

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】第 1 部門第 1 区分
 【発行日】平成28年5月26日 (2016.5.26)

【公表番号】特表2015-512263(P2015-512263A)
 【公表日】平成27年4月27日 (2015.4.27)
 【年通号数】公開・登録公報2015-028
 【出願番号】特願2015-503650(P2015-503650)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】
 【提出日】平成28年3月28日 (2016.3.28)
 【手続補正 1】
 【補正対象書類名】特許請求の範囲
 【補正対象項目名】全文
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【特許請求の範囲】
 【請求項 1】

(a) S A M H D 1 阻害活性を保持する V p x タンパク質または V p r タンパク質と、 (b) 抗原をコードする外因性ポリヌクレオチドと、 (c) D C - S I G N を発現する細胞に優先的に結合する複数のエンベローブ糖タンパク質とを含む偽型レンチウイルスベクター粒子を含む組成物であって、マンノシダーゼ阻害剤の不在下で調製された同じ偽型レンチウイルスベクター粒子の対照組成物と比較して、より高度にマンノシル化されている、組成物。

【請求項 2】

前記エンベローブ糖タンパク質が、アルファウイルス糖タンパク質またはシンドビス糖タンパク質から成る群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

高マンノシル化が、マンノシダーゼ阻害剤の不在下で調製された対照組成物よりもさらに E n d o H 感受性であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

E n d o H 感受性が、E n d o H 処理後、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) によって、前記エンベローブ糖タンパク質の分子量を評価することによって判定される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

E n d o H による処理後の前記エンベローブ糖タンパク質の分子量が、(a) エンドグリコシダーゼにより処理されないエンベローブ糖タンパク質と、(b) P N G a s e F により処理されたエンベローブ糖タンパク質との間の距離の約 45 % 以上、約 70 % 以上、または約 90 % 以上シフトしている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記組成物中の前記エンベローブ糖タンパク質のうちの少なくとも 30 % が、マンノシダーゼ阻害剤の不在下で調製された偽型レンチウイルスベクター粒子の対照組成物中の同じアミノ酸配列 (複数を含む) を有する対照糖タンパク質と比較して、増加した量の E n d o H 感受性グリカンを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記偽型レンチウイルスベクター粒子が、組み込み不能である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物が、シンドビス E 2 糖タンパク質、配列番号 30 [S I N - V a r 1] と 90 % 同一であるシンドビス E 2 糖タンパク質、配列番号 30 [S I N - V a r 1] と 90 % 同一であるシンドビス E 2 糖タンパク質であって、(i) 前記 E 2 糖タンパク質の残基 160 が、不在であるか、またはグルタミン酸以外のアミノ酸であり、(i i) 前記 E 2 糖タンパク質変異体の残基 70、76、もしくは 159 のうちの 1 つ以上が、非塩基性残基であり、(i i i) 前記 E 2 糖タンパク質変異体が、シンドビスウイルス E 3 糖タンパク質との融合タンパク質の一部ではない、シンドビス E 2 糖タンパク質、あるいは配列番号 30 [S I N - V a r 1] に示されるシンドビス E 2 糖タンパク質から成る群から選択される糖タンパク質を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 V p x タンパク質が、S I V m a c V p x [配列番号 44] と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、あるいは前記 V p x タンパク質が、S I V m a c V p x (配列番号 44)、S I V s m V p x (配列番号 45)、S I V r c m V p x (配列番号 46)、または H I V - 2 V p x (配列番号 47) と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、あるいは前記 V p x タンパク質が、S I V d e b V p r (配列番号 48) または S I V m u s V p r (配列番号 49) と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記抗原が、

(a) 腫瘍特異的抗原またはウイルス特異的抗原である；

(b) N Y - E S O - 1、M A G E、M A R T - 1 / M e l a n - A、B A G E、R A G E、g p 100、g p 75、m d a - 7、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質、腎細胞癌抗原、5 T 4、S M 2 2 - アルファ、炭酸脱水酵素 I、炭酸脱水酵素 I X (G 250 としても知られる)、H I F - 1 アルファ、H I F - 2 アルファ、V E G F、前立腺特異性膜抗原 (P S M A)、前立腺特異的抗原 (P S A)、前立腺酸性リン酸塩、前立腺の 6 - 膜貫通上皮抗原 (S T E A P)、N K X 3 . 1、テロメラーゼ酵素、スルビピン、メソテリン、変異型 r a s、b c r / a b l 再構成、H e r 2 / n e u、変異型 p 53、野生型 p 53、サイトクローム P 450 1 B 1、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ - V、ヒトパピローマウイルスタンパク質 E 6、ヒトパピローマウイルスタンパク質 E 7、癌胎児性抗原、およびアルファ - フェトタンパク質から成る群から選択される；あるいは

(c) H I V 抗原、S I V 抗原、アデノウイルス抗原、エンテロウイルス抗原、コロナウイルス抗原、カリシウイルス抗原、ジステンパーウイルス抗原、エボラウイルス抗原、フラビウイルス抗原、肺炎ウイルス抗原、ヘルペスウイルス抗原、感染性腹膜炎ウイルス抗原、インフルエンザウイルス抗原、白血病ウイルス抗原、マールブルグウイルス抗原、オルトミクソウイルス抗原、パピローマウイルス抗原、パラインフルエンザウイルス抗原、パラミクソウイルス抗原、パラボウイルス抗原、ペスチウイルス抗原、ピコルナウイルス抗原、ポリオウイルス抗原、ポックスウイルス抗原、狂犬病ウイルス抗原、レオウイルス抗原、レトロウイルス抗原、またはロタウイルス抗原である、

請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記レンチウイルスベクターが、第 2 の抗原をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記第 1 および第 2 の抗原が、前記 2 つの抗原の間に自己切断型 A 2 ペプチドを含む融合タンパク質として発現される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

自己切断型 A2 ペプチドが、配列番号 56 または配列番号 57 のアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記第 1 の抗原が、NY-ESO-1 であり、前記第 2 の抗原が、MAGE-A3 である、請求項 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記第 1 および第 2 の抗原が、二方向性プロモーターから発現される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記エンベロープ糖タンパク質が、マウス SIGNR1 を発現する細胞に結合する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記偽型レンチウイルスベクター粒子が、マウス SIGNR1 を発現しない細胞と比較して、マウス SIGNR1 を発現する細胞をより効率的に形質導入する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 18】

偽型レンチウイルスベクター粒子を生成する方法であって、

(a) キフネンシンを含む培養培地中で、

(1) 外因性抗原をコードするポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクターゲノムと、

(2) DC-SIGN を発現する樹状細胞に優先的に結合するシンドビス E2 糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、

(3) SAMHD1 阻害活性を保持する Vpx タンパク質または Vpr タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、を含むウイルスパッケージング細胞を培養することと、

(b) DC-SIGN を発現する樹状細胞に優先的に結合する偽型レンチウイルスベクター粒子を単離することと、を含む、方法。

【請求項 19】

(a) 前記 E2 糖タンパク質が、配列番号 30 [SIN-Var1] と 90% 同一である；

(b) (i) 前記 E2 糖タンパク質の残基 160 が、不在であるか、またはグルタミン酸以外のアミノ酸であり、(ii) 前記 E2 糖タンパク質変異体の残基 70、76、または 159 のうちの 1 つ以上が、非塩基性残基であり、(iii) 前記 E2 糖タンパク質変異体が、シンドビスウイルス E3 糖タンパク質との融合タンパク質の一部ではない、あるいは

(c) 前記 E2 糖タンパク質が、配列番号 30 [SIN-Var1] である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

(a) 前記 Vpx タンパク質が、SIVmac Vpx [配列番号 44] と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む；

(b) 前記 Vpx タンパク質が、SIVmac Vpx (配列番号 44)、SIVsm Vpx (配列番号 45)、SIVrcm Vpx (配列番号 46)、または HIV-2 Vpx (配列番号 47) と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む；あるいは

(c) 前記 Vpx タンパク質が、SIVdeb Vpr (配列番号 48) または SIVmu Vpr (配列番号 49) と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記抗原が、

(a) 腫瘍特異的抗原またはウイルス特異的抗原である；

(b) NY - ESO - 1、MAGE、MART - 1 / Melan - A、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda - 7、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質、腎細胞癌抗原、5T4、SM22 - アルファ、炭酸脱水酵素I、炭酸脱水酵素IX (G250としても知られる)、HIF - 1アルファ、HIF - 2アルファ、VEGF、前立腺特異性膜抗原 (PSMA)、前立腺特異的抗原 (PSA)、前立腺酸性リン酸塩、前立腺の6 - 膜貫通上皮抗原 (STEAP)、NKX3.1、テロメラーゼ酵素、スルビビン、メソテリン、変異型ras、bcr / abl再構成、Her2 / neu、変異型p53、野生型p53、サイトクロームP450 1B1、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ - V、ヒトパピローマウイルスタンパク質E6、ヒトパピローマウイルスタンパク質E7、癌胎児性抗原、およびアルファ - フェトタンパク質から成る群から選択される；あるいは

(c) HIV抗原、SIV抗原、アデノウイルス抗原、エンテロウイルス抗原、コロナウイルス抗原、カリシウイルス抗原、ジステンパーウイルス抗原、エボラウイルス抗原、フラビウイルス抗原、肺炎ウイルス抗原、ヘルペスウイルス抗原、感染性腹膜炎ウイルス抗原、インフルエンザウイルス抗原、白血病ウイルス抗原、マールブルグウイルス抗原、オルトミクソウイルス抗原、パピローマウイルス抗原、パラインフルエンザウイルス抗原、パラミクソウイルス抗原、パラボウイルス抗原、ペスチウイルス抗原、ピコルナウイルス抗原、ポリオウイルス抗原、ポックスウイルス抗原、狂犬病ウイルス抗原、レオウイルス抗原、レトロウイルス抗原、またはロタウイルス抗原である、

請求項18に記載の方法。

【請求項22】

前記レンチウイルスベクターゲノムが、第2の抗原をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項23】

前記第1および第2の抗原が、前記2つの抗原の間に自己切断型A2ペプチドを含む融合タンパク質として発現される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

自己切断型A2ペプチドが、配列番号56または配列番号57のアミノ酸配列を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記第1の抗原が、NY - ESO - 1であり、前記第2の抗原が、MAGE - A3である、請求項22に記載の方法。

【請求項26】

前記第1および第2の抗原が、二方向性プロモーターから発現される、請求項22に記載の方法。

【請求項27】

前記キフネンシンが、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、前記培養培地中に存在するか、または前記キフネンシンが、約0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、前記培養培地中に存在する、請求項18に記載の方法。

【請求項28】

前記ウイルスパッケージング細胞が、

(i) gagおよびpol遺伝子を含むポリヌクレオチドと、

(ii) revタンパク質をコードするポリヌクレオチドとをさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項29】

前記gagおよびpol遺伝子が、ヒトのコドンに最適化され、配列番号54の1228 ~ 1509位周辺に最適化されないウインドウを含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記gagおよびpol遺伝子を含むポリヌクレオチドが、機能的rev応答要素 (RRE) を欠いている、請求項28に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 p o l 遺伝子が、不活性インテグラーゼ酵素をコードする、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記インテグラーゼ酵素が、D 6 4 V 突然変異体を有する、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記レンチウイルスベクターゲノムが、H I V - 1 に由来する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記レンチウイルスベクターゲノムが、不活性化された 3 ' 側の長い末端反復 (L T R) または自己不活性化された 3 ' 側の長い末端反復 (L T R) を有する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記レンチウイルスベクターゲノムが、エンハンサー配列、T A T A ボックス、S p 1 部位、N K - カッパ B 部位、またはポリプリン区画 (P P T) のうちの少なくとも 1 つを欠いている U 3 要素を含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記レンチウイルスベクターゲノムが、配列番号 2 1、2 2、または 2 3 のうちのいずれか 1 つの前記ヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記レンチウイルスベクターゲノムが、樹状細胞成熟 / 刺激因子をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記樹状細胞成熟 / 刺激因子が、G M - C S F、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 2 3、T N F、B 7 . 1、B 7 . 2、4 - 1 B B、C D 4 0 リガンド、および薬物誘導 C D 4 0 から成る群から選択される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

抗原をコードする前記ヌクレオチド配列が、ヒトユビキチン C プロモ - ター (U b i C)、サイトメガロウイルス前初期プロモ - ター (C M V)、ラウス肉腫ウイルスプロモ - ター (R S V)、およびテトラサイクリン応答プロモ - ターから成る群から選択されるプロモ - ターに作動可能に連結している、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記プロモ - ターが、イントロン欠損プロモーターである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記イントロン欠損プロモーターが、U b i C プロモーターである、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

請求項 1 8 に記載の方法によって産生される、レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 4 3】

請求項 2 8 に記載の方法によって産生される、レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 4 4】

偽型レンチウイルスベクター粒子を生成する方法であって、

(a) キフネンシンを含む培養培地中で、

(1) M A G E - A 3 および N Y - E S O - 1 をコードするポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクターゲノムであって、自己切断型 T A 2 ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、M A G E - A 3 および N Y - E S O - 1 をコードするポリヌクレオチドとの間に配置され、前記レンチウイルスゲノムがポリプリン区画 (P P T) を欠いており、M A G E - A 3 および N Y - E S O - 1 の発現が、イントロンを欠いている U b i C プロモーターによって制御される、レンチウイルスベクターゲノムと、

(2) D C - S I G N を発現する樹状細胞に優先的に結合するシンドビス E 2 糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、

(3) ヒトのコドンに最適化される g a g および p o l 遺伝子を含むポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが機能的 r e v 応答要素 (R R E) を欠いており、前記 p o l 遺伝子が不活性インテグラーゼ酵素をコードする、ポリヌクレオチドと、

(4) S A M H D 1 阻害活性を保持する V p x タンパク質または V p r タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを含むウイルスパッケージング細胞を培養することと、

(b) D C - S I G N を発現する樹状細胞に優先的に結合する偽型レンチウイルスベクター粒子を単離することと、を含む、方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 5】

本明細書に記載されるいくつかのまたは任意の実施形態において、偽型レンチウイルスベクター粒子はまた、マウス S I G N R 1 を発現しない細胞と比較して、マウス S I G N R 1 を発現する細胞をより効率的に形質導入する。

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目 1)

(a) S A M H D 1 阻害活性を保持する V p x タンパク質または V p r タンパク質と、(b) 抗原をコードする外因性ポリヌクレオチドと、(c) D C - S I G N を発現する細胞に優先的に結合する複数のエンベロップ糖タンパク質とを含む偽型レンチウイルスベクター粒子を含む組成物であって、マンノシダーゼ阻害剤の不在下で調製された同じ偽型レンチウイルスベクター粒子の対照組成物と比較して、より高度にマンノシル化されている、組成物。

(項目 2)

前記エンベロップ糖タンパク質が、アルファウイルス糖タンパク質である、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3)

前記エンベロップ糖タンパク質が、シンドビス糖タンパク質である、項目 2 に記載の組成物。

(項目 4)

高マンノシル化が、マンノシダーゼ阻害剤の不在下で調製された対照組成物よりもさらに E n d o H 感受性であることを特徴とする、項目 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

(項目 5)

E n d o H 感受性が、E n d o H 処理後、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) によって、前記エンベロップ糖タンパク質の分子量を評価することによって判定される、項目 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

(項目 6)

E n d o H による処理後の前記エンベロップ糖タンパク質の分子量が、(a) エンドグリコシダーゼにより処理されないエンベロップ糖タンパク質と、(b) P N G a s e F により処理されたエンベロップ糖タンパク質との間の距離の約 4 5 % 以上シフトしている、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 7)

E n d o H による処理後の前記エンベロップ糖タンパク質の分子量が、(a) エンドグリコシダーゼにより処理されないエンベロップ糖タンパク質と、(b) P N G a s e F により処理されたエンベロップ糖タンパク質との間の距離の約 7 0 % 以上シフトしている、項目 6 に記載の組成物。

(項目 8)

E n d o Hによる処理後の前記エンベローブ糖タンパク質の分子量が、(a) エンドグリコシダーゼにより処理されないエンベローブ糖タンパク質と、(b) P N G a s e F により処理されたエンベローブ糖タンパク質との間の距離の約 9 0 % 以上シフトしている、項目 6 に記載の組成物。

(項目 9)

前記組成物中の前記エンベローブ糖タンパク質のうちの少なくとも 3 0 % が、マンノシダーゼ阻害剤の不在下で調製された偽型レンチウイルスベクター粒子の対照組成物中の同じアミノ酸配列(複数を含む)を有する対照糖タンパク質と比較して、増加した量の E n d o H 感受性グリカンを含む、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 0)

前記エンベローブ糖タンパク質の大部分が、高度にマンノシル化されている、項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 1)

前記偽型レンチウイルスベクター粒子が、組み込み不能である、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 2)

前記組成物が、シンドビス E 2 糖タンパク質を含む、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 3)

前記 E 2 糖タンパク質が、配列番号 3 0 [S I N - V a r 1] と 9 0 % 同一である、項目 1 2 に記載の組成物。

(項目 1 4)

(i) 前記 E 2 糖タンパク質の残基 1 6 0 が、不在であるか、またはグルタミン酸以外のアミノ酸であり、(i i) 前記 E 2 糖タンパク質変異体の残基 7 0 、 7 6 、もしくは 1 5 9 のうちの 1 つ以上が、非塩基性残基であり、(i i i) 前記 E 2 糖タンパク質変異体が、シンドビスウイルス E 3 糖タンパク質との融合タンパク質の一部ではない、項目 1 2 または 1 3 に記載の組成物。

(項目 1 5)

前記 E 2 糖タンパク質が、配列番号 3 0 [S I N - V a r 1] である、項目 1 4 に記載の組成物。

(項目 1 6)

前記 V p x タンパク質が、S I V m a c V p x [配列番号 4 4] と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 7)

前記 V p x タンパク質が、S I V m a c V p x (配列番号 4 4) 、 S I V s m V p x (配列番号 4 5) 、 S I V r c m V p x (配列番号 4 6) 、または H I V - 2 V p x (配列番号 4 7) と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 8)

前記 V p x タンパク質が、S I V d e b V p r (配列番号 4 8) または S I V m u s V p r (配列番号 4 9) と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 9)

前記抗原が、腫瘍特異的抗原またはウイルス特異的抗原である、項目 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 2 0)

前記腫瘍特異的抗原が、N Y - E S O - 1 、 M A G E 、 M A R T - 1 / M e l a n - A 、 B A G E 、 R A G E 、 g p 1 0 0 、 g p 7 5 、 m d a - 7 、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質、腎細胞癌抗原、5 T 4 、 S M 2 2 - アルファ、炭酸脱水酵素 I 、炭酸

脱水酵素 I X (G 2 5 0 としても知られる)、H I F - 1 アルファ、H I F - 2 アルファ、V E G F、前立腺特異性膜抗原 (P S M A)、前立腺特異的抗原 (P S A)、前立腺酸性リン酸塩、前立腺の 6 - 膜貫通上皮抗原 (S T E A P)、N K X 3 . 1、テロメラゼ酵素、スルビピン、メソテリン、変異型 r a s、b c r / a b l 再構成、H e r 2 / n e u、変異型 p 5 3、野生型 p 5 3、サイトクローム P 4 5 0 1 B 1、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ - V、ヒトパピローマウイルスタンパク質 E 6、ヒトパピローマウイルスタンパク質 E 7、癌胎児性抗原、およびアルファ - フェトタンパク質から成る群から選択される、項目 1 9 に記載の組成物。

(項目 2 1)

前記ウイルス特異的抗原が、H I V 抗原、S I V 抗原、アデノウイルス抗原、エンテロウイルス抗原、コロナウイルス抗原、カリシウイルス抗原、ジステンパーウイルス抗原、エボラウイルス抗原、フラビウイルス抗原、肺炎ウイルス抗原、ヘルペスウイルス抗原、感染性腹膜炎ウイルス抗原、インフルエンザウイルス抗原、白血病ウイルス抗原、マールブルグウイルス抗原、オルトミクソウイルス抗原、パピローマウイルス抗原、パラインフルエンザウイルス抗原、パラミクソウイルス抗原、パラボウイルス抗原、ペスチウイルス抗原、ピコルナウイルス抗原、ポリオウイルス抗原、ポックスウイルス抗原、狂犬病ウイルス抗原、レオウイルス抗原、レトロウイルス抗原、またはロタウイルス抗原である、項目 1 9 に記載の組成物。

(項目 2 2)

前記レンチウイルスベクターゲノムが、第 2 の抗原をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、項目 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 2 3)

前記第 1 および第 2 の抗原が、前記 2 つの抗原の間に自己切断型 A 2 ペプチドを含む融合タンパク質として発現される、項目 2 2 に記載の組成物。

(項目 2 4)

自己切断型 A 2 ペプチドが、配列番号 5 6 または配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む、項目 2 3 に記載の組成物。

(項目 2 5)

前記第 1 の抗原が、N Y - E S O - 1 であり、前記第 2 の抗原が、M A G E - A 3 である、項目 2 2 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 2 6)

前記第 1 および第 2 の抗原が、二方向性プロモーターから発現される、項目 2 2 に記載の組成物。

(項目 2 7)

前記エンベロープ糖タンパク質が、マウス S I G N R 1 を発現する細胞に結合する、項目 1 に記載の組成物。

(項目 2 8)

前記偽型レンチウイルスベクター粒子が、マウス S I G N R 1 を発現しない細胞と比較して、マウス S I G N R 1 を発現する細胞をより効率的に形質導入する、項目 1 に記載の組成物。

(項目 2 9)

偽型レンチウイルスベクター粒子を生成する方法であって、

(a) キフネンシンを含む培養培地中で、

(1) 外因性抗原をコードするポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクターゲノムと、

(2) D C - S I G N を発現する樹状細胞に優先的に結合するシンドビス E 2 糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、

(3) S A M H D 1 阻害活性を保持する V p x タンパク質または V p r タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、を含むウイルスパッケージング細胞を培養することと

(b) DC - SIGNを発現する樹状細胞に優先的に結合する偽型レンチウイルスベクター粒子を単離することと、を含む、方法。

(項目30)

前記E2糖タンパク質が、配列番号30 [SIN - Var 1]と90%同一である、項目29に記載の方法。

(項目31)

(i) 前記E2糖タンパク質の残基160が、不在であるか、またはグルタミン酸以外のアミノ酸であり、(ii) 前記E2糖タンパク質変異体の残基70、76、または159のうちの1つ以上が、非塩基性残基であり、(iii) 前記E2糖タンパク質変異体が、シンドビスウイルスE3糖タンパク質との融合タンパク質の一部ではない、項目29または30に記載の方法。

(項目32)

前記E2糖タンパク質が、配列番号30 [SIN - Var 1]である、項目30に記載の方法。

(項目33)

前記Vp xタンパク質が、SIVmac Vp x [配列番号44]と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、項目29～32のいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

前記Vp xタンパク質が、SIVmac Vp x (配列番号44)、SIVsm Vp x (配列番号45)、SIVrcm Vp x (配列番号46)、またはHIV-2 Vp x (配列番号47)と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、項目29～32のいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

前記Vp xタンパク質が、SIVdeb Vpr (配列番号48)またはSIVmus Vpr (配列番号49)と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、項目29～32のいずれか一項に記載の方法。

(項目36)

前記抗原が、腫瘍特異的抗原またはウイルス特異的抗原である、項目29～35のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

前記腫瘍特異的抗原が、NY-ESO-1、MAGE、MART-1/Melan-A、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda-7、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質、腎細胞癌抗原、5T4、SM22-アルファ、炭酸脱水酵素I、炭酸脱水酵素IX (G250としても知られる)、HIF-1アルファ、HIF-2アルファ、VEGF、前立腺特異性膜抗原 (PSMA)、前立腺特異的抗原 (PSA)、前立腺酸性リン酸塩、前立腺の6-膜貫通上皮抗原 (STEAP)、NKX3.1、テロメラゼ酵素、スルビピン、メソテリン、変異型ras、bcr/abl再構成、Her2/neu、変異型p53、野生型p53、サイトクロームP450 1B1、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V、ヒトパピローマウイルスタンパク質E6、ヒトパピローマウイルスタンパク質E7、癌胎児性抗原、およびアルファ-フェトタンパク質から成る群から選択される、項目36に記載の方法。

(項目38)

前記ウイルス特異的抗原が、HIV抗原、SIV抗原、アデノウイルス抗原、エンテロウイルス抗原、コロナウイルス抗原、カリシウイルス抗原、ジステンパーウイルス抗原、エボラウイルス抗原、フラビウイルス抗原、肺炎ウイルス抗原、ヘルペスウイルス抗原、感染性腹膜炎ウイルス抗原、インフルエンザウイルス抗原、白血病ウイルス抗原、マールブルグウイルス抗原、オルトミクソウイルス抗原、パピローマウイルス抗原、パラインフルエンザウイルス抗原、パラミクソウイルス抗原、パラボウイルス抗原、ペスチウイルス抗原、ピコルナウイルス抗原、ポリオウイルス抗原、ポックスウイルス抗原、狂犬病ウイルス抗原、レオウイルス抗原、レトロウイルス抗原、またはロタウイルス抗原である、項

目 3 6 に記載の方法。

(項 目 3 9)

前記レンチウイルスベクターゲノムが、第 2 の抗原をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、項目 2 9 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項 目 4 0)

前記第 1 および第 2 の抗原が、前記 2 つの抗原の間に自己切断型 A 2 ペプチドを含む融合タンパク質として発現される、項目 3 9 に記載の方法。

(項 目 4 1)

自己切断型 A 2 ペプチドが、配列番号 5 6 または配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む、項目 4 0 に記載の方法。

(項 目 4 2)

前記第 1 の抗原が、N Y - E S O - 1 であり、前記第 2 の抗原が、M A G E - A 3 である、項目 3 9 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項 目 4 3)

前記第 1 および第 2 の抗原が、二方向性プロモーターから発現される、項目 3 9 に記載の方法。

(項 目 4 4)

前記キフネンシンが、約 0 . 1 μ g / m l ~ 約 1 0 μ g / m l の濃度で、前記培養培地中に存在する、項目 2 9 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項 目 4 5)

前記キフネンシンが、約 0 . 2 5 μ g / m l ~ 約 2 μ g / m l の濃度で、前記培養培地中に存在する、項目 4 4 に記載の方法。

(項 目 4 6)

前記ウイルスパッケージング細胞が、

(i) g a g および p o l 遺伝子を含むポリヌクレオチドと、

(i i) r e v タンパク質をコードするポリヌクレオチドとをさらに含む、項目 2 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項 目 4 7)

前記 g a g および p o l 遺伝子が、ヒトのコドンに最適化され、配列番号 5 4 の 1 2 2 8 ~ 1 5 0 9 位周辺に最適化されないウインドウを含む、項目 4 6 に記載の方法。

(項 目 4 8)

前記 g a g および p o l 遺伝子を含むポリヌクレオチドが、機能的 r e v 応答要素 (R R E) を欠いている、項目 4 6 または 4 7 に記載の方法。

(項 目 4 9)

前記 p o l 遺伝子が、不活性インテグラーゼ酵素をコードする、項目 4 6 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項 目 5 0)

前記インテグラーゼ酵素が、D 6 4 V 突然変異体を有する、項目 4 9 に記載の方法。

(項 目 5 1)

前記 V p x タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、前記 r e v タンパク質をコードするポリヌクレオチド、または前記 g a g および p o l 遺伝子を含むポリヌクレオチドと同じまたは異なるプラスミド上にある、項目 4 6 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項 目 5 2)

前記レンチウイルスベクターゲノムが、H I V - 1 に由来する、項目 2 9 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項 目 5 3)

前記レンチウイルスベクターゲノムが、不活性化された 3 ' 側の長い末端反復 (L T R) または自己不活性化された 3 ' 側の長い末端反復 (L T R) を有する、項目 2 9 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項 目 5 4)

前記レンチウイルスベクターゲノムが、エンハンサー配列、T A T Aボックス、S p 1 部位、N K - カッパ B 部位、またはポリプリン区画 (P P T) のうちの少なくとも1つを欠いているU 3 要素を含む、項目5 3 に記載の方法。

(項目5 5)

前記レンチウイルスベクターゲノムが、配列番号2 1、2 2、または2 3のうちのいずれか1つの前記ヌクレオチド配列を含む、項目2 9 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目5 6)

前記レンチウイルスベクターゲノムが、樹状細胞成熟 / 刺激因子をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、項目2 9 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目5 7)

前記樹状細胞成熟 / 刺激因子が、G M - C S F、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、I L - 2 3、T N F、B 7 . 1、B 7 . 2、4 - 1 B B、C D 4 0 リガンド、および薬物誘導C D 4 0 から成る群から選択される、項目5 6 に記載の方法。

(項目5 8)

抗原をコードする前記ヌクレオチド配列が、ヒトユビキチンCプロモ - ター (U b i C)、サイトメガロウイルス前初期プロモ - ター (C M V)、ラウス肉腫ウイルスプロモ - ター (R S V)、およびテトラサイクリン応答プロモ - ターから成る群から選択されるプロモ - ターに作動可能に連結している、項目2 9 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目5 9)

前記プロモ - ターが、イントロン欠損プロモーターである、項目5 8 に記載の方法。

(項目6 0)

前記イントロン欠損プロモーターが、U b i C プロモーターである、項目5 9 に記載の方法。

(項目6 1)

項目2 9 ~ 4 5 に記載の方法によって產生される、レンチウイルスベクター粒子。

(項目6 2)

項目4 6 ~ 6 0 に記載の方法によって產生される、レンチウイルスベクター粒子。

(項目6 3)

偽型レンチウイルスベクター粒子を生成する方法であって、

(a) キフネンシンを含む培養培地中で、

(1) M A G E - A 3 および N Y - E S O - 1 をコードするポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクターゲノムであって、自己切断型 T A 2 ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、M A G E - A 3 および N Y - E S O - 1 をコードするポリヌクレオチドとの間に配置され、前記レンチウイルスゲノムがポリプリン区画 (P P T) を欠いており、M A G E - A 3 および N Y - E S O - 1 の発現が、イントロンを欠いている U b i C プロモーターによって制御される、レンチウイルスベクターゲノムと、

(2) D C - S I G N を発現する樹状細胞に優先的に結合するシンドビス E 2 糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、

(3) ヒトのコドンに最適化される g a g および p o 1 遺伝子を含むポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが機能的 r e v 応答要素 (R R E) を欠いており、前記 p o 1 遺伝子が不活性インテグラーゼ酵素をコードする、ポリヌクレオチドと、

(4) S A M H D 1 阻害活性を保持する V p x タンパク質または V p r タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを含むウイルスパッケージング細胞を培養することと、

(b) D C - S I G N を発現する樹状細胞に優先的に結合する偽型レンチウイルスベクター粒子を単離することと、を含む、方法。