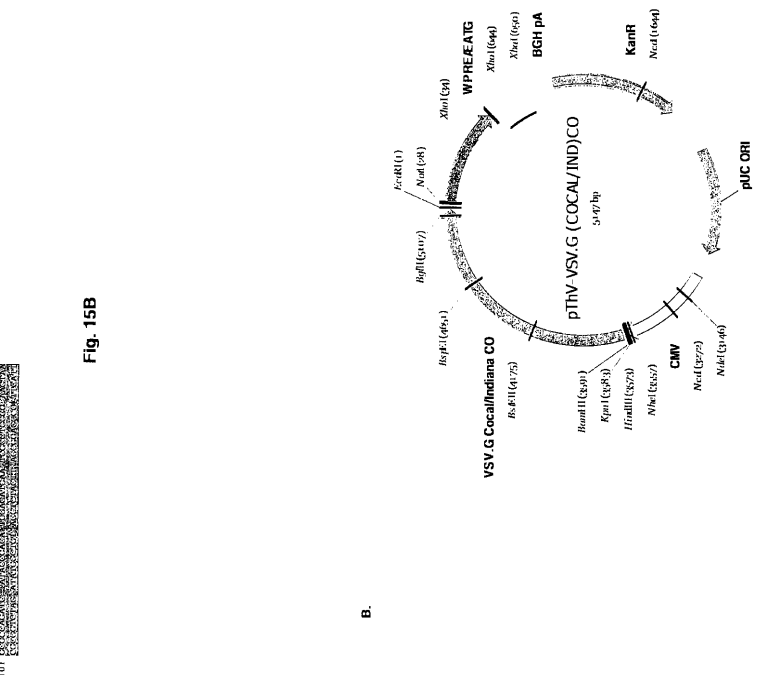


Fig. 15C

【図１６Ａ】

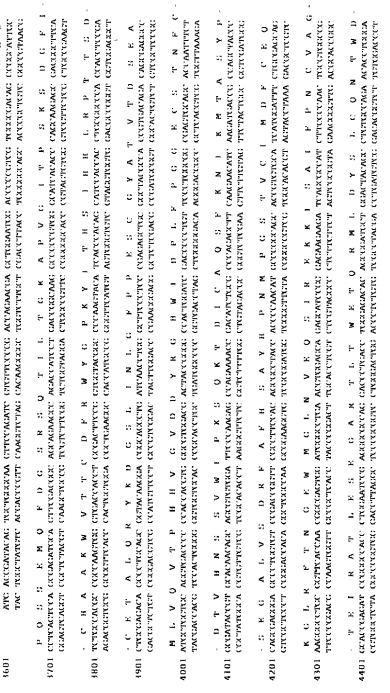


Fig. 16A

【図１６Ｂ】

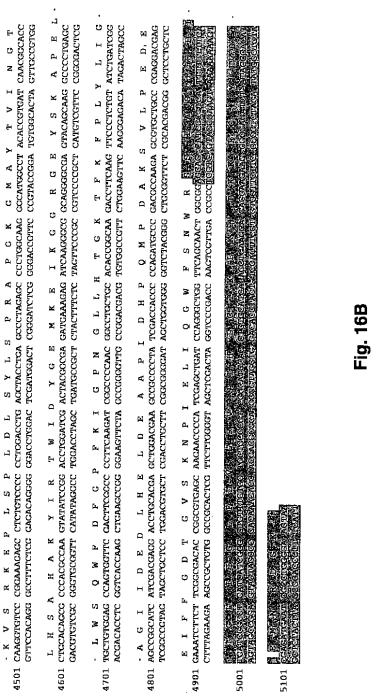


Fig. 16B

【図１６Ｃ】

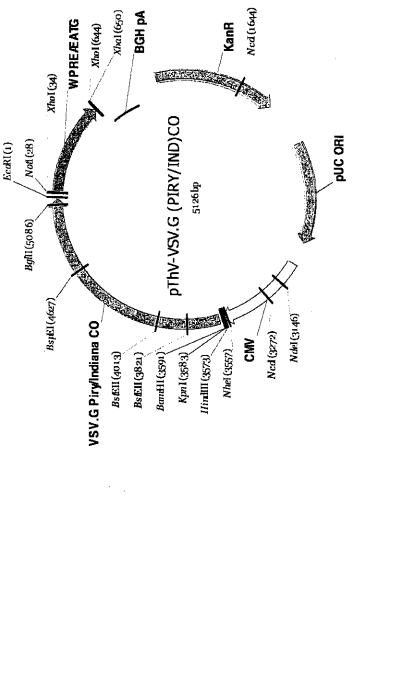


Fig. 16C

【図１７Ａ】

Fig. 17A

【図１７Ｂ】

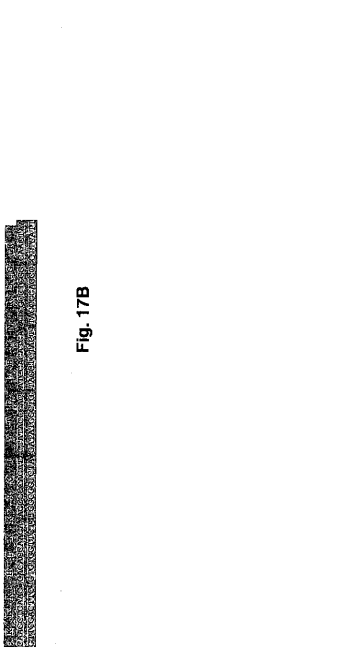


Fig. 17B

【図１７Ｃ】

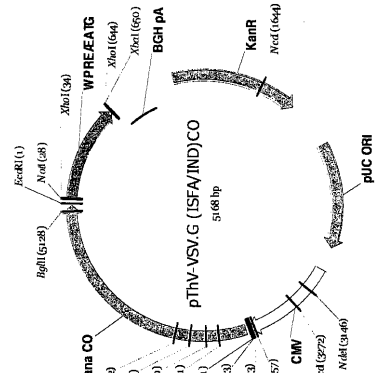


Fig. 17C

【図１８Ａ】

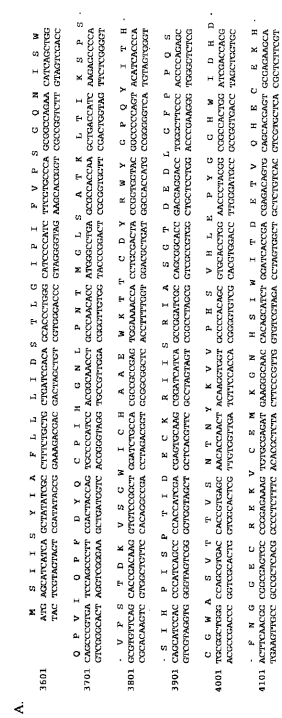


Fig. 18A

【図１８Ｂ】

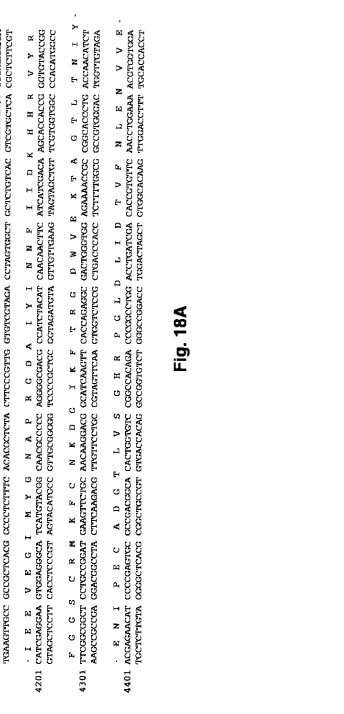


Fig. 18B

【図１８Ｃ】

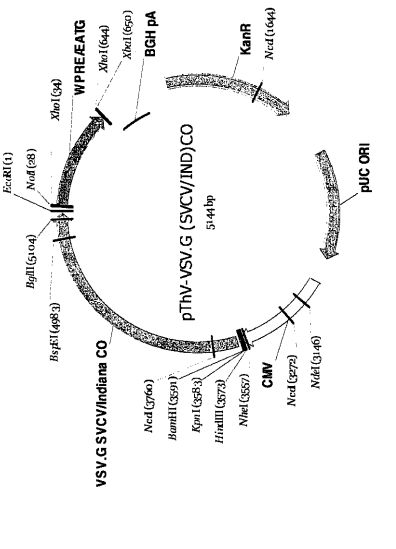


Fig. 18C

【図１９Ａ】

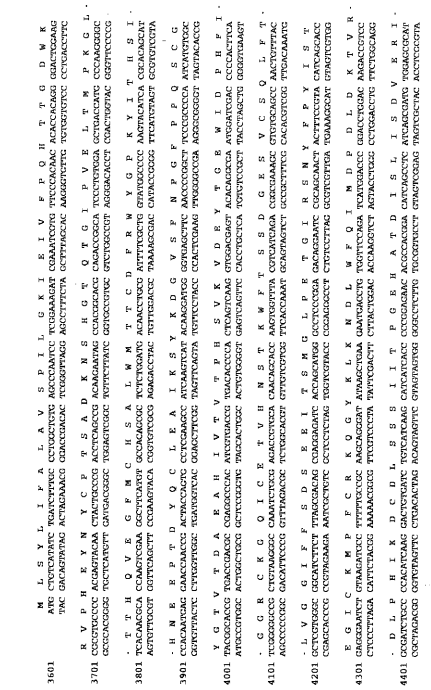


Fig. 19A

【図１９Ｂ】

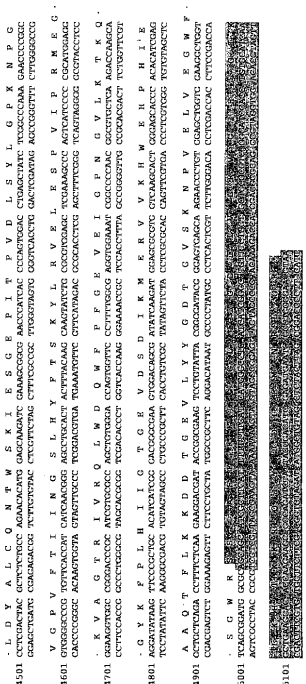


Fig. 19B

【図１９Ｃ】

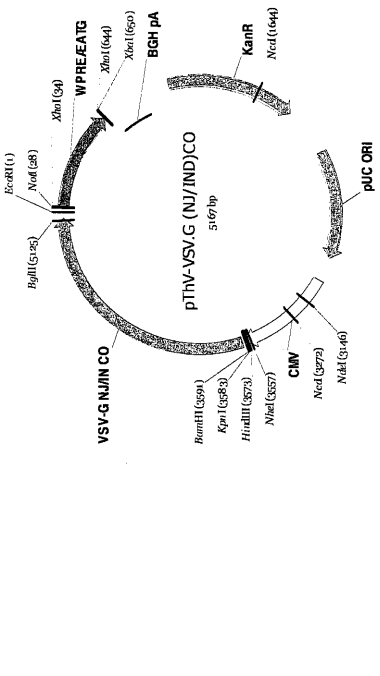
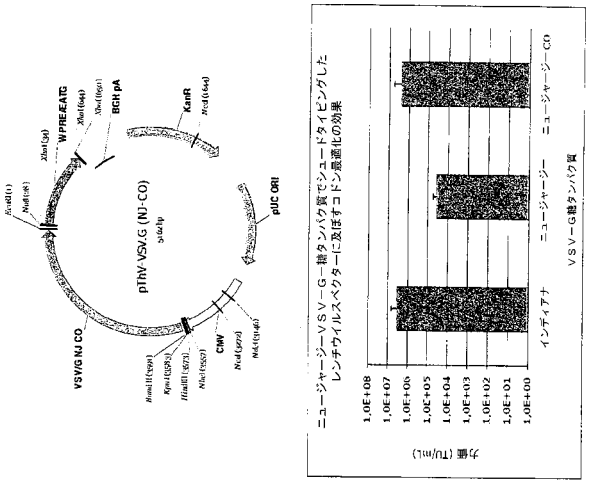


Fig. 19C

【図２０】



【図２１Ａ】

A.

MASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSL
YNTVATLYCVHQRIEVKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAAADTNHSSQVSQNYPIVQNLQGQMVHQAISPRTLN
AWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPGQM
REPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKT
LRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIMM
QRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHIAKNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRP
EPTAPPEESFRFGEETTTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGND

【図２１Ｂ】

B.

KKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPD
IVIYQYMDDLYVGSDLEIGQHRTEILKEPVHGVY

【図２１Ｃ】

C.

VGFPVRPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFG
WCFKLVPVDPEKEVLVWKFDSRLAFHHMARELHPEYYapvkqtlnfdllklagdvesnpgp

【図２１Ｄ】

D.

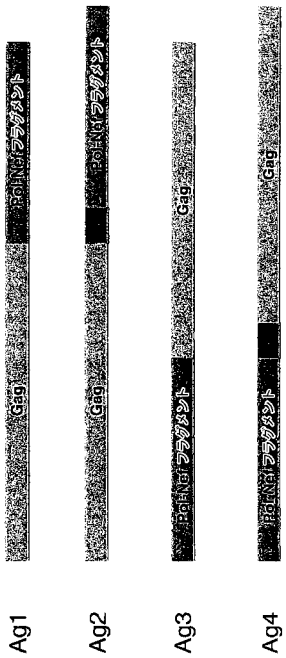
MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEEL
RSLYNTVATLYCVHQRIEKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAAADTGHSSQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAISPR
TLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAP
GQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRF
YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSAT
IMMQRGNFRNQRKIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQ
SRPEPTAPPFLQSRPEPTAPPEESFRSGVETTTPSQRQEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ

【図２１Ｅ】

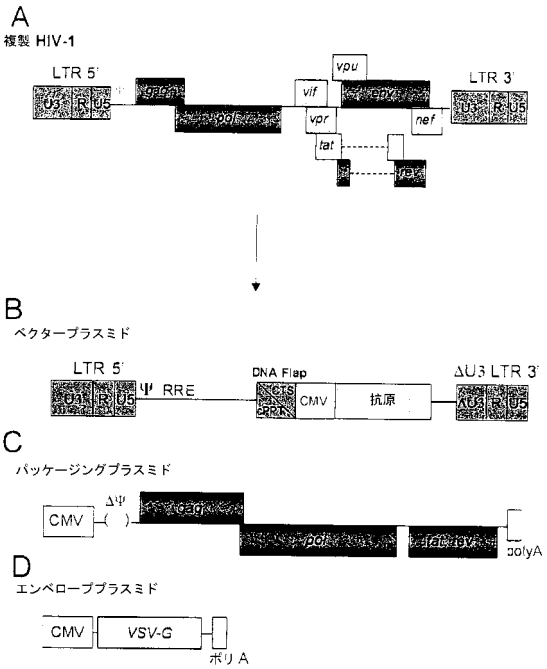
E.

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
AAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTG
TTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTT
AGATCATTATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCT
TTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC
AGCCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGA
ACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTCAGCATTA
TCAGAAGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATG
TTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCA
GGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATG
ACAAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGA
ATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAAGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTC
TATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTTGGTCCAAAAT
GCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTAAAAGCATTGGGACCAGCAGCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGT
CAGGGAGTGGGAGGACCCGGCCATAAGGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACC
ATAATGATGCAAAGAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGATTGTTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCAC
ATAGCCAGAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGAT
TGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAG
AGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTC
AGGTCTGGGGTAGAGACAACAACTCCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCC
CTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA

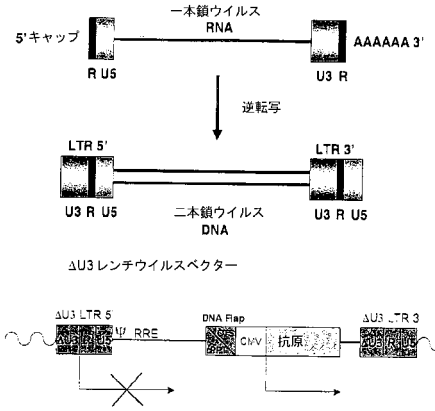
【図２２】



【図２３】



【図２４】



【図２５】

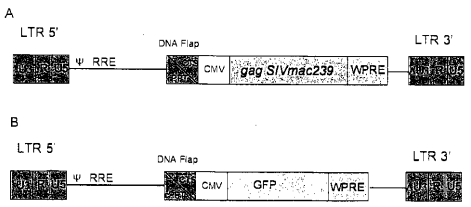
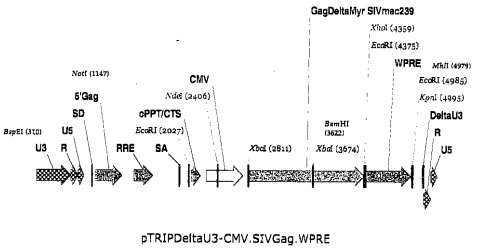


Fig. 25

【図２５】

C1.



pTRIPDeltaU3-CMV.SIVGag.WPRE

5322 bp

C2.

```
tggaagggctaatttcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggc
tacttccctgattagcagaactacacaccagggccagggatcagatatccactgaccttttggatggtg
ctacaagctagtaccagttgagccagagaagttagaagaagccaacaaaggagagaacaccagcttgt
tacaaacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagttgttagagtggaggtttgacagc
cgcctagcatttcatcacggtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgag
cttgctacaagggactttccgctgggggactttccagggaggcgtggcctgggcgggactggggagtg
gcgagccctcagatcctgcatataagcagctgctttttgcctgtactgggtctctctggttagaccag
atctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcctg
agtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttt
tagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagagg
agctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtg
agtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaa
gcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatataaat
taaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaaca
tcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatccccttcagacaggatcagaagaacttag
atcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaagg
aagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgat
cttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaa
aaattgaacattagggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagagagaaaaagagca
gtgggaatagggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaat
gacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgaggg
ctattgaggcgcaacagcatctgttgcaacctcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatc
ctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggttgctctggaaaactcat
ttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaatcaca
cgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaa
tcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaa
ttggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtag
gtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcg
```

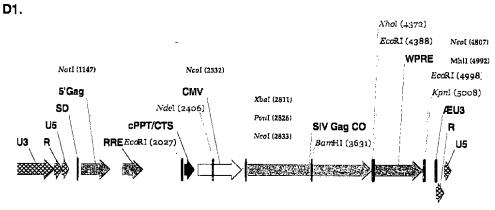
Fig. 25

```
tttcagacccaccctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggaga
gagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattcacaaatggc
agtattcatccacaatttaaaagaaaagggggattgggggtacagtgcagggaaagaatagtag
acataataqcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgg
gtttattacagggacagcagagatccactttggggccgataagcttgggagttccgcgttacataactt
acggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgt
tcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccc
acttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatgg
cccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatt
agtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgact
cacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgg
gactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggga
ggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatccgctggagacgccatccacgctgttttg
acctccatagaagacaccgactctagaggatctgccaccatggtgagaaactccgtcttgtcagggaa
gaaagcagatgaattagaaaaaattaggctacgaccccaacggaaagaaaagtacatgttgaagcatg
tagtatgggcagcaaatgaattagatagatttggattagcagaaagcctgttgggaacaaagcaaggaa
tgtcaaaaaatactttcggtcttagctccattagtgccaacaggctcagaaaattttaaaaagccttta
taatactgtctgcgtcatctggtgcatttcacgcagaagagaaagtgaaacacactgaggaagcaaaac
agatagtgcagagacacctagtggtggaaacaggaacaacagaaactatgccaaaaacaagtagacca
acagcaccatctagcggcagaggaggaaattaccagtacaacaaatagggtggttaactatgtccacct
gccattaagcccgagaacattaaatgcctgggtaaaattgatagaggaaaagaaatttggagcagaag
tagtgccaggatttcaggcactgtcagaaggttgcaccccctatgacattaatcagatgttaaatttgt
gtgggagaccatcaagcggctatgcagattatcagagatattataaacgaggaggctgcagattgggga
cttgcagcacccacaaccagctccacaacaaggacaacttagggagccgtcaggatcagatattgcag
gaacaactagttcagtagatgaacaaatccagtggatgtacagacaacagaacccctaccagtaggc
aacatttacaggagatggatccaactgggttgcaaaaatgtgtcagaatgtataacccaacaaacat
tctagatgtaaaacaagggccaaaagagccatttcagagctatgtagacaggtttctacaaaagtttaa
gagcagaacagacagatgcagcagtaaagaattggatgactcaaacactgctgattcaaaatgctaac
ccagattgcaagctagtgctgaagggggctgggtgtgaatcccaccctagaagaaatgctgacggcttg
tcaaggagtagggggggccgggacagaaggctagattaatggcagaagccctgaaagaggcccctcgcac
cagtgccaatccccttttgcagcagcccaacagaggggaccaagaaagccaattaagtgttggaattgt
gggaaagagggacactctgcaaggcaatgcagagccccaagaagacagggatgctggaaatgtggaaa
aatggaccatgttatggccaaatgcccagacagacaggcgggttttttaggccttggtccatgggaa
agaagcccggcaatttcccatggctcaagtgcatcaggggctgatgccaactgctcccccagaggac
ccagctgtggatctgctaaagaactacatgcagttgggcaagcagcagagagaaaagcagagagaaag
cagagagaagccttacaaggaggtgacagaggatttgctgcaccctcaatttctttcttggaggagacc
agtagctcgagctcaagcttcgaattcccgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattg
actggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgccttgtatca
tgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatg
aggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccact
ggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccac
ggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaatt
ccgtggtgttgtcgggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgccacctggattctg
cgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgct
gccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccg
cctccccgcgtcgacgcgtgaattcggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatctt
agccacttttaaaagaaaagggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatcgtgg
agagatgctgcatatgaagcagctgcttttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagc
ctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttc
aagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtg
tggaaaatctctagcagt
```

Fig. 25

【図２５】

D1.



pTRIPDeltaU3-CMV-SIVGag CO-WPRE

5335 bp

D2.

```
tggaagggctaatttcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggc
tacttccctgattagcagaactacacaccagggccagggatcagatatccactgaccttttggatggtg
ctacaagctagtaccagttgagccagagaagttagaagaagccaacaaaggagagaacaccagcttgt
tacaacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagttgttagagtggaggtttgacagc
cgcctagcatttcatcacggtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgag
cttgctacaagggactttccgctgggggactttccagggaggcgtggcctgggcgggactggggagtg
gcgagccctcagatcctgcatataagcagctgctttttgcctgtactgggtctctctggttagaccag
atctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttg
agtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttt
tagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagagg
agctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtg
agtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaa
gcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatataaat
taaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaaca
tcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatccccttcagacaggatcagaagaacttag
atcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaagg
aagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgat
cttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaa
aaattgaaccattagggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagagagaaaaagagca
gtgggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaat
gacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgaggg
ctattgaggcgcaacagcatctgttgcaacctcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatc
ctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggttgctctggaaaactcat
ttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaatcaca
cgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaa
tcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaa
ttggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtag
gtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcg
```

Fig. 25

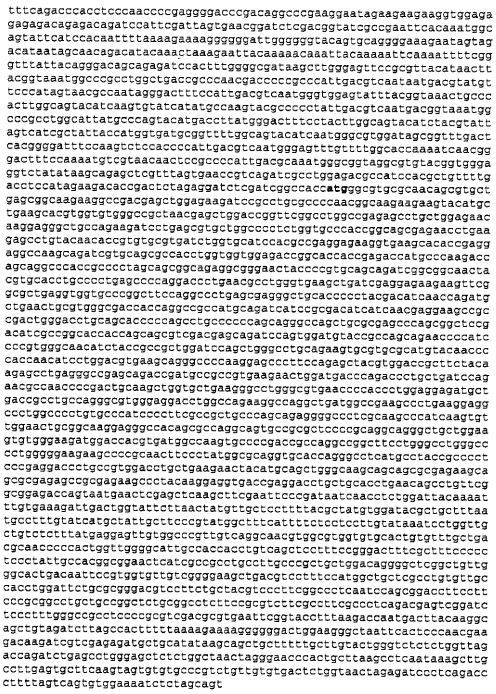


Fig. 25

【図２６】

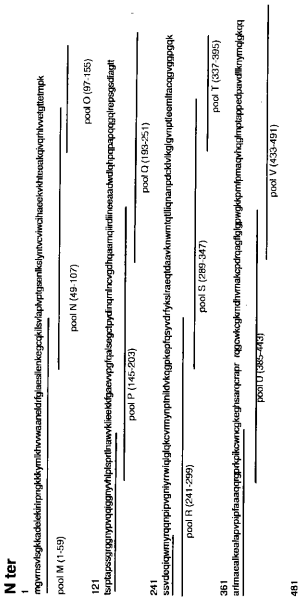


Fig. 26

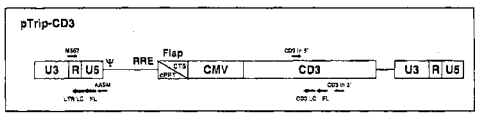
【図２７】

A.

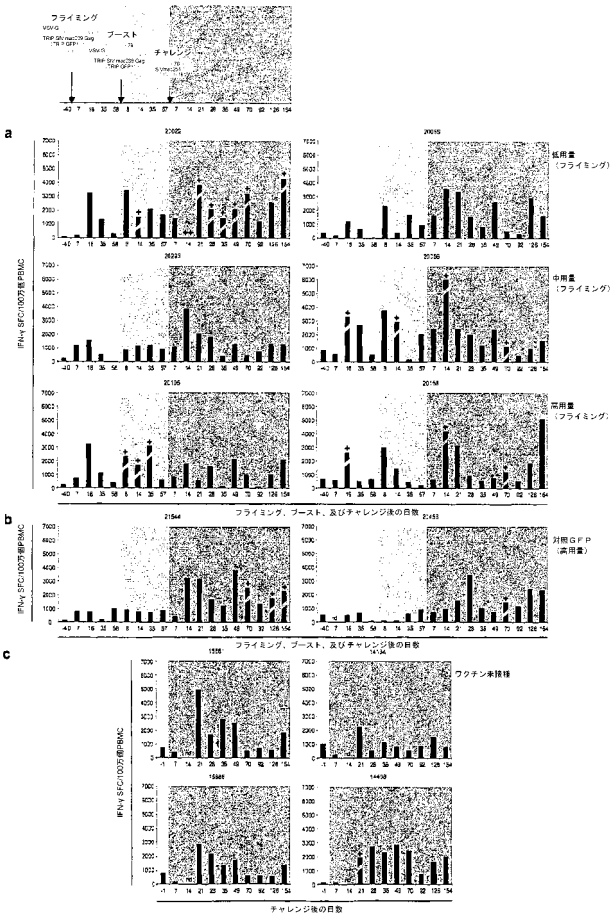
PCR	オリゴ	配列 5' → 3'
U5R フォワードプライマー	M667	GGCTAACTAGGGAACCCACTG
U5R リバースプライマー	AASM	GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA
U5R 3'エンドドナープローブ	LTR FL	CACAACAGACGGGCACACACTACTTGA-FL
U5R 5'エンドドナープローブ	LTR LC	LC-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC
CD3 フォワードプライマー	CD3 in 5'	GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA
CD3 リバースプライマー	CD3 in 3'	CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA
CD3 3'エンドドナープローブ	CD3 FL	GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-FL
CD3 5'エンドドナープローブ	CD3 LC	LC-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCCTTC

	サイクルの工程及び数	温度	持続時間
1サイクル	1; 変性	95°C	3 分
40サイクル	2; 変性	95°C	5 秒
	3; アニーリング	57°C	10 秒
	4; 伸長	72°C	8 秒

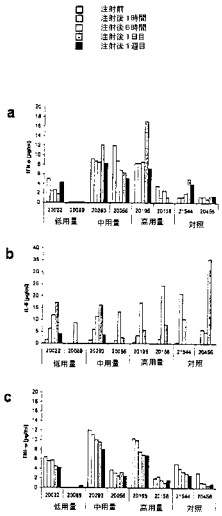
B.



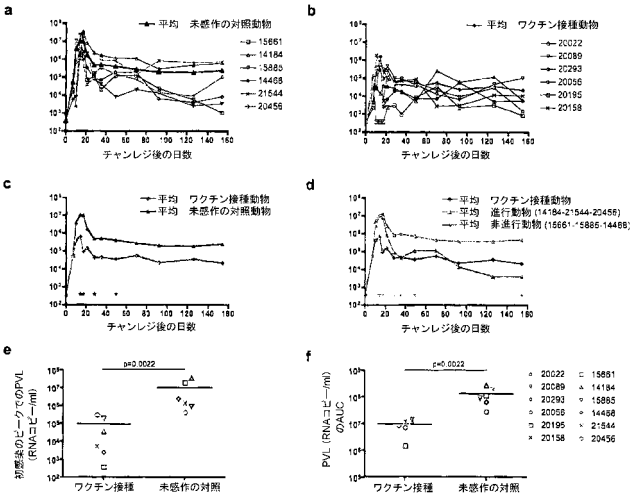
【図２８（１）】



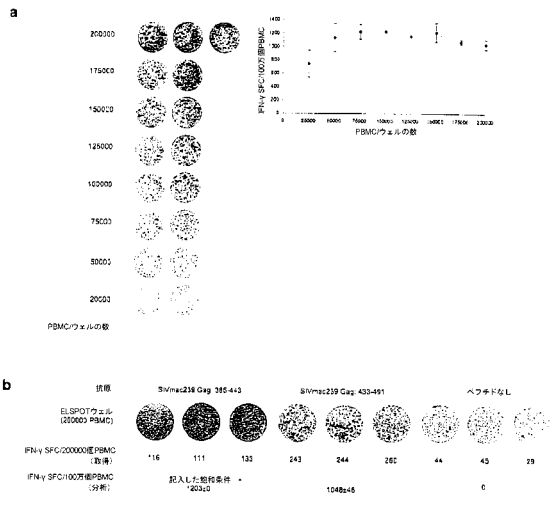
【図２８（２）】



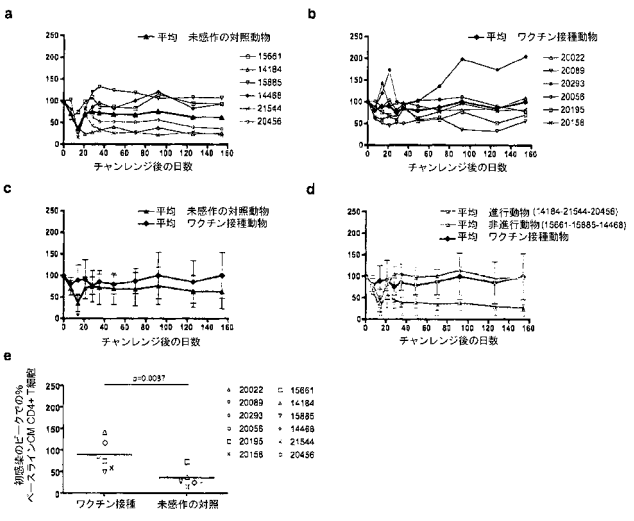
【図２９（１）】



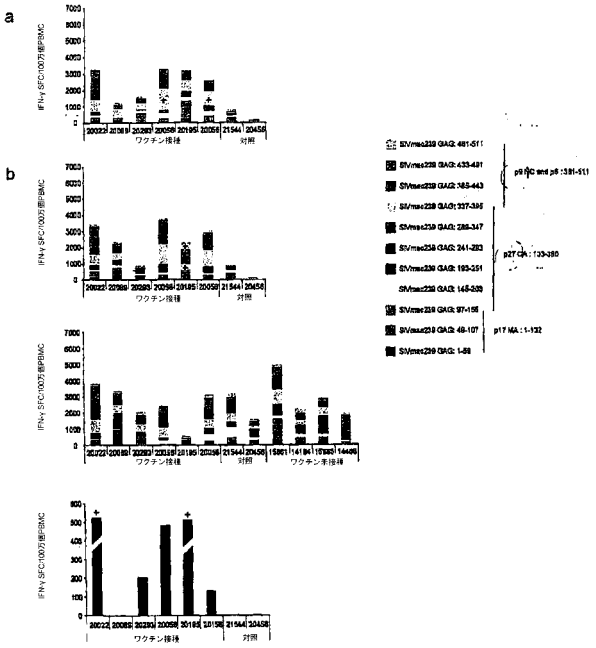
【図２９（２）】



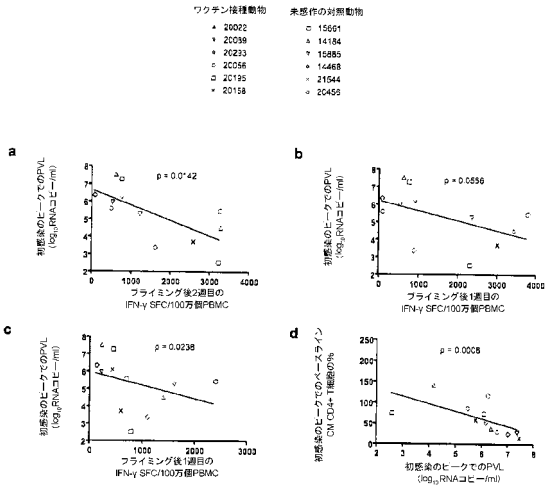
【図３０（１）】



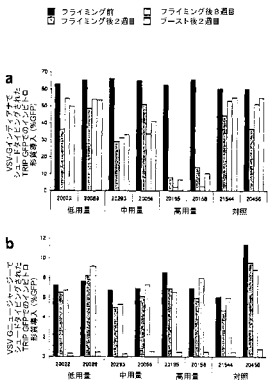
【図３０（２）】



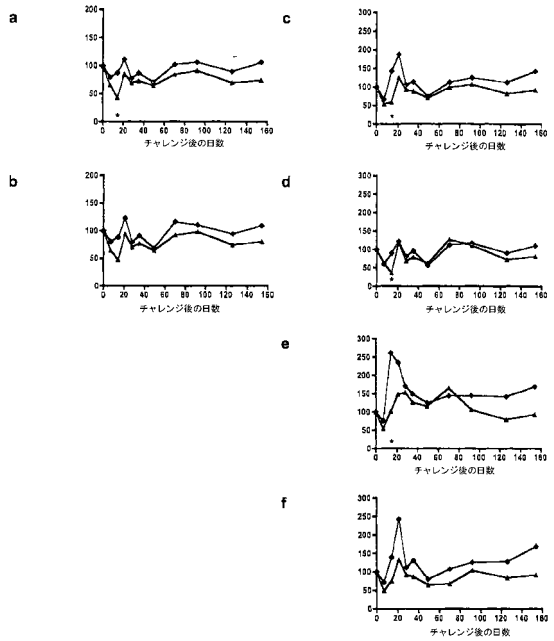
【図３１（１）】



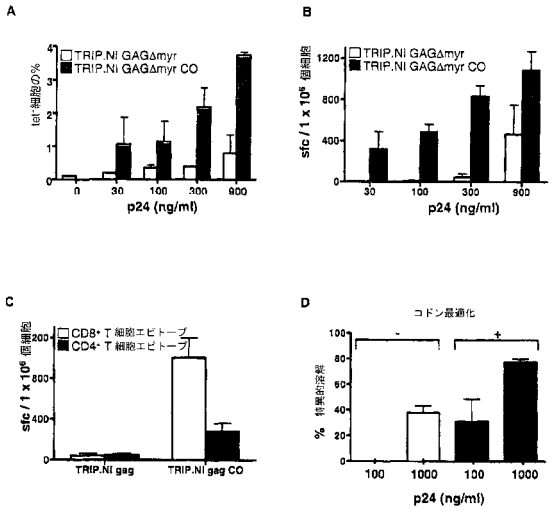
【図３１（２）】



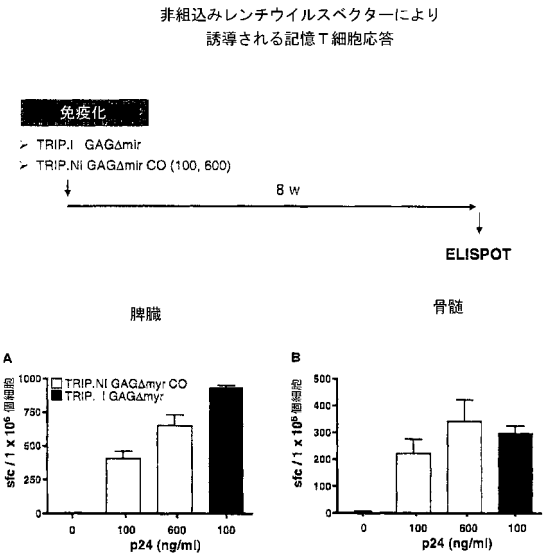
【図３２】



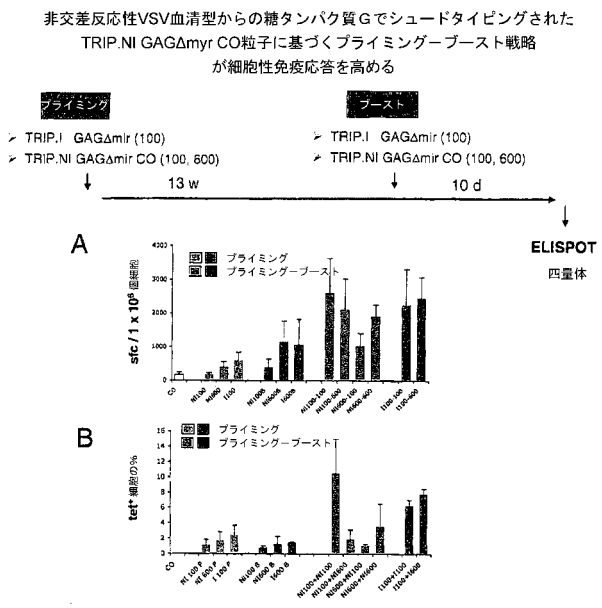
【図３３】



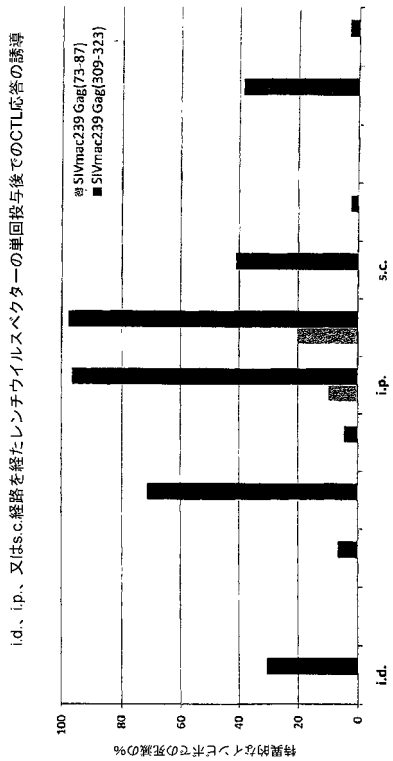
【図３４】



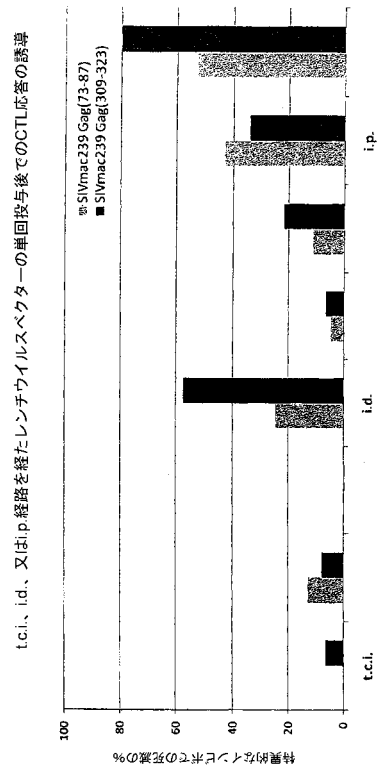
【図３５】



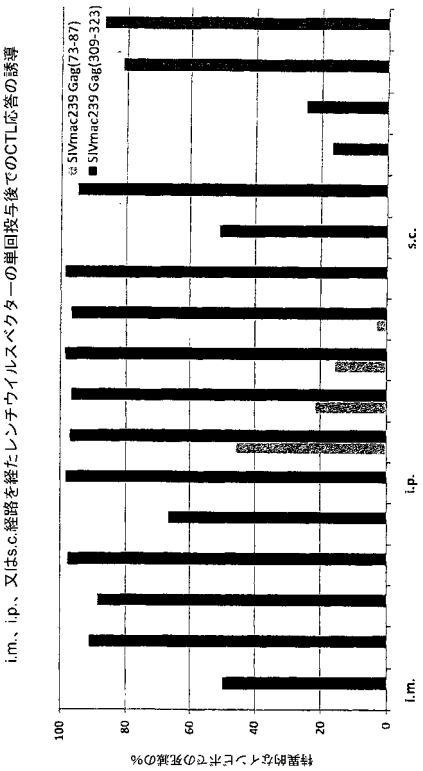
【図３６】



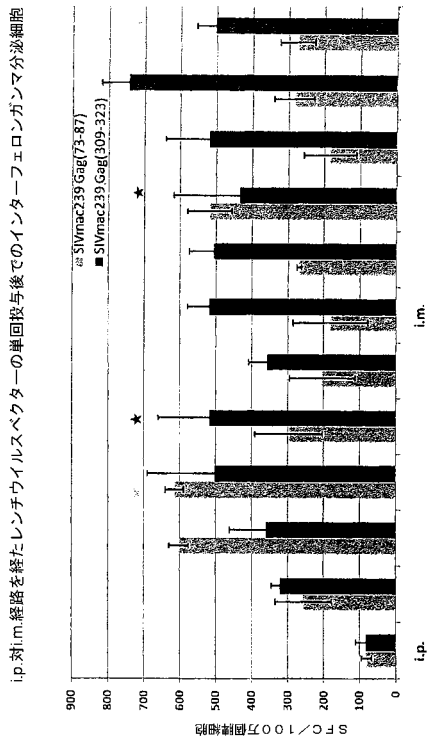
【図３７】



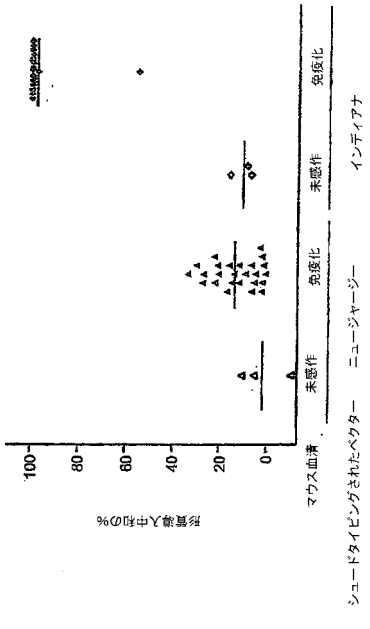
【図３８】



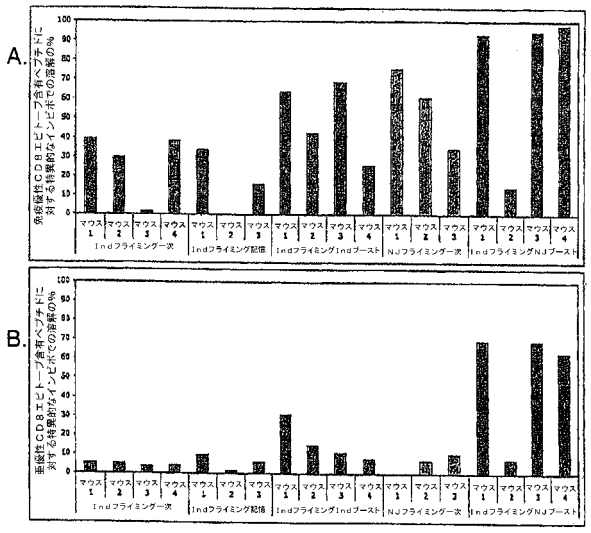
【図３９】



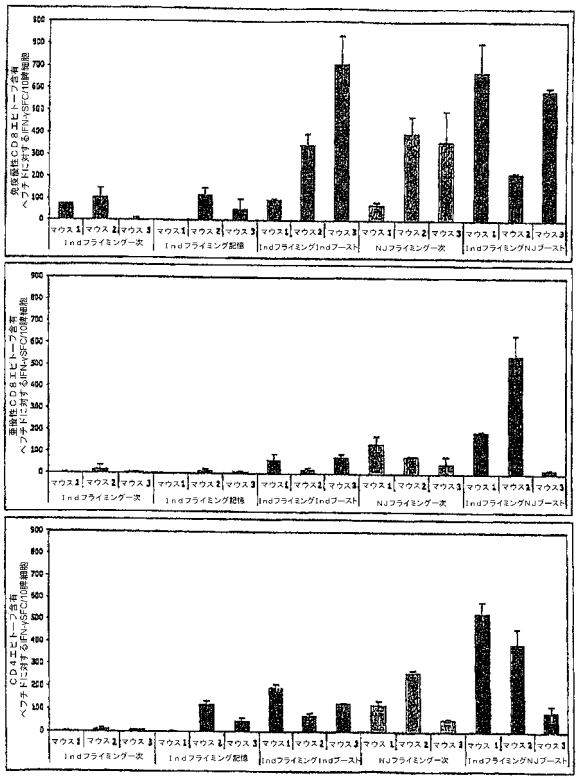
【図４０】



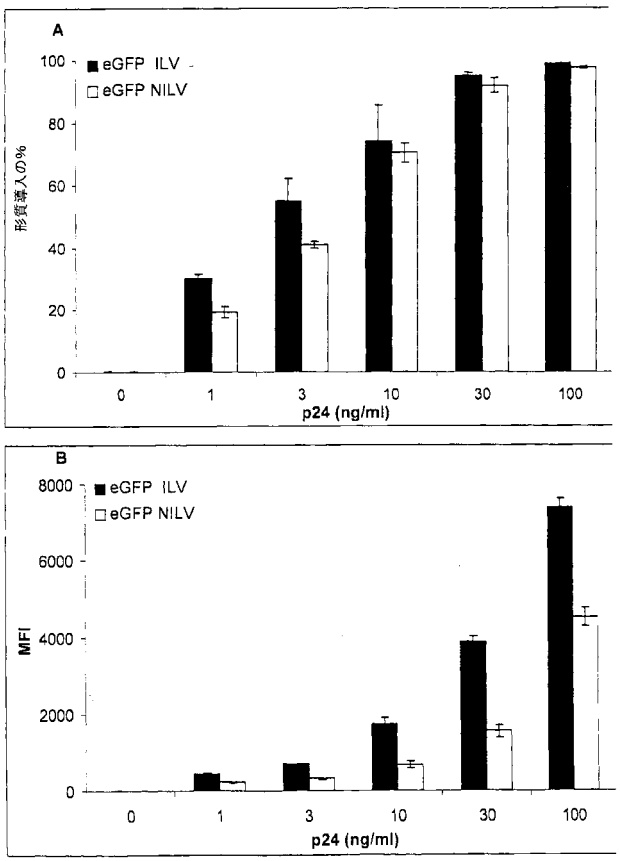
【図４１】



【図４２】



【図４３】



【図４４Ａ】

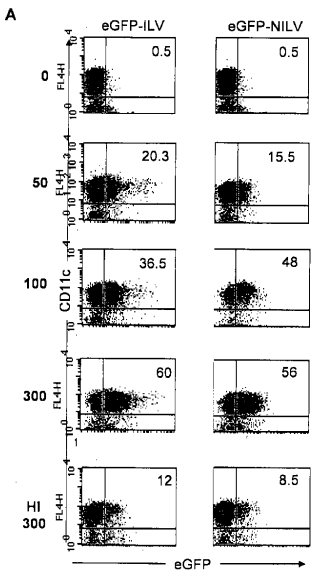


Fig. 44A

【図４４Ｂ】

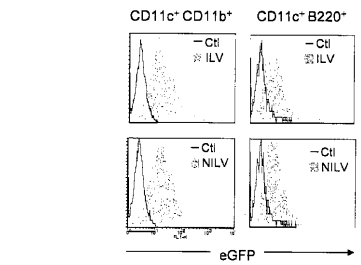
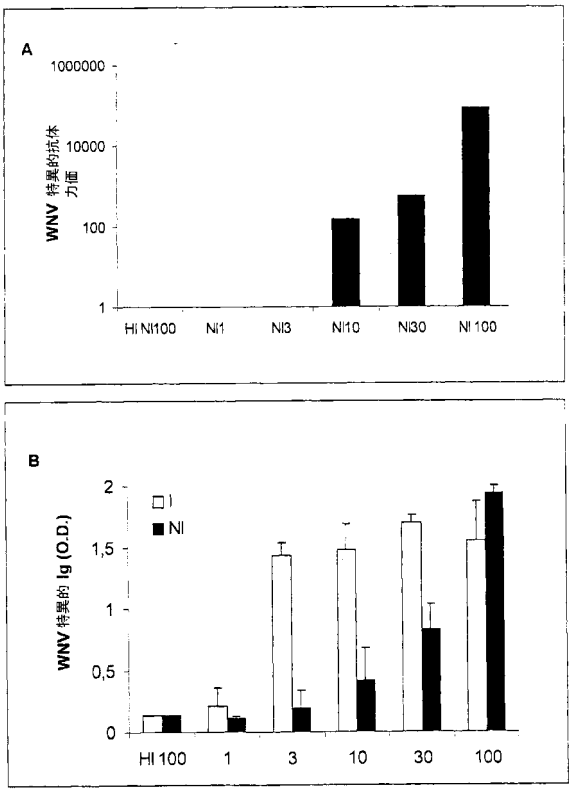
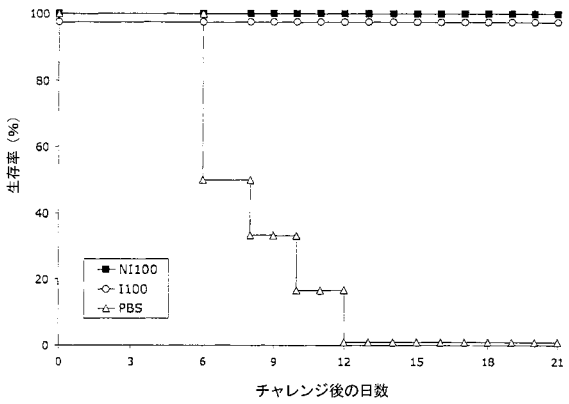


Fig. 44B

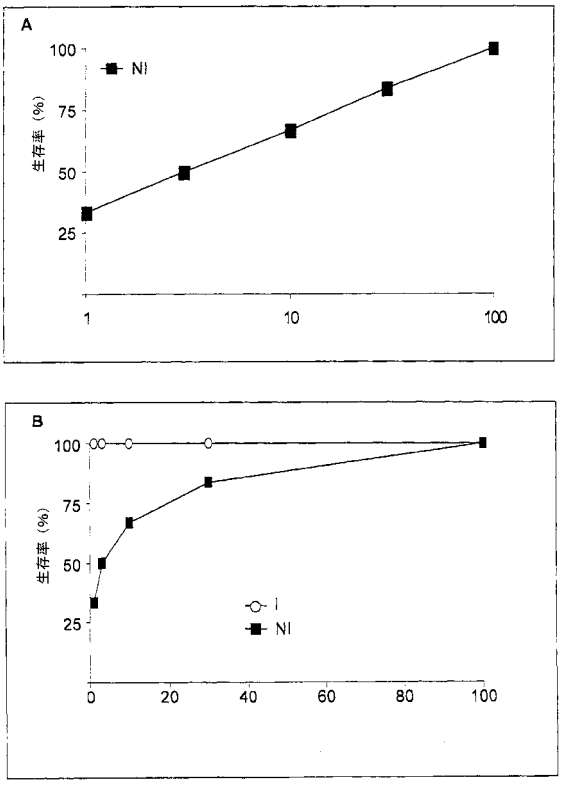
【図４５】



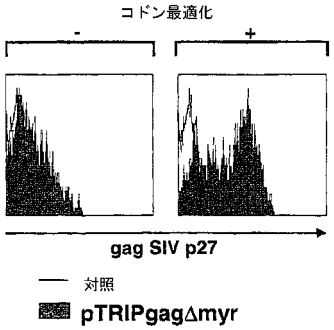
【図４６】



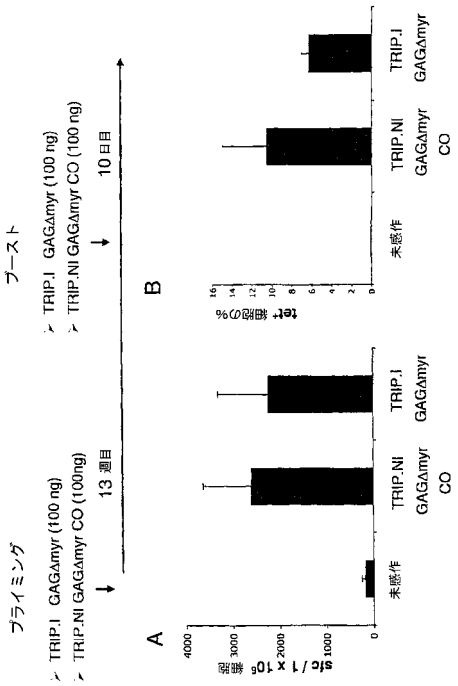
【図４７】



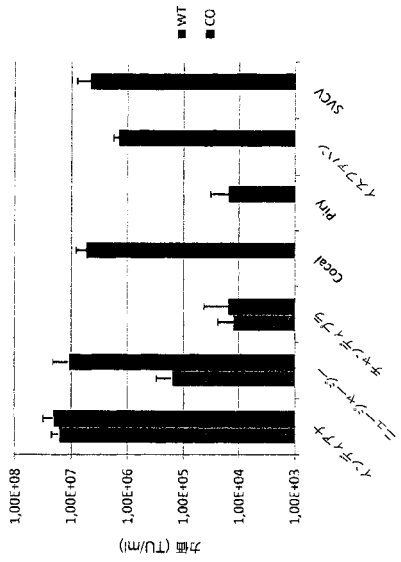
【図４８】



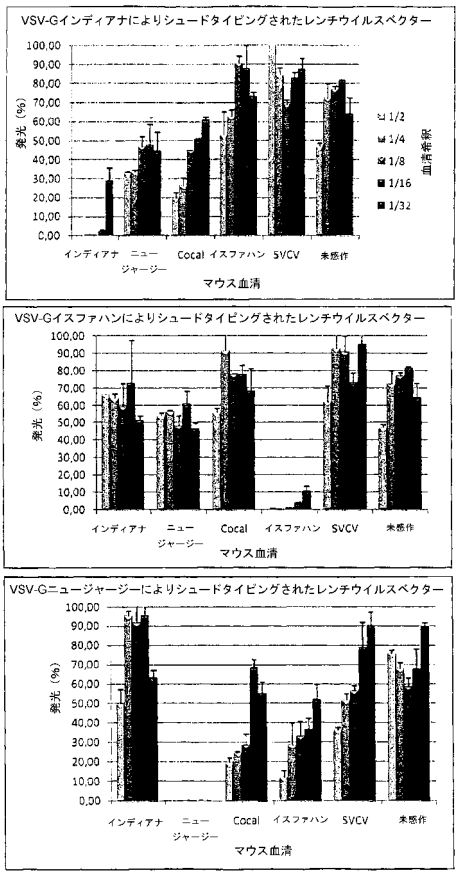
【図４９】



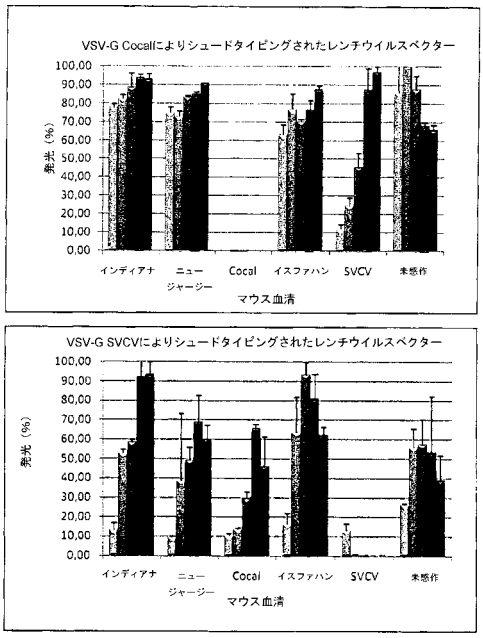
【図５０】



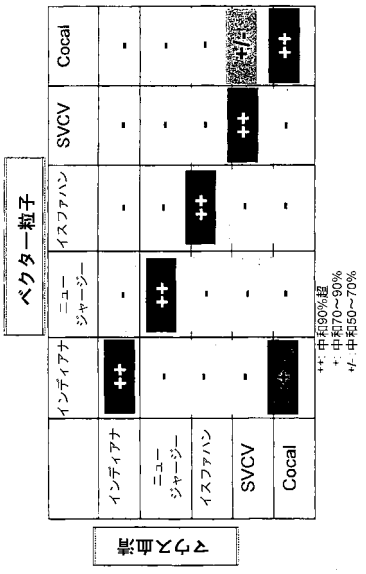
【図５１Ａ】



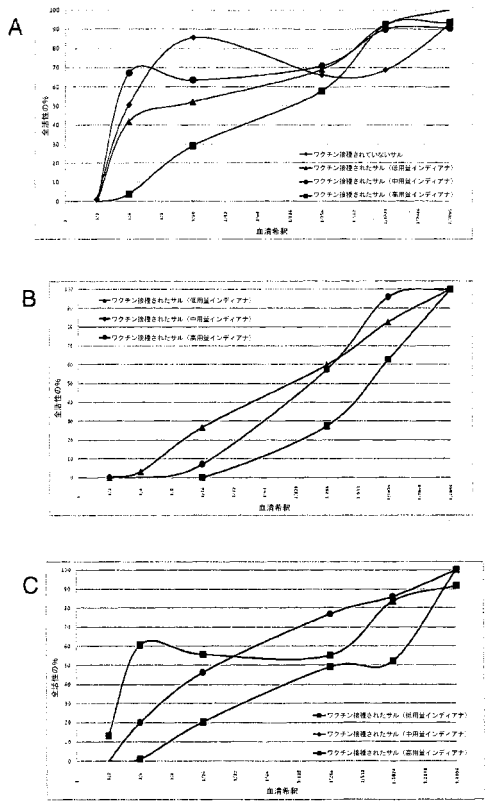
【図５１Ｂ】



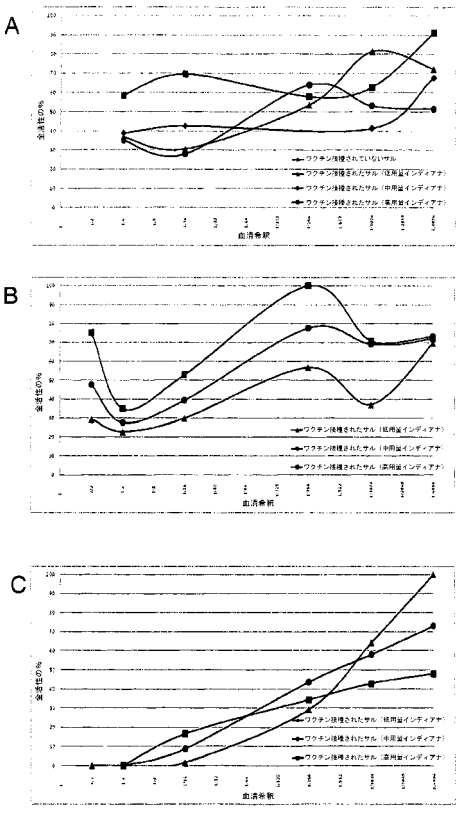
【図５２】



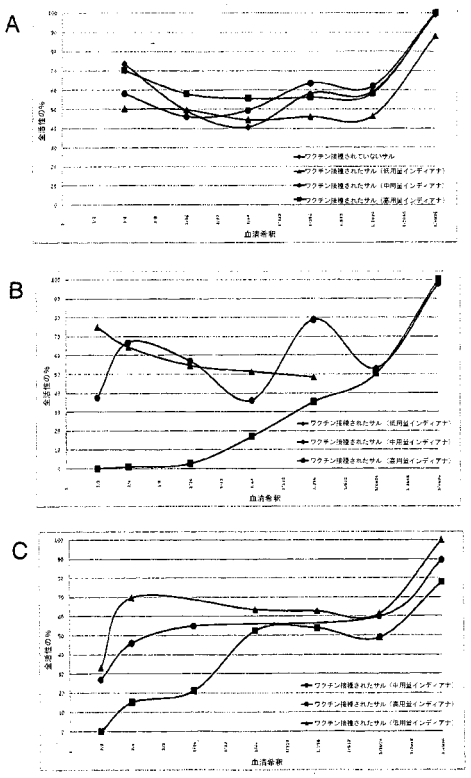
【図５３】



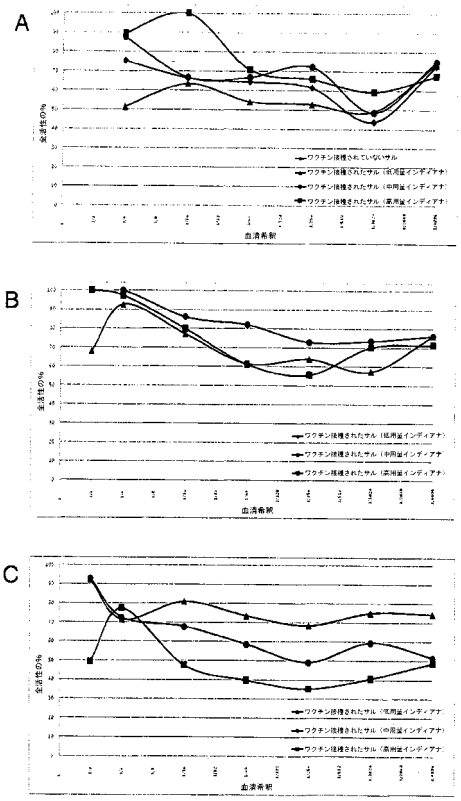
【図５４】



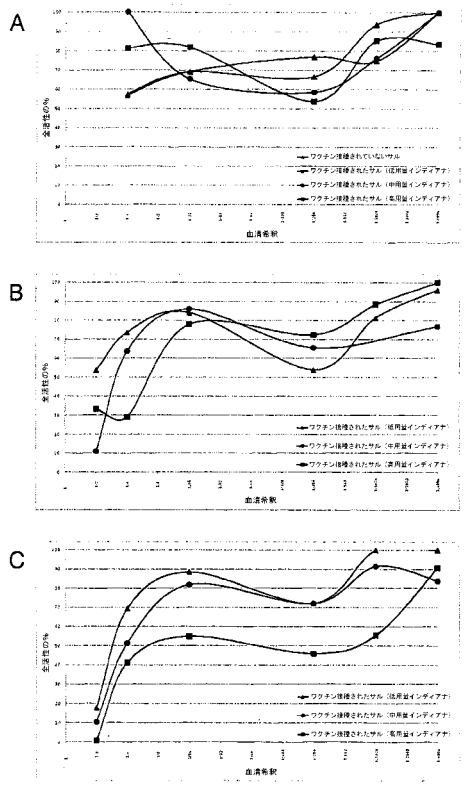
【図５５】



【図５６】



【図５７】



【図５８】

A インディアナ

血清	>75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	合計
非加熱	20	22	29	21	2	2	96
加熱	13	21	37	22	2	1	96

形質導入の%

B ニュージャージー

血清	>75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	合計
非加熱	9	17	22	34	10	4	96
加熱	7	9	33	37	8	2	96

形質導入の%

C Cocal

血清	>75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	合計
非加熱	6	11	49	30	4	2	96
加熱	10	12	40	34	6	1	96

形質導入の%

DSVCV

血清	>75%	50<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	合計
非加熱	0	0	6	90	0	0	96
加熱	0	2	3	91	0	0	96

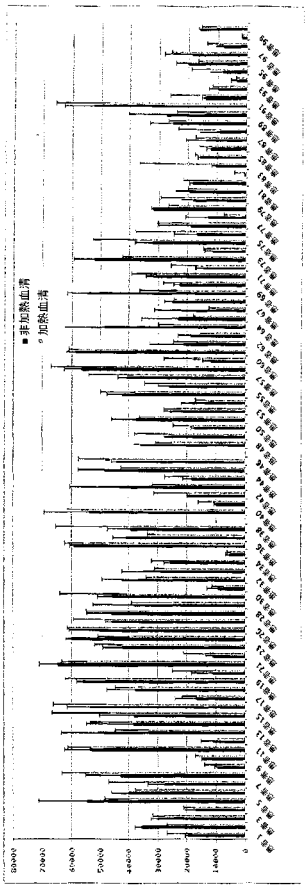
形質導入の%

E イスファハン

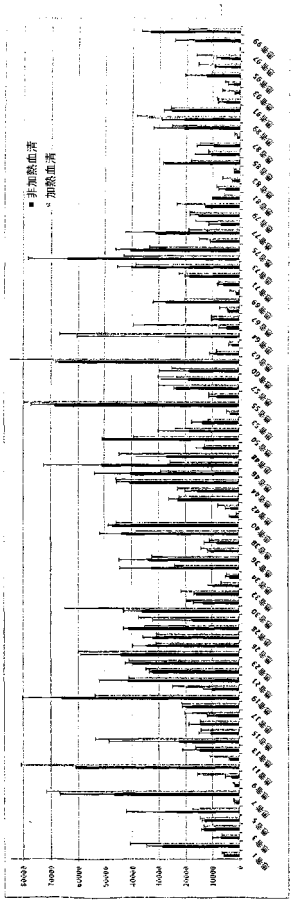
血清	>75%	90<>75%	25<>50%	<25%	5%<>2%	<2%	合計
非加熱	16	17	42	17	3	0	95
加熱	11	20	35	27	2	0	95

形質導入の%

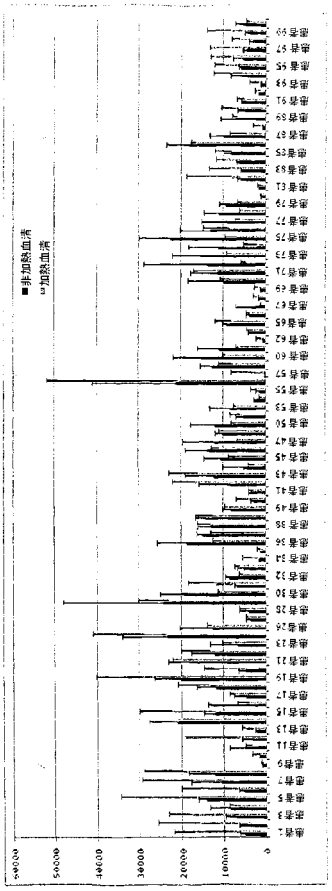
【図５９Ａ】



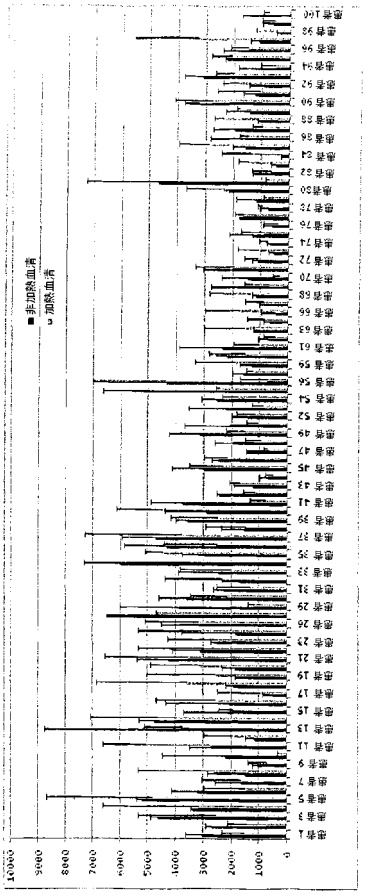
【図５９Ｂ】



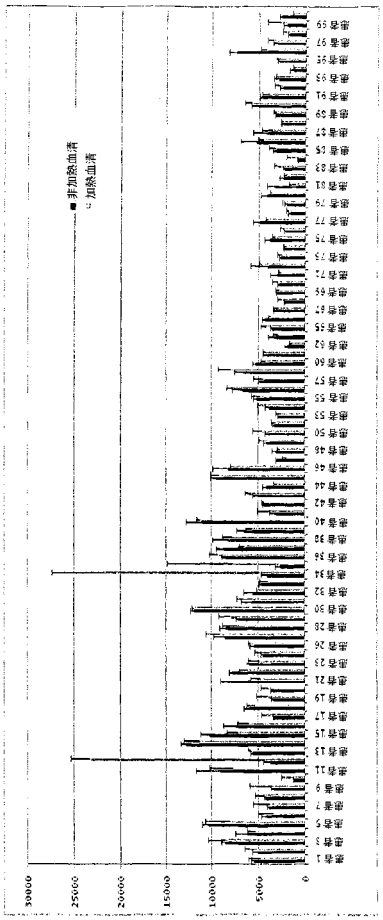
【図５９Ｃ】



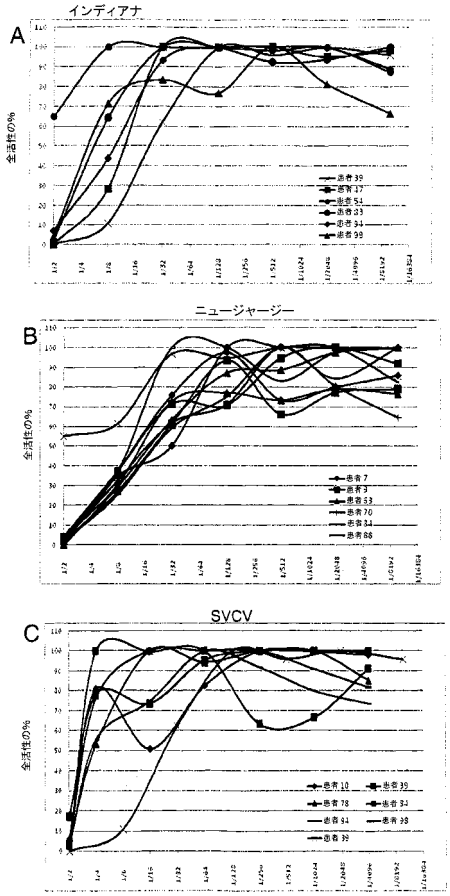
【図５９Ｄ】



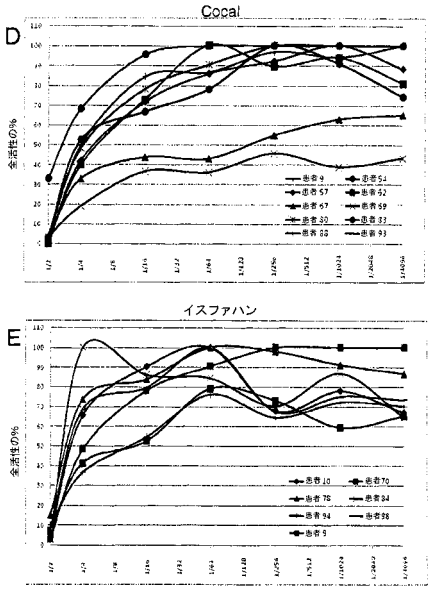
【図５９Ｅ】



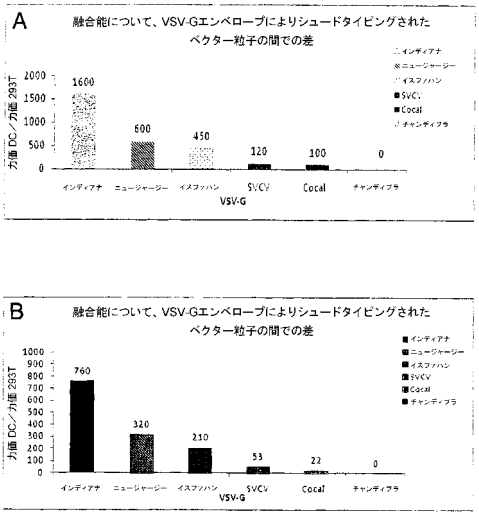
【図６０－１】



【図６０－２】



【図６１】



【配列表】
2010535495000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/002930

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/21 C07K14/16 C12N15/62 C12N15/867 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BALIGA ET AL: "Vaccination of Mice with Replication-Defective Human Immunodeficiency Virus Induces Cellular and Humoral Immunity and Protects against Vaccinia Virus-gag Challenge" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA,, US, vol. 14, no. 3, 12 August 2006 (2006-08-12), pages 432-441, XP005844837 ISSN: 1525-0016 * concerns invention 1 * page 437, left-hand column, paragraph 2 - page 438, left-hand column, paragraph 1; figures 1B,2,5; table 2 page 438, right-hand column, last paragraph - page 439, left-hand column, paragraph 1	1,4-14, 16-18, 20, 32-34, 36, 42-44, 49,51, 53,54,87

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 October 2009	06/11/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Brenz Verca, Stefano

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/002930

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IGLESIAS MARIA CANDELA ET AL: "Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses invivo" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 15, no. 6, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 1203-1210, XP008087284 ISSN: 1525-0016 cited in the application	
A	* concerns invention 1 * the whole document	
Y	* concerns invention 3 * figure 1; tables 1,2	60-62, 64-69,87
A	WO 2004/110485 A (PALMOWSKI MICHAEL J [GB]; LOPES LUCIEN [GB]; IKEDA YASUHIRO [GB]; CERU) 23 December 2004 (2004-12-23) * concerns invention 1 * page 6, line 35 - page 7, line 6 page 10, line 34 - page 11, line 9	
A	DELENDA C: "LENTIVIRAL VECTORS: OPTIMIZATION OF PACKAGING, TRANSDUCTION AND GENE EXPRESSION" JOURNAL OF GENE MEDICINE, WILEY,, US, vol. 6, no. SUPPL 1, February 2004 (2004-02), pages S125-S138, XP008051607 ISSN: 1099-498X cited in the application * concerns invention 1 * the whole document	
A	PICHLMAIR ANDREAS ET AL: "Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via toll-like receptor 9" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 81, no. 2, January 2007 (2007-01), pages 539-547, XP002473033 ISSN: 0022-538X * concerns invention 1 * the whole document	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/002930

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUFFA VIVIANA ET AL: "Evaluation of a self-inactivating lentiviral vector expressing simian immunodeficiency virus gag for induction of specific immune responses in vitro and in vivo." VIRAL IMMUNOLOGY WINTER 2006, vol. 19, no. 4, January 2006 (2006-01), pages 690-701, XP002482736 ISSN: 0882-8245 * concerns invention 3 * * vector pTY2-SIVGagDX * page 691, right-hand column, paragraph 3 - page 692, left-hand column, paragraph 1; figure 1 page 697, left-hand column, lines 1-14	60-62, 64-69,87
Y	NEGRI DONATELLA RM ET AL: "Successful immunization with a single injection of non-integrating lentiviral vector" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 15, no. 9, 26 June 2007 (2007-06-26), pages 1716-1723, XP008087256 ISSN: 1525-0016 * concerns invention 3 * the whole document	60-62, 64-69,87
Y	BUFFA VIVIANA ET AL: "A single administration of lentiviral vectors expressing either full-length human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)(HXB2) Rev/Env or codon-optimized HIV-1(JR-FL) gp120 generates durable immune responses in mice" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 87, no. Part 6, June 2006 (2006-06), pages 1625-1634, XP002552701 ISSN: 0022-1317 * concerns invention 3 * * vector pTY2-JREnv * page 1631, right-hand column, paragraph 2	60-62, 64-69,87

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/002930

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GOMEZ ET AL: "Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1IIIB Gag-Pol-Nef proteins of clade B" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 25, no. 15, 16 March 2007 (2007-03-16), pages 2863-2885, XP005939185 ISSN: 0264-410X * concerns invention 3 * page 2865, right-hand column, paragraph 1	60-62, 64-69,87
A	FENG GAO ET AL: "CODON USAGE OPTIMIZATION OF HIV TYPE 1 SUBTYPE C GAG, POL, ENV, AND NEF GENES: IN VITRO EXPRESSION AND IMMUNE RESPONSES IN DNA-VACCINATED MICE" AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, MARY ANN LIEBERT, US, vol. 19, no. 9, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 817-823, XP009025628 ISSN: 0889-2229 * concerns invention 3 * the whole document	
A	KEIL W ET AL: "EPITOPE MAPPING BY DELETION MUTANTS AND CHIMERAS OF TWO VESICULAR STOMATITIS VIRUS GLYCOPROTEIN GENES EXPRESSED BY A VACCINIA VIRUS VECTOR" VIROLOGY, vol. 170, no. 2, 1989, pages 392-407, XP002473034 ISSN: 0042-6822 the whole document	
A	ROLLMAN ET AL: "The rationale behind a vaccine based on multiple HIV antigens" MICROBES AND INFECTION, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 7, no. 14, November 2005 (2005-11), pages 1414-1423, XP005171715 ISSN: 1286-4579 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2008/002930

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-58 (entirely), 60-62(entirely), 64-69 (partially), 87 (partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2008/002930

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-58 (entirely), 64-69 (partially), 87(partially)

Combination (kit) of compounds for sequential administration to a mammalian host to elicit a protective specific cellular immune response against an immunodeficiency virus infection, comprising
(i) a first lentiviral particle pseudotyped with a first heterologous viral envelope protein
(ii) a second lentiviral particle pseudotyped with a second heterologous viral envelope protein different from said first heterologous viral envelope protein,
each lentiviral vector particle comprising in its genome a polynucleotide encoding one or several polypeptides comprising at least one antigen derived from a gag antigen of an immunodeficiency virus and wherein said first and second viral envelope protein(s) do not sero-neutralize each other and are suitable for in vivo transduction of mammalian cells; said combination of compounds for use in a therapeutic protocol comprising the administration of antiretroviral chemical drugs.

---

2. claims: 59 (entirely), 64-69 (partially), 86 (entirely), 87 (partially)

Lentiviral particle pseudotyped with a heterologous viral envelope protein and comprising in its genome a polynucleotide encoding one or several polypeptides comprising at least one antigen derived from a gag antigen of an immunodeficiency virus; said lentiviral vector for use in a therapeutic protocol comprising the administration of antiretroviral chemical drugs.

---

3. claims: 60-62 (entirely), 64-69 (partially), 87(partially)

Lentiviral particle pseudotyped with a heterologous viral envelope protein and comprising in its genome a polynucleotide having a human codon optimized sequence encoding an antigen derived from a gag antigen of a human immunodeficiency virus; said lentiviral vector for use in a therapeutic protocol comprising the administration of antiretroviral chemical drugs;

---

4. claims: 63, 87(partially)

Lentiviral particle pseudotyped with a vesicular stomatitis virus envelope protein G (VSV-G) and comprising in its genome a polynucleotide encoding an antigen derived from a gag antigen of an immunodeficiency virus;

International Application No. PCT/IB2008/002930

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

5. claims: 70-77,79

Plasmidic vector composition comprising:
a . lentiviral vector plasmid, comprising:
i. polynucleotides containing the cis-acting sequences of a lentivirus genome, comprising the 5' LTR or a modified 5' LTR wherein the promoter is replaced, encapsidation signal (psi), RRE sequence, DNA Flap and 3' LTR sequences, wherein said 3'- LTR sequences being deleted at least for the enhancer and viral promoter of the U3 region and optionally for the complete U3 region, said vector plasmid further containing
ii. a polynucleotide encoding one or several polypeptides comprising at least one antigen derived from a GAG antigen of a Human Immunodeficiency Virus and which, and wherein said polynucleotide is under the control of an internal promoter suitable for use in a human host in vivo;
b. a packaging plasmid containing (i) an internal promoter suitable for use in a human host in vivo and (ii) lentiviral polynucleotides encoding the GAG, POL, and optionally TAT and REV proteins of a lentivirus, said packaging plasmid being devoid of the lentiviral psi encapsidation signal, and having a terminal a poly A tail, and;
c. an envelope plasmid containing (i) an internal promoter suitable for use in a human host in vivo and (ii) a polynucleotide encoding a heterologous viral envelope protein or viral envelope proteins selected among VSV-G envelope proteins or proteins derived therefrom and a poly A tail

---

6. claim: 78 (partially)

Lentiviral vector plasmid, comprising:
i. polynucleotides containing the cis-acting sequences of a lentivirus genome, comprising the 5' LTR or a modified 5' LTR wherein the promoter is replaced, encapsidation signal (psi), RRE sequence, DNA Flap and 3' LTR sequences, wherein said 3'- LTR sequences being deleted at least for the enhancer and viral promoter of the U3 region and optionally for the complete U3 region, said vector plasmid further containing
ii. a polynucleotide encoding one or several polypeptides comprising at least one antigen derived from a GAG antigen of a Human Immunodeficiency Virus and which, and wherein said polynucleotide is under the control of an internal promoter suitable for use in a human host in vivo;

---

7. claim: 78 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Packaging plasmid containing (i) an internal promoter suitable for use in a human host in vivo and (ii) lentiviral polynucleotides encoding the GAG, POL, and optionally TAT and REV proteins of a lentivirus, said packaging plasmid being devoid of the lentiviral psi encapsidation signal, and having a terminal a poly A tail.

---

8. claim: 78 (partially)

Envelope plasmid containing (i) an internal promoter suitable for use in a human host in vivo and (ii) a polynucleotide encoding a heterologous viral envelope protein or viral envelope proteins selected among VSV-G envelope proteins or proteins derived therefrom and a poly A tail

---

9. claims: 80-82, 87(partially)

Chimeric HIV-1 derived antigens consisiting of combinations of gag with nef,pol,tat or rev of HIV-1.

---

10. claims: 83-84

VSV-G envelope protein fusions and human codon optimized encoding nucleic acids thereof.

---

11. claims: 85, 87(partially)

Nucleic acid molecule encoding a gag-derived antigen

---

12. claims: claims 88-103

Use of a lentiviral vector comprising a defective integrase protein and further comprising a polynucleotide encoding at least one antigenic polypeptide, to produce an immunogenic composition for eliciting an immune response against said at least one polypeptide, in a host administered with said immunogenic composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2008/002930

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004110485 A	23-12-2004	US 2006257416 A1	16-11-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　31/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12	
Ａ６１Ｐ　33/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/00	
Ａ６１Ｐ　31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ　31/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18	

(31)優先権主張番号　08156405.6
(32)優先日　平成20年5月16日(2008.5.16)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

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

(71)出願人　510031453
テラヴェクティス
ＴＨＥＲＡＶＥＣＴＹＳ
フランス国、エフ－７５７２４　パリ・セデックス　１５、リュ・デュ・ドクドゥール・ルー　２８、バティマン・パストゥール・ビオトープ
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)代理人　100113653
弁理士　束田　幸四郎
(74)代理人　100116919
弁理士　齋藤　房幸
(72)発明者　シャルノー，ピエール
フランス国、エフ－７５００５　パリ、リュ・デ・エコール　６ビス
(72)発明者　ベイニョン，アンーソフィー
フランス国、エフ－７５０１２　パリ、リュ・ドゥ・ロッテンブール　３ビス
(72)発明者　クータン，フレデリク・フィリップ
フランス国、エフ－９２１３０　イシ・レ・ムリノー、リュ・ミシュレ　３
(72)発明者　クールベイレット，カリーヌ
フランス国、エフ－９１３００　マシー、リュ・ドーフィーヌ　２

Ｆターム(参考)　4B024 AA01
4B065 AA95X AA95Y AB01 BA02 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB262 ZB332 ZB352 ZB372 ZC552
4C085 AA03 BA69 BB23 CC08 EE01
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB26 ZB33 ZB35 ZB37 ZC55