

(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2020-537525

(P2020-537525A)

(43) 公表日 令和2年12月24日 (2020. 12. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861 Z N A Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/34 (2006.01)	C 1 2 N 15/34	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/67 (2006.01)	C 1 2 N 15/67 Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/30 (2006.01)	C 1 2 N 15/30	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/51 (2006.01)	C 1 2 N 15/51	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-521290 (P2020-521290)	(71) 出願人	305060279
(86) (22) 出願日	平成30年10月16日 (2018. 10. 16)		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2年6月11日 (2020. 6. 11)		ズ ソシエテ アノニム
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/078206		ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
(87) 国際公開番号	W02019/076877		ル リュ ドランスティテュ 8 9
(87) 国際公開日	平成31年4月25日 (2019. 4. 25)	(74) 代理人	110002572
(31) 優先権主張番号	62/572, 927		特許業務法人平木国際特許事務所
(32) 優先日	平成29年10月16日 (2017. 10. 16)	(72) 発明者	アメンドラ, ヴァージニア
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		イタリア国 ローマ, ヴィア ディ カス
			テル ロマノ 1 0 0, レイセラ エスア
			ールエル
		(72) 発明者	コロカ, ステファノ
			イタリア国 ローマ, ヴィア サラリア
			7 3, レイセラ エスアールエル
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 複製能力のあるアデノウイルスベクター

(57) 【要約】

外因性免疫原を送達するための複製能力のあるサルアデノウイルスベクターが提供される。本発明のベクターは、外因性免疫原の優れた複製及び発現を実証する。本発明のベクターは、予防及び治療ワクチンとして、並びに遺伝子治療において有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

プロモーター及び導入遺伝子を含む発現カセットを含む、複製能力のあるサルアデノウイルスベクターであって、前記発現カセットが前記ベクターのE3領域、HE1部位又はHE2部位に挿入されている、複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 2】

サルガチンパンジーである、請求項1に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 3】

チンパンジーアデノウイルスファイバーポリペプチド若しくはその機能的誘導体及び/又はチンパンジーアデノウイルスE4領域をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項1に記載の複製能力のあるチンパンジーアデノウイルスベクター。

10

【請求項 4】

ベクターが、ヒトにおける血清有病率が低いアデノウイルスである、請求項1に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 5】

ベクターが、ChAd155である、請求項4に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 6】

ベクターが、ChAd83である、請求項4に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

20

【請求項 7】

プロモーターが、CASIプロモーター及び強化されたサイトメガロウイルスプロモーターから選択される、請求項1に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 8】

プロモーターがCASIプロモーターである、請求項7に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 9】

プロモーターが、強化されたサイトメガロウイルスプロモーターである、請求項7に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

30

【請求項 10】

発現カセットが転写後調節エレメントをさらに含む、請求項1に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 11】

転写後調節エレメントが、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメントである、請求項10に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 12】

導入遺伝子が抗原である、請求項1に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 13】

抗原が、狂犬病ウイルス抗原、呼吸器合胞体ウイルス抗原、ヒト免疫不全ウイルス抗原、結核抗原、マラリア抗原、C型肝炎ウイルス抗原、チクングニア抗原及びB型肝炎ウイルス抗原から選択される、請求項12に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

40

【請求項 14】

発現カセットがE3領域に挿入されている、請求項1に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 15】

発現カセットがHE1領域に挿入されている、請求項1に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 16】

50

発現カセットがHE2領域に挿入されている、請求項1に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 17】

請求項1～16のいずれか一項に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクターを使用して、それを必要とする対象において病原体によって引き起こされる疾患に対する免疫応答を誘導する方法。

【請求項 18】

疾患の予防又は治療のための、請求項1～16のいずれか一項に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクターの使用。

【請求項 19】

筋肉内注射により投与される、請求項1～16のいずれか一項に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 20】

経口投与される、請求項1～16のいずれか一項に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクター。

【請求項 21】

筋肉内注射により投与される、請求項1～16のいずれか一項に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクターを使用する方法。

【請求項 22】

経口投与される、請求項1～16のいずれか一項に記載の複製能力のあるサルアデノウイルスベクターを使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。前記ASCIIコピーは、2018年9月28日に作成され、VU66430_WO_SL.txtという名称で、サイズは100,598バイトである。

【0002】

発明の分野

本発明は、組換えアデノウイルスの分野にある。本発明は、単離された複製能力のあるアデノウイルスベクター、組換えポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、並びにポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列を含む組成物を提供する。

【背景技術】

【0003】

ヒトアデノウイルスは、その大きな導入遺伝子容量、及び様々な標的組織における高効率な遺伝子導入を実現する能力により、遺伝子導入用途に広く使用されている。組換えアデノウイルスは遺伝子治療及びワクチンとして有用である。サルアデノウイルスに基づくウイルスベクターは、核酸ベースのワクチンの開発のためのヒト由来のアデノウイルスベクターの使用に代わるものを提供することができる。

【0004】

大部分のヒトは、ヒトアデノウイルスに曝露され、免疫を生じる。分子を標的に効果的に送達させ、ヒトアデノウイルス血清型に対する既存の免疫の影響を最小化するベクターが求められている。サルアデノウイルスはこの点で有効である。というのも、それらは、ヒトウイルスと十分に近縁であり、ヒトが既存の免疫をほとんど持たないか又は全く持たない送達される外因性抗原に対して免疫を誘導するのに有効である。

【0005】

複製欠損アデノウイルスは、そのゲノムを細胞の内部に送達するが、それらは複製しないため、導入遺伝子ペイロードを増幅しない。典型的には、E1遺伝子は、選択されるプロモーター、及び目的の1つ以上の遺伝子に対応する核酸配列を含む導入遺伝子カセットで

10

20

30

40

50

置換され、それが複製欠損組換えウイルスをもたらす。

【0006】

複製欠損アデノウイルスとは異なり、複製能力のあるアデノウイルスはそのDNA及びその導入遺伝子を複製し、したがって、導入遺伝子発現を非常に大きな程度に増幅する。複製能力のあるアデノウイルスは、効力がより大きい可能性があるが、家族又は医療従事者に伝播し感染するリスクを有する。潜在的な安全性の問題にもかかわらず、複製能力のあるヒトアデノウイルスは、呼吸器疾患に免疫を付与するために、首尾よく使用されている。何十万もの米国軍新兵が、腸溶性カプセル又は錠剤として製剤化された全体ウイルスヒトAd4、Ad7及びAd21の生存非弱毒化分離株を用いて、急性呼吸器疾患に対し効果的かつ安全にワクチン接種された(Cancer Gene Therapy (2004年) 11巻:819頁)。

10

【0007】

ヒト及びイヌの複製能力のあるベクターが記載されているが(Vaccine (2002年) 20巻:3485頁)、疾患の予防又は治療のための免疫原又は治療剤を送達することができるサルスの複製能力のあるアデノウイルスベクターはまだ見出されていない。このようなベクターは、強力な複製能力のあるベクターの利点とサルアデノウイルスの利点を兼ね備えたものである。また、サルベクターはヒト細胞において複製する能力を有するが、一方、サル細胞におけるよりもその複製が不十分であり、そのためそれらの能力は、サルにおける場合と比較して弱められている。したがって、強力な複製という利点とヒトにおける既存の免疫を示さないという利点を兼ね備えたベクターが当技術分野において必要とされている。

20

【発明の概要】

【0008】

本発明の複製能力のあるサルアデノウイルスベクターは、複製欠損サルアデノウイルスベクターよりも強力な遺伝子ベースのワクチン応答を生成する。本発明のベクターは、ヒト免疫化に適した安全なプロファイルを維持しながら、改善されたインビボでの効力を提供するように最適化されている。それらは、本質的に強力な免疫調節性骨格、及び強力であり、持続的な導入遺伝子発現を駆動することができるプロモーターを有する。本発明の複製能力のあるベクターは、対象において免疫応答を誘導するための免疫原性組成物の成分、治療におけるそれらの使用方法及び製造プロセスとして有用である。

【0009】

本発明は、プロモーター及び導入遺伝子を含む発現カセットを含む複製能力のあるサルアデノウイルスベクターであって、その発現カセットはベクターのE3領域、HE1部位又はHE2部位に挿入されている、複製能力のあるサルアデノウイルスベクターを提供する。

30

【0010】

本発明はまた、この複製能力のあるサルアデノウイルスベクターを使用して、それを必要とする対象において病原体によって引き起こされる疾患に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0011】

一実施形態では、サルはチンパンジーである。ベクターはChAd155又はChAd83であり得る。

【0012】

複製能力のあるチンパンジーアデノウイルスは、チンパンジーアデノウイルスファイバーポリペプチド若しくはその機能的誘導体及び/又はチンパンジーアデノウイルスE4領域をコードするヌクレオチド配列をさらに含み得る。

40

【0013】

プロモーターは、CASIプロモーター及び強化されたサイトメガロウイルスプロモーターから選択され得る。一実施形態では、発現カセットは、転写後調節エレメントをさらに含み得る。一実施形態では、転写後調節エレメントは、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメントである。

【0014】

導入遺伝子は抗原であり得る。抗原は、狂犬病ウイルス抗原、呼吸器合胞体ウイルス抗

50

原、ヒト免疫不全ウイルス抗原、結核抗原、マラリア抗原、C型肝炎ウイルス抗原、チクングニア抗原及びB型肝炎ウイルス抗原から選択され得る。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】複製能力のあるサルアデノウイルス構築物。逆方向末端反復(ITR)は3'及び5'末端に隣接する。E1は初期遺伝子1である。CMVはサイトメガロウイルスプロモーターである。CASIはCASIプロモーター、RGはモデル抗原であり、WPREはウッドチャック肝炎転写後調節エレメントであり、E3は、初期遺伝子3が欠失していることを示す。ファイバーはファイバータンパク質をコードするアデノウイルス遺伝子を示し、E4は初期遺伝子4である。複製能力のあるサルアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムのE3領域の代わりに導入遺伝子発現カセット(「RC1」)を挿入し(上部パネル)、HE1領域、すなわち、ファイバー遺伝子の停止コドンとE4領域の間に導入遺伝子発現カセットを挿入し(中央パネル)、又はHE2領域、すなわち、右ITRの下流に導入遺伝子発現カセット(「RC2」)を挿入する(下部パネル)ことによって構築された。

10

【図2】初代ヒト細胞株においてRC1及びRC2ベクターを発現する複製能力のあるChAd155及びChAd83の生産。バーは、細胞あたりの発現したウイルス粒子の数を表す。

【図3】初代ヒト細胞株においてRC1及びRC2ベクターを発現する複製能力のあるChAd155及びChAd83の全ウイルスゲノムコピー数。バーは、細胞あたりのベクターゲノムコピー数を表す。

【図4】感染多重度250及び1250での初代ヒト細胞株によるChAd155複製欠損(RD)及び複製能力のある(RC1及びRC2)ベクターの発現レベル。ベクターは、狂犬病糖タンパク質導入遺伝子(51kDa)を発現し、それはウエスタンブロットによって実証されている。左側パネルは感染後の2日目の発現を示し、右側パネルは感染後の7日目の発現を示す。

20

【図5】感染多重度250及び1250での初代ヒト細胞株によるChAd83複製欠損(RD)及び複製能力のある(RC1及びRC2)ベクターの発現レベル。ベクターは、狂犬病糖タンパク質導入遺伝子(51kDa)を発現し、それはウエスタンブロットによって実証されている。上部パネルは感染後の2日目の発現を示し、下部パネルは感染後の7日目の発現を示す。

【図6】マウス細胞株NMuLi(上部パネル)及びVero非ヒト霊長類細胞株(下部パネル)における複製能力のあるChAd155 RC1及びRC2、並びにChAd83発現RC1及びRC2ベクターのウイルスゲノムコピー数。細胞は感染多重度50及び250で感染させた。

30

【図7】マウス細胞株におけるモデル狂犬病糖タンパク質(RG)導入遺伝子を発現するChAd155 RC1及びRC2ベクターの発現レベルの比較であり、それは感染後の2日目及び5日目のウエスタンブロットによって実証されている(上部パネル)。マウス細胞株における、ChAd155 RC1及びRC2ベクターと、モデル狂犬病糖タンパク質(RG)導入遺伝子を発現するChAd83 RC1及びRC2ベクターとの発現レベルの比較であり、それは感染後の2日目及び5日目のウエスタンブロットによって実証されている(下部パネル)。細胞は感染多重度50、250及び1250で感染させた。

【図8】マウスにおけるモデルタンパク質導入遺伝子を発現するChAd155複製欠損(RD)、ChAd155 RC1及びChAd83 RC1ベクターの免疫原性であり、それらはIFN-ガンマELISpotにより測定され、 10^6 個の脾臓細胞あたりのスポット形成細胞数として表される。

40

【図9】マウスにおけるモデル狂犬病糖タンパク質タンパク質導入遺伝子を発現するChAd155 RD及びChAd155 RC1の経口及び筋肉内(IM)送達に対する、中和抗体(上部パネル)及びT細胞(下部パネル)応答。上部パネルは、狂犬病感染に対する中和抗体防護を示し、それは蛍光抗体ウイルス中和アッセイ(FAVN)により測定される。点線は防護の閾値を示す。下部パネルは、狂犬病特異的T細胞応答を示し、インターフェロンガンマELISpotアッセイにより測定される。

【発明を実施するための形態】

【0016】

配列のアノテーション

配列番号1-野生型ChAd155をコードするポリヌクレオチド配列

50

配列番号2-野生型ChAd83をコードするポリヌクレオチド配列

配列番号3-CASIプロモーターをコードするポリヌクレオチド配列

配列番号4-強化されたhCMVプロモーターをコードするポリヌクレオチド配列

【0017】

発明の詳細な説明

アデノウイルス

アデノウイルスは、エンベロープのない二十面体ウイルスであり、約36kbの線状二本鎖DNAゲノムを有する。アデノウイルスは、宿主細胞のゲノムに組み込まれることなく、分裂細胞と非分裂細胞の両方を含むいくつかの哺乳動物種の多数の細胞型に形質導入することができる。それらは、証明された安全性、様々な標的組織において高効率な遺伝子導入を達成する能力、及び大きな導入遺伝子容量により、遺伝子導入用途に広く使用されている。ヒトアデノウイルスベクターは、現在、遺伝子治療及びワクチンに使用されているが、一般的なヒトアデノウイルスへの以前の曝露後の、既存の免疫の世界的な普及率が高いという欠点がある。

10

【0018】

アデノウイルスは、3つの主要なタンパク質であるヘキソン(II)、ペントンベース(III)、及びノブ化(knobbed)ファイバー(IV)、並びに他のいくつかのマイナータンパク質VI、VII、IX、IIIa及びIVa2を含む二十面体キャプシドを有する特徴的な形態を有する。ヘキソンは、キャプシドの構成成分の大部分を占め、キャプシドは240個の三量体ヘキソンサブソメア及び12個のペントンベースからなる。ヘキソンは、3つの保存されたダブルバレルを有し、その上部は3つのタワーを有し、各々のタワーは、キャプシドの大部分を形成する各サブユニット由来のループを含む。ヘキシソンのベースは、アデノウイルス血清型間で高度に保存されているが、一方、表面ループは可変である。ペントンは、別のアデノウイルスキャプシドタンパク質であり、それはファイバーが付着する五量体ベースを形成する。三量体ファイバータンパク質は、キャプシドの12個の頂点の各々でペントンベースから突き出ており、ノブ化棒状構造である。ファイバータンパク質の主な役割は、ノブ(knob)領域と細胞受容体の相互作用を介してウイルスキャプシドを細胞表面に連結することである。柔軟なシャフトの変化、並びにファイバーのノブ領域は、各種アデノウイルス血清型の特徴である。

20

【0019】

アデノウイルスゲノムは十分に特徴付けられている。線状二本鎖DNAは、塩基性の高いタンパク質VII及び小さなペプチドpX(μ とも呼ばれる)と会合する。別のタンパク質であるVは、このDNAタンパク質複合体とともにパッケージ化され、タンパク質VIを介してキャプシドへの構造的連結を提供する。同様に配置されている特定のオープンリーディングフレーム、例えば、各々のウイルスのE1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4及びL5遺伝子の位置に関して、アデノウイルスゲノムの全体的な構成には全般的保存がある。アデノウイルスゲノムの各先端は、ウイルス複製に必要な逆方向末端反復(ITR)として公知である配列を含む。アデノウイルスゲノムの5'末端は、パッケージング及び複製に必要な5'シス-エレメント、すなわち、5'ITR配列(複製起点として機能することができる)、及び線状アデノウイルスゲノムとE1プロモーターのエンハンサーエレメントのパッケージングに必要な配列を含有する天然の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キャプシド形成に必要な、ITRを含む3'シス-エレメントを含む。ウイルスはまた、感染性ビリオンを生産するために必要な構造タンパク質のいくつかを処理するために必要である、ウイルスにコードされたプロテアーゼを含む。

30

40

【0020】

アデノウイルスゲノムの構造は、ウイルス遺伝子が宿主細胞の形質導入後に発現される順序に基づいて記載される。より具体的には、ウイルス遺伝子は、転写がDNA複製の開始前又は開始後に生じるかどうかに応じて、初期(E)又は後期(L)遺伝子と呼ばれる。形質導入の初期段階では、アデノウイルスのE1A、E1B、E2A、E2B、E3及びE4遺伝子が発現して、

50

ウイルス複製のために宿主細胞を準備する。E1遺伝子はマスタースイッチと考えられ、転写活性化因子として作用し、初期と後期の両方の遺伝子転写に関与する。E2はDNA複製に関与する。E3は免疫調節に関与し、E4はウイルスのmRNA代謝を調節する。感染の後期には、ウイルス粒子の構成成分をコードする後期遺伝子L1-L5の発現が活性化する。後期遺伝子は、選択的スプライシングにより主要後期プロモーター(MLP)から転写される。

【0021】

アデノウイルスキャプシドタンパク質及びそれらをコードするポリヌクレオチド

上記で概説したように、アデノウイルスキャプシドは、ヘキソン、ペントン及びファイバーという3つの主要なタンパク質を含む。ヘキソンは、キャプシドの構成成分の大部分を占め、キャプシドは240個の三量体ヘキサカプソメア及び12個のペントンベースからなる。ヘキソンは、3つの保存されたダブルバレルを有するが、一方、その上部は3つのタワーを有し、各々のタワーは、キャプシドの大部分を形成する各々のサブユニットからのループを含む。ヘキサソンのベースは、アデノウイルス血清型間で高度に保存されているが、表面ループは可変である。

10

【0022】

ペントンは、ファイバーが付着する五量体ベースを形成する別のアデノウイルスキャプシドタンパク質である。三量体ファイバータンパク質は、キャプシドの12個の頂点の各々でペントンベースから突き出ており、ノブ化棒状構造である。他のほとんどの二十面体ウイルスの表面と比較したアデノウイルスキャプシドの表面の顕著な相違は、長くて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、細胞受容体との相互作用を介したウイルスキャプシドの細胞表面への連結である。

20

【0023】

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、以下の共通の構造:N末端テール、反復配列で作られた中央シャフト、及びC末端の球状ノブドメイン(又は「ヘッド」)を共有する。中央シャフトドメインは、可変数のベータ-リピートからなる。ベータ-リピートは接続して、高剛性で安定した、3つの絡み合ったらせん状鎖の細長い構造を形成する。シャフトは、N末端テールを球状ノブ構造に接続し、それが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、受容体を側方及び頂端に結合させるための大きな表面を提示する。この構造の効果は、ウイルスキャプシドから遠くに受容体結合部位を与えることであり、したがって、相対的に平らなキャプシド表面によって提示される立体的な制約からウイルスを解放する。

30

【0024】

多くのアデノウイルス血清型のファイバーは、同じ全体的構造を有するが、それらの機能及び構造に影響を与える可変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いくつかの露出した領域は、容易に適応可能な受容体結合部位を提示する。ファイバーノブの球状形状は、ノブの側面又はファイバーノブの上部に受容体を結合させることができる。これらの結合部位は、典型的には、ヒトアデノウイルスのうちあまり保存されていないベータ鎖を接続する表面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、三次及び四次構造を保存しながら、ノブに様々な表面特徴を与える。例えば、ファイバーノブ配列の等電点の範囲が広いと、ノブ表面の静電ポテンシャル及び電荷分布は変動し、pIはアデノウイルス「Ad」8、Ad19、及びAd37についての約9から亜群Bのアデノウイルスについての約5まで変動する。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、ウイルスキャプシドからいくつかの配向及び距離(シャフト)において様々な結合表面(ノブ)を提示させることができる。

40

【0025】

一部の血清型間の最も明白なバリエーションの1つは、ファイバーの長さである。研究は、ファイバーシャフトの長さが、ノブと、その標的受容体を有するウイルスとの相互作用に強く影響を与えることを示している。さらに、血清型間でファイバータンパク質はまた、曲がる能力において変動し得る。シャフトにおけるベータ-リピートは非常に安定した規則的な構造を形成するが、電子顕微鏡(EM)研究は、ファイバー中の明確なヒンジを示

50

している。いくつかのアデノウイルス血清型ファイバー由来のタンパク質配列の分析は、EMで見られるように、シャフト中のヒンジの1つと強く関連する、N末端テールからの3番目のベータ-リピートでのシャフトの反復配列の破壊を示す。ファイバーにおけるヒンジは、ノブが、ウイルスキャプシドに対して様々な配向をとることができるようにし、これにより、ノブ上の受容体結合部位の正しい提示を必要とする受容体結合に対する立体障害を回避することができる。例えば、亜群Dのアデノウイルスの剛性ファイバーは、それ自体は曲がることのできないため、柔軟な受容体又はウイルス付着のために予め配置された受容体を必要とする。

【0026】

異なるAd血清型に対する特定の細胞受容体の同定、及びそれらが組織指向性にどのように寄与するかについての知識は、ファイバーのシュードタイピング技術を使用することにより達成された。一部の亜群のAdはコクサッキーウイルス及びアデノウイルス受容体(「CAR」)を一次受容体として使用するが、多くのAdが代替の一次受容体を使用しており、インビトロ及びインビボで大きく異なる指向性をもたらすことが明らかになりつつある。これらの血清型のファイバーは、それらの一次及び三次構造の明らかな相違、例えば、ファイバーシャフトの剛性、ファイバーシャフトの長さ、並びにCAR結合部位の欠如及び/又は推定されるHSPG結合モチーフの欠如、さらにファイバーノブ内の正味電荷の相違を示す。したがって、代替のファイバーシャフト及びノブを有するAd5粒子のシュードタイピングは、重要な細胞結合ドメインを除去する機会を提供し、さらに、Ad5により達成されたものと比較して、定義された細胞型へのより効率的な(場合によってはより細胞選択的な)導入遺伝子送達を可能にし得る。使用されたファイバーがヒト又は実験モデルにおける血清有病率の低いAd由来である場合、ファイバーのシュードタイプAd粒子の中和もまた減少し得るが、状況は、ベクターの投与の成功を支持する。さらに、全長のファイバー、並びに単離されたファイバーノブ領域は、ヘキソン又はペントンだけではなく、樹状細胞の成熟を誘導することができ、強力なCD8+T細胞応答の誘導に関連付けられる。まとめると、アデノウイルスファイバータンパク質は、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。

【0027】

アデノウイルスの複製

歴史的に、アデノウイルスワクチン開発は、欠損のある非複製ベクターに焦点をあててきた。それらは、複製に必須であるE1領域遺伝子の欠失によって複製欠損にされる。典型的には、非必須のE3領域遺伝子もまた欠失され、外因性導入遺伝子のための余地ができる。次に、外因性プロモーターの制御下にある導入遺伝子を含む発現カセットが挿入される。その後、これらの複製欠損ウイルスは、E1補完細胞で生産される。

【0028】

用語「複製欠損」又は「複製能力のない」アデノウイルスとは、少なくとも機能的欠失(又は「機能喪失」突然変異)、すなわち、その全体を完全に除くことはせずに、遺伝子の機能を損なう欠失又は突然変異、例えば、人工停止コドンの導入、活性部位若しくは相互作用ドメインの欠失又は突然変異、遺伝子などの調節配列の突然変異又は削除、あるいはウイルス複製に必須である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(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/又はE4 ORF1)から選択されるアデノウイルス遺伝子のうちの1つ以上の完全な除去を含むように操作されているために、複製することができないアデノウイルスを指す。好適には、E1及び任意選択的にE3及び/又はE4を欠失させる。欠失させた場合、前述の欠失させた遺伝子領域は、別の配列に対する同一性パーセントを決定する場合、アラインメントにおいて好適には考慮されない。

【0029】

用語「複製能力のある」アデノウイルスとは、細胞に含まれる任意の組換えヘルパータンパク質の非存在下で、宿主細胞において複製することができるアデノウイルスを指す。

好適には、「複製能力のある」アデノウイルスは、無傷の構造遺伝子、並びに以下の無傷又は機能的に必須の初期遺伝子:E1A、E1B、E2A、E2B及びE4を含む。特定の動物から単離された野生型アデノウイルスは、その動物において複製能力がある。

【0030】

本発明のベクター

非ヒトサルアデノウイルスに基づくウイルスベクターは、遺伝子治療及び遺伝子ワクチンのためのヒト由来ベクターの使用に代わるものを表す。非ヒトサルから単離された特定のアデノウイルスは、ヒト起源の細胞におけるそれらの効率的な増殖によって示されるように、ヒトから単離されたアデノウイルスと近縁である。ヒトは、サルアデノウイルスに対する免疫をほとんど生じさせないか又は全く生じさせないため、ヒトアデノウイルスの使用に代わる改善された代替物を提供することを約束する。

10

【0031】

「ベクター」という用語は、少なくとも1つのポリヌクレオチド、又は少なくとも1つのポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドを細胞に導入することができる少なくとも1つのポリペプチドとの混合体を指す。「低い血清有病率」とは、ヒトアデノウイルス5(Ad5)と比較して、既存の中和抗体レベルが低下していることを意味し得る。同様に又はあるいは、「低い血清有病率」とは、約35%未満の血清有病率、約30%未満の血清有病率、約20%未満の血清有病率、約15%未満の血清有病率、約10%未満の血清有病率、約5%未満の血清有病率、約4%未満の血清有病率、約3%未満の血清有病率、約2%未満の血清有病率、約1%未満の血清有病率又は検出不能な血清有病率を意味し得る。血清有病率は、Hum. Gene Ther. (2004年) 15巻:293頁に記載されている方法を使用して、臨床的に意義のある中和力価(50%中和力価>200として定義される)を有する個人のパーセンテージとして測定することができる。

20

【0032】

一実施形態では、本発明のアデノウイルスベクターは、「サルアデノウイルス」とも呼ばれる非ヒトサルアデノウイルスに由来する。多数のアデノウイルスが、非ヒトサル、例えば、チンパンジー、ボノボ、アカゲザル、オランウータン及びゴリラから単離されている。これらのアデノウイルスに由来するベクターは、これらのベクターによってコードされる導入遺伝子に対する強い免疫応答を誘導することができる。非ヒトサルアデノウイルスに基づくベクターの特定の利点には、ヒト標的集団におけるこれらのアデノウイルスに対する交差中和抗体の相対的な欠如が含まれ、したがって、それらの使用により、ヒトアデノウイルスに対する既存の免疫が克服される。例えば、一部のサルアデノウイルスは、既存のヒト中和抗体との交差反応性がなく、特定のチンパンジーアデノウイルスと既存のヒト中和抗体との交差反応は、特定の候補ヒトアデノウイルスベクターの場合における35%と比較して、標的集団の2%にのみ存在する(Sci. Transl. Med. (2012年) 4巻:1頁)。

30

【0033】

本発明のアデノウイルスベクターは、非ヒトアデノウイルス、例えば、サルアデノウイルス由来、例えば、チンパンジー(パン・トログロダイテス(Pan troglodytes))、ボノボ(パン・パニスカス(Pan paniscus))、ゴリラ(ゴリラ・ゴリラ(Gorilla gorilla))及びオランウータン(ポンゴ・アベリ(Pongo abelii)及びポンゴ・ピグナウス(Pongo pygmaeus))由来であり得る。それらには、B群、C群、D群、E群及びG群由来のアデノウイルスが含まれる。チンパンジーアデノウイルスには、限定されないが、ChAd3、ChAd15、ChAd19、ChAd25.2、ChAd26、ChAd27、ChAd29、ChAd30、ChAd31、ChAd32、ChAd33、ChAd34、ChAd35、ChAd37、ChAd38、ChAd39、ChAd40、ChAd63、ChAd83、ChAd155、ChAd157、ChAd0x1、ChAd0x2及びSadV41が含まれる。あるいは、アデノウイルスベクターは、ボノボから単離された非ヒトサルアデノウイルス、例えば、PanAd1、PanAd2、PanAd3、Pan5、Pan6、Pan7(C7とも呼ばれる)及びPan9に由来し得る。ベクターには、全体又は一部に、非ヒトアデノウイルスのファイバー、ペントン又はヘキソンをコードするヌクレオチドが含まれ得る。

40

【0034】

本発明の好ましい実施形態では、サルはチンパンジーである。本発明の一部の実施形態

50

では、複製能力のあるチンパンジーアデノウイルスベクターは、チンパンジーアデノウイルスファイバーポリペプチド若しくはその機能的誘導体及び/又はチンパンジーアデノウイルスE4領域をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0035】

本発明の実施形態では、ベクターは、ヒトにおける血清有病率が低いアデノウイルスであり、「低い血清有病率」は、ヒト対象において30%未満である。本発明のアデノウイルスベクターの実施形態では、アデノウイルスは、ヒト対象において血清有病率が30%未満であり、好ましくはヒト対象において血清有病率を有さず、より好ましくは以前にチンパンジーアデノウイルスと接触したことがないヒト対象において血清有病率を有さない。

【0036】

複製欠損ベクターの遺伝子発現カセット挿入部位の選択は、ウイルス複製に關与することが公知である領域の置換に主に焦点が当てられている。複製能力のあるベクターの遺伝子発現カセット挿入部位の選択は、複製機構を維持しなければならない。ウイルスは、複数のプロモーター及び選択的スプライシングによって制御される非常に複雑な転写ユニットを生成することによって、コーディング能力を最大化する。その結果、複製能力のあるウイルスベクターは、機能的発現カセットのための余地を残しながら、複製に必要な配列を保存しなければならない。

【0037】

好ましい実施形態では、本発明のサルアデノウイルスベクターは、ChAd155又はChAd83である。

【0038】

本発明のアデノウイルスベクターの実施形態では、アデノウイルスDNAは、哺乳動物標的細胞に侵入することができる、すなわち、それは感染性である。本発明の感染性組換えアデノウイルスは、予防又は治療ワクチンとして、及び遺伝子治療のために使用することができる。したがって、一実施形態では、組換えアデノウイルスは、標的細胞への送達のための内因性分子を含む。標的細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ウシ細胞、イヌ細胞、ヤギ細胞、シカ細胞、チンパンジー細胞、カイロプテラ細胞、ウマ細胞、ネコ細胞、ヒト細胞、ルピナス細胞、ヒツジ細胞、ブタ細胞、齧歯類細胞、クマ細胞又はキツネ細胞である。例えば、標的細胞への送達のための内因性分子は、発現カセットであり得る。

【0039】

本発明によれば、プロモーター及び導入遺伝子を含む発現カセットを含み、発現カセットはベクターのE3領域、HE1部位又はHE2部位に挿入されている、複製能力のあるサルアデノウイルスベクターがある。ベクターは、複製に必要なE1領域又はその断片を含む。

【0040】

一実施形態では、プロモーターは、CASIプロモーター及び強化されたサイトメガロウイルスプロモーターから選択される。

【0041】

さらなる実施形態では、発現カセットは、転写後調節エレメントをさらに含んでもよく、転写後調節エレメントは、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメントであり得る。

【0042】

別の実施形態では、導入遺伝子は抗原である。抗原は、狂犬病ウイルス抗原、呼吸器合胞体ウイルス抗原、ヒト免疫不全ウイルス抗原、結核抗原、マラリア抗原、C型肝炎ウイルス抗原、チクングニア抗原及びB型肝炎ウイルス抗原から選択され得る。

【0043】

本発明の実施形態では、複製に必要なE1領域又はその断片が存在し、目的の外因性配列が、完全に又は部分的に欠失させたE3領域に挿入されている。一実施形態では、ベクターは、左ITR領域、続いてE1領域、次にE3領域を含み、これは、プロモーター、目的の抗原、及び任意選択的に追加のエンハンサーエレメントを含む発現カセットで置換されている。これらの後にファイバー領域、E4領域、及び右ITRが続く。翻訳は右方向に生じる。さらなる実施形態では、プロモーターはCMVプロモーターである。またさらなる実施形態で

10

20

30

40

50

は、エンハンサーエレメントは、B型肝炎翻訳後調節エレメント (HPRE) 又はウッドチャック肝炎翻訳後エレメント (WPRE) である。

【0044】

他の実施形態では、ベクターは、左 ITR 領域; 続く E1 領域; 完全に又は部分的に欠失させた E3 領域; ファイバー領域; E4 領域; プロモーター、目的の抗原、及び任意選択的に HE1 部位、すなわちファイバー遺伝子の停止コドンと E4 領域の間 (「HE1 部位」) に挿入された 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含む発現カセット; 続く右 ITR を含む。ChAd155 HE1 挿入部位は、野生型 ChAd155 配列の塩基対 (bp) 34611 と 34612 の間にある。ChAd83 HE1 挿入部位は、野生型 ChAd83 配列の塩基対 (bp) 33535 と 33536 の間にある。翻訳は右方向に行われる。さらなる実施形態では、プロモーターは CASI プロモーターである。なおさらなる実施形態では、エンハンサーエレメントは HPRE 又は WPRE である。

10

【0045】

さらなる実施形態では、ベクターは、左 ITR 領域; 続く E1 領域; 完全に又は部分的に欠失させた E3 領域; ファイバー領域; E4 領域; プロモーター、目的の抗原、及び任意選択的に HE2 部位、すなわち左 ITR の末端と E4 mRNA のキャップ部位の間 (「HE2 部位」) に挿入された 1 つ以上のエンハンサーエレメントを含む発現カセット; 続く右 ITR を含む。ChAd155 HE2 挿入部位は、野生型 ChAd155 配列の塩基対 (bp) 37662 と 37663 の間にある。ChAd83 HE2 挿入部位は、野生型 ChAd83 配列の塩基対 (bp) 36387 と 36388 の間にある。翻訳は左方向に行われる。さらなる実施形態では、プロモーターは CASI プロモーターである。なおさらなる実施形態では、エンハンサーエレメントは HPRE 又は WPRE である。

20

【0046】

HE1 及び HE2 部位は、導入遺伝子の挿入部位として同定されたが、これは、これらの特定の点への挿入が、ChAd155 及び ChAd83 のコード配列又は調節配列を中断しないためである。したがって、ChAd ゲノムの HE1 又は HE2 部位への発現カセットの挿入は、ウイルス複製サイクルに影響を及ぼさない。

【0047】

本発明の一実施形態では、ベクターは、アデノウイルスベクターの機能的誘導体又は免疫原性誘導体である。「アデノウイルスベクターの誘導体」とは、ベクターの改変バージョンを意味し、例えば、ベクターの 1 つ以上のヌクレオチドが欠失、挿入、修飾又は置換されている。

30

【0048】

調節エレメント

調節エレメント、すなわち発現制御配列には、適切な転写開始、終結、プロモーター及びエンハンサー配列; 効率的な RNA プロセッシングシグナル、例えば、ウサギのベータ-グロビンポリ A を含むスプライシング及びポリ A デニル化 (ポリ A) シグナル; テトラサイクリン調節可能システム、マイクロ RNA、転写後調節エレメント、例えば、WPRE、ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント; 細胞質 mRNA を安定化する配列; 翻訳効率を高める配列 (例えば、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; 必要に応じて、コードされた生成物の分泌を高める配列が含まれる。

【0049】

「プロモーター」は、RNA ポリメラーゼの結合を可能にし、遺伝子の転写を誘導するヌクレオチド配列である。典型的には、プロモーターは、転写開始部位の近傍の、遺伝子の非コード領域に配置される。転写の開始において機能するプロモーター内の配列エレメントは、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。プロモーターの例には、限定されないが、細菌、酵母、植物、ウイルス、並びにサル及びヒトを含む哺乳動物由来のプロモーターが含まれる。内部、天然、構成的、誘導性及び/又は組織特異的なプロモーターを含む、多数の発現制御配列が当技術分野において、公知であり、利用することができる。

40

【0050】

本発明のプロモーターは、典型的には異種プロモーターである。「異種」とは、それが

50

比較されている実体の残りの部分とは遺伝子型が異なる実体に由来することを意味する。本発明のプロモーターは、構成的又は誘導性であり得る。構成的プロモーターは、調節の影響とは無関係にRNA合成を開始する。誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外因的に供給される化合物、環境要因、例えば温度、又は特定の生理学的状態の存在によって調節することができる。

【0051】

本発明のプロモーターには、限定されないが、CMVプロモーター、ベータ-アクチンプロモーター、例えば、ニワトリベータアクチン(CAG)プロモーター、CASIプロモーター、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、TBGプロモーター、レトロウイルスラウス肉腫ウイルスLTR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、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、EF1aプロモーター、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン(MT)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導性マウス乳がんウイルス(MMTV)プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーターシステム、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制性システム、テトラサイクリン誘導性システム、RU486誘導性システム及びラパマイシン誘導性システムが含まれる。

10

【0052】

導入遺伝子は、組織特異的プロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、骨格筋における発現が望まれる場合、筋肉において活性なプロモーターを使用すべきである。これらには、骨格ベータ-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、並びに天然に存在するプロモーターよりも高い活性を有する合成筋プロモーターが含まれる。組織特異的であるプロモーターの例として、肝臓では、例えば、アルブミン、B型肝炎ウイルスコア、アルファ-フェトプロテイン(AFP);骨では、例えば、オステオカルシン、骨シアロタンパク質;リンパ球では、例えば、CD2、免疫グロブリン重鎖及びT細胞受容体鎖;及びニューロンでは、例えば、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)が公知である。

20

【0053】

任意選択的に、治療的に有用な生成物又は免疫原性の生成物をコードする導入遺伝子を有するベクターは、選択可能マーカー又はレポーター遺伝子も含み得る。レポーター遺伝子は、当技術分野において公知であるものから選択することができる。好適なレポーター遺伝子には、限定されないが、強化された緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、及び、とりわけジェネティシン、ハイグロマイシン又はブリマイシン耐性をコードする配列を含み得る分泌型胚アルカリホスファターゼ(seAP)が含まれる。このような選択可能レポーター又はマーカー遺伝子(ウイルス粒子にパッケージ化されるようにウイルスゲノムの外に位置しても又はしなくてもよい)を使用して、アンピシリン耐性などの細菌細胞内のプラスミドの存在を示すことができる。ベクターの他の成分は、複製起点を含み得る。

30

【0054】

好適なプロモーターには、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター及びCASIプロモーターが含まれる。CMVプロモーターは、強力であり、遍在的に活性である。それは、多くの組織型において高レベルの導入遺伝子発現を駆動する能力を有し、当技術分野において周知である。CMVプロモーターは、CMVエンハンサーの有無にかかわらず、本発明のベクターにおいて使用することができる。

40

【0055】

CASIプロモーターは、CMVエンハンサー、ニワトリベータ-アクチンプロモーター、並びにユビキチン(UBC)エンハンサーに隣接するスプライスドナー及びスプライスアクセプターの組み合わせとして記載される合成プロモーターである(米国特許第8,865,881号)。

【0056】

一部の実施形態では、CASIプロモーターは、配列番号3と少なくとも約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%、又はそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み得る。一部の実施形態では、プロモータ

50

ーは、配列番号3の核酸配列を含むか又はそれからなる。一部の実施形態では、強化されたhCMVプロモーターは、配列番号4と少なくとも約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%、又はそれを超える配列同一性を有する核酸配列を含み得る。一部の実施形態では、プロモーターは、配列番号4の核酸配列を含むか又はそれからなる。

【0057】

好適なプロモーターにはまた、限定されないが、チンパンジー伸長因子1プロモーター(chEF1)(強い活性を有する遍在的プロモーター)が含まれ、これはインビボで導入遺伝子の持続的な発現をもたらす。一実施形態では、プロモーターは、CMVエンハンサーを有するヒトフェリチン軽鎖プロモーターである。この実施形態では、フェリチンによる鉄調節を排除するため、フェリチン重鎖及び軽鎖の5'UTRは、チンパンジー伸長因子1アルファの5'UTRに置換されている。一実施形態では、プロモーターは、CMVエンハンサーを有するニワトリベータアクチンプロモーターである。一実施形態では、プロモーターは、ハイブリッドプロモーターである。一実施形態では、ハイブリッドプロモーターは、CMVエンハンサー及びユビキチン遺伝子エンハンサーを有するCMVプロモーターであり、従来のCMVプロモーターよりも強力なプロモーターである。

【0058】

本明細書で使用される「転写後調節エレメント」は、転写された場合、本発明のウイルスベクターによって送達される導入遺伝子(複数可)又はその断片の発現を増強するDNA配列である。転写後調節エレメントには、限定されないが、B型肝炎ウイルス転写後調節エレメント(HPRE)及びウッドチャック肝炎転写後調節エレメント(WPRE)が含まれる。WPREは、すべてのプロモーターではないが、特定のプロモーターによって駆動される導入遺伝子発現を増強することが実証されている、三部構成シス作用エレメントである。

【0059】

本発明の実施形態では、ChAd155ベクターは、プロモーター、エンハンサー、及びレポーター遺伝子のうちの1つ以上を含み得る。例えば、本発明のベクターは、任意選択的にテトラサイクリンのオン/オフ転写制御を有する、ChAd155-強化hCMV-SeAP、ChAd155-CAS1-seAP及びChAd155-hCMV-seAP、並びにテトラサイクリンのオン/オフ転写制御を有するChAd155-CMV-hFerL-chEF1-seAPを含むことができる。

【0060】

本発明の実施形態では、ChAd83ベクターは、プロモーター、エンハンサー、及びレポーター遺伝子のうちの1つ以上を含み得る。例えば、本発明のベクターは、任意選択的にテトラサイクリンのオン/オフ転写制御を有する、ChAd83-強化hCMV-SeAP、ChAd83-強化hCMV-SeAP、ChAd83-CAS1-seAP及びChAd83-hCMV-seAP、並びにテトラサイクリンのオン/オフ転写制御を有するChAd83-CMV-hFerL-chEF1-seAPを含むことができる。

【0061】

本発明のベクターは、当業者に公知である技術と組み合わせて、本明細書に提供される技術を使用して生成される。そのような技術には、従来のcDNAのクローニング技術、例えば本文に記載されているもの、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が含まれる。

【0062】

導入遺伝子

アデノウイルスベクターを使用して、インビボでの発現のために、所望のRNA又はタンパク質配列、例えば異種配列を送達することができる。本発明のベクターは、裸のDNA、ファージ、トランスポゾン、コスミド、エピソーム、プラスミド又はウイルス成分を含む任意の遺伝的エレメントを含み得る。本発明のベクターは、サルアデノウイルスDNA及び発現カセットを含有し得る。「発現カセット」は、宿主細胞における導入遺伝子の翻訳、転写及び/又は発現に必要な導入遺伝子及び調節エレメントを含む。

【0063】

10

20

30

40

50

「導入遺伝子」は、目的のポリペプチドをコードする、導入遺伝子に隣接するベクター配列に対して異種である核酸配列である。核酸コード配列は、宿主細胞における導入遺伝子の転写、翻訳、及び/又は発現を可能にする様式で調節成分に作動的に連結される。本発明の実施形態では、ベクターは、治療レベル又は予防レベルで導入遺伝子を発現する。トランスジェニックポリペプチドの「機能的誘導体」は、例えば、1つ以上のアミノ酸が欠失、挿入、修飾又は置換されている、ポリペプチドの改変バージョンである。

【0064】

導入遺伝子は、例えば、免疫応答を誘導するためのワクチンとして、欠損遺伝子若しくは欠如遺伝子を修復又は置換することによって遺伝的欠損を修復するために、又はがん治療薬として、予防又は治療に使用され得る。本明細書で使用される場合、免疫応答の誘導とは、タンパク質が当該タンパク質に対するT細胞及び/又は液性抗体免疫応答を誘導する能力を指す。

10

【0065】

導入遺伝子によって誘発される免疫応答は、中和抗体を生産する抗原特異的B細胞応答であり得る。誘発された免疫応答は、全身的及び/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、例えば、インターフェロンガンマ(IFNガンマ)、腫瘍壊死因子アルファ(TNFアルファ)及び/又はインターロイキン2(IL2)などのサイトカインを発現するCD4+T細胞を伴う応答などのCD4+T細胞応答を含み得る。あるいは又はさらに、抗原特異的T細胞応答は、サイトカイン、例えば、IFNガンマ、TNFアルファ及び/又はIL2を発現するCD8+T細胞を伴う応答などのCD8+T細胞応答を含む。

20

【0066】

本発明の導入遺伝子には、限定されないが、狂犬病ウイルス抗原、例えば、狂犬病糖タンパク質(RG)、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)抗原、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)抗原、結核抗原、マラリア抗原、C型肝炎ウイルス(HCV)抗原、チクングニア抗原及びB型肝炎(HBV)抗原が含まれる。

【0067】

導入遺伝子配列の構成は、得られるベクターが置かれる用途に依存する。一実施形態では、導入遺伝子は、生物学的及び医学的に有用な生成物をコードする配列であり、例えば、予防的導入遺伝子、治療的導入遺伝子又は免疫原性導入遺伝子、例えば、タンパク質又はRNAである。タンパク質導入遺伝子には抗原が含まれる。本発明の抗原性導入遺伝子は、疾患を引き起こす生物に対する免疫原性応答を誘導する。RNA導入遺伝子には、tRNA、dsRNA、リボソームRNA、触媒RNA、及びアンチセンスRNAが含まれる。有用なRNA配列の例は、処置された動物における標的化された核酸配列の発現を消滅させる配列である。

30

【0068】

あるいは、導入遺伝子配列は、発現時に検出可能なシグナルを生成するレポーター配列を含み得る。このようなレポーター配列には、限定されないが、ベータ-ラクタマーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ(LacZ)、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(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、膜結合タンパク質、例えば、CD2、CD4、CD8、インフルエンザ血球凝集素タンパク質、及び高親和性抗体が存在するか又は従来手段によって生産され得る当該技術分野において周知である他のもの、並びに、とりわけ血球凝集素又はMyc由来の抗原タグドメインに適切に融合し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配列が含まれる。これらのコード配列は、それらの発現を駆動する調節エレメントと会合する場合、酵素、放射線学、比色分析、蛍光又は他の分光分析、蛍光活性化細胞選別分析、及び酵素結合免疫吸着分析(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)及び免疫組織化学を含む免疫分析などの、従来手段によって検出可能なシグナルを提供する。

40

【0069】

遺伝暗号の冗長性の結果として、ポリペプチドは、様々な異なる核酸配列によってコードされ得る。コーディングは、いくつかの同義語コドン、すなわち、他のアミノ酸ではなく、同じアミノ酸をコードするコドンを使用するように偏っている。「コドン最適化され

50

た」とは、組換え核酸のコドン組成における改変が、アミノ酸配列を変更することなく行われることを意味する。コドン最適化は、生物特異的なコドン使用頻度を使用することによって、異なる生物におけるmRNA発現を改善するために使用されている。

【0070】

コドンバイアスに加えて、及びそれとは独立して、一部の同義語コドン対が他よりも頻繁に使用される。このコドン対バイアスは、一部のコドン対が過剰であり、他のコドン対が過少であることを意味する。コドン対の脱最適化は、ウイルスの病原性を減らすために使用されている。例えば、過少なコドン対を含有するように改変されたポリオウイルスは、翻訳効率の低下を示し、野生型ポリオウイルスと比較して弱毒化されたことが報告されている(Science (2008年) 320巻:1784頁)。コドン対の脱最適化によって合成の弱毒化ウイルスを操作することにより、野生型と同じアミノ酸配列をコードするが、同義語コドンの異なる対ごとの配置を使用するウイルスを生産することができる。コドン対の脱最適化により弱毒化されたウイルスは、野生型と比較して最大1000倍少ないブランクを生成し、より少ないウイルス粒子を生産し、ブランクを形成するためにウイルス粒子が約100倍多く必要であった。

10

【0071】

対照的に、ヒトゲノムにおいて過剰であるコドン対を含有するように改変されたポリオウイルスは、野生型RNAと同様な様式で作用し、野生型RNAと同一のサイズであるブランクを生成した(Colemanら(2008年) Science 320巻:1784頁)。このことは、過剰なコドン対を有するウイルスが、過少なコドン対を有するウイルスと同様の数の突然変異を含有し、野生型と比較して増大した翻訳を示したという事実にもかかわらず起こった。この観察は、コドン対が最適化された構築物が、それらの非コドン対が最適化された対応物と同様な様式で作用することが予測され、機能的利点を提供することは予測されなかったことを示唆する。

20

【0072】

本発明の構築物は、コドン最適化された核酸配列を含み得る。あるいは又はさらに、本発明のベクターは、導入遺伝子又はその免疫原性誘導体若しくは断片のコドン最適化配列を含む。本発明の構築物は、コドン対が最適化された核酸配列を含み得る。あるいは又はさらに、本発明のベクターは、導入遺伝子又はその免疫原性誘導体若しくは断片のコドン対最適化配列を含むか又はそれからなる。

30

【0073】

複製能力のあるアデノウイルスベクターの送達

一部の実施形態では、本発明の組換えアデノウイルスは、皮膚投与、皮内投与、筋肉内注射、腹腔内注射、静脈内注射、粘膜投与、経鼻投与、経口投与、直腸投与、皮下注射、経皮投与又は腔内投与により対象に投与される。

【0074】

治療レジメンが、各々が異なる組成物中に製剤化された1つ以上のアデノウイルスベクター及びさらなる成分の同時投与を伴う場合、それらは、同じ部位に又はその近傍に、同じ位置に投与されることが好ましい。例えば、成分は、同じ側若しくは同じ四肢(「同時側」投与)又は反対側若しくは反対の四肢(「反対側投与」)に(例えば、筋肉内、経皮、皮内、皮下から選択される投与経路を介して)投与することができる。

40

【0075】

本発明の一実施形態では、ベクターは、筋肉内(IM)、すなわち、筋肉への直接注射で投与することができる。筋肉は、血管に富んでいて、取り込みは通常は急速である。

【0076】

本発明の一実施形態では、ベクターは経口投与することができる。経口ワクチン送達は、注射部位での痛みの排除、送達の容易さ及び利便性を含む、筋肉内送達を上回るいくつかの利点を提供する。これにより、資格が劣っている医療従事者がワクチンを効果的に投与することができるようになり、HIV、B型肝炎及びC型肝炎などの有病率が高い地域において、針及び注射器が汚染される可能性を回避することができる。

50

【0077】

口腔粘膜は、ほとんどが角質化していない、層状化した扁平上皮の外層、及び密性結合組織である固有層の下位層から構成される。固有層は、多くの免疫細胞を含み、病原性生物から内部組織を防護する障壁として免疫応答が生じる部位である。経口/消化管経路を介した投与は、単純な円柱上皮の単一細胞層を介して広い表面積への接近を抗原に提供し、それはパイエル板を標的とし、全身応答を誘導する。

【0078】

生存複製能力のあるアデノウイルスは、何十年もの間、経口投与に成功しているが、抗原性導入遺伝子をコードするウイルスベクターの投与はより困難である。免疫認識のメカニズムは、腸の管腔側には容易に接近することができない;これは、食品中の摂取したタンパク質に対する免疫応答の増大から体を防護する。したがって、本発明の構築物は、経口経路を介して腸に送達される場合、タンパク質抗原に対する免疫応答を引き起こすという障害に直面する。例えば、第1相研究では、ヒト対象は、導入遺伝子としてインフルエンザ血球凝集素抗原を用いた複製能力のある生存ヒトAd4ワクチンを経口投薬された。それらは、細胞性免疫応答で応答したが、筋肉内で追加免疫されるまで液性抗体応答を増大させなかった(Lancet Infect Dis (2013年) 13巻:238頁)。同様に、従来のブタは、導入遺伝子としてブタ発熱ウイルス抗原を用いた複製能力のある生存組換えブタアデノウイルスワクチンを経口的又は皮下的に投薬された。経口投薬されたブタはトランスジェニック抗原に対する抗体を生じなかったが、皮下投薬されたブタの75%が、トランスジェニック抗原に対する抗体を生じた(Vaccine (2001年) 146巻:1787頁)。

【0079】

本発明の一実施形態では、ベクターを粘膜投与することができる。粘膜ワクチン送達はまた、ワクチンの筋肉内送達に対するいくつかの利点を提供する。粘膜は体外に隣接しているため、非経口ワクチンと比較してわずかに低い程度の純度で粘膜ワクチンは効果的及び安全であり、したがって、それらは生産することが容易である。それらはまた、典型的には、低用量で有効であり、したがって費用効果が高い。

【0080】

本明細書で使用される「粘膜」送達は、すべての粘膜を包含する。粘膜は、典型的には、上皮及び固有層を含む体腔及び身体通路を裏打ちしている。粘膜は、角質化され得るか又は角質化され得ない。粘膜組織には、限定されないが、肺胞、気管支、口腔、皮膚、子宮内膜、胃、腸、頬、内膜、咀嚼器官、鼻、嗅覚器官、口、耳、口蓋、直腸、特殊(舌)、舌下、気管及び膈粘膜が含まれる。

【0081】

粘膜は、リンパ系マイクロコンパートメント、例えば、パイエル板、腸間膜リンパ節、虫垂、扁桃腺及びアデノイドで構成される高度特殊化免疫系を提供する。粘膜の吸収上皮細胞によって取り込まれた抗原は、シャトル輸送されるか、又は抗原提示細胞に直接提示され、T細胞に提示され得る。粘膜組織における免疫応答は、抗原の性質、抗原提示細胞の種類、及び局所微小環境によって決定される。感作された粘膜B及びT細胞は、最初の抗原の出会いの部位を離れ、リンパ液を通過して血液循環に入る。粘膜送達は、例えば、口腔、生殖器、例えば、膈、鼻腔内、眼、例えば、眼結膜、耳、例えば、内耳、直腸又は舌下であり得る。

【0082】

本発明の一実施形態では、ベクターを舌下投与することができる。舌下経路を介したワクチン送達は、層状化した扁平上皮の角質化していない上皮の非常に薄い層を介した迅速な接近により抗原を提供し、そこでは、それはランゲルハンス細胞を標的とし、全身応答を誘導する。舌下に送達された抗原は、舌下粘膜の樹状細胞の密なネットワークで利用可能になる。舌下に送達された複製能力のあるベクターは肝臓を迂回するため、したがって、初回通過代謝を回避し、その持続性が高まるため、したがって、より強力な免疫応答が生じる可能性がある。

【0083】

本発明の実施形態では、ベクターは、口腔に投与され得る。口腔経路を介したワクチン送達はまだ、舌下層よりも幾分厚い、層状化した扁平上皮の角質化していない上皮の層を介した接近により抗原を提供する。口腔送達はまた、ランゲルハンス細胞を標的とし、全身応答を誘導する。

【0084】

アジュバント

特定の病原体に対する強力で持続的な免疫を確立するためのアプローチには、ワクチンへのアジュバントの添加が含まれる。「アジュバント」とは、組成物の活性成分に対する免疫応答を増大、刺激、活性化、強化又はモジュレートする薬剤を意味する。アジュバント効果は、細胞レベル又は体液レベル、あるいはそれらの両方で生じ得る。アジュバントは、実際の抗原に対する免疫系の応答を刺激するが、免疫学的効果自体は有しない。あるいは又はさらに、本発明のアジュバント添加された組成物は、1つ以上の免疫刺激剤を含み得る。「免疫刺激剤」とは、抗原とともに又は別々に投与されたかどうかにかかわらず、対象の免疫応答の全般的で一時的な増加を誘導する薬剤を意味する。

【0085】

本発明の組成物は、アジュバントの有無にかかわらず投与され得る。あるいは又はさらに、組成物は、1つ以上のアジュバント(例えば、ワクチンアジュバント)を含み得るか又はそれとともに投与され得るが、特に、組成物は、導入遺伝子をコードする本発明のベクターの免疫学的有効量を含む。

【0086】

使用方法/使用

本明細書に開示される免疫学的有効量の構築物又は組成物を投与するステップを含む、それを必要とする対象において病原体によって引き起こされる疾患に対する免疫応答を誘導する方法が提供される。一部の実施形態では、それを必要とする対象においてトランスジェニック抗原に対する免疫応答を誘導するための、本明細書に開示される構築物又は組成物の使用が提供される。本発明のベクターは、感染に起因する疾患の予防、治療又は改善に適用され得る。

【0087】

本発明の方法は、医薬における本発明のベクターの使用を含む。それらは、病原体によって引き起こされる疾患の治療のための本発明のベクターの使用を含む。本発明のベクターは、病原体によって引き起こされる疾患を治療するための医薬の製造において使用することができる。

【0088】

アデノウイルスベクターによる効果的な免疫化は、アデノウイルスベクター骨格の固有の免疫調節能力に依存する。免疫学的に強力でないアデノウイルスは、抗原発現の誘導が少ない。効果的な免疫化はまた、強力で持続的な導入遺伝子発現を駆動するプロモーターの能力に依存する。例えば、ウイルスプロモーターCMV-IEによって駆動されるアデノウイルスベクターは、発現を弱めるサイトカインを誘導するため、長期的な導入遺伝子発現を維持しない。

【0089】

「対象」とは、脊椎動物、例えば哺乳動物、例えば、ヒト又は獣医学対象の哺乳動物を意図している。一部の実施形態では、対象はヒトである。

【0090】

全般

本発明のベクターは、当業者に公知である技術と併組み合わせ、本明細書に提供される技術及び配列を使用して生成される。このような技術には、従来のcDNAのクローニング技術、例えば本文に記載されているもの、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が含まれる。

【0091】

特に説明がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。単数形の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、複数の指示対象を含む。同様に、「又は」という語は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、「及び」を含むことを意図する。「複数」という用語は、2つ以上を指す。さらに、溶液成分の濃度又はその比率などの物質の濃度又はレベル、並びに温度、圧力及びサイクル時間などの反応条件に関して与えられた数値限定は、概算であることが意図される。本明細書で使用される「約」という用語は、 $\pm 10\%$ の量を意味することを意図する。

【0092】

10

ここで、本発明を、以下の非限定的な実施例によってさらに説明する。

【実施例】

【0093】

[実施例1]

複製能力のあるチンパンジーアデノウイルスの構築

野生型チンパンジーアデノウイルスタイプ155(ChAd155)(国際公開第2016/198621号)及びタイプ83(ChAd83)(国際公開第2010/086189号)は、標準的手順を使用して健常なチンパンジーから単離され、Sci Transl Med (2012年) 4巻:1頁及び国際公開第2010/086189号に記載されている複製欠損ウイルスとして構築された。

【0094】

20

複製能力のあるChAd155及びChAd83は、各々、導入遺伝子発現カセットを挿入することによって構築された。発現カセット成分は、古典的なヒトCMVプロモーター又はCASIプロモーターのいずれか、モデル抗原としての狂犬病糖タンパク質、及び任意選択的にWPREエンハンサーを使用した。導入遺伝子カセットの挿入部位は、E3領域の置換、ファイバーとE4領域の間(HE1部位)への挿入、及び右のITRの下流(HE2部位)への挿入を含んでいた。

【0095】

図1の上部パネルは、導入遺伝子カセットがE3領域を置換したRC1ベクターを示す。中央パネルは、導入遺伝子カセットがファイバー遺伝子の停止コドンとE4領域の間(HE1部位)に挿入された構築物を示す。導入遺伝子カセットをHE1部位に挿入した場合、ChAd155は複製に失敗した。しかしながら、ChAd83のHE1部位への導入遺伝子の挿入は、存続可能なベクターを生産した。下部パネルはRC2ベクターを示し、導入遺伝子カセットが右のITRの下流(HE2部位)に挿入されている。E1領域は、RC1とRC2の構成の両方において元のままである。導入遺伝子は、相同組換え技術により、配列番号1及び配列番号2の以下の位置に挿入された：

30

HE1 ChAd155: 配列番号1の塩基対 (bp) 34611と34612の間の挿入部位；

HE2 ChAd155: 配列番号1の塩基対 (bp) 37662と37663の間の挿入部位；

HE1 ChAd83: 配列番号2の塩基対 (bp) 33535と33536の間の挿入部位；

HE2 ChAd83: 配列番号2の塩基対 (bp) 36387と36388の間の挿入部位。

【0096】

[実施例2]

40

ウイルス生産、ベクター力価及び発現

ベクターの複製を評価するための動物モデルを同定するために、タイプCの複製能力のあるアデノウイルスChAd155 RC2及びタイプEの複製能力のあるアデノウイルスChAd83 RC2ベクターを、様々な動物起源の細胞において、ベクター力価及びゲノムコピー数で測定されるそれらの複製能力について評価した。結果を表1に示す。

【0097】

【表 1】

表 1.複製能力のある ChAd155 及び ChAd83 の複製及び発現

細胞株: 種	ベクター	ベクター 力価	ゲノム コピー	発現	
				2 日目	7 日目
MRC5:ヒト	ChAd155	+++	+++	++	++++
	ChAd83	+++++	+++++	+++	+++++
PK15: ブタ	ChAd155	+++++	+++++	NA	NA
	ChAd83	+++	++++	NA	NA
NMuLi: マウス	ChAd155	++	+++	+++	+++
	ChAd83	ND	+	++	++
Vero: 非ヒト霊長類	ChAd155	++	++++	+++	+++
	ChAd83	ND	+	+	+

ND=検出不可; NA=該当なし

【 0 0 9 8 】

表1に示されるように、ヒトMRC5細胞及びブタPK15細胞は、高いベクター力価、及び複製能力のあるChAd155とChAd83の両方の高いゲノムコピー数をもたらした。マウスNMuLi細胞及び非ヒト霊長類Vero細胞もまたRC ChAd155を生産したが、ヒト細胞又はブタ細胞よりも程度は低かった。RC ChAd83は、マウスNMuLi細胞、及び驚くべきことに、非ヒト霊長類Vero細胞では十分に増殖できなかった。

【 0 0 9 9 】

ヒトMRC5、マウスNMuLi及び非ヒト霊長類Vero細胞は、RC ChAd155の発現を7日目まで保持(support)した。ヒトMRC5細胞は、RC ChAd83の発現を7日目まで保持し、マウスNMuLi及び非ヒト霊長類Vero細胞も同様であったがヒト細胞よりも程度が低かった。

【 0 1 0 0 】

ウイルス生産

図2は、各々RC1又はRC2のいずれかを含む、複製能力のあるChAd155又はChAd83のいずれかに感染したヒト初代MRC5細胞によって生産されるウイルスの量を示す。感染後7日目に細胞を回収し、3回の凍結融解サイクル後に得られた細胞溶解物においてベクター力価を評価した。ベクター力価は、それぞれのプロモーター領域用に設計されたプライマーを用いた定量的PCR(QPCR)分析によって測定された。感染多重度(moi)は、細胞あたりウイルス粒子1250個であった。ウイルス生産は、バーの上にベクター粒子(vp)/細胞として示されている。

【 0 1 0 1 】

ヒトMRC5細胞は、RC1(2.17×10^3 vp/細胞)又はRC2(4.40×10^3 vp/細胞)のいずれかを含むChAd155の生産を保持し、また、RC1(1.18×10^4 vp/細胞)又はRC2(1.06×10^5 vp/細胞)のいずれかを含むChAd83の生産を保持した。図2に示されるように、ChAd83は、ChAd155より高いレベルで生産され、RC2を含むChAd83ベクターは、4つのウイルス/ベクターの組み合わせの中で最も頑健であった。

【 0 1 0 2 】

ベクターゲノムコピー数

感染後、ベクターは細胞内で複製され、ベクターゲノムコピー数はQPCRにより測できる。ベクターDNA複製は、ウイルス複製及び増殖を十分に許容しない細胞においてさえ起こる可能性がある。ベクターDNAのQPCRは、ウイルスが複製サイクルを完了し成熟したウイルス子孫として放出される能力とは無関係に、感染した細胞内でのベクターの複製の尺度を提供する。したがって、ベクターの複製を、ChAdウイルス複製又は増殖を許容しない動物種、組織型、及び細胞型において定量することができる。

【 0 1 0 3 】

10

20

30

40

50

ベクターゲノムコピー数は、ベクター力価と並行して測定され、結果は図3に示された。ヒトMRC5細胞を、各々がRC1又はRC2のいずれかを含むChAd155又はChAd83のいずれかに感染させた。感染後7日目に細胞を回収し、全DNAを抽出し、QPCRによってウイルスゲノムを定量し、結果を細胞あたりのベクターゲノムコピー数として表した。そのmoiは、細胞あたりウイルス粒子250個であり、細胞あたりのウイルス粒子の数は、細胞あたりのウイルスゲノムコピー数を示すバーの上に示した。そのコピー数は、導入遺伝子発現のレベルに正比例する。

【0104】

図3に示されるように、ChAd155によるRC1(6.21×10^3 vp/細胞)及びRC2(6.71×10^3 vp/細胞)のウイルスDNA複製の量は類似していた。ChAd83は、ChAd155よりも多くのRC1(2.76×10^4 vp/細胞)及びRC2(9.19×10^4 vp/細胞)ウイルスDNAを生産した。ウイルスDNA複製の最も高いレベルは、ChAd83 RC2によって観察された。

【0105】

[実施例3]

ヒト細胞からのウイルス導入遺伝子発現

ウエスタンブロット分析を行って、複製欠損の及び複製能力のあるChAd155(図4)及びChAd83(図5)ウイルスベクターにおける導入遺伝子発現のレベルを比較した。MRC5細胞は、細胞あたりウイルス粒子250又は1250個のmoiでChAd155 RC1又はChAd155 RC2ベクターにより形質導入された。細胞を、感染後の2日目及び7日目に回収し、標準的な方法を用いて抽出物を調製し、SDS-PAGEゲルに等量の抽出物をロードした。電気泳動による分離後、タンパク質をニトロセルロース膜に転写し、それを次に、狂犬病糖タンパク質導入遺伝子に対する市販のモノクローナル抗体でプローブした。

【0106】

図4及び図5は、感染後の2日目と7日目の両方で、複製能力のあるChAd155 RC(図4)及びChAd83 RC(図5)ベクターが、それぞれ、複製欠損ChAd155 RD及びChAd83 RDベクターよりも高いレベルで導入遺伝子を発現したことを実証している。狂犬病糖タンパク質に対する抗体でプローブした場合、プロットの左側のバーで示されている狂犬病糖タンパク質の予測分子量に対応する約51kDaのバンドが観察された。

【0107】

moiの増加は、試験されたすべてのベクターについて、2日目と7日目の両方で導入遺伝子発現の増加をもたらした。ChAd155に関して、RC2ベクターが最も高いレベルの導入遺伝子発現を生じさせ、続いてChAd155 RC1、次にChAd155 RDであった。ChAd83に関して、RC2ベクターが最も高いレベルの導入遺伝子発現を生じさせ、続いてChAd155 RDベクター、次にChAd155 RC1であった。

【0108】

感染後の2日目に、hCMV(RC1)又はCASI(RC2)プロモーターのいずれかから駆動された場合、ChAd155による低レベルの発現がウエスタンブロットにより観察された。ChAd83による導入遺伝子のピーク発現は、感染の2日後に観察されたが、ChAd83ベクターはMRC5細胞において細胞変性性であるため、それはおそらくこの初期の時点で発生したといえる。さらに、アデノ骨格Eは、プロモーターのシャットオフ/転写サイレンシングを強化するため、MRC5細胞においてCMVプロモーターによって駆動されるChAd83の発現は2日より長く持続しなかった。

【0109】

7日目までに、hCMVプロモーターによって駆動される発現はわずかな程度増加し、また、CASIプロモーターによって駆動される発現は大幅に増加し、hCMVプロモーターによって駆動される発現よりも頑健であった。対照的に、感染後の2日目に、hCMVとCASIの両方によって駆動されるChAd83の発現は、ChAd155で観察されたものよりも非常に高かった。しかしながら、7日目までに、hCMVプロモーターによって駆動される発現はほぼ検出不能なレベルまで低下したが、一方、CASIプロモーターによって駆動される発現は一定のままであった。理論に拘束されるものではないが、これは、ChAd83(Eタイプアデノウイルス)の

アデノ骨格がプロモーターの遮断を強化する一方で、CASIプロモーターが転写サイレンシングを克服し得ることを示す。

【0110】

これらの研究は、HE2遺伝子座に位置する左方向の配向でのCASIプロモーターを含むRC2ベクターが、削除されたE3領域内に位置する右方向の配向でのCMVプロモーターを配置するRC1ベクターよりも導入遺伝子をより強く発現することを実証している(図1)。

【0111】

[実施例4]

複製能力のあるアデノウイルスゲノムコピー数

細胞あたりのベクターコピー数として表される、本発明の複製能力のあるアデノウイルスベクターの効率は、マウスと非ヒト霊長類の両方に由来する細胞培養物において評価された。図6(上部パネル)は、単層で増殖させて、細胞あたりウイルス粒子250個のmoiでChAd155 RC1、ChAd155 RC2、ChAd83 RC1又はChAd83 RC2に感染させたマウス肝NMuLi細胞で増殖させた複製能力のあるベクターのゲノムコピー数を示す。感染後の5日目に全DNAが抽出され、そのベクター複製は、ベクターのプロモーター領域にアニーリングするプライマーを使用したQPCRによって測定された。

【0112】

細胞あたりのベクターコピー数として表されるその結果を図6(上部パネル)に示す。ChAd155は、NMuLi細胞においてRC1とRC2の両方のベクターを高効率で増幅させた。ChAd155は、RC1(1.73×10^4)及びRC2(1.92×10^4)ベクターをほぼ同程度に複製した。ChAd83は、RC1及びRC2ベクターの複製において、ChAd155よりも効率が低かった。ChAd83は、マウス細胞においてベクターDNAを少量だけ複製した。RC1ベクターは、細胞あたり 5.47×10^2 コピーのレベルで複製され、RC2ベクターは細胞あたり 6.74×10^2 コピーのレベルで複製された。

【0113】

また、非ヒト霊長類Vero細胞を単層で増殖させて、ChAd155 RC1、ChAd155 RC2、ChAd83 RC1又はChAd83 RC2に感染させた(図6下部パネル)。2つの異なる感染多重度を使用した：細胞あたりウイルス粒子50個及び250個。感染後の5日目に全DNAを抽出し、ベクターのプロモーター領域にアニーリングするプライマーを使用したQPCRによってベクターの複製を測定した。

【0114】

細胞あたりのベクターコピー数として表される結果は、図6(下部パネル)に示される。Vero霊長類細胞株は、ChAd155 RC1(50のmoiで細胞あたり 3.71×10^3 コピー、及び250のmoiで細胞あたり 4.93×10^4 コピー)、及びChAd155 RC2(50のmoiで細胞あたり 8.15×10^3 コピー、及び250のmoiで細胞あたり 7.05×10^4 コピー)を許容した。Vero霊長類細胞株は、ChAd83 RC1又はChAd83 RC2を許容しているとしても不十分であった。ChAd83 RC1及びChAd83 RC2ベクターは50のmoiでVero細胞から発現するようには検出されなかった。250のmoiで、ChAd83は、細胞あたり 1.13×10^2 コピーのレベルでRC1ベクターを複製し、及び細胞あたり 1.29×10^3 コピーのレベルでRC2ベクターを複製した。

【0115】

[実施例5]

マウス細胞及び非ヒト霊長類細胞からの導入遺伝子発現

ウエスタンブロット分析を行って、マウスNMuLi細胞におけるChAd155 RC1及びChAd155 RC2による導入遺伝子発現のレベルを比較した(図7上部パネル)。細胞に、細胞あたりウイルス粒子50個、250個、又は1250個のmoiでChAd155 RC1又はChAd155 RC2を感染させた。感染後の2日目及び5日目に細胞を回収し、標準的な方法を用いて抽出物を調製し、SDS-PAGEゲルに等量的全細胞抽出物をロードした。電気泳動による分離後、タンパク質をニトロセルロース膜に転写し、それを次に、狂犬病糖タンパク質導入遺伝子に対する市販のモノクローナル抗体でプローブした。

【0116】

図7(上部パネル)は、ChAd155 RC1とChAd155 RC2の両方がマウスNMuLi細胞において導入

10

20

30

40

50

遺伝子を発現することを実証している。発現は、感染後の2日目と5日目の両方で観察され、狂犬病糖タンパク質(RG)の予測分子量に対応する約51kDaのバンドによって示された。ChAd155 RC2ベクターは、感染後の2日目と5日目の両方で、ChAd155 RC1ベクターよりも高いレベルの導入遺伝子発現をもたらした。

【0117】

次に、ウエスタンブロット分析を行って、マウスNMuLi細胞におけるChAd155 RC1、ChAd155 RC2、ChAd83 RC1及びChAd83 RC2による導入遺伝子発現のレベルを比較した(図7下部パネル)。細胞を、ChAd155 RC1、ChAd155 RC2、ChAd83 RC1、又はChAd83 RC2を細胞あたりウイルス粒子50個、250個、又は1250個(ChAd83 RC1については250個及び1250個)のmoiで感染させた。細胞は、図4に記載されているように、ウエスタンブロットのために処理された。

10

【0118】

図7(下部パネル)は、ChAd155 RC1、ChAd155 RC2、ChAd83 RC1及びChAd83 RC2がマウスNMuLi細胞において導入遺伝子を発現することを実証している。発現は、感染後の2日目と5日目の両方で観察され、狂犬病糖タンパク質(RG)の予測分子量に対応する約51kDaのバンドによって示された。ChAd155は、ChAd83と比較して導入遺伝子のより効率的な発現を実証した。感染後の2日目に、ChAd155 RC2による頑健な導入遺伝子発現は、50vp/細胞の低moiでさえ観察されたが、一方、ChAd155 RC1による頑健な導入遺伝子発現は、より高いmoiで最初に観察された。また、RC2は、ChAd155とChAd83の両方のウイルス血清型において、RC1よりも効率的な導入遺伝子発現を実証した。RC2は、直接比較の各々において、RC1よりも強く発現された。

20

【0119】

[実施例6]

マウスにおけるRD及びRC1ベクターの免疫原性

T細胞応答を誘導するためのChAd155 RDベクターの免疫学的効力を、Balb/cマウス(群あたり6匹のマウス)のChAd155 RC1及びChAd83 RC1ベクターのそれと比較した。ベクターを、 10^5 及び 10^6 個のウイルス粒子の用量で筋肉内に注射した。免疫の3週間後、動物を屠殺し、免疫化されたマウスの脾臓細胞を単離し、狂犬病糖タンパク質T細胞エピトープを使用してIFN-ガンマ-ELISpotで分析した。結果は、図8に示され、100万個の脾臓細胞あたりのIFN-ガンマスポット形成細胞(SFC)として表される。各ドットは、単一のマウスの応答を表し、水平線は各投薬群の幾何平均に対応する。

30

【0120】

10^6 vpの用量で、すべてのマウスが陽性に反応し、抗原性導入遺伝子に対する免疫応答を増大させた(図8)。予期した通り、免疫応答は、3つのベクターの各々について高用量ではより頑健であった。ChAd155 RC1は、同等のChAd155 RD又はChAd83 RC1ベクター用量のいずれよりも免疫応答の誘導においてより強力であった。これらの結果は、マウスNMuLi細胞におけるChAd83の複製がほとんどないか又は全くないこと、及びChAd155 RC1ベクターと比較して抗原発現のレベルが低いことを実証している実施例4及び図6に示されるデータと一致する。

【0121】

40

[実施例7]

マウスに経口投与されたRD及びRC1ベクターの免疫原性

ChAd155-RD及びChAd155 RC1ベクターの免疫学的効力をマウスにおいて評価した。複製欠損のChAd155ベクター及び複製能力のあるChAd155ベクターを比較し、その結果を図9に示した。動物(群あたり6匹)を経口又は筋肉内経路で免疫し、次に、トランスジェニック抗原に対する中和抗体応答(上部パネル)及びT細胞応答(下部パネル)を評価した。

【0122】

図9(上部パネル)は、 5×10^8 個のウイルス粒子を経口投薬又は 1×10^7 個のウイルス粒子を筋肉内投薬したマウスの液性中和抗体の免疫応答について記載する。免疫後8週で、狂犬病Gタンパク質に対する市販のモノクローナル抗体を使用して、蛍光抗体ウイルス中和

50

アッセイ (FAVN) により中和抗体力価を測定した。

【 0 1 2 3 】

B細胞 (抗体) 応答の尺度であるウイルス中和力価を図9 (上部パネル) に示す。各ドットは、単一のマウスの応答を表す。図9の上部パネルは、機能的中和抗体が、ChAd155 RD又はChAd155 RC1の単回投与後の8週間以内に血清中で検出されたことを実証している。ChAd155 RC1が経口投与された場合、6匹のマウスのすべてが防護閾値 (点線) を超える中和抗体力価を示した。ChAd155 RDの経口投与は、6匹のマウスのうち4匹で防護閾値を超える中和抗体力価をもたらす結果となった。

【 0 1 2 4 】

ChAd155 RC1が筋肉内に投与された場合、6匹のマウスのすべてが防護閾値を超える中和抗体力価を示した。ChAd155 RDの筋肉内投与は、6匹のマウスのうち5匹で防護閾値を超える中和抗体力価を生じる結果となった。

【 0 1 2 5 】

ChAd155 RC1ベクターで免疫されたマウスの中和力価は、経口で又はIMで投与されたかどうかにかかわらず、ChAd155 RDベクターで免疫されたマウスよりも高かった。これは、本発明の複製能力のあるChAd155ベクターが、経口投与であれ筋肉内投与であれ、トランスジェニック抗原に対する抗体応答の誘導において複製欠損ChAd155ベクターよりも効果的であることを実証している。

【 0 1 2 6 】

IFN-ガンマ分泌によるT細胞応答は、トランスジェニック抗原でワクチン接種された動物の脾臓細胞においてELISpotにより測定され、図9に示された (下部パネル)。マウスは、 5×10^8 個のウイルス粒子を経口投与されたか、又は 1×10^7 個のウイルス粒子を筋肉内投与された。免疫後3週で、T細胞応答は、実施例6に記載されているように、ELISpotによって測定された。各ドットは、単一のマウスの応答を表す。

【 0 1 2 7 】

T細胞 (細胞性免疫) 応答の尺度であるIFN-ガンマ分泌は、図9 (下部パネル) に示される。各ドットは、単一のマウスの応答を表す。図9は、T細胞免疫応答が、ChAd155 RD又はChAd155 RC1の単回投与後、免疫後の3週間以内に検出されたことを実証している。ChAd155 RC1を経口投与した場合、6匹のマウスのすべてがT細胞応答を増大させた。ChAd155 RDの経口投与により、6匹のマウスのうち4匹がT細胞応答を増大させた。

【 0 1 2 8 】

ChAd155 RC1ベクターで免疫したマウスのT細胞応答は、経口で又はIMで投与されたかどうかにかかわらず、ChAd155 RDベクターで免疫されたマウスよりも高かった。これは、本発明の複製能力のあるChAd155ベクターが、経口で又は筋肉内に投与されたかどうかにかかわらず、トランスジェニック抗原に対する細胞性免疫応答の誘導において、複製欠損ChAd155ベクターよりも効果的であることを実証している。

【 0 1 2 9 】

[実施例8]

ブタにおける複製能力のあるベクターの免疫原性

イノシシ (Sus) 属の動物は、ブタ (pig又はswine) として一般的に知られており、PK1ブタ細胞のインピトロでのデータに基づいて、それらはChAd複製を許容する可能性が高いことから、適切なモデルを提供する。免疫原性を実証するために、ブタ、例えば、スース・スクローファ・ドメスティクス (Sus scrofa domesticus) を、約 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ 個のウイルス粒子の用量で筋肉内又は鼻腔内に送達される複製能力のあるChAd155又はChAd83ベクターで免疫することができる。収集した血清試料は、中和抗体、T細胞応答及びB細胞応答について分析され得る。ワクチン接種後の放出は、鼻汁、唾液又は糞を収集することによってモニタリングされ得る。ウイルスを放出する部位は、その生体分布を示している可能性がある。例えば、放出が主に鼻汁から生じている場合、ウイルスは優先的に上気道で複製すると推測することができる。安全性の指標には、体重、体温、摂食量、血液学的パラメーター及び血清化学の測定が含まれ得る。

10

20

30

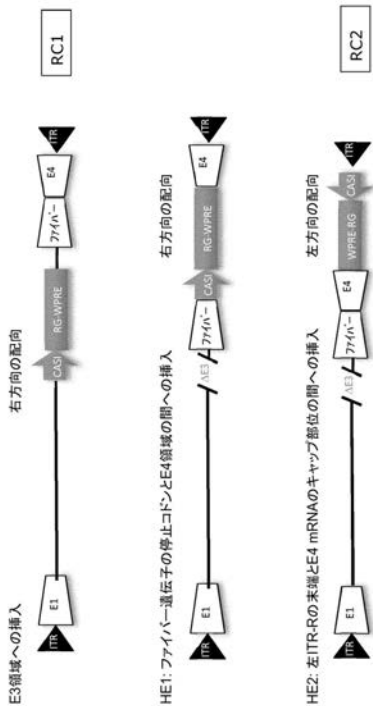
40

50

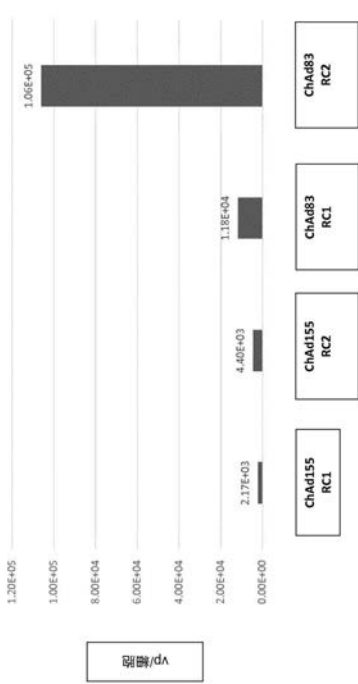
【 0 1 3 0 】

本発明のベクターの免疫原性が筋肉内及び鼻腔内投与によりブタモデルで実証されると、舌下投与を含む他の経路により免疫原性を試験することができる。実験計画には、複製能力のあるベクターと複製欠損ベクターの比較、ChAd155とChAd83ベクターの比較、構築物内の様々な位置にあるCASIプロモーター及びCMVプロモーターを含むプロモーターの比較、様々なエンハンサーエレメント、例えばWPREの効果の比較、及び舌下経路と他の免疫化経路との比較が含まれ得る。

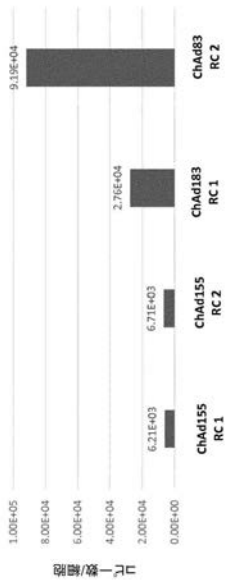
【 図 1 】



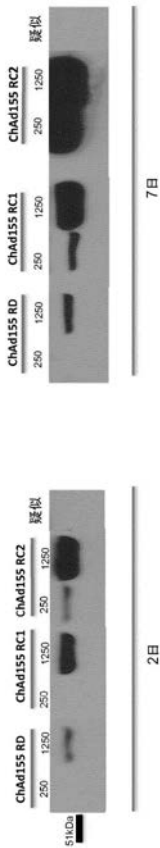
【 図 2 】



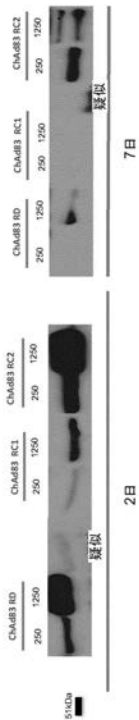
【 図 3 】



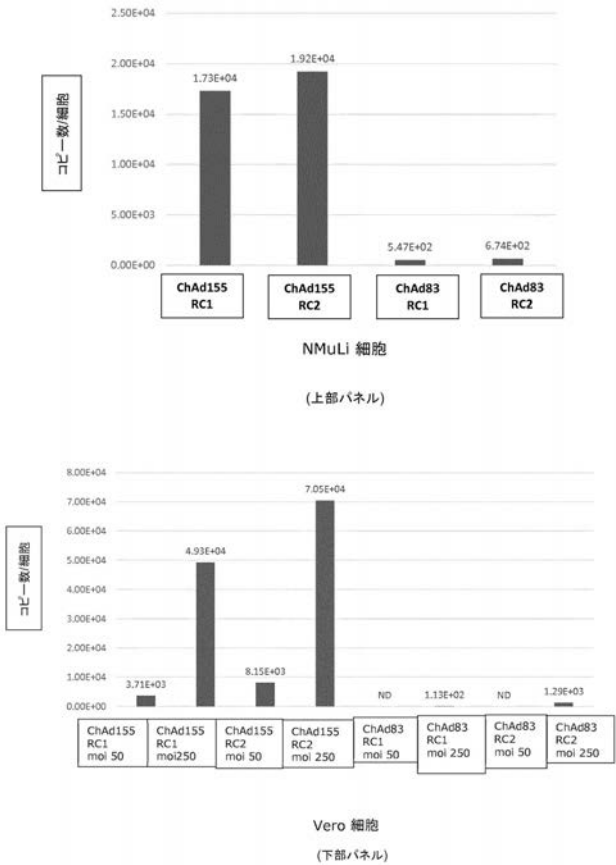
【 図 4 】



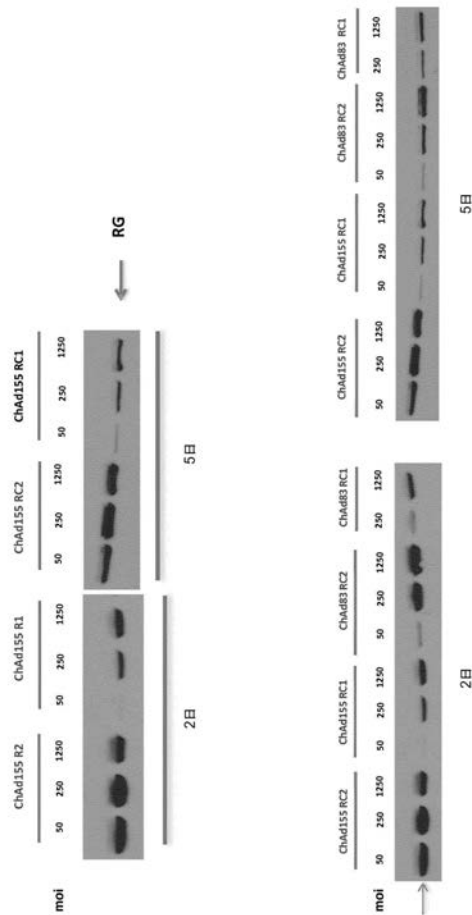
【 図 5 】



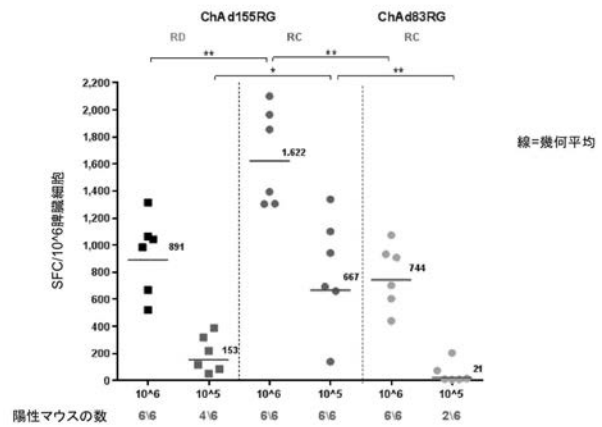
【 図 6 】



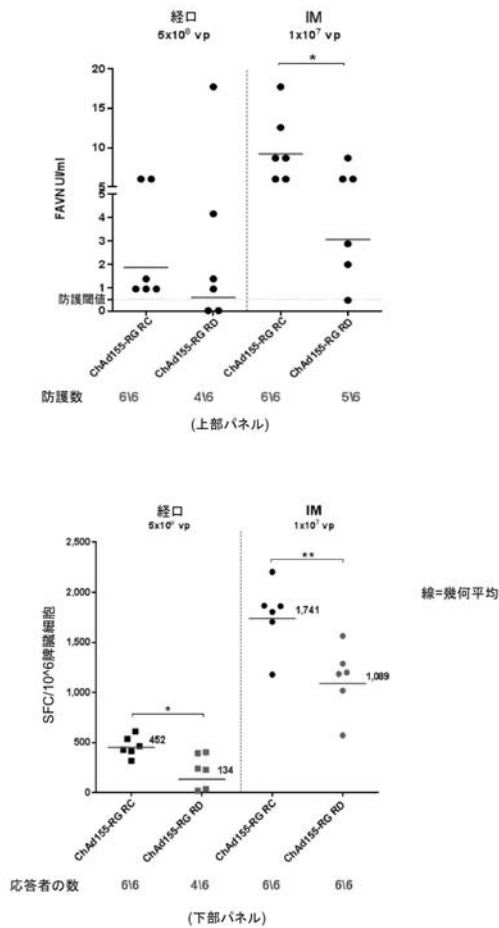
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2020537525000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/078206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/00 A61K39/12
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)

C12N A61K

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, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUSAN J MORRIS ET AL: "Simian adenoviruses as vaccine vectors", FUTURE VIROLOGY, vol. 11, no. 9, 1 September 2016 (2016-09-01), pages 649-659, XP055359141, UK ISSN: 1746-0794, DOI: 10.2217/fv1-2016-0070 page 652, left-hand column - page 652, right-hand column ----- -/--	1-7, 9-14, 17-22

☒ 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

26 November 2018

Date of mailing of the international search report

19/12/2018

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Stoyanov, Borislav

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/078206

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEI YA-FANG ET AL: "Complete replication-competent adenovirus 11p vectors with E1 or E3 insertions show improved heat stability", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 497, 3 August 2016 (2016-08-03), pages 198-210, XP029723766, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/J.VIROL.2016.07.026 page 199, left-hand column - page 208, right-hand column; figure 1A -----	1-7, 9-14, 17-22
A	WO 2017/017049 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE]) 2 February 2017 (2017-02-02) claim 44 -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/078206

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017017049 A1	02-02-2017	AR 105470 A1	04-10-2017
		AU 2016301029 A1	01-02-2018
		BE 1023915 A1	12-09-2017
		BE 1023916 A1	12-09-2017
		BR 112018001683 A2	18-09-2018
		CA 2993277 A1	02-02-2017
		CA 2993371 A1	02-02-2017
		CN 108135991 A	08-06-2018
		CN 108367061 A	03-08-2018
		EA 201890355 A1	31-08-2018
		EP 3328420 A1	06-06-2018
		EP 3328421 A1	06-06-2018
		JP 2018521666 A	09-08-2018
		JP 2018524393 A	30-08-2018
		KR 20180034589 A	04-04-2018
		US 2018216081 A1	02-08-2018
		US 2018250375 A1	06-09-2018
		WO 2017017049 A1	02-02-2017
		WO 2017017050 A1	02-02-2017

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 15/31 (2006.01)		C 1 2 N 15/31		
C 1 2 N 15/45 (2006.01)		C 1 2 N 15/45		
C 1 2 N 15/49 (2006.01)		C 1 2 N 15/49		
C 1 2 N 15/47 (2006.01)		C 1 2 N 15/47		
A 0 1 K 67/027 (2006.01)		A 0 1 K 67/027		
C 1 2 N 7/01 (2006.01)		C 1 2 N 7/01		
C 1 2 N 7/04 (2006.01)		C 1 2 N 7/04		
A 6 1 K 35/761 (2015.01)		A 6 1 K 35/761		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	G	
A 6 1 K 39/205 (2006.01)		A 6 1 K 39/205		
A 6 1 K 39/155 (2006.01)		A 6 1 K 39/155		
A 6 1 K 39/21 (2006.01)		A 6 1 K 39/21		
A 6 1 K 39/002 (2006.01)		A 6 1 K 39/002		
A 6 1 P 33/06 (2006.01)		A 6 1 P 33/06		
A 6 1 K 39/29 (2006.01)		A 6 1 K 39/29		
A 6 1 P 31/20 (2006.01)		A 6 1 P 31/20		
A 6 1 P 31/14 (2006.01)		A 6 1 P 31/14		

(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 ヴィッテリ , アレッサンドラ

イタリア国 ローマ , ヴィア ディ カステル ロマノ 1 0 0 , レイセラ エスアールエル

F ターム(参考) 4B065 AA95X AA95Y AC14 BA01 BA02 CA24 CA45
 4C084 AA13 MA66 NA14 ZB05 ZB09 ZB33 ZB38 ZC55
 4C085 AA03 BA02 BA57 BA64 BA69 BB11 CC08 CC21 DD62 EE01
 GG01 GG03
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA08 CA12 MA66 NA05 ZB05 ZB09 ZB33
 ZB38 ZC55