

(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2020-511114

(P2020-511114A)

(43) 公表日 令和2年4月16日 (2020.4.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/34 (2006.01)	C 1 2 N 15/34	4 B 0 6 5
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01 Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861 Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-530815 (P2019-530815)	(71) 出願人	305060279
(86) (22) 出願日	平成29年12月7日 (2017.12.7)		グラクソスミスクライン バイオロジカル
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月9日 (2019.7.9)		ズ ソシエテ アノニム
(86) 国際出願番号	PCT/IB2017/057738		ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
(87) 国際公開番号	W02018/104911		ル リュ ドランスティテュ 8 9
(87) 国際公開日	平成30年6月14日 (2018.6.14)	(74) 代理人	110002572
(31) 優先権主張番号	1620968.6		特許業務法人平木国際特許事務所
(32) 優先日	平成28年12月9日 (2016.12.9)	(72) 発明者	アメンドラ, バージニア
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		イタリア国 0 0 1 2 8 ローマ, ビア
			ディ カステル ロマーノ 1 0 0
		(72) 発明者	カボネ, ステファニア
			イタリア国 0 0 1 2 8 ローマ, ビア
			ディ カステル ロマーノ 1 0 0
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アデノウイルスポリヌクレオチド及びポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、新規チンパンジーアデノウイルスであるChAd157に由来する単離されたポリヌクレオチド及びポリペプチド配列、ならびに該ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を含む組換えポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、細胞及び組成物に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体

からなる群より選択されるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドであって、該機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチドからなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項 3】

以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドであって、該機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチドからなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項 4】

以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドであって、該機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び

(d) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体

からなる群より選択される少なくとも1種のポリヌクレオチド又はポリペプチドを含む、組換えアデノウイルス。

【請求項 5】

以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドであって、該機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(d) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、

(e) 請求項 3 に記載のベクター、及び

(f) 請求項 4 に記載の組換えアデノウイルス

10

20

30

40

50

の少なくとも1種、及び薬学的に許容される賦形剤を含む組成物。

【請求項 6】

以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドであって、該機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(d) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、

(e) 請求項 3 に記載のベクター、及び

(f) 請求項 4 に記載の組換えアデノウイルス

の少なくとも1種を含む細胞。

【請求項 7】

以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体

からなる群より選択される単離されたアデノウイルスポリペプチド。

【請求項 8】

ポリヌクレオチドが配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードし、該機能的誘導体が、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 9】

ポリヌクレオチドが配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 10】

ポリヌクレオチドが配列番号 2 の配列を有する、請求項 9 記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 11】

以下：

(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；若しくは

(b) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 3 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも60%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、

又は、

(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；若しくは

(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 5 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも60%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、

をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 12】

以下：

(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；若しくは

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 3 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 98% 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、
又は、

(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；若しくは

(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 5 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 98% 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、
をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 11 記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

10

【請求項 13】

以下：

(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；又は

(b) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 3 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 98% 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、
及び、

(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；又は

(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 5 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 98% 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、
をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1～10 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

20

【請求項 14】

以下：

(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；又は

(b) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 3 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 98% 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、
及び、

30

(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；又は

(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 5 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 98% 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、
をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 13 記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 15】

ポリヌクレオチドが配列番号 4 の配列を含む、請求項 11～14 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 16】

ポリヌクレオチドが配列番号 6 の配列を含む、請求項 11～15 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

40

【請求項 17】

ポリヌクレオチドが、以下：

(a) アデノウイルス 5'-末端、好ましくはアデノウイルス 5'逆方向末端反復；

(b) アデノウイルス E1A 領域、又は E1A_280R 及び E1A_243R 領域から選択されるその断片

；

(c) アデノウイルス E1B 若しくは IX 領域、又は E1B_19K、E1B_55K 若しくは IX 領域からなる群より選択されるその断片；

(d) アデノウイルス E2b 領域、又は E2B_pTP、E2B_ポリメラーゼ及び E2B_IVa2 領域から

50

なる群より選択されるその断片；

(e) アデノウイルスL1領域、又はL1_13.6kタンパク質、L1_52k及びL1_IIIaタンパク質からなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(f) アデノウイルスL2領域、又は請求項3に記載のL2_ペントントタンパク質、L2_pVII、L2_V、及びL2_pXタンパク質からなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(g) アデノウイルスL3領域、又はL3_pVIタンパク質、請求項2に記載のL3_ヘキソントタンパク質及びL3_プロテアーゼからなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(h) アデノウイルスE2A領域；

(i) アデノウイルスL4領域、又はL4_100kタンパク質、L4_33kタンパク質及びタンパク質L4_VIIIからなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(j) アデノウイルスE3領域、又はE3 ORF1、E3 ORF2、E3 ORF3、E3 ORF4、E3 ORF5、E3 ORF6、E3 ORF7、E3 ORF8、及びE3 ORF9からなる群より選択されるその断片；

(k) アデノウイルスL5領域、又は請求項1に記載のL5_ファイバータンパク質をコードするその断片；

(l) アデノウイルスE4領域、又はE4 ORF7、E4 ORF6、E4 ORF4、E4 ORF3、E4 ORF2、及びE4 ORF1からなる群より選択されるその断片；

(m) アデノウイルス3'-末端、好ましくはアデノウイルス3'逆方向末端反復；及び／又は

(n) アデノウイルスVAI又はVAII RNA領域、好ましくはChAd157以外のアデノウイルス由来、より好ましくはAd5由来のアデノウイルスVAI又はVAII RNA領域の少なくとも1種を含む、請求項1～16のいずれか1項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項18】

ポリヌクレオチドが、以下：

(a) アデノウイルス5'-末端、好ましくはアデノウイルス5'逆方向末端反復；

(e) アデノウイルスL1領域、又はL1_13.6kタンパク質、L1_52k及びL1_IIIaタンパク質からなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(f) アデノウイルスL2領域、又は請求項3に記載のL2_ペントントタンパク質、L2_pVII、L2_V、及びL2_pXタンパク質からなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(g) アデノウイルスL3領域、又はL3_pVIタンパク質、請求項2に記載のL3_ヘキソントタンパク質及びL3_プロテアーゼからなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(i) アデノウイルスL4領域、又はL4_100kタンパク質、L4_33kタンパク質及びタンパク質L4_VIIIからなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(k) アデノウイルスL5領域、又は請求項1に記載のL5_ファイバータンパク質をコードするその断片；

(m) アデノウイルス3'-末端、好ましくはアデノウイルス3'逆方向末端反復の少なくとも1種を含む、請求項17記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項19】

ポリヌクレオチドがアデノウイルスVAI又はVAII RNA領域を含む、請求項1～16のいずれか1項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項20】

VAI又はVAII RNA領域が、ChAd157以外のアデノウイルスに由来する、請求項19記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項21】

VAI又はVAII RNA領域がAd5に由来する、請求項20記載のポリヌクレオチド、ベクター

10

20

30

40

50

、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 22】

ポリヌクレオチドが、本質的に配列番号 15 又は 22 からなる参照配列に対してその全長にわたって少なくとも 95% 同一のポリヌクレオチドを含むかそれからなる、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 23】

ポリヌクレオチドが、その全長にわたって参照配列に対して少なくとも 99% 同一のポリヌクレオチドを含むかそれからなる、請求項 22 記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

10

【請求項 24】

ポリヌクレオチドが、その全長にわたって参照配列に対して少なくとも 99.5% 同一のポリヌクレオチドを含むかそれからなる、請求項 23 記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 25】

ポリヌクレオチドが、その全長にわたって参照配列に対して同一のポリヌクレオチドを含むかそれからなる、請求項 22 ~ 24 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 26】

参照配列が配列番号 15 である、請求項 25 記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

20

【請求項 27】

参照配列が配列番号 22 である、請求項 25 記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 28】

ポリヌクレオチドが、E1A、E1B、E2A、E2B、E3及びE4からなる群より選択されるゲノム領域の少なくとも 1 種の遺伝子を非機能性にする変異又は欠失を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 29】

ポリヌクレオチドが、E1A、E1B、E2A、E2B、E3及び / 又はE4からなる群より選択されるゲノム領域の少なくとも 1 種の遺伝子を欠く、請求項 28 記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

30

【請求項 30】

ゲノム領域がE1A及び / 又はE1Bである、請求項 28 又は 29 のいずれか記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 31】

ポリヌクレオチドが、E1ゲノム領域の欠失を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 32】

組換えアデノウイルスが複製能を有する、請求項 4 及び 8 ~ 31 のいずれか 1 項記載のアデノウイルス。

40

【請求項 33】

組換えアデノウイルスが複製能を有さない、請求項 4 及び 8 ~ 32 のいずれか 1 項記載のアデノウイルス。

【請求項 34】

組換えアデノウイルスがタンパク質をコードする核酸配列を含み、該核酸配列が、宿主細胞中での該タンパク質の発現を指令する 1 以上の配列に機能的に連結している、請求項 4 及び 8 ~ 33 のいずれか 1 項記載のアデノウイルス。

【請求項 35】

タンパク質が抗原性タンパク質又はその断片である、請求項 34 記載のアデノウイルス

50

。

【請求項 3 6】

タンパク質が異種タンパク質又はその断片である、請求項 3 5 記載のアデノウイルス。

【請求項 3 7】

タンパク質がウイルス由来である、請求項 3 6 記載のアデノウイルス。

【請求項 3 8】

宿主細胞中での生成物の発現を指令する 1 以上の配列が、転写開始配列、転写終結配列、プロモーター配列及びエンハンサー配列からなる群の 1 種以上から選択される配列を含む、請求項 3 4 ~ 3 7 のいずれか 1 項記載のアデノウイルス。

【請求項 3 9】

宿主細胞における生成物の発現を指令する 1 以上の配列がプロモーター配列を含む、請求項 3 8 記載のアデノウイルス。

【請求項 4 0】

プロモーター配列が、内部プロモーター、天然のプロモーター、RSV LTRプロモーター、CMVプロモーター、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、PGKプロモーター、EF1aプロモーター及びCASIプロモーターからなる群より選択される、請求項 3 9 記載のアデノウイルス。

【請求項 4 1】

プロモーター配列が、配列番号 4 2 に提供されるものなどの、促進型hCMVプロモーターである、請求項 3 9 記載のアデノウイルス。

【請求項 4 2】

アデノウイルスが、ヒト被験体中で 10 % 未満の血清陽性率を有し、好ましくはヒト被験体中で血清陽性率を有さないものである、請求項 4 及び 8 ~ 4 1 のいずれか 1 項記載のアデノウイルス。

【請求項 4 3】

アデノウイルスが哺乳動物細胞に感染することができる、請求項 4 及び 8 ~ 4 2 のいずれか 1 項記載のアデノウイルス。

【請求項 4 4】

無機アジュバント（例えばリン酸アルミニウム又は水酸化アルミニウム等の無機金属塩）、有機アジュバント（例えばQS21等のサポニン又はスクアレノ）、オイルベースのアジュバント（例えばフロイント完全アジュバント及びフロイント不完全アジュバント）、サイトカイン（例えばIL-1 β 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、GM-CSF、及びINF- γ ）、粒子状アジュバント（例えば免疫刺激複合体（ISCOMS）、リボソーム、又は生分解性マイクロスフェア）、ピロソーム、細菌性アジュバント（例えば3-de-O-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)等のモノホスホリルリピドA、又はムラミルペプチド）、合成アジュバント（例えば非イオン性ブロックコポリマー、ムラミルペプチド類似体、又は合成リピドA）、合成ポリヌクレオチドアジュバント（例えばポリアルギニン又はポリリジン）及び非メチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド（「CpG」）からなるリストから選択されるアジュバントを含む、請求項 5 及び 8 ~ 4 3 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 4 5】

アジュバントが3D-MPL及び / 又はQS21である、請求項 4 4 記載の組成物。

【請求項 4 6】

細胞が、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4及びL5からなる群より選択される少なくとも 1 種のアデノウイルス遺伝子を発現する宿主細胞である、請求項 6 及び 8 ~ 3 1 のいずれか 1 項記載の細胞。

【請求項 4 7】

宿主細胞が懸濁液中で増殖する、請求項 4 5 記載の細胞。

【請求項 4 8】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

ポリペプチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 49】

ワクチンとして使用するための、請求項 48 記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞。

【請求項 50】

疾患の治療又は予防のための、請求項 1～47 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞の使用。

【請求項 51】

請求項 1～47 のいずれか 1 項記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、アデノウイルス、組成物又は細胞を被験体に投与することを含む、被験体における免疫応答を誘導する方法。

10

【請求項 52】

配列番号 2 の配列を含むか、該配列からなる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 53】

ChAd157ファイバー、又は本明細書に記載されるその機能的誘導体を含まない組換えアデノウイルスベクターに以前に曝露された被験体に対する投与のための導入遺伝子をコードする、請求項 4 及び 8～43 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 54】

被験体が、ChAd155ファイバー、ヘキソン及び / 又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターに以前に曝露されている、請求項 53 記載の組換えアデノウイルスベクター。

20

【請求項 55】

被験体が、ChAd155ファイバー、ヘキソン及びペントンを含む組換えアデノウイルスベクターに以前に曝露されている、請求項 54 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 56】

ChAd155ファイバー、ヘキソン及び / 又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターが、導入遺伝子をコードする請求項 4 及び 8～43 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターとは異なる医学的適応（1種類又は複数種類）を標的とする導入遺伝子をコードする、請求項 54 又は 55 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 57】

ChAd155ファイバー、ヘキソン及び / 又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターが、導入遺伝子をコードする請求項 4 及び 8～43 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターと同じ医学的適応（1種類又は複数種類）を標的とする導入遺伝子をコードする、請求項 54 又は 55 記載の組換えアデノウイルスベクター。

30

【請求項 58】

ChAd155ファイバー、ヘキソン及び / 又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターが、導入遺伝子をコードする請求項 4 及び 8～43 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターと同じ導入遺伝子をコードする、請求項 54 又は 55 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 59】

導入遺伝子が、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生性微生物又は多細胞性寄生生物などの病原体に対する、あるいは癌細胞又は腫瘍細胞に対する免疫をヒト又は非ヒト動物に付与するために有用である免疫原をコードする、請求項 53～58 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクター。

40

【請求項 60】

本明細書に記載されるChAd157ファイバー、又はその機能的誘導体を含まない組換えアデノウイルスベクターにその後曝露される可能性がある被験体に対する投与のための導入遺伝子をコードする、請求項 4 及び 8～43 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 61】

50

被験体が、ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターにその後に曝露される可能性がある、請求項 6 0 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 6 2】

被験体が、ChAd155ファイバー、ヘキソン及びペントンを含む組換えアデノウイルスベクターにその後に曝露される可能性がある、請求項 6 1 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 6 3】

ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターが、導入遺伝子をコードする請求項 4 及び 8 ~ 4 3 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターとは異なる医学的適応（1種類又は複数種類）を標的とする導入遺伝子をコードする、請求項 6 1 又は 6 2 記載の組換えアデノウイルスベクター。

10

【請求項 6 4】

ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターが、導入遺伝子をコードする請求項 4 及び 8 ~ 4 3 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターと同じ医学的適応（1種類又は複数種類）を標的とする導入遺伝子をコードする、請求項 6 1 又は 6 2 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 6 5】

ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターが、導入遺伝子をコードする請求項 4 及び 8 ~ 4 3 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターと同じ導入遺伝子をコードする、請求項 6 1 又は 6 2 記載の組換えアデノウイルスベクター。

20

【請求項 6 6】

導入遺伝子が、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生性微生物又は多細胞性寄生生物などの病原体に対する、あるいは癌細胞又は腫瘍細胞に対する免疫をヒト又は非ヒト動物に付与するために有用である免疫原をコードする、請求項 6 0 ~ 6 5 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 6 7】

以下：

(a) 第1の導入遺伝子をコードする請求項 4 及び 8 ~ 4 3 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターを被験体に投与するステップ；及び

30

(b) ChAd157ファイバーを含まない組換えアデノウイルスベクターであって、第2の導入遺伝子をコードするベクターを被験体に投与するステップ
を含み、このとき、ステップ(a)及び(b)は、いずれの順序でも行なうことができ、且つ第1及び第2の導入遺伝子は同じか又は異なることができる、被験体での免疫応答を生起するための方法。

【請求項 6 8】

以下：

(a) ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生性微生物又は多細胞性寄生生物などの病原体に対する、あるいは癌細胞又は腫瘍細胞に対する免疫をヒト又は非ヒト動物に付与するために有用である免疫原をコードする第1の導入遺伝子をコードする請求項 4 及び 8 ~ 4 3 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターを被験体に投与するステップ；及び

40

(b) ChAd157ファイバー、又は本明細書に記載されるその機能的誘導体を含まない組換えアデノウイルスベクターであって、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生性微生物又は多細胞性寄生生物などの異なる病原体に対する、あるいは癌細胞又は腫瘍細胞に対する免疫をヒト又は非ヒト動物に付与するために有用である免疫原をコードする第2の導入遺伝子をコードするベクターを被験体に投与するステップ
を含み、このとき、ステップ(a)及び(b)は、いずれの順序でも行なうことができる、被験体の予防又は治療のための方法。

50

【請求項 69】

ChAd157ファイバー、又は本明細書に記載されるその機能的誘導体を含まない組換えアデノウイルスベクターが、請求項 4 及び 8 ~ 43 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクターとの低い交差反応性を有する、請求項 53 ~ 68 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクター又は方法。

【請求項 70】

第1のベクターを用いる免疫付与が、平均して、第2のベクターを用いる免疫付与から生じるレベルの50%未満の中和力価を引き起こす、請求項 69 記載の組換えアデノウイルスベクター又は方法。

【請求項 71】

ChAd157ファイバーを含まない組換えアデノウイルスベクターが、ChAd157ファイバー、ChAd157ヘキソン又はChAd157ファイバー若しくはそれに対して少なくとも98%の同一性を有するその機能的誘導体を含まない、請求項 53 ~ 70 のいずれか 1 項記載の組換えアデノウイルスベクター又は方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規のチンパンジーアデノウイルスChAd157に由来する単離されたポリヌクレオチド及びポリペプチド配列、ならびに前記ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を含む組換えポリヌクレオチド、ベクター、アデノウイルス、細胞及び組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

アデノウイルスは、様々な標的組織において高効率の遺伝子導入を達成するその能力のため、及び大きな導入遺伝子収容能力のため、遺伝子導入の用途に広く使用されている。通常、アデノウイルスのE1遺伝子は欠失しており、選択されたプロモーター、目的の遺伝子のcDNA配列、ポリAシグナルで構成されている導入遺伝子カセットに置換され、結果として複製欠損組換えウイルスを生じる。

【0003】

組換えアデノウイルスは、遺伝子治療において、またワクチンとして有用である。チンパンジーアデノウイルスに基づくウイルスベクターは、遺伝子ワクチンの開発のためのヒト由来アデノウイルスベクターの使用の代替手段となる。チンパンジーから分離されたアデノウイルスは、ヒト由来の細胞におけるそれらの効率的な増殖によって証明されるように、ヒトから単離されたアデノウイルスと近縁である。しかし、ヒト及びチンパンジーアデノウイルスが近縁であるため、2つのウイルス種の間の血清学的交差反応が起こり得る。

【0004】

標的に分子を効率的に送達し、その集団における選択されたアデノウイルスの血清型に対する既存の免疫の効果を最小限に抑えるベクターの需要がある。ヒトにおいて観察される既存の免疫の1つの態様は、液性免疫であり、アデノウイルスタンパク質に特異的な抗体の産生及び持続を引き起こし得る。アデノウイルスによって引き起こされる液性応答は、主に3つの主要なカプシド構造タンパク質：ファイバー、ペントン及びヘキソンに向けられる。

【発明の概要】

【0005】

単離されたポリヌクレオチドが提供され、そのポリヌクレオチドは、以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体からなる群より選択されるポリペプチドをコードする。

【 0 0 0 6 】

また、以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドであって、その機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチドからなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む組換えポリヌクレオチドもまた提供される。

【 0 0 0 7 】

また、以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドであって、その機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチドからなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む組換えベクターも提供される。

【 0 0 0 8 】

また、以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドであって、その機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び

(d) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体からなる群より選択される少なくとも1種のポリヌクレオチド又はポリペプチドを含む、組換えアデノウイルスも提供される。

【 0 0 0 9 】

また、以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、その機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド、

(d) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの単離された機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、

(e) 上記の (a) 又は (b) に記載されるようなポリヌクレオチドを含むベクター、及び

(f) 上記の (a) 又は (b) に記載されるようなポリヌクレオチドを含む組換えアデノウイルス

の少なくとも1種、及び薬学的に許容される賦形剤を含む組成物も提供される。

【 0 0 1 0 】

また、以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド、

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、その機能的誘導体が配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 99.8% 同一のアミノ酸配列を有する、ポリヌクレオチド、

(c) 上記の (a) 又は (b) に記載されるようなポリヌクレオチドを含むベクター、及び

(d) 上記の (a) 又は (b) に記載されるようなポリヌクレオチドを含む組換えアデノウイルス

の少なくとも 1 種を含む細胞も提供される。

10

【0011】

また、以下：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 1 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 99.8% 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体
からなる群より選択される単離されたアデノウイルスポリペプチドも提供される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1 A】図 1 A ~ D は、示されたサルアデノウイルス由来のファイバータンパク質配列のアラインメントを示す。ChAd157 (配列番号 1)、ChAd3 (配列番号 27)、PanAd3 (配列番号 28)、ChAd17 (配列番号 29)、ChAd19 (配列番号 30)、ChAd24 (配列番号 31)、ChAd155 (配列番号 7)、ChAd11 (配列番号 32)、ChAd20 (配列番号 33)、ChAd31 (配列番号 34)、PanAd1 (配列番号 35)、PanAd2 (配列番号 36)。

20

【図 1 B】図 1 A の続き。

【図 1 C】図 1 B の続き。

【図 1 D】図 1 C の続き。

【図 2】サブグループ C BAC シャトルを模式的に示す。

【図 3】サブグループ C プラスミドシャトルを模式的に示す。

【図 4】pChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG ベクターを模式的に示す。

30

【図 5】pARS C 種 Ad5orf6-2 シャトルを模式的に示す。

【図 6】ChAd157 RG を担持するプラスミドを模式的に示す。

【図 7】ChAd157/GAG、ChAd19/GAG 及び ChAd155/GAG による導入遺伝子発現を示す。

【図 8】ChAd155/RG 及び ChAd157/RG を感染させた HeLa 細胞の溶解液のウェスタンブロット解析を示す。

【図 9】ChAd157/GAG、ChAd155/GAG 及び ChAd19 GAG の BALB/c マウスでの免疫学的有効性を示す。

【図 10】ChAd157/RG 及び ChAd155/RG の BALB/c マウスでの免疫学的有効性を示す。

【図 11】種々の ChAd ベクターを用いたマウスの予備免疫付与後の中和力価を示す。

【図 12】種々の予備免疫付与計画後の ChAd157/GAG を用いたマウスのワクチン接種に続く IFN-γ ELISpot を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0013】

配列の説明

配列番号 1 - ChAd157 ファイバーのポリペプチド配列

配列番号 2 - ChAd157 ファイバーをコードするポリヌクレオチド配列

配列番号 3 - ChAd157 ペントンのポリペプチド配列

配列番号 4 - ChAd157 ペントンをコードするポリヌクレオチド配列

配列番号 5 - ChAd157 ヘキソンのポリペプチド配列

配列番号 6 - ChAd157 ヘキソンをコードするポリヌクレオチド配列

50

- 配列番号 7 - ChAd155ファイバーのポリペプチド配列
- 配列番号 8 - ChAd155ファイバーをコードするポリヌクレオチド配列
- 配列番号 9 - ChAd155ペントンのポリペプチド配列
- 配列番号 10 - ChAd155ペントンをコードするポリヌクレオチド配列
- 配列番号 11 - ChAd155ヘキソンのポリペプチド配列
- 配列番号 12 - ChAd155ヘキソンをコードするポリヌクレオチド配列
- 配列番号 13 - 野生型ChAd155をコードするポリヌクレオチド配列
- 配列番号 14 - サブグループC BACシャトル (#1365) のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 15 - pChAd157 ΔE1_TetO hCMV RpsL-Kana#1551のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 16 - HIV Gagポリヌクレオチド配列 10
- 配列番号 17 - pChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG#1557のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 18 - Ad5orf6プライマー1ポリヌクレオチド配列
- 配列番号 19 - Ad5orf6プライマー2ポリヌクレオチド配列
- 配列番号 20 - ファイバー-E4 polyAプライマー1ポリヌクレオチド配列
- 配列番号 21 - ファイバー-E4 polyAプライマー2ポリヌクレオチド配列
- 配列番号 22 - ChAd157 ΔE1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana#1594のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 23 - 狂犬病糖タンパク質のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 24 - pChAd157 ΔE1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RG#1559のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 25 - CMVforプライマーポリヌクレオチド配列 20
- 配列番号 26 - CMVrevプライマーポリヌクレオチド配列
- 配列番号 27 - ChAd3のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 28 - PanAd3のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 29 - ChAd17のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 30 - ChAd19のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 31 - ChAd24のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 32 - ChAd11のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 33 - ChAd20のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 34 - ChAd31のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 35 - PanAd1のファイバータンパク質のアミノ酸配列 30
- 配列番号 36 - PanAd2のファイバータンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 37 - hCMV(tetO) のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 38 - サブグループCプラスミドシャトル#1376のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 39 - BGH polyAのポリヌクレオチド配列
- 配列番号 40 - pARS C種Ad5orf6-2のポリヌクレオチド配列
- 配列番号 41 - CMVFAM-TAMRAプローブのポリヌクレオチド配列
- 配列番号 42 - 促進型hCMVプロモーターをコードするポリヌクレオチド配列

【0014】

本発明のベクター、組成物及び方法は、先行技術を超える1つ以上の下記の改善された特性、すなわち、より高い生産性、改善された免疫原性、導入遺伝子発現の増加または異なる血清学的交差反応性プロフィールを含むがそれらに限定されない特性を有し得る。 40

本発明のベクター、組成物及び方法は、生産性、免疫原性、導入遺伝子発現及び/又は血清学的交差反応性などの特性の組み合わせを示すことができ、このことは、それらが、公知のアプローチに対する価値ある代替法を提供することを意味する。

【0015】

アデノウイルス

アデノウイルスは、3つの主要なタンパク質、ヘキソン(II)、ペントンベース(III)及びノブのあるファイバー(IV)を多数の他の微量タンパク質、VI、VIII、IX、IIIa及びIVa2とともに含む正20面体カプシドによる特徴的な形態を有する。ウイルスゲノムは直鎖状の二本鎖DNAである。ウイルスDNAは、高塩基性のタンパク質VII及び小ペプチドpX(50

以前はmuと呼ばれた)と密接に結び付いている。別のタンパク質、Vは、このDNA-タンパク質複合体とともにパッケージングされ、タンパク質VIを介してカプシドとの構造的結合を提供する。ウイルスはまた、ウイルスにコードされたプロテアーゼを包含し、これはいくつかの構造タンパク質をプロセッシングして成熟した感染性ウイルスを生じるために必要である。

【0016】

アデノウイルスゲノムは、よく特性解析されている。特定のオープンリーディングフレームに関して、アデノウイルスゲノムの全体構造には全般的保存性があり、例えばそれぞれのウイルスのE1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4及びL5遺伝子の位置は同様に配置されている。アデノウイルスゲノムのそれぞれの末端は、逆方向末端反復(ITR)として知られる配列を含み、これはウイルス複製に必要である。ウイルスはまた、ウイルスにコードされたプロテアーゼを包含し、これは感染性ビリオンを生じるために必要なくいくつかの構造タンパク質をプロセッシングするために必要である。アデノウイルスゲノムの構造は、宿主細胞の形質導入後にウイルス遺伝子が発現する順序に基づいて表される。より詳細には、ウイルス遺伝子は、転写がDNA複製の開始前に起こるか、又は開始後に起こるかによって、初期(E)又は後期(L)遺伝子と呼ばれる。形質導入の初期には、アデノウイルスのE1A、E1B、E2A、E2B、E3及びE4遺伝子が発現して、宿主細胞にウイルス複製の準備をさせる。感染の後期には、ウイルス粒子の構造成分をコードする後期遺伝子L1~L5の発現が活性化される。

10

【0017】

アデノウイルスは種特異的であり、異なる血清型、すなわち、抗体によって交差中和されないウイルスの種類が、様々な哺乳動物種から分離されている。例えば、50種以上の血清型がヒトから分離されており、それらは配列相同性及びそれらの赤血球を凝集させる能力に基づいて6つのサブグループ(A~F; BはB1とB2に更に分類される)に分類される(Tatsis及びErtl Molecular Therapy (2004) 10:616-629)。多数のアデノウイルスが、ヒト以外のサル、例えば、チンパンジー、ボノボ、アカゲザル及びゴリラ等から分離されており、それらは、ヘキソン又はファイバー配列に基づく系統発生関係に基づいて、同じヒトグループに分類される(Collocaら、(2012) Science Translational Medicine 4:1-9; Royら、(2004) Virology 324: 361-372; Royら、(2010) Journal of Gene Medicine 13:17-25)。

20

30

【0018】

国際公開第2005071093号は、ChAd19をはじめとするチンパンジーアデノウイルスを開示する。国際公開第2016198621号(PCT/EP2016/063329)は、チンパンジーアデノウイルスChAd155を開示し、この文献は、ChAd155由来ベクターを規定する目的のために、参照により本明細書中に組み入れられる。

【0019】

ファイバータンパク質を含むアデノウイルスカプシドタンパク質及びこれらのタンパク質をコードするポリヌクレオチド

上記に概説されたように、アデノウイルスカプシドは、3つの主要なタンパク質、ヘキソン、ペントン及びファイバーを含む。ヘキソンは、カプシドの構造成分の大多数を占め、カプシドは240個の三量体ヘキソンカプソメア及び12個のペントンベースで構成される。ヘキソンは、3つの保存されたダブルバレル(double barrel)を有し、一方、その上端は3つのタワー(tower)を有し、それぞれのタワーはカプシドの大部分を形成するそれぞれのサブユニットからのループを含む。ヘキシソンの基部はアデノウイルス血清型の間で高度に保存されているが、一方、表面のループは可変である(Tatsis及びErtl Molecular Therapy (2004) 10:616-629)。

40

【0020】

ペントンは、ファイバーが付着する五量体のベースを形成するもう1つのアデノウイルスカプシドタンパク質である。三量体のファイバータンパク質は、カプシドの12個の頂点のそれぞれでペントンベースから突出しており、ノブのある棒状の構造である。他のほと

50

んどの正20面体ウイルスのそれと比較したアデノウイルスカプシドの表面の顕著な違いは、長く細いファイバータンパク質の存在である。ファイバータンパク質の主な役割は、その細胞受容体との相互作用を介して細胞表面にウイルスカプシドを係留することである。

【0021】

多くのアデノウイルス血清型のファイバータンパク質は、共通の構造、すなわち、N-末端のテール (tail)、反復配列で作られた中央のシャフト (shaft)、及びC-末端の球状のノブドメイン (又は「ヘッド (head) 」) を共有している。中央のシャフトドメインは、様々な数のβリピートから成る。βリピートは結び付いて、非常に固く安定した3本の撚り合わさったらせん状のストランド (strand) の伸長構造を形成する。シャフトは、N-末端のテールを球状のノブ構造とつなぎ、ノブ構造は標的細胞受容体との相互作用に関与する。アデノウイルスノブドメインの球状の性質は、側面及び先端方向に受容体を結合するための広い表面を与える。この構造の効果は、受容体結合部位をウイルスカプシドから遠く突出させることであり、その結果、比較的平坦なカプシド表面によって与えられる立体障害からウイルスを解放している。

10

【0022】

多くのアデノウイルス血清型のファイバーは同じ全体構造を有するが、それらは、それらの機能ならびに構造に影響を与える様々なアミノ酸配列を有する。例えば、ファイバーノブの表面上の多くの露出した領域は、容易に適応できる受容体結合部位を与える。ファイバーノブの球状の形は、受容体がノブの側面又はファイバーノブの上端に結合することを可能にする。これらの結合部位は通常、ヒトアデノウイルス間での保存性に乏しいβストランドにつながっている表面に露出したループにある。これらのループ上の露出した側鎖は、その三次構造及び四次構造を保ちながら、ノブに様々な表面特性を与える。例えば、ノブ表面での静電ポテンシャル及び電荷分布は、Ad 8、Ad 19、及びAd 37でのpI約9からサブグループBアデノウイルスでのpI約5まで、ファイバーのノブ配列における幅広い等電点によって変化し得る。構造的に複雑なウイルスリガンドとして、ファイバータンパク質は、ウイルスカプシドから多くの方向及び距離 (シャフト) で様々な結合表面 (ノブ) の提示を可能にする。

20

【0023】

いくつかの血清型の間で最も明らかな変異の1つは、ファイバーの長さである。研究によって、ファイバーのシャフトの長さは、ノブ及びウイルスのその標的受容体との相互作用に強い影響を及ぼすことが示された。更に、血清型の間でファイバータンパク質はまた、それらの折れ曲がる能力の点でも異なり得る。シャフトのβリピートは非常に安定で不変の構造を形成するが、電子顕微鏡 (EM) 観察は、ファイバー中に異なるヒンジ (hinge) を示した。いくつかのアデノウイルス血清型ファイバーからのタンパク質配列の解析は、N-末端のテールから3番目のβリピートでシャフトの反復配列中での中断を示し、これは、EMによって見られるような、シャフト中のヒンジの1つと強い相関がある。ファイバー中のヒンジはノブがウイルスカプシドに対して様々な方向をとることを可能にし、これは、ノブ上の受容体結合部位の的確な提示を必要としている受容体連結への立体障害を回避し得る。例えば、サブグループD Adの硬いファイバーは、それら自体が曲がることはできないため、ウイルス付着のために柔軟な受容体又は前に配置される部分 (one prepositioned) を必要とする (Nicklinら Molecular Therapy 2005 12:384-393)。

30

40

【0024】

異なるAd血清型に特異的な細胞受容体の同定及びそれらがどのように組織親和性に寄与するかの知見は、ファイバーの偽型化技術 (pseudotyping technology) の使用によって達成されている。いくつかのサブグループのAdは、一次受容体としてCARを使用するが、多くのAdは別の一次受容体を使用しており、in vitro及びin vivoにおいて大きく異なる親和性をもたらしていることが明らかになってきている。これらの血清型のファイバーは、ファイバーのノブ内の正味電荷の違いとともに、ファイバーシャフトの剛性、ファイバーシャフトの長さ、ならびにCAR結合部位及び/又は推定HSPG結合モチーフの欠如などの、一次構造ならびに三次構造における明らかな違いを示す。別のファイバーシャフト及び

50

ノブによるAd5粒子の偽型化は、その結果、重要な細胞結合ドメインを除去する機会を与え、加えて、Ad5によって達成されるそれと比較して、規定の細胞型へのより効率的（且つ、より細胞選択的な可能性のある）導入遺伝子送達を可能にし得る。使用されるファイバーがヒト又は実験モデルにおいて、より低い血清陽性率を有するAdに由来する場合、ファイバーを偽型化したAd粒子の中和もまた減少させることができ、これは、ベクターの投与の成功に都合のよい状況である（NicklinらMolecular Therapy (2005) 12:384-393）。更に、ヘキソン又はペントン単独ではなく、完全長のファイバーならびに単離されたファイバーのノブ領域は、樹状細胞の成熟を誘導することができ、強力なCD8+ T細胞応答の誘導と関連する（Molinier-FrenkelらJ. Biol. Chem. (2003) 278:37175-37182）。総合すると、アデノウイルスファイバーは、少なくともアデノウイルスベクターの受容体結合及び免疫原性において重要な役割を果たす。

10

【0025】

図1に示されるアラインメントは、グループCサルアデノウイルスのファイバータンパク質間の違いを図示している。顕著な特徴は、これらのアデノウイルスのファイバー配列が、ChAd157のように短いファイバーを持つもの、又はChAd155のように長いファイバーを持つものに大別され得ることである。この長さの違いは、長いファイバーに対して短いファイバーの約321の位置での36アミノ酸の欠失による。加えて、短いファイバーと長いファイバーサブグループとの間で異なり、更に各サブグループ内で一致している、多数のアミノ酸置換がある。これらの違いの正確な機能はまだ解明されていないが、ファイバーの機能及び免疫原性を考えると、それらは重要である可能性が高い。ウイルス親和性の決定要因の1つはファイバーシャフトの長さであることが示されている。より短いシャフトを有するAd5ベクターは、CAR受容体に対するより低い結合効率及びより低い感染性を有することが実証されている（Ambriovic-Ristov A.ら: Virology. (2003) 312(2):425-33）。この機能障害は、細胞受容体への効率の低い付着をもたらす、より短いファイバーの剛性の増加の結果であると推測されている（Wu, E.ら: J Virol. (2003) 77(13): 7225-7235）。

20

【0026】

本発明の1つの態様では、チンパンジーアデノウイルスChAd157の単離されたファイバーポリペプチド、及びチンパンジーアデノウイルスChAd157のファイバーポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

30

【0027】

ファイバータンパク質は、低い血清陽性率に寄与することが期待され、従って、既存の中和抗体に対するアデノウイルスの親和性を抑制するため、例えば、低い血清陽性率を有する組換えアデノウイルスを製造するために、ChAd157由来のヘキソン及びペントンポリペプチドとは独立して、又は（ヘキソン及びペントンのうちの一方または両方と）組み合わせて使用され得る。このような組換えアデノウイルスは、少なくともChAd157由来のファイバータンパク質を有する、異なる血清型由来のカプシドタンパク質を有するキメラアデノウイルスであり得る。

【0028】

ChAd157ファイバーポリペプチド配列は、配列番号1に示される。

40

ChAd157ペントンポリペプチド配列は、配列番号3に示される。

ChAd157ヘキソンポリペプチド配列は、配列番号5に示される。

【0029】

ChAd157ファイバー若しくはその機能的誘導体のポリペプチド配列を含むポリペプチド、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞

適切には、本発明の単離されたポリペプチド、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0030】

本発明のポリペプチド、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であるポリペプチドを含むことができ、そ

50

の機能的誘導体は、配列番号1のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有する。

あるいは、機能的誘導体は、配列番号1のアミノ酸配列と比較して1箇所の置換などの、配列番号1のアミノ酸配列と比較して1箇所以下の付加、欠失または置換を有する。

【0031】

適切には、本発明のポリペプチド、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞は、以下：

(a) 配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチド；若しくは

(b) 配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号3のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも60%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、

及び/又は

(a) 配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド；若しくは

(b) 配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号5のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも60%同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、

をさらに含む。

【0032】

適切には、配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体は、配列番号3のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも70%、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、例えば少なくとも95%又は少なくとも98%同一のアミノ酸配列を有する。

【0033】

適切には、配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体は、配列番号5のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも70%、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、例えば少なくとも95%又は少なくとも98%同一のアミノ酸配列を有する。

【0034】

特に、本発明のポリペプチド、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞は、以下：

(a) 配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

及び/又は

(b) 配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド

をさらに含む。

【0035】

ChAd157ファイバー若しくはその機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド、ベクター、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞

適切には、本発明の単離されたポリヌクレオチド、ベクター、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。適切には、そのポリヌクレオチドは、配列番号2の配列を有する。

【0036】

本発明の単離されたポリヌクレオチド、ベクター、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞が、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドを含む場合、その機能的誘導体は配列番号1のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも99.8%同一のアミノ酸配列を有し、適切には、ポリヌクレオチドは、配列番号2の配列を有し、このとき、1箇所のコドンが付加、欠失または変更されて、異なるアミノ酸をコードしている。

【0037】

適切には、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞は、以下：

(a) 配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチド；若しくは

(b) 配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列

10

20

30

40

50

番号 3 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 60 % 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体、
及び / 又は

(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ; 若しくは

(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体であって、配列番号 5 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 60 % 同一のアミノ酸配列を有する機能的誘導体をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

【 0 0 3 8 】

適切には、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体は、配列番号 3 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、特に少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 % 又は少なくとも 98 % 同一のアミノ酸配列を有する。

10

【 0 0 3 9 】

適切には、配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的誘導体は、配列番号 5 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、特に少なくとも 90 %、例えば少なくとも 95 % 又は少なくとも 98 % 同一のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 4 0 】

特に、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞は、以下 :

20

(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ;

及び / 又は

(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド

をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

【 0 0 4 1 】

本発明のポリヌクレオチド、ベクター、組換えアデノウイルス、組成物又は細胞は、以下 :

(a) 配列番号 4 のポリヌクレオチド ;

及び / 又は

(b) 配列番号 6 のポリヌクレオチド

をさらに含む。

30

【 0 0 4 2 】

ChAd157 骨格

本発明は、野生型、未改変の ChAd157 及び改変された ChAd157 の骨格構築物を含む、チンパンジーアデノウイルス ChAd157 の単離されたポリヌクレオチド配列を提供する。これらの改変された骨格構築物は、pChAd157 ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551 (配列番号 1 5) 及び ChAd157 ΔE1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana#1594 (配列番号 2 2) 等の、本明細書中で例示されたものを含む。ChAd157 骨格は、例えば導入遺伝子の送達のための複製能を有する又は複製能を有さない組換えアデノウイルスの構築に使用され得る。

40

【 0 0 4 3 】

pChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG (配列番号 1 7) の注釈は、以下に示される :

Annotations ChAd157DE1_TetOhCMV_GAG

IX 3187..3651
 IVa2 Complement (3710..5045,5325..5337)
 Pol Complement(4816..8397, 13762..13770)
 VA RNAI 10230..10391
 pTP Complement(8196..10199,13762..13770)
 48K 10652..11914
 pIIIIa 11938..13714
 III 13807..15588
 pVII 15603..16199
 V 16275..17390
 pX 17415..17660
 pVI 17750..18508
 Hexon 18623..21499
 Protease 21529..22158
 DBP Complement(22274..23926)
 92K 23976..26447
 22K 26164..26739
 33K Join(26164..26473,26679..27061)
 E2e promoter Complement(27027..27274)
 pVIII 27136..27819
 E3 12K 27820..28137
 E3 CR1-alphap0 28635..28835
 E3 gp18K 28838..29329

10

E3A 11K 30776..31072
 E3 RID alpha 31084..31356
 E3 RID beta 31359..31757
 E3 15K 31750..32136
 U exon Complement(32167..32331)
 fibre 32342..33973
 E4 ORF6/7 Complement(34181..34456,35168..35341)
 E4 ORF6 Complement(34457..35341)
 E4 ORF4 Complement(35241..35606)
 E4 ORF3 Complement(35622..35969)
 E4 ORF2 Complement(35966..36358)
 E4 ORF1 Complement(36411..36797)

20

【 0 0 4 4 】

30

1つの実施形態では、配列番号15、22の配列の断片及びそれらの相補鎖、それらに相補的なcDNA及びRNAが提供される。適切には、断片は、少なくとも15ヌクレオチドの長さ、より適切には30ヌクレオチドの長さ、より適切には60ヌクレオチドの長さ、より適切には120ヌクレオチドの長さ、より適切には240ヌクレオチドの長さ、より適切には480ヌクレオチドの長さであり、機能的断片、すなわち、生物学的な目的のある断片を含む。例えば、機能的断片は、所望のアデノウイルス産物を発現することができる、又は組換えウイルスベクターの作製に有用であり得る。このような断片は、上記の遺伝子配列を含む。特定の実施形態では、配列番号15、22の単離された配列及びそれらの相補鎖、それらに相補的なcDNA及びRNAが提供される。

【 0 0 4 5 】

40

本明細書に記載されるアデノウイルス核酸、及び上記のそれらの断片によってコードされる、タンパク質、酵素、及びその断片などのChAd157アデノウイルスの遺伝子産物が提供される。これらのタンパク質は、上記で特定されたオープンリーディングフレームによってコードされるもの、及び配列表に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含む。

【 0 0 4 6 】

更なるChAd157ポリヌクレオチド及びポリペプチド

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のファイバーポリペプチド；ヘキソンポリペプチド及びファイバーポリペプチド；ペントンポリペプチド及びファイバーポリペプチド；又はヘキソンポリペプチド、ペントンポリペプチド及びファイバ

50

ーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み；更なるアデノウイルスポリヌクレオチド、適切にはChAd157ポリヌクレオチドをさらに含み得る。従って、適切には、本発明のポリヌクレオチドは、以下：

(a)アデノウイルス5'-逆方向末端反復（ITR）；

(b)アデノウイルスE1A領域、又はE1A_280R及びE1A_243R領域から選択されるその断片；

(c)アデノウイルスE1B若しくはIX領域、又はE1B_19K、E1B_55K及びIX領域からなる群より選択されるその断片；

(d)アデノウイルスE2B領域；又はE2B_pTP、E2B_ポリメラーゼ及びE2B_IVa2領域からなる群より選択されるその断片；

(e)アデノウイルスL1領域、又はL1_13.6K、L1_52K及びL1_pIIIaタンパク質からなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(f)アデノウイルスL2領域若しくは本発明のペントントンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むL2領域、又はL2_ペントントンパク質、L2_pVIIタンパク質、L2_Vタンパク質、及びL2_pXタンパク質からなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(g)アデノウイルスL3領域若しくは本発明のヘキソントンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むL3領域、又はL3_pVIタンパク質、L3_ヘキソントンパク質及びL3_プロテアーゼタンパク質からなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(h)アデノウイルスE2A領域；

(i)アデノウイルスL4領域、又はL4_100kタンパク質、L4_33Kタンパク質、L4_22Kタンパク質及びタンパク質L4_VIIIからなる群より選択されるアデノウイルスタンパク質をコードするその断片；

(j)アデノウイルスE3領域、又はE3 ORF1、E3 ORF2、E3 ORF3、E3 ORF4、E3 ORF5、E3 ORF6、E3 ORF7、E3 ORF8、及びE3 ORF9からなる群より選択されるその断片；

(k)アデノウイルスL5領域、又は本発明のL5_ファイバーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むL5領域；

(l)アデノウイルス（例えばAd5等）E4領域、又はE4 ORF7、E4 ORF6、E4 ORF4、E4 ORF3、E4 ORF2、及びE4 ORF1からなる群より選択されるその断片；特に前記E4領域のORF6；

(m)アデノウイルス3'-ITR；ならびに／あるいは

(n)アデノウイルスVAI又はVAII RNA領域、好ましくはChAd157以外のアデノウイルス由来、より好ましくはAd5由来のアデノウイルスVAI又はVAII RNA領域の1種以上を含む。

【0047】

定義

適切には、本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチドは単離されている。「単離された」ポリヌクレオチドとは、その本来の環境から取り出されたものである。例えば、天然のポリヌクレオチドは、それが天然の系において共存する物質の一部又はすべてから分離された場合、単離されている。ポリヌクレオチドは、例えば、それが天然の環境の一部ではないベクターにクローニングされた場合、またはそれがcDNA中に含まれる場合、単離されていると見なされる。

【0048】

適切には、本発明のポリヌクレオチドは組換え体である。組換え体とは、ポリヌクレオチドが、クローニング、制限酵素切断（restriction）若しくはライゲーションステップ、又は自然界において見出されるポリヌクレオチドとは異なるポリヌクレオチドをもたらし他の方法の少なくとも1つの生成物であることを意味する。組換えアデノウイルスは、組換えポリヌクレオチドを含むアデノウイルスである。組換えベクターは、組換えポリヌクレオチドを含むベクターである。「組換えウイルス」は、元の組換えウイルスの子孫を含む。「組換えベクター」は、元の組換えベクターの複製物を含む。「組換えポリヌクレ

オチド」は、元の組換えポリヌクレオチドの複製物を含む。

【0049】

適切には、本発明のポリペプチド配列は、天然配列に対して少なくとも1つの変更を含む。適切には、本発明のポリヌクレオチド配列は、天然配列に対して少なくとも1つの変更を含む。例えば、遺伝子工学技術によって異なる種（及びしばしば異なる属、亜科又は科）由来のプラスミドまたはベクター内に導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである。その天然のコード配列から取り出され、天然では連結することが見出されないコード配列と機能的に連結しているプロモーターは、異種プロモーターである。ウイルス又はウイルスベクターのゲノム内にクロニングされており、ウイルスのゲノムが天然にはそれを含まない特異的な組換え部位は、異種組換え部位である。異種核酸配列はまた、アデノウイルスゲノムにおいて天然に見出される配列を含むが、アデノウイルスベクターの中で非天然の位置に配置される。

10

【0050】

通常、「異種の」とは、比較されている他の存在物と遺伝子型で識別可能な存在物に由来することを意味する。異種核酸配列とは、アデノウイルスベクターの天然に存在する核酸配列から単離されていない、それに由来しない、又はそれに基づかない任意の核酸配列を指す。異種タンパク質配列とは、アデノウイルスベクターの天然に存在するタンパク質配列から単離されていない、それに由来しない、又はそれに基づかない任意のタンパク質配列を指す。「天然に存在する」とは、天然に見出される、合成によって作られていない、又は改変されていない配列を意味する。配列は、ある起源から単離されるが、適切には起源遺伝子の正常な機能を破壊しないように、（例えば、欠失、置換（突然変異）、挿入、又は他の変更によって）改変されている場合、起源に「由来」する。

20

【0051】

ポリペプチドの「機能的誘導体」とは、適切には、ポリペプチドの改変型を指し、例えば、ポリペプチドの1以上のアミノ酸が、欠失、挿入、改変及び/又は置換され得る。未改変のアデノウイルスカプシドタンパク質の誘導体は、例えば以下の場合：

(a) そのカプシド内に誘導体カプシドタンパク質を有するアデノウイルスが、未改変のカプシドタンパク質を有するアデノウイルスと比較して、実質的に同じ若しくはより低い血清陽性率を保持する場合、及び/又は

(b) そのカプシド内に誘導体カプシドタンパク質を有するアデノウイルスが、未改変のカプシドタンパク質を有するアデノウイルスと比較して、実質的に同じ若しくはより高い宿主細胞感染性を保持する場合、及び/又は

30

(c) そのカプシド内に誘導体カプシドタンパク質を有するアデノウイルスが、未改変のカプシドタンパク質を有するアデノウイルスと比較して、実質的に同じ若しくはより高い免疫原性を保持する場合、及び/又は

(d) そのカプシド内に誘導体カプシドタンパク質を有するアデノウイルスが、未改変のカプシドタンパク質を有するアデノウイルスと比較して、実質的に同じ若しくはより高いレベルの導入遺伝子生産性を保持する場合、機能的であると考えられる。

【0052】

上記の特性(a)～(d)は、適切には、下記の実施例の項に記載される方法を用いて測定され得る。

40

【0053】

適切には、ポリペプチド、ベクター又は組換えアデノウイルスは、ヒト集団において低い血清陽性率を有する。「低い血清陽性率」とは、ヒトアデノウイルス5型(Ad5)と比較して低い既存の中和抗体レベルを有することを意味し得る。同様に、又は、その代わりに、「低い血清陽性率」とは、約20%より低い血清陽性率、約15%より低い血清陽性率、約10%より低い血清陽性率、約5%より低い血清陽性率、約4%より低い血清陽性率、約3%より低い血清陽性率、約2%より低い血清陽性率、約1%より低い血清陽性率又は検出不可能な血清陽性率を意味し得る。血清陽性率は、Aste-Amezagaら、Hum. Gene Ther. (2004)

50

15(3):293-304に記載されるような方法を用いて、臨床的に意義のある中和力価を有する個体のパーセンテージ（50%中和力価>200と定義される）として測定され得る。

ポリペプチド、ペプチド及びタンパク質という用語は、本明細書において同じ意味で使用される。

【0054】

「サル」という用語は、一般的に非ヒト霊長類、例えば、旧世界ザル、新世界ザル、類人猿及びテナガザルを含むことを意味する。詳細には、サルは、チンパンジー（*Pan troglodyte*）、ボノボ（*Pan paniscus*）及びゴリラ（*Gorilla*属）などの非ヒト類人猿を指し得る。類人猿以外のサルは、アカゲザル（*Macaca mulatta*）を含み得る。

【0055】

配列比較

2つの近縁のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の比較のために、第一配列と第二配列との間の「%同一性」が、標準設定を用いたBLAST（登録商標）（blast.ncbi.nlm.nih.gov）で利用可能、最終アクセス2015年3月9日）などのアラインメントプログラムを用いて計算され得る。%同一性は、一致した残基数を参照配列の残基数で割って100を掛けたものである。上記及び特許請求の範囲に示される%同一性の数字は、この方法によって計算されたパーセンテージである。%同一性の別の定義は、一致した残基数をアラインメントされた残基数で割って100を掛けたものである。別法には、アラインメント中のギャップ、例えば他方の配列に対する一方の配列での欠失が、スコアリングパラメーター（scoring parameter）中のギャップスコア又はギャップコストで説明されるギャップ法（gapped method）の使用が含まれる。更なる情報については、ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_BLASTGuide.pdfで入手可能なBLAST（登録商標）ファクトシート、最終アクセス2015年3月9日を参照されたい。

【0056】

ポリヌクレオチド又はそれによってコードされるポリペプチドの機能性を保持する配列は、より厳密に一致している可能性が高い。ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、それらがその全長にわたって100%配列同一性を共有する場合、他のポリペプチド又はポリヌクレオチド配列と同一若しくは一致していると言われる。

【0057】

配列間の「違い」とは、第一配列と比較した、第二配列のある位置での単一アミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を指す。2つのポリペプチド配列は、1つ、2つ又はより多くのこのようなアミノ酸の違いを含み得る。その他の点では第一配列と同一（100%配列同一性）である第二配列中の挿入、欠失又は置換は、配列同一性のパーセントの減少をもたらす。例えば、同一配列が9アミノ酸残基の長さである場合、第二配列中の1つの置換は、88.9%の配列同一性をもたらす。同一配列が17アミノ酸残基の長さである場合、第二配列中の2つの置換は、88.2%の配列同一性をもたらす。同一配列が7アミノ酸残基の長さである場合、第二配列中の3つの置換は、57.1%の配列同一性をもたらす。第一及び第二ポリペプチド配列が9アミノ酸残基の長さで6個の同一残基を共有する場合、第一及び第二ポリペプチド配列は66%を超える同一性を共有する（第一及び第二ポリペプチド配列は、66.7%の同一性を共有する）。第一及び第二ポリペプチド配列が17アミノ酸残基の長さで16個の同一残基を共有する場合、第一及び第二ポリペプチド配列は94%を超える同一性を共有する（第一及び第二ポリペプチド配列は、94.1%の同一性を共有する）。第一及び第二ポリペプチド配列が7アミノ酸残基の長さで3個の同一残基を共有する場合、第一及び第二ポリペプチド配列は42%を超える同一性を共有する（第一及び第二ポリペプチド配列は、42.9%の同一性を共有する）。

【0058】

別法として、第一の参照ポリペプチド配列を第二の比較ポリペプチド配列と比較する目的で、第二配列を生じるために第一配列に引き起こされる付加、置換及び/又は欠失の数が確認され得る。付加とは、第一ポリペプチドの配列内への1つのアミノ酸残基の付加である（第一ポリペプチドのどちらかの末端での付加を含む）。置換とは、第一ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドの配列における1つのアミノ酸残基の1つの異なるアミノ酸残基での置換である。欠失とは、第一ポリペプチドの配列からの1つのアミノ酸残基の欠失である（第一ポリペプチドのどちらかの末端での欠失を含む）。

【0059】

第一の参照ポリヌクレオチド配列を第二の比較ポリヌクレオチド配列と比較する目的で、第二配列を生じるために第一配列に引き起こされる付加、置換及び/又は欠失の数が確認され得る。付加とは、第一ポリヌクレオチドの配列内への1つのヌクレオチド残基の付加である（第一ポリヌクレオチドのどちらかの末端での付加を含む）。置換とは、第一ポリヌクレオチドの配列における1つのヌクレオチド残基の1つの異なるヌクレオチド残基での置換である。欠失とは、第一ポリヌクレオチドの配列からの1つのヌクレオチド残基の欠失である（第一ポリヌクレオチドのどちらかの末端での欠失を含む）。

10

【0060】

適切には、本発明の配列中の置換は保存的置換であり得る。保存的置換は、置換されるアミノ酸と類似した化学的特性を有する別のアミノ酸によるアミノ酸の置換を含む（例えば、Stryerら、Biochemistry, 第5版2002, 44~49ページ参照）。好ましくは、保存的置換は、以下：(i) 別の異なる塩基性アミノ酸による塩基性アミノ酸の置換；(ii) 別の異なる酸性アミノ酸による酸性アミノ酸の置換；(iii) 別の異なる芳香族アミノ酸による芳香族アミノ酸の置換；(iv) 別の異なる非極性脂肪族アミノ酸による非極性脂肪族アミノ酸の置換；及び(v) 別の異なる極性無電荷アミノ酸による極性無電荷アミノ酸の置換、からなる群より選択される置換である。塩基性アミノ酸は、好ましくは、アルギニン、ヒスチジン、及びリジンからなる群より選択される。酸性アミノ酸は、好ましくは、アスパラギン酸又はグルタミン酸である。芳香族アミノ酸は、好ましくは、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンからなる群より選択される。非極性脂肪族アミノ酸は、好ましくは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、メチオニン及びイソロイシンからなる群より選択される。極性無電荷アミノ酸は、好ましくは、セリン、トレオニン、システイン、プロリン、アスパラギン及びグルタミンからなる群より選択される。保存的アミノ酸置換とは対照的に、非保存的アミノ酸置換は、上記の保存的置換(i)から(v)に該当しない任意のアミノ酸による1つのアミノ酸の交換である。

20

【0061】

ベクター及び組換えアデノウイルス

30

本発明のChAd157配列は、治療薬として、ならびに様々なベクター系、組換えアデノウイルス及び宿主細胞の構築に有用である。適切には、「ベクター」という用語は、野生型配列と比較して実質的に改変されている（例えば、遺伝子若しくは機能性領域が欠失及び/若しくは不活性化されている）、ならびに/あるいは、異種配列、すなわち、異なる起源から得られた核酸（「インサート」とも呼ばれる）を組み込み、細胞（例えば宿主細胞）に導入された際、挿入されたポリヌクレオチド配列を複製及び/又は発現する核酸を指す。例えば、インサートは本明細書に記載されるChAd157配列の全部又は一部であり得る。加えて、あるいは別法としては、ChAd157ベクターは、ウイルス遺伝子、例えばE1又は本明細書に記載される他のウイルス遺伝子若しくは機能性領域などの1以上の欠失又は不活性化を有するChAd157アデノウイルスであり得る。このようなChAd157は、異種配列を含んでも、含まなくてもよいが、しばしば「骨格」と呼ばれ、そのまま、又はベクターの更なる改変の開始点として使用され得る。

40

【0062】

ベクターは、裸のDNA、プラスミド、ウイルス、コスミド、ラムダベクターなどのファージベクター、BAC（細菌人工染色体）などの人工染色体、又はエピソームを含む任意の適切な核酸分子であり得る。あるいは、ベクターは、T7に適合した系（T7-compatible system）のような無細胞in vitro転写若しくは発現のための転写及び/又は発現ユニットであり得る。ベクターは、単独で、又は他のアデノウイルス配列若しくは断片と組み合わせ、又は非アデノウイルス配列由来の因子と組み合わせ使用され得る。ChAd157配列はまた、アンチセンス送達ベクター、遺伝子治療ベクター、またはワクチンベクターにおい

50

ても有用である。従って、ChAd157配列を含む遺伝子送達ベクター、及び宿主細胞が、更に提供される。

【 0 0 6 3 】

「複製能を有する」アデノウイルスという用語は、細胞中に含まれるいかなる組換えヘルパタンパク質もなしに、宿主細胞中で複製できるアデノウイルスを指す。適切には、「複製能を有する」アデノウイルスは、以下の完全な又は機能的な必須の初期遺伝子：E1A、E1B、E2A、E2B、E3及びE4を含む。特定の動物から分離された野生型のアデノウイルスは、その動物において複製能を有する。

【 0 0 6 4 】

「複製能を有さない」あるいは「複製欠損の」アデノウイルスという用語は、少なくとも機能的欠失（又は「機能喪失」突然変異）、すなわちそれを完全に除去することなく遺伝子の機能を損なう欠失又は突然変異、例えば人為的な終止コドンの導入、活性部位若しくは相互作用ドメインの欠失若しくは突然変異、遺伝子の調節配列等の突然変異若しくは欠失、又は、ウイルス複製に必須な遺伝子産物をコードする遺伝子、例えばE1A、E1B、E2A、E2B、E3及びE4より選択される１種以上のアデノウイルス遺伝子（例えばE3 ORF1、E3 ORF2、E3 ORF3、E3 ORF4、E3 ORF5、E3 ORF6、E3 ORF7、E3 ORF8、E3 ORF9、E4 ORF7、E4 ORF6、E4 ORF4、E4 ORF3、E4 ORF2及び／若しくはE4 ORF1）などの完全除去、を有するように操作されているために、複製する能力がないアデノウイルスを指す。特に適切には、E1ならびに任意選択でE3及び／又はE4が欠失している。欠失している場合、上記の欠失遺伝子領域は、別の配列に対する％同一性を決定する際、適切にはアラインメントでは考慮されない。

【 0 0 6 5 】

本発明は、治療又はワクチンの目的のいずれかで、タンパク質、適切には異種タンパク質を細胞に送達するベクター、例えば組換えアデノウイルス等を提供する。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、又はウイルスなどの任意の遺伝因子を含み得る。このようなベクターは、本明細書に開示されるようなChAd157のDNA及びミニ遺伝子(minigene)を含む。「ミニ遺伝子」(又は「発現カセット」)とは、選択された異種遺伝子(導入遺伝子)ならびに宿主細胞において遺伝子産物の翻訳、転写及び/又は発現を行うために必要な他の調節因子の組合せを意味する。

【 0 0 6 6 】

通常、ChAd157由来のアデノウイルスベクターは、ミニ遺伝子が、選択されたアデノウイルス遺伝子本来の領域に他のアデノウイルス配列を含む核酸分子中に位置するように設計される。ミニ遺伝子は、既存遺伝子領域内に挿入されて、必要であれば、その領域の機能を破壊し得る。あるいは、ミニ遺伝子は、部分的に又は完全に欠失しているアデノウイルス遺伝子の部位に挿入され得る。例えば、ミニ遺伝子は、E1A、E1B、E2A、E2B、E3及びE4からなる群より選択されるゲノム領域の少なくとも1種の遺伝子の機能を失わせる突然変異、挿入又は欠失の部位に位置し得る。「機能を失わせる」という用語は、遺伝子領域がもはや機能的な遺伝子発現の産物を産生できないように、十分な量の遺伝子領域が除去される、又は他の方法で破壊されることを意味する。必要であれば、遺伝子領域全体が除去され得る（そして適切にはミニ遺伝子で置換される）。

【 0 0 6 7 】

例えば、組換えウイルスの生成に有用なベクターの作製のために、ベクターは、ミニ遺伝子、ならびにアデノウイルスゲノムの5'末端若しくはアデノウイルスゲノムの3'末端、又はアデノウイルスゲノムの5'末端及び3'末端の両方を含み得る。アデノウイルスゲノムの5'末端は、パッケージングならびに複製に必要な5'シス因子；すなわち、（複製の起点として機能する）5' ITR配列、並びに（直鎖状のAdゲノムのパッケージングに必要な配列及びE1プロモーターのエンハンサー因子を含む）天然の5'パッケージングエンハンサードメインを含む。アデノウイルスゲノムの3'末端は、パッケージング及びカプシド形成に必要な3'シス因子（ITRなど）を含む。適切には、組換えアデノウイルスは5'及び3'アデノウイルスシス因子の両方を含み、ミニ遺伝子（適切には導入遺伝子を含んでいる）は5'及

び3'アデノウイルス配列の間に位置する。ChAd157に基づくアデノウイルスベクターはまた、更なるアデノウイルス配列をも含み得る。

【0068】

適切には、ChAd157に基づくベクターは、本発明のアデノウイルスChAd157ゲノムに由来する1種以上のアデノウイルス因子を含む。1つの実施形態では、ベクターは、ChAd157由来のアデノウイルスITR、及び同じアデノウイルス血清型由来の更なるアデノウイルス配列を含む。別の実施形態では、ベクターは、ITRを供給するものとは異なるアデノウイルス血清型に由来するアデノウイルス配列を含む。

【0069】

本明細書において定義される場合、偽型 (pseudotyped) アデノウイルスとは、アデノウイルスのカプシドタンパク質が、ITRを供給するアデノウイルスとは異なるアデノウイルスに由来するアデノウイルスを指す。

10

【0070】

更に、本明細書に記載されるアデノウイルスを用い、当業者にとって既知の技術 (例えば、US 7,291,498) を用いて、キメラ又はハイブリッドアデノウイルスが構築され得る。

【0071】

本発明のベクター中に存在するITR及び他の任意のアデノウイルス配列は、多くの供給先から得られ得る。様々なアデノウイルス株が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection)、Manassas, Virginiaから入手可能であり、又は要求に応じて様々な商業的及び公共的供給先から入手可能である。更に、多くのこのような株の配列は、例えばPubMed及びGenBankなどの様々なデータベースから利用可能である。他のチンパンジー又はヒトアデノウイルスから作製された相同のアデノウイルスベクターは、既刊文献 (例えば、US 5,240,846) に記載されている。Ad5型 (GenBank受入番号M73370) など、多くのアデノウイルス型のDNA配列はGenBankから利用可能である。アデノウイルス配列は、例えば血清型2、3、4、7、12及び40など、更に任意の現在同定されているヒト型などの、任意の既知のアデノウイルス血清型から得ることができる。同様に、ヒト以外の動物 (例えば、サル) に感染することが知られているアデノウイルスもまた、本発明のベクター構築物に使用され得る (例えば、US 6,083,716)。ウイルス配列、ヘルパーウイルス (必要であれば)、及び組換えウイルス粒子、ならびに本明細書に記載されるベクターの構築に使用される他のベクター成分及び配列は、以下に記載されるように得ることができる。

20

30

【0072】

配列、ベクター及びアデノウイルスの作製

本発明の配列は、組換えによる作製、化学合成、または他の合成方法を含む任意の適切な方法によって作製され得る。適切な作製技術は、当業者によく知られている。別法として、ペプチドもまた周知の固相ペプチド合成法によって合成され得る。

【0073】

アデノウイルスプラスミド (又は他のベクター) は、アデノウイルスベクターを作製するために使用され得る。1つの実施形態では、アデノウイルスベクターは、複製能を有さないアデノウイルス粒子である。1つの実施形態では、アデノウイルス粒子は、E1A及び/又はE1B遺伝子中の、特にE1A及びE1B中の欠失によって複製不能にされている。別法では、アデノウイルスは、任意選択でE1A及び/又はE1B遺伝子を保持しながら、別の手段によって複製不能にされている。同様に、いくつかの実施形態では、ベクターに対する免疫応答の減少は、E2B及び/又はDNAポリメラーゼ遺伝子中の欠失によって達成され得る。アデノウイルスベクターはまた、アデノウイルスゲノムへの他の突然変異、例えば、他の遺伝子中の温度感受性変異又は欠失を含み得る。他の実施形態では、アデノウイルスベクター中に完全なE1A及び/又はE1B領域を保持することが望ましい。このような完全なE1領域は、アデノウイルスゲノム中のその本来の位置にあってもよく、又は天然のアデノウイルスゲノム中の欠失部位 (例えば、E3領域中) に置かれてもよい。

40

【0074】

50

哺乳動物（例えばヒト等）の細胞に遺伝子を送達するためのアデノウイルスベクターの構築では、様々な改変アデノウイルス核酸配列がベクター内で使用され得る。例えば、アデノウイルス遅延初期遺伝子（delayed early gene）E3の全部又は一部は、組換えウイルスの一部を形成するアデノウイルス配列から除去され得る。E3の機能は、組換えウイルス粒子の機能及び生産に重要ではないと考えられている。E4遺伝子の少なくともORF6領域の欠失、より望ましくは、この領域の機能の余剰性のため、E4領域全体の欠失を有するアデノウイルスベクターもまた構築され得る。本発明の更に別のベクターは、遅延初期遺伝子E2Aに欠失を含む。欠失はまた、アデノウイルスゲノムの任意の後期遺伝子L1～L5にも作られ得る。同様に、中間遺伝子（intermediate gene）IX及びIVa2中の欠失は、いくつかの目的のために有用であり得る。他の欠失は、他のアデノウイルス構造遺伝子又は非構造遺伝子に作られ得る。上記で議論された欠失は個別に使用され得る。すなわち、本明細書に記述されるような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み得る。あるいは、それらの生物学的活性を破壊するのに有効な遺伝子全体又はその一部の欠失は、任意の組合せで使用され得る。例えば、1つの例示的なベクターでは、アデノウイルス配列は、E3の欠失の有無にかかわらず、E1遺伝子及びE4遺伝子の欠失、又はE1、E2A及びE3遺伝子の欠失、又はE1及びE3遺伝子の欠失、又はE1、E2A及びE4遺伝子の欠失などを有し得る。任意の1種以上のE遺伝子は、アデノウイルスの異なる株から供給されるE遺伝子（又は1種以上のE遺伝子オープンリーディングフレーム）と適切に置換され得る。特に適切には、ChAd157 E1及びE3遺伝子は欠失しており、ChAd157 E4遺伝子はE4Ad5orf6に置換される。上記で議論されたように、このような欠失及び/又は置換は、望ましい結果を得るために、温度感受性変異のような他の突然変異と組み合わせて使用され得る。

10

20

【0075】

1種以上の必須アデノウイルス配列（例えば、E1A、E1B、E2A、E2B、E4 ORF6、L1、L2、L3、L4及びL5）を欠くアデノウイルスベクターは、ウイルスの感染性及びアデノウイルス粒子の増殖に必要とされる、欠けているアデノウイルス遺伝子産物の存在下で培養され得る。これらのヘルパー機能は、アデノウイルスベクターを、1種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）又はパッケージング宿主細胞の存在下で培養することによって提供され得る。

【0076】

複製能を有さないベクターの補完

上述の任意の遺伝子に欠失のある組換えアデノウイルスを産生するために、欠失遺伝子領域の機能は、ウイルスの複製及び感染性に必須ならば、ヘルパーウイルス又は細胞株、すなわち、補完若しくはパッケージング細胞株によって組換えウイルスに供給されなければならない。

30

【0077】

ヘルパーウイルス

ミニ遺伝子を運ぶために使用されるウイルスベクターのアデノウイルス遺伝子の内容に応じて、ミニ遺伝子を含む感染性組換えウイルス粒子の産生に必要な十分なアデノウイルス遺伝子配列を供給するために、ヘルパーアデノウイルス又は複製しないウイルス断片が使用され得る。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中に存在せず、及び/又は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って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む。1つの実施形態では、ヘルパーウイルスは複製欠損であり、適切には本明細書に記載される1以上の配列に加えてアデノウイルス遺伝子を含む。このようなヘルパーウイルスは、適切にはE1を発現している（及び、任意選択で、更にE3を発現している）細胞株とともに使用される。

40

【0078】

ヘルパーウイルスは、任意選択でリポーター遺伝子を含み得る。多くのこのようなりポーター遺伝子は、当技術分野で知られており、また本明細書に記載されている。アデノウイルスベクター上の導入遺伝子とは異なる、ヘルパーウイルス上のリポーター遺伝子の存在は、アデノウイルスベクターとヘルパーウイルスとの両方を別々に観測することを可能

50

にする。このリポーターは、精製時に、結果として生じる組換えウイルスとヘルパーウイルスとの分離を可能にするために使用される。

【0079】

補完細胞株

多くの状況において、ウイルスの複製及び感染性に必須な1種以上の欠けている遺伝子、例えばヒトE1など、を発現している細胞株は、チンパンジーアデノウイルスベクターをトランス補完(transcomplement)するために使用され得る。本発明のチンパンジーアデノウイルス配列と現在入手可能なパッケージング細胞に見られるヒトアデノウイルス配列との間の多様性のため、現在のヒトE1含有細胞の使用は、複製及び産生過程の際に複製能を有するアデノウイルスの生成を妨げるので、これは特に有益である。

10

【0080】

あるいは、必要であれば、選択された親細胞株での発現のためのプロモーターの転写制御下で、少なくともChAd157由来のE1遺伝子又は別のアデノウイルス由来のE1遺伝子(例えば、hAd5 E1などのヒトアデノウイルス、または別のChAd E1)を発現するパッケージング細胞または細胞株を作製するために、本明細書において提供される配列を利用し得る。この目的のために、誘導性プロモーター又は構成的プロモーターが使用され得る。このようなプロモーターの例は、本明細書の他の部分に詳細に記載されている。親細胞は、任意の所望のChAd157遺伝子を発現する新規細胞株の作製のために選択される。限定はされないが、このような親細胞株は、数ある中でも、HeLa [ATCC寄託番号CCL 2]、A549 [ATCC寄託番号CCL 185]、HEK 293、KB [CCL 17]、Detroit [例えば、Detroit 510, CCL 72]及びWI-38 [CCL 75]細胞であり得る。これらの細胞株はすべて、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209から入手可能である。

20

【0081】

このようなE1発現細胞株は、組換えアデノウイルスE1欠失ベクターの作製に有用である。加えて、又は別法として、1種以上のアデノウイルス遺伝子産物、例えば、E1A、E1B、E2A、E3及び/若しくはE4を発現する細胞株は、組換えウイルスベクターの作製に使用されるものと基本的に同じ方法を用いて構築され得る。このような細胞株は、それらの産物をコードする必須遺伝子に欠失のあるアデノウイルスベクターをトランス補完する(transcomplement)ために、又はヘルパー依存性ウイルス(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ために利用され得る。宿主細胞の調製は、選択されたDNA配列の組み立て(Assembly)などの技術を含む。

30

【0082】

別の可能性では、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及び/又はヘルパーウイルスによってトランスで(in trans)供給される。このような例では、適切な宿主細胞は、原核細胞(例えば、細菌細胞)、ならびに昆虫細胞、酵母細胞、及び哺乳動物細胞などの真核細胞を含む、任意の生物有機体から選択され得る。

【0083】

宿主細胞は、A549、WEHI、3T3、1011/2、HEK 293細胞又はPer.C6(両方とも機能的なアデノウイルスE1を発現する)[Fallaux, FJら、(1998), Hum Gene Ther, 9:1909-1917]、S aos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2、ならびにヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、及びハムスターなどの哺乳動物由来の初代線維芽細胞、肝細胞及び筋芽細胞を含むが、それらに限定されない任意の哺乳動物種の細胞から選択され得る。

40

【0084】

特に適切な補完細胞株はProcell92細胞株である。Procell92細胞株は、アデノウイルスE1遺伝子を発現するHEK 293細胞を基にして、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーターの制御下にあるTetリプレッサー、及びG418-耐性遺伝子でトランスフェクトされている(VitelliらPLOS One (2013) 8(e55435):1-9)。Procell92.Sは、懸濁条件下での増殖に適しており、毒性タンパク質を発現するアデノウイルスベクターの産生に有用である(www.okairos.com/e/inner.php?m=00084, 最終アクセス2015年4月13日)。

50

【 0 0 8 5 】

ウイルス粒子の組み立て (Assembly) 及び細胞株のトランスフェクション

通常、ミニ遺伝子を含むベクターをトランスフェクションによって送達する場合、ベクターは、約 1×10^4 細胞 ~ 約 1×10^{13} 細胞、好ましくは約 10^5 細胞に対して、約 $5 \mu\text{g}$ ~ 約 $100 \mu\text{g}$ DNA、好ましくは約 $10 \mu\text{g}$ ~ 約 $50 \mu\text{g}$ DNAの量で送達される。しかし、宿主細胞に対するベクターDNAの相対量は、選択したベクター、送達方法及び選択した宿主細胞などの要因を考慮して調整され得る。

【 0 0 8 6 】

宿主細胞へのベクターの導入は、トランスフェクション及び感染を含む当技術分野において既知の任意の方法によって達成され得る。1以上のアデノウイルス遺伝子は、宿主細胞のゲノム内に安定に組み込まれてもよく、エピソームとして安定に発現されてもよく、又は一過性に発現されてもよい。遺伝子産物はすべて、一過性にエピソーム上で若しくは安定に組み込まれて発現されてもよく、又は、遺伝子産物の一部は安定に発現され、他の遺伝子産物は一過性に発現されてもよい。

10

【 0 0 8 7 】

ベクターの宿主細胞への導入はまた、当業者にとって既知の技術を用いて達成され得る。適切には、標準的なトランスフェクション技術、例えば、CaPCトランスフェクション又はエレクトロポレーションが用いられる。

【 0 0 8 8 】

様々な中間プラスミド内への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及び他のベクター因子）の組み立て (Assembly)、ならびに組換えウイルス粒子を産生するためのプラスミド及びベクターの使用はすべて、従来の技術を用いて達成される。このような技術は、cDNAの従来のクローニング技術、アデノウイルスゲノムの重複オリゴヌクレオチド配列の使用、ポリメラーゼ連鎖反応、及び所望のヌクレオチド配列を提供する任意の適切な方法を含む。標準的なトランスフェクション及び共トランスフェクション技術、例えば、CaPC沈殿法が用いられる。使用される他の従来法は、ウイルスゲノムの相同組換え、寒天重層中のウイルスのブラック形成、シグナル発現を測定する方法などを含む。

20

【 0 0 8 9 】

例えば、望ましいミニ遺伝子含有ウイルスベクターの構築及び組み立て (Assembly) の後に、ベクターはヘルパーウイルスの存在下でパッケージング細胞株内にin vitroでトランスフェクトされる。ヘルパー配列とベクター配列との間で相同組換えが起こり、それは、ベクター内のアデノウイルス-導入遺伝子配列が複製され、ビリオンカプシド内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生じさせる。結果として生じる組換えアデノウイルスは、選択された導入遺伝子の選択された細胞への導入に有用である。パッケージング細胞株内で増殖した組換えウイルスによるin vivo実験では、本発明のE1欠失組換えアデノウイルスベクターは、非サル哺乳動物、好ましくはヒト、細胞への導入遺伝子の導入における有用性を実証する。

30

【 0 0 9 0 】

導入遺伝子

導入遺伝子は、その導入遺伝子と隣接しているベクター配列に対して異種の、目的のタンパク質をコードする核酸配列である。核酸コード配列は、導入遺伝子の宿主細胞内での転写、翻訳、及び/又は発現を可能にするように、調節成分と機能的に連結している。

40

【 0 0 9 1 】

導入遺伝子配列の構成は、結果として生じるベクターが用いられる用途によって異なる。例えば、導入遺伝子は治療用導入遺伝子又は免疫原性導入遺伝子であり得る。あるいは、導入遺伝子配列は、リポーター配列を含んでもよく、それは発現時に検出可能なシグナルを生じる。このようなリポーター配列は、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ (LacZ)、アルカリフォスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、例えばCD2、

50

CD4、CD8、インフルエンザ血球凝集素タンパク質を含む膜結合タンパク質、及びそれに対する高親和性抗体が存在する、又は従来の方法によって産生され得る、当技術分野においてよく知られている他のタンパク質、及び特に血球凝集素若しくはMyc由来の抗原タグドメインに適切に融合された膜結合タンパク質を含む融合タンパク質、をコードするDNA配列を含むが、それらに限定されない。これらのコード配列は、それらの発現を行わせる調節因子と連結している場合、従来の方法によって検出可能なシグナルをもたらす、それらの方法は、酵素アッセイ、放射線アッセイ、比色アッセイ、蛍光アッセイ又は他の分光アッセイ、蛍光活性化細胞選別アッセイ、ならびに酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫測定（RIA）及び免疫組織化学などの免疫アッセイを含む。

【0092】

10

1つの実施形態では、導入遺伝子は、生物学及び医学において有用な産物をコードする非マーカー配列、例えば、タンパク質、RNA、酵素、若しくは触媒RNAなどの、治療用導入遺伝子又は免疫原性導入遺伝子である。望ましいRNA分子は、tRNA、dsRNA、リボソームRNA、触媒RNA、及びアンチセンスRNAを含む。有用なRNA配列の一例は、処理された動物において標的核酸配列の発現を消去する配列である。

【0093】

導入遺伝子は、例えば、遺伝的欠損の治療のため、癌の治療薬若しくはワクチンとして、免疫応答の誘導のため、及び/又は予防ワクチンの目的のために使用され得る。本明細書において用いられる場合、免疫応答の誘導とは、タンパク質に対するT細胞及び/又は液性免疫応答を誘導するタンパク質の能力を指す。

20

【0094】

予防との用語は、予め医薬を提供することを意味し、これは、病原体への曝露に先立つ（曝露前予防）か、又は疾患症状の発症に先立つ（曝露後予防）ものであり得る。治療および療法との用語は、本明細書中で相互に交換可能に用いられ、疾患中の医薬の投与を意味する。

疾患との用語は、被験体での構造又は機能の障害、特に、特定の症状を生成するもの、又は特定の部位に罹患し、且つ単に物理的傷害の直接的な結果ではないものを意味する。

【0095】

調節因子

導入遺伝子に加えて、ベクターはまた、プラスミドベクターでトランスフェクトされた細胞若しくは本発明によって作製されたウイルスに感染した細胞での、その転写、翻訳及び/又は発現を可能にするように、導入遺伝子に機能的に連結している従来の制御因子をも含む。本明細書において用いられる場合、「機能的に連結している」配列は、目的の遺伝子と隣接している発現制御配列、及びトランスで又は距離を置いて目的の遺伝子を制御するように作用する発現制御配列の両方を含む。

30

【0096】

発現制御配列は、適切な転写開始配列、終止配列、プロモーター及びエンハンサー配列；効果的なRNAプロセッシングシグナル、例えば、スプライシングシグナル及びウサギβ-グロビンpolyAを含むポリアデニル化（poly A）シグナルなど；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を向上させる配列（例えば、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を向上させる配列；ならびに必要であれば、コードされる産物の分泌を促進する配列を含む。数ある配列の中でも特に、キメライントロン（chimeric intron）が使用され得る。

40

【0097】

いくつかの実施形態では、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子（WPRE）（Zuffreyら（1999）J Virol；73（4）：2886-9）が導入遺伝子に機能的に連結され得る。典型的なWPREは、配列番号26に提供される。

【0098】

「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの結合を可能にし、遺伝子の転写を指示するヌクレオチド配列である。通常、プロモーターは、遺伝子の転写開始部位に近接した遺伝子

50

の5'非コード領域に位置する。転写開始において機能するプロモーター内の配列因子はしばしば、コンセンサスヌクレオチド配列によって特徴付けられる。プロモーターの例は、細菌、酵母、植物、ウイルス、及び哺乳動物（ヒトを含む）由来のプロモーターを含むがそれらに限定されない。内部プロモーター、天然のプロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター及び／又は組織特異的プロモーターを含む非常に多くの発現制御配列が当技術分野において知られており、利用され得る。

【0099】

構成的プロモーターの例は、TBGプロモーター、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター（任意選択でエンハンサーを含む）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（任意選択でCMVエンハンサーを含む、例えば、Boshartら、Cell, 41:521-530（1985）参照）、CASIプロモーター、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、及びEF1aプロモーター（Invitrogen）を含むが、それらに限定されない。

10

【0100】

いくつかの実施形態では、プロモーターはCASIプロモーターである（例えば、WO2012/115980参照）。CASIプロモーターは、CMVエンハンサーの一部、ニワトリ β -アクチンプロモーターの一部、及びUBCエンハンサーの一部を含む合成プロモーターである。いくつかの実施形態では、CASIプロモーターは、配列番号12に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれ以上の配列同一性を有する核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号12の核酸配列を含む、または配列番号12の核酸配列からなる。

20

【0101】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外から供給される化合物、温度などの環境要因、又は例えば、急性期、細胞の特定の分化状態、若しくは複製している細胞のみにおいてなどの特定の生理状態の存在によって調節され得る。誘導性プロモーター及び誘導系は、Invitrogen、Clontech及びAriadを含むがそれらに限定されない様々な商業的供給源から入手可能である。多くの他の系が記載されており、当業者によって容易に選択され得る。例えば、誘導性プロモーターは、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン（MT）プロモーター及びデキサメタゾン（Dex）誘導性マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーターを含む。他の誘導系は、T7ポリメラーゼプロモーター系（WO 98/10088）；エクジソン昆虫プロモーター（Noら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351（1996））、テトラサイクリン抑制系（Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551（1992））、テトラサイクリン誘導系（Gossenら、Science, 378:1766-1769（1995）、Harveyら、Curr. Opin. Chem. Biol, 2:512-518（1998）も参照）を含む。他の系は、FK506二量体、カストラジオール（castradiol）を用いるVP16又はp65、ジフェノールムリスレロン（diphenol murislerone）、RU486誘導系（Wangら、Nat. Biotech., 15:239-243（1997）及びWangら、Gene Ther., 4:432-441（1997））ならびにラバマイシン誘導系（Magariら、J. Clin. Invest., 100:2865-2872（1997））を含む。いくつかの誘導性プロモーターの有効性は時間とともに増大する。このような場合、複数のリプレッサーをタンデムに挿入すること（例えば、IRESによってTetRに連結されたTetR）によって、このような系の有効性を向上させ得る。

30

40

一部の実施形態では、プロモーターは、配列番号42に提供されるものなどの促進型hCMVプロモーターである。

【0102】

別の実施形態では、導入遺伝子の天然のプロモーターが使用される。導入遺伝子の発現が天然の発現を模倣することが望ましい場合、天然のプロモーターが好まれ得る。天然のプロモーターは、導入遺伝子の発現が、時間的に若しくは発達上、又は組織特異的に、又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時に使用され得る。更なる実施形態では、エンハンサー因子、ポリアデニル化部位またはコザックコンセンサス配列などの

50

他の天然の発現制御因子もまた、天然の発現を模倣するために使用され得る。

【0103】

導入遺伝子は、組織特異的プロモーターに機能的に連結され得る。例えば、骨格筋での発現が望ましい場合、筋肉で活性のあるプロモーターが用いられるべきである。これらは、骨格β-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由来のプロモーター、ならびに天然に存在するプロモーターより高い活性を有する合成筋肉プロモーター（Liら、Nat. Biotech., 17:241-245 (1999)参照）を含む。組織特異的なプロモーターの例は、数ある中でも、肝臓（アルブミン、Miyatakeら、J. Virol., 71:5124-32 (1997)；B型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandigら、Gene Ther., 3:1002-9 (1996)；α-フェトプロテイン（AFP）、Arbuthnotら、Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)）、骨オステオカルシン（Steinら、Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)）；骨シアロタンパク質（Chenら、J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)）、リンパ球（CD2、Hansalら、J. Immunol., 161:1063-8 (1998)；免疫グロブリン重鎖；T細胞受容体鎖）、ニューロン（ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター（Andersenら、Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)）、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子（Piccioliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)）、及びニューロン特異的vgf遺伝子（Piccioliら、Neuron, 15:373-84 (1995)）など）に関して知られている。

【0104】

任意選択で、治療上有用な又は免疫原性の産物をコードする導入遺伝子を有するベクターはまた、選択マーカー又はリポーター遺伝子を含んでもよく、それは、数ある中でも、ジェネティシン、ハイグロマイシン若しくはピューロマイシン耐性をコードする配列を含み得る。このような選択リポーター又はマーカー遺伝子（好ましくは、ウイルス粒子内にパッケージングされるウイルスゲノムの外側に位置する）は、例えばアンピシリン耐性など、細菌細胞でのプラスミドの存在を示すために使用され得る。ベクターの他の構成要素は、複製起点を含み得る。

【0105】

これらのベクターは、当業者にとって既知の技術とともに、本明細書において提供される技術及び配列を用いて作製される。このような技術は、文献に記載されるものなどの従来のcDNAのクローニング技術、アデノウイルスゲノムの重複オリゴヌクレオチド配列の使用、ポリメラーゼ連鎖反応、及び所望のヌクレオチド配列を提供する任意の適切な方法を含む。

【0106】

治療及び予防

ChAd157を基にした組換えベクターは、in vitro、ex vivo、及びin vivoでのヒト又は非サル哺乳動物への遺伝子導入に有用である。

【0107】

本明細書に記載される組換えアデノウイルスベクターは、in vitroで異種導入遺伝子によってコードされる産物を産生するための発現ベクターとして使用され得る。例えば、導入遺伝子を含んでいる複製能を有さない組換えアデノウイルスは、上述のような補完細胞株にトランスフェクトされ得る。

【0108】

ChAd157由来の組換えアデノウイルスベクターは、1種以上のアデノウイルス血清型に対して中和抗体を有する生物であっても、in vivo又はex vivoにおいて選択された導入遺伝子を選択された宿主細胞に送達し得る、効果的な遺伝子導入ベヒクルを提供する。1つの実施形態では、ベクター及び細胞はex vivoで混合され；感染細胞は従来の方法を用いて培養され；形質導入細胞は患者に再注入される。これらの技術は、治療目的及び防御免疫の誘導などの免疫付与のための遺伝子送達に特に適している。

【0109】

免疫原性導入遺伝子

組換えChAd157ベクターはまた、免疫原性組成物中でも投与され得る。本明細書に記載

10

20

30

40

50

する免疫原性組成物は、哺乳動物、適切にはヒトに送達された後、ベクターによって送達された導入遺伝子産物に対して免疫応答、例えば液性（例えば、抗体）応答及び／又は細胞性（例えば、細胞傷害性T細胞）応答を誘導できる１種以上の組換えChAd157ベクターを含有している組成物である。組換えアデノウイルスは、（適切には任意のその遺伝子の欠失の中に）所望の免疫原をコードする遺伝子を含み、その結果ワクチンに使用され得る。組換えアデノウイルスは、免疫応答の誘導に不可欠で病原体の蔓延を制限することができる抗原が同定されており、cDNAが入手可能である任意の病原体に対する、予防ワクチン又は治療ワクチンとして使用され得る。

【0110】

免疫原との用語は、免疫応答を生起することが可能なポリペプチドを意味する。適切には、免疫原は、少なくとも１種のB細胞またはT細胞エピトープを含む抗原である。生起される免疫応答は、中和抗体を生成する抗原特異的B細胞応答であり得る。生起される免疫応答は、全身性及び／又は局所的応答であり得る抗原特異的T細胞応答であり得る。抗原特異的T細胞応答は、複数のサイトカイン（例えばIFN γ 、TNF α 及び／又はIL2）を発現するCD4+T細胞を含む応答などのCD4+T細胞応答を含み得る。あるいは、又はそれに加えて、抗原特異的T細胞応答は、複数のサイトカイン（例えばIFN γ 、TNF α 及び／又はIL2）を発現するCD8+T細胞を含む応答などのCD8+T細胞応答を含み得る。

したがって、免疫付与との用語は、免疫応答を生起するための免疫原（又は文脈に対して適切であれば免疫原をコードするポリヌクレオチド）の投与を意味する。

【0111】

このようなワクチン又は他の免疫原性組成物は、適切な送達ベヒクル中に製剤化され得る。通常、免疫原性組成物の用量は、下記の「送達方法及び投与量」に記載される範囲である。もしあれば追加免疫の必要性を決定するために、選択された遺伝子の免疫のレベルが測定され得る。血清中の抗体力価の評価の後に、任意選択の追加免疫付与が必要とされ得る。

【0112】

任意選択で、本発明のワクチン又は免疫原性組成物は、例えば、アジュバント、安定剤、pH調整剤、保存剤などを含む他の成分を含有するように製剤化されてもよい。適切なアジュバントの例は、下記の「アジュバント」で提供される。このようなアジュバントは、抗原をコードするDNAワクチンのみによるプライミングで生じる免疫応答と比較して、抗原特異的免疫応答を向上させるために、抗原をコードするプライミングDNAワクチンとともに投与され得る。あるいは、このようなアジュバントは、（下記の「投与計画」に記載されるように）本発明のChAd157ベクターが関与する投与計画において投与される、ポリペプチド抗原とともに投与され得る。

【0113】

組換えアデノウイルスは、免疫原性を示す量、すなわち、ある投与経路において、望ましい標的細胞をトランスフェクトし、選択された遺伝子の十分なレベルの発現を提供して、免疫応答を誘導するために有効な組換えアデノウイルスの量、で投与される。防御免疫がもたらされる場合、組換えアデノウイルスは、感染及び／又は疾患の再発の予防に有用なワクチン組成物であると考えられる。

【0114】

本明細書に記載される組換えベクターは、ベクターによって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傷害性T細胞及び抗体の誘導に非常に有効であると期待される。

【0115】

ヒト又は非ヒト動物に他の病原体に対する免疫を与えるために有用な、本発明のベクターによって発現される免疫原は、例えば、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、菌類、寄生性微生物又は多細胞性寄生生物を含む、又は癌細胞もしくは腫瘍細胞に由来する。例えば、免疫原は、様々なウイルスの科より選択され得る。それに対する免疫応答が望まれるウイルスの科の例は、狂犬病ウイルスなどのリッサウイルス、呼吸器系ウイルス、例

10

20

30

40

50

例えば呼吸器合胞体ウイルス（RSV）ならびに他のパラミクソウイルス、例えばヒトメタ肺炎ウイルス、hMPV及びパラインフルエンザウイルス（PIV）等を含む。

【0116】

ヒト又は非ヒト動物に免疫を与えるための免疫原として有用である適切な狂犬病抗原は、狂犬病ウイルス糖タンパク質（G）、RNAポリメラーゼ（L）、マトリックスタンパク質（M）、核タンパク質（N）及びリントタンパク質（P）から選択することができる。「Gタンパク質」又は「糖タンパク質」又は「Gタンパク質ポリペプチド」又は「糖タンパク質ポリペプチド」という用語は、狂犬病糖タンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。「Lタンパク質」又は「RNAポリメラーゼタンパク質」又は「Lタンパク質ポリペプチド」又は「RNAポリメラーゼタンパク質ポリペプチド」という用語は、狂犬病RNAポリメラーゼタンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。「Mタンパク質」又は「マトリックスタンパク質」又は「Mタンパク質ポリペプチド」又は「マトリックスタンパク質ポリペプチド」という用語は、狂犬病マトリックスタンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。「Nタンパク質」又は「核タンパク質」又は「Nタンパク質ポリペプチド」又は「核タンパク質ポリペプチド」という用語は、狂犬病核タンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。「Pタンパク質」又は「リントタンパク質」又は「Pタンパク質ポリペプチド」又は「リントタンパク質ポリペプチド」という用語は、狂犬病リントタンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。

10

20

【0117】

ヒト又は非ヒト動物に免疫を与えるための免疫原として有用なRSVの適切な抗原は、以下：融合タンパク質（F）、付着タンパク質（G）、マトリックスタンパク質（M2）及び核タンパク質（N）より選択され得る。「Fタンパク質」又は「融合タンパク質」又は「Fタンパク質ポリペプチド」又は「融合タンパク質ポリペプチド」という用語は、RSV融合タンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。同様に、「Gタンパク質」又は「Gタンパク質ポリペプチド」という用語は、RSV付着タンパク質ポリペプチドのアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。「Mタンパク質」又は「マトリックスタンパク質」又は「Mタンパク質ポリペプチド」という用語は、RSVマトリックスタンパク質のアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指し、M2-1（本明細書においてM2.1と表され得る）とM2-2遺伝子産物のいずれか又は両方を含み得る。同様に、「Nタンパク質」又は「ヌクレオカプシドタンパク質」又は「Nタンパク質ポリペプチド」という用語は、RSV核タンパク質のアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するポリペプチド又はタンパク質を指す。

30

【0118】

ヒトRSV株の2つのグループ、主にG糖タンパク質の抗原性の違いに基づくA及びBグループが記載されている。これまでに多数のRSV株が分離されており、そのいずれも、本明細書において開示される免疫原性複合物の抗原という点で適している。GenBank及び/又はEMBL受入番号によって示される例示的な株は、米国特許出願公開第2010/0203071号（WO2008114149）に見出すことができ、これは、本発明での使用に適したRSV Fタンパク質及びGタンパク質の核酸配列及びポリペプチド配列を開示する目的で、参照により本明細書に組み入れられる。ある実施形態では、RSV Fタンパク質はRSV Fタンパク質の細胞外ドメイン（FΔTM）であり得る。

40

【0119】

典型的なMタンパク質及びNタンパク質の核酸配列及びタンパク質配列は、例えば、米国特許出願公開第2014/0141042号（WO2012/089833）に見出すことができ、これは、本発明での使用に適したRSV Mタンパク質及びNタンパク質の核酸配列及びポリペプチド配列を開示する目的で、本明細書に組み入れられる。

50

【0120】

適切には、本発明での使用のために、核酸は、RSV F抗原ならびにRSV、M及びN抗原をコードする。より具体的には、核酸は、RSV FΔTM抗原ならびにRSV M2-1及びN抗原をコードし、RSV FΔTM抗原とRSV M2-1との間に自己切断部位が含まれ、RSV M2-1とN抗原との間にフレキシブルリンカーが含まれる。1つの実施形態では、適切な核酸は、配列番号37によって表されるポリペプチドをコードする。

【0121】

1つの実施形態では、免疫原はレトロウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のようなレンチウイルス由来であり得る。このような実施形態では、免疫原はHIV-1又はHIV-2に由来し得る。

10

【0122】

HIVゲノムは、多数の異なるタンパク質をコードし、それらの各々は、本発明のベクターによって発現される場合、その全体又は断片として免疫原性であり得る。エンベロープタンパク質は、例えば、gp120、gp41及びEnv前駆体gp160を含む。HIVの非エンベロープタンパク質は、例えばgag及びpol遺伝子の産物などの内部構造タンパク質、ならびにRev、Nef、Vif及びTatなどの他の非構造タンパク質を含む。ある実施形態では、本発明のベクターは、HIV Gagを含む1種以上のポリペプチドをコードする。

【0123】

Gag遺伝子は、プロテアーゼによって切断され、そのすべてがGagの断片の例である、マトリックスタンパク質(p17)、カプシド(p24)、ヌクレオカプシド(p9)、p6ならびに2つのスペースペプチド、p2及びp1を含む産物を生じる前駆体ポリタンパク質として翻訳される。

20

【0124】

Gag遺伝子は、p55とも呼ばれる55キロダルトン(kD)のGag前駆体タンパク質を生じ、それはスプライシングされないウイルスmRNAから発現される。翻訳の間に、p55のN末端はミリストイル化され、それが細胞膜の細胞質側と結合する引き金となる。膜結合Gagポリタンパク質は、他のウイルスタンパク質及び細胞タンパク質とともに2コピーのウイルスゲノムRNAを動員し、これが感染細胞の表面からのウイルス粒子の出芽を引き起こす。出芽後、p55は、ウイルスにコードされるプロテアーゼ(pol遺伝子の産物)によって、ウイルスの成熟過程の間に、MA(マトリックス[p17])、CA(カプシド[p24])、NC(ヌクレオカプシド[p9])、及びp6と呼ばれる4つのより小さいタンパク質に切断され、それらのすべてはGagの断片の例である。1つの実施形態では、本発明のベクターは、配列番号16のGagポリペプチドを含む。

30

【0125】

アジュバント

「アジュバント」は、本明細書において用いられる場合、免疫原への免疫応答を向上させる組成物を指す。このようなアジュバントの例は、無機アジュバント(例えばリン酸アルミニウム又は水酸化アルミニウム等の無機金属塩)、有機アジュバント(例えばQS21等のサポニン、又はスクアレン)、オイルベースのアジュバント(例えばフロイント完全アジュバント及びフロイント不完全アジュバント)、サイトカイン(例えばIL-1β、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、GM-CSF、及びINF-γ)粒子状アジュバント(例えば免疫刺激複合体(ISCOMS)、リポソーム、又は生分解性マイクロスフェア)、ビロソーム、細菌性アジュバント(例えば3-de-O-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)等のモノホスホリルリピドA、又はムラミルペプチド)、合成アジュバント(例えば非イオン性ブロックコポリマー、ムラミルペプチド類似体、又は合成リピドA)、合成ポリヌクレオチドアジュバント(例えば、ポリアルギニン又はポリリジン)ならびに非メチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド(「CpG」)を含むが、それらに限定されない。

40

【0126】

1つの適切なアジュバントは、モノホスホリルリピドA(MPL)、特に3-de-O-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)である。化学的には、それはしばしば、4、5、又は6個

50

のアシル化鎖のいずれかを有する3-de-O-アシル化モノホスホリルリピドAの混合物として供給される。それはGB 2122204Bにおいて教示される方法によって精製及び調製することができ、この参照文献はまたジホスホリルリピドA及びその3-O-脱アシル化型の調製も開示する。他の精製リポ多糖類ならびに合成リポ多糖類が開示されている（米国特許第6,005,099号及びEP 0 729 473 B1；Hilgersら、1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79(4):39 2-6；Hilgersら、1987, *Immunology*, 60(1):141-6；ならびにEP 0 549 074 B1）。

【0127】

サポニンもまた適切なアジュバントである（Lacaille-Dubois, M及びWagner H, *A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine* vol 2 pp 363-386 (1996)参照）。例えば、サポニンQuil A（南米の樹木シャボンノキ（*Quillaja Saponaria* Molina）の樹皮から得られる）、及びその画分は、米国特許第5,057,540及びKensil, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1996, 12:1-55；ならびにEP 0 362 279 B1に記載される。Quil Aの精製画分はまた、QS21及びQS17等の免疫刺激剤としても知られており；それらの製造方法は、米国特許第5,057,540及びEP 0 362 279 B1に開示されている。またQS7（Quil-Aの非溶血性画分）も、これらの参照文献に記載されている。QS21の使用はKensilら（1991, *J. Immunology*, 146: 431-437）に更に記載されている。QS21及びポリソルベート又はシクロデキストリンの組合せもまた知られている（WO 99/10008）。QS21及びQS7など、Quil Aの画分を含有する粒子状アジュバント系は、WO 96/33739及びWO 96/11711に記載されている。

【0128】

別のアジュバントは、非メチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド（「CpG」）である（Krieg, *Nature* 374:546 (1995)）。CpGは、DNA中に存在するシトシン-グアノシンジヌクレオチドモチーフの略語である。CpGは、全身経路と粘膜経路との両方で投与される際のアジュバントとして知られている（WO 96/02555、EP 468520、Davisら、*J. Immunol.*, 1998, 160:870-876；McCluskie 及びDavis, *J. Immunol.*, 1998, 161:4463-6）。CpGは、ワクチン中に製剤化される際、遊離抗原とともに自由溶液中で投与されてもよく（WO 96/02555）、抗原に共有結合的にコンジュゲートされてもよく（WO 98/16247）、又は水酸化アルミニウムなどの担体とともに製剤化されてもよい（Brazolot-Millanら、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, 95:15553-8）。

【0129】

上述のようなアジュバントは、リボソーム、水中油型エマルション、及び／又は金属塩（水酸化アルミニウムのようなアルミニウム塩を含む）などの担体とともに製剤化され得る。例えば、3D-MPLは、水酸化アルミニウム（EP 0 689 454）又は水中油型エマルション（WO 95/17210）とともに製剤化されてもよく；QS21は、コレステロール含有リボソーム（WO 96/33739）、水中油型エマルション（WO 95/17210）又はミョウバン（WO 98/15287）とともに製剤化されてもよく；CpGは、ミョウバン（Brazolot-Millan、上記）又は他の陽イオン性担体とともに製剤化されてもよい。

【0130】

アジュバントの組合せ、詳細にはモノホスホリルリピドA及びサポニン誘導体の組合せ（例えば、WO 94/00153；WO 95/17210；WO 96/33739；WO 98/56414；WO 99/12565；WO 99/11241参照）、より詳細にはWO 94/00153に開示されるようなQS21及び3D-MPLの組合せ、又はWO 96/33739に開示されるようなQS21がコレステロール含有リボソーム（DQ）中でクエンチされている（quenched）組成物が、本発明において使用され得る。あるいは、QS21などのサポニンを加えたCpGの組合せは、本発明における使用に適したアジュバントである。水中油型エマルション中にQS21、3D-MPL及びトコフェロールを含む強力なアジュバント製剤は、WO 95/17210に記載され、本発明に使用するための別の製剤である。サポニンアジュバントは、リボソーム中に製剤化され、免疫刺激性オリゴヌクレオチドと組み合わせられ得る。このように、適切なアジュバント系は、例えば、アルミニウム塩とともにモノホスホリルリピドA、好ましくは3D-MPLの組合せを含む（例えばWO00/23105に記載される）。更なる例示アジュバントは、QS21及び／又はMPL及び／又はCpGを含有する。QS21は、

WO 96/33739において開示されるようにコレステロール含有リボソーム中でクエンチされ得る。

【0131】

他の適切なアジュバントは、WO9850399若しくは米国特許第6,303,347号（AGPの調製方法もまた開示される）において開示されるようなアルキルグルコサミニドホスフェート（AGP）、又は米国特許第6,764,840号において開示されるようなAGPの製薬上許容され得る塩を含む。いくつかのAGPはTLR4作動薬であり、いくつかはTLR4拮抗薬である。両方ともアジュバントとして有用であると考えられる。

【0132】

ワクチン接種のために使用される発現系に含まれる抗原への不変鎖の融合は、アデノウイルスによって投与された場合、前記抗原に対する免疫応答を増加させることが見出されている（WO 2007/062656、これはUS 2011/0293704として公開されており、不変鎖配列の開示のために参照により組み入れられる）。従って、本発明の1つの実施形態では、免疫原性導入遺伝子は、組換えChAd157ウイルスベクターにおいて不変鎖と共発現され得る。

10

【0133】

別の実施形態では、本発明は、被験体にChAd157カプシドを送達することによって、免疫調節効果応答（immunomodulatory effect response）を誘導するための、あるいは別の活性物質に対する細胞傷害性T細胞応答を向上させる又は補助するためのChAd157のカプシドの使用を提供する（任意選択で、インタクトな若しくは組換えウイルス粒子又は空のカプシドが使用される）。ChAd157カプシドは単独で、又は活性物質との併用投与計画において、それに対する免疫応答を向上させるために送達され得る。有利には、宿主にアデノウイルスを感染させることなく、望ましい効果が達成され得る。

20

【0134】

投与計画

通常、ChAd157組換えアデノウイルスベクターは、治療用分子又は免疫原性分子（例えばタンパク質等）の送達に用いられる。両方の用途に対して、本発明の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含む投与計画での使用に特によく適していることが容易に理解されるであろう。このような投与計画は通常、ウイルスカプシドが入れ替えられている一連のウイルスベクターの送達を含む。ウイルスカプシドは、引き続く投与のたびに、又は特定の血清型カプシドの事前に選択した回数（例えば、1回、2回、3回、4回若しくはそれ以上）の投与後に変更され得る。従って、投与計画は、第一カプシドを有する組換えアデノウイルスの送達、第二カプシドを有する組換えアデノウイルスによる送達、及び第三カプシドを有する組換えアデノウイルスによる送達を含み得る。本発明のアデノウイルスカプシドを単独で、互いに併用して、又は（好ましくは免疫学的に交差反応しない）他のアデノウイルスと併用して用いる様々な他の投与計画が当業者にとって明白であろう。任意選択で、このような投与計画は、他の非ヒト霊長類アデノウイルスのカプシド、ヒトアデノウイルスのカプシド、又は本明細書に記載されるような人工配列のカプシドを有する組換えアデノウイルスの投与を含み得る。

30

【0135】

本発明のアデノウイルスベクターは、複数のアデノウイルスを介した導入遺伝子の送達
が望ましい治療計画、例えば、同一の導入遺伝子の再送達を含む投与計画、又は他の導入
遺伝子の送達を含む併用投与計画に、特によく適している。このような投与計画は、ChAd
157アデノウイルスベクターの投与と、それに続く同一血清型のアデノウイルス由来のベ
クターによる再投与を含み得る。特に望ましい投与計画は、ChAd157アデノウイルスベク
ターの投与を含み、その中で、第一投与において送達されるベクターのアデノウイルスカ
プシド配列の起源が、その後の1回以上の投与において用いられるウイルスベクターのア
デノウイルスカプシド配列の起源とは異なる。例えば、治療計画は、ChAd157ベクターの
投与、及び同一の又は異なる血清型の1種以上のアデノウイルスベクターによる反復投与
を含む。

40

【0136】

50

別の例では、治療計画は、アデノウイルスベクターの投与と、それに続く第一送達アデノウイルスベクターのカプシドの起源とは異なるカプシドを有するChAd157ベクターによる反復投与、及び任意選択で、前の投与ステップのベクターのアデノウイルスカプシドの起源と同一若しくは、好ましくは異なる別のベクターによる更なる投与を含む。これらの投与計画は、ChAd157配列を用いて構築されたアデノウイルスベクターの送達に限定されない。むしろ、これらの投与計画は、ChAd157ベクターと組み合わせて、他の非ヒト霊長類アデノウイルス配列、又はヒトアデノウイルス配列などの他のアデノウイルス配列を含むがそれらに限定されない他のアデノウイルス配列を問題なく利用できる。

【0137】

更なる例では、治療計画は、(i) 1種以上のChAd157アデノウイルスベクター、ならびに(ii) 非アデノウイルスベクター、非ウイルスベクター、及び/又は様々な他の治療上
10
有用な化合物若しくは分子、例えば任意選択でアジュバントと同時に投与される抗原タンパク質などの異なる成分、の同時送達(同時投与など)又は連続送達(プライム・ブーストなど)のいずれかを含み得る。同時投与の例は、同側性(homo-lateral)同時投与及び対側性(contra-lateral)同時投与を含む(下記の「送達方法及び投与量」に更に記載される)。

【0138】

1種以上のChAd157アデノウイルスベクターを用いる同時送達又は特に連続送達(プライム・ブーストなど)での使用に適切な非アデノウイルスベクターは、1種以上のボックスウイルスベクターを含む。適切には、ボックスウイルスベクターは、コルドボックスウ
20
イルス亜科に属し、より適切には、オルソボックス(orthopox)、パラボックス(parapox)、ヤタボックス(yatapox)、アビボックス(avipox)(適切にはカナリア痘(ALVAC)若しくは鶏痘(FPV))及びモルシボックス(molluscipox)からなる群より選択される前記亜科の属に属する。更に適切には、ボックスウイルスベクターは、オルソボックス(orthopox)に属し、ワクシニアウイルス、NYVAC(ワクシニアのコペンハーゲン株に由来する)、改変ワクシニアアンカラ(MVA)、牛痘ウイルス及びサル痘ウイルスからなる群より選択される。最も適切には、ボックスウイルスベクターはMVAである。

【0139】

「同時」投与は、適切には同じように進行する免疫応答を指す。好ましくは、両成分は同時に投与される(DNAとタンパク質両方の同時投与など)が、一方の成分は数分以内(30
例えば、同一の診療予約又は診察で)、数時間以内に投与され得る。このような投与もまた、同時投与と呼ばれる。いくつかの実施形態では、同時投与は、アデノウイルスベクター、アジュバント及びタンパク質成分の投与を指し得る。他の実施形態では、同時投与は、アデノウイルスベクター及び別のウイルスベクター、例えば、第二のアデノウイルスベクター又はMVAなどのボックスウイルスの投与を指す。他の実施形態では、同時投与は、アデノウイルスベクター及びタンパク質成分の投与を指し、任意選択でアジュバントが添加される。

【0140】

プライム・ブースト投与計画が用いられてもよい。プライム・ブーストとは、2つの個別の免疫応答:(i) 免疫系の初回刺激と、それに続く(ii) 一次免疫応答が確立した数
40
週間又は数カ月後の免疫系の二次免疫又は追加免疫、を指す。

【0141】

このような投与計画は、従来の抗原、例えばタンパク質(任意選択でアジュバントとともに同時投与される)、又はこのような抗原をコードする配列を有する組換えウイルス(例えば、WO 00/11140)などによる二次の、追加投与に対する免疫系を刺激するための、組換えChAd157ベクターの投与を含み得る。あるいは、免疫付与計画は、抗原をコードする(ウイルス又はDNAベースのいずれかの)ベクターに対する免疫応答をブーストするための、組換えChAd157ベクターの投与を含み得る。別の選択肢では、免疫付与計画は、タンパク質の投与と、それに続く抗原をコードする組換えChAd157ベクターによる追加免疫を含む。一例では、プライム・ブースト投与計画は、抗原が由来するウイルス、細菌又は
50

他の生物に対する防御免疫応答を提供し得る。別の実施形態では、プライム・ブースト投与計画は、治療が投与されている疾患の存在を検出するための従来のアッセイを用いて測定され得る治療効果を提供する。

【0142】

好ましくは、ブースト組成物は、プライム組成物を被験体に投与した約2～約27週間後に投与される。ブースト組成物の投与は、プライムワクチンによって投与されたものと同一の抗原若しくは異なる抗原を含有する又は送達することができる有効量のブースト組成物を用いて達成される。ブースト組成物は、同一のウイルス起源又は別の起源に由来する組換えウイルスベクターで構成され得る。あるいは、ブースト組成物は、プライムワクチンにおいてコードされるものと同一であるが、タンパク質の形態で抗原を含有しており、その組成物が宿主において免疫応答を誘導する組成物であり得る。ブースト組成物の第一の必要条件は、組成物の抗原が、プライム組成物によってコードされるものと同一の抗原、又は交差反応する抗原であるということである。

10

【0143】

ChAd157、及びChAd155などの特定の他のアデノウイルスベクターとでの中和抗体間の低い交差反応性は、複数のベクターの投与が必要である文脈では有益である。複数回投与は、異なる導入遺伝子（例えば、異なる医学的適応に関連する免疫原をコードする）の分離した送達又は同じか若しくは類似する導入遺伝子の送達（例えば、特定の医学的適応に対する免疫応答を増大させるためのプライム・ブースト投与計画において）の目的のためであり得る。

20

【0144】

結果として、ChAd157ファイバー、又は本明細書に記載されるその機能的誘導体を含まない（例えば、ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクター、特に、ChAd155ファイバー、ヘキソン及びペントンを含む組換えアデノウイルスベクターなどの、本明細書に記載されるChAd157ファイバー、ヘキソン又はペントンを含まない）組換えアデノウイルスベクターに以前に曝露された被験体に対する投与のための、導入遺伝子をコードする本発明の組換えアデノウイルスベクターが提供される。特に、ChAd157ファイバー、又は本明細書に記載されるその機能的誘導体を含まない（例えば、ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクター、特に、ChAd155ファイバー、ヘキソン及びペントンを含む組換えアデノウイルスベクターなどの、本明細書に記載されるChAd157ファイバー、ヘキソン又はペントンを含まない）組換えアデノウイルスベクターが以前に投与された被験体への投与のための導入遺伝子をコードする本発明の組換えアデノウイルスベクターが提供される。適切には、ChAd157ファイバーを含まない組換えアデノウイルスベクターは、ChAd157との低い交差反応性を有するものである。一実施形態では、ChAd157ファイバーを含まない組換えアデノウイルスベクターは、本発明の導入遺伝子の組換えアデノウイルスベクターとは異なる医学的適応（1種類又は複数種類）を標的とする導入遺伝子をコードする。別の実施形態では、ChAd157ファイバーを含まない組換えアデノウイルスベクターは、本発明の導入遺伝子の組換えアデノウイルスベクターと同じ医学的適応（1種類又は複数種類）を標的とする導入遺伝子（例えば、同じ導入遺伝子）をコードする。

30

40

【0145】

ChAd157ファイバー、又は本明細書に記載されるその機能的誘導体を含まない（例えば、ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクター、特に、ChAd155ファイバー、ヘキソン及びペントンを含む組換えアデノウイルスベクターなどの、本明細書に記載されるChAd157ファイバー、ヘキソン又はペントンを含まない）組換えアデノウイルスベクターへとその後曝露される可能性がある（すなわち、曝露されることが意図又は予期される）被験体に対する投与のための導入遺伝子をコードする、本発明の組換えアデノウイルスベクターもまた提供される。特に、ChAd157ファイバー、又は本明細書に記載されるその機能的誘導体を含まない（例えば、ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクター、特に、ChAd155

50

ファイバー、ヘキソン及びペントンを含む組換えアデノウイルスベクターなどの、本明細書に記載されるChAd157ファイバー、ヘキソン又はペントンを含まない組換えアデノウイルスベクターをその後に投与される可能性がある被験体に対する投与のための導入遺伝子をコードする本発明の組換えアデノウイルスベクターが提供される。適切には、ChAd157ファイバーを含まない組換えアデノウイルスベクターは、ChAd157との低い交差反応性を有するものである。一実施形態では、ChAd157ファイバーを含まない組換えアデノウイルスベクターは、本発明の導入遺伝子の組換えアデノウイルスベクターとは異なる医学的適応（1種類又は複数種類）を標的とする導入遺伝子をコードする。別の実施形態では、ChAd157ファイバーを含まない組換えアデノウイルスベクターは、本発明の導入遺伝子の組換えアデノウイルスベクターと同じ医学的適応（1種類又は複数種類）を標的とする導入遺伝子（例えば、同じ導入遺伝子）をコードする。

10

【0146】

したがって、本発明は、以下：

(a)第1の導入遺伝子をコードする本発明の組換えアデノウイルスベクターを被験体に投与するステップ；及び

(b)ChAd157ファイバー、又は本明細書に記載されるその機能的誘導体を含まない組換えアデノウイルスベクターであって、第2の導入遺伝子をコードするベクターを被験体に投与するステップ

を含み、このとき、ステップ(a)及び(b)は、いずれの順序でも行なうことができ、且つ第1及び第2の導入遺伝子は同じか又は異なることができる、被験体での免疫応答を生起するための方法を提供する。

20

【0147】

通常は、第1および第2の導入遺伝子は、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生性微生物又は多細胞性寄生生物などの病原体に対して、あるいは癌細胞又は腫瘍細胞に対して、ヒト又は非ヒト動物に免疫を付与するために有用である免疫原をコードするであろう。第1および第2の導入遺伝子は、同じか又は異なる免疫原をコードし得る。異なる免疫原をコードする場合には、それらは、同じか又は異なる病原体又は癌細胞若しくは腫瘍細胞を標的とし得る。

【0148】

結果として、以下：

30

(a)ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生性微生物又は多細胞性寄生生物などの病原体に対して、あるいは癌細胞又は腫瘍細胞に対して、ヒト又は非ヒト動物に免疫を付与するために有用である免疫原をコードする第1の導入遺伝子をコードする本発明の組換えアデノウイルスベクターを被験体に投与するステップ；及び

(b)本明細書に記載されるChAd157ファイバー、又はその機能的誘導体を含まない組換えアデノウイルスベクターであって、該ベクターは、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生性微生物又は多細胞性寄生生物などの異なる病原体に対して、あるいは癌細胞又は腫瘍細胞に対して、ヒト又は非ヒト動物に免疫を付与するために有用である免疫原をコードする第2の導入遺伝子をコードするベクターを被験体に投与するステップを含み、このとき、ステップ(a)及び(b)は、いずれの順序でも行なうことができる、被験体の予防又は治療のための方法もまた提供される。

40

【0149】

本明細書に記載されるChAd157ファイバー、又はその機能的誘導体を含まない組換えアデノウイルスベクターは、適切には、ChAd157ファイバー、ChAd157ヘキソン又はChAd157ファイバーを含まず、例えば、ChAd157ファイバー、ChAd157ヘキソン又はChAd157ファイバー若しくはそれに対して少なくとも98%の同一性を有するその機能的誘導体を含まない。

【0150】

本明細書に記載されるChAd157ファイバー、又はその機能的誘導体を含まない組換えアデノウイルスベクターは、ChAd155ファイバー、ヘキソン及び/又はペントンを含む組換

50

えアデノウイルスベクター、特に、ChAd155ファイバー、ヘキソン及びペントンを含む組換えアデノウイルスベクターであり得る。

【0151】

言及される通り、本発明の組換えアデノウイルスベクターは、ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターと組み合わせて、治療的又は免疫原性分子の送達のために用いることができる。ChAd155ファイバー、ヘキソン及び／又はペントンを含む組換えアデノウイルスベクターは、配列番号7、9及び11のファイバー、ペント及び／又はヘキソン、特に配列番号7、9及び11のファイバー、ペント及びヘキソンを含むであろう。

【0152】

低い交差反応性との用語は、第1のベクターを用いた免疫付与が、第2のベクターに対する著明な中和抗体応答を引き起こさない、すなわち、第2のベクターの免疫学的有効性に顕著に影響を及ぼさないことを意味する。中和抗体応答とは、本明細書中の実施例7に類似する方法を用いて測定することができる。望ましくは、第1のベクターを用いる2回の免疫付与は、第2のベクターを用いる免疫付与から生じるレベルの平均して50%未満、例えば、75%未満、適切には90%未満である中和力価を引き起こす。

「被験体」との用語は、いずれかの動物、適切には哺乳動物、特にヒトを意味する。

【0153】

送達方法及び投与量

ベクターは、製薬上又は生理学的に許容され得る担体、例えば、生理食塩水；等張塩類溶液若しくは当業者にとって明白な他の製剤等に懸濁又は溶解することによって、投与のために調製され得る。適切な担体は当業者にとって明らかであり、主に投与経路によって決まる。本明細書に記載される組成物は、生分解性の生体適合性ポリマーを用いた徐放性製剤で、又はミセル、ゲル及びリボソームを用いた現地送達（on-site delivery）によって、哺乳動物に投与され得る。

【0154】

いくつかの実施形態では、本発明の組換えアデノウイルスは、筋肉内注入、腔内投与、静脈内注入、腹腔内注入、皮下注入、経皮投与、皮内投与、鼻腔内投与、直腸投与又は経口投与によって、被験体に投与される。舌下投与もまた対象となり得る。

【0155】

治療計画が、それぞれ異なる組成物に製剤化される1種以上のChAd157アデノウイルスベクター及び更なる成分の同時投与を含む場合、それらは好ましくは同一部位またはほぼ同じ部位に共に配置されて投与される。例えば、成分は、四肢の同じ側（「同側性」投与）又は四肢の反対側（「対側性」投与）に（例えば、筋肉内、経皮、皮内、皮下より選択される投与経路を介して）投与され得る。

【0156】

ウイルスベクターの投与量は、主に、治療されている疾患、患者の年齢、体重及び健康状態などの要因によって決まり、従って患者によって異なり得る。例えば、治療上有効な成人又は動物用のウイルスベクターの投与量は、通常、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{15}$ 個のウイルス粒子、例えば $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 個のウイルス粒子等（例えば、 1×10^8 、 2.5×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 1.5×10^9 、 2.5×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 1.5×10^{10} 、 2.5×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1.5×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 5×10^{11} 、 1×10^{12} 個の粒子）を含む。あるいは、ウイルスベクターは、一般的には $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ プラーク形成単位（PFU）、例えば 1×10^5 PFU、 2.5×10^5 PFU、 5×10^5 PFU、 1×10^6 PFU、 2.5×10^6 PFU、 5×10^6 PFU、 1×10^7 PFU、 2.5×10^7 PFU、 5×10^7 PFU、 1×10^8 PFU、 2.5×10^8 PFU、 5×10^8 PFU、 1×10^9 PFU、 2.5×10^9 PFU、 5×10^9 PFU、又は 1×10^{10} PFU等の用量で投与され得る。投与量は、動物の大きさ及び投与経路に応じて変わる。例えば、筋肉内注入に対する適切なヒト又は動物用の投与量（約80kgの動物に対して）は、単一箇所約 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{12}$ 粒子/mLの範囲である。任意選択で、複数箇所の投与が用いられ得る。別の例では、適切なヒト又は動物用の投与量は、経口製剤で約 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{15}$ 個の粒子の範囲であり得る。

10

20

30

40

50

【0157】

ウイルスベクターは、例えば、標準曲線として、HCMVプロモーターを含む発現カセットを有するベクターゲノムを含有しているプラスミドDNAの段階希釈を用いて、CMVプロモーター領域上に設計されたプライマー及びプローブを用いた、定量的PCR分析（Q-PCR）によって定量化され得る。試験サンプル中のコピー数は、平行線分析法（parallel line analysis method）によって決定される。ベクター粒子定量化の別法は、分析的HPLC又は $A_{260\text{ nm}}$ に基づく分光光度法であり得る。

【0158】

免疫学的に有効な核酸の量は、適切には1ng～100mgであり得る。例えば、適切な量は1 μg ～100mgであり得る。特定の核酸（例えば、ベクター）の適切な量は、当業者によって容易に決定され得る。核酸成分の典型的な有効量は、1ng～100 μg の間、例えば1ng～1 μg の間（例えば、100ng～1 μg ）又は1 μg ～100 μg の間、例えば10ng、50ng、100ng、150ng、200ng、250ng、500ng、750ng、又は1 μg 等であり得る。核酸の有効量はまた、1 μg ～500 μg 、例えば1 μg ～200 μg の間、例えば10～100 μg の間、例えば1 μg 、2 μg 、5 μg 、10 μg 、20 μg 、50 μg 、75 μg 、100 μg 、150 μg 、又は200 μg を含み得る。あるいは、核酸の典型的な有効量は、100 μg ～1mgの間、例えば100 μg ～500 μg 、例えば、100 μg 、150 μg 、200 μg 、250 μg 、300 μg 、400 μg 、500 μg 、600 μg 、700 μg 、800 μg 、900 μg 又は1mgであり得る。

【0159】

通常、ヒト用量は0.1ml～2mlの体積である。従って、本明細書に記載される組成物は、例えば単一又は複合の免疫原性成分あたり0.1、0.15、0.2、0.5、1.0、1.5又は2.0mlのヒト用量の体積に製剤化され得る。

【0160】

当業者は、投与経路及び組換えベクターが用いられる治療用途又はワクチン用途に応じて、これらの用量を調整し得る。導入遺伝子の、又はアジュバントのための発現レベル、循環抗体のレベルは、用量投与の頻度を決定するために測定され得る。

【0161】

1回以上のプライム及び/又はブーストステップが用いられる場合、このステップは、毎時、毎日、毎週若しくは毎月、又は毎年投与される単回投与を含み得る。一例として、哺乳動物は、担体中に約10 μg ～約50 μg のプラスミドを含有する1回又は2回の投与を受け得る。送達量又は送達部位は、哺乳動物の種類及び状態に基づいて望ましく選択される。

【0162】

選択された導入遺伝子によってコードされるタンパク質の治療レベル、またはそれに対する免疫応答のレベルは、もしあるとすれば、追加免疫の必要性を決定するために測定され得る。CD8⁺ T細胞応答の評価、又は任意選択で、血清中の抗体力価の評価に続いて、任意選択の追加免疫付与が要求され得る。任意選択で、組換えChAd157ベクターは、単回投与で、又は様々な併用投与計画、例えば、他の活性成分を含む投与計画若しくは治療過程との併用で、又はプライム・ブースト投与計画で、送達され得る。

本発明は、ここから下記の非限定的な実施例によって更に記載される。

【実施例】

【0163】

実施例1：ChAd157の単離およびベクター構築

29種類の異なる野生型チンパンジーアデノウイルスが、アデノウイルスの単離及び解析技術を記載する目的で参照により本明細書に組み入れられるCollocaら、Sci Transl Med. 2012 Jan 4;4(115):115ra2及びWO2010/086189に記載されるような標準的な手法を用いて、様々な欧州内の施設で飼育される健康な若いチンパンジーから単離された。

【0164】

29種類の野生型ウイルスを引き続いてプールし；該プールのウイルスゲノムを、E1領域の欠失を有するベクターのミニライブラリーを作製するために、BACシャトルを用いて大

腸菌BJ5183細胞中での相同組換えによりクローニングした。ΔE1ベクターのミニライブラリーを、Procell 92細胞株へとトランスフェクションし；回収されたベクターを16回の感染継代のために順番に継代した。第16継代において、ウイルスDNAを、増幅させたベクターから調製し、プラスミドシャトルを用いて大腸菌BJ5183細胞での相同組換えによりクローニングした。優勢なベクター種をChAd157 ΔE1ベクターとして特定し、続いて、ベクター骨格の以下の追加の改変：

(a) ΔE1ウイルスのE4領域 (bp 34413 ~ bp 37127) の欠失；

(b) ヒトAd5由来のE4orf6の挿入

を有するように改変した。

【 0 1 6 5 】

1.1：ΔE1ミニライブラリー作製

29種類の野生型ウイルスのプールを用いて、プールされたウイルスゲノムを取得した。プールしたウイルスゲノムを、プールされたウイルスDNA及びサブグループC BACシャトル (#1365) (配列番号 1 4) で同時形質転換した大腸菌株BJ5183における相同組換えによって、BACベクターにクローニングした。図 2 に示されるように、サブグループCシャトルは、C種に属するChAdのクローニングに特化したBACベクターであり、従って、pIX遺伝子、及びC種 ChAdウイルスの左右の末端 (左右のITRを含む) に由来するDNA断片を含有する。

【 0 1 6 6 】

C種BACシャトルはまた、左末端とpIX遺伝子との間に挿入されたRpsL-Kanaカセットを有する。加えて、ISceI制限酵素認識部位と隣接したAmp-LacZ-SacB選択カセットが、pIX遺伝子とウイルスゲノムの右末端との間に存在する。詳細には、BACシャトルは、以下の特性：左ITR：bp 27 ~ 139、hCMV(tetO) RpsL-Kanaカセット：bp 493 ~ 3396、pIX遺伝子：bp 3508 ~ 3972、ISceI制限酵素認識部位：bp 3990及び7481、Amp-LacZ-SacB選択カセット：bp 4000 ~ 7471、右ITR：bp 7805 ~ 7917を有した。hCMV(tetO)は、配列番号 3 7 に提供される。

【 0 1 6 7 】

BJ5183細胞を、精製したウイルスDNAのプール及びISceI制限酵素で消化した後ゲルから精製したサブグループC BACシャトルベクターで、エレクトロポレーションによって同時形質転換した。pIX遺伝子及び右ITR配列 (C種BACシャトルの線状化されたDNAの末端に存在する) とプールされたウイルスDNA中に存在する相同配列との間で起こる相同組換えは、BACシャトルベクター内への異なるウイルスゲノムDNAの挿入を引き起こす。同時に、ウイルスのE1領域は欠失し、RpsL-Kanaカセットによって置換されて、BAC/ミニライブラリー ΔE1/TetO hCMV RpsL-Kanaを生じた。

【 0 1 6 8 】

1.2：Procell 92細胞株での ΔE1ミニライブラリー増幅およびChAd157 ΔE1ベクターのクローニング

ΔE1ミニライブラリーを、PmeIを用いて消化し、バルク中の種々のウイルスのライブラリーを回収する目的で、Procell 92パッケージング細胞株をトランスフェクションするために用いた。トランスフェクションの10日後、細胞を回収し、細胞溶解液を3サイクルの凍結 (-70 °C) ・融解 (+37 °C) に供し、2000rpmでの遠心分離により清澄化し、新鮮な細胞に感染させるために用いた。ウイルス増幅の16回の連続継代を、Procell 92細胞での増殖効率に関してウイルス種を選択するために行なった。第16継代でウイルス (1種類又は複数種類) を2回のCsCl勾配遠心分離により精製し、ウイルスDNAを抽出し、プラスミドシャトルを用いて大腸菌BJ5183細胞に相同組換えによりクローニングした。詳細には、BJ5183細胞を、精製したウイルスDNAとサブグループCプラスミドシャトル (配列番号 3 8) とを用いて同時形質転換した。図3に示される通り、サブグループCプラスミドシャトルは、C種に属するChAdのクローニングに特化したプラスミドベクターであり、従って、C種ChAdウイルスの右端および左端 (右側および左型ITRを含む) に由来するDNA断片を含む。

【 0 1 6 9 】

10

20

30

40

50

線状化したサブグループCプラスミドシャトル (PshAI/NdeI/XbaIを用いて消化) の末端に存在する右側および左側 ITR DNA配列と、ウイルスゲノムDNAとの相同組換えにより、プラスミドベクターへのその挿入を可能にした。30種類の異なるクローンを増幅し、制限分析により分析して、9種類の異なるウイルス種を特定した。19種/30種のクローンは、同じ制限パターンを示し、優勢なウイルス種を示した。これらのクローンのうちの1種を選択し、pChAd157 ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551 (配列番号 15) として特定した。

【0170】

1.3: ChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG#1557の構築

GAGカセット (GAGポリヌクレオチド配列: 配列番号 16) を、HCMVプロモーターとBGH polyA配列 (配列番号 39) との間に存在する相同性を利用することによる大腸菌内での相同組換えによって、線状化したプレアデノアクセプターベクター中にクローニングした。

10

プラスミドpARS CV32TetOhCMV GAGをSpeI及びSphIで切断し、tetO、HIV-GAG及びBGH polyA配列とともにHCMVプロモーターを含む2.44Kbの断片を切り出した。

【0171】

HIV-GAG 2.44Kb断片を、相同組換えによって、HCMV及びBGHpAの制御下でRpsL-Kana選択カセットを有するpChAd157 ΔE1/TetO hCMV RpsL-Kana (#1551) アクセプターベクター (SnaBI消化) 中にクローニングした。その結果生じた構築物がpChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG#1557ベクターであった (配列番号 17)。

ChAd157 GAGを担持するプラスミドの構造を、図4に報告する。

20

【0172】

1.4: ChAd157 ΔE1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana#1594の構築

ChAd157 ΔE1ベクターを、次に、骨格中に以下の改変:

(a) ΔE1ウイルスのE4領域 (bp 34413 ~ bp 37127) の欠失;

(b) ヒトAd5由来のE4orf6の挿入

を有するように改変した。

【0173】

クローニング及び大腸菌での相同組換えのいくつかのステップを含む方法を用いて、天然E4領域をAd5 E4orf6コード配列と置換することによって、ヌクレオチド34413 ~ 37127 (ΔE1ベクター配列と一致する) に及ぶE4領域の欠失をベクター骨格に導入した。E4コード領域は完全に欠失しているが、一方E4の天然のプロモーター及びポリアデニル化シグナルは保存された。この目的のために、下記に詳述されるような大腸菌BJ5183での相同組換えによるChAd157の天然E4領域の置換によって、Ad5orf6の挿入を可能にするようにシャトルベクターを構築した。

30

【0174】

pARS C種Ad5E4orf6-1の構築

鋳型としてAd5 DNAを用い、オリゴヌクレオチド5'-ATACGGACTAGTGGAGAAGTACTCGCCTACATG-3' (配列番号 18) 及び5'-ATACGGAAGATCTAAGACTTCAGGAAATATGACTAC-3' (配列番号 19) を用いるPCRによって、Ad5orf6を含むDNA断片を得た。このPCR断片をBglII及びSpeIで消化し、BglII及びSpeIで消化したpARS C種 RLD-EGFPシャトルにクローニングして、プラスミドpARS C種 Ad5orf6-1を作製した。

40

【0175】

pARS C種 Ad5E4orf6-2の構築

鋳型としてプラスミドpChAd157 ΔE1/TetO hCMV RpsL-Kana (#1551) を用い、以下のオリゴヌクレオチド: 5'-ATTCAAGTGTACAGGCGCGCCAAAGCATGACACTGATGTTTCATTTTC-3' (配列番号 20) 及び5'-ACTAGGACTAGTTATAAGCTAGAATGGGGCTTTTGC-3' (配列番号 21) を用いるPCRによって、ファイバーE4 polyA (ChAd157 ΔE1ベクターのbp 34269 ~ bp 34412) を含む144bp DNA断片を増幅した。このPCR断片をBsrGI及びSpeIで消化し、BsrGI及びSpeIで消化したpARSサブグループC Ad5orf6-1にクローニングして、プラスミドpARS C種 Ad5orf6-2 (配列番号 40) を作製した。

50

【 0 1 7 6 】

得られたプラスミドpARS C種Ad5orf6-2はその後、E4領域をChAd157骨格中のAd5orf6で置換するために用いられた。この目的のために、プラスミドpChAd157 Δ E1_TetO hCMV RpsL-Kana (#1551) をPacIで消化し、BamHI/AscI消化したプラスミドpARS C種Ad5orf6-2とともにBJ5183細胞に同時形質転換し、pChAd157 Δ E1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana (#1594) プレアデノプラスミド (配列番号 2 2) を得た。

【 0 1 7 7 】

1.5 : ChAd157 Δ E1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RG#1559の構築

狂犬病ウイルス糖タンパク質 (RG) 発現カセット (狂犬病糖タンパク質ポリヌクレオチド配列 : 配列番号 2 3) を、HCMVプロモーターとBGH polyA配列との間に存在する相同性を利用することによる大腸菌内での相同組換えによって、線状化したプレアデノアクセプターベクター中にクローニングした。

プラスミドpvjTetOhCMV-bghpolyA_RGをSpeI及びAsiSIで切断し、tetO、RG及びBGHpolyA配列とともにHCMVプロモーターを含む2.59Kbの断片を切り出した。

得られたRG 2.59Kb断片を、相同組換えによって、HCMV及びBGHpAの制御下でRpsL-Kana選択カセットを有するpChAd157 Δ E1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana (#1594) アクセプターベクター中にクローニングした。アクセプタープレAdプラスミドを制限エンドヌクレアーゼSnaBIで線状化した。その結果生じた構築物がpChAd157 Δ E1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RG#1559ベクターであった (配列番号 2 4) 。

ChAd157 RGを担持するプラスミドの構造を、図 6 に報告する。

【 0 1 7 8 】

実施例 2 : ベクター産生

ChAd157の生産性を、Procell 92細胞株においてChAd19及びChAd155と比較して評価した。

【 0 1 7 9 】

2.1 : HIV Gag導入遺伝子を含むベクターの産生

ChAd157/GAG、ChAd19/GAG及びChAd155/GAG (HIV Gag導入遺伝子を発現するChAd157、ChAd19及びChAd155ベクター) を、Procell 92中でレスキューおよび増幅し ; 溶解液を用いて、1つのT25フラスコの単層で培養されたProcell 92にそれぞれのベクターを感染させた。300vp/細胞の感染多重度 (MOI) を用い、ChAd19/GAGがhCMVプロモーター中のTetOオペレーターの挿入により転写制御を欠損していたので、テトラサイクリンの存在下で感染を行なった。十分な細胞変性効果が明らかな時点で (ChAd157/GAG及びChAd155/GAGに関しては感染の48時間後、ChAd19/GAGに関しては感染 5 日後)、感染細胞を回収し ; 3回の凍結 / 融解 (-70 ~ 37) によって感染細胞からウイルスを放出させ、その後、溶解液を遠心分離によって清澄化した。プライマー及びCMVプロモーター領域に相補的なプローブを用いた定量PCR分析によって、清澄化溶解液を定量化した。そのオリゴヌクレオチド配列は以下の通りである : CMVfor 5'-CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA-3' (配列番号 2 5)、CMVrev 5'-GACTTGGAATCCCCGTGAGT-3' (配列番号 2 6)、CMVFAM-TAMRAプローブ 5'-ACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTT-3' (配列番号 4 1) (QPCRはABI Prism 7900 Sequence detector - Applied Biosystemで行われた) 。

清澄化溶解液において測定して得られた体積力価 (vp/ml) 及び細胞あたりのウイルス粒子 (vp/cell) で表される比生産性を、下記の表 1 に示す。

【 0 1 8 0 】

【表 1】

表 1: GAG ベクター生産性

ベクター	体積生産性 (vp/ml)	総 vp	細胞比生産性 (vp/細胞)
ChAd157/GAG	4.61E+09	2.30E+10	7.68E+03
ChAd155/GAG	5.42E+09	2.71E+10	9.04E+03
ChAd19/GAG	4.80E+08	2.40E+09	8.00E+02

【0181】

10

2.2: RG導入遺伝子を含むベクターの産生

懸濁培養されたProcell 92中でのRGワクチンベクターの生産性を評価するために、別の一連の実験を行った。実験は、 5×10^5 細胞/mlの細胞密度のProcell 92に感染させることによって、同時にChAd157/RGとChAd155/RGとを比較した。300vp/細胞の感染多重度(MOI)を用いた。感染4日後に感染細胞を回収し、3回の凍結/融解によって感染細胞からウイルスを放出させ、溶解液を遠心分離によって清澄化した。その後、上記に報告されたようなQPCRによって、清澄化溶解液を定量化した。

体積生産性及び細胞比生産性を、下記の表2に示す。

【0182】

20

【表 2】

表 2: RG ベクター生産性

ベクター	体積生産性 (vp/ml)	総 vp	細胞比生産性 (vp/細胞)
ChAd157/RG	9.39E+09	4.69E+11	1.88E+04
ChAd155/RG	1.41E+10	7.04E+11	2.81E+04

【0183】

実施例 3: 導入遺伝子発現レベル

3.1: HIV Gag導入遺伝子の発現レベル

30

HeLa細胞に、HIV Gag導入遺伝子を有するChAd19、ChAd155及びChAd157ベクターを感染させることによる並列実験において、発現レベルを比較した。

HeLa細胞を35mmディッシュに播種して、MOI = 250vp/細胞を用いてChAd19/GAG、ChAd157/GAG及びChAd155/GAG精製ウイルスを感染させた。感染48時間後、感染HeLa細胞の上清を回収し、分泌HIV GAGタンパク質の産生を、市販のELISAキット(HIV-1 p24 ELISA Kit, PerkinElmer Life Science)の使用によって定量化した。メーカーの使用説明書に従い、HIV-1 p24抗原標準曲線を用いて、定量化を行った。

GAGタンパク質のpg/mlで表された結果を、図7に図示する。

【0184】

3.2: RG導入遺伝子の発現レベル

40

ChAd155/RGベクターと比較してChAd157/RGベクターによりもたらされる狂犬病糖タンパク質発現を評価するために、ウェスタンブロット解析も行なった。この目的のために、HeLa細胞を35mmディッシュに播種して、MOI = 250vp/細胞を用いてChAd157/RG及びChAd155/RG精製ウイルスを感染させた。感染48時間後、細胞溶解液を回収し、還元SDS-PAGE、続いてウェスタンブロット解析により、導入遺伝子発現レベルを評価した。

【0185】

等量のタンパク質抽出物を還元SDSゲルに載せ、電気泳動分離後、ニトロセルロース膜にタンパク質を転写し、ウサギポリクローナル抗GP (Cat. No. RBVGP11-S α Diagnostic 1:1000希釈)を用いてプローブとした。一次抗体とともにインキュベートした後、膜を洗浄し、その後、抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート二次抗体

50

とともにインキュベートした。最後に、増強型化学発光（ECL）検出試薬（W3252282、PIERCE）を用いて、化学発光によって、アッセイを現像した。ウェスタンブロットの結果を、図 8 に示す。

【 0 1 8 6 】

矢印で示された約57kDのバンドは、抗GPポリクローナル抗体によって示され、これは狂犬病糖タンパク質の予想分子量に相当する。

ChAd157ベクターの発現レベルは、ChAd155によりもたらされるものと同等であるようであることが、結果により実証された。

【 0 1 8 7 】

実施例 4：マウス免疫付与実験による免疫学的有効性の評価

10

4.1：HIV Gag導入遺伝子を含むベクターの免疫原性

BALB/cマウス（群あたり6匹）において、ChAd155/GAG及びChAd19/GAGと並行してChAd157/GAGベクターの免疫原性を評価した。筋肉内に 10^7 個のウイルス粒子を注射することによって、実験を行った。免疫付与の3週間後に、BALB/cマウスにおいてマッピングされたGAG CD8+ T細胞エピートプを用いて、*ex vivo*インターフェロン- γ （IFN- γ ）酵素結合免疫スポット（ELISpot）によって、T細胞応答を測定した。得られた結果を、図 9 に示し、100万個の脾臓細胞あたりのIFN- γ スポット形成細胞（SFC）として表す。

それぞれの点は1匹のマウスでの応答を示し、線はそれぞれの用量群の幾何平均（geomean）に対応する。CD8免疫優勢ペプチドに対して陽性のマウスの頻度をx軸に示す。

【 0 1 8 8 】

20

4.2 RG導入遺伝子を含むベクターの免疫原性

BALB/cマウスにおいて、ChAd157/RG及びChAd155/RGベクターの免疫学的有効性を評価した。両方のベクターを、 10^7 及び 10^6 vpの用量で筋肉内に注射した。ワクチン接種の7週間後、免疫されたマウスの脾臓細胞を分離し、抗原としてRG由来のペプチドプールを用いて、IFN γ -ELISpotによって分析した（図 10）。

免疫応答のレベルは、予想された通り、投与量の減少に従って低下した。さらに、ChAd155/RGベクターはChAd157/RGよりも高いT細胞応答を誘導したが、これらは有意には異ならなかった（図 10）。

【 0 1 8 9 】

実施例 5：感染性の評価

30

5.1：HIV Gag導入遺伝子を含むベクターの感染性

精製ウイルスの感染性は、免疫細胞化学染色により感染細胞を可視化するためにアデノウイルスヘキソタンパク質に対する抗体を用いて、接着性Procell 92細胞において評価した。ヘキソタンパク質に対する抗体は、アデノウイルスの全ての血清型を認識する。この目的のために、 2×10^5 生存細胞/mlの細胞密度で24ウェルプレートにProcell 92細胞を播種し、MOI = 1vp/細胞、0.5vp/細胞及び0.25vp/細胞を用いて、ChAd157/GAG及びChAd155/GAG及びChAd19/GAGベクターを二連で感染させた。感染から48時間後、冷却メタノールにより感染細胞を固定し、その後、抗ヘキソン抗体を用いて標識した。過剰な抗体は除去される。標識された細胞を、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲート化された二次抗体とともにインキュベートし、検出は、市販のキットVECTOR NOVARED Substrate Kit (SK-4800)を用いて行なう。西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素標識がDAB基質と反応して、暗褐色の生成物を生じる際に、検出が達成される。その後、標識された暗褐色の細胞を、光学顕微鏡により定量化し、感染力価を算出した。結果を以下の表に示す。

40

【表 3】

ウイルス	Vp/ml	Ifu/ml	R (vp/ifu)
ChAd155 GAG	1.32E+11	1.58E+09	84
ChAd157 GAG	1.17E+11	1.23E+09	95
ChAd19 GAG	4.46E+10	3.86E+08	116

【 0 1 9 0 】

ChAd155及びChAd157ウイルスの感染性は同等であり、ChAd19よりも高いことが、結果により実証された。

【 0 1 9 1 】

5.2 : RG導入遺伝子を含むベクターの感染性

ChAd157/RG及びChAd155/RG精製ウイルスの感染性を、上記で報告した通りに、ヘキソン免疫染色性により接着性Procell 92細胞で評価した。結果を以下の表に示す。

【表 4】

ウイルス	Vp/ml	Ifu/ml	R (vp/ifu)
ChAd155/RG	4.23E+11	4.06E+09	104
ChAd157/RG	1.97E+11	1.46E+09	133

ChAd155及びChAd157ウイルスの感染性は同等であることが、結果により実証された。

【 0 1 9 2 】

実施例 6 : ChAd155ベクターとChAd157ベクターとの間の交差中和化の評価

6.1 : ChAd155及びChAd157ベクターが異なる血清型であるか否かのin vivo試験

BALB/cマウス（群あたり6匹）において、ChAd155ベクターとChAd157ベクターとの間の交差中和化を評価した。マウスを、RGを発現する 10^9 vpのChAd155又はChAd157を用いて第0週及び第3週に2回予備免疫付与するか、または生理食塩緩衝液を用いてモックワクチン接種した。3週間後、全部のマウスを、HIV gagをコードする 10^9 vpのChAd157を用いて、1回

【表 5】

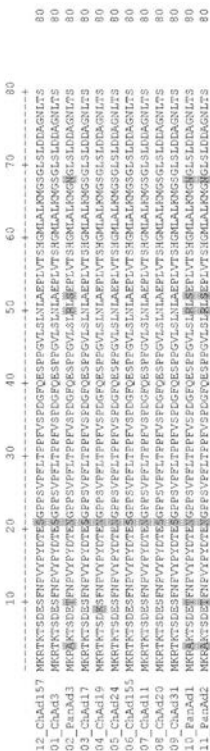
群	n	予備免疫付与 2x w0 及び w3	用量 (vp)	免疫付与 w6	用量 (vp)
1	6	PBS	-	ChAd157-GAG	10^9
2	6	ChAd155-RG	10^9	ChAd157-GAG	10^9
3	6	ChAd157-RG	10^9	ChAd157-GAG	10^9

予備免疫付与ベクターに対する中和力価を、in vitro中和アッセイにより第5週（2回目の注入の2週間後）の血清において測定した（図 1 1）。最終的に、免疫付与の3週間後の脾臓細胞でのgagに対するT細胞応答を、BALB/cマウスにおいてマッピングされたGAG CD8+ T細胞エピトープを用いて、IFN- γ ELISpotによって、試験した（図 1 2）。予備免疫付与のために用いたベクターの用量は、2種類のAdベクターに対する良好な中和活性を引き起こすことができたが、幾分かの変動を有した。抗ChAd155中和抗体は、ChAd157に対して交差反応せず、逆もまた同じである（図 1 1）。さらに、ChAd157-Gag T細胞応答は、抗ChAd155予備免疫により影響されず、このことは、交差中和化が観察されないことを確認した（図 1 2）。

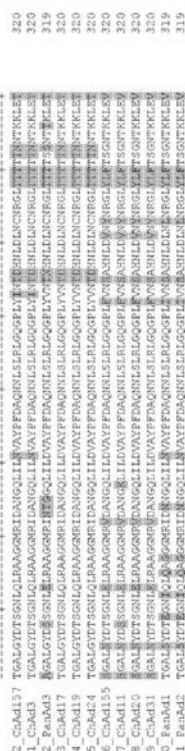
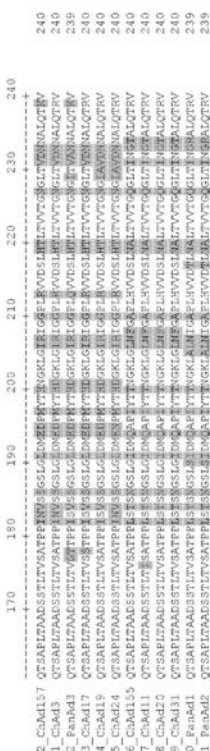
【 0 1 9 3 】

総合すると、これらのデータは、ChAd155及びChAd157ウイルスが異なるアデノウイルス血清型であることを示唆する。

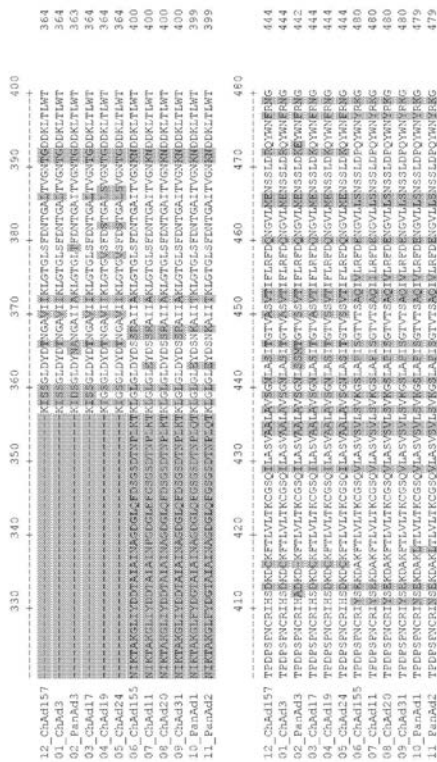
【図 1 A】



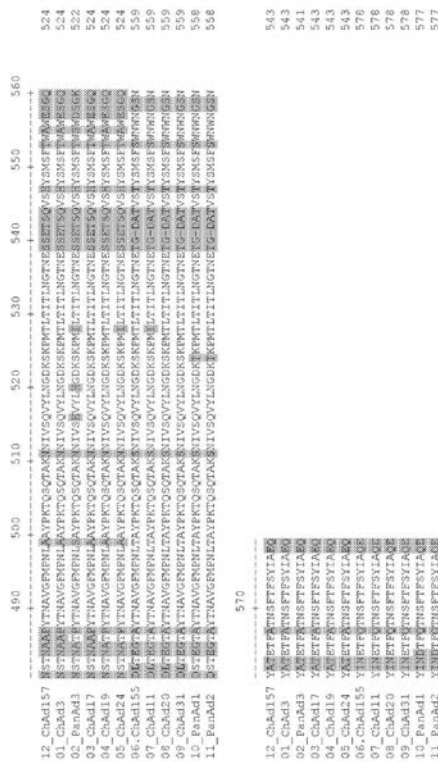
【図 1 B】



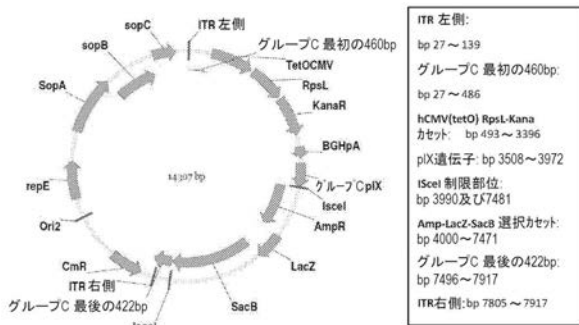
【図 1 C】



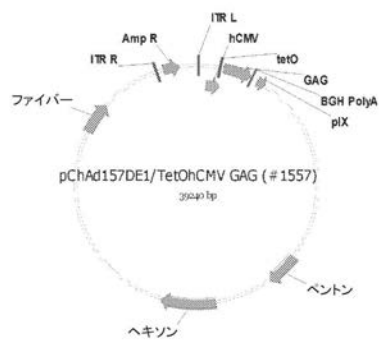
【図 1 D】



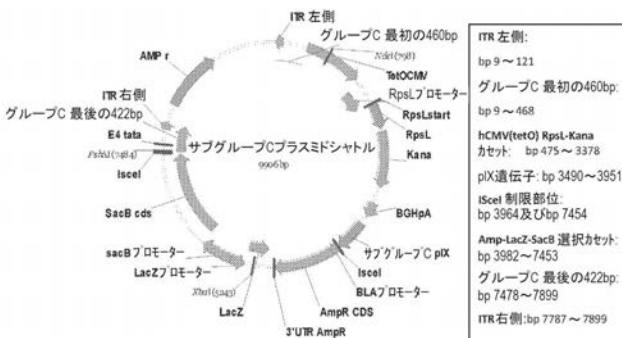
【図 2】



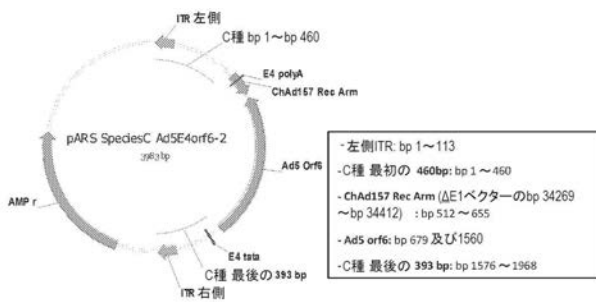
【図 4】



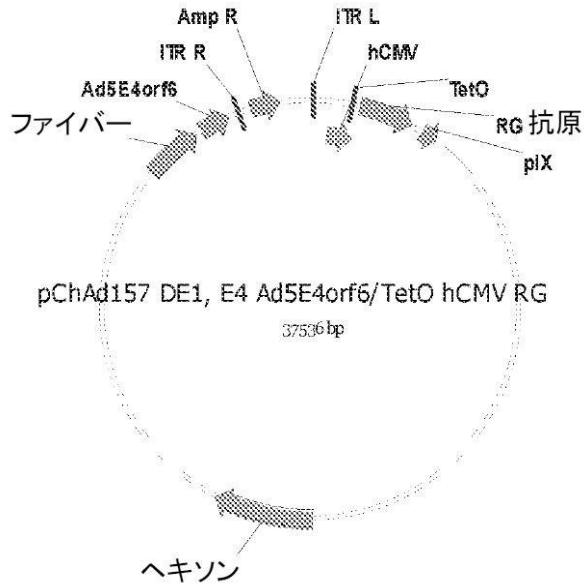
【図 3】



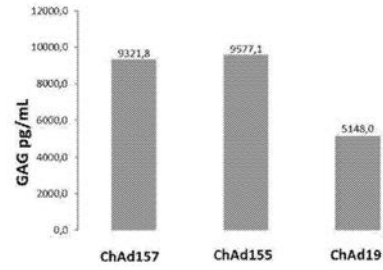
【図 5】



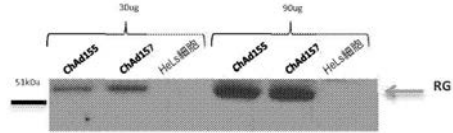
【図 6】



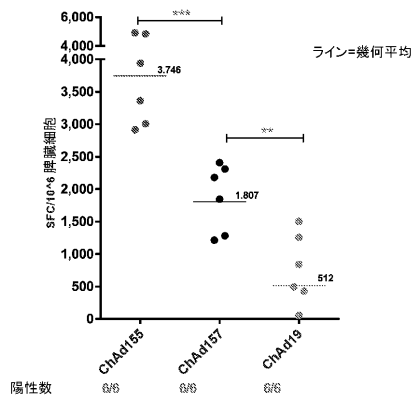
【図 7】



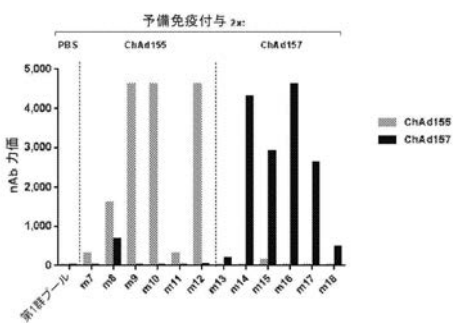
【図 8】



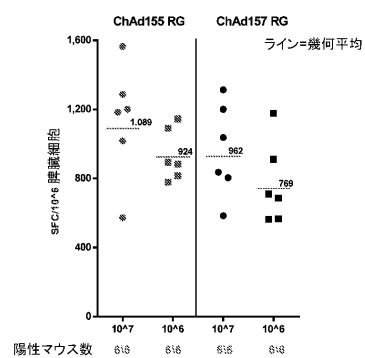
【図 9】



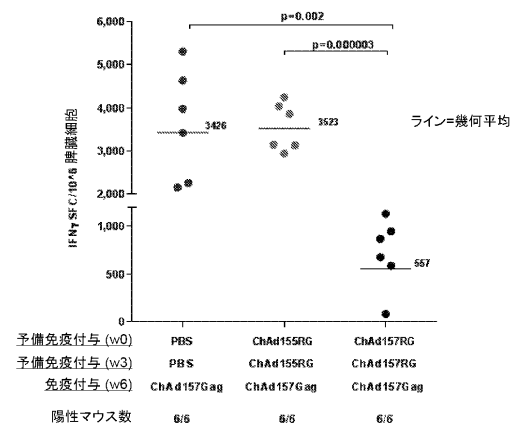
【図 11】



【図 10】



【図 12】



【配列表】

2020511114000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2017/057738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/12 A61K39/235 C07K14/075 C12N15/861
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K C12N

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)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/071093 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CIRILLO AGOSTINO [IT]; COLLOCA STE) 4 August 2005 (2005-08-04) abstract page 4, line 3 - line 12 page 4, line 31 - page 5, line 5 page 6, line 12 - line 35 example 2 sequences 14, 15, 42, 56, 57, 83 -----	1-71
A,P	WO 2016/198621 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE]) 15 December 2016 (2016-12-15) cited in the application the whole document -----	1-71

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 March 2018

Date of mailing of the international search report

20/03/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/057738

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005071093 A2	04-08-2005	AT 449105 T	15-12-2009
		AU 2005206292 A1	04-08-2005
		AU 2011247884 A1	01-12-2011
		CA 2553541 A1	04-08-2005
		CA 2880060 A1	04-08-2005
		CA 2880061 A1	04-08-2005
		CN 101014613 A	08-08-2007
		CN 102719478 A	10-10-2012
		CN 107723298 A	23-02-2018
		CY 1109841 T1	10-09-2014
		CY 1119285 T1	14-02-2018
		DK 1711518 T3	06-04-2010
		DK 2163260 T3	19-06-2017
		EP 1711518 A2	18-10-2006
		EP 2163260 A2	17-03-2010
		EP 3269390 A2	17-01-2018
		ES 2337374 T3	23-04-2010
		ES 2627288 T3	27-07-2017
		HU E033576 T2	28-12-2017
		JP 4814800 B2	16-11-2011
		JP 5427874 B2	26-02-2014
		JP 5753377 B2	22-07-2015
		JP 2007518414 A	12-07-2007
		JP 2011120588 A	23-06-2011
		JP 2012110326 A	14-06-2012
		JP 2014158467 A	04-09-2014
		LT 2163260 T	26-06-2017
		PL 2163260 T3	29-12-2017
		PT 1711518 E	26-02-2010
		PT 2163260 T	08-06-2017
		SI 1711518 T1	30-04-2010
		US 2011217332 A1	08-09-2011
		US 2012328651 A1	27-12-2012
		WO 2005071093 A2	04-08-2005
WO 2016198621 A1	15-12-2016	AU 2016275601 A1	18-01-2018
		AU 2016275619 A1	04-01-2018
		BE 1024420 A1	12-02-2018
		CA 2988481 A1	15-12-2016
		CA 2988654 A1	15-12-2016
		KR 20180011265 A	31-01-2018
		KR 20180012857 A	06-02-2018
		WO 2016198599 A1	15-12-2016
		WO 2016198621 A1	15-12-2016

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 14/075 (2006.01)	C 0 7 K 14/075	
C 1 2 N 15/47 (2006.01)	C 1 2 N 15/47	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	K
A 6 1 K 39/002 (2006.01)	A 6 1 K 39/002	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
	C 1 2 N 1/15	

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

(72)発明者 コロカ, ステファノ

イタリア国 0 0 1 9 8 ローマ, ピア サラリア 7 3

(72)発明者 フォルゴリ, アントネッラ

イタリア国 0 0 1 2 8 ローマ, ピア ディ カステル ロマーノ 1 0 0

(72)発明者 メローネ, ロゼラ

イタリア国 0 0 1 2 8 ローマ, ピア ディ カステル ロマーノ 1 0 0

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA95X AA95Y AB01 BA02 CA45
 4C084 AA01 AA02 AA03 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA01 MA17
 MA22 MA24 MA28 MA52 MA59 MA60 MA66 NA14 ZB091 ZB092
 ZB261 ZB262 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372
 4C085 AA03 AA38 BA07 BA49 BA77 CC08 DD86 EE01 EE06 FF02
 FF03 FF13 FF17 FF20 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
 GG08
 4C087 AA01 AA02 BB64 BB65 BC83 CA12 MA17 MA22 MA24 MA28
 MA52 MA59 MA60 MA66 NA14 ZB09 ZB35 ZB37
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 EA31 FA74