

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5809978号
(P5809978)

(45) 発行日 平成27年11月11日(2015.11.11)

(24) 登録日 平成27年9月18日(2015.9.18)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00
C 0 7 K	14/075 (2006.01)	C 0 7 K	14/075
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76

請求項の数 13 (全 52 頁)

(21) 出願番号 特願2011-534762 (P2011-534762)
 (86) (22) 出願日 平成21年10月29日(2009.10.29)
 (65) 公表番号 特表2012-507296 (P2012-507296A)
 (43) 公表日 平成24年3月29日(2012.3.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/062548
 (87) 国際公開番号 W02010/051367
 (87) 国際公開日 平成22年5月6日(2010.5.6)
 審査請求日 平成24年10月4日(2012.10.4)
 (31) 優先権主張番号 61/109,958
 (32) 優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/109,979
 (32) 優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502409813
 ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバー
 シテイ・オブ・ペンシルベニア
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1910
 4フィラデルフィア・スイート200・チ
 エスナツトストリート3160
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所
 (72) 発明者 ロイ, スーミトラ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1908
 7ウエイン・プーロード240
 (72) 発明者 ウイルソン, ジェイムズ・エム
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1903
 5グラドウイン・ノースアビニヨンドライ
 ブ1350

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サルアデノウイルスSA dV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50ならびにそれらの用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アデノウイルスキャプシドを有する組換えアデノウイルスベクターであって、前記キャプシドがヘキソタンパク質、ペントタンパク質およびファイバータンパク質を含み、前記ヘキソタンパク質がSA dV-46のヘキソタンパク質、配列番号79のアミノ酸1ないし959であり、前記キャプシドが宿主細胞中の転写、翻訳および/若しくは発現を制御する発現制御配列に作動可能に連結されている遺伝子を保有する異種分子ならびに複製および包皮化に必要な5'および3'アデノウイルスシスエレメントを被包化する、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項2】

請求項1に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記ペントタンパク質が、配列番号74のアミノ酸1ないし563のSA dV-46ペントタンパク質、配列番号6のアミノ酸1ないし651のSA dV-43ペントタンパク質、配列番号43のアミノ酸1ないし664のSA dV-45ペントタンパク質、配列番号104のアミノ酸1ないし580のSA dV-47ペントタンパク質、配列番号134のアミノ酸1ないし504のSA dV-48ペントタンパク質、配列番号162のアミノ酸1ないし511のSA dV-49ペントタンパク質、配列番号188のアミノ酸1ないし511のSA dV-50ペントタンパク質の1種以上よりなる群から選択される、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項3】

請求項 1 に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記ファイバータンパク質が、配列番号 89 のアミノ酸 1 ないし 353 の S A d V - 46 ファイバータンパク質、配列番号 22 のアミノ酸 1 ないし 599 の S A d V - 43 ファイバータンパク質、配列番号 59 のアミノ酸 1 ないし 601 の S A d V - 45 ファイバータンパク質、配列番号 119 のアミノ酸 1 ないし 322 の S A d V - 47 ファイバータンパク質、配列番号 147 のアミノ酸 1 ないし 570 の S A d V - 48 ファイバータンパク質、配列番号 174 のアミノ酸 1 ないし 521 の S A d V - 49 ファイバータンパク質、配列番号 175 のアミノ酸 1 ないし 418 の S A d V - 49 ファイバータンパク質、配列番号 200 のアミノ酸 1 ないし 521 の S A d V - 50 ファイバータンパク質、配列番号 201 のアミノ酸 1 ないし 418 の S A d V - 50 ファイバータンパク質の 1 種以上よりなる群から選択される、組換えアデノウイルスベクター。

10

【請求項 4】

請求項 1 に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記アデノウイルスが複製欠損である、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記アデノウイルスが E1 遺伝子の全部若しくは一部を欠く、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記アデノウイルスキャプシドが S A d V - 46 からのファイバーおよびペントンキャプシドタンパク質を含む S A d V - 46 キャプシドである、組換えアデノウイルスベクター。

20

【請求項 7】

請求項 1 に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記ウイルスがハイブリッドキャプシドを有する、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記ウイルスが S A d V - p43、S A d V - 45、S A d V - 47、S A d V - 48、S A d V - 49 および S A d V - 50 から選択される 1 種以上のキャプシドタンパク質を含んでなる、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記キャプシドが S A d V - 43、S A d V - 45、S A d V - 47、S A d V - 48、S A d V - 49 若しくは S A d V - 50 ファイバータンパク質をさらに含んでなる、組換えアデノウイルスベクター。

30

【請求項 10】

請求項 8 に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記キャプシドが S A d V - 46、S A d V - 43、S A d V - 45、S A d V - 47、S A d V - 48、S A d V - 49 若しくは S A d V - 50 ペントンタンパク質をさらに含んでなる、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の組換えアデノウイルスベクターであって、前記アデノウイルスが複製および被包化に必要な 5' および 3' アデノウイルスシスエレメントを含んでなるシュードタイピングされたアデノウイルスであり、前記シスエレメントがアデノウイルス 5' 逆方向末端反復およびアデノウイルス 3' 逆方向末端反復を含んでなる、組換えアデノウイルスベクター。

40

【請求項 12】

製薬学的に許容できる担体中に請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターを含んでなる組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターを有効成分とし

50

て含んでなる、前記遺伝子を宿主細胞に送達するための製薬学的製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦に支援される研究若しくは開発に関する声明

本研究は米国立保健研究所からの助成金NIDDK(5P30DK047757-15)およびNHBLBI(5P01HL059407-10)により支援された。米国政府は本発明にある種の権利を有しうる。

【背景技術】

【0002】

アデノウイルスは約36キロ塩基(kb)のゲノムサイズをもつ二本鎖DNAウイルスであり、多様な標的組織での高度に効率的な遺伝子移入を達成するその能力および大きな導入遺伝子容量により遺伝子移入の応用に広範に使用されている。慣習的には、アデノウイルスのE1遺伝子が欠失され、そして選択すべきプロモーター、目的の遺伝子のcDNA配列およびポリAシグナルよりなる導入遺伝子カセットで置き換えられて、複製欠損組換えウイルスをもたらす。

【0003】

アデノウイルスは、多数の他の少量のタンパク質VI、VII、IX、IIIaおよびIVa2と一緒に3種の主要なタンパク質ヘキソン(HI)、ペントンベース(HII)およびノブ(knobbed)ファイバー(IV)よりなる正二十面体キャプシドをもつ特徴的形態を有する(非特許文献1)。該ウイルスゲノムは、逆方向末端反復(ITR)を有する5'末端に末端タンパク質が共有結合されている直鎖状二本鎖DNAである。該ウイルスDNAは高度に塩基性のタンパク質VIIおよび小ペプチドpX(以前はμと称される)と緊密に会合している。別のタンパク質VはこのDNA-タンパク質複合体でパッケージングされ、そしてタンパク質VIを介してキャプシドへの構造的結合を提供する。該ウイルスは、成熟感染性ウイルスを産生するための構造的タンパク質のいくつかのプロセッシングに必要である、ウイルスにコードされるプロテアーゼもまた含有する。

【0004】

ヒト、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、イヌおよびオポッサムのアデノウイルスを包含するマストアデノウイルスファミリーの分類スキームが作成されている。この分類スキームは赤血球を凝集させる該ファミリー中のアデノウイルス配列の異なる能力に基づいて作成された。該結果は、サブグループA、B、C、D、EおよびFと現在称される6サブグループであった。非特許文献2を参照されたい。

【0005】

宿主細胞への異種分子の送達のための組換えアデノウイルスが記述されている。2種のチンパンジーアデノウイルスのゲノムを記述する特許文献1を参照されたい。サルアデノウイルスC5、C6およびC7はワクチンベクターとして有用であるとして特許文献2に記述されている。他のチンパンジーアデノウイルスがアデノウイルスワクチン担体を作成するのに有用であるとして特許文献3に記述されている。

【0006】

当該技術分野で必要とされるものは、集団における選択されたアデノウイルス血清型に対する既存の免疫の影響を回避する効果的なベクターである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許第6,083,716号明細書

【特許文献2】米国特許第7,247,472号明細書

【特許文献3】第WO 2005/1071093号明細書

【非特許文献】

【0008】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】W. C. Russell, J. Gen Virol., 81:2573-2604 (Nov 2000)

【非特許文献2】T. Shenkら、Adenoviridae: The Viruses and their Replication”、第67章、FIELD'S VIROLOGY、第6版、B. N. Fieldsらにより編中、(Lippincott Raven Publishers、フィラデルフィア、1996)、p. 111-2112

【発明の概要】

【0009】

[発明の要約]

サル(ゴリラ)アデノウイルス-43(SAdV-43)、-45(SAdV-45)、-46(SAdV-46)、-47(SAdV-47)、サル(カニクイザル)アデノウイルス-48(SAdV-48)、-49(SAdV-49)および-50(SAdV-50)の単離された核酸配列およびアミノ酸配列、ならびにこれらの配列を含有するベクターを本明細書に提供する。本明細書に記述されるSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50配列を含有するベクターおよび細胞の多数の使用方法もまた提供される。

10

【0010】

本明細書に記述される方法は、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ベクターを投与することにより1種若しくはそれ以上の選択された異種遺伝子を哺乳動物患者に送達することを必要とする。ワクチン接種のための本明細書に記述される組成物の使用は、防御免疫応答の誘発のための選択された抗原の提示を可能にする。サルアデノウイルス45に基づくベクターは異種遺伝子産物を*in vitro*で製造するのにもまた使用しうる。こうした遺伝子産物は本明細書に記述されるような多様な目的上多様な状態でそれら自身有用である。

20

【0011】

本発明のこれらおよび他の態様および利点を下により詳細に記述する。

【0012】

[発明の詳細な記述]

ゴリラ糞便から単離されたサルアデノウイルス43、45、46および47から、ならびにカニクイザル糞便から単離されたサルアデノウイルス48、49および50からの新規核酸およびアミノ酸配列が提供される。引用することにより本明細書に組み込まれる配列表に関して、数字識別子<223>の下のいかなる「フリーテキスト」も、配列表フリーテキストと見出しを付けられた請求の範囲に先行する節に提供される。

30

【0013】

組換えタンパク質若しくはフラグメントまたは他の試薬の*in vitro*製造での使用のための新規アデノウイルスベクターおよびそれらのベクターを製造するためのパッケージング細胞株もまた提供される。治療若しくはワクチンの目的上の異種分子の送達における使用のための組成物がさらに提供される。こうした治療若しくはワクチン組成物は挿入された異種分子を保有するアデノウイルスベクターを含有する。加えて、該新規SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列は、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの製造に必要とされる不可欠のヘルパー機能の提供において有用である。従って、こうした製造法でこれらの配列を使用するヘルパー構築物、方法および細胞株が提供される。

40

【0014】

核酸若しくはそのフラグメントを指す場合の「実質的相同性」若しくは「実質的類似性」という用語は、適切なヌクレオチドの挿入若しくは欠失を伴い別の核酸(若しくはその相補鎖)と最適に整列される場合に、整列された配列の最低約95ないし99%のヌクレオチド配列同一性が存在することを示す。

【0015】

50

複数のアミノ酸若しくはそれらのフラグメントを指す場合の「実質的相同性」若しくは「実質的類似性」という用語は、適切なアミノ酸の挿入若しくは欠失を伴い別のアミノ酸（若しくはその相補鎖）と最適に整列される場合に、整列された配列の最低約95ないし99%のアミノ酸配列同一性が存在することを示す。好ましくは、相同性は、完全長配列若しくはそのタンパク質、または長さ最低8アミノ酸若しくはより望ましくは最低15アミノ酸であるそのフラグメントにわたる。適するフラグメントの例を本明細書に記述する。

【0016】

核酸配列の文脈の「配列同一性パーセント」若しくは「同一の」という用語は、最大に対応のため整列される場合に同一である該2配列中の残基を指す。1配列を別のものと整列するためにギャップが必要とされる場合、スコアリングの程度はギャップについてのペナルティを伴わずより長い配列に関して計算される。ポリヌクレオチド若しくはそれによりコードされるポリペプチドの機能性を保存する配列はより緊密に同一である。配列同一性比較の長さは、ゲノムの完全長（例えば約36kbp）、遺伝子のオープンリーディングフレーム、タンパク質、サブユニット若しくは酵素の完全長（例えば、アデノウイルスコーディング領域を提供する表を参照されたい）にわたることができるか、または、最低約500ないし5000ヌクレオチドのフラグメントが望ましい。しかしながら、例えば最低約9ヌクレオチド、通常は最低約20ないし24ヌクレオチド、最低約28ないし32ヌクレオチド、最低約36若しくはそれ以上のヌクレオチドのより小さいフラグメントの間の同一性もまた望ましいことができる。同様に、「配列同一性パーセント」はタンパク質の完全長若しくはそのフラグメントにわたるアミノ酸配列について容易に決定しうる。適しては、フラグメントは長さ最低約8アミノ酸でありかつ約700アミノ酸まででありうる。適するフラグメントの例を本明細書に記述する。

【0017】

同一性は、本明細書で定義されるようなアルゴリズムおよびコンピュータプログラムをデフォルトの設定で使用して容易に決定される。好ましくは、こうした同一性は、タンパク質、酵素、サブユニットの完全長にわたるか、若しくは長さ最低約8アミノ酸のフラグメントにわたる。しかしながら、同一遺伝子産物が使用されている使用に適する場合、同一性はより短い領域に基づいてもよい。

【0018】

本明細書に記述されるところのアライメントは、インターネットのウェブサーバーを通じてアクセス可能な「Clustal W」のような多様な公的に若しくは商業的に利用可能な多配列アライメントプログラムのいずれかを使用して実施する。あるいは、Vector NTI（登録商標）ユーティリティ（Invitrogen）もまた使用される。上述されたプログラムに含有されるものを包含する、ヌクレオチド配列同一性を評価するのに使用し得る当該技術分野で既知の多数のアルゴリズムもまた存在する。別の例として、ポリヌクレオチド配列はGCG Version 6.1中のプログラムFastaを使用して比較し得る。Fastaは、クエリおよび検索配列の間の最良のオーバーラップ領域のアライメントおよび配列同一性パーセントを提供する。例えば、核酸配列間の配列同一性パーセントは、GCG Version 6.1（引用することにより本明細書に組み込まれる）に提供されるところのそのデフォルトのパラメータ（6のワードサイズ（word size）およびスコアリングマトリックスのNOPAMファクター）でFastaを使用して決定し得る。同様に、アミノ酸アライメントを実施するためのプログラムが利用可能である。一般に、これらのプログラムはデフォルト設定で使用するとは言え、当業者はこれらの設定を必要とされるとおり変更し得る。あるいは、当業者は、少なくとも参照されるアルゴリズムおよびプログラムにより提供されるもののような同一性のレベル若しくはアライメントを提供する別のアルゴリズム若しくはコンピュータプログラムを利用し得る。

【0019】

ポリヌクレオチドに適用されるところの「組換え」は、該ポリヌクレオチドが、クロー

10

20

30

40

50

ニング、制限若しくはライゲーション段階、および天然に見出されるポリヌクレオチドと異なる構築物をもたらす他の手順の多様な組合せの産物であることを意味している。組換えウイルスは組換えポリヌクレオチドを含んでなるウイルス粒子である。該用語は、それぞれ、元のポリヌクレオチド構築物の複製物および元のウイルス構築物の子孫を包含する。

【0020】

「異種」は、それが比較されている実体の残部のもとの遺伝子型が異なる実体由来を意味している。例えば、遺伝子工学技術により異なる種由来のプラスミド若しくはベクターに導入されるポリヌクレオチドは異種ポリヌクレオチドである。その本来のコーディング配列から取り出されかつそれが連結されて天然に見出されないコーディング配列に効果的に連結されているプロモーターは異種プロモーターである。ウイルスのゲノム、若しくは該ウイルスのゲノムがそれを天然に含有しないウイルスベクターにクローン化されている部位特異的組換え部位は異種組換え部位である。組換え酵素のコーディング配列をもつポリヌクレオチドを使用して、通常は組換え酵素を発現しない細胞を遺伝子的に変える場合、該ポリヌクレオチドおよび該組換え酵素の双方が該細胞に対し異種である。

10

【0021】

本明細および請求の範囲を通じて使用されるところの「含んでなる (comprise)」という用語、および他の変形のなかでも「含んでなる (comprises)」、「含んでなること」を包含するその変形は、他の成分、要素、整数、段階などに包括的なものである。「よりなる」若しくは「よりなること」という用語は他の成分、要素、整数、段階などを除外する。

20

【0022】

I. サルアデノウイルス配列

サルアデノウイルス - 43 (SAdV - 43)、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは - 50の核酸配列およびアミノ酸配列が、本明細書に引用することに組み込まれる配列表に提供されている。これらのアデノウイルスおよびそれらの配列は、それらが天然に会合している他の物質から単離されている。SAdV - 48、- 49および - 50はカニクイザルから単離された。

【0023】

SAdV - 43およびSAdV - 45はゴリラから単離され、そしてヒトサブグループCと同一サブグループにあることが確認されている。SAdV - 46およびSAdV - 47はゴリラから単離され、そしてヒトサブグループBと同一サブグループにあることが確認されている。従って、SAdV - 43、- 45、- 46および - 47ならびにそれらの配列に基づく構築物は、IFN、IL - 6、RANTESおよびMIP1を包含するサイトカイン/ケモカインを誘導若しくは発現するのに有用でありうる。

30

【0024】

SAdV - 48、- 49および - 50は既存のアデノウイルスファミリーA、B、C、D若しくはEのいずれにも容易に適合しない。SAdV - 48、- 49および - 50はこれらのファミリー内のアデノウイルスと血清型がおよび免疫学的により大きく異なり、そしてこれらのアデノウイルス由来のベクターは従ってヒト集団で既存の免疫に直面することがより少なくありそうであることが予期される。さらに、SAdV - 48、- 49および - 50は、例えばアカゲザルおよびカニクイザルを包含するヒト以外およびチンパンジー以外の霊長類種での抗原の評価に有用であることが予期される。これは、ヒトおよびチンパンジーモデルがいずれかの多様な理由上利用可能でない場合にとりわけ有用である。

40

【0025】

A. 核酸配列

本明細書に提供されるSAdV - 43核酸配列は配列番号1のヌクレオチド1ないし37189を包含する。本明細書に提供されるSAdV - 45核酸配列は配列番号38のヌクレオチド1ないし37152を包含する。本明細書に提供されるSAdV - 46核酸配列は配列番号69のヌクレオチド1ないし35608を包含する。本明細書に提供される

50

S A d V - 4 7 核酸配列は配列番号 9 9 のヌクレオチド 1 ないし 3 5 5 6 3 を包含する。本明細書に提供される S A d V - 4 8 核酸配列は配列番号 1 2 9 のヌクレオチド 1 ないし 3 4 2 0 1 を包含する。本明細書に提供される S A d V - 4 9 核酸配列は配列番号 1 5 7 のヌクレオチド 1 ないし 3 5 4 9 9 を包含する。本明細書に提供される S A d V - 5 0 核酸配列は配列番号 1 8 3 のヌクレオチド 1 ないし 3 5 5 1 2 を包含する。本明細書に引用することにより組み込まれる配列表を参照されたい。一態様において、S A d V - 4 3、- 4 5、- 4 6、- 4 7、- 4 8、- 4 9 および - 5 0 の核酸配列は、それぞれ配列番号 1、3 8、6 9、9 9、1 2 9、1 5 7 および 1 8 3 の配列に相補的である鎖、ならびに以下の配列およびそれらの相補鎖の配列に対応する R N A および c D N A 配列をさらに包含する。別の態様において、該核酸配列は、配列表に 9 8 . 5 % 以上同一、および好ましくは約 9 9 % 以上同一である配列をさらに包含する。一態様において、配列番号 1、3 8、6 9、9 9、1 2 9、1 5 7 および 1 8 3 に提供される配列およびそれらの相補鎖の天然のバリエーションおよび工作された改変もまた包含する。こうした改変は、例えば、当該技術分野で既知である標識、メチル化、および天然に存在するヌクレオチドの 1 個若しくはそれ以上の縮重ヌクレオチドでの置換を包含する。

【 0 0 2 6 】

【 表 1 - 1 】

領域	SAdV-43 ORF 配列番号 1	SAdV-45 ORF 配列番号 38	SAdV-46 ORF 配列番号 69	SAdV-47 ORF 配列番号 99	SAdV-48 ORF 配列番号	SAdV-49 ORF 配列番号	SAdV-50 ORF 配列番号
ITR	1..80	1..74	1..132	1..126	1..173	1..215	1..215
E1a	13S 結合 (556..1069, 1161..1468)	結合 (546..1059, 1149..1456)	結合 (574..1150, 1224..1449)	結合 (554..1130, 1224..1429)	結合 (491..1059, 1119..1347)	結合 (528..1101, 1215..1441)	結合 (528..1101, 1215..1441)
	E1b	1669..2220	1620..2162	1600..2142	1513..2064	1490..2128	1450..2128
	スモール T/19K	1974..3482	1925..3409	1905..3389	1818..3338	1885..3366	1885..3366
E2b	IX	3576..3974	3505..3918	3485..3898	3424..3833	3440..3886	3440..3886
	pTP	相補 (8519..10474, 13989..13997)	相補 (8461..10440, 13909..13917)	相補 (8444..10423, 13895..13903)	相補 (8327..10117, 13364..13372)	相補 (8433..10406, 13592..13600)	相補 (8433..10406, 13590..13598)
	ポリメララーゼ	相補 (5139..8717, 13989..13997)	相補 (5090..8659, 13909..13917)	相補 (5070..8642, 13895..13903)	相補 (5025..8522, 13364..13372)	相補 (5038..8631, 13592..13600)	相補 (5038..8631, 13590..13598)
L1	IVa2	相補 (4036..5366, 5645..5657)	相補 (3987..5320, 5596..5608)	相補 (3967..5297, 5576..5588)	相補 (3904..5252, 5531..5543)	相補 (3929..5265, 5544..5556)	相補 (3929..5265, 5544..5556)
	52/55D	10928..12151	10921..12087	10907..12073	10391..11578	10612..11742	10612..11742
	IIIa	12180..13964	12115..13875	12101..13861	11598..13334	11764..13557	11764..13557
L2	ベントン	14034..15986	13962..15650	13948..15687	13421..14932	13651..15183	13649..15181
	VII	16018..16623	15657..16232	15694..16269	14936..15493	15205..15759	15203..15757
	V	16696..17787	16278..17324	16315..17364	15547..16611	15809..16897	15807..16898

【 0 0 2 7 】

【表 1 - 2】

領域	SAdV-43 ORF 配列番号 1	SAdV-45 ORF 配列番号 38	SAdV-46 ORF 配列番号 69	SAdV-47 ORF 配列番号 99	SAdV-48 ORF 配列番号 129	SAdV-49 ORF 配列番号 157	SAdV-50 ORF 配列番号 183
	17804..18049	17774..18019	17356..17580	17396..17617	16635..16853	16918..17139	16919..17140
L3	18150..18893	18120..18869	17656..18405	17696..18442	16910..17677	17198..17992	17199..17993
	19000..21864	18976..21834	18528..21404	18561..21434	17776..20577	18071..20818	18072..20831
	21889..22518	21859..22488	21444..22070	21465..22091	20615..21220	20822..21436	20835..21449
	相補 (22616..24259)	相補 (22586..24223)	相補 (22165..23721)	相補 (22185..23738)	相補 (21280..22677)	相補 (21490..22968)	相補 (21503..22981)
E2a	DBP						
	100 kD	24267..26762	23752..26244	23769..26261	22705..24900	23006..25372	23019..25385
L4	33kD ホモログ	結合 (26446..26791, 26982..27352)	結合 (25943..26297, 26467..26822)	結合 (25960..26314, 26484..26842)	結合 (24683..25123, 25108..25397)		
	22 kD	26446..27042	25943..26554	25960..26574	24683..25123	25065..25763	25078..25776
	VIII	27446..28126	26895..27575	26915..27595	25454..26149	25939..26637	25952..26650
	12.5K	28130..28450	27578..27892	27598..27912	26145..26471	26640..26963	26653..26976
	CR1*					26911..28335	26924..28348
	CR1- α	28431..28976	27849..28292	27869..28312	26419..27519		
	7.1K	28963..29166					
	gp19K	29174..29653	28280..28795	28300..28812			
	CR1- β	29701..30567	28835..29425	28842..29477	27619..28407		
	CR1- γ	30613..30927	29444..30202	29499..30251			
RID- α	30939..31208	30215..30487	30264..30536	28422..28694	28354..28623	28367..28636	
RID- β	31215..31634	30462..30896	30511..30942	29694..29008	28533..28991	28546..29004	
14.7K	31630..32013	31597..31980	30892..31296	30938..31342	28888..29385	28997..29386	29010..29399
L5	ファイバー	32132..33934	31535..32593	31578..32543	29491..31200	ファイバー1 29587..31149	ファイバー1 31187..32440

【 0 0 2 8 】

【表 1 - 3】

領域	SAdV-43 ORF 配列番号 1	SAdV-45 ORF 配列番号 38	SAdV-46 ORF 配列番号 69	SAdV-47 ORF 配列番号 99	SAdV-48 ORF 配列番号 129	SAdV-49 ORF 配列番号 157	SAdV-50 ORF 配列番号 183
E4	Orf 6/7	相補 (34151..34426, 35129..35311)	相補 (34124..34393, 35102..35284)	相補 (32633..32881, 33604..33792)	相補 (32588..32836, 33550..33747)	相補 (32471..32701, 33452..33592)	相補 (32484..32714, 33465..33605)
	Orf 6	相補 (34430..35311)	相補 (34403..35284)	相補 (32881..33807)	相補 (32836..33762)	相補 (32720..33592)	相補 (32733..33605)
	Orf 4	相補 (35214..35576)	相補 (35187..35549)	相補 (33683..34063)	相補 (33638..34018)	相補 (32306..32668)	相補 (33541..33903)
	Orf 3	相補 (35596..35946)	相補 (35569..35919)	相補 (34076..34426)	相補 (34031..34381)	相補 (32690..33034)	相補 (33897..34244)
	Orf 2	相補 (35946..36335)	相補 (35919..36308)	相補 (34426..34812)	相補 (34381..34767)	相補 (33045..33431)	相補 (34258..34641)
	Orf 1	相補 (36373..36753)	相補 (36346..36726)	相補 (34858..35229)	相補 (34812..35183)	相補 (33466..33849)	相補 (34670..35050)
ITR	相補 (37110..37189)	相補 (37079..37152)	相補 (35477..35608)	相補 (35438..35563)	相補 (34029..34201)	相補 (35285..35499)	相補 (35298..35512)

*SAdV-49およびSAdV-50のCRタンパク質はCR1-β領域に対する最高の相同性を有するようである。しかしながら、これらのアデノウイルスは単独のCRタンパク質のみを有するため、それらはそう呼称されていない。α、βなどの命名法は典型的に該領域内のオープリーディングフレームの相対的位置を指すためである。これらのアデノウイルスが2種のファイバー遺伝子を含有すること(ある種の他のサルアデノウイルス、例えばSAdV-7と共通してそれらが有する特徴)が注目される。

【0029】

これらの配列由来のアデノウイルスベクターにおけるようなある態様において、これらの領域の一方若しくは双方の機能を、例えば該領域の欠失、該遺伝子のプロモーターの破壊、若しくは別の機能欠失により排除しうる。しかしながら、他の態様において、これらの領域の保持が望ましいことがある。

【0030】

一態様において、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-

50の配列、ならびにそれらの相補鎖すなわちそれらに相補的なcDNAおよびRNAのフラグメントが提供される。適するフラグメントは長さ最低15ヌクレオチドであり、そして機能的フラグメントすなわち生物学的に興味深いフラグメントを包含する。例えば、機能的フラグメントは、所望のアデノウイルス産物を発現し得るか、若しくは組換えウイルスベクターの製造で有用でありうる。こうしたフラグメントは本明細書の表に列挙される遺伝子配列およびフラグメントを包含する。該表は、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列中の転写物領域およびオープンリーディングフレームを提供する。ある種の遺伝子について、転写物およびオープンリーディングフレーム(ORF)は配列番号1に提示されるものに相補的な鎖上に位置する。例えばE2b、E4およびE2aを参照されたい。コードされるタンパク質の計算された分子量もまた示される。SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50のE1aオープンリーディングフレームおよびE2bのオープンリーディングフレームは内部スプライス部位を含有することに注意されたい。これらのスプライス部位は上の表中に示される。

10

【0031】

SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50アデノウイルス核酸配列は、治療薬としてならびに多様なベクター系および宿主細胞の構築で有用である。本明細書で使用されるところのベクターは、裸のDNA、プラスミド、ウイルス、コスミド若しくはエピソームを包含するいかなる適する核酸分子も包含する。これらの配列および産物は、単独で、あるいは他のアデノウイルス配列若しくはフラグメントと組合せ、または他のアデノウイルス若しくはアデノウイルス以外の配列からのエレメントと組合せて使用しうる。SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列は、アンチセンス送達ベクター、遺伝子治療ベクター若しくはワクチンベクターとしてもまた有用である。従って、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列を含有する核酸分子、遺伝子送達ベクターおよび宿主細胞がさらに提供される。

20

【0032】

例えば、本発明のサルAdV(SAdV)-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50のITR配列を含有する核酸分子。別の例において、本発明は所望のAd遺伝子産物をコードするSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列を含有する核酸分子を提供する。SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列を使用して構築されるなお他の核酸分子は、本明細書に提供される情報を鑑みれば当業者に容易に明らかであろう。

30

【0033】

一態様において、本明細書で同定されるサルAd遺伝子領域を異種分子の細胞への送達のための多様なベクターで使用しうる。例えば、パッケージング宿主細胞中でウイルスベクターを生成させる目的上、アデノウイルスキャプシドタンパク質(若しくはそのフラグメント)の発現のためのベクターを生成する。こうしたベクターはトランスでの発現のため設計しうる。あるいは、こうしたベクターは、所望のアデノウイルス機能、例えばE1a、E1b、末端反復配列、E2a、E2b、E4、E4ORF6領域の1種若しくはそれ以上を発現する配列を安定に含有する細胞を提供するよう設計する。

40

【0034】

加えて、該アデノウイルス遺伝子配列およびそれらのフラグメントは、ヘルパー依存ウイルス(例えば必須機能を欠失されたアデノウイルスベクター、若しくはアデノ随伴ウイルス(AAV))の製造に必要なヘルパー機能を提供するのに有用である。こうした製造方法のため、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列を、ヒトAdについて記述されたものに類似の様式でこうした方法で利用し得る。しかしながら、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列とヒトAdのものとの間の配列の差違により、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50配列の使用は、rAAV産生の間に感染性アデノウイルス汚

50

染物質 (contaminant) を産生しうるヒト Ad E1 機能を保有する宿主細胞、例えば 293 細胞中でのヘルパー機能との相長的組換えの可能性を大きく最小化するか若しくは排除する。

【0035】

アデノウイルスヘルパー機能を使用する rAAV の製造方法はヒトアデノウイルス血清型とともに文献に詳細に記述されている。例えば米国特許第 6,258,595 号明細書およびその中に引用される参考文献を参照されたい。米国特許第 5,871,982 号明細書；第 WO 99/14354 号明細書；第 WO 99/15685 号明細書；第 WO 99/47691 号明細書もまた参照されたい。これらの方法はヒト以外の霊長類の AAV 血清型を包含するヒト以外の血清型の AAV の製造でもまた使用しうる。必要なヘルパー機能 (例えば E1a、E1b、E2a および / 若しくは E4 ORF6) を提供する SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49 および -50 配列は、ヒト起源に典型的である rAAV パッケージング細胞中に存在するいずれかの他のアデノウイルスとの組換えの可能性を最小化若しくは排除する一方で必要なアデノウイルス機能の提供においてとりわけ有用であり得る。従って、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49 および -50 配列の選択された遺伝子若しくはオープンリーディングフレームをこれらの rAAV 製造方法で利用しうる。

10

【0036】

あるいは、組換え SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49 および -50 ベクターをこれらの方法で利用しうる。こうした組換えアデノウイルスサルベクターは、例えば、サル Ad 配列が例えば AAV 3' および / 若しくは 5' ITR ならびにその発現を制御する制御配列の制御下の導入遺伝子から構成される rAAV 発現カセットに隣接しているハイブリッドサル Ad / AAV を包含しうる。当業者は、なお他のサルアデノウイルスベクターならびに / 若しくは SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49 および -50 遺伝子配列が、rAAV、およびアデノウイルスヘルパーに依存する他のウイルスの製造に有用であることができることを認識するであろう。

20

【0037】

なお別の態様において、核酸分子は、所望の生理学的効果を達成するための宿主細胞中の選択されたアデノウイルス遺伝子産物の送達および発現のため設計される。例えば、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49 若しくは -50 の E1a タンパク質をコードする配列を含有する核酸分子を癌治療薬としての使用のため被験体に送達しうる。場合によっては、こうした分子を脂質に基づく担体中で処方しかつ癌細胞を優先的に標的指向化する。こうした製剤を他の癌治療薬 (例えばシスプラチン、タキソールなど) と組合せうる。本明細書に提供されるアデノウイルス配列のなお他の用途は当業者に容易に明らかであろう。

30

【0038】

加えて、当業者は、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49 および -50 配列を、治療および免疫原性分子の *in vitro*、*ex vivo* 若しくは *in vivo* 送達のための多様なウイルスおよびウイルス以外のベクター系のための使用に容易に適合させ得ることを容易に理解するであろう。例えば、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49 および -50 サル Ad 配列を多様な rAd および rAd 以外のベクター系で利用し得る。こうしたベクター系は、とりわけ、例えばプラスミド、レンチウイルス、レトロウイルス、ボックスウイルス、ワクシニアウイルスおよびアデノ随伴ウイルス系を包含しうる。これらのベクター系の選択は本発明の制限でない。

40

【0039】

本発明のサルおよびサル由来タンパク質の製造に有用な分子もまた提供される。該 SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49 若しくは -50 の DNA 配列を包含するポリヌクレオチドを保有するこうした分子は、裸の DNA、プラスミド、ウイルス、若しくはいずれかの他の遺伝因子の形態にあり得る。

【0040】

50

B . アデノウイルスタンパク質

本明細書に記述されるアデノウイルス核酸によりコードされるタンパク質、酵素およびそれらのフラグメントのような S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および - 5 0 アデノウイルスが提供される。他の方法により生成されるこれらの核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を有する S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および - 5 0 のタンパク質、酵素およびそれらのフラグメントがさらに包含される。こうしたタンパク質は、上の表で同定されるオープンリーディングフレームによりコードされるもの、下の表のタンパク質（配列表中にもまた示される）、ならびに該タンパク質およびポリペプチドのそれらのフラグメントを包含する。

【 0 0 4 1 】

【表 2 - 1】

領域	SAdV-43 配列番号		SAdV-45 配列番号	SAdV-46 配列番号	SAdV-47 配列番号	SAdV-48 配列番号	SAdV-49 配列番号	SAdV-50 配列番号
	29	66	96	126	154	182	208	
E1a	13S							
	12S							
	9S							
E1b	スモール T/19K	39	70	100	130	158	184	
	ラージ T/55K	61	91	121	148	177	203	
L1	IX	40	71	101	131	159	185	
	52/55 kD	41	72	102	132	160	186	
	IIIa	42	73	103	133	161	187	
	ペントン	43	74	104	134	162	188	
	VII	44	75	105	135	163	189	
	V	45	76	106	136	164	190	
	pX	46	77	107	137	165	191	
L3	VI	47	78	108	138	166	192	
	ヘキソン	48	79	109	139	167	193	
	エンド プロテアーゼ	49	80	110	140	168	194	
	100 kD	50	81	111	141	169	195	
	33kD ホモログ	68	98	128	156			
E3	22 kD	62	92	122	150	178	204	
	VIII	51	82	112	142	170	196	
	12.5K	52	83	113	151	171	197	
	CR1							
	CR1- α	63	93	123	143	179	205	
	7.1K	53						
	gp19K	54	84	114				
	CR1- β	55	85	115	144			
	CR1- γ	56	86	116				

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

領域	SAdV-43 配列番号	SAdV-45 配列番号	SAdV-46 配列番号	SAdV-47 配列番号	SAdV-48 配列番号	SAdV-49 配列番号	SAdV-50 配列番号
RID- α	20	57	87	117	145	172	198
	21	58	94	124	152	180	206
	27	64	88	118	146	173	199
L5 ファイバー	22	59	89	119	147	ファイバー1- 174	ファイバー1- 201
						ファイバー2- 175	ファイバー2- 200

10

20

30

40

【0043】

従って、一局面において、実質的に純粋である、すなわち他のウイルスおよびタンパク質性タンパク質を含まない独特なサルアデノウイルス43、-45、-46、-47、-48、-49および-50タンパク質が提供される。好ましくは、これらのタンパク質は最低10%同種、より好ましくは60%同種、および最も好ましくは95%同種である。

【0044】

一態様において、独特なサル由来キャプシドタンパク質が提供される。本明細書で使用

50

されるところのサル由来キャプシドタンパク質は、これらのタンパク質の生成手段に対する制限を伴わず、キメラキャプシドタンパク質、融合タンパク質、人工キャプシドタンパク質、合成キャプシドタンパク質および組換えキャプシドタンパク質を制限なしに包含する、上で定義されたところのS A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9若しくは - 5 0のキャプシドタンパク質またはそれらのフラグメントを含有するいかなるアデノウイルスキャプシドタンパク質も包含する。

【 0 0 4 5 】

適しては、これらのサル由来キャプシドタンパク質は、本明細書に記述されるところの多様なアデノウイルス血清型のキャプシド領域若しくはそれらのフラグメントまたは改変されたサルキャプシドタンパク質若しくはフラグメントと組合せの1種若しくはそれ以上のS A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9若しくは - 5 0の領域若しくはそれらのフラグメント(例えばヘキソン、ペントン、ファイバー若しくはまたのフラグメント)を含有する。本明細書で使用されるところの「変えられた向性を伴うキャプシドタンパク質の改変」は、変えられたキャプシドタンパク質、すなわちペントン、ヘキソン若しくはファイバータンパク質領域、またはファイバー領域のノブドメインのようなそれらのフラグメント、あるいは特異性が変えられているようなものをコードするポリヌクレオチドを包含する。該サル由来キャプシドは、サルS A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9若しくは - 5 0の1種若しくはそれ以上、またはヒト若しくはヒト以外の起源のものでありうる別のA d血清型を用いて構築しうる。こうしたA dは、A T C C、商業的および学術的供給源を包含する多様な供給源から得ることができるか、またはA dの配列はG e n B a n k若しくは他の適する供給源から得ることができる。

【 0 0 4 6 】

S A d V - 4 3 (配列番号6)、S A d V - 4 5 (配列番号43)、S A d V - 4 6 (配列番号74)、S A d V - 4 7 (配列番号104)、S A d V - 4 8 (配列番号134)、S A d V - 4 9 (配列番号162)およびS A d V - 5 0 (配列番号188)のペントンタンパク質のアミノ酸配列が提供される。適しては、該ペントンタンパク質若しくはそれらの独特のフラグメントを多様な目的上利用しうる。適するフラグメントの例は、上および配列番号6、43、74、104、134、162若しくは188に提供されるアミノ酸番号付けに基づき約50、100、150若しくは200アミノ酸のN末端および/若しくはC末端切断を有するペントンを包含する。他の適するフラグメントはより短い内部、C末端若しくはN末端フラグメントを包含する。さらに、該ペントンタンパク質は当業者に既知の多様な目的上改変しうる。

【 0 0 4 7 】

S A d V - 4 3 (配列番号11)、S A d V - 4 5 (配列番号48)、S A d V - 4 6 (配列番号79)、S A d V - 4 7 (配列番号109)、S A d V - 4 8 (配列番号139)、S A d V - 4 9 (配列番号167)およびS A d V - 5 0 (配列番号193)のヘキソンタンパク質のアミノ酸配列もまた提供される。適しては、該ヘキソンタンパク質若しくはそれらの独特のフラグメントを多様な目的上利用しうる。適するフラグメントの例は、上および配列番号11、48、79、109、139、167および193に提供されるアミノ酸番号付けに基づき約50、100、150、200、300、400若しくは500アミノ酸のN末端および/若しくはC末端切断を有するヘキソンを包含する。他の適するフラグメントはより短い内部、C末端若しくはN末端フラグメントを包含する。例えば、D E 1およびF G 1と呼称される1種の適するフラグメントヘキソンタンパク質のループ領域(ドメイン)若しくはその超可変領域。こうしたフラグメントは、配列番号11、48、79、109、139、167若しくは193を参照して、サルヘキソンタンパク質のアミノ酸残基約125ないし443;約138ないし441にわたる領域、若しくは、約残基138ないし残基163;約170ないし約176;約195ないし約203;約233ないし約246;約253ないし約264;約287ないし約297;および約404ないし約430にわたるもののようなより小さいフラグメントを包含する。他の適するフラグメントは当業者により容易に同定されうる。さらに、該ヘキソンタンバ

10

20

30

40

50

ク質は当業者に既知の多様な目的上改変しうる。該ヘキソタンパク質はアデノウイルスの血清型の決定子であるため、こうした人工ヘキソタンパク質は人工血清型を有するアデノウイルスをもたらすとみられる。他の人工キャプシドタンパク質を、11、48、79、109、139、167および/若しくは193のペントン配列および/若しくはファイバー配列ならびに/またはそれらのフラグメントを使用してもまた構築し得る。

【0048】

一態様において、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ヘキソタンパク質の配列を利用する変えられたヘキソタンパク質を有するアデノウイルスを生成しうる。ヘキソタンパク質の適する一変化方法は米国特許第5,922,315号明細書(引用することにより組み込まれる)に記述されている。この方法では、アデノウイルスヘキソンの最低1個のループ領域が別のアデノウイルス血清型の最低1個のループ領域で変えられる。従って、こうした変えられたアデノウイルスヘキソタンパク質の最低1個のループ領域はSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50のサルAdヘキソンループ領域である。一態様において、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ヘキソタンパク質の1個のループ領域が別のアデノウイルス血清型からの1個のループ領域により置換される。別の態様において、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ヘキソンのループ領域を使用して別のアデノウイルス血清型からのループ領域を置換する。適するアデノウイルス血清型は、本明細書に記述されることのあるヒトおよびヒト以外の血清型のなかから容易に選択しうる。適する血清型の選択は本発明の制限でない。SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50ヘキソタンパク質配列のなほ他の用途は当業者に容易に明らかであろう。

【0049】

SAdV-43(配列番号22)、SAdV-45(配列番号59)、SAdV-46(配列番号89)、SAdV-47(配列番号119)およびSAdV-48(配列番号147)のファイバータンパク質のアミノ酸配列が提供される。SAdV-49およびSAdV-50はそれぞれ2種のファイバータンパク質を有する。SAdV-49のファイバータンパク質1および2はそれぞれ配列番号174および175のアミノ酸配列を有する。SAdV-50のファイバータンパク質1および2はそれぞれ配列番号201および200のアミノ酸配列を有する。適しては、これらのファイバータンパク質若しくはそれらの独特のフラグメントを多様な目的上利用しうる。1種の適するフラグメントはファイバーノブである。他の適するフラグメントの例は、配列番号22、59、89、119、147、174、175、200および201に提供されるアミノ酸番号付けに基づき約50、100、150若しくは200アミノ酸のN末端および/若しくはC末端切断を有するファイバーを包含する。なほ他の適するフラグメントは内部フラグメントを包含する。さらに、ファイバータンパク質は当業者に既知の多様な技術を使用して改変しうる。

【0050】

SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50のタンパク質の独特のフラグメントは長さ最低8、最低15若しくは最低20アミノ酸である。しかしながら他の所望の長さのフラグメントを容易に利用し得る。加えて、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50遺伝子産物の収量および/若しくは発現を高めるために導入されるところの改変、例えばSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50遺伝子産物の全部若しくは1フラグメントが高めるための融合パートナーと(直接若しくはリンカーを介してのいずれかで)融合される融合分子の構築が、本明細書で提供される。他の適する改変は、通常切断されるプレ若しくはプロタンパク質を除外しかつ成熟タンパク質若しくは酵素を提供するためのコーディング領域(例えばタンパク質若しくは酵素)の切断、および/または分泌可能な遺伝子産物を提供するためのコーディング領域の突然変異を制限なしに包含する。なほ他の改変は当業者に容易に明らかであろう。本明細書に提供されるSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50タンパク質に対する最低約99%の同一性を

10

20

30

40

50

有するタンパク質がさらに包含される。

【0051】

本明細書に記述されることの、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50のアデノウイルスキャプシドタンパク質を含有するベクターは、中和抗体が他のAd血清型に基づくベクターならびに他のウイルスベクターの有効性を低下させる応用での使用にとりわけ良好に適する。該rAdベクターは、反復遺伝子治療のため、若しくは免疫応答(ワクチン力価)を高めるための再投与にとりわけ有利である。

【0052】

ある状況下では、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50遺伝子産物の1種若しくはそれ以上(例えばキャプシドタンパク質若しくはそのフラグメント)を使用して抗体を生成することが望ましいことがある。本明細書で使用されることの「抗体」という用語は、あるエピトープに特異的に結合することが可能である免疫グロブリン分子を指す。抗体は、例えば高親和性ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、合成抗体、キメラ抗体、組換え抗体およびヒト化抗体を包含する多様な形態で存在しうる。こうした抗体は免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEから発する。

【0053】

こうした抗体は当該技術分野で既知の多数の方法のいずれを使用しても生成しうる。適する抗体は、公知の慣習的技術、例えばKohlerとMilsteinおよびその多くの既知の変法により生成しうる。同様に、所望の高力価抗体は、これらの抗原に対し発生されたモノクローナル若しくはポリクローナル抗体に既知の組換え技術を適用することにより生成する(例えば、PCT特許出願第PCT/GB85/00392号明細書;英国特許出願公開第GB2188638A号明細書;Amitら、1986 Science、233:747-753;Queenら、1989 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、86:10029-10033;PCT特許出願第PCT/WO9007861号明細書;およびRiechmannら、Nature、332:323-327(1988);Huseら、1988a Science、246:1275-1281を参照されたい)。あるいは、抗体は、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50、またはタンパク質若しくはそれらの他のフラグメントに対する動物若しくはヒト抗体の相補性決定領域を操作することにより製造し得る。例えば、E. MarkとPadlin、"Humanization of Monoclonal Antibodies"、第4章、The Handbook of Experimental Pharmacology、Vol. 113、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、Springer-Verlag(June、1994);Harlowら、1999、Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク;Harlowら、1989、Antibodies: A Laboratory Manual、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー;Houstonら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883;およびBirdら、1988、Science 242:423-426を参照されたい。抗イディオタイプ抗体(Ab2)および抗抗イディオタイプ抗体(Ab3)がさらに提供される。例えば、M. Wetendorfら、"Modulation of anti-tumor immunity by anti-idiotypic antibodies." Idiotypic Network and Diseases、J. CernyとJ. Hiernauxにより編中、1990 J. Am. Soc. Microbiol.、ワシントンDC: pp. 203-229を参照されたい)。これらの抗イディオタイプおよび抗抗イディオタイプ抗体は当業者に公知の技術を使用して製造する。これらの抗体は、診断および臨床的な方法およびキットを包含する多様な目的上使用しうる。

【0054】

10

20

30

40

50

ある状況下で、S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 若しくは - 5 0 の遺伝子産物、抗体、若しくは他の構築物に検出可能な標識 (l a b e l) 若しくは標識 (t a g) を導入することが望ましいかもしれない。本明細書で使用されるところの検出可能な標識 (l a b e l) は、単独で若しくは別の分子との相互作用に際して検出可能なシグナルを提供することが可能である分子である。最も望ましくは、標識は免疫組織化学的分析若しくは免疫蛍光顕微鏡検査での即座の使用のために例えば蛍光により視覚的に検出可能である。例えば、適する標識は、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C)、フィコエリトリン (P E)、アロフィコシアニン (A P C)、コリホスフィン - O (C P O) 若しくはタンデム色素、 P E - シアニン - 5 (P C 5) および P E - テキサスレッド (E C D) を包含する。これらの蛍光色素の全部は商業的に入手可能であり、また、それらの用途は当該技術分野に既知である。他の有用な標識はコロイド状金標識を包含する。なお他の有用な標識は放射活性化合物若しくは元素を包含する。加えて、標識は、アッセイで比色シグナルを表すよう機能する多様な酵素系を包含し、例えばグルコース酸化酵素 (グルコースを基質として使用する) は生成物として過酸化物を放出し、この過酸化物は過酸化酵素、およびテトラメチルベンジジン (T M B) のような水素供与体の存在下で青色として見られる酸化型 T M B を産生する。他の例は、ワサビペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A P)、ならびに、A T P、グルコースおよび N A D + と反応してとりわけ 3 4 0 n m の波長で増大された吸光度として検出される N A D H を生じるグルコース - 6 - リン酸脱水素酵素を伴うヘキソキナーゼを包含する。

【 0 0 5 5 】

本明細書に記述される方法で利用される他の標識系は他の手段により検出可能であり、例えば、色素が埋め込まれている着色ラテックス微粒子 (B a n g s L a b o r a t o r i e s、インディアナ州) を、適用されるアッセイで生じる複合体の存在を示す視覚的シグナルを提供する標的配列とコンジュゲートを形成するために酵素の代わりに使用する。

【 0 0 5 6 】

所望の分子と標識の結合若しくは会合方法は同様に慣習的でありかつ当業者に既知である。既知の標識結合方法が記述されている (例えば、H a n d b o o k o f F l u o r e s c e n t p r o b e s a n d R e s e a r c h C h e m i c a l s、第6版、R . P . M . H a u g l a n d、M o l e c u l a r P r o b e s , I n c .、オレゴン州ユージーン、1996; P i e r c e C a t a l o g a n d H a n d b o o k、L i f e S c i e n c e a n d A n a l y t i c a l R e s e a r c h P r o d u c t s、P i e r c e C h e m i c a l C o m p a n y、イリノイ州ロックフォード、1994 / 1995を参照されたい)。従って標識および結合方法の選択は本発明を制限しない。

【 0 0 5 7 】

S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および - 5 0 の配列、タンパク質およびフラグメントは、組換え製造、化学合成若しくは他の合成手段を包含するいずれかの適する手段により製造しうる。適する製造技術は当業者に公知である。例えば S a m b r o o k ら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l、C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s (ニューヨーク州コールドスプリングハーバー) を参照されたい。あるいは、ペプチドは公知の固相ペプチド合成法 (M e r r i f i e l d、J . A m . C h e m . S o c .、8 5 : 2 1 4 9 (1 9 6 2) ; S t e w a r t と Y o u n g、S o l i d P h a s e P e p t i d e S y n t h e s i s (F r e e m a n、サンフランシスコ、1969) p p . 2 7 - 6 2) によってもまた合成し得る。これらおよび他の適する製造方法は当業者の知識内にあり、そして本発明の制限でない。

【 0 0 5 8 】

加えて、当業者は、S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および - 5 0 配列を、治療および免疫原性分子の i n v i t r o、e x v i v o 若しくは i n v i v o 送達のための多様なウイルスおよびウイルス以外のベクター系のための使用

に容易に適合し得ることを容易に理解するであろう。例えば、一態様において、本明細書に記述されるサルA d キャプシドタンパク質および他のサルアデノウイルスタンパク質は、遺伝子、タンパク質、ならびに他の所望の診断、治療および免疫原性分子のウイルス以外のタンパク質に基づく送達に使用される。こうした一態様において、S A d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50のタンパク質は、アデノウイルスの受容体をもつ細胞へのターゲティングのためある分子に直接若しくは間接的に結合される。好ましくは、ヘキソン、ペントン、ファイバーのようなキャプシドタンパク質若しくは細胞表面受容体のリガンドを有するそれらのフラグメントをこうしたターゲティングに選択する。送達に適する分子は、本明細書に記述される治療分子およびそれらの遺伝子産物のなかから選択される。脂質、ポリLysなどを包含する多様なリンカーをリンカーとして利用しうる。例えば、サルペントンタンパク質は、Medina - Kauwe L Kら、Gene Ther. 2001 May; 8(10): 795 - 803およびMedina - Kauwe L Kら、Gene Ther. 2001 Dec; 8(23): 1753 - 1761に記述されるものに類似の様式でサルペントン配列を使用する融合タンパク質の製造によりこうした目的上容易に利用しうる。あるいは、サルA d タンパク質IXのアミノ酸配列を、米国特許出願第20010047081号明細書に記述されるとおり細胞表面受容体にベクターを標的指向化するのに利用しうる。適するリガンドはCD40抗原、RGD含有若しくはポリリシン含有配列などを包含する。例えばヘキソンタンパク質および/若しくはファイバータンパク質を包含するなお他のサルA d タンパク質をこれらおよび類似の目的に使用しうる。

【0059】

なお他のS A d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50アデノウイルスタンパク質を、当業者に容易に明らかであろう多様な目的上、単独として若しくは他のアデノウイルスタンパク質と組合せて使用しうる。加えて、該S A d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49および- 50アデノウイルスタンパク質のなお他の用途が当業者に容易に明らかであろう。

【0060】

II. 組換えアデノウイルスベクター

本明細書に記述される組成物は、治療若しくはワクチンいずれかの目的上細胞に異種分子を送達するベクターを包含する。本明細書で使用される場所のベクターは、裸のDNA、ファージ、トランスポゾン、コスミド、エピソーム、プラスミド若しくはウイルスを制限なしに包含するいかなる遺伝因子も包含しうる。こうしたベクターは、S A d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49および/若しくは- 50のサルアデノウイルスDNAおよびミニ遺伝子を含有する。「ミニ遺伝子」により、選択された異種遺伝子、ならびに宿主細胞中での該遺伝子産物の翻訳、転写および/若しくは発現を駆動するのに必要な他の調節エレメントの組合せを意味している。

【0061】

典型的には、選択されたアデノウイルス遺伝子に固有の領域中に他のアデノウイルス配列を含有する核酸分子中にミニ遺伝子が配置されるようなS A d V由来アデノウイルスベクターを設計する。該ミニ遺伝子は、所望の場合はその領域の機能を破壊するように既存の遺伝子領域に挿入しうる。あるいは、該ミニ遺伝子は部分的に若しくは完全に欠失されたアデノウイルス遺伝子の部位に挿入しうる。例えば、該ミニ遺伝子は、選択されうるもののなかで、機能的E1欠失若しくは機能的E3欠失の部位のような部位に配置しうる。「機能的に欠失された」若しくは「機能的欠失」という用語は、該遺伝子領域が遺伝子発現の機能的産物を産生することがもはや可能でないように十分な量の遺伝子領域が除去または別の方法で例えば突然変異若しくは改変により損傷されることを意味している。所望の場合は該遺伝子領域全体を除去しうる。遺伝子破壊若しくは欠失の他の適する部位は本出願の別の場所で論考する。

【0062】

例えば、組換えウイルスの生成に有用な生産ベクターについて、該ベクターは、ミニ遺

10

20

30

40

50

伝子、ならびにアデノウイルスゲノムの5'端若しくはアデノウイルスゲノムの3'端のいずれかまたはアデノウイルスゲノムの5'および3'端の双方を含有しうる。アデノウイルスゲノムの5'端は、パッケージングおよび複製に必要な5'シスエレメント、すなわち5'逆方向末端反復(I T R)配列(複製起点として機能する)ならびに天然の5'パッケージングエンハンサードメイン(直鎖状A dゲノムをパッケージングするのに必要な配列およびE 1プロモーターのエンハンサーエレメントを含有する)を含有する。アデノウイルスゲノムの3'端はパッケージングおよび被包化に必要な3'シスエレメント(I T Rを包含する)を包含する。適しては、組換えアデノウイルスは5'および3'双方のアデノウイルスシスエレメントを含有し、また、ミニ遺伝子は該5'および3'アデノウイルス配列の間に配置される。S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9若しくは - 5 0に基づくアデノウイルスベクターは、これら若しくは他の供給源からの付加的なアデノウイルス配列もまた含有しうる。

10

【 0 0 6 3 】

適しては、これらのS A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9若しくは - 5 0に基づくアデノウイルスベクターは、それぞれS A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9若しくは - 5 0のアデノウイルスゲノム由来の1個若しくはそれ以上のアデノウイルスエレメントを含有する。一態様において、該ベクターはS A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9若しくは - 5 0からのアデノウイルス I T Rならびに同一アデノウイルス血清型からの付加的なアデノウイルス配列を含有する。別の態様において、該ベクターは I T Rを提供するものと異なるアデノウイルス血清型由来であるアデノウイルス配列を含有する。

20

【 0 0 6 4 】

本明細書で定義されるところのシュードタイピングされた(p s e u d o t y p e d)アデノウイルスは、アデノウイルスのキャプシドタンパク質が I T Rを提供するアデノウイルスと異なるアデノウイルスからであるアデノウイルスを指す。

【 0 0 6 5 】

さらに、キメラ若しくはハイブリッドアデノウイルスを、当業者に既知の技術を使用して、本明細書に記述されるアデノウイルスを使用して構築しうる。例えば米国特許第7, 291, 498号明細書を参照されたい。

【 0 0 6 6 】

I T Rのアデノウイルス供給源およびベクター中に存在するいかなる他のアデノウイルス配列の供給源の選択も本態様の制限でない。多様なアデノウイルス株がA m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n、バージニア州マナサスから入手可能であるか、若しくは多様な商業的および組織的供給源から求めにより入手可能である。さらに、多くのこうした株の配列は例えばP u b M e dおよびG e n B a n kを包含する多様なデータベースから入手可能である。他のサル若しくはヒトアデノウイルスから製造された相同なアデノウイルスベクターが公表された文献に記述されている(例えば米国特許第5, 240, 846号明細書を参照されたい)。A d 5型(G e n B a n k 受託番号M 7 3 2 6 0)を包含する多数のアデノウイルス型のD N A配列がG e n B a n kから入手可能である。アデノウイルス配列は、血清型2、3、4、7、12および40のような、ならびに現在同定されているヒト型のいずれもさらに包含するいずれの既知のアデノウイルス血清型からも得ることができる。同様に、ヒト以外の動物(例えばサル)を感染されることが既知のアデノウイルスもまた該ベクター構築物で使用しうる。例えば米国特許第6, 083, 716号明細書を参照されたい。

30

40

【 0 0 6 7 】

本明細書に記述されるベクターの構築で使用されるウイルス配列、ヘルパーウイルス(必要な場合)および組換えウイルス粒子、ならびに他のベクター成分および配列は上述されたとおり得られる。S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9および/若しくは - 5 0のD N A配列を、ベクターおよびこうしたベクターの製造で有用な細胞株を構築するのに使用する。

50

【 0 0 6 8 】

配列の欠失、挿入および他の突然変異を包含する該 S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および / 若しくは - 5 0 ベクターを形成する核酸配列の改変は、標準的な分子生物学技術を使用して生成することができ、そして本態様の範囲内にある。

【 0 0 6 9 】

A . 「ミニ遺伝子」

導入遺伝子の選択、「ミニ遺伝子」のクローニングおよび構築ならびにウイルスベクターへのその挿入に使用される方法は、本明細書に提供される教示を与えられる当該技術分野の熟練内にある。

【 0 0 7 0 】

1 . 導入遺伝子

導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質若しくは他の産物をコードする導入遺伝子に隣接するベクター配列に異種の核酸配列である。核酸コーディング配列は、宿主細胞中での導入遺伝子の転写、翻訳および / 若しくは発現を可能にする様式で調節成分に効果的に連結されている。

【 0 0 7 1 】

導入遺伝子配列の組成は、生じるベクターが利用されるであろう使用に依存することができる。例えば、1種の導入遺伝子配列は、発現に際して検出可能なシグナルを生じるレポーター配列を包含する。こうしたレポーター配列は、 - ラクターゼ、 - ガラクトシダーゼ (L a c Z)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T)、ルシフェラーゼ、例えば C D 2、C D 4、C D 8 を包含する膜結合タンパク質、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質、およびそれに向けられた高親和性抗体が存在するか若しくは慣習的手段により製造され得る当該技術分野で公知の他者、ならびにとりわけヘマグルチニン若しくは M y c からの抗原標識ドメインに適切に融合された膜結合タンパク質を含んでなる融合タンパク質をコードする D N A 配列を制限なしに包含する。これらのコーディング配列は、それらの発現を駆動する調節エレメントと会合される場合に、酵素的、X線撮影、比色、蛍光、若しくは他の分光学的アッセイ、蛍光標示式細胞分取アッセイ、ならびに酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A) および免疫組織化学を包含する免疫学的アッセイを包含する慣習的手段により検出可能なシグナルを提供する。例えば、マーカー配列が L a c Z 遺伝子である場合、シグナルを保有するベクターの存在は - ガラクトシダーゼ活性についてのアッセイにより検出する。導入遺伝子が G F P 若しくはルシフェラーゼである場合、該シグナルを保有するベクターはルミノメーターで色若しくは光産生により視覚的に測定しうる。

【 0 0 7 2 】

一態様において、導入遺伝子は、タンパク質、ペプチド、R N A、酵素若しくは R N A 触媒のような生物学および医学で有用である産物をコードするマーカー以外の配列である。望ましい R N A 分子は t R N A、d s R N A、リボソーム R N A、R N A 触媒およびアンチセンス R N A を包含する。有用な R N A 配列の一例は、処置された動物中での標的にされた核酸配列の発現を消滅させる配列である。

【 0 0 7 3 】

導入遺伝子は、例えば遺伝子欠損症の処置に、癌治療薬若しくはワクチンとして、免疫応答の誘導のため、および / または予防ワクチンの目的上使用しうる。本明細書で使用されるところの免疫応答の誘導は、ある分子 (例えば遺伝子産物) に対する T 細胞および / 若しくは体液性免疫応答を誘導する該分子の能力を指す。例えば多サブユニットタンパク質により引き起こされる状態を是正若しくは改善するための複数の導入遺伝子を使用を企図している。ある状況において、異なる導入遺伝子を、タンパク質の各サブユニットをコードする、または異なるペプチド若しくはタンパク質をコードするのに使用しうる。これは、該タンパク質サブユニットをコードする D N A の大きさが大きい場合、例えば免疫グロブリン、血小板由来増殖因子若しくはジストロフィンタンパク質について望ましい。細

10

20

30

40

50

胞が多サブユニットタンパク質を産生するために、細胞を多様なサブユニットのそれぞれを含有する組換えウイルスに感染させる。あるいは、1タンパク質の多様なサブユニットを同一導入遺伝子によりコードしうる。この場合、単一導入遺伝子がサブユニットのそれぞれをコードするDNAを包含し、各サブユニットのDNAは配列内リボソーム進入部位(IRES)により分離される。これは、サブユニットのそれぞれをコードするDNAの大きさが小さい、例えば該サブユニットをコードするDNAおよびIRESの全体の大きさが5キロ塩基未満である場合に望ましい。IRESに対する一代替として、該DNAは翻訳後事象で自己切断する2Aペプチドをコードする配列により分離してもよい。例えばM. L. Donnellyら、J. Gen. Virol.、78(Pt 1):13-21(Jan 1997); Furler, S.ら、Gene Ther.、8(11):864-873(June 2001); Klump H.ら、Gene Ther.、8(10):811-817(May 2001)を参照されたい。この2AペプチドはIRESよりかなり小さく、空間が制限因子である場合にそれを使用に十分に適するようになる。しかしながら、選択される導入遺伝子は、いかなる生物学的に活性の産物若しくは他の産物、例えば研究に所望の産物もコードしうる。

【0074】

適する導入遺伝子は当業者により容易に選択されうる。導入遺伝子の選択は本態様の制限であるとみなされない。

【0075】

2. 調節エレメント

ミニ遺伝子について上で同定された主要エレメントに加え、該ベクターは、本明細書に記述される方法により製造されかつ/若しくは当業者に既知のプラスミドベクターでトランスフェクトされた若しくはウイルスに感染させた細胞中でのその転写、翻訳および/若しくは発現を可能にする様式で導入遺伝子に作動可能に連結されている必要な慣習的調節領域もまた包含する。「調節領域」若しくは「制御配列」は、ポリヌクレオチドの複製、重複、転写、スプライシング、翻訳若しくは分解を包含する該ポリヌクレオチドの機能制御に寄与する分子の相互作用に関わるヌクレオチド配列である。調節は該過程の頻度、速度若しくは特異性に影響を与える可能性があり、そして本質的に高める若しくは阻害性であることができる。調節領域は当該技術分野で既知であり、そしていくつかの例を本明細書の別の場所で論考する。本明細書で使用されるどころの「作動可能に連結されている」配列は、目的の遺伝子に隣接する発現制御配列、およびトランスで若しくは少し離れて作用して目的の遺伝子を制御する発現制御配列の双方を包含する。

【0076】

発現制御配列は、適切な転写開始、終止、プロモーターおよびエンハンサー配列; スプライシングおよびポリアデニル化(ポリA)シグナルのような効率的なRNAプロセッシングシグナル; 細胞質mRNAを安定化する配列; 翻訳効率を高める配列(すなわちコザックコンセンサス配列); タンパク質の安定性を高める配列; ならびに所望の場合はコードされる産物の分泌を高める配列を包含する。

【0077】

天然の、構成的、誘導可能および/若しくは組織特異的であるプロモーターを包含する多数の発現制御配列が当該技術分野で既知でありかつ利用されうる。構成的プロモーターの例は、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター(場合によってはRSVエンハンサーを伴う)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(場合によってはCMVエンハンサーを伴う)(例えばBoshartら、Cell、41:521-530(1985)を参照されたい)、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 α -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、およびEF1プロモーター(Invitrogen)を制限なしに包含する。

【0078】

誘導可能なプロモーターは遺伝子発現の調節を可能にし、そして外的に供給される化合

10

20

30

40

50

物、温度のような環境因子、若しくは特定の生理学的状態、例えば急性期、細胞の特定の分化段階の存在により、または複製細胞中でのみ調節され得る。誘導可能なプロモーターおよび誘導可能な系は *In vitro* gen、Clontech および Ariad を制限なしに包含する多様な商業的供給源から入手可能である。多くの他の系が記述されておりかつ当業者により容易に選択され得る。例えば、誘導可能なプロモーターは、亜鉛で誘導可能なヒツジメタロチオニン (metallothionine) (MT) プロモーターおよびデキサメサゾン (Dex) で誘導可能なマウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーターを包含する。他の誘導可能な系は、T7ポリメラーゼプロモーター系 (第WO 98/10088号明細書); エクジソン昆虫プロモーター (Noz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346 - 3351 (1996)), テトラサイクリンで抑制可能な系 (Gossen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547 - 5551 (1992)), テトラサイクリンで誘導可能な系 (Gossen, Science, 268: 1766 - 1769 (1995), Harvey, Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 512 - 518 (1998) もまた参照されたい) を包含する。他の系は、FK506二量体、カストラジオール (castradiol) を使用するVP16若しくはp65、ジフェノールムリスレロン (diph enol murislerone)、RU486で誘導可能な系 (Wang, Nat. Biotech., 15: 239 - 243 (1997) および Wang, Gene Ther., 4: 432 - 441 (1997)) ならびにラパマイシンで誘導可能な系 (Magari, J. Clin. Invest., 100: 2865 - 2872 (1997)) を包含する。いくつかの誘導可能なプロモーターの有効性は時間とともに増大する。こうした場合には、複数のリプレッサーをタンデムに挿入することにより (例えばIRESによりTetRに結合したTetR) こうした系の有効性を高め得る。あるいは、所望の機能についてスクリーニングする前に最低3日待機し得る。この系の有効性を高めるための既知手段により所望のタンパク質の発現を高め得る (例えばウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WP RE) を使用して)。

【0079】

別の態様において、導入遺伝子の天然のプロモーターを使用することができる。該天然のプロモーターは、該導入遺伝子の発現が天然の発現を模倣すべきであることが望ましい場合に好ましいことがある。該天然のプロモーターは、導入遺伝子の発現が一時的に若しくは発達的に、または組織特異的様式で、あるいは特定の転写刺激に応答して調節されなければならない場合に使用しうる。さらなる一態様において、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位若しくはコザックコンセンサス配列のような他の天然の発現調節領域もまた天然の発現を模倣するのに使用しうる。

【0080】

導入遺伝子の別の態様は組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている導入遺伝子を包含する。例えば、骨格筋での発現が望ましい場合は筋で活性のプロモーターを使用すべきである。これらは、骨格 - アクチン、ミオシン軽鎖2A、ジストロフィン、筋クレアチンキナーゼをコードする遺伝子からのプロモーター、ならびに天然に存在するプロモーターより高い活性をもつ合成筋プロモーター (Li, Nat. Biotech., 17: 241 - 245 (1999) を参照されたい) を包含する。組織特異的であるプロモーターの例は、とりわけ、肝 (アルブミン、Miyatake, J. Virol., 71: 5124 - 32 (1997); B型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandig, Gene Ther., 3: 1002 - 9 (1996); -フェトプロテイン (AFP)、Arbutnot, Hum. Gene Ther., 7: 1503 - 14 (1996)), 骨オステオカルシン (Stein, Mol. Biol. Rep., 24: 185 - 96 (1997)); 骨シアロプロテイン (Chen, J. Bone Miner. Res., 11: 654 - 64 (1996)), リンパ球 (CD2, Hansal, J. Immunol., 161: 1063 - 8 (1998)); 免疫グロブリンH鎖; T細胞受容体鎖)、ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) プロモーター (Ander

10

20

30

40

50

senら、Cell . Mol . Neurobiol .、13 : 503 - 15 (1993))、神経フィラメント軽鎖遺伝子 (Piccioliら、Proc . Natl . Acad . Sci . USA、88 : 5611 - 5 (1991))、および神経特異的 vgf 遺伝子 (Piccioliら、Neuron、15 : 373 - 84 (1995)) のような神経の (neuronal) について既知である。

【 0081 】

場合によっては、治療上有用な若しくは免疫原性の産物をコードする導入遺伝子を保有するベクターは、選択可能なマーカー若しくはレポーター遺伝子もまた包含することができ、とりわけジェネチシン、ハイグロマイシン若しくはピューリマイシン (purimycin) 耐性をコードする配列を包含しうる。アンピシリン耐性のような、こうした選択可能なレポーター若しくはマーカー遺伝子 (好ましくはウイルス粒子中にパッケージングされるようにウイルスゲノムの外側に配置される) を、細菌細胞中の該プラスミドの存在を知らせるのに使用し得る。ベクターの他成分は複製起点を包含しうる。これらおよび他のプロモーターならびにベクターエレメントの選択は慣習的であり、そして多くのこうした配列が利用可能である (例えば Sambrookら、およびその中に引用される参考文献を参照されたい) 。

【 0082 】

これらのベクターは、当業者に既知の技術とともに本明細書に提供される技術および配列を使用して生成する。こうした技術は、教科書 (Sambrookら、Molecular Cloning : A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー) に記述されるもののような cDNA の慣習的クローニング技術、アデノウイルスゲノムのオーバーラップオリゴヌクレオチド配列の使用、ポリメラーゼ連鎖反応、および所望のヌクレオチド配列を提供するいずれかの適する方法を包含する。

【 0083 】

III . ウイルスベクターの製造

一態様において、サルアデノウイルスプラスミド (若しくは他のベクター) を使用してアデノウイルスベクターを製造する。一態様においてアデノウイルスベクターは複製欠損であるアデノウイルス粒子である。一態様において、アデノウイルス粒子は E1a および / 若しくは E1b 遺伝子の欠失により複製欠損にされている。あるいは、アデノウイルスは、場合によっては E1a および / 若しくは E1b 遺伝子を保持しつつ別の手段により複製欠損にされている。該アデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムに対する他の突然変異、例えば他の遺伝子中の温度感受性突然変異若しくは欠失もまた含有し得る。他の態様において、アデノウイルスベクター中に無傷の E1a および / 若しくは E1b 領域を保持することが望ましい。こうした無傷の E1 領域は、アデノウイルスゲノム中のその天然の場所に配置しうるか、若しくは天然のアデノウイルスゲノム中の欠失の部位 (例えば E3 領域中) に置くことができる。

【 0084 】

ヒト (若しくは他の哺乳動物) 細胞への遺伝子の送達のための有用なサルアデノウイルスベクターの構築において、ある範囲のアデノウイルス核酸配列を該ベクター中で使用し得る。例えば、アデノウイルス後初期遺伝子 (delayed early gene) E3 の全部若しくは一部分を、組換えウイルスの一部を形成するサルアデノウイルス配列から除外しうる。サル E3 の機能は組換えウイルス粒子の機能および産生に無関係であると考えられている。E4 遺伝子の少なくとも ORF6 領域、およびより望ましくはこの領域の機能の冗長性により E4 領域全体の欠失を有するサルアデノウイルスベクターもまた構築しうる。なお別の SA dV - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49 若しくは - 50 ベクターは後初期遺伝子 E2a 中に欠失を含有する。欠失はサルアデノウイルスゲノムの後期遺伝子 L1 から L5 のいずれで行ってもまたよい。同様に、中間遺伝子 (intermediate gene) IX および IVa₂ 中の欠失がいくつかの目的上有用でありうる。他の欠失を他の構造的若しくは非構造的アデノウイルス遺伝子中で行いう

10

20

30

40

50

る。上で論考された欠失は個別に使用しうる。すなわち、本明細書に記述されるところの使用のためのアデノウイルス配列は単一領域のみに欠失を含有しうる。あるいは、遺伝子全体、若しくはそれらの生物学的活性を破壊するのに効果的なそれらの部分の欠失をいかなる組合せで使用してもよい。例えば、一例示的ベクター中で、アデノウイルス配列は、E 3の欠失を伴う若しくは伴わない、E 1遺伝子およびE 4遺伝子、若しくはE 1、E 2 aおよびE 3遺伝子、若しくはE 1およびE 3遺伝子、若しくはE 1、E 2 aおよびE 4遺伝子などの欠失を有しうる。上で論考されたとおり、こうした欠失を、所望の結果を達成するために温度感受性突然変異のような他の突然変異とともに使用しうる。

【0085】

いずれかの必須アデノウイルス配列（例えばE 1 a、E 1 b、E 2 a、E 2 b、E 4 O R F 6、L 1、L 2、L 3、L 4およびL 5）を欠くアデノウイルスベクターは、ウイルスの感染性およびアデノウイルス粒子の増殖に必要とされる該欠けているアデノウイルス遺伝子産物の存在下で培養しうる。これらのヘルパー機能は、1種若しくはそれ以上のヘルパー構築物（例えばプラスミド若しくはウイルス）またはパッケージング宿主細胞の存在下で該アデノウイルスベクターを培養することにより提供しうる。例えば、1996年5月9日に公開されかつ引用することにより本明細書に組み込まれる国際特許出願第W O 9 6 / 1 3 5 9 7号明細書中の「最小」ヒトA dベクターの製造について記述される技術を参照されたい。

【0086】

1. ヘルパーウイルス

従って、ミニ遺伝子を保有するため使用されるウイルスベクターのサルアデノウイルス遺伝子内容に依存して、ヘルパーアデノウイルス若しくは非複製ウイルスフラグメントが、該ミニ遺伝子を含有する感染性組換えウイルス粒子を製造するのに必要な十分なサルアデノウイルス遺伝子配列を提供するのに必要でありうる。有用なヘルパーウイルスは、アデノウイルスベクター構築物に存在せずかつ/若しくは該ベクターがトランスフェクトされるパッケージング細胞株により発現されない、選択されたアデノウイルス遺伝子配列を含有する。一態様において、該ヘルパーウイルスは複製欠損でありかつ上述された配列に加えて多様なアデノウイルス遺伝子を含有する。こうしたヘルパーウイルスは、望ましくはE 1発現細胞株とともに使用する。

【0087】

ヘルパーウイルスは、Wuら、J. Biol. Chem.、264:16985-16987(1989); K. J. FisherとJ. M. Wilson、Biochem. J.、299:49(April 1, 1994)に記述される場所のポリカチオン複合物中でもまた形成しうる。ヘルパーウイルスは場合によっては第二のレポーターミニ遺伝子を含有しうる。多数のこうしたレポーター遺伝子が当該技術分野に既知である。アデノウイルスベクター上の導入遺伝子と異なるヘルパーウイルス上のレポーター遺伝子の存在が、A dベクターおよびヘルパーウイルスの双方が独立にモニターされることを可能にする。本第二のレポーターは、精製に際して、生じる組換えウイルスとヘルパーウイルスの間の分離を可能にするのに使用する。

【0088】

2. 補完細胞株

上述された遺伝子のいずれかで欠失された組換えサルアデノウイルス(A d)を生成するためには、欠失された遺伝子領域の機能を、該ウイルスの複製および感染性に不可欠である場合に、ヘルパーウイルス若しくは細胞株すなわち補完若しくはパッケージング細胞株により該組換えウイルスに供給しなければならない。多くの状況で、ヒトE 1を発現する細胞株を使用して該サルA dベクターをトランス補完し(trans complement)得る。これは、S A d V - 4 3、- 4 5、- 4 6、- 4 7、- 4 8、- 4 9および- 5 0配列と現在入手可能なパッケージング細胞で見出されるヒトA d E 1配列の間の多様性により、現在のヒトE 1含有細胞の使用が複製および製造過程の間の複製能力のあるアデノウイルスの生成を予防するため、とりわけ有利である。しかしながら、ある状況で

10

20

30

40

50

は、E1欠失サルアデノウイルスの製造に利用し得るE1遺伝子産物を発現する細胞株を利用することが望ましいであろう。こうした細胞株は記述されている。例えば米国特許第6,083,716号明細書を参照されたい。

【0089】

所望の場合は、選択された親細胞株中での発現のためのプロモーターの転写制御下にSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50からの少なくともアデノウイルスE1遺伝子を発現するパッケージング細胞若しくは細胞株を生成しうる。誘導可能な若しくは構成的プロモーターを本目的上使用しうる。こうしたプロモーターの例は本明細の別の場所に詳述されている。親細胞をいずれかの所望のSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50遺伝子を発現する新規細胞株の生成のため選択する。制限なしに、こうした親細胞株は、とりわけHeLa(ATCC受託番号CCL2)、A549(ATCC受託番号CCL185)、HEK293、KB(CCL17)、Detroit(例えばDetroit510、CCL72)およびWI-38(CCL75)細胞でありうる。これらの細胞株は全部American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209から入手可能である。他の適する親細胞株は他の供給源から得ることができる。

【0090】

こうしたE1発現細胞株は組換えサルアデノウイルスE1欠失ベクターの生成において有用である。加えて、若しくは、別法として、1種若しくはそれ以上のサルアデノウイルス遺伝子産物、例えばE1a、E1b、E2aおよび/若しくはE4ORF6を発現する細胞株を、本質的に同一の手順を使用して構築することができ、組換えサルアデノウイルスベクターの生成で使用する。こうした細胞株を、それらの産物をコードする必須遺伝子が欠失されたアデノウイルスベクターをトランス補完する、若しくはヘルパー依存ウイルス(例えばアデノ随伴ウイルス)のパッケージングに必要なヘルパー機能を提供するのに利用し得る。宿主細胞の製造は選択されたDNA配列の集成のような技術を必要とする。この集成は慣習的技術を利用して成し遂げうる。こうした技術は、公知でありかつ上で引用されたSambrookらに記述されるcDNAおよびゲノムクローニング、ポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせたアデノウイルスゲノムのオーバーラップオリゴヌクレオチド配列の使用、合成法、ならびに所望のヌクレオチド配列を提供するいずれかの他の適する方法を包含する。

【0091】

なお別法において、必須アデノウイルス遺伝子産物はアデノウイルスベクターおよび/若しくはヘルパーウイルスによりトランスに提供する。こうした場合に、適する宿主細胞は、原核生物(例えば細菌)細胞、ならびに昆虫細胞、酵母細胞および哺乳動物細胞を包含する真核生物細胞を包含するいかなる生物有機体からも選択し得る。とりわけ望ましい宿主細胞は、A549、WEHI、3T3、10T1/2、HEK293細胞若しくはPERC6(その双方は機能的アデノウイルスE1を発現する)(Fallaux, FJら、(1998)、Hum Gene Ther、9:1909-1917)、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2、ならびにヒト、サル、マウス、ラット、ウサギおよびハムスターを包含する哺乳動物由来の初代線維芽細胞、肝細胞および筋芽細胞のような細胞を制限なしに包含するいかなる哺乳動物種のなかからも選択される。細胞を提供する哺乳動物種の選択は本発明の制限でなく、哺乳動物細胞の型すなわち線維芽細胞、肝細胞、腫瘍細胞などもそうでない。

【0092】

3. ウイルス粒子の集成および細胞株のトランスフェクション

一般に、ミニ遺伝子を含んでなるベクターをトランスフェクションにより送達する場合、該ベクターは、約 1×10^4 細胞ないし約 1×10^{13} 細胞、および好ましくは約 10^5 細胞に対し約 $5 \mu\text{g}$ から約 $100 \mu\text{g}$ までのDNA、および好ましくは約 10 ないし約 $50 \mu\text{g}$ のDNAの量で送達される。しかしながら、宿主細胞に対するベクターDNAの

10

20

30

40

50

相対量は、選択されるベクター、送達方法および選択される宿主細胞のような因子を考慮に入れて調節してよい。

【0093】

該ベクターは、裸のDNA、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、エピソーム、ウイルスなどを包含する当該技術分野で既知の若しくは上で開示されたいずれのベクターでもよい。ベクターの宿主細胞への導入は、トランスフェクションおよび感染を包含する当該技術分野で既知の若しくは上で開示されたところのいずれの手段によっても達成しうる。アデノウイルス遺伝子の1種若しくはそれ以上が、宿主細胞のゲノム中に安定に組込まれうるか、エピソームとして安定に発現されうるか、若しくは一過性に発現されうる。遺伝子産物は全部、エピソーム上で一過性に発現されうるか若しくは安定に組込まれうるか、または、遺伝子産物の数種が安定に発現されうる一方で他者は一過性に発現される。さらに、アデノウイルス遺伝子のそれぞれのプロモーターは、構成的プロモーター、誘導可能なプロモーター若しくは天然のアデノウイルスプロモーターから独立に選択しうる。プロモーターは、例えば生物体若しくは細胞の特定の生理学的状態により（すなわち分化状態により、または複製中の若しくは静止状態の細胞中で）、あるいは外的に添加される因子により調節しうる。

10

【0094】

宿主細胞中への（プラスミド若しくはウイルスのような）分子の導入は、当業者に既知のおよび本明細書を通じて論考されるところの技術を使用してもまた達成しうる。好ましい態様において、標準的トランスフェクション技術、例えばCaPO₄トランスフェクション若しくは電気穿孔法を使用する。

20

【0095】

アデノウイルスの選択されたDNA配列（ならびに導入遺伝子および他のベクターエレメント）の多様な中間プラスミドへの集成、ならびに組換えウイルス粒子を製造するためのプラスミドおよびベクターの使用は全部慣習的技術を使用して達成される。こうした技術は、教科書（上で引用されたSambrookら）に記述されるもののようなcDNAの慣習的クローニング技術、アデノウイルスゲノムのオーバーラップオリゴヌクレオチド配列の使用、ポリメラーゼ連鎖反応、および所望のヌクレオチド配列を提供するいずれかの適する方法を包含する。標準的トランスフェクションおよびコトランスフェクション技術、例えばCaPO₄沈殿技術を使用する。使用される他の慣習的方法は、ウイルスゲノムの相同的組換え、アガーオーバーレイ中のウイルスのプラーク形成（plaqueing）、シグナル発生の測定方法などを包含する。

30

【0096】

例えば、所望のミニ遺伝子含有ウイルスベクターの構築および集成後に、該ベクターをヘルパーウイルスの存在下に*in vitro*でパッケージング細胞株にトランスフェクトする。相同的組換えがヘルパーおよびベクター配列間で起こり、それは該ベクター中のアデノウイルス-導入遺伝子配列が複製されかつビリオンキャプシドにパッケージングされることを可能にし、組換えウイルスベクター粒子をもたらし。こうしたウイルス粒子の現在の製造方法はトランスフェクションに基づく。しかしながら本発明はこうした方法に制限されない。生じる組換えサルアデノウイルスは選択された細胞への選択された導入遺伝子の移入において有用である。

40

【0097】

IV. 組換えアデノウイルスベクターの使用

組換えサルアデノウイルス（SAdV）-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50に基づくベクターは、*in vitro*、*ex vivo*および*in vivo*でヒト若しくはサル以外の家畜患者への遺伝子移入に有用である。

【0098】

本明細書に記述される組換えアデノウイルスベクターを、異種遺伝子によりコードされる産物の*in vitro*での製造のための発現ベクターとして使用し得る。例えば、E1欠失の場所に挿入された遺伝子を含有する組換えアデノウイルスを、上述されたところ

50

の E 1 発現細胞株にトランスフェクトしうる。あるいは、複製能力のあるアデノウイルスを別の選択された細胞株で使用しうる。該トランスフェクトした細胞をその後慣習的様式で培養して、組換えアデノウイルスにプロモーターから遺伝子産物を発現させる。該遺伝子産物をその後、培養物からの既知の慣習的なタンパク質単離および回収方法により培地から回収しうる。

【 0 0 9 9 】

S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 若しくは - 5 0 由来組換えサルアデノウイルスベクターは、生物体が 1 種若しくはそれ以上の A A V 血清型に対する中和抗体を有する場合であっても、選択された宿主細胞に選択された導入遺伝子を *i n v i v o* 若しくは *e x v i v o* で送達し得る効率的遺伝子移入媒体を提供する。一態様において、r A A V および細胞を *e x v i v o* で混合し；慣習的方法論を使用して感染細胞を培養し；そして形質導入された細胞を患者に再注入する。これらの組成物は、治療目的上、および保護免疫を誘導することを包含する免疫化のための遺伝子送達にとりわけ良好に適する。

10

【 0 1 0 0 】

より一般的には、S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 若しくは - 5 0 組換えアデノウイルスベクターは、下述されるとおり治療若しくは免疫原性分子の送達に利用することができる。該組換えアデノウイルスベクターが組換えアデノウイルスベクターの反復送達を必要とする療法での使用にとりわけ良好に適することが双方の応用について容易に理解されるであろう。こうした療法は、典型的に、ウイルスキャプシドが変えられている一連のウイルスベクターの送達を必要とする。ウイルスキャプシドは、各その後の投与について、または予め選択された数の特定の血清型キャプシドの投与（例えば 1、2、3、4 回若しくはそれ以上）の後に変えることができる。従って、ある療法は、第一のサルキャプシドをもつ r A d の送達、第二のサルキャプシドをもつ r A d を用いる送達、および第三のサルキャプシドを用いる送達を必要としうる。単独で、相互と組合せて、若しくは他のアデノウイルス（好ましくは免疫学的に交差反応性でない）と組合せて S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 若しくは - 5 0 キャプシドを使用する多様な他の療法が当業者に明らかであろう。場合によっては、こうした療法は、本明細書に記述されるような他のヒト以外の霊長類のアデノウイルス、ヒトアデノウイルス若しくは人工配列のキャプシドをもつ r A d の投与を必要としうる。療法の各相は、単一 A d キャプシドを用いる一連の注入（若しくは他の送達経路）の投与、次いで異なる A d 供給源からの別のキャプシドを伴うシリーズを必要としうる。あるいは、S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 若しくは - 5 0 ベクターを、他のウイルス系、ウイルス以外の送達系、タンパク質、ペプチドおよび他の生物学的に活性の分子を包含する、他のアデノウイルスに媒介されない送達系を必要とする療法で利用しうる。

20

30

【 0 1 0 1 】

以下のセクションは、該 S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および - 5 0 ベクターを介して送達しうる例示的分子に焦点を当てることができる。

【 0 1 0 2 】

A . 治療分子の A d 媒介性送達

40

一態様において、上述された組換えベクターを公表された遺伝子治療方法に従ってヒトに投与する。選択された導入遺伝子を持つサルウイルスベクターは、好ましくは生物学的に適合性の溶液若しくは製薬学的に許容できる送達ベヒクルに懸濁して患者に投与しうる。適するベヒクルは滅菌生理的食塩水を包含する。製薬学的に許容できる担体であることが既知かつ当業者に公知の他の水性および非水性の等張の滅菌注入溶液ならびに水性および非水性の滅菌懸濁液を本目的上使用しうる。

【 0 1 0 3 】

該サルアデノウイルスベクターは、医学の技術分野の当業者により決定され得る、標的細胞を形質導入し、ならびに不要な有害作用を伴わず若しくは医学上許容できる生理学的効果を伴い治療上の利益を提供するのに十分なレベルの遺伝子移入および発現を提供する

50

のに十分な量で投与する。慣習的かつ製薬学的に許容できる投与経路は、限定されるものでないが、網膜への直接送達および他の眼内送達法、肝への直接送達、吸入、鼻内、静脈内、筋肉内、気管内、皮下、皮内、直腸、経口および他の非経口投与経路を挙げることができる。投与経路は、所望の場合は組合せうるか、または導入遺伝子若しくは状態に依存して調節しうる。投与経路は、主として、処置されている状態の性質に依存することができる。

【0104】

ウイルスベクターの投与量は、主として、処置されている状態、患者の年齢、重量および健康状態のような因子に依存することができ、そして従って患者間で異なりうる。例えば、ウイルスベクターの治療上有効な成体のヒト若しくは家畜の投与量は、一般に約 1×10^6 から約 1×10^{15} 粒子まで、約 1×10^{11} ないし 1×10^{13} 粒子、若しくは約 1×10^9 ないし 1×10^{12} 粒子のウイルスの濃度を含有する約 $100 \mu\text{L}$ から約 100 mL までの担体の範囲にある。投与量は動物の大きさおよび投与経路に依存して変動することができる。例えば、筋肉内注入に適するヒト若しくは家畜の投与量（約 80 kg の動物について）は、単一部位について 1 mL あたり約 1×10^9 ないし約 5×10^{12} 粒子の範囲にある。場合によっては複数の投与部位が送達されうる。別の例において、適するヒト若しくは家畜の投与量は、経口製剤について約 1×10^{11} ないし約 1×10^{15} 粒子の範囲にありうる。当業者は、投与経路および該組換えベクターを使用する治療若しくはワクチンの応用に依存してこれらの用量を調節しうる。導入遺伝子の発現のレベル、若しくは免疫原については循環抗体のレベルをモニターして投与量の投与頻度を決定し得る。投与の頻度のタイミングのなお他の決定方法は当業者に容易に明らかであろう。

【0105】

任意の方法の一段階は、適する量の短時間作用型免疫調節物質のウイルスベクターの投与と同時に、またはその前若しくは後のいずれかの患者への共投与を必要とする。選択される免疫調節物質は、組換え SAdV - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49 若しくは - 50 ベクターに向けられる中和抗体の形成を阻害することが可能な、若しくは該ベクターの細胞溶解性 T リンパ球 (CTL) 排除を阻害することが可能な剤と本明細書で定義する。免疫調節物質は、T ヘルパーサブセット (T_{H1} 若しくは T_{H2}) と B 細胞の間の相互作用を妨害して中和抗体形成を阻害しうる。あるいは、免疫調節物質は、 T_{H1} 細胞と CTL の間の相互作用を阻害して該ベクターの CTL 排除の発生を低下させうる。多様な有用な免疫調節物質およびそれらの使用のための投与量が、例えば Yangら、J. Virol.、70 (9) (Sept.、1996)；1996年5月2日に公開された国際特許出願第 WO 96 / 12406 号明細書；および国際特許出願第 PCT / US 96 / 03035 号明細書（全部は引用することにより本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【0106】

1. 治療的導入遺伝子

導入遺伝子によりコードされる有用な治療的産物は、インスリン、グルカゴン、成長ホルモン (GH)、副甲状腺ホルモン (PTH)、成長ホルモン放出因子 (GRF)、卵巣刺激ホルモン (FSH)、黄体化ホルモン (LH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、アンジオポエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、エリスロポエチン (EPO)、結合組織増殖因子 (CTGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、上皮成長因子 (EGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 I および II (IGF-1 および IGF-II)、TGF、アクチビン、インヒピンを包含するトランスフォーミング増殖因子スーパーファミリーのいずれか 1 種、若しくは骨形成タンパク質 (BMP) BMP 1 ~ 15 のいずれか、増殖因子のヘレグリン (heregulin) / ニューレグリン / ARIA / neuregulin 分化因子 (NDF) ファミリーのいずれか 1 種、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン NT-3 および NT-4 / 5、毛様体神経栄養

因子 (CNTF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、ニューツリン、アグリ
ン、セマフォリン/コラプシンのファミリーのいずれか1種、ネトリン-1およびネトリン
-2、肝細胞増殖因子 (HGF)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグならびに
チロシン水酸化酵素を制限なしに包含するホルモンならびに増殖および分化因子を包含す
る。

【0107】

他の有用な導入遺伝子産物は、トロンボポエチン (TPO)、インターロイキン (IL
) IL-1からIL-25 (例えばIL-2、IL-4、IL-12およびIL-18を
包含する)、単球化学誘引物質タンパク質、白血病阻害因子、顆粒球マクロファージコロ
ニー刺激因子、 Fas リガンド、腫瘍壊死因子、ならびにインターフェロン、および幹細胞
因子、 flk-2 / flt3 リガンドのようなサイトカインおよびリンホカインを制限
なしに包含する免疫系を調節するタンパク質を包含する。免疫系により産生される遺伝子
産物もまた有用である。これらは、免疫グロブリン IgG、IgM、IgA、IgDおよ
びIgE、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、一本鎖抗体、T細胞受容体、キメラT細胞
受容体、一本鎖T細胞受容体、クラスIおよびクラスII MHC分子、ならびに工作
された免疫グロブリンおよびMHC分子を制限なしに包含する。有用な遺伝子産物は、補
体調節タンパク質、メンブレンコファクタープロテイン (MCP)、崩壊促進因子 (DAF)、
CR1、CF2およびCD59のような補体調節タンパク質もまた包含する。

10

【0108】

なお他の有用な遺伝子産物は、ホルモン、増殖因子、サイトカイン、リンホカイン、調
節タンパク質および免疫系タンパク質の受容体のいずれか1種を包含する。低密度リポタン
パク質 (LDL) 受容体、高密度リポタンパク質 (HDL) 受容体、超低密度リポタン
パク質 (VLDL) 受容体およびスカベンジャー受容体を包含するコレステロール調節の
ための受容体もまた本明細書に包含される。グルココルチコイド受容体およびエストロゲ
ン受容体を包含するステロイドホルモン受容体スーパーファミリーのメンバー、ビタミン
D受容体ならびに他の核受容体のような遺伝子産物もまた企図している。加えて、有用な
遺伝子産物は、 jun、 fos、 max、 mad、血清応答因子 (SRF)、AP-1、
AP2、myb、MyoDおよびミオゲニン、ETSボックス含有タンパク質、TFE3
、E2F、ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ZF5、NFAT、CREB、H
NF-4、C/EBP、SP1、CCAATボックス結合タンパク質、インターフェロン
調節因子 (IRF-1)、ウィルムス腫瘍タンパク質、ETS結合タンパク質、STAT
、GATAボックス結合タンパク質例えばGATA-3、およびウイングドヘリックスタ
ンパク質のフォークヘッドファミリーのような転写因子を包含する。

20

30

【0109】

他の有用な遺伝子産物は、カルバモイル合成酵素I、オルニチントランスカルバミラー
ゼ、アルギノコハク酸合成酵素、アルギノコハク酸脱離酵素、アルギナーゼ、フマリルア
セト酢酸加水分解酵素、フェニルアラニン水酸化酵素、 -1アンチトリプシン、グルコ
ース-6-ホスファターゼ、ボルフォビリノーゲン脱アミノ酵素、第VIIII因子、第IX
因子、シスタチオン 合成酵素、分枝鎖ケト酸脱炭酸酵素、アルブミン、イソバレリ
ルCoA脱水素酵素、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ、メチルマロニルCoAムター
ーゼ、グルタリルCoA脱水素酵素、インスリン、 -グルコシダーゼ、ピルビン酸カル
ボキシラーゼ、肝ホスホリラーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシン脱炭酸酵素、H-
プロテイン、T-プロテイン、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) 配列
およびジストロフィンのcDNA配列を包含する。

40

【0110】

他の有用な遺伝子産物は、挿入、欠失若しくはアミノ酸置換を含有する天然に存在しな
いアミノ酸配列を有するキメラ若しくはハイブリッドポリペプチドのような天然に存在し
ないポリペプチドを包含する。例えば、一本鎖の工作された免疫グロブリンはある種の免
疫無防備状態の患者で有用であり得る。他の型の天然に存在しない遺伝子配列は、標的の
過剰発現を低下させるのに使用し得るアンチセンス分子およびリボザイムのような触媒的

50

核酸を包含する。

【0111】

遺伝子の発現の低下および/若しくは調節は、癌および乾癬がそうであるような過剰増殖細胞を特徴とする過剰増殖状態の処置にとりわけ望ましい。標的ポリペプチドは、過剰増殖細胞中で独占的に若しくは正常細胞と比較してより高レベルで産生されるポリペプチドを包含する。標的抗原は、myb、myc、fynのような癌遺伝子ならびに転位遺伝子bcr/abl、ras、src、P53、neu、trkおよびEGFRによりコードされるポリペプチドを包含する。標的抗原としての癌遺伝子産物に加え、抗癌処置および保護療法の標的ポリペプチドは、いくつかの態様において自己免疫疾患の標的抗原としてもまた使用される、B細胞リンパ腫により作成される抗体の可変領域およびT細胞リンパ腫のT細胞受容体の可変領域を包含する。モノクローナル抗体17-1Aおよび葉酸結合ポリペプチドにより認識されるポリペプチドを包含する、腫瘍細胞中でより高レベルで見出されるポリペプチドのような他の腫瘍関連ポリペプチドを、標的ポリペプチドとして使用し得る。

10

【0112】

他の適する治療的ポリペプチドおよびタンパク質は、細胞受容体を包含する自己免疫と関連する標的および自己に向けられた抗体を産生する細胞に対する広範な保護免疫応答を賦与することにより、自己免疫疾患および障害に苦しめられている個体を処置するのに有用でありうるものを包含する。T細胞媒介性自己免疫疾患は、関節リウマチ(RA)、多発性硬化症(MS)、シェーグレン症候群、サルコイドーシス、インスリン依存性糖尿病(IDDM)、自己免疫性甲状腺炎、反応性関節炎、強直性脊椎炎、強皮病、多発性筋炎、皮膚筋炎、乾癬、血管炎、ヴェゲナー肉芽腫症、クローン病および潰瘍性大腸炎を包含する。これらの疾患のそれぞれは、内在性抗原に結合しかつ自己免疫疾患と関連する炎症カスケードを開始するT細胞受容体(TCR)を特徴とする。

20

【0113】

本明細書のSA d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50配列に基づくサルアデノウイルスベクターは、導入遺伝子の複数のアデノウイルス媒介性送達望ましい治療計画に、例えば同一導入遺伝子の再送達を必要とする療法、若しくは他の導入遺伝子の送達を必要とする併用療法でとりわけ良好に適する。こうした療法は、SA d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50サルアデノウイルスベクターの投与、次いで同一血清型アデノウイルスからのベクターを用いる再投与を必要としうる。とりわけ望ましい療法は、第一の投与で送達されるベクターのアデノウイルスキャプシド配列の供給源がその後の投与の1回若しくはそれ以上で利用されるウイルスベクターのアデノウイルスキャプシド配列の供給源と異なるSA d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50サルアデノウイルスベクターの投与を必要とする。例えば、ある治療計画は、SA d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50ベクターの投与、ならびに同一若しくは異なる血清型の1種若しくはそれ以上のアデノウイルスベクターを用いる反復投与を必要とする。別の例において、治療計画は、アデノウイルスベクターの投与、次いで第一の送達されるアデノウイルスベクター中のキャプシドの供給源と異なるキャプシドを有するSA d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50ベクターを用いる反復投与、ならびに、場合によっては前の投与段階のベクターのアデノウイルスキャプシドの供給源と同一であるか若しくは好ましくは異なる別のベクターを用いるさらなる投与を必要とする。これらの療法は、SA d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50配列を使用して構築されるアデノウイルスベクターの送達に制限されない。むしろ、これらの療法は、SA d V - 43、- 45、- 46、- 47、- 48、- 49若しくは- 50ベクターの1種若しくはそれ以上と組合せの、他のサルアデノウイルス配列(例えばPan9若しくはC68、C1など)、他のヒト以外の霊長類アデノウイルス配列またはヒトアデノウイルス配列を制限なしに包含するベクター他のアデノウイルス配列を容易に利用し得る。こうしたサル、他のヒト以外の霊長類およびヒトのアデノウイルス血清型の例は

30

40

50

本文書の別の場所で論考する。さらに、これらの治療計画は、アデノウイルス以外のベクター、ウイルス以外のベクター、および/または多様な他の治療上有用な化合物若しくは分子と組合せの S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 若しくは - 5 0 アデノウイルスベクターの同時若しくは連続いずれかの送達を必要としうる。S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および - 5 0 ベクターの使用はこれらの治療計画に制限されず、多様なそれらが当業者に容易に明らかであろう。

【 0 1 1 4 】

B . 免疫原性導入遺伝子の A d 媒介性送達

該組換え S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および - 5 0 ベクターは免疫原性組成物としてもまた使用しうる。本明細書で使用されるところの免疫原性組成物は、それに対する体液性（例えば抗体）若しくは細胞性（例えば細胞傷害性 T 細胞）応答が、哺乳動物、および好ましくは霊長類への送達後に該免疫原性組成物により送達される導入遺伝子産物に対し開始される組成物である。組換えサル A d は所望の免疫原をコードする遺伝子をそのアデノウイルス配列欠失のいずれかに含有し得る。該サルアデノウイルスは、ヒト起源のアデノウイルスに比較して多様な動物種で生組換えウイルスワクチンとしての使用により良好に適することがありそうであるが、しかしこうした使用に制限されない。該組換えアデノウイルスは、免疫応答の誘導にきわめて重要でかつ病原体の拡散を制限することが可能な抗原（1種若しくは複数）が同定されておりかつ c D N A が利用可能であるいかなる病原体に対する予防的若しくは治療的ワクチンとしても使用し得る。こうしたワクチン（若しくは他の免疫原性）組成物は上述されたとおり適する送達ベヒクル中で処方する。一般に免疫原性組成物の用量は治療的組成物について上で定義された範囲にある。選択された遺伝子の免疫のレベルをモニターしてブースターの必要性（あれば）を決定し得る。血清中の抗体力価の評価後に、任意のブースター免疫化が望ましいかもしれない。

【 0 1 1 5 】

場合によっては、S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 若しくは - 5 0 ベクターのワクチン組成物は例えばアジュバント、安定剤、pH調節剤、保存剤などを包含する他の成分を含有するように処方しうる。こうした成分はワクチンの技術分野の当業者に公知である。適するアジュバントの例は、リポソーム、アルム、モノホスホリルリピド A、およびサイトカイン、インターロイキン、ケモカイン、リガンドのようないずれかの生物学的に活性の因子、ならびに最適にはそれらの組合せを制限なしに包含する。これらの生物学的に活性の因子のあるものは例えばプラスミド若しくはウイルスベクターを介して *i n v i v o* で発現させ得る。例えば、こうしたアジュバントは、抗原のみをコードする D N A ワクチンでのプライミングに際して生成される免疫応答と比較して抗原特異的免疫応答を高めるように、抗原をコードするプライミング D N A ワクチンとともに投与し得る。

【 0 1 1 6 】

該組換えアデノウイルスは「免疫原性量」、すなわち所望の細胞をトランスフェクトしかつ免疫応答を誘導するために選択された遺伝子の十分なレベルの発現を提供するのにある投与経路で効果的である組換えアデノウイルスの量で投与する。保護免疫が提供される場合、該組換えアデノウイルスは、感染および/若しくは再発性疾患の予防において有用なワクチン組成物であると考えられる。

【 0 1 1 7 】

あるいは、若しくは加えて、該ベクターは、選択された免疫原に対する免疫応答を誘導するペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質をコードする導入遺伝子を含有しうる。該組換え S A d V - 4 3、 - 4 5、 - 4 6、 - 4 7、 - 4 8、 - 4 9 および - 5 0 ベクターは、該ベクターにより発現される挿入された異種抗原タンパク質に対する細胞溶解性 T 細胞および抗体の誘導で高度に有効であると期待される。

【 0 1 1 8 】

例えば、免疫原は多様なウイルス科から選択しうる。それに対する免疫応答が望ましい

10

20

30

40

50

とみられるウイルス科の例は、感冒の症例の約50%の原因であるライノウイルス属を包含するピコルナウイルス科；ポリオウイルス、コックスッキーウイルス、エコーウイルスおよびA型肝炎ウイルスのようなヒトエンテロウイルスを包含するエンテロウイルス属；ならびに主にヒト以外の動物における口蹄疫の原因であるアプトウイルス属を包含する。ウイルスのピコルナウイルス科内の標的抗原はVP1、VP2、VP3、VP4およびVP6を包含する。別のウイルス科は、流行性胃腸炎の重要な原因病原体であるノーウォーク群のウイルスを包含するカルシウイルス(*calcivirus*)科を包含する。ヒトおよびヒト以外の動物で免疫応答を誘導するための抗原の標的指向化における使用に望ましいお別のウイルス科は、シンドビスウイルス、ロスリバーウイルス、ならびにベネズエラ、東部および西部ウマ脳炎を包含するアルファウイルス属、ならびに風疹ウイルスを包含するルビウイルスを包含するトガウイルス科である。フラビウイルス科は、デング熱、黄熱病、日本脳炎、セントルイス脳炎およびダニ媒介性脳炎ウイルスを包含する。他の標的抗原は、C型肝炎、あるいは伝染性気管支炎ウイルス(家禽)、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス(ブタ)、ブタ血球凝集性脳脊髄炎ウイルス(ブタ)、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(ネコ)、ネコ腸内コロナウイルス(ネコ)、イヌコロナウイルス(イヌ)のような多数のヒト以外のウイルスおよび感冒を引き起こしうるヒト呼吸器コロナウイルスを包含するコロナウイルス科ならびに/または非A、非B若しくは非C型肝炎から生成しうる。コロナウイルス科内の標的抗原は、E1(M若しくはマトリックスタンパク質ともまた呼ばれる)、E2(S若しくはスパイクタンパク質ともまた呼ばれる)、E3(HE若しくはヘマグルチン-エルテロース(*hemagglutinin-elterose*)ともまた呼ばれる)糖タンパク質(全コロナウイルスに存在するわけではない)またはN(ヌクレオキャプシド)を包含する。なお他の抗原が、ベシクロウイルス属(例えば水疱性口内炎ウイルス)および一般的リッサウイルス(例えば狂犬病)を包含するラブドウイルス科に対し標的指向化されうる。

【0119】

ラブドウイルス科内の適する抗原はGタンパク質若しくはNタンパク質に由来しうる。マールブルグおよびエボラウイルスのような出血熱ウイルスを包含するフィロウイルス科は抗原の適する供給源となりうる。パラミクソウイルス科は、パラインフルエンザウイルス1型、パラインフルエンザウイルス3型、ウシパラインフルエンザウイルス3型、ルブラウイルス(流行性耳下腺炎ウイルス)、パラインフルエンザウイルス2型、パラインフルエンザウイルス4型、ニューカッスル病ウイルス(ニワトリ)、牛疫、麻疹およびイヌジステンパーを包含するモルビリウイルス、ならびにRSウイルスを包含するニューモウイルスを包含する。インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科内に分類され、そして抗原(例えばHAタンパク質、N1タンパク質)の適する供給源である。ブニヤウイルス科は、ブニヤウイルス属(カリフォルニア脳炎、ラクロス)、フレボウイルス(リフトバレー熱)、ハンタウイルス(プレマラ(*puremala*)はヘマハギン(*hemahagin*)熱ウイルスである)、ナイロウイルス(ナイロビ羊病)および多様な割り当てられていないブンガウイルス(*bungavirus*)を包含する。アレナウイルス科はLCMおよびラッサ熱ウイルスに対する抗原の供給源を提供する。レオウイルス科は、レオウイルス、ロタウイルス(小児で急性胃腸炎を引き起こす)、オルビウイルスおよびクルチウイルス(*cultivirus*)(コロラドダニ熱、レボンボ(ヒト)、ウマ脳症、ブルータング)属を包含する。

【0120】

レトロウイルス科は、ネコ白血病ウイルス、HTLV IおよびHTLV II、レンチウイルス(*lentivirinal*)(ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ウマ伝染性貧血ウイルスおよびスプマビリナル(*spumavirinal*)を包含する)のようなヒトおよび家畜の疾患を包含するオンコビリナル(*oncovirinal*)亜科を包含する。レンチウイルスのなかで多くの適する抗原が記述され、そして容易に選択し得る。適するHIVおよびSIV抗原の例は、gag、pol、Vif、Vpx、VPR、Env、Tat、Nef

10

20

30

40

50

および Rev タンパク質、ならびにそれらの多様なフラグメントを制限なしに包含する。例えば、Env タンパク質の適するフラグメントは、gp120、gp160、gp41 のようなそのサブユニット、若しくは例えば長さ最低約 8 アミノ酸のそれらのより小さいフラグメントのいずれも包含しうる。同様に tat タンパク質のフラグメントも選択しうる。(米国特許第 5,891,994 号明細書および米国特許第 6,193,981 号明細書を参照されたい。) D. H. Barouchら、*J. Virol.*、75(5):2462-2467 (March 2001) および R. R. Amaraら、*Science*、292:69-74 (6 April 2001) に記述される HIV および SIV タンパク質もまた参照されたい。別の例において、HIV および/若しくは SIV の免疫原性タンパク質若しくはペプチドを使用して、融合タンパク質若しくは他の免疫原性分子を形成しうる。例えば、2001 年 8 月 2 日に公開された第 WO 01/54719 号明細書および 1999 年 4 月 8 日に公開された第 WO 99/16884 号明細書に記述される HIV-1 Tat および/若しくは Nef 融合タンパク質ならびに免疫化療法を参照されたい。本明細書に記述される HIV および/若しくは SIV 免疫原性タンパク質若しくはペプチドは単に例示的である。加えて、これらのタンパク質に対する多様な改変が記述されているか、若しくは当業者により容易に作成され得る。例えば米国特許第 5,972,596 号明細書に記述される改変 gag タンパク質を参照されたい。さらに、いかなる所望の HIV および/若しくは SIV 免疫原も単独若しくは組合せで送達しうる。こうした組合せは単一ベクター若しくは複数のベクターからの発現を包含しうる。場合によっては、別の組合せは、タンパク質の形態の免疫原の 1 種若しくはそれ以上の送達を伴う 1 種若しくはそれ以上の発現された免疫原の送達を必要としうる。こうした組合せを下により詳細に論考する。

【0121】

パポーマウイルス科は、ポリオーマウイルス亜科 (BKU および JCU ウイルス) ならびにパピローマウイルス亜科 (癌若しくは乳頭腫の悪性の進行と関連する) を包含する。アデノウイルス科は呼吸器疾患および/若しくは腸炎を引き起こすウイルス (EX、AD7、ARD、O.B.) を包含する。パルボウイルス科はネコパルボウイルス (ネコ腸炎)、ネコ汎白血球減少症ウイルス、イヌパルボウイルスおよびブタパルボウイルスを包含する。ヘルペスウイルス科は、シンプレックスウイルス (HSV I、HSV II)、パルセロウイルス (偽性狂犬病、帯状疱疹) 属を包含するアルファヘルペスウイルス亜科、およびサイトメガロウイルス属 (HCMV、ムロメガロウイルス) を包含するベータヘルペスウイルス亜科、ならびに、リンホクリプトウイルス属、EBV (バーキットリンパ腫)、伝染性鼻気管炎、マレック病ウイルスおよびラジノウイルス属を包含するガンマヘルペスウイルス亜科を包含する。ポックスウイルス科は、オルトポックスウイルス (大疱瘡 (天然痘) およびワクシニア (牛痘))、パラポックスウイルス、アビポックスウイルス、カプリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、スイポックスウイルス属を包含するチョルドポックスウイルス亜科、ならびにエントモポックスウイルス亜科を包含する。ヘパドナウイルス科は B 型肝炎ウイルスを包含する。抗原の適する供給源となりうる 1 種の分類されないウイルスは D 型肝炎ウイルスである。なお他のウイルス供給源は、トリ伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスおよびブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスを包含しうる。アルファウイルス科はウマ動脈炎ウイルスおよび多様な脳炎ウイルスを包含する。

【0122】

他の病原体に対しヒト若しくはヒト以外の動物を免疫するのに有用である免疫原は、例えば、ヒトおよびヒト以外の脊椎動物を感染させる細菌、真菌、寄生性微生物若しくは多細胞寄生動物、または癌細胞若しくは腫瘍細胞からを包含する。細菌性病原体の例は、肺炎球菌; ブドウ球菌; および連鎖球菌をはじめとする病原性グラム陽性球菌を包含する。病原性グラム陰性球菌は髄膜炎菌; 淋菌を包含する。病原性腸グラム陰性桿菌は、腸内細菌科 (enterobacteriaceae); シュードモナス、アシネトバクテリア (acinetobacteria) およびエイケネラ (eikenella); 類鼻疽; サルモネラ (salmonella); シゲラ (shigella); ヘモフィルス (

10

20

30

40

50

haemophilus);モラクセラ(moraxella);軟性下疳菌(H. ducreyi)(軟性下疳を引き起こす);ブルセラ(brucella);フラニセラツラレンシス(Francisella tularensis)(野兎病を引き起こす);エルジニア(yersinia)(パスツレラ);ストレプトバシラス モニリフォルミス(streptobacillus moniliformis)およびスピリルムを包含し;グラム陽性桿菌は、リステリア モノシトゲネス(listeria monocytogenes);エリジペロスリックス ルシオパチエ(erysipelothrix rhusiopathiae);ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheria)(ジフテリア);コレラ;炭疽菌(B. anthracis)(炭疽);ドノヴァン症(鼠径部肉芽腫);およびバルトネラ症を包含する。病原性嫌気性細菌により引き起こされる疾患は破傷風;ボツリヌス中毒;他のクロストリジウム;結核;らい;および他のミコバクテリア感染症を包含する。病原性スピロヘータ疾患は梅毒;トレポネーマ症;イチゴ腫、ピンタおよび風土病性梅毒;ならびにレプトスピラ症を包含する。より高病原性の細菌および病原性真菌により引き起こされる他の感染症は、放線菌症;ノカルジア症;クリプトコックス症、ブラストミセス症、ヒストプラズマ症およびコクシジオイデス真菌症;カンジダ症、アスペルギルス症およびムコール症;スポロトリクス症;パラコクシジオイデス真菌症、ペトリエリジオーシス(petriellidiosis)、トルロプシス症、菌腫およびクロモミコース;ならびに皮膚糸状菌症を包含する。リケッチア感染症は、発疹チフス、ロッキー山熱、Q熱およびリケッチア痘を包含する。マイコプラズマおよびクラミジア感染症の例は:マイコプラズマ肺炎;性病性リンパ肉芽腫;オウム病;および周産期クラミジア感染症を包含する。病原性真核生物は病原性原生動物および蠕虫を包含し、また、それらにより生じられる感染症は:アメーバ症;マラリア;リーシュマニア;トリパノソーマ症;トキソプラズマ症;ニューモシスチス カリニ(Pneumocystis carinii);トリカンス(Trichans);トキソプラズマ(Toxoplasma gondii);バベシア症;ジアルジア症;旋毛虫症;フィラリア症;住血吸虫症;線虫;吸虫(trematodes)すなわち吸虫(flukes);および条虫(cestode)(条虫(tapeworm))感染症を包含する。

10

20

【0123】

これらの生物体および/若しくはそれらにより産生される毒素の多くは、生物学的攻撃での使用の可能性を有する剤として疾病対策センター(Centers for Disease Control)(CDC)、米国保健省の部門)により特定されている。例えば、これらの生物学的剤のいくつかは、炭疽菌(Bacillus anthracis)(炭疽)、ボツリヌス菌(Clostridium botulinum)およびその毒素(ボツリヌス中毒)、ペスト菌(Yersinia pestis)(ペスト)、大疱瘡(天然痘)、野兎病菌(Francisella tularensis)(野兎病)、ならびにウイルス性出血熱(フィロウイルス(例えばエボラ、マールブルグ)ならびにアレナウイルス(例えばラッサ、マチュボ))(それらの全部は現在カテゴリーAの剤に分類されている);コクシエラ ブルネティ(Coxiella burnettii)(Q熱);ブルセラ属(Brucella)スピーシーズ(ブルセラ症)、パークホルデルリア マレイ(Burkholderia mallei)(鼻疽)、類鼻疽菌(Burkholderia pseudomallei)(メロイドーシス(meloidosis))、トウゴマ(Ricinus communis)およびその毒素(リシントキシン)、ウェルシュ菌(Clostridium perfringens)およびその毒素(毒素)、ブドウ球菌属(Staphylococcus)スピーシーズおよびそれらの毒素(エンテロトキシンB)、オウム病クラミジア(Chlamydia psittaci)(オウム病)、水の安全性に対する脅威(例えばコレラ菌(Vibrio cholerae))、クリトスポリジウム パルブム(Cryptosporidium parvum)、発疹チフス(発疹チフスリケッチア(Rickettsia prowazekii))、ならびにウイルス性脳炎(アルファウイルス、例えばベネズエラウ

30

40

50

マ脳炎；東部ウマ脳炎；西部ウマ脳炎）；（それらの全部は現在カテゴリーBの剤として分類されている）；ならびにニパンウイルスおよびハンタウイルス（現在カテゴリーCの剤として分類されている）を包含する。加えて、そのように分類されるか若しくは異なって分類される他の生物体が将来同定かつ／若しくはこうした目的上使用されうる。本明細書に記述されるウイルスベクターおよび他の構築物が、これらの生物学的剤への感染症若しくはそれらとの他の有害反応を予防かつ／若しくは処置することができる、これらの生物体、ウイルス、それらの毒素若しくは他の副生成物からの抗原を送達するのに有用であることが容易に理解されるであろう。

【0124】

T細胞の可変領域に対する免疫原を送達するためのSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50ベクターの投与は、それらのT細胞を排除するためのCTLを包含する免疫応答を導き出すことが予期される。RAにおいて、該疾患に關与するTCRの数個の特定の可変領域が特徴づけられている。これらのTCRはV-3、V-14、V-17およびV-17を包含する。従って、これらのポリペプチドの最低1種をコードする核酸配列の送達はRAに關与するT細胞を標的指向化することができる免疫応答を導き出すことができる。MSにおいて、該疾患に關与するTCRの数個の特定の可変領域が特徴づけられている。これらのTCRはV-7およびV-10を包含する。従って、これらのポリペプチドの最低1種をコードする核酸配列の送達はMSに關与するT細胞を標的指向化することができる免疫応答を導き出すことができる。強皮症において、該疾患に關与するTCRの数個の特定の可変領域が特徴づけられている。これらのTCRはV-6、V-8、V-14およびV-16、V-3C、V-7、V-14、V-15、V-16、V-28ならびにV-12を包含する。従って、これらのポリペプチドの最低1種をコードする組換えサルアデノウイルスの送達は強皮症に關与するT細胞を標的指向化することができる免疫応答を導き出すことができる。

【0125】

C. Ad媒介性送達方法

選択された遺伝子の治療レベル若しくは免疫のレベルをモニターしてブースターの必要性（あれば）を決定し得る。血清中のCD8+ T細胞応答若しくは場合によっては抗体力価の評価後に任意のブースター免疫化が望ましいかもしれない。場合によっては、組換えSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50ベクターを、単回投与で、あるいは多様な組合せ療法で、例えば他の有効成分を必要とする処置の療法若しくはクールと組合せで、またはプライム-ブースト（prime-boost）療法で送達しうる。多様なこうした療法が当該技術分野で記述されており、そして容易に選択されうる。

【0126】

例えば、プライム-ブースト療法は、タンパク質のような伝統的な抗原若しくはこうした抗原をコードする配列を保有する組換えウイルスを用いる第二のブースター投与に対し免疫系をプライミングするためのDNA（例えばプラスミド）に基づくベクターの投与を必要としうる。例えば2000年3月2日に公開された第WO 00/11140号明細書（引用することにより組み込まれる）を参照されたい。あるいは、免疫化レジメンは、抗原を保有するベクター（ウイルス若しくはDNAに基づくのいずれか）またはタンパク質に対する免疫応答を増強するための組換えSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ベクターの投与を必要としうる。なお別の代替において、免疫化レジメンは、タンパク質、次いで抗原をコードするベクターを含むブースターの投与を必要とする。

【0127】

一態様において、選択された抗原を保有するプラスミドDNAベクターを送達すること、次いで組換えSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ベクターを用いて増強することによる、前記抗原に対する免疫応答のプライミングおよび増強方法が記述される。一態様において、該プライム-ブースト療法はプライムおよび

10

20

30

40

50

ノ若しくはブースト媒体からの多タンパク質の発現を必要とする。例えば、HIVおよびSIVに対する免疫応答を生成させるのに有用なタンパク質サブユニットの発現のための多タンパク質療法を記述するR. R. Amara、Science、292:69-74 (6 April 2001)を参照されたい。例えば、DNAプライムは、単一転写物からのGag、Pol、Vif、VPXおよびVprならびにEnv、TatおよびRevを送達しうる。あるいは、SIV Gag、PolおよびHIV-1 Envを組換えSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50アデノウイルス構築物中で送達する。なお他のレジメンは第WO 99/16884号明細書および第WO 01/54719号明細書に記述されている。

【0128】

しかしながら、該プライム-ブースト療法はHIVについての免疫化若しくはこれらの抗原の送達に制限されない。例えば、プライミングは、第一のSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ベクターを用いて送達すること、次いで第二のAdベクター、若しくはタンパク質の形態の抗原それ自体を含有する組成物を用いて増強することを必要としうる。一例において、該プライム-ブースト療法は、抗原が由来するウイルス、細菌若しくは他の生物体に対する保護免疫応答を提供し得る。別の態様において、該プライム-ブースト療法は、治療が投与されている状態の存在の検出のための慣例アッセイを使用して測定し得る治療効果を提供する。

【0129】

プライミング組成物は、所望の免疫応答が標的指向化されている抗原に依存する用量依存性の様式で体内の多様な部位に投与しうる。注入(1回若しくは複数)の量若しくは場所または製薬学的担体は制限でない。むしろ、該療法は、毎時、毎日、毎週若しくは毎月または毎年投与される単一用量若しくは投与量をそれぞれが包含しうるプライミングおよび/若しくは増強段階を必要としうる。一例として、哺乳動物は、約10 μ gないし約50 μ gの間のプラスミドを担体中に含有する1若しくは2用量を受領しうる。DNA組成物の所望の量は約1 μ gないし約10,000 μ gの間のDNAベクターの範囲にわたる。投与量は被験体体重約1kgあたり約1 μ gから1000 μ gのDNAまで変動しうる。送達の量若しくは部位は、望ましくは哺乳動物の正体および状態に基づいて選択する。

【0130】

哺乳動物への抗原の送達に適するベクターの投与量単位を本明細書に記述する。該ベクターは、等張の塩水；こうした投与の当業者に明らかであろう等張塩溶液若しくは他の製剤のような製薬学的若しくは生理学的に許容できる担体中に懸濁若しくは溶解されることにより投与のために調製される。適切な担体は当業者に明らかであることができ、そして投与経路に大きな部分依存することができる。本明細書に記述される組成物は、生物分解性の生物適合性ポリマーを使用する徐放製剤で、若しくはミセル、ゲルおよびリポソームを使用するその場の(on-site)送達により、上述された経路に従って哺乳動物に投与しうる。場合によっては、プライミング段階は、本明細書に定義されるような適する量のアジュバントをプライミング組成物とともに投与することもまた包含する。

【0131】

好ましくは、増強組成物は、哺乳動物被験体にプライミング組成物を投与した約2ないし約27週後に投与する。増強組成物の該投与は、プライミングDNAワクチンにより投与されると同一の抗原を含有する若しくは送達することが可能な有効量の増強組成物を使用して成し遂げる。該増強組成物は、同一ウイルス供給源(例えばそれぞれSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50アデノウイルス配列)または別の供給源由来の組換えウイルスベクターから構成しうる。あるいは、「増強組成物」は、プライミングDNAワクチンにコードされると同一の抗原をしかしタンパク質若しくはペプチドの形態で含有する組成物であり得、この組成物が宿主中で免疫応答を誘導する。別の態様において、増強組成物は、哺乳動物細胞中でのその発現を指図する制御配列の制御下に抗原をコードするDNA配列、例えば公知の細菌若しくはウイルスベクターのようなベクターを含有する。増強組成物の主要件は、該組成物の抗原がプライミング組成物

10

20

30

40

50

によりコードされるものと同じの抗原若しくは交差反応性抗原であることである。

【0132】

別の態様において、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50ベクターは多様な他の免疫化および治療計画での使用にもまた良好に適する。こうした療方は、異なる血清型キャプシドのAdベクターと同時に若しくは連続してのSAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ベクターの送達、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ベクターをAd以外のベクターと同時に若しくは連続送達する療方、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49若しくは-50ベクターをタンパク質、ペプチドおよび/または他の生物学的に有用な治療若しくは免疫原性化合物と同時に若しくは連続送達する療方を必要としうる。こうした用途は当業者に容易に明らかであろう。

10

【0133】

以下の実施例は、SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50のクローニングならびに例示的組換えベクターの構築を具体的に説明する。これらの実施例は具体的説明のみであり、そして本発明の範囲を制限しない。

【実施例1】

【0134】

サルアデノウイルス(SAdV-43、-45、-46、-47、-48、-49および-50)の単離ならびにPCR分析

糞便サンプルは動物を収容している施設で収集しかつハンクス平衡塩類溶液に懸濁し、そして氷上でペンシルバニア大学に送付した。微粒子を遠心分離により除去し、そして0.2µmシリンジフィルターを通して無菌濾過した。各濾過したサンプル100µlを、10%FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシンおよび50µg/mlゲンタマイシンを含むハムF12中で増殖させたA549細胞に接種した。培養約1ないし2週後に、接種菌液のいくつかを含む細胞培養物で視覚的CPEが明らかであった。培養物中のアデノウイルスの存在を、ヘキソンの内的1.9kb(超可変領域を包含しかつ血清型特異性を賦与する主な原因である領域)のPCR増幅により確認した。

20

【0135】

PCRに利用したプライマー対は、配列番号32:CAGGATGCTTTCGGAGTACCTGAGおよび配列番号33:TTGGCNGGDA TDGGGTAVAGCATGTTであった。この領域から得た配列を使用して、アデノウイルス種および血清型の新規性の初期決定を行った。アデノウイルス単離物は、標準的手順を使用して、A549細胞でブランク精製し、高力価まで増殖させ、そして塩化セシウム勾配で精製した。

30

【0136】

精製したウイルス調製物から得たウイルスDNAを完全に配列決定した(Qiagen Genomics Services、独国ヒルデン)。加えて、アウタープライマー、配列番号34:TGATGCGYTTCTTACCTYTGGTYTCCATGAGおよび配列番号35:AGTTYTACATGCTGGGCTCTTACCG、ならびにインナープライマー、配列番号36:GTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCGTAおよび配列番号37:TCACGTGGCCTACACTTACAAGCCAATCACを用いるDNAポリメラーゼに特異的な感受性ネステッドPCRを、アデノウイルス排出の特異的診断として使用した。

40

【実施例2】

【0137】

系統発生分析

その後の系統発生分析に使用するための8種の遺伝子:ファイバー、ヘキソン、ペントン、プロテアーゼ、E1A、DNA結合タンパク質(DBP)、ポリメラーゼ、末端タンパク質前駆体(pTP)。注釈付けられたサルアデノウイルスゲノムSAdV-25.2を、注釈付けられない(標的)ゲノム中のこれらの遺伝子のコーディング配列を見出すための参照として使用した。標的ゲノム中のある遺伝子を検出するため、以下の手順を実施

50

した。すなわち、1) 焦点の遺伝子 (focal gene) を参照ゲノムから抽出し、そしてそれを標的ゲノムと整列した。これは標的ゲノム中の焦点の遺伝子のおおまかな場所を提供した。2) 整列された領域と重なる標的ゲノム中の全ORFを同定した。3) 該遺伝子がイントロン (E1A、ポリメラーゼおよびpTP遺伝子) を有することが既知であった場合は、参照遺伝子に関して30%までの第一エキソンの長さおよび60%までの該イントロンの長さを保存した全部のGT-AGのイントロンの開始-終止シグナル対を同定し; 全部のこうした潜在的イントロンを切り出し、潜在的コーディング配列のプールを生成した。4) このプールからの各コーディング配列について、対応するアミノ酸配列を参照アミノ酸配列と整列した。5) コーディング配列をそれらのアライメントスコアに従って並べ替えた。最高のスコアをもつコーディング配列を標的ゲノム中の焦点の遺伝子のコーディング配列とみなした。全部のアライメントはClustalW v. 2.0.9ソフトウェア (Thompsonら、Nucleic Acids Res, 22: 4673-4680 (1994)) を用いて実施した。

10

【0138】

各遺伝子について生じるヌクレオチド配列アライメントから、トランジション/トランスバージョン比、不変部位の割合、および部位を横断する速度の離散化分布 (Yang, J Mol Evol, 39: 306-314 (1994)) を用いるHKY85モデル (Hasegawaら、J Mol Evol, 22: 160-174 (1985)) でPhyMLソフトウェア (GuindonとGascuel, Syst Biol, 52: 696-704 (2003)) を使用して、系統発生樹を再構築した。再構築した系統樹の信頼性を評価するため、100回のブートストラップ再構築を各遺伝子について実施した。

20

【0139】

B、C、EおよびDクレイド内の進化速度を正確に推定するため、旧世界ザルから単離された全アデノウイルスならびにHADV-40およびHADV-12単離物を除去した。残存するタンパク質配列を整列し、そしてPAL2NALソフトウェア (Suyamaら、Nucleic Acids Res, 34: W609-612 (2006)) を使用してDNAに逆翻訳した。このための系統樹は前と同一のモデルでこのデータサブセットを用いて生成した。最後に、枝特異的モデルでPAMLソフトウェア (Yang, Mol Biol Evol, 24: 1586-1591 (2007)) を使用して、枝の長さを固定して保つ多様な枝でのdn/ds比を推定した。相同性の内的分析はSIMPLOTSライディングウィンドウ解析 (ウィンドウ: 1000bp、ステップ: 20bp) (Loleら、J Virol, 73: 152-160 (1999)) により行った。

30

【0140】

この分析の終わりに、今やサルアデノウイルス43および45と呼称されかつ本明細書に開示される配列がサブファミリーCにあることが決定された。今やサルアデノウイルス46および47と呼称されかつ本明細書に開示される配列はサブファミリーBにあることが決定された。

【0141】

今やサルアデノウイルス48、49および50と呼称されかつ本明細書に開示される配列は、サブファミリーA、B、C、DおよびEのそれぞれに入らないことが決定された。SAdV-48、-49および-50は従って以前に特徴付けられていないクレイドに位置する。SAdV-48はおそらくSAdV-3およびSAdV-6 (双方とも以前にアカゲザル (Rhesus macaque) から単離されかつまた双方ともサブファミリーA、B、C、DおよびEの外側) に関係づけられる。SAdV-49およびSAdV-50のある種の遺伝子は種AおよびFアデノウイルスとの相同性を示した。

40

【実施例3】

【0142】

形質細胞様樹状細胞サイトカイン放出アッセイによるサイトカイン放出の分析

PBMCを、1000gで25分間のFicoll (Amersham Biosci

50

ence) 密度勾配遠心後に EDTA 若しくはヘパリン含有バキュテナーチューブに収集した全血から単離した。細胞を中間層から収集し、かつ PBS で洗浄した。PBMC を ACK 溶解緩衝液とインキュベートして赤血球を溶解し、洗浄し、そして 10% FBS、2 mM グルタミン、10 mM HEPES、50 µg/ml 硫酸ゲンタマイシンおよびペニシリン/ストレプトマイシンを含有する完全 RPMI 培地 (Mediatech) に再懸濁した。

【0143】

形質細胞様樹状細胞は、形質細胞様樹状細胞単離キット (Miltenyi biotec) を使用して、ペンシルベニア大学の AIDS 研究センター (Center For AIDS Research: CFAR) 免疫学コア (immunology core) から得たヒト PBMC から単離した。

10

【0144】

細胞を示されるとおり 10,000 の MOI で多様なアデノウイルスに感染させた。48 時間後に上清を収集し、そして、ELISA (IFN-、Pierce) ならびに多重サイトカイン分析 (インターロイキン-g (IL-6) およびマクロファージ炎症性タンパク質 1 (MIP-1) (Millipore/Luminex) の組合せを使用して多様なサイトカインおよびケモカインの誘導についてアッセイした。末梢血中の極端に少数の pDC により、提示されるデータは複数のドナーから単離された細胞を表す。

【0145】

適切なデータセットの統計学的有意性は、 $p < 0.01$ の場合に両側の対応のある student の t 検定により確立された。

20

【0146】

細胞内サイトカイン染色 (ICCS)。単離されたリンパ球によるサイトカイン産生の測定を、モノクローナル抗体を用いる組合せた表面および細胞内染色ならびにその後の 5 色フローサイトメトリー分析により実施した。10⁶ リンパ球を、CD49d および CD28 に対する精製抗体 (BD Biosciences) ならびに Golgi Plug (BD Pharmingen) の存在下に 10¹⁰ 粒子の熱不活性化 SAdV-48 若しくは 1 µg の HAdV-5 ヘキソンペプチドライブラリーと 6 時間インキュベートした。細胞を洗浄し、そして ECD-CD8 (Beckman Coulter) および APC-CD4 (BD Pharmingen) 抗ヒト抗体で染色した。細胞を洗浄し、250 µl の Cytifix/Cytoperm 溶液で 4 で 20 分間透過処理し、透過/洗浄溶液で洗浄し、そして FITC-TNF- (BD Pharmingen)、PE-IL2 (Beckman Coulter) および PE-Cy7-IFN- (BD Pharmingen) を包含する抗サイトカイン抗体で 4 で 30 分間染色した。細胞を洗浄し、フローサイトメトリーにより検査し、そして FlowJo ソフトウェア (TreeStar、オレゴン州) を使用してデータを解析した。

30

【0147】

同一の種グループに属するアデノウイルスとのサイトカイン/ケモカイン発現のプロファイルの顕著な類似性が存在した。種 C ウイルスはいずれかのサイトカイン/ケモカインの有意の量を合成することに失敗した一方、高レベルの数種のサイトカイン/ケモカインが種 E ウイルスへの曝露後に産生された。検出可能なしかしより大きく変動するレベルのサイトカインが種 B ウイルスへの曝露後に見出された。それぞれの種グループ内で、ヒトおよびヒト以外の霊長類のアデノウイルスの間で一貫した差違は存在しなかった。

40

【0148】

IFN- ELISPOT

Covance (N=15) および Oregon (N=15) からのアカゲザル (rhesus macaque) ならびにわれわれの施設からのカニクイザル (cynomolgus macaque) (N=10) から得た PBMC を、IFN- ELISPOT アッセイを使用して、多様な抗原 (HAdV-5 (種 C)、SAdV-24 (種 E)、SAdV-32 (種 B)、3 種のサル由来ウイルス (SAdV-48、SAdV-49 お

50

よびSAdV-50)ならびにHAdV-5ヘキソンペプチド)に対するアデノウイルス特異的T細胞について評価した。

【0149】

マルチスクリーン96ウェル滴定プレート(Millipore)をPBS中のヒト(クローンDK-1、Mabtech)若しくはサル(クローンGZ-4、Mabtech)IFN- γ に対する抗体で一夜被覆した。プレートを洗浄し、そしてその後完全培地(10%FBSを含有するRPMI培地)で1時間ブロッキングした。プレートをRPMI培地で洗浄し、そしてリンパ球をウェルあたり1および 2×10^5 細胞で100mlの完全培地に播種した。刺激物質ペプチドプール若しくはウイルスを、 $2 \mu\text{g/ml}$ の各ペプチドの最終濃度まで、若しくは100 μl の完全培地中本文中に示されるところのウイルスの多様な濃度で、各ウェルに添加した。細胞を5%CO₂下37 $^{\circ}\text{C}$ で20時間インキュベートした。プレートを洗浄し(0.05%Tween-20を含むPBS)、そしてその後2%FBSを含有する洗浄緩衝液で希釈したヒトおよびサルIFN- γ (クローンB6-1; Mabtech)に対するピオチニル化抗体とインキュベートした。プレートを2時間インキュベートしかつその後洗浄した。アビジンワサビペルオキシダーゼ(Vector Laboratories)を各ウェルに添加し、そしてプレートを1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、そしてスポットをAEC基質(BD Biosciences)で発色させた。スポットを自動ELISPOTリーダー(AID)で計数した。PHA(Sigma)およびCEFペプチドプール(Mabtech)を陽性対照として各分析に包含した。10⁶リンパ球あたり55スポット形成単位(SFU)以上かつバックグラウンドの3倍の値をもつELISPOTカウントのみを陽性で見なした。

【0150】

SAdV-48で刺激した細胞からのELISPOTデータは、低レベル応答をとまなう若干の動物が存在したとは言え、ほとんどの動物からの細胞が、評価されたいずれかのアデノウイルス抗原に応答することに失敗したことを示した。

【0151】

選択されたアカゲザル(rhesus macaque)およびカニクイザル(cynomolgus macaque)を剖検し、そして末梢血ならびに腸からの多様な部位(回腸、結腸および直腸)から収集した単核細胞を、抗原としてHAdV-5およびSAdV-48を使用してアデノウイルス特異的T細胞の存在について評価した。動物福祉の観点は類人猿での同様の研究を除外した。アデノウイルス特異的T細胞は、細胞を刺激するのにSAdV-48を使用した場合に腸全体で検出され、それらはセントラルメモリーおよびエフェクターメモリーの表現型をもつ細胞の混合物を示した。興味深いことに、腸でのアデノウイルス特異的T細胞の存在は、一貫して陰性であったか若しくは非常に低い応答を有した対応するPBMCの分析に基づき予測されなかった。サルで内因性アデノウイルス感染に対し生成されるT細胞は、血液若しくは粘膜からの細胞を使用してHAdV-5で効果的に刺激されなかった。抗原としてSAdV-48を使用するアデノウイルスに対する数種のサルからの腸サンプルの細胞内サイトカイン染色(ICCS)は、CD4⁺T細胞の優勢を示したとは言え、該頻度は低いがしかしIFN- γ 、TNF- α およびIL-2の発現について陽性であった。糞便抽出物を、SAdV-35(種B)およびSAdV-40(種C)に対する中和抗体の存在についてもまたアッセイした。罹患率(prevalence)および力価の双方が血清中のものより一貫して低いことが見出された。

【実施例4】

【0152】

ヒトアデノウイルスのE3遺伝子座は、対応するサルアデノウイルスと比較してより少なくかつより小さいCR1オープンリーディングフレームを含有する。

【0153】

ヒトアデノウイルスの以前の研究は、E3遺伝子座が、宿主応答の調節で重要であるがしかし複製に不可欠でないタンパク質をコードすることを示した。E3オープンリーディ

10

20

30

40

50

ングフレームの構造および機能の変動は、類人猿とヒトの間で観察された宿主応答の顕著な差違に寄与しているかもしれない。

【0154】

アデノウイルスのE3領域は9種までのオープンリーディングフレームをコードし得る。SAdV-48アデノウイルスはわずか6種のオープンリーディングフレーム、すなわち12.4Kタンパク質、CR1-、CR1-、RID-、RID- および14.7タンパク質を含有する。SAdV-49およびSAdV-50アデノウイルスはわずか5種のオープンリーディングフレーム、すなわち12.4Kタンパク質、CR1(他のアデノウイルスからのCR1- 遺伝子に対する最高の相同性を有する)、RID-、RID- および14.7タンパク質を含有する。

10

【0155】

抗アポトーシスタンパク質RID-、RID- および14.7Kタンパク質(Tollersonら、Nature, 392:726-730(1998))、未知の機能の12.5Kタンパク質をコードする第一のE3オープンリーディングフレームの産物、ならびにMHCクラスI発現を下方制御することが既知であるgp19kタンパク質(Andersonら、Cell, 43:215-222(1985))をコードする最後の3種のオープンリーディングフレームを包含する、多くのアデノウイルスで見出される9種までのオープンリーディングフレームは、ヒトおよび類人猿のアデノウイルスにわたり高度に保存されている。

20

【0156】

多様な単離物で2から4まで番号付けされている残存するE3オープンリーディングフレームは、保存されたドメインすなわちCR1(pfam PF02440)を含有しかつそれぞれCR1-、CR1-、CR1- およびCR1- と呼称される、未知の機能の膜貫通タンパク質をコードする。ウイルスのそれぞれの種グループは、異なる種グループ間で変動したCR1オープンリーディングフレームの特徴的な構造を示した。しかしながら、ある種グループ内で、ヒトおよび類人猿の単離物の間で一貫した差違が存在した。

【0157】

種Cの類人猿ウイルスは全部、3種のCR1 orf、すなわちCR1-、CR1- およびCR1- を含有し、種Cファミリーのヒト代表物(representative)は一貫してCR1- orfを欠いていた。種Bの類人猿ウイルスは全範囲の4種のCR1を含有し、種Bファミリーのヒト代表物は、CR1- (ヒトB2)を欠いていたか、若しくは実質的に切断されたバージョンのCR1- (ヒトB1)を含有したかのいずれかであった。種Eの類人猿ウイルスもまた全4種のCR1 orfを含有し、このファミリーの単独のヒト代表物HAdV-4は実質的に切断されたバージョンのCR1- を含有した。

30

【0158】

類人猿ウイルスと比較したヒトウイルス中のCR1構造の明らかな変性は、宿主の免疫検出および排除を回避するウイルスの能力に影響しうる。ヒトウイルス中のE3機能の相対的減少が、ヒトで観察されるより効果的なT細胞応答および減少された排出を説明しうる。

40

【0159】

オープンリーディングフレームのCR1ファミリーのこの分析は、アデノウイルスの異種間感染に関する可能なシナリオをさらに精密にするのに役立つ。系統発生樹全体のE3遺伝子座の構造は、種A、B、C、D、EおよびFウイルスの共通の祖先での重複事象、次いでとりわけヒトを感染させる血清型での(例えばCR1- の場合の)その後の遺伝子喪失を反映していることがありそうである。これは類人猿からヒトへのアデノウイルスの感染と最も一致する。他のより少なくありそうな説明は、独立した複数の重複がそれらの分岐後にB、CおよびE種内で発生したことである。

【実施例5】

50

【0160】

E1欠失アデノウイルスベクターの構築

ベクターは、例えばRoyら、Human Gene Therapy 15:519-530 (May 2004) に記述されることの慣習的技術により製造する。例えば、サブファミリーBのE1欠失ベクターを、2009年6月11日に公開された国際特許公開第WO 2009/073103号明細書に記述されるとおり製造する。同様に、サブファミリーCのE1欠失ベクターは、2009年8月27日に公開された国際特許公開第WO 2009/105084号明細書に記述されるとおり製造する。

【0161】

インフルエンザウイルス核タンパク質を発現するE1欠失アデノウイルスベクターを構築するため、H1N1 インフルエンザAウイルスNP (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai、GenBank受託番号AF389119.1) をコードするヌクレオチド配列をコドン最適化しかつ完全合成した (Celtek Genes、テネシー州ナッシュビル)。ヒトサイトメガロウイルス初期プロモーター、合成イントロン (プラスミドpCI (Promega、ウィスコンシン州マディソン) から得た)、コドン最適化したインフルエンザA NPコーディング配列およびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルから構成される発現カセットを構築した。プラスミドpShuttle CMV PI FluA NPは上述された発現カセットを持ち、そこでそれはそれぞれまれに切断する (rare-cutting) 制限酵素I-CeuIおよびPI-SceI (New England Biolabs) の認識部位により隣接される。E1欠失アデノウイルスベクターの分子クローンを創製するため、まれに切断する制限酵素I-CeuIおよびPI-SceIの認識部位がE1欠失の代わりに挿入されているE1欠失アデノウイルスのプラスミド分子クローンを最初に創製した。該E1欠失アデノウイルスプラスミドをその後I-CeuIおよびPI-SceIで消化し、そして発現カセット (同一酵素により消化した) を連結した。生じるアデノウイルスプラスミド分子クローンを、組換えアデノウイルスベクターをレスキューするためHEK 293細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後のレスキューが、制限酵素消化により該プラスミドから直鎖状アデノウイルスゲノムを最初に放出することにより促進されることが見出された。Royら、Vaccine 25:6845-6851 (August 2007) ; 2009年6月11日に公開された国際特許公開第WO 2009/073103号明細書 ; および2009年8月27日に公開された国際特許公開第WO 2009/105084号明細書を参照されたい。

【実施例6】

【0162】

アデノウイルスインフルエンザA核タンパク質四量体ワクチン

BALB/cマウスに、Royら、Vaccine 25:6845-6851 (August 2007) のプロトコルに従い、インフルエンザA核タンパク質 (NP) 四量体をコードするサルアデノウイルス (SAdV) ベクター 1×10^{11} 粒子形成単位 (PFU) を筋肉内に注入した。SAdV-45 (サブファミリーC) およびSAdV-46 (サブファミリーB) による送達をヒトアデノウイルス (HAdV) 5 (サブファミリーC) に対し評価した。NP四量体に対するTer+ CD8+ T細胞応答のキネティクスおよびT細胞表現型を注入後第10および20日に確認した。サイトカインプロファイルを注入後第10日に確認した。

【0163】

キネティクス

注入後第10日に、約8%のTer+ CD8+ T細胞がHAdV-5により送達されたNPに特異的であった。約5.5%のTer+ CD8+ T細胞がSAdV-46により送達されたNPに特異的であった。約0.5%のTer+ CD8+ T細胞がSAdV-45により送達されたNPに特異的であった (パーセンテージ約 $\pm 0.5\%$)。注入後第20日に、HAdV-5により送達されたNPに特異的なTer+ CD8+ T細胞は

10

20

30

40

50

5.5%に減少しており、SAdV-46により送達されたNPに特異的なTer+CD8+ T細胞は7%に増加しており、そしてSAdV-45により送達されたNPに特異的なTer+CD8+ T細胞は一定のままであった。

【0164】

メモリー表現型

Ter+CD8+ T細胞を表現型について評価した。注入後第10日に、約7.5%のT細胞がHAdV-5により送達されたNPに特異的であった。約0.5%がセントラルメモリーT細胞(TCM)であり、約3%がエフェクターメモリーT細胞(TEM)であり、そして約4%がエフェクターT細胞(TE)であった。第20日に、約5.5%のT細胞がHAdV-5により送達されたNPに特異的であった。約0.5%がTCMであり、約2.5%がTEMであり、そして約2.5%がTEであった。

10

【0165】

注入後第10日に、約4.5%のT細胞がHAdV-46により送達されたNPに特異的であった。約0.5%がTCMであり、約2%がTEMであり、そして約2%がTEであった。第20日に、約7%のT細胞がHAdV-46により送達されたNPに特異的であった。約0.5%がTCMであり、約4%がTEMであり、そして約2.5%がTEであった。(パーセンテージ約±0.5%)

【0166】

サイトカインプロファイル

CD8+ T細胞を、脾および肺組織中の注入後第10日の分泌されるサイトカインのプロファイルについて評価した。データを以下の表に要約する。

20

【0167】

【表3】

サイトカインプロファイルー脾

サイトカインを分泌する CD8+ T 細胞の% (約±0.5)	HAdV-5	SAdV-46
合計	6	5
IFN γ +TNF α -IL2-	1	0.5
IFN γ +TNF α +IL2-	4.5	4
IFN γ +TNF α +IL2+	0.5	0.5

30

サイトカインプロファイルー肺

サイトカインを分泌する CD8+ T 細胞の% (約±0.5)	HAdV-5	SAdV-46
合計	25	30
IFN γ +TNF α -IL2-	7.5	15
IFN γ +TNF α +IL2-	17	14.5
IFN γ +TNF α +IL2+	0.5	0.5

40

【0168】

SAdV-45の結果は免疫応答を示さなかった。しかしながら、これは反復されているベクター産生に関連すると考えられた。

【0169】

上で列挙された全部の文書、配列表、および全部2008年10月31日に出願された米国仮出願第61/109,955号;同第61/109,958号;同第61/109,957号;同第61/110,028号;同第61/109,979号;同第61/109,986号;同第61/109,997号明細書は引用することにより本明細書に組み込まれる。多数の改変および変形が、上で同定される明細の範囲に包含され、そして当業者に明らかであることが期待される。多様なミニ遺伝子の選択またはベクター若しくは

50

免疫調節物質の選択若しくは投与量のような組成物および方法に対するこうした改変および変更は、これに付随される請求の範囲の範囲内にあると考えられる。

【配列表フリーテキスト】

【 0 1 7 0 】

以下の情報は数字識別子 < 2 2 3 > の下のフリーテキストを含有する配列を提供する。

【 0 1 7 1 】

【表 4 - 1】

配列番号 (フリーテキストを含有する)	<223>の下のフリーテキスト
1	サルアデノウイルスタイプ43
2	合成構築物
3	合成構築物
4	合成構築物
5	合成構築物
6	合成構築物
7	合成構築物
8	合成構築物
9	合成構築物
10	合成構築物
11	合成構築物
12	合成構築物
13	合成構築物
14	合成構築物
15	合成構築物
16	合成構築物
17	合成構築物
18	合成構築物
19	合成構築物
20	合成構築物
21	合成構築物
22	合成構築物
23	合成構築物
24	合成構築物
25	合成構築物
26	合成構築物
27	合成構築物
28	合成構築物
29	合成構築物
30	サルアデノウイルスタイプ43
31	合成構築物
32	サルアデノウイルスに基づくプライマー
33	サルアデノウイルスに基づくプライマー
34	サルアデノウイルスに基づくプライマー
35	サルアデノウイルスに基づくプライマー
36	サルアデノウイルスに基づくプライマー
37	サルアデノウイルスに基づくプライマー
38	サルアデノウイルスタイプ45
39	合成構築物
40	合成構築物
41	合成構築物

10

20

30

40

【 0 1 7 2 】

【表 4 - 2】

配列番号 (フリーテキストを含有する)	<223>の下のフリーテキスト	
42	合成構築物	
43	合成構築物	
44	合成構築物	
45	合成構築物	
46	合成構築物	
47	合成構築物	10
48	合成構築物	
49	合成構築物	
50	合成構築物	
51	合成構築物	
52	合成構築物	
53	合成構築物	
54	合成構築物	
55	合成構築物	
56	合成構築物	
57	合成構築物	
58	合成構築物	20
59	合成構築物	
60	サルアデノウイルスタイプ45	
61	合成構築物	
62	合成構築物	
63	合成構築物	
64	合成構築物	
65	サルアデノウイルスタイプ45	
66	合成構築物	
67	サルアデノウイルスタイプ45	
68	合成構築物	30
69	サルアデノウイルスタイプ46	
70	合成構築物	
71	合成構築物	
72	合成構築物	
73	合成構築物	
74	合成構築物	
75	合成構築物	
76	合成構築物	
77	合成構築物	
78	合成構築物	
79	合成構築物	40
80	合成構築物	
81	合成構築物	
82	合成構築物	
83	合成構築物	
84	合成構築物	

【表 4 - 3】

配列番号 (フリーテキストを含有する)	<223>の下のフリーテキスト	
85	合成構築物	
86	合成構築物	
87	合成構築物	
88	合成構築物	
89	合成構築物	
90	サルアデノウイルスタイプ46	10
91	合成構築物	
92	合成構築物	
93	合成構築物	
94	合成構築物	
95	サルアデノウイルスタイプ46	
96	合成構築物	
97	サルアデノウイルスタイプ46	
98	合成構築物	
99	サルアデノウイルスタイプ47	
100	合成構築物	20
101	合成構築物	
102	合成構築物	
103	合成構築物	
104	合成構築物	
105	合成構築物	
106	合成構築物	
107	合成構築物	
108	合成構築物	
109	合成構築物	
110	合成構築物	
111	合成構築物	30
112	合成構築物	
113	合成構築物	
114	合成構築物	
115	合成構築物	
116	合成構築物	
117	合成構築物	
118	合成構築物	
119	合成構築物	
120	サルアデノウイルスタイプ47	
121	合成構築物	40
122	合成構築物	
123	合成構築物	
124	合成構築物	
125	サルアデノウイルスタイプ47	
126	合成構築物	
127	サルアデノウイルスタイプ47	

【表 4 - 4】

配列番号 (フリーテキストを含有する)	<223>の下のフリーテキスト	
128	合成構築物	
129	サルアデノウイルスタイプ48	
130	合成構築物	
131	合成構築物	
132	合成構築物	
133	合成構築物	10
134	合成構築物	
135	合成構築物	
136	合成構築物	
137	合成構築物	
138	合成構築物	
139	合成構築物	
140	合成構築物	
141	合成構築物	
142	合成構築物	
143	合成構築物	
144	合成構築物	20
145	合成構築物	
146	合成構築物	
147	合成構築物	
148	サルアデノウイルスタイプ48	
149	合成構築物	
150	合成構築物	
151	合成構築物	
152	合成構築物	
153	サルアデノウイルスタイプ48	
154	合成構築物	30
155	サルアデノウイルスタイプ48	
156	合成構築物	
157	サルアデノウイルスタイプ49	
158	合成構築物	
159	合成構築物	
160	合成構築物	
161	合成構築物	
162	合成構築物	
163	合成構築物	
164	合成構築物	
165	合成構築物	40
166	合成構築物	
167	合成構築物	
168	合成構築物	
169	合成構築物	
170	合成構築物	

【 0 1 7 5 】

【表 4 - 5】

配列番号 (フリーテキストを含有する)	<223>の下のフリーテキスト	
171	合成構築物	
172	合成構築物	
173	合成構築物	
174	合成構築物	
175	合成構築物	
176	サルアデノウイルスタイプ49	10
177	合成構築物	
178	合成構築物	
179	合成構築物	
180	合成構築物	
181	サルアデノウイルスタイプ49	
182	合成構築物	
183	サルアデノウイルスタイプ50	
184	合成構築物	
185	合成構築物	
186	合成構築物	
187	合成構築物	20
188	合成構築物	
189	合成構築物	
190	合成構築物	
191	合成構築物	
192	合成構築物	
193	合成構築物	
194	合成構築物	
195	合成構築物	
196	合成構築物	
197	合成構築物	30
198	合成構築物	
199	合成構築物	
200	合成構築物	
201	合成構築物	
202	サルアデノウイルスタイプ50	
203	合成構築物	
204	合成構築物	
205	合成構築物	
206	合成構築物	
207	サルアデノウイルスタイプ50	
208	合成構築物	40

【配列表】

[0005809978000001.app](#)

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/110,028
(32)優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/109,986
(32)優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/109,957
(32)優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/109,955
(32)優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/109,997
(32)優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)
(33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 バンデンベルグ, リュク・エイチ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19146フィラデルフィア・セントアルバンズストリート2131

審査官 白井 美香保

- (56)参考文献 特表2007-518414(JP,A)
特表2007-525197(JP,A)
特表2005-511035(JP,A)
特表2004-537300(JP,A)
JOURNAL OF VIROLOGY, 2001年, vol.75 no.23, pp.11603-11613
Vaccine, 2007年, vol.25, pp.6845-6851
Journal of General Virology, 2006年, vol.87, pp.2477-2485
Virology, 2005年, vol.333, pp.207-214
Journal of Virological Methods, 2007年 1月 2日, vol.141, pp.14-21
Virology, 2004年, vol.324, pp.361-372

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
PubMed
Cinii