(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3881689号
(P3881689)
(45)発行日　平成19年2月14日(2007.2.14)　(24)登録日　平成18年11月17日(2006.11.17)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	Z
A61K 39/21	(2006.01)	A61K	39/21	
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	

請求項の数 14　(全 15 頁)

(21)出願番号	特願平5-516046
(86)(22)出願日	平成5年3月10日(1993.3.10)
(65)公表番号	特表平6-508153
(43)公表日	平成6年9月14日(1994.9.14)
(86)国際出願番号	PCT/US1993/002338
(87)国際公開番号	WO1993/017706
(87)国際公開日	平成5年9月16日(1993.9.16)
審査請求日	平成12年3月9日(2000.3.9)
(31)優先権主張番号	07/850,189
(32)優先日	平成4年3月11日(1992.3.11)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　399042270
パウダージェクト　ヴァクシンズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ウィスコンシン　５３７１１，マディソン，　スイート　シー，サイエンス　ドライブ５８５
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(72)発明者　ヘインズ　ジョエル　アール
アメリカ合衆国　ウィスコンシン州　５３５６２　ミドルトン　パーメンター　ストリート　１５０２

審査官　川口　裕美子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫不全ウイルス用の遺伝子ワクチン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

霊長類の皮膚に対して被覆担体粒子を加速することによって、該霊長類における免疫不全ウイルスに対する免疫応答を誘導するに適切な被覆粒子であって、該被覆粒子は、以下：該粒子が導入されるべき細胞に比して小さなサイズの担体粒子；および

ＤＮＡ構築体であって、該ＤＮＡ構築体のコピーが該担体粒子を被覆し、該ウイルスの抗原決定基をコードするがウイルス複製に必須の領域を含まないＤＮＡ配列の上流に該霊長類の細胞に作動可能なプロモータを含む、ＤＮＡ構築体、

を含む被覆粒子。

【請求項２】

前記担体粒子が金粒子である、請求項１に記載の被覆粒子。

【請求項３】

前記プロモータがヒトサイトメガロウイルス即時型プロモータである、請求項１または２に記載の被覆粒子。

【請求項４】

前記ＤＮＡ配列は、前記ウイルスの主要抗原決定基をコードする、請求項１～３のいずれか１項に記載の被覆粒子。

【請求項５】

前記ＤＮＡ配列が、長末端反復配列およびプライマー結合サイトを含まない、請求項１～４のいずれか１項に記載の被覆粒子。

【請求項６】
前記ウイルスがヒト免疫不全ウイルスである、請求項１～５のいずれか１項に記載の被覆粒子。
【請求項７】
前記ＤＮＡ配列が、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ読み取り枠を含む、請求項６に記載の被覆粒子。
【請求項８】
霊長類の皮膚に対して被覆担体粒子を加速することによって、該霊長類における免疫不全ウイルスに対する免疫応答を誘導するのに適切な被覆粒子を備えた加速粒子の遺伝子移入デバイスであって、該被覆粒子は、以下：
該粒子が導入されるべき細胞に比して小さなサイズの担体粒子；および
ＤＮＡ構築体であって、該ＤＮＡ構築体のコピーが該担体粒子を被覆し、該ウイルスの抗原決定基をコードするがウイルス複製に必須の領域を含まないＤＮＡ配列の上流に該霊長類の細胞に作動可能なプロモータを含む、ＤＮＡ構築体、
を含む、デバイス。
【請求項９】
前記担体粒子が金粒子である、請求項８に記載のデバイス。
【請求項１０】
前記プロモータがヒトサイトメガロウイルス即時型プロモータである、請求項８または９に記載のデバイス。
【請求項１１】
前記ＤＮＡ配列は、前記ウイルスの主要抗原決定基をコードする、請求項８～１０のいずれか１項に記載のデバイス。
【請求項１２】
前記ＤＮＡ配列が、長末端反復配列およびプライマー結合サイトを含まない、請求項８～１１のいずれか１項に記載のデバイス。
【請求項１３】
前記ウイルスがヒト免疫不全ウイルスである、請求項８～１２のいずれか１項に記載のデバイス。
【請求項１４】
前記ＤＮＡ配列が、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ読み取り枠を含む、請求項１３に記載のデバイス。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は遺伝子ワクチンの一般的分野に関し、特に免疫不全ウイルス用の遺伝子ワクチンに関するものである。
発明の背景
ワクチン接種した個体を感染症の発生に対して抵抗性とする該個体のワクチン接種は医学における最も古典的な型の予防法の１種である。以前、小児、成人並びに獣医用途用のウイルス性および細菌性の病原体に対するワクチンは感染した生物から直接誘導され、大きな３つのカテゴリー、即ち生の弱毒化ワクチン、死菌ワクチンおよびサブユニットワクチンの１つとして分類できた。これら３つのカテゴリーのワクチンはその発現および作用様式において異なっているが、これら３種のカテゴリーのワクチンの何れかの投与は、該ワクチンの１回以上の接種に伴って、該病原体に対する特異的な免疫学的な応答を発生させることにある。この発生する免疫学的な応答は、該個体を後の感染に対して完全に免疫化することもしないこともあるが、通常は疾患症状の出現を阻害し、かつあらゆる後の感染の程度を大幅に制限するであろう。
現代分子生物学の方法は、種々の前臨床的および臨床的進展段階にある様々な新規ワクチンによる方策の開発を可能とする。これらの努力の意図するところは旧来の諸疾患用の新規なワクチンの製造のみならず、従来のワクチン開発戦略が不首尾であることが立証され

た感染症に対する新規なワクチンを作成することにある。特に、免疫不全ウイルスの最近の同定並びにその蔓延は、従来のワクチン開発戦略がこれまでに効果的な制御を達成し得なかった病原体の例である。

従来のワクチンの中の第一の広義のカテゴリーは生の弱毒化ワクチンである。生の弱毒化ワクチンは病原性のウイルスまたはバクテリアの特定の菌株に相当し、該菌株はその病原性を喪失するが、ヒト中での感染能および複製能を喪失しないように変性されている。生の弱毒化ワクチンはワクチンの最も有効な型と考えられている。というのは、各個体内において真の感染を生ずるからである。該複製病原体およびこれによるヒト細胞の感染は免疫系の体液性および細胞性部分を刺激し、かつ長期に及ぶ免疫記憶を刺激する。かくして、ウイルスのおよび細胞内バクテリアの感染に対する生の弱毒化ワクチンは、通常僅かに一回の接種後に、中和性抗体産生を刺激し、かつ細胞毒性t-リンパ細胞(CTLs)の生産を刺激する。生の弱毒化ワクチンのCTLs産生刺激能力が生の弱毒化ワクチン類の相対的な有効性における差異の重要な理由であると考えられている。CTLsは、実際のウイルス並びにバクテリア感染の阻止の理由となる該免疫系の主な成分として認識されている。CTLsは宿主の各感染細胞における外来タンパクの生産により誘発され、該感染細胞は該抗原を処理し、かつ免疫学的認識のために該細胞表面上の特定の抗原決定基を与える。個々の感染細胞中での外来抗原の生産を含む、該宿主細胞における実際の制限された感染の確立により、弱毒化ワクチンによるCTL免疫性が誘発される。生の弱毒化ワクチンに起因する免疫過程は、また免疫記憶の誘発をも生じ、この免疫記憶は将来感染性の物質の病原型に暴露された場合に、特異的CTLクローンおよび抗体－産生プラズマ細胞を即座に発生し、この感染を迅速に阻止し、かつ実際に疾患を予防する。

生の弱毒化ワクチンの重大な欠点は、無秩序な遺伝的変異を通して新規なビルレント表現型に戻る固有の傾向をもつことである。統計的には、かかる復帰は今日一般的に使用されている弱毒化ウイルスワクチンでは稀なできごとであるが、このようなワクチンは高頻度の復帰が避けえない程に大規模に投与されており、ワクチン－誘発性疾患の存在が実証されている。更に、弱毒化ワクチンが該ワクチンのレシピエント内で免疫系の応答能が低い状態にあるために、蔓延した感染の発生を生じた場合には、しばしば合併症が観測される。弱毒化ワクチンの開発に係わる更なる制限は、幾つかの病原体については適当な弱毒化菌株を同定することが困難であり、かつ幾つかの病原体に関する変異的浮動の頻度が著しく大きくて、復帰に関連した危険性をそのままでは許容し得ないことにある。後者の点が特に十分に実証されているウイルスはヒト免疫不全ウイルス(HIV)であり、このヒト免疫不全ウイルスについては、適当な動物モデルがないためにおよびその病因的なメカニズムが十分に理解されていないために、弱毒化変異ウイルス菌株の効果的な同定並びにテストは不可能である。このような変異株が同定できたとしても、遺伝的浮動の迅速さおよびレトロウイルス、例えばHIVの再組み換えのために、該ウイルスのあらゆる弱毒化された表現型の不安定性は許容し得ないレベルとなってしまう。これらの複雑性のために、このワクチン接種法が望ましい細胞毒性の細胞性免疫および免疫記憶を効果的に生ずるにも拘らず、幾つかのウイルスに対する生の弱毒化ワクチンの製造は許容し得ないものとなってしまう。

ワクチンの第二のカテゴリーは死菌およびサブユニットワクチンである。これらのワクチンは不活性化した全バクテリアまたはウイルスあるいはその精製した成分からなる。これらのワクチンは病原性ウイルスまたはバクテリアから誘導され、該ウイルスまたはバクテリアは物理的または化学的処理により不活性化されており、該全微生物病原体または精製された該病原体の成分の何れかがワクチンとして処方される。このカテゴリーのワクチンは該不活性化処理により比較的安全に作成できるが、該不活性化の程度と該ワクチン接種された患者に誘発された免疫系の反応の程度との間にある釣合いがある。過度の不活性化は、該生成物に対する後の免疫応答が防禦性でないような、免疫学的決定基の構造の大幅な変化を生ずる可能性がある。このことは、過去における不活性化した麻疹ウイルスワクチンおよび呼吸性シンシチウムウイルス(respiratory syncytil virus; RSウイルス)ワクチンの臨床的評価により最もよく実証され、該ワクチンは感染性のビリオンを中和し得な

いばかりか、感染性ウイルスに暴露された場合に一層悪化させるという強力な抗体応答を生じた。他方、免疫原性を保持するために不活性化処理を最小限に保った場合には、該ワクチン処方物中に感染性物質が混入する高い危険性をもつ。

死菌またはサブユニットワクチンの主な利点は、ワクチン接種された個体内の抗体を中和するかなりの力価を誘発し得ることにある。死菌ワクチンは、該病原体上の多数の抗原サイトに対して応答性を誘発する点で、一般的にサブユニットワクチンよりも免疫原性の高いものである。殺したウイルスワクチンまたはサブユニットワクチンは、通常適当な初回およびブースター応答を達成するのに多数回の接種を必要とするが、長期に及ぶ免疫性を達成し得る。これらのワクチンは毒素－産生バクテリアにより生ずる疾患の予防に特に有効である。この際の防禦形式は毒素中和抗体の著しく高い力価である。この抗体応答はかなり長い期間に渡り持続し、かつ既往応答または二次的応答のために、後の感染の際に迅速に再現し得る。他方、これらのワクチンは、一般的に細胞毒性の細胞性免疫応答を生じ得ず、そのためにウイルス性疾患の予防にとってこれらワクチンは理想的なものとはいえない。細胞毒性リンパ球はウイルス感染の排除にとって主要な媒介体であるから、細胞毒性細胞性免疫性を刺激し得ない全てのワクチン手段は、通常ウイルス疾患に対してあまり好ましい方法ではなく、そのために通常選択される方法は弱毒化ウイルス法である。

組み換えDNA法の開発は、今やワクチンとして使用するためのあらゆるタンパク、微生物またはウイルス病原体、またはその部分の異種生産を可能とした。従って、ワクチンの構成成分は実際の病原性生物自体から誘導する必要はない。理論的には、例えばウイルス表面の糖タンパクを、真核発現系において、適当な免疫原性にとって固有のその配座として形成できる。しかしながら、実際には組み換えウイルスタンパク構成成分は予防性の抗体応答を普遍的に誘発するものではない。更に、死菌ワクチンと同様に、細胞性の細胞毒性免疫応答は、一般的に組み換えサブユニットタンパクによる接種後には見られない。かくして、このワクチン接種法は安全かつ潜在的に免疫原性のウイルスまたはバクテリアタンパクを大量に生産する有効な方法を提供するが、かかるワクチンは血清抗体応答のみを発揮することができ、従ってウイルス疾患に対する予防を保証する最良の選択ではあり得ない。

組み換えDNA技術の利用可能性および免疫学における発展は種々の微生物抗原の抗原決定基の免疫学的に申し分のないマッピングに導く。従って、各々が明確なエピトープまたは決定基に相当する短いペプチドに基く化学的に合成されたワクチンを開発することが今や理論的には可能となる。B-細胞または抗体免疫応答を導く手段となるヘルパーT-細胞決定基の同定法が発展した。ヘルパーT-細胞ペプチドのB-細胞エピトープに相当するペプチドまたは抗体結合サイトに対する共有結合は該B-細胞エピトープの免疫原性を大幅に高めることを可能とする。不幸なことに、ウイルス上の天然抗体結合サイトの多くは配座依存性であるか、または１個以上のペプチド鎖から構成され、従って該完全なウイルス上のエピトープの構造を合成ペプチドと似せることが困難となる。かくして、ペプチドワクチンはウイルス病原体に対する抗体の中和を刺激する最良のビヒクルであるとは考えられない。他方、細胞毒性T-リンパ球により認識される決定基を表すペプチドが、親油性部分とのカップリングを介してクラスＩ主要組織適合性(MHC)抗原を担持する細胞膜を標的とする場合には、該ペプチドはCTLsを誘発できることを立証する幾つかの既に知られた証拠がある。これらの実験的なペプチドワクチンは安全かつ安価であると思われるが、複雑な三次元タンパク構造を模倣する上で幾つかの難点がある。しかしながら、実験動物中に細胞毒性免疫性を首尾よく誘発させ得ることに関連する幾つかの証拠がある。

ワクチンに関連して提案されたもう一つの新規な組み換え技術は、非－病原性ウイルス、例えばワクシニアウイルスまたはアデノウイルス等を発現する生の組み換えワクチンを生成することであり、該ウイルスのゲノムのセグメントは異種病原性ウイルスからのウイルス抗原をコードする遺伝子で置換されている。研究によれば、実験動物をかかる組み換えウイルスで感染することにより、異種タンパクを包含する種々のウイルスタンパクが生産されることが示された。この最終結果は、通常接種後の異種タンパクの生産により生ずる該タンパクに対する細胞毒性の細胞性免疫応答である。しばしば検出可能な抗体応答も同

時に見られる。生の組み換えウイルスは、従ってその作用様式において弱毒化ウイルスと類似し、かつ免疫応答を与えるが、よりビルレントな表現型に復帰する傾向は示さない。他方、この方法は、非－病原性ではあるがワクシニアウイルスおよびアデノウイルスが依然として低頻度で病原性の感染を誘発し得るという欠点をもたない訳ではない。かくして、破滅的に蔓延する感染の可能性のために、免疫性の低下した個体には使用しないように指示すべきであろう。更に、これらワクチンの異種タンパクに対する免疫性を誘発する能力は該キャリヤウイルスに対して元々存在する免疫性により調和され、従って該組み換えウイルスによる感染が予防され、かつ該異種タンパクの生産が阻止される可能性がある。概して、上記のワクチン接種法の全ては、種々の感染性の物質に対するその有用性を制限する固有の利点および欠点をもつ。幾つかの方法は非－複製型の抗原を使用している。これらの方法は中和血清抗体の誘発のために使用でき、かかるワクチンは多数回の接種を必要とし、かつ細胞毒性免疫性を生成しない。ウイルス性の疾患に対しては、弱毒化ウイルスの高い細胞毒性免疫性を誘発する能力および長期に渡る免疫記憶のために、該弱毒化ウイルスが最も有効であると考えられている。しかしながら、全てのウイルス性病原体に対して安全な弱毒化ワクチンを開発することは不可能である。

従って、あらゆる許容し得ない病原性、またはワクチン接種された個体における該ウイルスの変異もしくは組み換えの危険性をもつことなしに、細胞毒性免疫性、免疫記憶並びに循環性抗体の生産を可能とするワクチンを開発することが望ましい。

発明の概要

本発明は、要約すれば動物の細胞内で機能可能なプロモータおよびウイルスにより生産される決定基をコードするタンパクコード領域を含む外来遺伝子構築体のコピーを調製し、該外来遺伝子構築体のコピーを該動物の細胞のサイズと比較して小さなサイズの担体粒子上に被覆し、該被覆担体粒子をインビボで該動物の細胞内に加速注入する(accelerating)各工程を含む遺伝子ワクチン接種法により、該動物に該ウイルスに対する免疫性を付与することに関する。

本発明は、またヒト免疫不全ウイルス(HIV)のウイルスゲノムの全読み取り枠をコードするが長末端反復またはプライマー結合サイトをコードしないDNA配列と、ヒト細胞中で遺伝子ワクチン(genetic vaccine)を生成するのに有効なプロモータとを結合し、次いで該遺伝子ワクチンを粒子媒介トランスフェクション法により個体の細胞内に導入することにより、該ヒト免疫不全ウイルスに対する遺伝子ワクチンを生成することに関連する。

従って、本発明の目的の一つは、ワクチン接種した個体内に遺伝子ワクチンを使用して、ウイルス病原体に対する細胞毒性免疫性を該個体内に誘発させることにある。

本発明の特徴は、該遺伝子ワクチンの皮膚または粘膜への分配もしくは末梢血液細胞内への分配の何れにも等しく採用でき、かくして該処理した個体内に血清並びに粘膜性抗体応答を誘起するのに利用できることにある。

本発明の遺伝子ワクチン接種法の利点は、この方法が遺伝上安全であり、投与の際に苦痛を伴わず、かつ該ワクチン接種した個体に有害な影響を及ぼさないはずであることにある。

本発明の他の目的、利点並びに特徴は以下の本明細書の記載から明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

第１図は、プラスミドpWRG1602の遺伝子および制限サイトを示すプラスミドマップであり、

第２図は本発明の遺伝子ワクチンプラスミドpCHIVpALのプラスミドマップであり、

第３図は以下に記載する実施例の１つにおいて得られた結果の幾つかをグラフで示した図であり、および

第４図はもう一つの以下に記載する実施例において得られた結果をグラフで示した図である。

好ましい態様の説明

本発明は、ウイルス特に免疫不全ウイルスに対する遺伝子ワクチンを生成することを目的とし、この目的は免疫化すべき動物の細胞内で該病原性ウイルス由来の抗原的に正確なタ

ンパクの発現を誘発し得る遺伝子配列により該動物の体細胞をトランスフェクションすることにより達成される。該遺伝子配列はウイルスの複製または発病に必要とされるウイルスゲノムのエレメントを含まない。このような遺伝子ワクチンの動物体細胞への導入は、健康なまたは免疫性－低下個体における病原体感染の危険性なしに、弱毒化または組み換え生ウイルスの作用を模倣するためである。この遺伝子ワクチンの導入は、これら細胞内で該ウイルス粒子に関連した構造タンパク決定基の発現を生じるであろう。この処理された構造タンパクは、該トランスフェクションされた細胞の表面上に正常な細胞の主要組織適合性複合体(MHC)抗原と共に配列されるであろう。該MHC抗原と関連するこれらのウイルス抗原決定基の配列により、該ウイルス決定基に特異的な細胞毒性T-細胞クローンの増殖が誘発される。更に、該発現性のトランスフェクションされた細胞により遊離される該構造タンパクも、抗原表示細胞により取り出されて抗体応答を開始し得る。この免疫応答を誘発し得る該遺伝子ワクチン構築体を、好ましくは加速－粒子による形質転換装置によって該トランスフェクションすべき細胞内に分配する。

幾つかの理由のために、本発明の該遺伝子ワクチン法は、特に免疫不全ウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)および関連する動物ウイルス、サル免疫不全ウイルス(SIV)およびネコ免疫不全ウイルス(FIV)に対する免疫化のために有利に利用される。このHIVウイルスに対しては、このウイルスに固有の変異型への復帰の可能性のために、弱毒化ワクチン法は適さない。これらのウイルスに対するウイルスタンパクサブユニットワクチンも開発されつつあるが、かかるサブユニットワクチンは細胞毒性応答を生じ得ず、HIV感染またはHIV-関連疾患の発病を予防する必要があるかもしれない。ここの記載する如き遺伝子ワクチントランスフェクション法の利用は細胞毒性応答を生ずるであろう。また、このワクチン法はウイルスの侵入に対する抵抗性を授与する上で役立つと考えられる粘膜組織への分配を可能とする。即ち、HIVについては、しばしば粘膜を介して発症すると考えられているからである。

本発明の免疫化工程において求めている細胞性免疫応答を達成するためには、ワクチン接種した個体のトランスフェクションされた細胞が該ウイルスの主要な抗原決定基を発現し得るような遺伝子ワクチン構築体を生成する必要がある。これは、該ウイルスのゲノムによりコードされる種々のタンパクに対するコード領域を同定し、このようなタンパク各々に対する合成コード配列を生成し、かつかかるコード配列の各々を哺乳動物細胞内で該配列を発現することのできるプロモータと結合することにより可能となる。あるいは、該ウイルスゲノム自体を使用することもできる。レトロウイルスに対しては、プロウイルスクローンが長末端反復およびプライマー結合サイト等の、感染過程においてウイルスの複製に必要な配列をそこから除去するように変更されている限り、該ウイルスゲノムのDNA型、即ち該プロウイルスから該コード配列を作成することができる。このようなプロウイルスは、先天的にトランスフェクションされた細胞内で該ウイルス構造タンパクの全てを発現するのに必要なmRNAプロセッシング配列をもつであろう。

ウイルスの遺伝物質を変更して、初めからその発病過程を阻止しなければならない。該ウイルスを変更する方法はウイルス毎に異なるであろう。該免疫不全ウイルスはその遺伝物質をRNAとして担持するレトロウイルスである。その正常な感染過程中、該RNAは逆転写酵素と呼ばれる酵素により処理される。この酵素は該ウイルスのRNA配列をプロウイルスとして公知のDNA形状に転化する。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のプロウイルスは１ダース程の読み取り枠を含み、その全てがその感染過程中に翻訳されてタンパクを生成する。該タンパクの幾つかは構造タンパクであり、他のタンパクは該感染過程における諸段階の調節タンパクである。感染が生じた場合、該プロウイルスにより生成されたタンパクの全てが実際には単一のmRNAプリカーサにより生成され、該プリカーサは分化によりスプライスされて、別々にスプライスされた種々のRNA生成物を形成し、該RNA生成物は該ウイルスにより発現される様々なタンパクに翻訳される。有利には、本発明の免疫化工程で利用する該トランスフェクションされた細胞が出来る限り多くのウイルス構造タンパクを発現することが有用であろう。従って、ワクチン接種した個体内でウイルスの複製工程を開始しないように、該プロウイルスから該複製を防止するのに十分な部分を除去することのみを仮定

して、この遺伝子ワクチンで使用する該遺伝子ワクチンコード配列として、出来るだけ多くのプロウイルスを使用することが望ましい。
HIVまたはSIVウイルスに関するこの目的を達成するための有利な方法は、該感染性ウイルスが長末端反復(LTR)エレメントとして知られ、該天然のプロウイルス配列の末端に位置する該ウイルスゲノムの複製に必要とされる重要な遺伝子エレメントと、該プライマー結合サイトとを有するという事実に基く。該プライマー結合サイトは、tRNAが該ウイルスRNAを認識し、かつこれと結合して該逆転写過程の開始用のプライマーとして機能する該ウイルスRNA上のサイトである。該LTRエレメントおよび該プライマー結合サイト両者は逆転写を生ずるのに必要である。該LTRエレメントおよび該プライマー結合サイトの何れかの除去はウイルスの複製を妨害するであろう。該DNAプロウイルスからの該LTRエレメントおよび該プライマー結合サイト両者の除去は、かくして生成された遺伝子配列がウイルスの複製を生じずもしくは病原性のウイルス粒子をコードしないことを保証する。
かくして、有利な遺伝子ワクチンの生成および出来る限り多くのウイルスタンパクを正確に形成して、自然の感染を有効に模倣することを保証するという２つの理由から、構造並びに調節タンパクに対する完全なウイルスコード領域の使用が本発明にとって好ましい。しかしながら、幾つかの例においては、ウイルスタンパクの全組み合わせを生成することなく、僅かに１種のまたは数種のウイルスタンパクを発現することが望ましく、かつ十分であり得る。これは、標準的な組み換え技術を利用して、望ましい各ウイルスタンパクに対する個々の発現ベクターを組み立てることにより達成できる。
トランスフェクションした細胞内で該ウイルス遺伝子配列を適当に発現するためには、該標的細胞内で機能可能なプロモータ配列が必要である。数種のかかるプロモータが哺乳動物系について知られており、該系は発現すべきタンパクに対するコード配列の5'、または上流に結合していてもよい。下流側の翻訳ターミネータまたはポリアデニル化配列も、該タンパクコード配列の3'に付加することができる。
遺伝子ワクチンとして有効であるためには、免疫化すべき個体の細胞内に該ウイルスタンパクをコードする遺伝子配列を分配する方法が必要となる。免疫不全ウイルス疾患に罹患した哺乳動物の体細胞に遺伝子を分配することを可能とする技術が幾つか知られている。公知の技術は直接的DNA注入、遺伝子配列を体細胞内に分配するためのレトロウイルスベクターの利用、または感染され易い個体の１種以上の細胞型内にカプセル化されたDNAの放出を可能とするリポソームまたは他のカプセル化剤中にカプセル化したDNAの分配等を包含する。しかし、本発明においては該DNAが加速粒子の遺伝子転移デバイスにより該感染性の個体に転移させることが好ましい。該加速－粒子の遺伝子放出技術は、細胞内に放出すべき極めて小さな担体粒子上に遺伝子構築体を被覆することに基くものであり、該担体粒子はこの方法により形質転換しようとする該細胞に比して小さいように設計される。次いで、この被覆された担体粒子が該形質転換すべき細胞、即ち標的細胞内に止まるように、該粒子を該細胞に向けて物理的に加速する。この技術はインビボまたはインビトロの何れにおいても利用できる。幾分かの頻度で、該担体粒子上に予め被覆した該DNAが該標的細胞内で発現される。この遺伝子発現法は原核生物および真核生物両者のバクテリアおよび酵母から高等植物および動物に渡る範囲内で巧く機能することが証明されている。かくして、該加速粒子法は遺伝子を広範囲の組織型の細胞内に分配するための有利な方法を与え、かつ該処理された個体に何等有害な衝撃または作用を及ぼすことなく、その場でおよびインビボで細胞に遺伝子を分配することを可能とする。
加速粒子による遺伝子形質転換技術の遺伝子操作法はサンフォード(Sanford)の米国特許第4,945,050号に記載されている。この方法の改良法に基く装置は、バイオラドラボラトリーズ(Biorad Laboratories)社から市販品として入手できる。加速粒子による形質転換装置に係わるもう一つの方法は米国特許第5,015,580号に開示されており、該方法は大豆株の形質転換に関連するが、これは哺乳動物細胞および完全な全哺乳動物に対して使用する際にも同様に適している装置を開示している。
裸のDNAを含有する水性液滴(内部に該ウイルスの遺伝的ワクチンを含む)を適当な加速技術により免疫化しようとする個体の組織内に放出し得ることも特別に意図されている。幾

分かの頻度で、このような「裸の(naked)」DNAが該処理された組織内に取り込まれるであろう。
ここで使用する用語「トランスフェクションされた(transfected)」とは、何れの放出技術を使用しようとも、該分配された外来遺伝子ワクチン構築体を組み込んだ細胞を意味するものとする。発癌過程における細胞性の変化を言及する際にも使用される「形質転換」なる用語に固有の曖昧性を回避するために、この「形質転換」なる用語よりもむしろ該「トランスフェクション」なる用語を使用する。
該加速粒子注入デバイスまたは直接的DNA注入の何れを使用しても、遺伝子ワクチンを、非－侵入的様式で、種々の感染性組織型に分配して、該個体内に所定の抗原的応答を達成することができる。最も有利には、該遺伝子ワクチンは表皮に導入できる。見出されたこのような分配法は、全身的な体液性免疫応答を形成し、かつ同様に細胞毒性応答をも刺激するであろう。この技術にから付随的な有効性を得るために、該遺伝子を粘膜組織表面に分配して、粘膜性並びに全身的抗原性応答の該免疫化した個体内での発現を保証することも可能である。表皮、末梢血液細胞、即ちリンパ球(これらはインビトロで処理し、該個体に戻すことができる)、並びに種々の口内、上部呼吸器および生殖器粘膜表面上の任意の数のサイトを含む利用可能な種々の適当な放出サイトが存在すると考えられている。
加速粒子トランスフェクション法により細胞内にトランスフェクションされるべき免疫不全ウイルスワクチン発現ベクターの妥当性はインビトロで哺乳動物細胞内でのウイルス性抗原産生をアッセイすることにより評価できる。培地中に維持できる型の細胞、例えばサルのCOS細胞の感染性の哺乳動物細胞は多数の細胞トランスフェクション技術、例えば燐酸カルシウム媒介トランスフェクション並びに加速粒子によるトランスフェクション等のいずれかにより、インビトロでトランスフェクションすることが可能である。一旦該遺伝子ワクチン発現ベクターを該感染性の細胞中に導入したら、該ウイルス抗原の発現をかかる細胞の培養物の中位の上澄につき、ELISA法、ウエスタンブロット法、または逆転写酵素アッセイ等を包含する種々の技術により監視することができる。
与えられた発現ベクターがインビトロで培養された細胞内に適当なウイルスタンパク産生を誘発するかを確認した後、かかるベクターがマウス等の小動物モデル内で同様にタンパク産生を誘発する機能をもつことを証明することができる。かかる遺伝子ワクチンに応答する、マウス中の抗体および細胞毒性の細胞性免疫応答の測定はこの概念の重要な証拠であり、また適当な動物刺激モデルでのより厳密なテストの開始を正当化するであろう。
一旦、該遺伝子ワクチンが小実験動物内でウイルスタンパク産生および免疫応答を誘発し得ることを立証した後には、ヒト免疫不全症に対する動物モデルにおける有意の免疫応答を達成するのに適した投与量およびタイミングを決定することが必要となる。これはSIVおよびRhマカック属のサルモデル(rhesus macaque model)を利用して最も効果的に行うことができる。動物には、その種々の組織サイトにおいて、加速粒子トランスフェクション法により数種のドーズで該発現構築体を与えた。これらの処理された組織サイトは表皮、真皮(該表皮を介して)、口腔および上部呼吸器粘膜並びに末梢血液細胞を包含するが、これらに制限されない。種々の誘発技術を利用でき、遺伝子ワクチンの投与回数およびそのタイミングを系統的に変化させて、任意の得られる免疫原性応答を最適化し、かつ何れの投与量が最大の応答を与えるかを決定する。処理した個体内の抗体応答は特異的なウイルス抗原に対する抗体を認識する任意の公知技術により、例えば標準的ウエスタンブロット法およびELISA法を利用して検出できる。免疫生物学における当業者には公知の標準的方法を利用して、細胞媒介性細胞毒性応答を検出することも可能である。具体的には、脾臓または末梢血液中における細胞毒性T-細胞の存在は、溶菌活性の存在により示され、該溶菌活性の存在は組織適合性標的細胞を識別し、該標的細胞はそれ自体該免疫不全ウイルス由来のウイルス抗原を発現している。
ヒト免疫不全疾患用の遺伝子ワクチンの放出に最適の組織サイトおよび投与回数並びに投与のタイミングは動物モデルにおいておよび後の臨床的研究において経験的に決定する必要があるが、かかるワクチンを実際のヒトの健康整復において使用できる正確な方法をこの時点で予測することは困難である。このようなワクチンは生の弱毒化ワクチンまたは組

み換えウイルスワクチンの作用を、発病の危険性なしに模倣することにあるので、かかるワクチンがナイーブ(naive)な個体に防禦免疫性を誘発する際に有用であるばかりか、HIV-感染した、免疫性の低下した個体において使用して、該疾患の進行を阻止または防止するようにその免疫状態を人工的に刺激する目的にとっても有用であると考えられる。単一のワクチン投与法の何れも、健康な個体内に防禦性を確立し、もしくは感染した患者の疾患の進行を阻止するのに必要とされる種々の免疫応答を誘発することができないと考えることも重要である。寧ろ、種々の方法の組み合わせがこれらの最終目的を達成する際の真の協働作用を明らかにする可能性がある。かくして、真の感染を模倣した遺伝子ワクチンおよび死菌またはサブユニットワクチンとを組み込んだ組み合わせワクチン療法が、効果的に細胞毒性免疫性および免疫記憶並びに高濃度での防禦性抗体産生を達成するための魅力ある方法であると考えられる。遺伝子ワクチンは生ワクチンの使用に代わる安全な代替法として機能し、かつ種々の免疫化プロトコールおよび所定の結果を達成するために他のワクチンとの組み合わせで使用できる。

実施例

1. ベクターの構築

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)およびサル免疫不全ウイルス(SIV)の遺伝子配列は完全に決定され、公表されており、一般的に入手可能である。例えば、LAV-1/BRUと命名された該HIV株のDNA配列は承認番号K02013の下でゲンバンク(GenBank)に寄託されており、以下に言及するそのヌクレオチド位置はその配列からとったものである。HIVおよびSIV両者の試料はヘルスリサーチファシリティーズ(health research facilities)の適当な寄託機関を通して資格のある研究者にとって容易に入手できる。

このHIV遺伝子ワクチン発現ベクターを、HIV株LAV-1/BRUのプロウイルスゲノム由来の8266塩基対フラグメントを含むように構築した。このフラグメントはヌクレオチド位置678のSac Ⅰサイトから開始し、かつヌクレオチドNO. 8944のXho Ⅰサイトで終止するHIV DNAプロウイルス配列部分であった(ここで使用するヌクレオチドの番号付けに関する約束では、ヌクレオチドNo.1が5' LTRのU3領域の第一ヌクレオチドに対応するものと仮定している)。HIVゲノムのここに示したフラグメントは、nefタンパクのカルボキシ末端をコードする部分を除く該ウイルスの読み取り枠の全てを含む。このフラグメントが一旦転写されると、該HIVウイルスにより開始される発病過程中に感染細胞内で作用するRNAスプライシング経路を実行するのに必要とされるスプライシングドナーおよびアクセプタの全てを含有するmRNAを生ずる。

このコード配列フラグメントは哺乳動物細胞内で発現可能なプロモータと結合して、感染性の細胞内で該ウイルス抗原タンパクを発現するものでなければならない。一旦プロモータと結合すると、このコード配列フラグメントは該ウイルスからの主読み取り枠(gag、polおよびenvを含む)を発現し、元のリボソーム枠転位(ribosomal frame shifting)およびmRNAプロセッシング経路を、該ウイルス自体が利用しているのと同様な様式で利用する。しかしながら、このフラグメントはウイルスゲノムの複製に必要な幾つかのウイルス遺伝子エレメント(具体的には、長末端反復(LTR)エレメントおよびプライマー結合サイトを含む)を含むべきではない。従って、このフラグメントは逆転写不能であり、かくしてあらゆる潜在的な発病過程のこの遺伝子配列による発生を阻害する。

該HIV抗原をコードする該コード配列と哺乳動物内で発現可能なプロモータとを結合するために、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)の即時型プロモータを使用した。発現カセットを構築し、これをpWRG1602と命名した。これは第１図のプラスミドマップに示されている。このプラスミドpWRG1602は660塩基対のEco R1およびBam H1制限フラグメントを生じ、これは該HCMV即時型プロモータを含む619塩基対領域の末端に付加された数個の合成制限サイトを含む。

使用した転写終止セグメントはSV40ウイルス由来のポリアデニル化配列であった。このSV40ウイルス由来のポリアデニル化配列は、前にベテスダリサーチラブズ(Bethesda Research Labs;カタログ番号5369SS)から市販品として入手したプラスミドpsv2dhfr由来の約800塩基対のフラグメント(Bgl IIおよびBam HI消化により得た)である。同一のポリアデニル

化フラグメントはサブラマニ(Subramani)等, Mol. Cell Biol., 1981, 1, pp. 854-864にも記載されている。このフラグメントは、また該Bgl II末端近傍に小さなSV40介在配列を含み、該SV40ポリアデニル化領域は該フラグメントのBam HI末端に向かって配置されている。

pCHIVpALと命名したHIV遺伝子ワクチン発現プラスミドを以下のように構築した。該psv2dhfr由来の800塩基対のSV40フラグメントをクレノウのDNAポリメラーゼで処理して、その張出し末端(overhanging termini)を「閉じた(fill in)」。これと平行して、一定量のブルースクリプト(Bluescript)M13+SK DNA(承認番号X52325、位置668にXho Ⅰサイトをもつ)をXho Ⅰで開裂し、かつ同様にクレノウのDNAポリメラーゼで処理した。２個のフラグメントを連結してpBSpALと命名されたプラスミドを得た。該ブルースクリプトベクター中の該SV40フラグメントの配向は、該Bam HI末端またはポリアデニル化サイトを含む該末端が該プラスミドに含まれるポリリンカー本体を向くようなものであった。

次いで、種々の量の該プラスミドpBSpALを制限酵素Sac ⅠおよびSal Ⅰで消化して、Xho ⅠおよびSac Ⅰ消化により生成したフラグメントに連結するのに適した末端をもつプラスミドを形成した。このプラスミドに、該HIVプロウイルス由来の8266塩基対のフラグメントを連結して、pHIVpALと命名されたプラスミドを得た。このプラスミドは該SV40のポリアデニル化シグナルに続くHIV抗原決定基コード領域を含む。

次いで、このプラスミドpHIVpALを制限酵素Sac Ⅰで開裂し、その3'張出し末端をクレノウのDNAポリメラーゼを使用して除去した。かくして形成された開裂部に、該HCMVプロモータ(その末端はクレノウのDNAポリメラーゼで占められている)を含む該660塩基対フラグメントを挿入した。

得られたプラスミドは第２図に示され、5'末端から3'末端に向かって配向した該HCMV即時型プロモータ、HIVウイルス上の重要な全ての読み取り枠をコードする該HIVゲノムからの8266塩基対のフラグメント、および該SV40ポリアデニル化フラグメントを含む。この構築体を本発明の方法で用いる遺伝子ワクチン構築体として使用した。該SIV発現ベクターを該HIV発現ベクターと同様な方法で構築した。但し、該HIV遺伝子配列の代わりに、ヌクレオチド位置823におけるNar Ⅰサイトから開始し、ヌクレオチド位置9226におけるSac Ⅰサイトで終止するSIVmac239(承認番号M33262としてゲンバンクに寄託されている)のプロウイルスゲノムからの8404塩基対フラグメント(ヌクレオチドの番号付けに係わる約束は該HIVの場合と同様である)を使用した。このSIVゲノム発現フラグメントを上記のプラスミドpCHIVpALのHIVゲノムフラグメントに変えることができる。

2. 培養中の細胞への遺伝子ワクチンの組み込み

哺乳動物細胞内で適当な抗原タンパクを発現する該遺伝子構築体の能力を確認するために、インビトロでのテストを実施した。

種々の量のプラスミドpCHIVpALをインビトロで再生した。次に、このプラスミドのDNAのコピーを、培養中の細胞内にトランスフェクションする前に、金担体粒子上に被覆した。この被覆は10mgの沈殿させた金粉末(平均径1.5μ)と、50μｌの0.1Mスペルミジンおよび該プラスミドpCHIVpALのDNA 25μgとを混合することにより実施した。この混合物を室温にて10分間インキュベートした。次に、連続的に攪拌しつつ50μｌの2.5M$CaCl_2$を該混合物に添加し、その後該試料を更に３分間室温にてインキュベートして、該金粒子上に該DNAを堆積させた。この混合物をマイクロ遠心機で30秒間遠心処理して、該DNAを担持した該担体粒子を濃縮し、その後該担体粒子をエタノールで穏やかに洗浄し、ガラス栓を備えたバイアル中のエタノール10ml中に再懸濁した。このエタノール中の該担体粒子の再懸濁液を超音波印加した水浴に数秒間浸漬することにより十分に分散させた。

次いで、このDNA-被覆担体粒子を35mm平方のマイラーシート上に各マイラーシート当たりDNA-被覆金担体粒子170μｌの割合で層状(各側に1.7cm)に展開した。これは該担体粒子のエタノール懸濁液を該担体シート上に適用し、次いで該エタノールを蒸発させることにより実施した。次に、各マイラーシート上の該DNA-被覆金担体粒子を、米国特許第5,015,580号に記載された型の加速粒子形質転換装置内に配置した。この装置は該担体DNAによりトランスフェクションすべき標的細胞に向けて該担体粒子を加速するために調節可能な火花

放電を使用する。
一方で、サルのCOS-7細胞の培養物を3.5cmの培養皿内で調製した。このCOS細胞から培地を一時的に除去し、該培養皿を転倒させて、この加速粒子トランスフェクション法用の標的表面として使用した。8kVの火花放電を、上記米国特許第5,015,580号により詳細に記載されている方法で使用した。該細胞中に該粒子を注入した後、２mlの新たな培地を該培養皿に添加し、該細胞が継続的に生存し易いようにした。
この加速粒子導入の24時間後に、35個の該細胞の培養皿から培地を収穫し、濃縮して高分子量HIV抗原の存在についてテストした。該培地を高速遠心機で濃縮した。その濃縮されなかった培地0.5mlを、市販のELISAキットを使用して後に実施するHIVp24含量の測定のために取っておいた。新鮮な育成培地を該プレートに添加して、HIV抗原産生の連続的な監視を行った。この収穫した培地を先ず標準的な研究室用の遠心機内で1500RPMにて遠心処理し、次いで0.45μの膜を通して濾過することにより、該培地中の細胞デブリスを除去した。この清浄化された濾液を、６個の超遠心管(ベックマン(Beckman)SW41ローター)の各々中の、20%のグリセリン、100mMのKCl、50mMのトリス(Tris)-HCl(pH 7.8)を含む1mlの緩衝層上に穏やかに層状に展開した。これら試料を４℃にて、70分間35,000RPMで遠心処理した。この遠心処理後、該培地を捨て、生成したペレットを全体で20μｌの0.15MのNaCl、50mMのトリス(Tris)-HCl(pH 7.8)および1mMのEDTAを含む溶液中に再懸濁した。
この濃縮した試料を、予備－注型した12% SDS-ポリアクリルアミドゲル(バイオラド(Bio-Rad))による電気泳動処理に付した。このゲルをブッフラー(Buchler)半－乾燥ブロッター(モデルNo. 433-2900)を使用して、製造業者等の指示に従ってニトロセルロースシート上でエレクトロブロッティング処理した。次に、該ニトロセルロースシート上に固定化された該HIVウイルス抗原を検出するアッセイを実施した。該HIV抗原p24およびgp120をバイオ－ラド社のイムノブロットアッセイキット(カタログNo. 170-6451)を使用して検出した。このイムノブロットアッセイキットを使用するためには、検出されると考えられる抗原に特異的な抗体が必要である。該HIV特異的アッセイに対して、市販品として入手可能な以下のモノクローナル抗体を使用した。gp120に対しては、アメリカンバイオ－テクノロジーズ(American Bio-Technologies)社から入手したモノクローナル抗体No. 1001およびデュポン(DuPont)社から入手したモノクローナル抗体NEA 9305を使用した。該抗原p24に対しては、アメリカンバイオ－テクノロジーズ(American Bio-Technologies)社から入手したモノクローナル抗体No. 4001およびデュポン(DuPont)社から入手したモノクローナル抗体NEA 9283を使用した。このイムノブロットアッセイは製造業者等の指示に従って実施したが、ゼラチンを必要とする全ての溶液におけるゼラチンの代わりにカーネーション(Carnation)脱脂乾燥乳を使用した。現像したイムノブロットアッセイは、該処理したCOS細胞由来の試料中で生産された該p24およびgp120両者に対応するバンドを示した。負のコントロールはかかるバンドを全く示さず、かつ抗原タンパク自体からなる正のコントロールは該処理した細胞由来の試料から得たものと同様なバンドを形成した。このことは該COS細胞中のプラスミドpCHIVpALの活性および発現を実証しており、また該抗原の分子量型が該ウイルスに対して正常な宿主中で形成されたものと類似することを実証した。未処理COS細胞由来の平行して調製操作された試料は反応性の証拠を何等示さなかった。該COS細胞由来の該gp120バンドと該正のコントロール中の該gp120バンドとの間には移動度における僅かな差異があり、これはグリコシル化における差異によるものと考えられている。
サルのCOS細胞内でのHIV決定基の産生を更に立証するために、処理した細胞からの成育培地をコールター(Coulter)HIVp24抗原アッセイキット(カタログNo.6603698)を使用して分析した。遺伝子注入後の第一の24時間単位の３つの期間中に採取した成育培地の試料をp24抗原含量につきアッセイしたところ、それぞれ１ml当たり42、30および12ngの該p24抗原を含んでいることを示した。これらの値は各24時間の期間内に該培地中に遊離されたp24抗原の量を反映している。というのは、該細胞に対する該成育培地は処理後毎日完全に交換されたからである。平行して検討された未処理COS細胞から採取した試料は反応性を示さなかった。
3. 健全なマウスの皮膚におけるウイルス抗原の検出

次いで、加速粒子トランスフェクションプロトコールを利用して、該プラスミドpCHIVpALを健全なマウス本体の皮膚に注入した。加速粒子が遺伝子を健全な動物の表皮または皮膚層に注入するのに利用でき、また該遺伝子が一旦注入されると発現可能であることは既に立証されている。該プラスミドpCHIVpALのコピーを前記の例に記載の如くして金担体粒子上に被覆した。但し、該プラスミド５mgを金担体粒子１mgにつき使用し、かつ該処方物をエタノール１ml当たり５mgの担体粒子なる濃度でエタノールに懸濁させた。この懸濁液163μｌを２つの担体シート各々の上に載せ、健全なマウスへの粒子加速プロトコールで使用した。更に２種の金担体粒子の懸濁液をコントロールとして調製した。第一のコントロール処方物ではヒト成長ホルモン遺伝子を含むプラスミドを使用し、また第二のコントロールは金担体粒子上に何等DNAを担持させずに調製した。６匹のBalb/Cマウスを10:2のケタミン／ロンピン(Ketamine/Rompin)混合物50μｌで麻酔し、該マウスの腹部の体毛をハサミで除去した。毛嚢を脱毛クリーム(ナイール(Nair))で除去した。この麻酔したマウスを、スペーサとしてのプラスチックペトリ皿を使用し、公開されたPCT出願No. WO 91/19781に記載された方法を利用して、粒子放出チャンバー上に維持したスクリーンの上方15mmの位置に懸垂させた。該ペトリ皿の底部に正方形の孔を形成して、該加速担体粒子を該麻酔したマウスの腹部皮膚層に侵入させた。６匹のマウスを各２匹からなる３群に分けた。この３群の各マウスは１回の担体粒子による「衝撃(blast)」を受けた。該担体粒子は25kVでの放電を使用して加速された。これら３群の各々のマウスは、それぞれ該pCHIVpAL、成長ホルモンプラスミド、またはDNAを含まない金担体粒子を発現する処理に付された。この処理の３日後に、該標的皮膚領域を該処理マウス並びに粒子－媒介トランスフェクションプロトコールに付されていない２種のコントロールマウス群から切除した。これらの組織試料を解剖用の鉗子で、0.5%のトライトン(Triton)X-100を含む燐酸緩衝塩水600μｌ中で細かく裁断した。次いで、この組織懸濁液を５分間5,000RPMにて遠心処理し、生成する上澄を集めた。この上澄試料を10倍に希釈し、コールターHIV p24抗原ELISAキット(カタログNo.6603698)を使用して、製造業者等の指示に従って、HIV p24抗原の含有率について分析した。第３図に、このプロトコールの結果を示した。該pCHIVpALで処理したマウスから採取した組織試料は、コントロール試料の3－倍を越える反応性を示した。このことは、該処理組織が、該遺伝子注入プロトコールの結果としてHIV p24抗原を合成したことを示す。バックグラウンドを差し引いた後、反応性のこのレベルは、該ELISAキットの正のコントロール試薬について得られた標準カーブと比較して、該細かく裁断した組織からHIV p24抗原0.6ngが遊離されたことと一致する。

4. ワクチン接種したマウス内でのHIV p24特異的血清抗体の検出

マウスの表皮細胞への遺伝子注入の結果として発現される、該マウスの外来タンパクに対する系統的な免疫応答を発揮する能力をテストするために、以下の実験を実施した。プラスミドpCHIVpALのコピーを作成し、上記実施例１および２に記載の如く金担体粒子に被覆した。但し、該金担体粒子１mg当たり10μgのプラスミドDNAを使用した。コントロールとして、ヒト成長ホルモン遺伝子を含む異種プラスミドをも、インビボでの遺伝子注入用のプラスミド－被覆金担体粒子を調製するのに使用した。この例については、ヒト成長ホルモンプラスミドのサイズが小さいために金担体粒子１mg当たり5.0μgのDNAを使用して、インビボで該細胞に注入される該プラスミドのコピー数をほぼ同一とした。

10匹の雄Balb/Cマウス(5～7週令)をそれぞれ４匹、３匹および３匹からなる３つの群に分けた。初回免疫化処理の第一工程は群１の４匹のマウスに対して実施し、ここで各動物は該成長ホルモンプラスミドのみで被覆された加速粒子による単一の処理に付された。この加速は上記実施例３に記載の方法によって、25kVにて実施した。群２のマウスの各々は該プラスミドpCHIVpALで被覆した金担体粒子により単一の処理に付された。群３のマウス各々はpCHIVpALで被覆した加速粒子による３回の処理をその腹部に受けた。群３の場合において、該粒子衝撃領域は相互に重複しないように配置した。該群３匹の全てに対する粒子衝撃手順は免疫応答を誘発するために４～７週後に繰り返した。該最終の処理の８～10日経過後に、各マウスから眼窩後部血液試料を採取し、マイクロテイナー(microtainer)チューブ内で４℃にて凝固させた。5000RPMにて遠心処理した後、その血清を集めた。

次いで、酵素イムノアッセイにより該マウス血清中のHIV p24-特異的抗体を検出するアッセイを実施した。このアッセイは0.4μｇのHIV p24抗原(アメリカンバイオーテクノロジーズ社(Americal Bio-Technologies, Inc.))を、50μｌのドゥルベコズ燐酸緩衝塩水(D-PBS)中で、４℃にて一夜インキュベートすることにより、96ウエルをもつマイクロタイタープレートの各ウエルに吸着させることによって実施した。該抗原の吸着後、残留するタンパク結合サイトを2%カーネーション(Carnation)脱脂乾燥乳含有D-PBS(ウエル当たり200μｌ)を添加し、２時間維持することにより隠蔽した。次いで、該ウエルを３回300μｌの0.025%のツイーン(Tween)-20を含むD-PBSで洗浄した。各々５μｌの該血清試料をD-PBS(45μｌ)で1:10に希釈し、単一のウエルに添加し、次いで室温にて１時間インキュベートした。上記の如くツイーン(Tween)-20含有D-PBSで洗浄した後、結合したマウス抗体の存在を、ツイーン(Tween)-20含有D-PBS(ウエル当たり50μｌ)で1:1500に希釈した山羊－抗－マウスアルカリホスファターゼ複合第二抗体(バイオ－ラド(Bio-Rad；カタログNo. 172-1015)を使用して検出した。室温にて30分間インキュベートした後、該ウエルを再度洗浄し、該複合抗体をバイオ－ラドアルカリホスファターゼ基質キット(Bio-Rad；カタログNo. 172-1063)を使用して、その製造業者の指示に従って検出した。このELISAプレートを405nmフィルタを使用してマイクロプレートリーダー上で解析した。

このアッセイの結果を第４図に示した。該pCHIVpAL被覆金粒子の衝撃を１回受けた群のマウスの１匹および同一の粒子の衝撃を３回受けた群の２匹のマウスは有意のp24-特異的抗体応答(バックグラウンドの５～10倍)を示した。該コントロール動物から採取した血清全ては典型的なバックグラウンドELISA反応性を示した。この実験は、インビボでの健全な動物の表皮細胞内への、抗原－コード性遺伝子を被覆した担体粒子の注入に伴って、抗原－特異的抗体応答が誘発される可能性を立証している。

かくして、大量の該ウイルスの抗原性タンパクまたは該ウイルス自体を該患者に注入するのではなく、寧ろ該治療すべき患者に、ワクチン接種された個体中の細胞内で該抗原性タンパクを発現する遺伝子配列を注入することにより、インビボで循環レベルの免疫不全ウイルス抗原に対する抗体が生成し得る。従って、本発明の方法はワクチン接種された個体中に血清抗体応答を誘発することができ、その際に生ウイルスの任意の部分または個体内で該ウイルスを複製し得る遺伝物質の任意の部分を該個体に導入する必要はない。

【図１】

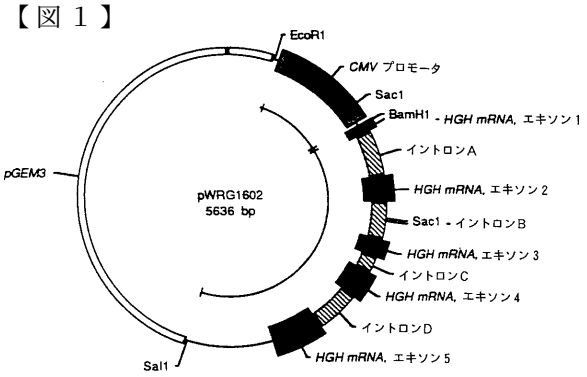

Fig. 1

【図２】

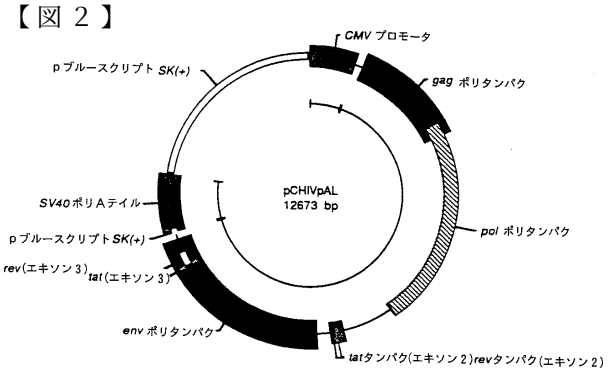

Fig. 2

【図３】

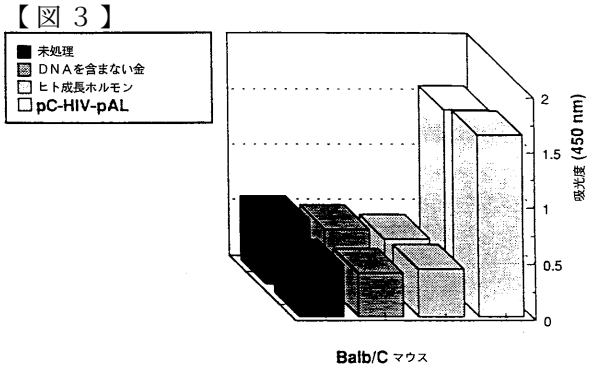

Fig. 3

【図４】

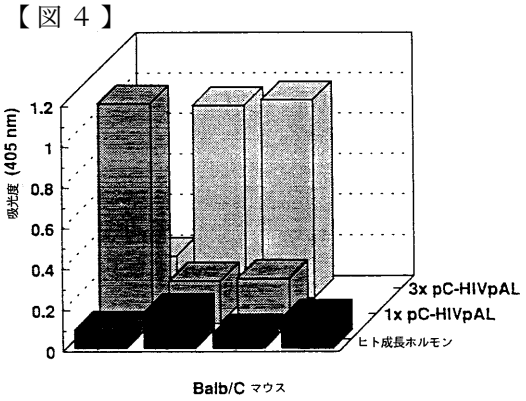

Fig. 4

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第９１／００７４８７（WO，Ａ１）
国際公開第９１／０００３５９（WO，Ａ１）
Haynes JR et al., Mol Immunol, １９９１年 3月, 28(3), 231-4
Foecking MK et al., Gene, １９８６年, 45(1), 101-5

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 39/00
MEDLINE