

(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2006-514549

(P2006-514549A)

(43) 公表日 平成18年5月11日(2006.5.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 7
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-563586 (P2004-563586)
 (86) (22) 出願日 平成15年12月15日 (2003.12.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年8月16日 (2005.8.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/039967
 (87) 国際公開番号 W02004/058278
 (87) 国際公開日 平成16年7月15日 (2004.7.15)
 (31) 優先権主張番号 60/433, 703
 (32) 優先日 平成14年12月16日 (2002.12.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505228442
 アメリカ合衆国
 THE GOVERNMENT OF T
 HE UNITED STATES OF
 AMERICA, AS REPRES
 ENTED BY THE SECRE
 TARY, DEPARTMENT OF
 HEALTH AND HUMAN SE
 RVICES
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208
 52、ロックヴィル、スイート 325、
 エグゼクティブ ブルバード 6011
 、オフィス オブ テクノロジー トラン
 スファー、ナショナル キャンサー イン
 スティテュート

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-15を発現する組換えワクチンウイルスおよびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、ワクチンの免疫原性を高めることが可能な組成物に関する。組成物またはアジュバントは、それを必要とする動物にワクチン抗原と連続的にまたは同時に組み合わせて投与する。1つの好ましい側面においては、アジュバントは、IL-15をコードする核酸配列を含む、ワクシニアウイルスベクターなどの組換えポックスウイルスベクターの形態で提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IL - 15 をコードする核酸配列を含む、組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 2】

発現制御配列に作動可能に連結した少なくとも 1 つの抗原をコードする核酸配列を含む発現ユニットをさらに含む、請求項 1 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの抗原が、ウイルスペプチドまたはポリペプチドを含む、請求項 2 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。 10

【請求項 4】

ウイルスペプチドまたはポリペプチドが HIV または SIV ウイルスゲノムによって発現される、請求項 3 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 5】

ウイルスペプチドまたはポリペプチドが狂犬病ウイルスゲノムによって発現される、請求項 3 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 6】

ウイルスペプチドまたはポリペプチドがワクシニアウイルスゲノムによって発現され、かつ天然痘に対する保護免疫応答を惹起する、請求項 3 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。 20

【請求項 7】

少なくとも 1 つの抗原が癌特異抗原を含む、請求項 2 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 8】

癌特異抗原が Her - 2 / neu ポリペプチドからのものである、請求項 7 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 9】

少なくとも 1 つの抗原が細菌抗原である、請求項 2 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。 30

【請求項 10】

少なくとも 1 つの細菌抗原が、*Borrelia burgdorferi*、*Bartonella henselae*、*Yersinia pestis*、および *Bacillus anthracis* からなる群から選択される、請求項 9 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 11】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも 2 つの抗原が、2 つの異なるポリペプチドからのものである、請求項 2 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 12】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも 2 つの抗原が、2 つの異なる HIV ポリペプチドからのものである、請求項 2 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。 40

【請求項 13】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも 2 つの抗原が、HIV の 2 つの株からのものである、請求項 2 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 14】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも 2 つの抗原が、HIV の 2 つの異なる分離株からのものである、請求項 2 に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。 50

【請求項 15】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも2つの抗原が、HIVの2つの異なるクレードからのものである、請求項2に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 16】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも2つの抗原が、HIVポリペプチドの異なるサブ配列からのものである、請求項2に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 17】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも2つの抗原が、HIVポリペプチドの同じサブ配列に由来するが、ここで各サブ配列が、少なくとも1つのアミノ酸によって異なる、請求項2に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

10

【請求項 18】

サブ配列が、HIVポリペプチドにおける高度に易変異性の領域からのものである、請求項17に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 19】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも1つの抗原がHIVポリペプチドからのものであり、かつ、少なくとも1つの抗原がHIV陽性患者における日和見感染に関連する感染性生物からのものである、請求項2に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

20

【請求項 20】

発現ユニットが複数の抗原をコードする配列を含み、少なくとも1つの抗原はCTL認識エピトープを含み、少なくとも1つの抗原はTヘルパー細胞認識エピトープを含み、少なくとも1つの抗原はB細胞認識エピトープを含む、請求項2に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 21】

CTL認識エピトープを含む少なくとも1つの抗原、Tヘルパー細胞認識エピトープを含む少なくとも1つの抗原、およびB細胞認識エピトープを含む少なくとも1つの抗原が、同じHIVポリペプチドからのものである、請求項20に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

30

【請求項 22】

ワクチンウイルスがボックスウイルスである、請求項1に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 23】

ボックスウイルスが、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスである、請求項22に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 24】

鶏痘ウイルスがカナリアボックスウイルスである、請求項23に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

40

【請求項 25】

1または2以上の不活性化された病原性関連配列を含む、請求項1に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 26】

制限された宿主域を含む、請求項1に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 27】

ワクチンベクターがヒトにおいて複製しない、請求項1に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項 28】

50

ワクチンウイルスベクターが、1または2以上のカプシドポリペプチドを含む、請求項1に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項29】

1または2以上のカプシドポリペプチドが標的化分子に結合している、請求項28に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項30】

IL-15をコードする配列が、それに作動可能に連結された発現制御配列を含む、請求項1に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項31】

IL-15をコードする配列が、それに作動可能に連結された発現制御配列を含む、請求項2に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

10

【請求項32】

IL-15をコードする配列と抗原をコードする配列とが、同じ時間的な発現パターンを有する発現制御配列に制御可能に連結している、請求項31に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項33】

IL-15をコードする配列と抗原をコードする配列とが、異なる時間的な発現パターンを有する発現制御配列に制御可能に連結している、請求項31に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項34】

抗原をコードする配列が、IL-15をコードする配列の前に発現される、請求項33に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

20

【請求項35】

抗原をコードする配列が、IL-15をコードする配列の後に発現される、請求項33に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクター。

【請求項36】

請求項1に記載の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクターと、少なくとも1つの抗原をコードする核酸とを含む、ワクチン組成物。

【請求項37】

請求項19に記載のベクターを含む組成物であって、少なくとも1つの抗原をコードする核酸が、第2の組換え弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクターにより発現される、前記組成物。

30

【請求項38】

医薬的な担体をさらに含む、請求項36に記載の組成物。

【請求項39】

請求項2～35のいずれかに記載の弱毒化または非病原性ワクチンウイルスベクターを、免疫応答を刺激するのに有効な量で動物に投与することを含む、動物に免疫応答を惹起するための方法。

【請求項40】

請求項36～38のいずれかに記載のワクチン組成物を、免疫応答を刺激するのに有効な量で動物に投与することを含む、動物に免疫応答を惹起するための方法。

40

【請求項41】

免疫応答が、少なくとも1つの抗原に特異的なメモリーCD8⁺T細胞の産生、少なくとも1つの抗原に特異的なメモリーCD4⁺T細胞の産生、および少なくとも1つの抗原に特異的な抗体の産生の1または2以上を含む、請求項39または40に記載の方法。

【請求項42】

抗体の少なくともいくつかは中和抗体である、請求項39または40に記載の方法。

【請求項43】

動物がヒトである、請求項39または40に記載の方法。

【請求項44】

50

動物が家畜である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 45】

動物がイヌまたはネコである、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 46】

動物が非ヒト霊長類である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 47】

抗原をコードする核酸と I L - 15 をコードする核酸とを、所定時間間隔後に再投与することをさらに含み、ここで、該間隔が最初の投与の少なくとも約 6 ヶ月後である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 48】

抗原を所定時間間隔後に再投与することを含み、ここで、該間隔が最初の投与の少なくとも約 8 ヶ月後である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 49】

抗原を所定時間間隔後に再投与することを含み、ここで、該間隔が最初の投与の少なくとも約 10 ヶ月後である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 50】

抗原を所定時間間隔後に再投与することを含み、ここで、該間隔が最初の投与の少なくとも約 12 ヶ月後である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 51】

抗原を所定時間間隔後に再投与することを含み、ここで、該間隔が最初の投与の少なくとも約 14 ヶ月後である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 52】

少なくとも 1 つの抗原がウイルス抗原である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 53】

ウイルス抗原が H I V ウイルスからのものである、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

ヒトが、H I V 感染のリスクが高い個体である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 55】

ヒトが、最初の投与の際に H I V 陽性ではない個体である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 56】

ヒトが、最初の投与の際に H I V 陽性の個体である、請求項 43 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2002年12月16日に提出された米国仮出願シリアル番号60/433,703に対し優先権を主張するものであり、その全体を参照により本明細書中に組み込む。

【0002】

本発明は、インターロイキン15 (I L - 15) を発現することができる組換えワクチンベクター、および、かかるウイルスを用いて免疫応答を調節する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

20年にわたる A I D S の流行により、世界中のおよそ4千万人の人々がヒト免疫不全ウイルス (H I V) に感染していると推定される。A I D S は、2200万人を超える命を奪った。2001年だけで、300万人の死者が出た。過去20年にわたって得られた H I V の分子生物学的、病因論的、および疫学的知見にもかかわらず、有効な H I V ワクチンの開発は、依然として前例のない試みであり続けている。ヒトの他の病原に対する有効なワクチンの開発において過去に成功裏に利用されていた慣用の戦略は、H I V のケースにおいては無効であることが示された。

【0004】

10

20

30

40

50

ヒトにおいて保護を与える決定的な免疫関連物 (immune correlates) はないが、最近の動物モデル実験に由来する証拠は、HIVに対するワクチン誘導性の免疫が可能であることを示唆している (Amara, et al., Science 292: 69~74, 2001, Rose, et al., Cell 106: 539~49, 2001, Barouch, et al., Science 290: 486~92, 2000, Shiver, et al., Nature 415: 331~5, 2000, Chen, et al., Nat. Med. 7: 1225~31, 2001)。アカゲザルにおける病原性キメラSIV-HIV-1 (SHIV) による研究は、抗体がHIVに対する保護に重要な役割を演じ得ることを明らかにした。例えば、受動的に注入された抗体が、SHIV感染を、経口または経膈チャレンジにおいてのみならず、SHIVのチャレンジが静脈内で行われた場合でさえ防ぐことが示された (例えば、Shibata, et al., Nat. Med. 5: 204~10, 1999, Mascola, et al., Nat. Med. 6: 207~10, 2000参照)。細胞誘導性の免疫機構もまた、同様にウイルス複製の抑制に主要な役割を演じているようである。この主張は、非ヒト霊長類におけるSIVの多くの研究において、また、細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) が、同疾患の急性期および慢性期の両方におけるウイルス複製の制御の要であることを示したヒトにおける研究によって十分に支持されている (Walker, et al., Nat. Med. 6: 1094~5, 2000)。

10

【0005】

今までのところ、HIV感染に対する保護を与えるのに有効なワクチンはない。より注目すべきは、最近の候補ワクチンが感染細胞に対し有効な細胞応答を誘導せず、そのため長期の保護を与えないということである。

ペプチドまたはポリペプチドワクチンは、一部の病気に成功裏に用いられているが、これらのワクチンを用いてHIVに対する保護的な免疫応答を得る上での障壁は、HIVペプチドの低い免疫原性、HIVの遺伝的変異性、およびT細胞の患者の免疫学的バックグラウンドへの依存性を包含する。

20

【0006】

一般的にペプチドの免疫原性が低いため、これらは典型的には、免疫応答を刺激するためのアジュバントとともに投与される。不完全フロイントアジュバントおよび他のオイルベースのアジュバントがより有効であり、Th1応答の誘導に有利であるようであるが、アラムは選択的なTh2応答をもたらす (Grun and Maurer, Cell Immunol. 121(1): 134~45, 1989)。ペプチドへの応答を増強するためのアジュバントによるさらなるアプローチは、リポペプチド免疫刺激剤との共有結合、またはペプチドのリポソーム内へのエンカプシレーション (encapsulation) を含む (Kim, et al., Int J Oncol. 21(5): 973~9, 2002, Martinon, et al., J Immunol. 149(10): 3416~22, 1992)。ある種のサイトカインもまた有用であることが証明されている。マウスでの実験において、IL-12およびIL-1の活性断片が、ペプチドに対するTh1応答を増強することが示された。IL-2は、FDAにより、転移性腎細胞癌、または転移性メラノーマを有する患者の処置への使用を認可された (Antonia, et al., J Urol. 167(5): 1995~2000, 2002)。これは、癌用のワクチンの成分として、およびAIDSのモデルにおけるワクチンによるアプローチの要素として用いられた (<http://www.actis.org/vaccinetrials.asp>参照)。しかしながら、IL-2の投与は、毛細血管漏出症候群を伴うとともに、その活性化誘導細胞死 (AICD) における役割のために、IL-2は、腫瘍細胞上に発現された抗原を認識するT細胞を死に導く可能性がある。例えば、Waldmann, et al., Immunity 14: 105~10, 2001参照。さらにまた、IL-2はメモリーCD8⁺T細胞の生存を抑制するため、HIVワクチンにおけるアジュバントとしてのその有用性を潜在的に低減させている。

30

40

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

本発明は、ワクチンの免疫原性を高めることが可能な組成物に関する。本組成物またはアジュバントは、それを必要とする哺乳動物に、ワクチン抗原と共に順次または同時に投与される。1つの好ましい側面においては、アジュバントは、IL-15をコードする核

50

酸配列を含む、ワクシニアウイルスベクターなどの組換えポックスウイルスベクターの形態で提供される。

【0008】

IL-15およびIL-2は、両方とも共有シグナル成分を有する受容体複合体を利用するが、IL-15およびIL-2の発現および相互作用は、重複するものの、同一ではない。IL-15のmRNAは、線維芽細胞、上皮細胞および単球に広く分布するが、IL-2の主要な給源である休止または活性化T細胞には分布しない。IL-15は、*in vitro*でT細胞の増殖と分化とを刺激し、*in vivo*でT細胞誘導性の免疫応答を増大させることができる。さらに、IL-15は、B細胞の増殖および分化の誘導を刺激することが示されている。抗原特異的T細胞およびB細胞の増殖および分化は、特定の抗原についての保護免疫を増大させることができる。Armitage, et al., J. Immunology 154: 483~490 (1995)は、IL-15が、活性化ヒトB細胞からのIgM、IgGおよびIgAの分泌を強力に誘導することを報告している。加えて、IL-15は、ナチュラルキラー(NK)細胞において、リンホカイン活性化(LAK)活性を誘導することができる。

10

【0009】

本発明は、IL-15が、IL-2への応答を有意に超える、抗原に対する長期の免疫応答を増強することができるという知見を利用するものである。したがって、本発明は、病原生物による急性、慢性および不顕性感染に対する応答、ならびに悪性細胞に対する応答を生じさせる組成物および方法を提供する。

1つの側面において、本発明は、IL-15をコードする核酸配列を含む組換えワクチンウイルスベクターを提供する。好ましくは、ベクターはまた、発現制御配列に作動可能に連結した少なくとも1つの抗原をコードする核酸配列を含む発現ユニットを含む。

20

【0010】

IL-15をコードする配列と抗原をコードする配列とは、同じまたは異なる発現の時間的パターンを有する発現制御配列に作動可能に連結していてもよい。1つの側面において、抗原をコードする配列は、IL-15をコードする配列より前に発現される。別の側面において、抗原をコードする配列は、IL-15をコードする配列より後に発現される。

ベクターは、1または2以上の不活性化した病原性遺伝子を含んでもよく、または制限された宿主域を含んでもよく、そして好ましくは複製欠損型または複製不能型または複製減弱型である。好適なベクターは、限定されることなく、ポックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アルファウイルス、レトロウイルス、エプスタインバーウイルス、レンチウイルス、およびピコルナウイルスに基づく(すなわちこれらのウイルスゲノムの部分を含む)ものを包含する。1つの好ましい側面において、ベクターは組換えポックスウイルスベクターである。組換え非病原性ポックスウイルスは、好ましくはワクシニアウイルスであるが、カナリアポックスウイルスなどの鶏痘ウイルスであってもよい。

30

【0011】

好ましくは、ベクターは、1または2以上のカプシドポリペプチドを含む。1つの側面においては、1または2以上のポリペプチドは、細胞(例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞、または腫瘍細胞)への選択的な感染を容易にするために標的化分子に結合している。

40

また好ましくは、IL-15をコードする配列は、これに作動可能に連結した発現制御配列を含む。

【0012】

1つの側面においては、少なくとも1つの抗原は、Her-2/neuポリペプチドからの抗原などの、癌特異抗原である。

別の側面においては、少なくとも1つの抗原は、細菌抗原、例えば、*Borrelia burgdorferi*、*Bartonella henselae*、*Yersinia pestis*、および*Bacillus anthracis*からの抗原などである。

さらなる側面においては、少なくとも1つの抗原は、ウイルスペプチドまたはポリペプチド、例えば、狂犬病ウイルスゲノム、イヌジステンパーウイルスゲノム、ニューカッス

50

ル病ウイルスゲノム、エボラウイルスゲノム、西ナイルウイルスゲノム、エプスタインバーウイルスゲノムまたは天然痘ゲノムにより発現されるペプチド/ポリペプチドである。

特に好ましい側面においては、少なくとも1つの抗原は、HIVまたはSIVウイルスゲノムにより発現されるペプチドまたはポリペプチドなどのウイルスペプチドまたはポリペプチドを含む。

【0013】

抗原をコードする発現ユニットは、いくつかの態様においては、複数の抗原をコードする配列を含む多価発現ユニットである。1つの側面においては、少なくとも2つの抗原が2つの異なるHIVポリペプチドからのものである。別の側面においては、少なくとも2つの抗原は、HIVの2つの異なる株からのものである。さらに別の側面においては、少なくとも2つの抗原は、HIVの2つの異なる分離株からのものであり、またはHIVの2つの異なるクレードからのものである。

10

さらにまた別の側面においては、少なくとも2つの抗原は、HIVポリペプチドの異なるサブ配列からのものである。しかしながら、別の側面においては、少なくとも2つの抗原は、HIVポリペプチドの同じサブ配列に由来するが、各サブ配列は、少なくとも1つのアミノ酸によって異なる。1つの側面においては、サブ配列は、HIVポリペプチドにおける高度に易変異性の領域からのものである。

【0014】

別の側面において、発現ユニットは、複数の抗原をコードする配列、CTL認識エピトープを含む少なくとも1つの抗原、Tヘルパー細胞認識エピトープを含む少なくとも1つの抗原、B細胞認識エピトープを含む少なくとも1つの抗原を含む。1つの側面においては、エピトープは同じHIVポリペプチドからのものである。

20

1つの側面においては、少なくとも1つの抗原はHIVポリペプチドからのものであるが、少なくとも1つの他の抗原は、HIV陽性患者における日和見感染に関連する感染性生物、例えばPneumocystis cariniiからのものである。

【0015】

本発明はさらに、IL-15をコードする核酸と、少なくとも1つの抗原をコードする核酸とを含み、ここで、少なくとも1つの抗原をコードする核酸が、第2の組換えワクチンウイルスベクターにより発現される組換えワクチンウイルスベクターを提供する。

本発明はまた、上記の任意の組換えワクチンウイルスベクターまたは組成物を、動物に免疫応答を刺激するのに有効な量で投与することを含む、動物に免疫応答を生じさせるための方法を提供する。好ましくは、免疫応答は、少なくとも1つの抗原に特異的なメモリーCD8⁺T細胞の産生、少なくとも1つの抗原に特異的なメモリーCD4⁺T細胞の産生、および少なくとも1つの抗原に特異的な抗体の産生の1または2以上を含む。また、好ましくは、少なくとも抗体のいくつかは中和抗体である。

30

【0016】

1つの側面において、動物はヒトである。

別の側面において、動物は、イヌまたはネコなどの家畜である。動物はまた、キツネおよびアライグマなどの野生動物または野生動物であってもよい。動物はまた、非ヒト霊長類であってもよい。

40

本方法は、天然痘または狂犬病などのウイルス病因に感染するリスクがあるか、またはすでに感染している患者に、予防または治療ワクチンを提供するために用いてもよい。1つの側面においては、本方法はHIV感染のリスクが高い個体への予防ワクチンを提供するために用いられ、そして、ワクチンは最初の投与の時にHIV陽性ではない個体に投与してもよい。しかしながら、ワクチンはまた、最初の投与の時にHIV陽性の個体に投与してもよい。

【0017】

本発明による組成物は長期免疫応答を増強することができるため、本組成物の再投与は、従来技術のワクチンより長い間隔で行われるだろう。1つの側面において、組換えワクチンベクターの最初の投与と再投与との間の間隔は、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約

50

8ヶ月、少なくとも約10ヶ月、少なくとも約12ヶ月、少なくとも約14ヶ月、少なくとも約16ヶ月、少なくとも約18ヶ月、または少なくとも約24ヶ月である。

【0018】

本発明の目的および特徴は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照することによってよりよく理解できる。

【0019】

詳細な説明

本発明は、IL-15をコードする核酸配列を含む組換えワクチンベクターを提供する。好ましくは、ベクターはまた、発現制御配列に作動可能に連結した少なくとも1つの抗原をコードする核酸配列を含む発現ユニットを含むが、抗原をコードする配列はまた、別の核酸の一部として、例えば、第2の組換えワクチンベクターの一部として提供してもよい。

【0020】

本発明の実行は、別記のない限り、従来の技術の範囲内にある慣用の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技術を利用する。かかる技術は、文献に完全に説明されている。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)におけるManiatis、Fritsch & Sambrook、DNA Cloning: A Practical Approach、Volumes I and II (D. N. Glover、ed.、1985)、Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait、ed.、1984)、Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins、eds.、1985)、Transcription and Translation (B. D. Hames & S. I. Higgins、eds.、1984)、Animal Cell Culture (R. I. Freshney、ed.、1986)、Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press、1986)、B. Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)を参照。ワクシニア制限フラグメント、オープンリーディングフレームおよびヌクレオチドの位置に関する全ての表示は、Goebel、et al.、Virology 179: 247~266、1990、Goebel、et al.、Virology 179: 517~563、1990に報告されている用語に基づくものである。

【0021】

定義

以下の定義は、以下の説明において用いられている特有の用語について提供される。

本明細書および特許請求の範囲で用いられる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかにそれ以外のものを指示しない限り、複数の参照を包含する。例えば、用語「細胞」は、複数の細胞（これらの混合物を含む）を包含する。用語「核酸分子」は、複数の核酸分子を包含する。

【0022】

本明細書中で用いる場合、用語「含む」は、組成物および方法が列挙した要素を包含するが、他の要素を除外しないということの意味する。「本質的に...からなる」は、組成物および方法を定義することに用いる場合、組み合わせに任意の本質的な意義を有する他の要素を除外することを意味するものとする。したがって、本明細書中に定義された要素を本質的に含む組成物は、単離および精製方法からの微量な混入物、およびリン酸緩衝生理食塩水、保存剤などの医薬的に許容し得る担体を除外しない。「...からなる」は、他の成分の微量な要素およびこの発明の組成物を投与するための実質的な方法工程以上のものを除外することを意味するものとする。これらの中間的な用語のそれぞれによって定義された態様は、本発明の範囲内である。例えば、本質的にIL-15からなる組成物は、他のサイトカインは含まないが、サイトカインではないアジュバント、抗原、治療剤などを含むことができる。

【0023】

本明細書中で用いる場合、「転写制御下にある」または「作動可能に連結された」は、ポリヌクレオチド配列の発現（例えば、転写または翻訳）が、発現制御エレメントと、コード配列との適切な並列によって制御されていることを意味する。1つの側面において、DNA配列は、発現制御配列が当該DNA配列の転写を制御および調節する場合に、発現

10

20

30

40

50

制御配列に「作動可能に連結」または「操作可能に連結」されている。発現制御配列に作動可能に連結した核酸配列を含む構築物は、本明細書中では「発現ユニット」または「発現カセット」と呼ぶ。

【0024】

本明細書中で用いる場合、「発現制御配列」は、それぞれRNAポリメラーゼに結合するプロモーター配列、エンハンサー配列、および/またはリボソームの結合のための翻訳開始配列を意味する。例えば、細菌発現ベクターは、*lac*プロモーターなどのプロモーターおよび、転写開始のためにシャイン・ダルガノ配列および開始コドンAUG（上記 Sambrook, et al., 1989）を含むことができる。同様に、真核発現ベクターは、好ましくは、RNAポリメラーゼIIのための異種、同種またはキメラプロモーター、下流ポリ

10

【0025】

本明細書中で用いる場合、「核酸送達ベクター」は、対象となるポリヌクレオチドを細胞中に輸送することができる核酸分子のことである。好ましくは、かかるベクターは、発現制御配列に作動可能に連結したコード配列を含む。

本明細書中で用いる場合、「核酸送達」または「核酸移送」は、外来性のポリヌクレオチド（例えば、発現カセットなど）の宿主細胞内への導入を意味し、導入に用いられる方法とは無関係である。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞中で安定的にまたは一過性に維持されてもよい。安定した維持は、典型的には、導入したポリヌクレオチドが宿主細胞に適合した複製起点を含有するか、または染色体外レプリコン（例えばプラスミド）もしくはミトコンドリア染色体などの、宿主細胞のレプリコン中に組み込まれることを要する。

20

【0026】

本明細書中で用いる場合、「組換えワクチンベクター」は、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*で宿主細胞中に送達されるポリヌクレオチドであって、ワクチンウイルスからのゲノム配列および異種の核酸配列（例えば、IL-15および/または抗原を発現するための発現ユニットなど）を含むものを意味する。好ましくは、1または2以上の病原性関連配列が、ベクター内で不活性化される。ベクターは、ウイルスカプシドタンパク質で被包されているとよく、または裸の核酸を含んでもよく、または細胞への侵入を容易にするための1または2以上の分子（例えば、リボソームなど）と会合した核酸を含んでもよい。しかしながら、好ましくは、ベクターは、1または2以上のウイルスカプシドタンパク質で被包されている。ワクチンウイルスの例は、限定されることなく、以下にさらに定義されるボックスウイルスを包含する。

30

【0027】

本明細書中で用いる場合、「弱毒化ウイルス」または1または2以上の「不活性化した病原性関連遺伝子」を有するウイルスは、複製欠損型のウイルス、または特定の宿主において野生型ウイルスより複製の効率が悪くなるウイルスを意味する。

本明細書中で用いる場合、用語「核酸を細胞に投与する」または「ベクターを細胞に投与する」とは、細胞に核酸/ベクターを感染させる（例えば、ウイルスの形態で）、形質導入する、トランスフェクトする、マイクロインジェクションする、エレクトロポレーションする、または撃ち込むことを意味する。いくつかの側面においては、分子は、標的細胞中に、標的細胞を送達細胞と接触させることにより（例えば、細胞融合により、または送達細胞を、それが標的細胞の近くにある時に溶解することにより）導入される。

40

【0028】

細胞は、外来または異種核酸が細胞の内部に導入された場合に、かかる核酸によって「形質転換し」、「形質導入され」、または「トランスフェクトされた」という。形質転換DNAは細胞のゲノムを構成する染色体DNAに組み込まれて（共有結合して）いてもいなくてもよい。原核生物、酵母および哺乳類の細胞においては、例えば、形質転換DNAは、プラスミドなどのエピソームエレメントとして維持されてもよい。真核細胞において

50

は、安定的に形質転換された細胞とは、形質転換DNAが染色体に組み込まれ、染色体の複製を介して娘細胞に受け継がれていく細胞のことである。この安定性は、形質転換DNAを含有する娘細胞の集団で構成される細胞系またはクローンを樹立する真核細胞の能力によって証明される。「クローン」は、有糸分裂により単一の細胞または共通の原細胞から由来する細胞の集団のことである。「細胞系」は、*in vitro*で多くの世代（例えば、少なくとも約10世代）安定した、増殖が可能な初代細胞のクローンのことである。

【0029】

本明細書中で用いる場合、「IL-15ポリペプチド」は、Grabstein, et al., Science 264: 96, 1994および米国特許第5,747,024号に記載された野生型アミノ酸配列と少なくとも約70%、少なくとも約90%、少なくとも約97%または約100%の相同性を有するポリペプチドを意味する。IL-15の変異体、修飾体、生物学的に活性なフラグメントおよび融合体もまた、これらが少なくとも以下の特性を有している限り、この用語の範囲に包含される：IL-15の変異体、修飾形態、生物学的に活性なフラグメントおよび融合体をコードする核酸が、野生型IL-15配列に、以下に定義する中程度のまたは高いストリンジェンシー条件下で結合し、かつポリペプチド自体がCTL-2細胞の増殖を刺激することができる（例えば、Gillis and Smith, Nature 268:154, 1977, ATCC TIB 214に記載されているものを参照）。

【0030】

本明細書中で用いる場合、「IL-15の変異型」とは、保存的に置換された配列を含むIL-15ポリペプチドを意味し、これは、1または2以上のアミノ酸残基が、同様の物理的および化学的特徴を有する残基と置換されていることを意味する。保存的置換の例は、1つの脂肪族残基の他の残基との置換、例えば、Ile、Val、Leu、またはAlaの相互の置換、または、1つの極性残基の他のものとの置換、例えば、LysとArg、GluとAsp、もしくはGlnとAsnとの間の置換を包含する。表現型の上ではサイレントでありそうなアミノ酸変化に関する手引きは、例えばBowie, et al., Science 247: 1306~1310, 1990に見出すことができる。他のこのような保存的置換、例えば、同様の疎水特性を有する領域の置換は、この定義に包含されている。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当該技術分野においてよく知られている（例えば、Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915~10919, 1992参照）。好ましくは、IL-15ポリペプチドは、シグナルトランスダクションに重要であることが知られているAsp⁵⁶およびGln¹⁵⁶残基を保持する。「変異体」はまた、代替的なRNAスプライシング事象により生じるIL-15の形態であって、それでもなおCTL-2増殖アッセイにおいて機能することが可能であり、かつ野生型IL-15と実質的に同様の活性を有するものを包含する。

【0031】

本明細書中で用いる場合、IL-15ポリペプチドの「修飾形態」とは、IL-15ポリペプチドの翻訳後修飾された形態（例えば、グリコシル化形態またはタンパク質分解により処理された形態など）を意味する。

本明細書中で用いる場合、「IL-15ポリペプチドをコードする核酸配列」は、Grabstein, et al., Science 264: 96, 1994および米国特許第5,747,024号に記載された野生型IL-15核酸配列に相当する核酸配列、ならびに縮重的な置換（degenerate substitution）により野生型IL-15核酸配列とは異なる配列、およびIL-15ポリペプチドの変異体、修飾形態、および生物学的に活性なフラグメントをコードする核酸配列を包含する。縮重コドン置換は、1または2以上の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作出することにより達成することができる（例えば、Batzer, et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081, 1991, Ohtsuka, et al., J. Biol. Chem. 260: 2605~2608, 1985, Rossolini, et al., 1994, Mol. Cell. Probes 8: 91~98参照）。

【0032】

野生型タンパク質の「生物学的に活性なフラグメント」、「生物学的に活性な形態」、

10

20

30

40

50

「生物学的に活性な均等物」または「機能的な派生物」は、野生型タンパク質の生物学的活性と、該活性を検出するのに好適なアッセイ（例えば、IL-15の生物学的に活性なフラグメントの場合は、少なくともCTL-2アッセイ）を用いて測定した場合、実質的に同等の（例えば、有意に異ならない）生物学的活性を保有するものである。

本明細書中で用いる場合、用語「単離された」は、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはこれらのフラグメントが、通常自然状態で結び付いている細胞その他の構成要素から分離されていることを意味する。例えば、ポリヌクレオチドに関していえば、単離されたポリヌクレオチドとは、それが染色体において通常結び付いている5'および3'配列から分離しているもののことである。当業者にとって明らかのように、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはこれらのフラグメントは、それを、天然に存在するその対応物と区別するための「単離」を必要としない。

10

【0033】

本明細書中で用いる場合、「ボックスウイルス」は、ボックスウイルス科の任意の成員を含み、これには、Chordopoxviridae亜科（脊椎動物ボックスウイルス）およびEntomopoxviridae亜科（昆虫ボックスウイルス）が含まれる。例えば、B. Moss in Virology, ed. Fields et al., Raven Press p. 2080 (1990) 参照。コルドボックスウイルスは以下の属を含む：Orthopoxvirus（例えば、ワクシニア）、Avipoxvirus（例えば、鶏痘）、Capripoxvirus（例えば、羊痘）、Leporipoxvirus（例えば、ウサギ（ショーブ）線維腫、粘液腫）、およびSuipoxvirus（例えば、豚痘）。

20

本明細書中で用いる場合、「標的細胞」または「レシピエント細胞」は、個々の細胞、または外来の核酸分子、ポリヌクレオチドおよび/もしくはタンパク質のレシピエントになることが所望される、またはレシピエントである細胞を意味する。この用語はまた、単一細胞の子孫を包含するものとし、そして該子孫は、天然の、偶発的な、または意図的な変異のために、本来の親細胞とは必ずしも完全に同一（形態学的に、またはゲノムもしくは全DNA相補体において）である必要はない。標的細胞は、他の細胞（例えば、組織内にあるような）と接触していてもよく、または生物体の内部を循環していてもよい。

【0034】

本明細書中で用いる場合、「患者」は、脊椎動物であり、好ましくは哺乳類であり、より好ましくはヒトである。哺乳類は、限定されることなく、マウス、非ヒト霊長類、ヒト、農業動物、スポーツ動物、ペット、および野生動物もしくは野生動物を包含する。

30

用語「癌」、「新生物」および「腫瘍」は、同義的に、そして単数形または複数形で用いられ、悪性の形質転換を受け、宿主生物に対し病的になった細胞を意味する。原発性癌細胞（すなわち、悪性形質転換部位の近傍から得た細胞）は、非癌性細胞から、十分に確立された技術、特に組織学的検査により、容易に識別することができる。癌細胞の定義は、本明細書中で用いる場合、原発性癌細胞のみならず、原癌細胞に由来する任意の細胞をも包含する。これは、転移した癌細胞、ならびにin vitro培養物および癌細胞に由来する細胞系を包含する。通常固形腫瘍として現れる癌のタイプについていえば、「臨床的に検出できる」腫瘍とは、腫瘍塊に基づいて、例えば、CATスキャン、MRIイメージング、X線、超音波または触診により検出できるもの、および/または、患者から得られる試料中の1または2以上の癌特異的抗原の発現により検出できるものである。

40

【0035】

本明細書中で用いる場合、用語「医薬的に許容し得る担体」とは、任意の標準的な医薬的な担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、および油/水もしくは水/油エマルジョンなどのエマルジョン、および種々のタイプの湿潤剤を包含する。組成物はまた、安定剤および保存剤を含むことができる。担体、安定剤およびアジュバントの例については、Mart in Remington's Pharm. Sci., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)) 参照。

用語「抗原源」は、本明細書中で用いる場合、先天免疫または適応免疫を惹起する任意の物質をカバーする。抗原源は、抗原を生成するためにプロセッシング（例えば、タンパク質分解）を要し得る。抗原源は、ポリペプチド/タンパク質、ペプチド、微生物、組織、

50

オリゴ糖類もしくは多糖類、核酸（抗原、または抗原を含むか、もしくはそれ自体抗原となるポリペプチド/タンパク質をコードするもの）であってもよい。

【0036】

本明細書中で用いる場合、用語「抗原」、「抗原決定基」または「エピトープ」は、免疫系の成分により特異的に認識または特異的に結合される短いペプチド配列またはオリゴ糖を示すために同義的に用いる。一般的に、抗原は、抗原提示細胞上で、これらが結合するMHC/HLA分子とコンテキストにおいて認識される。2つの抗原は、これらが同じ抗体、B細胞、またはT細胞により特異的に結合され得、かつ、抗体、B細胞、またはT細胞へのエピトープの結合が、他のエピトープによる結合を実質的に阻止する（第1のエピトープの結合が、第2のエピトープの存在下において、第2のエピトープの不存在下に観察された結合の約30%未満、好ましくは、約20%未満、そしてより好ましくは、約10%、5%、1%、または約0.1%未満である）場合に、互いに一致する。

10

【0037】

本明細書中で用いる場合、「ワクチン組成物」は、IL-15ポリペプチドをコードするワクチンベクターと、少なくとも1つの抗原源とを含む。抗原源は、ワクチンベクターの一部として含まれる、または別個の核酸分子として提供される、抗原をコードする核酸を含んでもよい。ワクチン組成物の成分は、一緒にまたは順次投与してもよい。

本明細書中で用いる場合、「ワクチン」は、抗原を含む物質に対し能動免疫を提供するが、疾患は引き起こさない抗原を含有またはコードする物質を意味する。

本明細書中で用いる場合、「サブユニットワクチン」は、ウイルスまたはその他の微生物の一部、例えば、免疫応答を惹起することができるウイルスもしくは微生物のポリペプチドまたはかかるポリペプチドをコードする核酸を含むもの、のみを含有するワクチンを意味する。

20

【0038】

本明細書中で用いる場合、「治療ワクチン」は、すでに抗原に暴露されている者に、当該抗原に対する免疫応答をブーストするために設計されたワクチンである。

本明細書中で用いる場合、「治療的に有効な量」は、異常な生理学的応答を予防、修正および/または正常化するのに十分な量を意味する。1つの側面において、「治療的に有効な量」は、臨床的に顕著な病気の特徴、例えば、CD4細胞の抑制（すなわち、CD4細胞の少なくとも30%の増加をもたらす）、ウイルス量の減少、腫瘍塊の大きさの減少などを、少なくとも約30パーセント、より好ましくは少なくとも50パーセント、最も好ましくは少なくとも90パーセント低減するために十分な量である。好ましくは、「ワクチン組成物の治療的に有効な量」は、ワクチン抗原への有益な免疫応答を少なくとも約30%、より好ましくは少なくとも約50%または少なくとも約90%増強、すなわち、抗原に対するCTL応答を増大、CD8⁺T細胞によるIFNの分泌を増大、ワクチン抗原に特異的な抗体の産生を増大、およびワクチン組成物の投与後のこれらの反応の持続時間を増大させる。

30

【0039】

本明細書中で用いる場合、「増大した持続時間」を有する免疫応答は、抗原の最初の投与の少なくとも約4ヶ月、約6ヶ月、約8ヶ月、約10ヶ月、約12ヶ月、約16ヶ月、約18ヶ月、または少なくとも約20ヶ月後において観察される有意な反応を意味する。

40

「抗体」は、任意の免疫グロブリンであり、抗体および、特異抗原に結合するそのフラグメントを包含する。この用語は、ポリクローナル、モノクローナル、およびキメラ抗体（例えば、二重特異抗体）を包含する。「抗体結合部位」は、抗原に特異的に結合する重鎖および軽鎖の可変および超可変領域から構成される抗体分子の構造部分である。典型的な抗体分子は、インタクトな免疫グロブリン分子、実質的にインタクトな免疫グロブリン分子、および本明細書に記載の治療方法に用いることが好ましいFab、Fab'、F(ab')₂およびF(v)部分を包含する、パラトープを含むこれらの免疫グロブリン分子の部分である。

【0040】

50

本明細書中で用いる場合、用語「免疫エフェクター細胞」は、抗原と結合することができ、かつ免疫応答を媒介する細胞を意味する。これらの細胞は、限定されることなく、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞および細胞傷害性Tリンパ細胞（CTL）、例えば、CTLセルライン、CTLクローン、および腫瘍性、炎症性もしくはその他の浸潤物からのCTLを包含する。

本明細書中で用いる場合、用語「ウイルス感染」は、ウイルスが健康細胞に侵入し、細胞の増殖機構を利用して増殖もしくは複製し、そして最終的には細胞を溶解して細胞死、ウイルス粒子の放出および新たに産生された子孫ウイルスによる他の細胞の感染をもたらす、疾患の状態を表すものである。「非増殖性の感染」、すなわちワクチンウイルスベクターによるものは、ベクターが細胞内に導入されるが、病原性関連遺伝子が不活性化されているため、または宿主域が制限されているために、細胞内では複製しない感染である。

10

【0041】

本明細書中で用いる場合、用語「ウイルス感染を処置または予防する」は、特定のウイルスの複製を阻害すること、ウイルスの伝播を阻害すること、または、ウイルスがその宿主内に定着するのを予防すること、および、ウイルス感染によって引き起こされた疾患の症状を改善または緩和することを意味する。

本明細書中で用いる場合、「アジュバント」は、ワクチン抗原に対する宿主の免疫応答を増強、増大または強化する物質を意味する。

用語「免疫原性」は、免疫原または抗原が免疫応答を誘導する相対的な有効性を意味する。

20

本明細書中で用いる場合、「ベースライン」は、測定を開始した場合に、ワクチン投与の直前の時点の意味する。

【0042】

本明細書中で用いる場合、「ブースター」は、最初のワクチン抗原に対する免疫応答を増大させるために、初期用量の後に与えられる第2のまたはより後のワクチン用量を意味する。ブースター用量として与えられるワクチンは、初期ワクチンと同じであってもなくてもよい。

本明細書中で用いる場合、「チャレンジ」は、宿主動物のワクチン抗原への意図的な暴露を意味する。

本明細書中で用いる場合、「クレード」は、遺伝的類似性（エンベロープタンパク質の類似性によって測定されたものなど）にしたがって分類された、関連するHIV分離株の群を意味する。現在HIV-1分離株には2つの群、MおよびOがある。M群は、AからIまでの少なくとも9つのクレードからなる。O群は、同程度の数のクレードからなると思われる。クレードBは、北米およびヨーロッパで一般的に見られ、そして分離株LAI b、MN、およびSF-2を包含する。

30

【0043】

本明細書中で用いる場合、「セロコンバージョン」は、特定の抗原に対する抗体の発生を意味する。

本明細書中で用いる場合、「免疫」は、免疫系により具体的な疾患に対してもたらされる先天性または後天性の抵抗力を意味する。免疫は、部分的または完全であっても、特異的または非特異的であっても、持続性または一過性であってもよい。

40

本明細書中で用いる場合、「殺菌的免疫（sterilizing immunity）」は、感染の成立を完全に防ぐ免疫応答を意味する。

本明細書中で用いる場合、「メモリー細胞」は、特異抗原に暴露し、そしてその後、免疫系が同じ抗原に再び遭遇した時により容易に増殖する（抗原を認識し、そして分裂する）ことができるT細胞およびB細胞のサブセットを意味する。

【0044】

組換えベクター

本発明は、抗原に対する免疫応答を誘導または増強するための、IL-15ポリペプチドをコードする核酸配列を含むワクチンベクターを提供する。好ましくは、ワクチンベク

50

ターは、ワクシニアベクターなどのポックスウイルスベクターである。本発明は、一般的に、選択された抗原（「ワクチン抗原」）に対する細胞性または体液性免疫応答を惹起および/または増強するために実行することができる。

IL-15のクローニングおよびシーケンシングは、Grabstein, et al., Science 264: 96, 1994および米国特許第5,747,024号に開示されている。本明細書中で用いる場合、「IL-15核酸」は、野生型IL-15配列に、中程度または高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし、かつCTL-2細胞の増殖を刺激することができる（Gillis and Smith, Nature 268: 154, 1977, ATCC TIB 214）。

【0045】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、約25 ~ 約37のインキュベーション温度、約6×SSC ~ 約10×SSCのハイブリダイゼーションバッファー濃度、約0% ~ 約25%のホルムアミド濃度、および約6×SSCの洗浄液が挙げられる。中程度のハイブリダイゼーション条件の例としては、約40 ~ 約50のインキュベーション温度、約9×SSC ~ 約2×SSCのハイブリダイゼーションバッファー濃度、約30% ~ 約50%のホルムアミド濃度、および約5×SSC ~ 約2×SSCの洗浄液が挙げられる。高いハイブリダイゼーション条件の例としては、約55 ~ 約68のインキュベーション温度、約1×SSC ~ 約0.1×SSCのハイブリダイゼーションバッファー濃度、約55% ~ 約75%のホルムアミド濃度、および約1×SSC、0.1×SSCまたは脱イオン水の洗浄液が挙げられる。一般的に、ハイブリダイゼーションのインキュベーション時間は、5分 ~ 24時間であり、1、2または3以上の洗浄工程を有し、そして洗浄インキュベーション時間は、約1、2または15分である。SSCは、0.15MのNaClおよび15mMのクエン酸バッファーである。他のバッファー系を用いたSSCの均等物を使うことができると理解される。

【0046】

好ましくは、IL-15核酸配列は、野生型IL-15ポリペプチドに対し約70%の相同性を有する、そしてより好ましくは、野生型IL-15ポリペプチドに対し少なくとも約90%の相同性または約100%の相同性を有するIL-15ポリペプチドをコードする。

2配列（核酸またはポリペプチド）間のパーセント同一性（percent identity）および類似性は、数学的アルゴリズムを用いて決定することができる（例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988, Bioinformatics: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993, Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991参照）。

【0047】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、配列は、最適な比較目的のためにアライメントされる（例えば、最適なアライメントのためにギャップが第1および第2のアミノ酸または核酸配列の1つまたは両方に導入され、そして、非相同性配列は比較目的のために無視することができる）。2配列間のパーセント同一性は、配列により共有されている同一の位置の数の関数であり、ギャップの数、および2配列の最適なアライメントのために導入する必要があったギャップの長さが考慮される。アミノ酸位置またはヌクレオチド位置にそれぞれ対応するアミノ酸残基またはヌクレオチドが、次に比較される。第1の配列中のある位置が、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、当該分子は、その位置において同一である（本明細書中で用いる場合、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と同等である）。

【0048】

「比較ウィンドウ（comparison window）」は、25 ~ 600、普通には約50 ~ 約2

00、より普通には約100～約150からなる群から選択される連続位置の数のいずれか1つを有するセグメントであって、2つの配列が最適にアライメントされた後、配列が、同じ数の連続位置の参照配列と比較することができるセグメントを意味する。比較のための配列のアライメント方法は、当該技術分野でよく知られている。

例えば、2つのポリペプチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>で入手可能) のGAPプログラムの一部であるNeedlemanおよびWunschのアルゴリズム (J. Mol. Biol. (48): 444~453、1970) を用いることにより、Smith & Watermanの局所相同性アルゴリズム (Adv. Appl. Math. 2: 482、1981) により、Pearson & Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444、1988) およびAltschul、et al. (Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389~3402、1997) の類似性検索法により、これらのアルゴリズム (GAP、BESTFIT、FASTA、およびWisconsin Geneticsソフトウェアパッケージ (Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis. から入手可能) のBLAST) のコンピュータによる実行により、または手動のアライメントおよび視覚的検討 (例えば、上記Ausubel et al. 参照) により決定することができる。

10

【0049】

ギャップパラメータは、ユーザーの要求に合うように変更することができる。例えば、GCGソフトウェアパッケージを利用する場合、NWSgapDNA.CMPマトリックス、および40、50、60、70または80のギャップウェイト (gap weight)、および1、2、3、4、5、または6の長さウェイト (length weight) を用いることができる。Blossom62マトリックスまたはPAM250マトリックスを用いた典型的なギャップウェイトは、16、14、12、10、8、6、または4であり、一方典型的な長さウェイトは1、2、3、4、5、または6である。GCGソフトウェアパッケージは、核酸配列間のパーセント同一性を決定するのに用いることができる。2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性はまた、ALIGNプログラム (version 2.0) に組み込まれた、PAM120ウェイト留数表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を用いたE. MyersおよびW. Millerのアルゴリズム (CABIOS 4: 11~17、1989) を用いて決定することができる。

20

【0050】

本発明の1つの側面においては、IL-15のヒトcDNAは、316bpの5'非コード領域、および489bpのオープンリーディングフレーム (ストップコドンを含む)、および400bpの3'非コード領域を含む162アミノ酸の前駆体をコードする (例えば、Grabstein、et al.、Science 264: 965、1994参照)。組換えベクターは、全長cDNAまたはそのコード領域もしくは生物学的に活性なフラグメント (例えば、5'非コード領域および3'非コード領域の1または2以上を欠くもの) を含んでもよい。組換えベクターはまた、114アミノ酸のIL-15のプロセッシングされた形態をコードする配列に相当する配列を含んでもよい。かかる配列は、非IL-15分泌配列、例えば、免疫グロブリンカップ軽鎖のシグナル配列に融合されていてもよい。

30

【0051】

好ましくは、本発明によるベクターに発現された組換えIL-15ポリペプチドは、CTLL-2アッセイで決定した場合、野生型IL-15と実質的に同じ活性を有する。上記Grabstein、et al.、1994参照。簡潔に述べると、CTLL-2細胞 (約 2×10^4 ~ 10^6) を、96穴プレートもしくは他の好適な容器中の組換えIL-15ポリペプチドの連続希釈物に添加し、37 °C および5% CO₂ で3日間インキュベートする。その後、0.5mCiの³H-チミジンを混合物に添加する。チミジンは、細胞が増殖した場合だけ取り込まれる。一晚のインキュベーションの後、細胞を採集し (例えば、グラスファイバーフィルター上に)、そして放射活性を、ベータカウンター (例えば、Packard Instrument Company、Meriden、Conn. から入手可能な、Matrix 96ベータカウンタ) などの好適な検出器を用いて測定する。サンプル中の組換えIL-15の活性は、既知量のIL-1

40

50

5を用いて作成した標準曲線から決定する。標準として使用する組換えヒトIL-15は、商業的に購入することができる(例えば、PeproTech、London、UKから)。本発明による組換えIL-15ポリペプチドは、好ましくは標準曲線から約20%未満の差を、より好ましくは約10%未満の差を、そしてより一層好ましくは、約5%未満の差を示す。1つの側面において、組換えIL-15ポリペプチドは、製造者にしたがって、約 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ U/mgの比活性を有する。チミジン取り込みアッセイを上記したが、細胞増殖を測定するための任意の好適なアッセイを用いてもよいこと、およびそれが本発明の範囲に含まれることは、当業者に明らかであろう。

【0052】

好ましくは、IL-15核酸は、IL-15受容体(IL-15R)のサブユニットに特異的に結合し、かつIL-15受容体複合体のまたはサブユニットのいずれかもしくは両方を介してシグナルを伝達できるIL-15ポリペプチドをコードする。さらなる側面においては、本発明による組換えIL-15ポリペプチドは、極性化の誘導、コラーゲンゲルへの浸潤、および接着受容体の再分布(例えば、Wilkinson and Liew, J Exp Med. 181(3): 1255~9, 1995; Nieto, et al., Eur. J Immunol 26(6): 1302~7, 1996に記載されているものを参照)の1または2以上を測定することによりアッセイした場合に、ヒト末梢血Tリンパ球における化学誘引因子として作用する。

【0053】

本発明による組換えIL-15発現ワクチンベクターの投与により、抗原への再暴露の際に二次応答を起こすようにプライミングされたメモリー細胞の拡大された集団が生じる。この効果は、抗原提示細胞(APC)により提示されたワクチン抗原の存在下におけるかかる細胞の迅速に拡大する能力、または抗原への最初の暴露後でさえも迅速な抗原特異的細胞溶解反応を示すその能力によりモニターすることができる。

【0054】

細胞死は、当該技術分野で知られたアッセイにより、例えば、血球計算板にてトリパンブルー排除細胞を計数することによりモニターすることができる。アポトーシスは、採集した細胞にヨウ化プロピジウム(PI)(ICN)を加え、フローサイトメトリーによりPIを取り込んだ細胞のパーセンテージを決定することにより分析することができる。アポトーシス細胞のパーセンテージは、当該技術分野で知られているように前方散乱分析により決定することができ、そしてそれはPIの取り込みに相関する。好ましくは、組換えポリペプチドは、CD8⁺T細胞を細胞死から保護し、約20%未満、約10%未満、そして約5%未満の細胞数の変化を、組換えIL-15濃度約0.1 ng/ml以上でもたらし、かつ20%未満、10%未満、そして好ましくは、約5%未満の集団内のアポトーシス細胞の数の増大をもたらす。

【0055】

組換えIL-15ポリペプチドがメモリー応答を増強する能力は、本発明によるワクチンベクターを、ワクチン抗原またはワクチン抗原をコードする配列の存在下でマウスに感染させることにより評価することができる。マウスは、抗原暴露後種々の日数で犠牲にし、ナイーブマウス、処置マウスまたはバッファで処置したマウスからのリンパ節細胞を単離し、ワクチン抗原または無関係な抗原(例えば、鶏卵リゾチームまたはインフルエンザ抗原)で再刺激する。細胞増殖は、当該技術分野における定法を用いて(例えば、³H-チミジンの取り込みを測定することにより)モニターする。バッファにより処置されたマウスまたはナイーブマウスと比べたメモリー細胞の増殖の有意な増加(当該技術分野でよく知られた統計学的方法を用いて決定されたもの)を、増強されたメモリー応答を表すものとして捉える。好ましくは、組換えIL-15を発現するウイルスベクターは、少なくとも約25%、少なくとも約50%、または少なくとも約100%の増殖の増大をもたらすことができる。追加的にまたは代替的に、メモリー細胞の応答は、生物学的に活性なIL-15の証として捉えられる。好ましくは、かかる応答は、ワクチン-抗原特異的CD8⁺T細胞による細胞溶解、および/またはかかる細胞によるIFNの産生を包含する。好ましくは、生物学的に活性なIL-15の投与は、CD8⁺T細胞による応答

10

20

30

40

50

の継続時間および規模を増強する。

【0056】

上記で論じたとおり、好ましいワクチンベクターは、ポックスウイルスを包含する。これらのウイルスの大きなゲノムサイズは、少なくとも25,000塩基対の外来DNAを受け入れることが可能なベクターの操作を可能にする (Smith, et al., Gene 25: 21, 1983)。さらに、ポックスウイルスは、ほとんどの真核細胞腫に感染することができ、かつ細胞内に侵入するために特別の受容体を要しない。他のDNAウイルスとは異なり、ポックスウイルスは専ら感染細胞の細胞質で複製するため、組換えウイルスDNAと宿主染色体との遺伝子交換の可能性が低減され、そして異種遺伝子が宿主細胞の調節とは独立して発現することを可能にする。

ポックスウイルスベクターは、ポックスウイルス科の任意の成員から得ることができ、特にワクシニアウイルスまたはavipoxvirus (例えば、カナリア痘、鶏痘など) は、ワクチンベクターにとって好適な配列を提供する。

【0057】

1つの側面において、ポックスウイルスベクターはワクシニアウイルスベクターである。ワクシニアウイルスは、現場条件下で物理的および遺伝子的安定性を示すため、輸送および保管における問題点および出費が低減される。組換えワクシニアウイルスベクターは、外来遺伝子産物に対して細胞性および体液性免疫を与え、かつ、いくつかの動物モデルにおいて感染症に対して保護することが示された。さらに、組換えワクシニアウイルスはまた、HIVのgp160エンベロープ遺伝子を発現させる臨床試験に用いられており (例えば、Cooney, The Lancet 337: 567~572, 1991, Graham, et al., J. of Infectious Dis. 166: 244~252, 1992, Estin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1052~1056, 1988参照)、したがって臨床的に許容されている。

【0058】

好適なワクシニアウイルスは、限定されることなく、コペンハーゲン (VC-2) 株 (Goebel, et al., Virol. 179: 247~266, 1990, Johnson, et al., Virol. 196: 381~401, 1993)、改変コペンハーゲン株 (NYVAC) (米国特許第6,265,189号)、WYETH株および改変アンカラ (MVA) 株 (Antoine, et al., Virol. 244: 365~396, 1998) を包含する。しかしながら、以下の例はワクシニアウイルスに関するものであるものの、ワクチンとして用いられるのに好適な他のポックスウイルスで代用してもよく、これらもまた本発明の範囲に包含される。例えば、ALVACおよびTROVACベクターなどの鶏痘株もまた、所望の特性を提供し、高度に弱毒性である (例えば、米国特許第6,265,189号、AIDS Research Reviews, Koff, et al., eds., Vol. 3, Marcel Dekker, N.Y., 1993におけるTartaglia et al.による総説、Tartaglia et al., 1990, Immunology 10: 13~30, 1990における総説を参照)。

【0059】

ワクシニアウイルスベクターなどの組換えポックスウイルスベクターを構築するための方法および条件は、当該技術分野において知られている (例えば、Piccini, et al., Methods of Enzymology 153: 545~563, 1987, 米国特許第4,769,330号、米国特許第4,722,848号、米国特許第4,769,330号、米国特許第4,603,112号、米国特許第5,110,587号、米国特許第5,174,993号、EP 83 286, EP 206 920, Mayr et al., Infection 3: 6~14, 1975, Sutter and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847~10851, 1992参照)。鶏痘ウイルスの調製は、例えばWO 96/11279に記載されている。

【0060】

ワクチンベクターは、一般的に以下のように調製する。1つの側面において、IL-15をコードする核酸配列を含むドナープラスミドを構築し、大腸菌における増殖により増幅し、そして慣用の手法により単離する。ドナープラスミドは、ワクシニアウイルス配列に相同な核酸配列を含む。IL-15をコードする核酸は、発現制御エレメントに作動可能に連結している。好ましくは、発現制御エレメントは、上流プロモーター配列、および、必要に応じてRNAプロセッシングシグナルを含むウイルスの調節エレメントを含む。発

10

20

30

40

50

現制御配列は、ワクシニアウイルスからのものでも、または他のポックスウイルスからのものでもよく（例えば、Mackett, et al., J. Virol, 49: 857, 1982参照）、そしてIL-15ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結している。プロモーターの選択により、IL-15配列の発現の時間（例えば、早期または後期）およびレベルの両方が決定される。

【0061】

発現ユニットは、発現制御配列を含み、そしてIL-15配列は、その両端を、組換えサイトとして標的化されているワクシニアウイルスDNA配列に相同なDNAで挟まれている。好ましくは、フランキング配列は、ワクシニアウイルスゲノムにおける必須ではない遺伝子座に対応する。得られたプラスミド構築物を、次に大腸菌または他の好適な宿主における複製により増幅し、そして当該技術分野における定法を用いて単離する（例えば、Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) (1989)参照）。

10

【0062】

好適な細胞培養物（例えば、ニワトリ胚線維芽細胞、CV-1細胞、BHK-21細胞、143B tk細胞、ベロ細胞、肺細胞など）を、ドナーおよびレシピエント配列の両方を含む組換え体の選択のために、レシピエントワクシニアウイルス配列と一緒にドナープラスミドでトランスフェクトする。トランスフェクションは、核酸の細胞内への侵入を促進するための1種または2種以上の分子を提供することにより促進してもよい。好適な送達ビヒクルは、限定されることなく、リポソーム製剤、ポリペプチド、多糖類、リポ多糖類、カチオン分子、細胞送達ビヒクル、電気穿孔を促進するためのビヒクルなどを包含する。

20

【0063】

好適なレシピエント配列は、保護免疫応答を誘導および/または増強することができる組換えウイルスの産生をもたらし、かつあらゆる有意な病原特性を欠くものが選択される。したがって、1つの好ましい側面においては、レシピエント配列は、組織培養においてウイルスの増殖のために必須ではなく、その欠失または不活性化が哺乳類（例えば、マウスまたはヒトなど）などの宿主生物における病原性を低減する、1または2以上の遺伝子を含む。

30

【0064】

病原性関連配列は、例えば、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、ヘマグルチニン、13.8 kD分泌タンパク質、リボヌクレオチド還元酵素遺伝子、宿主域遺伝子、出血性遺伝子(hemorrhagic gene)、およびA型封入体領域を包含する。例えば、Hruby et al., J. Virol. 43: 403~409, 1982, Weir, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3411~3415, 1983, Flexner, et al., Nature 330: 259, 1987, Buller, et al., Nature 317: 813, 1985, Buller, et al., J. Virol. 62: 866, 1988, Shida et al., J. Virol. 62: 4474, 1988, Kotwal, et al., Virology 171: 579, 1989, Child, et al., Virology 174: 626, 1990参照。不活性化病原性関連配列は、完全にもしくは部分的に欠失した遺伝子配列、置換、再構成、挿入、これらの組み合わせなどを含んでもよい。変異は、操作しても、または選択してもよい。例えば、弱毒化ウイルス株は、好適な脊椎動物宿主細胞（例えば、発育鶏卵および/またはニワトリ線維芽細胞など）において繰り返し継代し、そして引き続いてブランク精製を行い、より小さな、より遅く複製する、または、完全なもしくは部分的な弱毒化の指標を示すブランクを同定することにより、選択することができる。好ましくは、本発明によるポックスウイルスベクターは、複製不適合であり、かつ最初に感染した細胞を超えて広がることが不可能であるか、または、弱毒化されたものである。

40

【0065】

アビポックスウイルスなどの宿主制限ウイルスもまた、ヒトなどの哺乳類において非病原性であるために、用いることができる。

50

ドナープラスミド中の相同なワクシニアウイルス配列と、ウイルスゲノムとの間の組換えにより、IL-15をコードする配列を含むワクシニアベクターが産生される。

【0066】

組換えは、ドナープラスミドにレポーター遺伝子配列を含め、これらの配列を有する組換えウイルスについてスクリーニングすることにより検出することができる。例えば、大腸菌ガラクトシダーゼ遺伝子を含むドナープラスミドは、組換え体を、親ウイルスから識別する方法を提供する(Chakrabarti, et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3403, 1985)。かかる組換え体により形成されるプラークは、適切な指示物質の添加により形成される青色により、陽性に同定することができる。代替的に、または追加的に、レシピエント配列はレポーター配列を含んでおり、そして組換え体はレポーター配列の機能の喪失(すなわち、ドナー配列の、レシピエント配列中への挿入によりもたらされる)により検出される。1つの側面において、レシピエントレポーター配列は、病原性関連遺伝子である。例えば、チミジンキナーゼ遺伝子内への挿入は、チミジンキナーゼ陰性の143B骨肉腫細胞において、プロモデオキシウリジン(BrdU)存在下で増殖する組換え体をもたらす。

10

【0067】

しかしながら、別の側面において、レシピエントレポーター配列は、異種配列である(例えば、ガラクトシダーゼまたはグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼなど)。組換えワクシニアウイルスを精製するさらなる戦略は、例えば、Scheiflinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9977~9981, 1992、Merchinsky and Moss, Virology 190: 522~526, 1992に記載されている。

20

ウイルス粒子は、培養上清から、または溶解工程(例えば、化学的溶解、凍結/解凍、浸透圧ショック、超音波処理など)後の培養細胞から回収することができる。連続的なプラーク精製を、混入野生型ウイルスを除去するのに用いることができる。ウイルス粒子は、その後、当該技術分野において知られている技術を用いて(例えば、クロマトグラフィー法、または塩化セシウムもしくはショ糖勾配での超遠心分離により)精製することができる。

【0068】

本発明によるベクターは、ベクターが標的細胞に成功裏に導入されたことを確認するための、検出可能なおよび/または選択可能なマーカーをさらに含んでもよい。これらのマーカーは、限定されることなく、RNA、ペプチドもしくはタンパク質の産生などの活性をコードすることができ、または、RNA、ペプチド、タンパク質、無機および有機化合物もしくは組成物などのための結合部位を提供することができる。いくつかのケースでは、ドナープラスミドにより提供されるレポーター配列が、標的細胞内への導入を確認するためのマーカーとして用いられる。

30

検出可能な/選択可能なマーカー遺伝子の例は、限定されることなく、さもなければ毒性の化合物に抵抗性を与える産物(例えば、抗生物質)、さもなければレシピエント細胞に欠けている産物(例えば、tRNA遺伝子、栄養要求性マーカーなど)、遺伝子産物の活性を抑制する産物、酵素(例えば、ガラクトシダーゼまたはグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼなど)、蛍光タンパク質(GFP、CFP、YFP、BFP、RFP、EGFP、EYFP、EBFP、dsRed、これらの変異、修飾または増強形態など)、細胞表面タンパク質(すなわち、免疫アッセイで検出することができるもの)、をコードする核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどを包含する。

40

【0069】

マーカー遺伝子は、ワクチンベクターによるIL-15遺伝子の移行が成功したことを確認するため、および/またはIL-15を発現する組換え体を単離するためのマーカーとして用いることができる。

1つの側面においては、ワクチンベクターは、ワクチンベクターの細胞内への侵入を促進するためのウイルスカプシド分子を含む。さらに、ウイルスカプシド分子は、特定の細胞種への標的化および/または選択的な侵入を促進するための標的化部分を含ませるように操作することができる。好適な標的化分子は、限定されることなく、化学的結合物(ch

50

emical conjugate)、脂質、糖脂質、ホルモン、糖、ポリマー(例えば、PEG、ポリリン、PEIなど)、ペプチド、ポリペプチド(例えば、WO 94/40958参照)、ビタミン、レクチン、抗体およびそのフラグメントを包含する。好ましくは、かかる標的化分子は、樹状細胞(例えば、CD44など)などの抗原提示細胞または癌細胞の細胞特異的マーカーを認識し、これに結合する。

【0070】

抗原をコードする配列

抗原源は、担体に結合したポリペプチドまたはペプチドの形態で投与することができ、または、抗原をコードする核酸配列の形態で投与することができる。好ましくは、抗原源は、免疫系の1種または2種以上の応答を刺激する領域を含有し、これは、例えば、限定されることなく、免疫グロブリン応答、MHC/HLAクラスI応答、MHC/HLAクラスII応答、NK応答などを包含する。MHC/HLAクラスII媒介性の応答の場合、抗原源は、一般的に細胞内にリソソーム酵素によって放出され得、放出された場合に、MHC/HLAクラスIIエピトープに該当するペプチドセグメントを含む。

10

【0071】

合成抗原および改変抗原もまた、本明細書中に記載の方法に用いることができる。合成抗原は、その天然の対応物に比較して変更されたアミノ酸配列を有する(この態様においては、抗原は、ペプチドをコードする核酸よりも、むしろペプチドの形態で提供される)。また本発明の範囲に含まれるのは、任意に介在アミノ酸配列またはリンカーを含む、抗原のマルチマー(コンカテマー)である。複数の抗原が、多価抗原発現ユニットを形成する抗原発現ユニットによりコードされている場合、抗原は同じであっても異なってもよい。

20

【0072】

1つの側面においては、多価抗原発現ユニットは、同じか、または異なる抗原源からの、少なくとも1つのCTLエピトープ、少なくとも1つのヘルパーエピトープ、および少なくとも1つのB細胞エピトープを含む。異なるエピトープは、同じか、または異なるタンパク質からのものであってもよい。例えば、複数の抗原配列は、感染性生物の少なくとも2種の株(例えば、HIVおよびPneumocystis cariniiからの)からの抗原、単一の感染性生物のゲノムによってコードされる異なるポリペプチドからの抗原、または単一のポリペプチドからの抗原、例えば、異なる抗原性領域もしくは同じ抗原性配列の代表的な変異体、の組み合わせであってもよい。最後の態様においては、同じ抗原性配列の変異体を、特に易変性のペプチド配列(例えば、感染性生物内のもの)に対する免疫応答を誘導または増強するために用いてもよい。

30

【0073】

また本発明の範囲に含まれるのは、翻訳の最中または翻訳後に、例えば、リン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク分解性の開裂、抗体分子、膜分子もしくは他のリガンドへの結合により、異なって修飾された抗原性ペプチドである(例えば、Ferguson et al., Ann. Rev. Biochem. 57: 285~320, 1998参照)。

好適な抗原は、限定されることなく、癌/腫瘍抗原、自己抗原(例えば、移植片拒絶において認識される抗原など)、アレルゲン、過敏症に関連する抗原、プリオン抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫もしくは菌類からの抗原、および寄生虫抗原(これらの生物の細胞壁または細胞膜に見出されるタンパク質を特に含む)を包含する。

40

【0074】

特に、好適な抗原は、狂犬病(例えば、GenBank Accession No. M34678)、マラリア(Shetty, Lancet Infect Dis. 2(11): 648, 2002)、寄生虫感染症(例えば、住血吸虫症など)、ハンタウイルス(Meissner, et al., Virus Res. 89(1): 131, 2002, Padula, et al., J Gen Virol. 83(Pt 9): 2117~22, 2002, Hoffacker, et al., Nucleic Acids Res. 26(16): 3825~36, 1998)、黄熱病(Pugachev, et al., Vaccine 20(7-8): 996~9, 2002)、西 Nile 熱(Lanciotti, et al., Virology 298(1): 96~105, 2002)、麻疹(Crowley, et al., Intervirology 28(2): 65~77, 1987)、流行性耳下

50

腺炎 (Jin, et al., *Virus Res.* 70 (1-2) : 75~83, 2000)、風疹 (Dominguez, et al., *Virology* 177 (1) : 225~38, 1990)、灰白髄炎 (例えば、Kinnunen, et al., *J Gen Virol.* 72 (Pt 10) : 2483~9, 1991参照)、天然痘 (Massung, et al., *Virology* 201 (2) : 215~40, 1994、Mayr, et al., *Zentralbl. Bakteriolog. [B].* 167 (5-6) : 375~90, 1978、Aguado, et al., *J Gen Virol.* 73 (Pt 11) : 2887~902, 1992、Shchelkunov, et al., *Virus Res.* 36 (1) : 107~18, 1995参照)、炭疽、エボラ (Sanchez, et al., *Virus Res.* 29 (3) : 215~40, 1993)、ウマ脳炎 (Kinney, et al., *Virology* 170 (1) : 19~30, 1989)、リフトバレー熱 (Muller, et al., *Nucleic Acids Res.* 19 (19) : 5433, 1991)、ネコ引っ掻き熱 (例えば、Renesto, et al., *Res Microbiol.* 151 (10) : 831~6, 2000参照)、ウイルス性髄膜炎、マールブルグウイルス (上記Sanchez, et al., 1993)、A、B、C、D、およびE型肝炎 (概してGenBank参照)、日本脳炎 (例えば、GenBank Accession No. E07883)、デング熱 (例えば、GenBank Accession No. M24444)、ペスト (Parkhill, et al., *Nature* 413 (6855) : 523~7, 2001)、野兔病 (Karlsson, et al., *Microb. Comp. Genomics* 5 (1) : 25~39, 2000)、およびクラミジアおよびリケッチア病因を包含する、他の病原生物により起こる疾患に関連する生物のゲノムによりコードされる抗原である。

【0075】

特に好ましい抗原は、ヒトまたは家畜に病原性を有するウイルスのゲノムによってコードされる、ウイルスによりコードされたタンパク質である。非限定的な例は、残基365~80 (NP365-80)、NP50-63、およびNP147-58から構成されるインフルエンザ核タンパク質からのペプチド、および先にクラスI拘束細胞毒性アッセイで決定されたインフルエンザヘマグルチニンHA202-21およびHA523-45からのペプチド (Perkins et al., 1989, *J. Exp. Med.* 170: 279~289)を含む。関連する原虫抗原は、記載されている (例えば、米国特許第5,609,872号参照) マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* により表示されるエピトープに相当するペプチドを含む。パピローマウイルスコア抗原、HCV構造および非構造タンパク質、およびCMV構造および非構造タンパク質、エボラGP1またはGP2タンパク質 (例えば、Feldmann, et al., *Arch Virol Suppl.* 15: 159~69, 1999、Sanchez, et al., *J. Virol* 72 (8) : 6442~7, 1998、Volchkov, V. E., et al., *FEBS Lett* 305 (3) : 181~4, 1992参照)、または核カプシドタンパク質 (Vanderzanden, et al., *Virology*, 246 (1) : 134~44, 1998)もまた、抗原の給源を提供する。別の側面においては、抗原は呼吸器合胞体ウイルス (RSV) に由来するものである。例えば、RSVウイルス抗原は、糖タンパク質 (G-タンパク質) または融合タンパク質 (F-タンパク質) であってもよい。さらなる側面においては、抗原は、HSV-1およびHSV-2などの単純ヘルペスウイルス (HSV) に由来する。例えば、HSVウイルス抗原は、HSV-2からの糖タンパク質Dであってもよい。

【0076】

1つの好ましい側面においては、狂犬病ウイルスが抗原の給源を提供する。現在、多価狂犬病抗原は、イヌにおいて「有効な干渉」を示している。すなわち、1種または2種以上の抗原 (イヌジステンパーウイルス抗原、イヌアデノウイルス抗原、イヌコロナウイルス抗原、イヌパラインフルエンザ抗原、イヌパルボウイルス抗原、およびレプトスピラバクテリン抗原) を、狂犬病抗原と組み合わせて用いた場合、満足できる免疫応答を維持するのに失敗する。例えば、米国特許第5,843,456号参照。したがって、本発明による組換えワクシニアウイルスは、顕著に長期の免疫応答 (1年を超える) を維持するその能力のために特に有用である。

したがって、本発明の1つの好ましい側面においては、本発明によるワクチン組成物は、狂犬病抗原の給源 (すなわち、狂犬病抗原をコードする核酸) と、組換えIL-15を発現する配列とを含む。好適な狂犬病抗原の給源は、限定されることなく糖タンパク質Gを包含する。例えば、Wiktor, et al., *J. Immunol.* 110: 269~276, 1973参照。狂犬病抗原をコードする配列を含むベクターは、例えば米国特許第6,210,663号に記載されている。かかる組成物は、上記のように多価ワクチンを提供するために、追加の抗原源 (例えば

糖タンパク質 G の異なる部分を含む) を含んでもよい。

【0077】

1つの側面においては、好ましい抗原は天然痘抗原である。この態様においては、ワクシニアウイルス自体が、天然痘株へのその緊密な抗原上および遺伝子上の関連性のために、好適な抗原の給源を提供する。現在、Wyeth株などのワクシニアワクチンは、少数のワクチンにおいて、種痘性湿疹および脳炎を含む副作用を生じさせる可能性がある。天然痘が撲滅された時代においても、ワクチン接種を受けた100万人に約1250人がこれらの副作用に苦しんでおり、100万人に約1人が死亡している。2才未満の若年の小児が、特に被害を受けやすい。天然痘撲滅計画が再開されれば、集団内における免疫抑制状態にある個体のパーセントがより高いため(例えば、AIDSを有する個体または免疫抑制剤を使用している個体)、死亡数は増加すると思われる。さらに、一般人口における湿疹の有病率は、未知の理由により上昇している(Science 296: 1592~1595、2002、Smith, et al., Nature Reviews/Immunology 2: 521~526、2002参照)。これらの理由のため、より安全なワクチンが真に求められており、そしてWyethおよびMVAなどの株から生成された組換えIL-15を発現するワクチンは、この要求を少なくとも3つの方法で満たすことができる。第1に、ワクチンにIL-15発現配列を組み込むことにより、体液性および細胞媒介性免疫応答の両方が増大する。第2に、ヘマグルチニンなどの病原性関連遺伝子の、IL-15配列による挿入不活性化は、ウイルスの弱毒化をもたらす。第3に、発現されたIL-15自体が、NK細胞の活性化、ならびにインターフェロングammaおよびケモカインの産生の増強により、病原性の低減を導く。

10

20

【0078】

別の特に好ましい側面においては、AIDSなどの慢性疾患に関連する抗原(例えば、GenBank Accession No. U18552)が選択される。AIDSの病原因子は、病原性レトロウイルスである、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)である(例えば、Barre-Sinoussi, et al., Science 220: 868~870、1983、Gallo, et al., Science 224: 500~503、1984参照)。少なくとも2つの異なるタイプのHIVが存在する。HIV-1(上記Barre-Sinoussi, et al., 1983、上記Gallo, et al., 1984)およびHIV-2(Clavel, et al., Science 223: 343~346、1986、Guyader, et al., Nature 326: 662~669、1987)である。HIVのタイプは、株、分離株およびクレードにさらに分けることができる。

したがって、好ましくは、本発明による1つの側面においては、抗原は、種々のタイプのHIV(例えば、HIV-1およびHIV-2)、株(例えば、HIV-1のBH10およびpNL4-3株)、分離株、クレード(例えば、M群のクレードA、B、C、D、E、F、およびG)などを包含するHIVを包含する、病原性ウイルスからのものである。

30

【0079】

ウイルス抗原は、全長(gp160)、切断体(例えば、gp120およびgp41)のいずれかのHIVエンベロープタンパク質EnvなどのHIVエンベロープタンパク質であってもよく、これは挿入、欠失または置換により変更されていてもよい。HIVエンベロープタンパク質は、AIDS患者に存在する抗HIV抗体の主要抗原であることが示されている(例えば、Barin, et al., Science 228: 1094~1096、1985参照)。多くのHIV株からのHIVエンベロープをコードするアミノ酸およびRNA配列が知られている。Myers, G. et al., Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.M. (1992) 参照。

40

1つの好ましい側面においては、エピトープは、gp120ポリペプチドのV3領域、V1-V2領域、CD4結合サイト、C4領域、CCR5もしくはCCR3に関する結合領域などのCCR結合領域から選択される。V3ドメインにおける中和エピトープの位置はよく知られている。V2およびC4ドメインにおける中和エピトープが、それぞれ残基163と200との間および約420と440との間に位置することが見出された。さらに、抗体結合のための残基はまたV2ドメインにおける残基171、174、177、1

50

81、183、187、188、およびC4ドメインにおける残基429および432を包含する。例えば、Berman, et al. *Virology* 265: 1~9, 1999、およびBerman, *AIDS Res. Human Retroviruses* 15: 115~132参照。

【0080】

別な態様においては、本発明の組換えウイルスにより発現されるHIV抗原は、グリコシル化部位に欠失および/または変異を含む改変されたEnvタンパク質である。HIV-1のgp120は、N結合グリコシル化のための24の潜在的部位(Asn-X-Ser/Thr)を含む。24のグリコシル化部位のうち約13は、種々のウイルス分離株において保存されている。HIV-1 Envタンパク質の分析により、24の潜在的なグリコシル化部位のうち17が、炭水化物側差により修飾されていることが示され、そしてしたがって、Env gpタンパク質の多大なグリコシル化のために、gp120のペプチド骨格の非常に少ない領域が炭水化物塊から突出しているかも知れない。いくつかのグリコシル化部位は非中和エピトープで見つかっており、これは真の中和エピトープに対する免疫を希釈し、またはデコイ(decoy)エピトープとして機能する。したがって、これらのグリコシル化部位の欠失または変異は、真の中和エピトープのマスキングを取り除くことにより、抗原への免疫を増強し得る。例えば、Mizuochi, et al. *J. Biol. Chem.* 265: 8519~8524, 1990、およびLeonard et al., *J. Biol. Chem.* 265:10373~10382, 1990参照。

10

【0081】

他のウイルス抗原は、限定されることなく、HIV(gp17)などのカプシドタンパク質、またはTat、Vif、Vpr、Nef、およびRevなどのHIV調節タンパク質を包含する、全長野生型、改変、もしくはプロテアーゼ処理産物またはフラグメントを包含する。

20

他の好ましい抗原源は、HIVマトリックスタンパク質、またはGagである。Gag(gp24)は、異なるHIV株およびサブタイプの中で比較的保存されており、広いクラス交差的な(broad cross-class)抗Gag CTL応答が、HIV感染患者において証明されている。暴露されたが、血清反応陰性の対象の研究は、Gag特異的CTLが、持続的なHIV感染の成立に対する保護に関与し得ることを示している。さらに、Gag特異的CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球は、急性感染期中、ならびに感染の無症候期の間のウイルス量の制御に重要である。多数の別個のGagエピトープが記載されており、細胞毒性活性を示す。さらにまた、感染した未処置の者のp24特異的なCTL増殖応答のレベルは、Gag特異的CTLレベルと正の相関を有し、血清HIV-1RNAレベルと負の相関を有する。例えば、米国公開出願第20020160430号を参照。

30

【0082】

他の特徴化されたHIVエピトープは、Los Alamosにより毎年発行されるHIV Molecular Immunology Databaseに含まれている。例えば、HIV Molecular Immunology 2001、Bette T. M. Korber, Christian Brander, Barton F. Haynes, Richard Koup, Carla Kuiken, John P. Moore, Bruce D. Walker、およびDavid I. Watkins編、Los Alamos National Laboratory, Theoretical BiologyおよびBiophysics, Los Alamos, New Mexico. LA-UR 02-4663発行を、<http://HIV-web.lanl.gov/content/immunology/maps/maps.html>にて参照。

40

【0083】

1つの側面においては、特定のクレードに適合するHIV抗原性ペプチドがワクチン抗原を提供する。様々なクレード株の配列が当該技術分野において知られており、これは、クレードA (Accession No: HIV-1 92UG037WHO.0108HED)、B (Accession No: pNL4-3)、C (Accession No: HIV-1 92BR025WHO.109HED)、D (Accession No: HIV-1 92UG024.2)、E (Accession No: HIV-1 93TH976.17)、F (Accession No: HIV-1 93BR020.17)、およびG (Accession No: HIV-1 92RU131.9)を包含する。例えば、以下のペプチドを用いることができる: p17~SLFNTVATL(クレードA)、SLYNTVATL(クレードB)、pol A~

50

ILKDPVHG (クレード A)、ILKEPVHGV (クレード B)、p24~DRFFKTLRA (クレード A)、DLNMLNI (クレード A)、PPIPVGDIY (クレード A)、DLNMLNTV (クレード B)、DRFYKTLRA (クレード B)、PPIPVGDIY (クレード B)、nef~YPLTGWICY (クレード B)、YPLTFGWC F (クレード D)。これらは、アフリカのクレードで特によく見られるエピトープである。例えば、Rowland-Jones, et al. J Clin. Invest. 102 (9) : 1758~65、1998参照。

【0084】

対応するSIV配列もまた、本発明の範囲に含まれる。

上記で論じたとおり、本発明によるワクチン組成物は、複数の異なるタイプのワクチン抗原を提供し得る。例えば、HIVワクチンに関して、組成物は、上記の任意のHIV抗原の少なくとも2種を含むワクチン抗原源を提供し得る。抗原は、異なるHIVポリペプチド、異なる株、異なるクレード、または同じHIVポリペプチドの異なる領域からのものであってもよい。1つの側面においては、HIVポリペプチドの易変領域を代表するペプチドのパネルが提供される。ペプチドは、当該領域の既知の変異体であってもよく、および/またはランダムに生成した変異体を含んでもよい。

10

【0085】

別の側面において、本発明によるワクチン組成物は、少なくとも1つのHIV抗原源と、HIVウイルスに対する保護免疫応答を増強する抗原とを提供し得る。例えば、B型肝炎表面抗原からのユニバーサルT細胞エピトープ含有ペプチド(アミノ酸19~33)が、HIV gp120に特異的な抗体の産生を増強することが報告されている。例えば、Greenstein, et al., J Immunol. 148 (12) : 3970~7、1992参照。さらに別な側面においては、少なくとも1つのHIV抗原源が、Pneumocystis cariniiまたはBartonella henselaeなどのHIV感染に関連する感染性微生物の抗原源と共に提供される。

20

1つの好ましい多価の組み合わせは、gag、polおよびenvを含む。別の好ましい多価の組み合わせは、gag、polおよび逆転写酵素(RT)を含む。さらに別の多価の組み合わせは、gag、tatおよびnefを含む。

【0086】

本発明の別な側面においては、抗原源は、細菌抗原を含む。抗原の細菌性給源は、限定されることなく、Bacillus tuberculosis、Bacillus anthracis、動物にライム病を起こすスピロヘータBorrelia burgdorferi、およびネコ引っ掻き熱の病原因子であるBartonella henselaeを包含する(例えば、Renesto, et al., Res Microbiol. 151 (10) : 831~6、2000、Regnery, et al., Clin. Infect. Dis. 21:94-98、1995参照)。

30

寄生虫もまた抗原の給源となり、そして、限定されることなくクリプトスポリジウム、アイメリア、ヒストモナス、ロイコチトゾーン、トキソプラズマ、トリコモナス、リーシュマニア、トリパノソーマ、ジアルジア(例えば、GenBank Accession No. M33641)、プラスモジウム(例えば、GenBank Accession No. X53832)、鉤虫、回旋糸状虫症(例えば、GenBank Accession No. M27807)、住血吸虫症(例えば、GenBank Accession No. L08198)、トリパノソーマ症、アメーバ症、フィラリア症(例えば、GenBank Accession No. J03266)、ボレリア症の病原体、パベシア、およびタイレリアを包含する。かかる生物の抗原性ポリペプチドは、外皮タンパク質、病原性寄生虫のタンパク質などを包含する。

【0087】

好適な微生物性および寄生虫性抗原は、限定されることなく、ジフテリア、百日咳(例えば、GenBank Accession No. M35274)、破傷風(例えば、GenBank Accession No. M64353)、結核、細菌性および真菌性肺炎(例えば、Haemophilus influenzae、Pneumocystis cariniiなど)、コレラ、腸チフス、ペスト、細菌性赤痢、サルモネラ症(例えば、GenBank Accession No. L03833)、レジオネラ病、およびライム病(例えば、GenBank Accession No. U59487)を包含する疾患の原因となる既知の病原因子に、あるいはHB e Ag、HB c AgおよびHB s AgなどのB型肝炎抗原(例えば、S、pre-S1、もしくはpre-S2)、ORF5、ORF6(例えば、Blum, et al., TIG 5 (5) : 154~158、1989参照)、HBV pol抗原、もしくはC、E1、E2/NS1、NS2、NS3、NS4およびNS5などのC型肝炎抗原に由来すると考えられる。

40

50

【0088】

癌特異抗原もまた、本発明の範囲に含まれる。これらは、限定されることなく、Her-2/neu、gp100、MAGEタンパク質(MAGE1、例えば、GenBank Accession No. M77481、MAGE2、例えば、GenBank Accession No. U03735、MAGE3、MAGE4)、TAG-72、CEA、MART、チロシナーゼ関連タンパク1および2(TRP-1、TRP-2)(例えば、Boon et al., Immunol. Today 16: 334~336、1998参照)、CD20、Mucin1(例えば、GenBank Accession No. J03651)およびMucin2、p53(例えば、Harris, et al., Mol. Cell. Biol., 6: 4650~4656、1986参照、そしてGenBankにAccession No. M14694で寄託されている)、変異p53(例えば、GenBank Accession No. X54156およびAA494311)、p21/ras、p210/bcr-abl融合ポリペプチド、c-myc、p97メラノーマ抗原(例えば、GenBank Accession No. M12154)、血液抗原T、TnおよびシアリルTn、EGFの切断形態、ルイスY抗原、扁平上皮癌抗原(例えば、米国特許第5,763,164号に記載の配列参照)、前立腺特異抗原(PSA、Osterling, J. Urol. 145: 907~923、1991、GenBank Accession No. X14810)、上皮膜抗原(Pinkus et al., Am. J. Clin. Pathol. 85: 269~277、1986)、CYFRA21-1(Lai et al., 199Jpn. J. Clin. Oncol. 29: 421~421、1999)およびEp-CAM(Chaubal et al., Anticancer Res. 19: 2237~2242、1999)に由来するエピトープを含むポリペプチドを包含する。エプスタインバーウイルス遺伝子産物はまた、ホジキンリンパ腫ならびにパーキットリンパ腫およびその他のリンパ腫で発現される抗原性ポリペプチドをコードする。HTLV-1ゲノムの産物は成人T細胞白血病細胞で見出され、一方、ヒトパピローマウイルス(HPV)E6およびE7遺伝子産物は、子宮頸癌細胞において見出された。さらに、ヒトヘルペスウイルス8(HHV8)のゲノム産物はカポジ肉腫で見出された。

10

20

【0089】

移植抗原の例は、T細胞上のCD3受容体を含む。CD3受容体に対する抗体による処置は、循環しているT細胞を迅速に除去し、そしてほとんどの拒絶エピソードを改善することが示されている。

自己抗原の例は、IAS鎖を含む。IAS鎖からの18アミノ酸のペプチドによるマウスのワクチン接種が、実験的な自己免疫性脳脊髄炎に対する保護およびこれの処置をもたらすことが示された。全身性狼瘡を有する患者で見出された自己免疫ポリペプチドもまた、本発明の範囲に含まれる(例えば、GenBank Accession No. D28394、Bruggen et al., Ann. Med Interne 147: 485~489、1996)。さらなる抗原は、アミロイド抗原を包含する。

30

抗原性ペプチドはまた、Der p Iアレルゲン(Hoyne, et al., Immunol. 83: 190~195、1994)、ハチ毒ホスホリパーゼA2(PLA)(Akdis, et al., J. Clin. Invest. 98:1676~1683、1996)、カバノキ花粉アレルゲンBet v 1(Bauer, et al., Clin. Exp. Immunol. 107: 536~541、1997)、および多エピトープ性組換え草アレルゲンrKBG8.3(Cao, et al., Immunol. 90: 46~51、1997)などのアレルゲンを包含し得る。

【0090】

新規な抗原を、当該技術分野でよく知られた方法を用いて同定することもできる。任意の慣用の方法、例えば、サブトラクションライブラリー、正常細胞および腫瘍細胞の比較ノザンおよび/またはウェスタンブロット分析、遺伝子発現の連続分析(米国特許第5,695,937号)およびSPHERE(PCT W097/35035に記載)を、使用するための推定される抗原を同定するのに用いることができる。

40

2つの細胞系により発現される核酸配列の示差的スクリーニングは、癌細胞、そしてさらには癌細胞の特定の病期に特異的な抗原をコードする配列を選択するのに用いることができる。非標的細胞が正常細胞である場合は、示差的スクリーニングは、正常細胞に共通する核酸配列を除去または削減し、これにより正常細胞に存在する抗原に向けられた免疫応答が回避される。非標的細胞が正常細胞である場合は、示差的スクリーニングは、正常

50

細胞に共通する配列を除去または削減し、これにより正常細胞に存在する抗原に向けられた免疫応答が回避される。

【0091】

例えば、Kawakami et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3515~19に記載されている発現クローニングもまた、新規な腫瘍関連抗原を同定するのに用いることができる。簡潔に述べると、この方法では、腫瘍細胞に由来するmRNAに対応するcDNAのライブラリーを発現ベクターにクローニングし、そして標的細胞に導入し、その後、細胞傷害性T細胞と共にインキュベートする。T細胞応答を刺激することができるcDNAのプールを同定し、連続希釈法およびcDNAのより単純なプールの再試験により、T細胞を刺激することができ、したがって、腫瘍抗原をコードするユニークなcDNA配列が同定される。対応するmRNAの腫瘍特異性は、正常細胞および腫瘍細胞の比較ノザンおよび/またはウェスタンブロット分析により確認することができる。

10

【0092】

SAGE分析は、抗原発現細胞に発現されているヌクレオチド配列を同定することにより、CTLなどの拡大された免疫エフェクター細胞によって認識される抗原の同定に用いることができる。SAGE分析は、抗原発現集団および当該抗原を発現しない細胞からの相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を提供することから始める。両方のcDNAは、プライマーサイトに結合していてもよい。次に配列タグを、例えば、DNAを増幅するための適切なプライマーを用いて作製する。2つの細胞種の間これらのタグのセットにおける差異を測定することにより、抗原発現細胞集団に異常に発現されている配列を同定することができる。

20

【0093】

最適なエピトープおよび新規な抗原性ペプチドを同定する別の方法は、固相エピトープ回収(Solid Phase Epitope Recovery) (「SPHERE」)として知られる技法である。この方法は、PCT WO 97/35035に詳細に記載されている。MHCクラスI拘束性CTLエピトープをスクリーニングするのに用いられているが、この方法は、CTLよりもむしろ、例えば、抗原特異的MHCクラスII特異的T細胞系の刺激についてスクリーニングすることにより、クラスIIエピトープについてスクリーニングするように改変することができる。SPHEREにおいては、ペプチドライブラリーをビーズ上に合成し、ここで各ビーズは制御された方法で放出することができるユニークペプチドを含有する。溶出したペプチドは、任意の所望の複雑性を有するウェルを得るためにプールすることができる。一定の割合のペプチドをビーズから切断した後、これらを、上記のように、クラスIまたはクラスII応答を刺激するその能力についてアッセイする。陽性の個々のビーズを次に解読し、反応性のアミノ酸配列を同定する。全ての陽性物の分析により、試験されたT細胞応答を刺激する保存的に置換されたエピトープの部分的なプロファイルがもたらされる。ペプチドは、再合成し、そして、応答を確認するために再試験してもよい。また、特定の応答により許容される誘導体の完全な範囲を列挙するために、全ての保存的置換を表示する第2のライブラリー(最小の複雑性のもの)を合成することもできる。多数のT細胞系を同時にスクリーニングすることにより、交差反応エピトープの検索を容易にすることができる。

30

40

【0094】

ポリペプチド部分の好適な抗原部分は、関連するエピトープの合成と、当該技術分野における定法を用いた分析により容易に同定することができる(例えば、Manca et al. Eur. J. Immunol. 25:1217~1223, 1995, Sarobe, et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 7: 635~40, 1994, Shirai, et al., J. Immunol. 152: 549~56, 1994, Manca, et al., Int. Immunol. 5: 1109~1117, 1993, Ahlers, et al., J. Immunol. 150: 5647~65, 1993, Kundu and Merigan, AIDS 6: 643~9, 1992, Lasarte, et al. Cell Immunol. 141: 211~8, 1992, and Hosmalin et al., J. Immunol. 146: 1667~73, 1991参照)。

【0095】

単離ペプチドは適切な固相合成手法を用いて合成することができる(Steward and Youn

50

g、Solid Phase Peptide Synthesis、Freemantle、San Francisco、CA 1968)。好ましい方法は、Merrifield法である (Merrifield、Recent Progress in Hormone Res. 23: 451, 1967)。一度単離ペプチドが得られたら、それをクロマトグラフィー (例えば、イオン交換、アフィニティー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解度 (differential solubility) を包含する標準的な方法により、または、タンパク質生成のための任意の他の標準的な技術により精製することができる。免疫アフィニティークロマトグラフィーについて、1つのエピトープを、そのペプチドまたは関連ペプチドに対して作製され、かつ固定された支持体に付加された抗体を含むアフィニティークラムに結合させることにより単離することができる。あるいは、hexa-His (Invitrogen)、マルトース結合ドメイン (New England Biolabs)、インフルエンザ外被配列 (Kolodziej, et al., Methods Enzymol. 194: 508~509, 1991)、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのアフィニータグをペプチドに付着させ、適切なアフィニティークラム上を通過させることにより、簡単な精製を可能にすることができる。

【0096】

単離ペプチドはまた、タンパク質分解、各磁気共鳴、およびX線結晶学などの技術を用いて物理的に特徴化することができる。抗原ミミトープ (mimitope) を、コンホメーション依存性の中和抗体に結合するそれらの能力を決定することにより、コンホメーション依存性の抗原性エピトープを模倣するものについて選択することができる。

抗原性ドメインとして用いるための所望の抗原タンパク質の最も適切な部分の選択は、機能的スクリーニングにより行うことができる。具体的なスクリーニング手法は、抗原のタイプおよびその抗原活性についてのアッセイに依存する。抗原性は、抗原特異的な、MHC / HLAクラスIまたはMHC / HLAクラスII特異的T細胞系またはクローンの刺激により測定することができる。あるいは、抗原性は、in vivoにおいて、抗体、または抗原に特異的なT細胞を生成する能力の測定により決定することができる。

【0097】

1つの側面において、特定のHLAハプロタイプにより認識されるエピトープが同定される。例えば、HIV感染ドナーから末梢血単球 (PBMC) を得、および拡大培養物と、PHA刺激自己リンパ芽球による約1週間の再刺激により得る。CTLは、好適な培養培地、例えば、RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Glasgow, Scotland)、10% FCS (Gibco Life Technologies)、抗生剤、および10% Lymphocult T (Biotest, Solihull, England) (IL-2) などで、もう1週間培養する。

【0098】

標準的な⁵¹クロム放出アッセイは、⁵¹クロム (Amersham, Buckinghamshire, England) で標識し、HLA分子または対照ペプチド (例えば、インフルエンザ抗原など) に結合することが予想されるエピトープペプチドのプールにより、マイクロタイタープレートの多数の異なるウェル内で約50 μMでパルスしたHLA適合性または非適合性の標的Bリンパ芽球様細胞を用いて行う。HLA分子と反応し、CTL応答を刺激する、プールからの個別のペプチドを次に試験し、特異的に反応するペプチドエピトープを同定する。クロムをシンチレーションカウンター (例えば、Wallac, Gaithersburg, MDで入手可能なもの) で計数し、パーセント溶解を式 $100 \times (E - M / T - M)$ 、式中Eはクロムの実験的放出、Mは界面活性剤を含まない培地の存在下における放出 (すなわち、放出は、CTL応答のために起こる)、そしてTは5% Triton X-100界面活性剤の存在下における放出である。結果は、HIVペプチドの認識が、少なくとも2つの別個のアッセイにおいて対照ペプチドの > 10% 上である場合に陽性とみなされる。

【0099】

免疫原性部分はまた、動物モデルにおいて選択または確認することができる。例えば、HLA A2.1 / Kb トランスジェニックマウスは、ウイルス抗原のヒトT細胞による認識のためのモデルとして有用であることが示されている。インフルエンザおよびB型肝炎ウイルス系の両方において、マウスT細胞受容体のレパートリーは、ヒトT細胞により認識されるのと同じ抗原決定基を認識する。両方の系において、HLA A2.1 / Kb

トランスジェニックマウスで生じるCTL応答は、HLA A2.1ハプロタイプのヒトCTLにより認識されるのと実質的に同じエピトープに向けられている (Vitiello et al., J. Exp. Med. 173: 1007~1015, 1991, Vitiello et al., Abstract of Molecular Biology of Hepatitis B Virus Symposia, 1992)。特に、マウスにおけるCTLの誘導は、ヒトにおける細胞性免疫原性を予想するのに用いることができる (Warner et al., AIDS Res. and Human Retroviruses 7: 645~655, 1991参照)。

【0100】

代替的に、または追加的に、ポリペプチドの免疫原性領域は、生物の様々な病原性株もしくは病気 (例えば、自己免疫疾患など) に関連するポリペプチドの間で保存されている領域を同定するための、および/または特定のMHCハプロタイプに結合する領域を同定するためのコンピュータプログラム (例えば、Falk, et al., Nature 351: 290, 1991参照) を用いて同定することができる。多数のソフトウェアプログラムが当該技術分野において知られている。例えば、Peptgenは、重複するペプチドのマップを生成する。Motifscanは、HLA結合モチーフに基づいて、ポリペプチド配列を可能なエピトープについてスキャンし、一方ELF (エピトープ位置発見ツール) は、潜在的なCTLエピトープを同定するのに用いることができる。この分析から、ペプチドは適切なin vitroまたはin vivoアッセイにおいて確認することができる。

所望のエピトープのペプチド配列を単離および同定したならば、これらのエピトープをコードする配列を含む核酸を容易にシーケンシングすることができる。

【0101】

発現構築物 (すなわち、免疫原性部分または抗原コード配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む核酸分子) に組み込まれる免疫原性部分は、様々な長さであってもよいが、一般的には、核酸が、少なくとも約8~30アミノ酸長、より好ましくは8~24アミノ酸長の部分をコードするのが好ましい。上記で論じたとおり、いくつかの場合には、任意にリンカー配列で分離された、または適切なMHC/HLA分子による認識を容易にする補助配列に連結された、抗原の繰り返し単位を提供するのが好ましい。

【0102】

抗原コードベクター構築物

抗原性物質は、IL-15コードウイルスベクターと同時に、または当該ベクターの投与の直前または後に、宿主に投与することができる。

単離されたポリペプチドワクチンが宿主に注射された場合、抗原は、宿主細胞の外部から提示され、そして、ポリペプチドが適切にプロセッシングされず、かつ早いクリアランスを受けやすいため、しばしば、強い、持続性の免疫応答を生じない。したがって、好ましくは、抗原性物質は、抗原をコードする核酸を投与することにより提供される。

【0103】

プロモーターに作動可能に連結した少なくとも1つの抗原をコードする核酸配列を含む発現構築物は、線形のフラグメントまたは環状分子として、組換えIL-15ベクターと共に投与することができる。構築物は、ベクターの増幅のための少なくとも1つのタイプの宿主細胞 (例えば、大腸菌など) において複製するための少なくとも1つの複製起点をさらに含むことができる。抗原をコードする発現構築物は、宿主生物に、裸のDNAとして、または発現構築物の細胞内への侵入を促進するための1種または2種以上の分子を伴う送達ビヒクル中にて投与することができる。好適な分子は、限定されることなく、リポソーム、ポリペプチド、多糖類、リポ多糖類、カチオン分子、ウイルス粒子などを包含する。

抗原をコードする発現ユニットもまた、ウイルスベクターの形態で提供することができる。そして、ベクターは、組換えIL-15発現ベクターと同じであっても、または異なってもよい。1つの側面においては、ベクターは、ワクシニアウイルスベクターなどのボックスウイルスベクターである。別の側面においては、抗原をコードする発現ユニットは、IL-15をコードするウイルスベクターと同じものの一部である。1つの側面においては、抗原およびIL-15のいずれの発現も、個々のボックスウイルスプロモーター

10

20

30

40

50

知られており、例えば、Vogel、J. Clin. Invest. 102: 1758~1765に記載されている。

【0108】

このアッセイは、末梢血単核細胞(PBMC)からのペプチド特異的CTL媒介性のIFN- γ の放出を検出する。1つの側面において、アッセイを実行するために、96穴のニトロセルロースプレートをIFN- γ に対する抗体(例えば、Mabtech、Stockholm、Swedenから入手可能)で被覆し、そしてPBMCをウェルに種々の濃度(例えば、 2×10^5 、 10^5 および 5×10^4)で、好ましくはデュプリケートで設置する。好適な自己標的細胞をペプチドなし、または特定のドナーのクラスI HLAタイプにしたがって選択されたペプチドパネルの1つで、終濃度 $10 \mu\text{M}$ にてパルスし、プレートを 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で約16時間インキュベートし、PBMCによりIFN- γ を放出させ、抗体結合をモニタリングすることにより検出する。結合は、検出器とコンジュゲート抗体と、その後の色原体を用いて、当該技術分野でよく知られているように色の変化を検出することにより、視覚化できる。アッセイは、ペプチドでパルスされた標的細胞の約10%よりも大きな特異的溶解が、少なくとも2つの別個の実験における2つの異なるエフェクター/標的(E/T)比で得られた場合に陽性とみなす。対照アッセイは、同一の条件下で、同じクラスI対立遺伝子を有する非感染患者からの細胞を用いて行う。

10

【0109】

1つの側面において、本発明による組成物は、中和抗体の産生を惹起するものを同定するためにスクリーニングされる。中和抗体の存在は、ウイルス試料と抗体試料(例えば、ワクチン接種した患者の血清から得たもの)とを事前に混合し、PBMCまたは細胞系に接種し、好適な期間(例えば、約2週間まで)培養し、ウイルスの複製を測定するか(例えば、p24または逆転写酵素アッセイを介して)、細胞における細胞変性効果の欠如を検出することによって(例えば、トリパンブルーにより、または合胞体形成をモニタリングすることによる)検出することができる。感染性または細胞死の減少は、抗体試料がウイルスを中和することが可能であることを示す。感染性の減少は、p24または逆転写酵素レベルの抗体に暴露されていない対照と比較した減少により反映され、一方細胞死の減少は、有意に少ない細胞死および/または合胞体によって示される。

20

【0110】

PCRアッセイもまた、中和抗体の存在を検出するのに用いることができる。1つの側面においては、抗体およびウイルス試料を細胞と混合する。好適なインキュベーション期間の後、(例えば、2~5時間)、細胞を回収し、PCRを実行し、ウイルス配列(LTRまたはgag配列など)を検出する。増幅された産物の、抗体を欠いた対照と比較した減少は、中和(すなわち、より少ない感染イベント)の証拠である。抗体およびウイルス試料を混合し、細胞に適用する。数時間後、細胞を回収し、DNAを単離し、PCRを実行してLTRまたはgag領域DNAを検出する。PCR産物を定量し、抗体を欠く対照と比較する。中和は、より少ない感染イベントと相関するPCRシグナルの減少として定義する。

30

さらに別の側面においては、ウイルスの感染性を測定するためにMAGIアッセイを行う。このアッセイにおいては、Tatにより活性化される切断HIV-1 LTRに作動可能に連結された、CD4と、核に局在するように修飾されたガラクトシダーゼ遺伝子とにより安定にトランスフェクトされたHeLa細胞が用いられる。したがって、ガラクトシダーゼの発現は、Tatのレベルに依存しており、Tatは、今度は、ウイルスの存在に依存している。HeLa細胞は青染し、そして集団内の青色細胞の数は、接種物中の感染性粒子の数に比例する。

40

【0111】

ワクチン組成物の有効性はまた、選択された抗原のレベルおよび/または抗原と特異的に交差反応する抗体の血清中における存在をモニターすることにより評価することができる。例えば、HIVワクチンの有効性は、選択した時間間隔で、ウイルス力価を、例えば、HIVに特異的な抗体を用いた免疫アッセイを行うことなどによって測定することによりモニターすることができる。また、高感度の核酸ベースの試験を、例えば、EP 617,132

50

、WO 94/20640、WO 92/02526および米国特許第5,451,503号および第4,775,619号に記載されているように利用することができる。ウイルス量は、患者からの血漿、細胞または組織におけるHIV RNAの量を測定することによりモニターすることができる。患者のその後のモニタリングは、ワクチン接種療法の投与後の定期的な診断試験を含んでもよい。

ワクチンは、以下の例1~3にさらに記載のとおり、最初に非ヒト哺乳類（例えば、マウスまたは霊長類）において試験してもよい。例えば、接種マウスの免疫応答のアッセイは、より多くの抗体産生、T細胞増殖および本発明によるワクチン組成物に対する細胞傷害性T細胞応答を証明するのに用いることができる。ワクチンは、マウスにおいて高度に有効であるワクチン製剤がサルにおける適切な免疫応答をも惹起するか否かを決定するために、アカゲザルにおいて評価することができる。

10

【0112】

投与量および投与経路

本発明はさらに、組換えIL-15を発現するポックスウイルスベクターと、少なくとも1つの抗原源（すなわち、ワクチン抗原）とを含む医薬組成物を提供する。好ましくは、抗原源は、発現制御配列に作動可能に連結した少なくとも1つの抗原をコードする核酸配列を含む発現構築物である。また、好ましくは、組成物は、医薬的に許容し得る希釈剤、担体、または賦形剤担体を含む。さらに、ワクチンは、ワクチンの活性および/または保存期間を増大させるための水性媒体または水含有懸濁液を含んでもよい。媒体/懸濁液は塩、グルコース、pHバッファー、安定剤、乳化剤および保存剤を含んでもよい。

IL-15に加えて、他のアジュバントを含めることができ、これは、例えば、限定されることなく、ムラミルジペプチド、水酸化アルミニウム、サポニン、ポリアニオン、両親媒性物質、パチルスカルメットゲラン（BCG）、リポ多糖類エンドトキシン、キーホールリンペットヘモシアニン（GKLH）、およびサイトキサンを包含する。しかしながら、本発明において見出されたことは、IL-15が他のアジュバントの使用を要せずに長期の免疫応答を増強することができるということである。

20

【0113】

本発明はまた、IL-15をコードする組換えポックスウイルスと、抗原をコードする核酸とを含むキットを包含する。組換えポックスウイルスは、凍結乾燥形態で提供することができる、これは、例えば、等張で水性の生理食塩水バッファー中で再構成される。キットは、好適な担体、希釈剤または賦形剤を含有する分離した容器を含んでもよい。キットはまた、追加の治療剤、例えば、抗癌剤、ウイルス感染の症状を改善するための剤（例えば、プロテアーゼ阻害剤、シメチジン（Smith/Kline, Pa.）、低用量シクロフォスファミド（Johnson/ Mead, N.J.）など）、および免疫補助機能を提供するタンパク質（B-7など）をコードする遺伝子などを含んでもよい。1つの側面において、キットは、代替的にまたは追加的に抗原提示細胞を含む。さらに、キットは、成分を混合または組み合わせるための、および/またはキットの構成要素を投与するための説明書を含んでもよい。

30

【0114】

1つの側面において、本発明は、本発明による治療的に有効なワクチン組成物を投与する方法を提供する。所望の治療効果は、ウイルス量を低減またはなくすこと、CD4⁺および/もしくはCD8⁺T細胞またはワクチン抗原を認識する抗体の数を増加させること、CD4⁺T細胞の全体レベルを増加させること、抗原を認識する中和抗体のレベルを増加させること、疾患の症状の数または重篤度を低減すること、癌特異マーカーの発現を低減すること、腫瘍の大きさまたは増殖速度を低減すること、腫瘍の転移を防止すること、病原性生物による感染を防止することなどの、1または2以上を含む。治療効果は、生物学的マーカーおよび/または異常な生理学的応答を評価することにより、モニターすることができる。一般的に、本発明による組成物の有効な用量は、ワクチン抗原に対する免疫応答を、例えばワクチン抗原に特異的なメモリーT細胞が生成されるように調節することができるウイルス力価を含む。

40

【0115】

用量および投与手段の両方を、患者の条件（例えば、年齢、体重、一般的な健康状態）

50

、疾患を発症するリスク、または疾患の進行の状態に基づいて決定することができる。好ましい投与経路は、送達ワクチンベクターがポックスウイルスである場合は、皮内スカリフィケーションによるものである。

1つの側面において、組換えウイルスの有効量は、好ましくは、約 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ プラーク形成単位 (p f u) のウイルス / m l の濃度を含む生理食塩水約 10 μ l ~ 約 25 μ l の範囲である。

【0116】

本発明の好ましい側面においては、プライミング免疫を行い、その後、任意に、ブースター免疫を、プライミング免疫の約3~4週間後に行う。しかしながら、プライミング免疫後、少なくとも約4ヶ月、約6ヶ月、約8ヶ月、約12ヶ月、約10ヶ月、約16ヶ月、約18ヶ月、または約24ヶ月までは、次の免疫を提供する必要はない。1つの側面においては、ワクチンはワクチン抗原に暴露したことがない患者、例えば、HIV陰性の患者に投与される予防ワクチンである。別の側面において、ワクチンは、ワクチン抗原について血清反応陽性である者に(必ずしも症状を示さなくてもよい)(すなわち、例えば、HIV陽性個体などに)、治療的に投与される。さらなる側面においては、ワクチンは免疫不全個体に投与される。この側面においては、ワクチンは、好ましくはMVAまたはAVIPOXなどの複製欠損ウイルスに由来する。

10

【0117】

例

これから、本発明を以下の例を参照してさらに例証する。当然のことながら、以下は単なる例示を目的とするものであり、依然として本発明の範囲に含まれる細部の変更はなされてもよい。

20

【0118】

例1 二重組換えHIV gp160/IL-15は、細胞性免疫応答の規模と持続時間を増大させる

免疫刺激性サイトカインとのHIV抗原との共送達により強靱な免疫応答をもたらすことを示すために、HIV-1 gp160をヒトIL-2またはヒトIL-15とタンデムで発現する2種の組換えワクシニアウイルスを作製した。American Type Culture Collectionから商業的に入手可能なWRワクシニア株(ATCC No. VR-119)の組換えのために、ヒトIL-15遺伝子のコード領域をトランスファーベクターpSC11にクローニングした。

30

ヒトIL-15を発現する組換えワクシニアを作出するために、開始コドンATG上流の3個のヌクレオチド、および、終止コドンTGAと、終止コドン下流の4個のヌクレオチドとを含むIL-15の全コード領域を含むIL-15のコード領域を用いた。IL-15配列を得たプラスミドは、Burton, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4935 ~ 4939に記載されている。

【0119】

ヒトIL-2を発現する組換えワクシニアを作出するために、ヒトIL-2遺伝子のコード領域を、ATCCカタログ番号39673から得たpTCGF-11プラスミドから、コード配列に加えて、開始コドンATG上流の17個のヌクレオチド、および、終止コドンと終止コドン下流の250個のヌクレオチドとを含むIL-2の全コード領域を含む0.8kbのPst-1フラグメントとして得た。

40

pSC11トランスファーベクター(例えば、Toth, et al., Vet. Microbiol. 45(2-3): 171~83、1995参照)を、IL-2またはIL-15を、ワクシニアゲノムのチミジンキナーゼ(「tk」)遺伝子座へ組み込むために用いた。サイトカインのみを担持する組換え体(例えば、IL-15ワクシニアまたはIL-2ワクシニア)においては、それぞれのサイトカインは、tk遺伝子座に、ウイルスtk遺伝子の挿入不活性化を伴って組み込まれた。

【0120】

原型のpVOTE1ベクターは、Ward, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 677

50

3に記載されている。pVOTE1を改変するにあたり、Apa-IサイトとSma-Iサイトとの間のDNA配列を除去し、早期/後期ワクシニアプロモーター:5'-CACCCATAAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAAGAACAGTGACGGATCCC-3'に置換した。その後、この改変プラスミドを、ワクシニアゲノムのヘマグルチニン遺伝子座へIL-2またはIL-15を組み込むために用いた。HIV gp160と、IL-2またはIL-15のいずれかをと、両方とも発現する二重組換え体においては、gp160を含むHIVワクシニアウイルスベクターをEarl, et al., J. Virol. 65: 31~41, 1991に記載のとおりtk遺伝子座に組み込み、そして、ヒトIL-2またはIL-15コード配列のいずれかを組み込むために、IL-2またはIL-15のいずれかを含む改変pVOTEトランスファーベクターをヘマグルチニン遺伝子座に挿入した。

【0121】

14ヶ月の期間にわたってウイルス組換え体を接種されたマウスの免疫応答は、CTL活性に関して、その規模および持続時間の両方において著しく異なっていた。近交系Balb/c雌マウスは、100 μ lの容積中の6 \times 10⁶ pfuにより皮下に(尾根部に)免疫した。3~4週間後、動物を、最初の免疫と同じ用量のそれぞれのウイルスでブーストした。

図1および2に示したデータは、HIV-1 gp120ペプチドでパルスした標的細胞に対して細胞溶解活性を示すCD8⁺細胞を表したものである。各群の動物からの脾臓CD8⁺T細胞をin vitroで1.0 nMの免疫優勢HIV gp120 V3ループペプチドP18-I10で7日間刺激した。これらのin vitroで刺激した細胞を、5時間の⁵¹Cr放出アッセイにおいて、同種のペプチドでパルスした標的細胞、P815線維芽細胞(H-2D^dハプロタイプ)を溶解するエフェクター細胞として用いた。早期応答はIL-2群がより優勢であったが、後期においては、IL-15群がより強靱な応答を示した。

【0122】

図から分かるとおり、組換えIL-15ベクターを受けたマウスにおける抗原特異的CTL応答は、組換えIL-2を受けたマウスにおいて観察されたCTL応答よりもはるかに長く、例えば、最初の注射後少なくとも14ヶ月間持続した。

抗原特異的CD8⁺の存在は、標識H2D^d-p18-I10テトラマーを用いて、Klenerman, et al., Nature Reviews/Immunology 2: 263~272, 2002に記載のアッセイにより定量した。図3に示すとおり、免疫優勢gp120について陽性のCD8⁺T細胞は、テトラマー染色により決定したところでは、両群のマウスに存在した。組換えIL-15を受けたマウスは、組換えIL-2を受けたマウスのおよそ4倍多いgp120特異的CD8⁺T細胞を含んでいた。

【0123】

図4に示すとおり、14ヶ月の時点で、免疫優勢HIV-1 gp120ペプチドへの暴露に際して γ -インターフェロンを産生するCD8⁺T細胞(すなわち、メモリーCD8⁺細胞)が、gp160とともにIL-15を発現するワクシニアによりワクチン接種されたマウスにおいて、gp160とともにIL-2を発現するワクシニアによりワクチン接種されたマウスに比べてはるかに高いレベル(約4倍)で存在しており、これは、メモリーCD8⁺細胞の長期の増強を示すものである。

したがって、用いたすべての試験において、HIV gp160/IL-2製剤を受けたマウス群は、初期にgp120特異的CTL活性をもたらすことにより活発に应答する一方、このCTL応答の持続時間および規模は、比較的短命であった。この群におけるCTL活性のレベルは、ワクチン接種後約120日までに、ワクチン接種していない対照群のベースラインレベルに低下した。これに対し、gp160/IL-15製剤を受けたマウス群は、高レベルのgp120特異的CTL活性を、ワクチン接種後14ヶ月を超えて維持した(図1と図2を比較されたい)。

【0124】

例 2 二重組換え抗原/IL-15 構築物は、体液性免疫応答を増強する

ワクチン接種した動物の血清中の HIV gp120 に特異的な抗体のレベルを当該技術分野における定法を用いた ELISA により評価した。HIV gp160 のみを発現するワクチンによりワクチン接種したマウスにおける gp120 特異抗体のレベルは、ワクチン接種後 8 ヶ月において検出不能であった（すなわち、ワクチン接種していない動物と違いはなかった）。しかしながら、HIV gp160 を IL-15 とタンデムに発現する二重組換えワクチンによりワクチン接種したマウスは、高レベルの gp120 特異抗体を、この遅い時点においてさえ表示していた（図 5 参照）。

【0125】

例 3 組換え Her-2/neu ワクチンベクター

Ye, et al., Mol. Cell. Biol. 16: 6178~6189, 1996 に記載されたヒト Her-2/neu をコードする配列を含むプラスミドを用いて、Her-2/neu のコード領域を得、これを次に pSC11 にクローニングし、そしてワクチニアの WR 株の tk 遺伝子座に組み込み、Her-2/neu ワクチニアウイルスベクターを作製した。Her-2/neu/IL-15 二重組換え体は、IL-15 を、組換え Her-2/neu ワクチニアベクターのヘマグルチニン遺伝子座に、IL-15 を含む改変 pVOTE ベクターを用いて組み込むことにより作製した。

組換え体は、WR 株 (ATCC# VR-119)、Wyeth 株 (ATCC# VR-1536) および MVA 株 (ATCC-VR1508) のバックボーンにおいて作出し、動物は、上記の例に記載されているとおりにワクチン接種した。

【0126】

Her-2/neu 癌遺伝子を IL-15 とタンデムで発現する組換えワクチニアでワクチン接種した動物はまた、肺癌のマウスモデルにおいて、増強された細胞性および体液性免疫応答を示した。このモデルでの、哺乳類組織における Her-2/neu 癌遺伝子の特異的な過剰発現は、トランスジェニック動物の乳腺における自然発生的な腫瘍形成を導く（例えば、Guy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 10578~10582, 1992 参照）。Her-2/neu 癌遺伝子を IL-15 とタンデムで発現する組換えワクチニアウイルスでワクチン接種した動物は、Her-2/neu 癌遺伝子のみを発現する組換えワクチニアウイルスでワクチン接種した動物よりも低減した全身腫瘍組織量（図 6 および 7 参照）、およびより高レベルの Her-2/neu 特異抗体（図 8 参照）を示した。

【0127】

したがって、IL-15 をワクチンウイルススペースのワクチン製剤に組み込むことにより、ワクチン抗原に対して、それがウイルス抗原であるかまたは癌特異抗原であるかにかかわらず、細胞媒介性免疫ならびに抗体媒介性の体液性免疫の両方が増大する。感染性疾患または癌のいずれかのためのワクチニアベースのワクチンを開発するにあたり、所望の免疫応答が、ワクチン接種を受けた対象において長期の細胞媒介性免疫および抗体媒介性体液性免疫を達成することである場合、例えば、HIV または天然痘のケースのような場合には、IL-15 を組み込むことによってよりすぐれたワクチンがもたらされる。また、要求される免疫応答が確実な抗体免疫応答である狂犬病ワクチンなどのサブユニットワクチンの場合においても、IL-15 を組み込むことは有益であり得る。狂犬病感染の暴露後において示されているように、抗狂犬病抗体の投与は、狂犬病の発症を有効に防ぐことができる。例えば、Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, MMWR 1999 48 (No RR-1): 1~21 (<http://www.cdc.gov/mmwr> で入手可能) を参照。このことは、十分に有効な抗体レベルのみで、細胞媒介性免疫応答の一切の関与なしに、狂犬病などのワクチン抗原に対する保護を提供することができることを示すものである。

【0128】

例 4 非ヒト霊長類における免疫応答の増強

上記の例は、ワクチンウイルススペースのベクターに免疫刺激性サイトカインを組み込むことにより、ワクチン接種対象における免疫応答を有意に増強することができるという概念を強化するものである。非ヒト霊長類における、ワクチン抗原に対する長期の保護免疫

10

20

30

40

50

応答の生成を証明するために、H I V - 1 エンベロープ遺伝子を S I V g a g および p o l 遺伝子と共に担持する、M V A (改変ウイルス A n k a r a) 組換え 8 9 . 6 e n v - g a g - p o l ウイルス (Amara, et al., Science 292: 6974, 2001 参照) を用いて、相同組換えおよび I L - 1 5 配列を含む p V O T E 改変ベクターのヘマグルチニン遺伝子座への挿入により、I L - 1 5 を発現する二重組換え体を作成した。多価 M V A ベクターの構築は、上記 Amara, et al., Science, 2001 に一般的に記載されている。比較の目的で、同じ抗原を I L - 2 と一緒に発現する二重組換え株 (ヘマグルチニン遺伝子座への組み込みに p V O T E 改変ベクターを使用) もまた作成した。

【 0 1 2 9 】

2 3 頭の幼若アカゲザル (Macaca mulatta) のコホートを、上記に記載のとおりにより作成した二重組換え M V A ウイルスを対象とした免疫化研究に用いる。主要組織適合複合体 (M H C) クラス I 対立遺伝子 M a m u - A * 0 1 を発現する動物を用いるか、または、代替的に、この対立遺伝子を発現するものを同定するために、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 分析を用いて動物をタイピングする。プライマー A*01/R (5' -GAC AGC GAC GCC GCG AGC CAA-3') および A*01/R (5' -GCT GCA GCG TCT CCT TCC CC-3') を、M a m u - A * 0 1 を有するサルを同定するのに用いる。 10

現在、テトラマー技術が、特定の抗原に特異的な C D 8 + 細胞を定量的に評価することにおいて信頼できる技術であることは受け入れられている。アカゲザルにおいて最も信頼性が高く、かつ最も良く研究されている S I V m a c g a g ポリペプチドのための C T L エピトープは、H L A - A 相同分子 M a m u - A * 0 1 によって拘束されている。したがって、M a m u - A * 0 1 ハプロタイプを有するサルを得ることにより、テトラマー M a m u - A * 0 1 / S I V g a g エピトープを用いて、ワクチン接種した動物において C D 8 + T 細胞応答を正確に定量することが可能となる。例えば、Juroda, et al., J. Exp. Med. 187: 1373 ~ 1381, 1998 参照。 20

【 0 1 3 0 】

動物を 5 群に分け、以下のプロトコルに従って、 10^9 p f u の組換え M V ワクシニアウイルスを皮内にワクチン接種する：

- i) 5 頭の動物は、S H I V 抗原を発現する M V A ワクシニアを受ける；
- i i) 5 頭の動物は、S H I V 抗原を I L - 2 と共に発現する、二重組換え M V A ワクシニアを受ける； 30
- i i i) 5 頭の動物は、S H I V 抗原を I L - 1 5 と共に発現する、二重組換え M V A ワクシニアを受ける；
- i v) 4 頭の動物は非ワクチン接種対照として残されるが、病原性 S H I V 8 9 . 6 P ウイルスを、ワクチン接種動物をこのウイルスでチャレンジする時に、感染させる；そして
- v) 4 頭の動物は実験の間中ワクチン接種および感染を受けないままであり、健常対照とする。

【 0 1 3 1 】

最初のワクチン接種に引き続き、動物は、4 週間間隔で 2 回、それぞれのウイルスでブーストし、その免疫学的パラメータを最後のブースター接種後 8 ヶ月間モニターする。各個の動物から 4 週ごとに血液を採取し、細胞性および体液性免疫応答をモニターするために次のアッセイを行う。動物を一度チャレンジしたら、免疫学的パラメータの毎月の評価を、感染動物において、実験の終了または罹患動物の安楽死まで継続する。 40

【 0 1 3 2 】

血清は、最初に、スクリーニング試験として、E L I S A アッセイを用いて、オリゴマー H I V エンベロープ g p 1 4 0 への抗体について試験する。Chen, et al., Nature Medicine 7: 1225 ~ 1231, 2001 に記載されているものを参照。各動物から連続的に採取した血清試料からの選択した血清検体のウイルス中和アッセイを行い、S H I V 8 9 . 6 ウイルスに感染した M T - 2 細胞を用いて、Rose, et al., Cell 106: 539 ~ 549, 2001 に記載されたアッセイにより、中和抗体の力価を決定する。抗体の力価は、体液性応答の規模および持続時間に対する I L - 2 および I L - 1 5 の効果を確かめるために測定する。し 50

かしながら、SHIV89.6ウイルスに対する中和抗体は、チャレンジウイルスSHIV89.6Pの抑制に影響しないようであるが、これはこれらの抗体が交差中和性ではないからである。

【0133】

Mamu-A*01組織適合型を発現する動物については、ドミナントGag-CM9エピトープを認識するCD8⁺T細胞の頻度を、Mamu-A*01テトラマーを用いて決定する。Mamu-A*01型以外の動物については、Gagポリペプチド全体中のエピトープを認識するT細胞の頻度を、重複ペプチドのプールを用いて決定する。例えば、上記Amara, et al., 2001に記載のものを参照。末梢血単核細胞(PBMC)を重複gagペプチドのプールでパルスした後、細胞内 - インターフェロンの発現および表面CD4またはCD8の発現のための二重標識を行う。好適なモノクローナル抗体は、例えば、Biosource International, Camarillo, CAから商業的に入手可能である。アッセイの方法は、Rose, et al., Cell 106: 539~549, 2001に記載されている。

10

【0134】

免疫パラメータとワクチン接種動物における疾患の進行との間の相関関係を明らかにするために、上記のように処置した動物を、SHIV89.6の病原性派生体、すなわちSHIV89.6Pでチャレンジした。SHIV89.6PはR5/X4エンベロープを担持し、かつCD4⁺T細胞の早期の減少を誘導する。ワクチン接種をしていない動物においては、これは、AIDS様疾患の早期の発症を伴う。動物は、ワクチン誘導性エフェクター免疫応答がピークレベルではないが、メモリー相がウイルスチャレンジに対する免疫応答を決定づける上でより重要な時期である、ワクチン接種後8ヶ月にチャレンジする。ほとんどのHIV-1感染が粘膜表面を超えて伝達するため、13粘膜感染用量(mucosal infectious dose)の無細胞SHIV89.6Pウイルスを直腸内投与する。

20

【0135】

上記のアッセイに加えて、以下のアッセイを行う。

感染動物の臨床評価

サルを、ルーチンの血液学的検査および血液化学分析により、ウイルスチャレンジ後定期的に(1ヶ月1回)、臨床的にモニターする。

チャレンジ後のウイルス量の定量

血漿中のウイルス量を、1mlあたり200ウイルスRNAコピー当量(copy equivalent)の検出限界のリアルタイムPCRを用いてSHIV RNAを検出することにより、毎週評価する。血漿ウイルス血症が陰性に転じた場合、感染動物のPBMCからのウイルスの増殖を共培養技術によって試みる。

30

CD4⁺Tリンパ球の計数

末梢血CD4細胞の計数は、感染動物におけるCD4細胞の任意の減少を検出およびモニターするために、ウイルスチャレンジ後毎週行う。Rose, et al., Cell 106: 539~549, 2001。

各個の動物において別個に、連続的に免疫学的パラメータをモニターすることにより、少ない試料数および実験コホートにおける任意の遺伝的不均一性にもかかわらず、信頼性が高くかつ有意義な情報が最大化する。

40

【0136】

リンパ節生検

感染動物からのリンパ節生検を3ヶ月間隔で行い、それについて細胞形態学的分析を行って、濾胞構造の完全性、胚中心の拡大または萎縮を評価し、そして濾胞および傍皮質の減少または過形成の存在を同定する。さらに、SHIV89.6PウイルスRNAの存在を、リンパ節材料におけるin situハイブリダイゼーションにより評価する。

SHIV89.6Pウイルス中和抗体

オリゴマーHIVエンベロープgp140についてのELISA抗体力価、ならびにSHIV89.6およびSHIV89.6Pに対する中和抗体の存在を、SHIV89.6Pによるチャレンジの後、月単位で決定する。例えば、Chen, et al., Nat Med. 7: 1225

50

~ 31、2001、Shibata、et al.、Nat. Med. 5: 204~10、1995参照。

【0137】

例5 CTL活性のIL-15による増強

ウイルス病原体および癌に対する理想的なワクチンは、高活性のCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導するはずであり、かつワクチンにより提供される免疫は長期間持続すべきである。図9に図解されているとおり、高活性のCD8⁺CTLは、ウイルス感染および腫瘍モデルにおいてより低い密度の抗原を認識することによって、より有効かつより保護的な免疫を提供する。これに対して、低活性のCD8⁺CTLは、有効性の低い免疫を提供するか、または免疫を提供しない。例えば、Ansari、et al.、: Cell. Immunol. 210(2): 125~42、2001、Gray、et al.、J. Virol. 75(21): 10065~72、2001、Oh、et al. J. Immunol. 170(5): 2523~30、2003、Pittet、et al.、J. Immunol. 171(4):1844~9(2003)、Romieu、et al.、J. Immunol. 161(10): 5133~7、1998参照。

10

高活性CD8⁺CTLは、共刺激シグナルを増大することにより、および適切にブーストすることにより、選択的に誘導することができる。本明細書に開示のとおり、長期持続性の免疫はまた、IL-15を分子ワクチンアジュバントとして用いることによっても達成することができる。

【0138】

上記の例において示したとおり、IL-15は、長期持続する免疫をもたらすため、IL-15をHIVワクチン用のアジュバントとして用いることができる。IL-15はまた、高活性CD8⁺CTLの死をブロックすることができる抗アポトーシスタンパク質の発現を増大させることに関与している。gp160(vPE16)、gp160とIL-15(vPE16/IL-15)、またはgp160とIL-2(vPE16/IL-2)を発現する組換えワクチニアで免疫した動物は、CD8⁺CTLにおいて広範な機能的活性を誘導した。CD8⁺CTLの活性の幅は、免疫後の期間に依存して狭くなった。しかしながら、驚くべきことに、IL-15によって誘導されたCD8⁺CTLは、vPE16およびvPE16/IL-2によって誘導されたCD8⁺CTLよりも10倍低い、および100倍低い量の抗原に応答した。図10に示すとおり、IL-15によって誘導されたCD8⁺CTLは、ブースト後14ヶ月においてより低い密度の抗原に応答した。図11A~Dに示すとおり、この差は、免疫後の時間と共に拡大した。図12A~Cおよび図13A~Cに示すとおり、長期にわたる増大した活性は、CD8⁺CTLの増大した特異的細胞溶解活性と相関する。この効果は、低濃度のペプチド(0.001μM)(図13A~C)で増殖したCD8⁺CTLにおいてより明確であった。同様に、IL-15によって誘導された高活性CD8⁺CTLは、in vivoにおいて、ブースト後14ヶ月までのより長い期間存続した(図14AおよびB)。

20

30

【0139】

さらに、異なる活性度を有するCD8⁺T細胞におけるIL-15Rの発現レベルが異なっていることが見出された(示さず)。高活性CD8⁺T細胞は、IL-2RまたはIL-7Rではなく、IL-15Rを高レベルで発現したが、これは、CD8⁺CTL上のIL-15Rおよびin vivoにおけるIL-15が、異なる活性度のCD8⁺CTLの一生を制御していることを示唆するものである。この結果と一致して、データは、高活性CD8⁺CTLが増大したレベルのアポトーシスタンパク質を発現し、IL-15に反応して、低活性のCD8⁺CTLよりも良好に増殖したことを示した。これらの知見は、IL-15が選択的に高活性CD8⁺CTLの維持に貢献する機構を支持するものである。さらに、高活性CD8⁺CTLは、より高レベルのCD8を発現する。

40

これらの結果は、IL-15が、プライミングの時点で、より高い活性およびより長い寿命を有する異なる表現型のCTLを選択および誘導し、IL-15がアジュバントとして含まれた場合に、より有効なCTL免疫をもたらすことを示すものである。

【0140】

当業者において、本明細書中に記載されている事項の変更、改変およびその他の実施は

50

、本発明の精神および範囲から逸脱することなく行われるだろう。

上記に同定されたすべての参考文献、特許および特許出願は、その全体を明示的に参照により本明細書に組み込む。

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1】IL-15およびgp160抗原の両方、IL-2およびgp160の両方、またはgp160単独を発現する本発明の組換えワクシニアウイルスを受けた2ヶ月後のマウスから得たCD8⁺T細胞による、HIV-1 gp120ペプチドによりパルスした細胞の特異的溶解のパーセントを示したグラフである。「E/T」は、エフェクター/標的細胞比を示す。

10

【図2】IL-15およびgp160抗原の両方、IL-2およびgp160の両方、またはgp160単独を発現する本発明の組換えワクシニアウイルスを受けた14ヶ月後のマウスから得たCD8⁺T細胞による、HIV-1 gp120ペプチドによりパルスした細胞の特異的溶解のパーセントを示したグラフである。「E/T」は、エフェクター/標的細胞比を示す。

【図3】免疫後の種々の時期の非免疫マウス、HIV gp160を発現する組換えワクシニアウイルスを受けたマウス、およびgp160およびIL-15またはIL-2を共発現するワクシニアウイルスを受けたマウスの、新鮮な脾臓における、免疫後の種々の時期での、HIV gp120 V3ループペプチド(P18-I10)テトラマー陽性CD8⁺T細胞のパーセントを示した棒グラフである。

20

【0142】

【図4】免疫後の種々の時期の非免疫マウス、HIV gp160を発現する組換えワクシニアウイルスを受けたマウス、およびgp160およびIL-15またはIL-2を共発現するワクシニアウイルスを受けたマウスにおける、HIV gp120 V3ループP18-I10ペプチドでパルスした細胞に暴露した際の、IFN産生CD8⁺T細胞のパーセントを示した棒グラフである。

【図5】非免疫マウス、HIV gp160を発現する組換えワクシニアウイルスを受けたマウス、およびgp160およびIL-15またはIL-2を共発現するワクシニアウイルスを受けたマウスにおける、免疫の8ヶ月後の抗gp120抗体の力価を示した図である。

30

【図6】Her-2/neu、Her-2/neuおよびIL-15の両方を発現する組換えワクシニアウイルス、または対照ワクシニアウイルスを受けてから様々な時間間隔経過時における担癌マウスの数を示したグラフである。

【図7】Her-2/neu、Her-2/neuおよびIL-15の両方を発現する組換えワクシニアウイルス、または対照ワクシニアウイルスを受けた後の担癌マウスにおける腫瘍数を示したグラフである。

【0143】

【図8】Her-2/neu、Her-2/neuおよびIL-15の両方を発現する組換えワクシニアウイルス、または対照ワクシニアウイルスを受けたマウスの血清中の、抗Her-2/neu抗体のレベルを示した図である。

40

【図9】CD8⁺CTLの反応性が、CD8⁺CTL媒介性の免疫の有効性を決定することを図解した図である。

【図10】IL-15で誘導されたCD8⁺CTLが、ブーストの14ヶ月後において、より低い密度の抗原に反応することを示したグラフである。

【0144】

【図11】IL-15で誘導されたCD8⁺CTLが、より低い密度の抗原に反応す

【図12】高濃度のペプチド(0.1 μM)で拡大させたCD8⁺CTLの細胞溶解活性を示したグラフである。

【図13】低濃度のペプチド(0.001 μM)で拡大させたCD8⁺CTLの細胞溶解活性を示したグラフである。

50

【図14】IL-15で誘導された高反応性CD8⁺CTLが、in vivoでより長期間持続することを示したグラフである。

【図1】

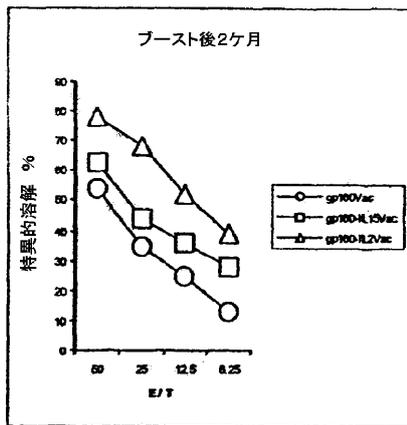


図1

【図2】

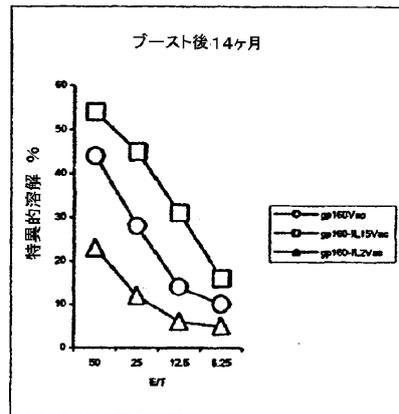


図2

【 図 3 】

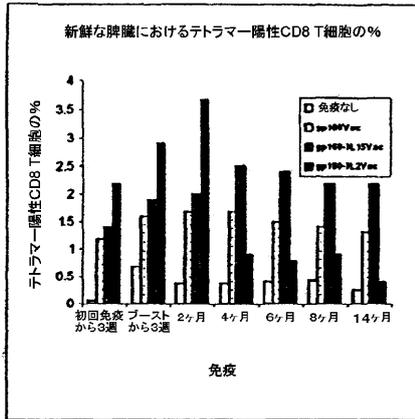


図3

【 図 4 】

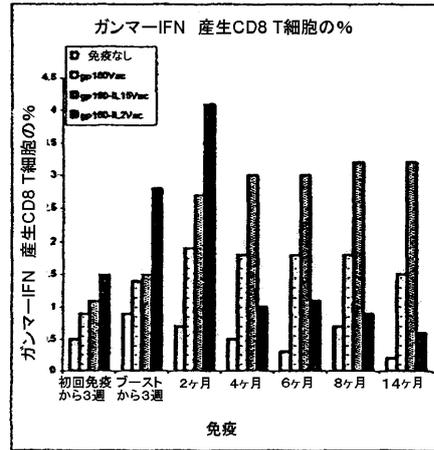


図4

【 図 5 】

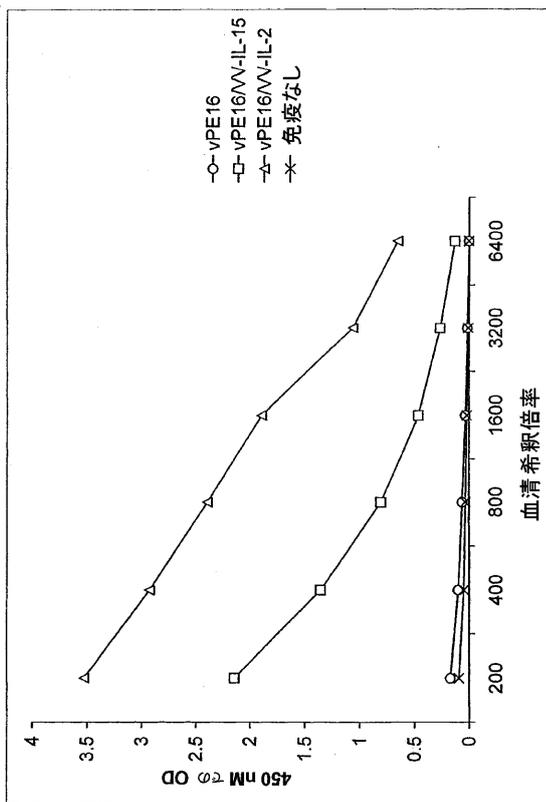


図5

【 図 6 】

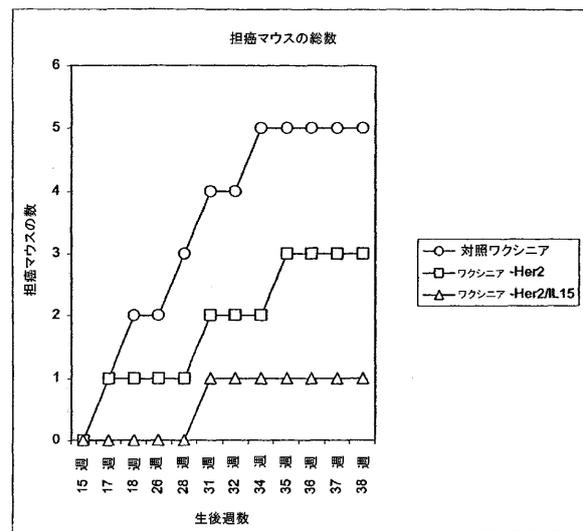


図6

【 図 7 】

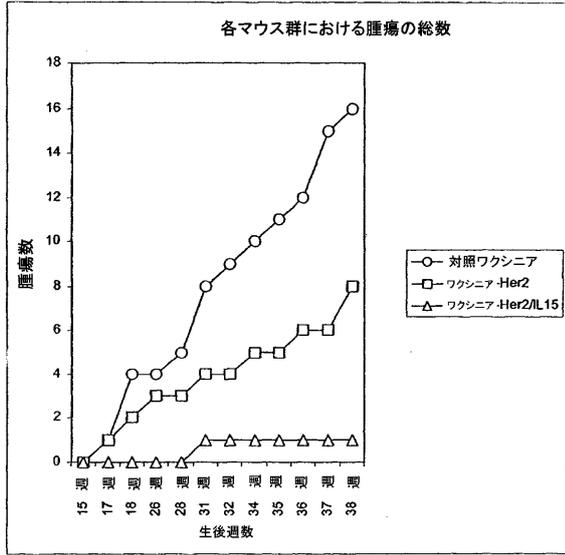


図7

【 図 8 】

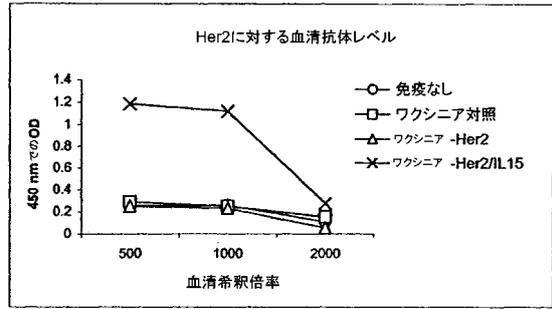


図8

【 図 9 】

CD8⁺ CTLの活性が CD8⁺ CTL 媒介性免疫の有効性を決定する

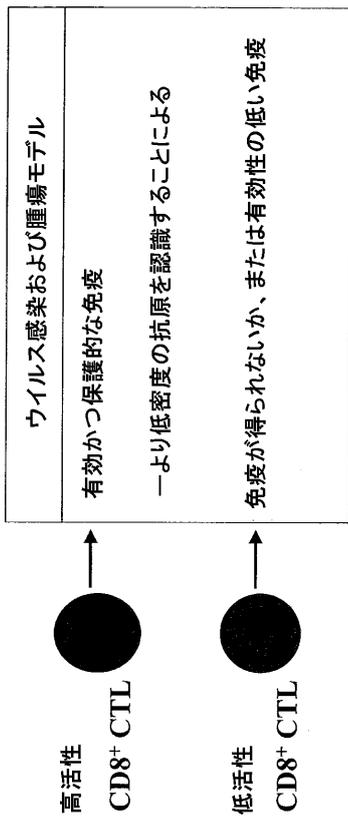


図9

【 図 10 】

IL-15 で誘導した CD8 CTLs は、より低密度の抗原に反応する :ブーストの14ヶ月後

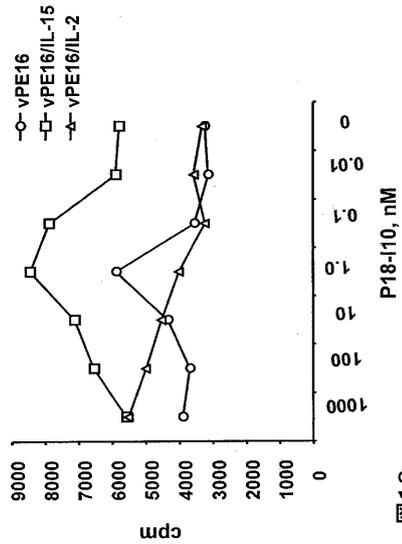
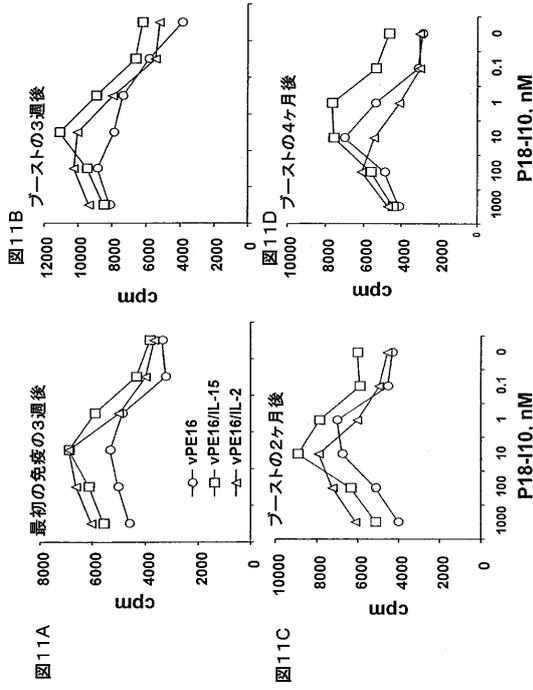


図10

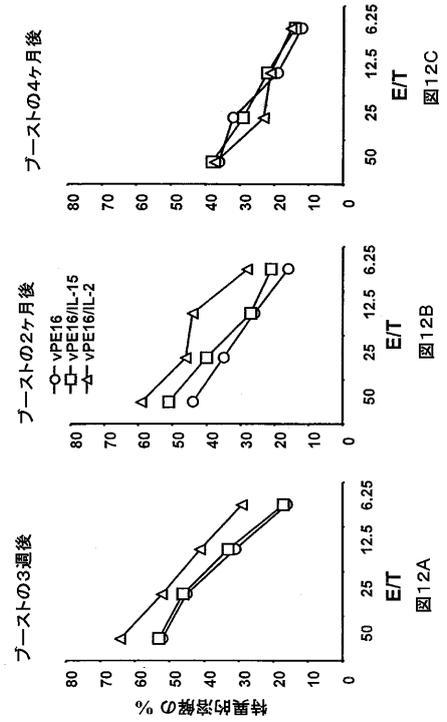
【 図 1 1 】

IL-15で誘導したCD8⁺CTLはより低密度の抗原に反応する



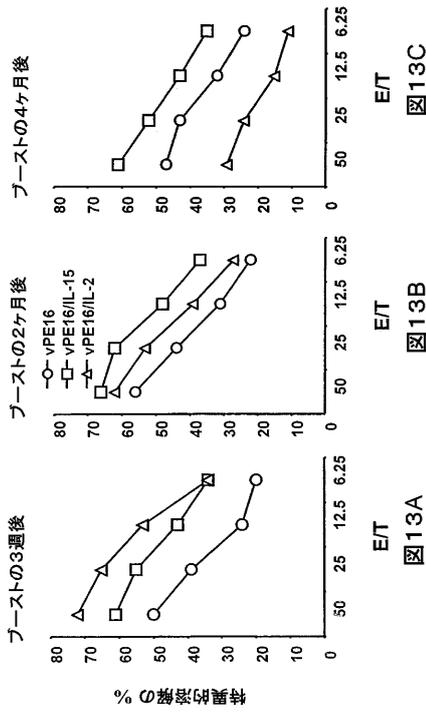
【 図 1 2 】

高濃度のペプチド (0.1 uM)で拡大したCD8⁺CTLの細胞溶解活性



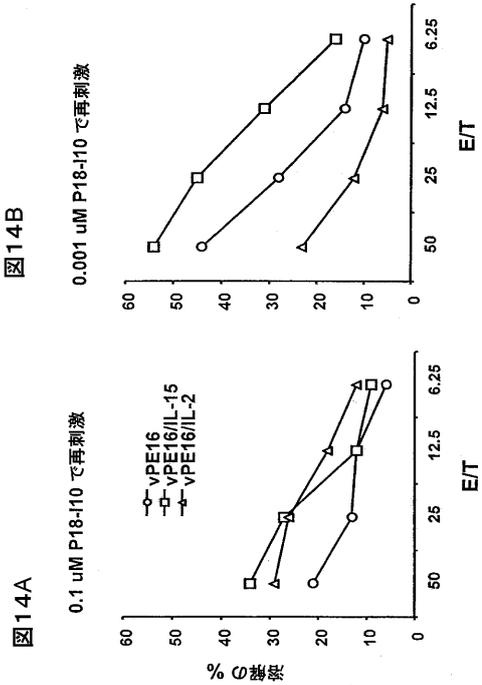
【 図 1 3 】

低濃度のペプチド (0.001 uM)で拡大したCD8⁺CTLの細胞溶解活性



【 図 1 4 】

IL-15で誘導した高活性CD8⁺CTLはin vivoでより長期間
持続する: プースト後14ヶ月



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/39967
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 35/00, 48/00; C12N 15/63 US CL : 514/44; 424/93.1, 93.2; 435/320.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/44; 424/93.1, 93.2; 435/320.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 6,190,901 B1 (SUNDICK et al) 20 February 2001 (20-02-2001), see the entire document, especially column 6, lines 44-51.	1 ----- 2-56
Y	US 6,013,268 A (REED, S.) 11 January 2000 (11-01-2000), see the entire document.	1-56
X --- Y	PERERA et al. Comparative assessment of virulence of recombinant vaccinia viruses expressing IL-2 or IL-15 in immunodeficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 24 April 2001, Vol. 98, No. 9, pages 5146-5151, 2001, see the entire document.	1 ----- 2-56
P	OH et al. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia virus expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 18 March 2003, Vol. 100, No. 6, pages 3392-3397, see the entire document.	1-56
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 17 May 2004 (17.05.2004)	Date of mailing of the international search report 08 JUN 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>Robert Bell-Harris</i> Randy K. Simola Telephone No. 571/272-1600	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/18 (2006.01) A 6 1 P 31/18

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 505228442

アメリカ合衆国

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

アメリカ合衆国 メリーランド州 20852、ロックヴィル、スイート 325、エグゼクティブ ブルバード 6011、オフィス オブ テクノロジー トランスファー、ナショナル キャンサー インスティテュート

National Cancer Institut, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, MD 20852 (US)

(74) 代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72) 発明者 ベレラ, リヤンジュ, ピー.

アメリカ合衆国 メリーランド州 20892、ケンジントン、ガイガー アベニュー 3207

(72) 発明者 ウォルドマン, トーマス, エー.

アメリカ合衆国 メリーランド州 20902、シルバー スプリング、リックオーバー ロード 3910

(72) 発明者 オー, サン - コン

アメリカ合衆国 メリーランド州 21237、ボルティモア、ケータラム シーティー. 45

(72) 発明者 ベルゾフスキー, ジェイ, エー.

アメリカ合衆国 メリーランド州 20814、ベテスダ、ブラッドレー ブルバード 5908

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA26 BA35 CA02 DA02 EA02 FA02 HA17

4C085 AA03 BA51 BA69 BB31 CC08

4C087 AA01 BC83 CA12 NA14 ZC55