

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7366014号  
(P7366014)

(45)発行日 令和5年10月20日(2023.10.20)

(24)登録日 令和5年10月12日(2023.10.12)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K 39/235 (2006.01)	A 6 1 K	39/235		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	A	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		

請求項の数 8 (全28頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-524185(P2020-524185)	(73)特許権者	516257833
(86)(22)出願日	平成30年10月30日(2018.10.30)		ヤンセン ファッションズ アンド プリベ ンション ベーフェー
(65)公表番号	特表2021-500908(P2021-500908 A)		JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(43)公表日	令和3年1月14日(2021.1.14)		オランダ国 2333 セーエン ライデン
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/079713		アルヒメーデスウェッハ 4
(87)国際公開番号	WO2019/086456	(74)代理人	100092783
(87)国際公開日	令和1年5月9日(2019.5.9)		弁理士 小林 浩
審査請求日	令和3年9月13日(2021.9.13)	(74)代理人	100093676
(31)優先権主張番号	17199348.8		弁理士 小林 純子
(32)優先日	平成29年10月31日(2017.10.31)	(74)代理人	100120134
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 大森 規雄
前置審査		(74)代理人	100149010
			弁理士 星川 亮

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アデノウイルス及びその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号13の核酸配列を含む、アデノウイルスベクター。

【請求項2】

配列番号8の核酸配列を含む、アデノウイルスベクター。

【請求項3】

アデノウイルスベクターの導入遺伝子挿入部位に、導入遺伝子が挿入された、請求項1又は2に記載のアデノウイルスベクター。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載のベクターを含む組換え細胞。

10

【請求項5】

(a) 請求項4に記載の組換え細胞を、前記ベクターを産生するための条件下で増殖させること；及び

(b) 前記組換え細胞から前記ベクターを単離することを含む、ベクターを作製する方法。

【請求項6】

請求項1～3のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターを含む免疫原性組成物。

【請求項7】

必要とする対象において免疫応答を誘導する方法で用いるための、請求項6に記載の免疫原性組成物であって、前記方法が、前記免疫原性組成物を前記対象に投与することを含

20

む、免疫原性組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のアデノウイルスベクターを薬学的に許容される担体と組み合わせることを含む、ワクチンを作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオテクノロジーに関する。より詳細には、抗原を送達し、宿主において免疫応答を誘発するための複製欠損アデノウイルスベクターなどのアデノウイルスベクターの分野及び使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

組換えアデノウイルスベクターは、遺伝子治療適用及びワクチンに広く応用されている。AdV-5 ベクターに基づくワクチンは、様々な動物モデルにおいて強力な保護的な免疫応答を誘発することが示されている（例えば、国際公開第 2001/02607 号パンフレット；国際公開第 2002/22080 号パンフレット；Shiver et al., Nature 415:331 (2002)；Letvin et al., Ann. Rev. Immunol. 20:73 (2002)；Shiver and Emini, Ann. Rev. Med. 55:355 (2004)）。しかしながら、組換え AdV-5 ベクターに基づくワクチンの有用性は、ヒト集団における AdV-5 特異的中和抗体 (NAbs) の高い血清有病率によって制限される可能性が高い。抗 AdV-5 免疫の存在は、マウス、アカゲザル、及びヒトにおける研究において、AdV-5 に基づくワクチンの免疫原性を大幅に抑制することが示されている。

20

【0003】

最も一般的なヒトアデノウイルス、例えば、AdV-5 により以前に感染又は治療された個体における既存の免疫の存在を回避するための一つの有望な戦略は、そのような既存の免疫に遭遇しないアデノウイルス血清型からの組換えベクターの開発を含む。一つのこのような戦略は、非ヒトサルアデノウイルスの使用に基づいているが、これは非ヒトサルアデノウイルスが通常ヒトに感染せず、ヒト試料では低い血清有病率を示すためである。非ヒトサルアデノウイルスは、これらのウイルスがインビトロでヒト細胞に感染できたことが示されたため、ヒトへの適用が可能である（国際公開第 2003/000283 号パンフレット；国際公開第 2004/037189 号パンフレット）。

30

【0004】

したがって、大量に生産可能で、宿主の既存の免疫に遭遇しないが依然として免疫原性があり、ベクターに挿入された異種核酸によってコードされる抗原に対して強い免疫応答を誘導することができる代替的なアデノウイルスベクターが、この分野では必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

ヘキソンポリペプチドをコードする単離された核酸配列が提供される。特定の実施形態では、ヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体は、配列番号 1 のアミノ酸配列又は配列番号 1 のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含む。

40

【0006】

特定の実施形態では、ヘキソンポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含む。特定の実施形態では、ヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体は、BLY6 ヘキソンポリペプチド（配列番号 2）のアミノ酸配列又は配列番号 2 のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。

50

## 【0007】

また、ファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体をコードする単離された核酸配列も提供される。特定の実施形態では、ファイバーポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列を含むファイバーノブポリペプチド配列；配列番号11のアミノ酸配列を含むファイバーシャフトポリペプチド配列；及び配列番号12のアミノ酸配列を含むファイバーテールポリペプチド配列のうちの少なくとも1つを含む。特定の実施形態では、ファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体は、BLY6ファイバーポリペプチド（配列番号3）のアミノ酸配列又は配列番号3のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

## 【0008】

本発明の実施形態はまた、本発明のファイバー及びヘキソン核酸配列によってコードされる単離されたファイバー及びヘキソンポリペプチドを含む。

## 【0009】

さらに本明細書では、本明細書で開示されるヘキソンポリペプチドのうちの少なくとも1つをコードするヘキソン核酸配列、及び本明細書で開示されるファイバーポリペプチドのうちの少なくとも1つをコードするファイバー核酸配列を含む単離された核酸が提供される。特定の実施形態において、本明細書では、本明細書に記載される単離された核酸を含むベクターが提供される。一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。別の実施形態では、ベクターは発現ベクターである。好ましい一実施形態では、ベクターはアデノウイルスベクターである。より好ましくは、ベクターはさらに導入遺伝子を含む。

## 【0010】

本明細書に記載されるベクターを含む組換え細胞も提供される。このような細胞は、組換えタンパク質の産生、組換えタンパク質の発現、又はベクター若しくはウイルス粒子の産生のために使用することができる。また、ベクターを作製する方法も提供される。方法は、(a)本明細書で開示される組換え細胞を、ベクターを産生するための条件下で増殖させること；及び(b)組換え細胞からベクターを単離することを含む。

## 【0011】

特定の実施形態では、本明細書で開示されるベクターを含む免疫原性組成物が提供される。また、本明細書で開示される免疫原性組成物を対象に投与することを含む、必要とする対象において免疫応答を誘導する方法も提供される。

## 【0012】

特定の実施形態では、(a)少なくとも1つの導入遺伝子；及び(b)本発明の実施形態によるヘキソンポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノウイルスベクターが提供される。ヘキソンポリペプチドは、例えば、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含み得る。ヘキソンポリペプチドは、例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態では、ヘキソンポリペプチドは、BLY6ヘキソンポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸配列又は配列番号2のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

## 【0013】

特定の実施形態では、(a)少なくとも1つの導入遺伝子；及び(b)本発明の実施形態によるファイバーポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノウイルスベクターが提供される。特定の実施形態では、ファイバーポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列を含むファイバーノブポリペプチド配列；配列番号11のアミノ酸配列を含むファイバーシャフトポリペプチド配列；及び配列番号12のアミノ酸配列を含むファイバーテールポリペプチド配列のうちの少なくとも1つを含み得る。特定の実施形態では、ファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体は、BLY6ファイバーポリペプチド（配列番号3）のアミノ酸配列又は配列番号3のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。本発明の実施形態はまた、(a)少なくとも1つの導入

10

20

30

40

50

遺伝子；(b)本発明の実施形態によるヘキソンポリペプチドをコードする核酸配列；及び(c)本発明の実施形態によるファイバーポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノウイルスベクターを含む。

【0014】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるアデノウイルスベクターは、複製欠損アデノウイルスベクター(rAd)である。一実施形態では、アデノウイルスベクターは、E1欠失を含み得る。特定の実施形態では、本明細書で提供されるアデノウイルスベクターはさらに、E3欠失を含み得る。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(例えば、ChAd3)；ゴリラアデノウイルス；又はアカゲザルアデノウイルス(例えば、rhAd51、rhAd52又はrhAd53)などの1種以上のサルアデノウイルス(SAdV)に由来するアデノウイルス核酸配列を含むサルアデノウイルスベクターであり得る。アデノウイルスベクターは、1種以上のヒトアデノウイルス(例えば、hAdV-4、hAdV-5、hAdV-26、hAdV-35)に由来するアデノウイルス配列を含むヒトアデノウイルスベクターであり得る。好ましくは、アデノウイルスベクターは、1種以上のヒトアデノウイルス核酸配列を含むキメラアデノウイルスベクターである。ヒトアデノウイルス核酸配列は、例えば、ヒトアデノウイルス-4(hAdV-4)、ヒトアデノウイルス-5(hAdV-5)、ヒトアデノウイルス-26(hAdV-26)、又はヒトアデノウイルス-35(hAdV-35)に由来し得る。アデノウイルスベクターは、例えば、ヒトアデノウイルス-5(hAdV-5) E4orf6及びorf6/7を含み得る。

10

20

【0015】

特定の実施形態では、導入遺伝子は、逆位末端配列(ITR)に隣接して位置する。特定の実施形態では、導入遺伝子は、例えば、E4領域と右ITR(RITR)の間において、E1欠失にあるか又はE1欠失に隣接し、E3欠失にあるか又はE3欠失に隣接し、且つ/又はITRにあるか又はITRに隣接して位置する。

【0016】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるアデノウイルスベクターは、配列番号13又は配列番号14の核酸配列を含む。

【0017】

また、本明細書に記載されるアデノウイルスベクター及び薬学的に許容される担体を含む免疫原性組成物又はワクチンが提供される。さらに、必要とする対象において免疫応答を誘導するための方法が提供される。方法は、対象に本明細書で開示されるワクチンを投与することを含む。さらに、ベクターを作製する方法が提供される。方法は、本明細書で開示されるアデノウイルスベクターを薬学的に許容される担体と組み合わせることを含む。

30

【0018】

上述の概要、及び下記の本願の好ましい実施形態の詳細な説明は、添付した図面とともに読む場合により十分に理解されることになる。しかしながら、本願は、図面に示される明確な実施形態に限定されないことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1-1】BLY6、FLuc及びAd49、FLucによって誘導される細胞性及び体液性免疫応答を示す。図1Aは、実験構成を示す。図1Bは、インターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ ) ELISPOT分析によって決定されるとおりのベクターにコードされた抗原(すなわち、Fluc、ホタルルシフェラーゼ)に対してAd26、FLuc、BLY6、FLuc及びAd49、FLucによって誘導される細胞性免疫応答を示す。y軸は $10^6$ 個の脾細胞当たりのスポット形成単位(SFU)の数を示し、点線は中程度の刺激の95%パーセントイルを示す。

40

【図1-2】(上記の通り。)

【図2-1】BLY6、RSVF-2A-GLucによって誘導される細胞性及び体液性免疫応答を示す。図2Aは、実験構成を示す。図2Bは、3種の異なる濃度( $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ )

50

<sup>9</sup>及び10<sup>10</sup>v p)のAd26・RSVF-2A-GLuc又はBLY6・RSVF-2A-GLuc、又は10<sup>10</sup>v pのAd26・FLuc又はBLY6・FLucによる免疫化後8週目に実施されたウイルス中和アッセイ(VNA)の結果のグラフを示す。図2Cは、IFN-ELISPOT分析によって決定されるとおりの免疫化後にAd26・RSVF-2A-GLuc及びBLY6・RSVF-2A-GLucによって誘導される細胞性免疫応答を示す。図2Dは、免疫化後8週目の免疫化マウスの血清中のAd26・RSVF-2A-GLuc又はBLY6・RSVF-2A-GLucによって誘導されるRSVF特異的IgG結合抗体のグラフを示す。

【図2-2】(上記の通り。)

【図2-3】(上記の通り。)

【図2-4】(上記の通り。)

【図3】アデノウイルスベクターAd35、Ad26、Ad49、Ad5、Ad4及びBLY6で免疫化されたマウスにおいて誘導される同種及び異種アデノウイルス中和力価を示す。

【図4】米国(US)及び欧州連合(EU)に居住する18歳~55歳までの成人に由来する200名のヒトコホート血清試料におけるAd35、Ad26、Ad5及びBLY6の血清有病率を示す。各ベクターに対してこれらの血清において測定された中和力価を、示されるとおりに図表において表される4種のカテゴリー(<16(陰性)、16~300、300~1,000、1000~4000及び>4000)に分けた。

【図5】プラスミドpBLY6.dE1.dE3(配列番号8)の概略図を示す。

【図6】プラスミドpBLY6.dE1.dE3.5IXP(配列番号9)の概略図を示す。

【図7】BLY6ヘキソンポリペプチド(配列番号2)及びSAdV-30-1ヘキソンポリペプチド(配列番号4)配列のアラインメントを示す。

【図8】生産細胞株sPER.C6における新規のベクターBLY6.FLucの生産性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本開示は、アデノウイルス種Eに割り当てられた新規のゴリラアデノウイルス単離物の単離及び同定、並びに前記ゴリラアデノウイルスのヘキソン及びファイバーポリペプチドの可変領域をコードする核酸を含むワクチンベクターの構築及び評価に少なくとも部分的に基づく。アデノウイルスベクターは、ヒトにおいて免疫応答を誘発するとともに、低い血清有病率を有することができる。アデノウイルスベクターは、ワクチンのために製剤化され、且つ目的の特異抗原に対する防御免疫を誘導するために使用され得る。

【0021】

背景技術の項で、また本明細書全体を通して、様々な刊行物、論文及び特許が引用又は記載されており、これらの参考文献はそれぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれる文献、行為、材料、装置、物品などの議論は、本発明の文脈を提供することを目的とする。そのような議論は、これらの内容のいずれか又は全てが、開示されている、又は特許請求されているあらゆる発明に関する先行技術の一部を形成することを認めるものではない。

【0022】

別途定義されていない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び科学用語は、本発明が関係する分野の当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。さもなければ、本明細書で使用する特定の用語は、本明細書で規定されている意味を有する。

【0023】

本明細書で使用する場合、及び添付した特許請求の範囲においては、単数形「a」、「an」及び「the」は、別途文脈が明白に規定していない限り、複数の言及を含むことに留意しなければならない。

【0024】

10

20

30

40

50

特に明記しない限り、本明細書に記載される濃度又は濃度範囲などの任意の数値は、全ての場合において、用語「約」によって修飾されていると理解されるべきである。したがって、数値は、通常、列挙された値の±10%を含む。例えば、濃度1mg/mLは、0.9mg/mL～1.1mg/mLを含む。同様に、1%(w/v)～10%(w/v)の濃度範囲は、0.9%(w/v)～11%(w/v)を含む。本明細書で使用する場合、数値範囲の使用は、全ての可能な部分的範囲、その範囲内の全ての個々の数値を明示的に含み、文脈に明らかに別段の指示がない限り、そのような範囲内の整数及び値の分数を含む。

#### 【0025】

別段の指示がない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、一連のあらゆる要素を指すと理解すべきである。当業者は、通例の実験だけを使用して、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多数の等価物を認識することになるか、又は確認することができ得るであろう。このような等価物は、本発明に包含されるものとする。

10

#### 【0026】

本明細書で使用する場合、用語「～を含む(comprises)」、「～を含む(comprising)」、「～を含む(includes)」、「～を含む(including)」、「～を有する(has)」、「～を有する(having)」、「～を含有する(contains)」、若しくは「～を含有する(containing)」、又はそれらの任意の他の変形は、記載された整数又は整数群を包含することを意味するものと理解されるが、任意の他の整数又は整数群の排除を意味するものではなく、非排他的又はオープンエンドであることが意図されている。例えば、構成要素の一覧を含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、又は装置は必ずしもそれらの構成要素のみに限定されるものではなく、明示的に列挙されていない、又はそのような組成物、混合物、プロセス、方法、物品、若しくは装置が本来具備している他の構成要素を含むことができる。さらに、明確に反対のことを述べない限り、「又は」は包括的「又は」を意味し、排他的「又は」を意味しない。例えば、条件A又はBは、以下のいずれか1つによって満たされる。Aが真であり(又は、存在し)且つBが偽である(又は、存在しない)、Aが偽であり(又は、存在しない)且つBが真である(又は、存在する)、並びにA及びBの両方が真である(又は、存在する)。

20

30

#### 【0027】

本明細書で使用する場合、多数の列挙された要素間の接続語「及び/又は」は、個々の選択肢及び組み合わせた選択肢の両方を包含すると理解される。例えば、2つの要素が「及び/又は」によって結合される場合、第1選択肢は第2要素を伴わない第1要素の適用性を指す。第2選択肢は、第1要素を伴わない第2要素の適用性を指す。第3選択肢は、第1及び第2要素を合わせた適用性を指す。これらの選択肢のいずれか1つは、本明細書で使用する用語「及び/又は」の意味の範囲内に含まれ、このため用語「及び/又は」の要件を満たすと理解される。2つ以上の選択肢の同時の適用性は、さらに用語「及び/又は」の意味の範囲内に含まれ、このため用語「及び/又は」の要件を満たすと理解される。

#### 【0028】

本明細書で使用する場合、「～からなる(consists of)」という用語、又は「～からなる(consist of)」若しくは「～からなる(consisting of)」などのその変形は、本明細書及び特許請求の範囲を通して使用されるとき、記載された整数又は整数群を全て包含するが、その特定の方法、構造、又は組成物にさらなる整数又は整数群を加えることはできないことを意味する。

40

#### 【0029】

本明細書で使用する場合、「実質的に～からなる(consists essentially of)」という用語、又は「実質的に～からなる(consist essentially of)」若しくは「実質的に～からなる(consisting essentially of)」などのその変形は、本明細書及び特許請求の範囲を通して使用

50

されるとき、記載された整数又は整数群を全て包含し、且つ、その特定の方法、構造、又は組成物の基本の又は新規の特性を実質的に変化させない記載された整数又は整数群を任意選択的に包含することを意味する。M . P . E . P . 2 1 1 1 . 0 3 節を参照されたい。

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用する場合、「対象」は、本発明の実施形態による方法によってワクチン接種されることになるか又はワクチン接種されたあらゆる動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを意味する。用語「哺乳動物」は、本明細書で使用する場合、あらゆる哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、マウス、ネズミ、ウサギ、モルモット、サル、ヒトなど、より好ましくはヒトが挙げられるが、これに限定されない。

10

【 0 0 3 1 】

語「右」、「左」、「下」及び「上」は、参照される図面における方向を指定する。

【 0 0 3 2 】

また、本明細書で好ましい発明の構成要素の寸法又は特性に言及するときに使用される「約」、「略」、「一般に」、「実質的に」などの用語は、当業者に理解されるとおり、記載された寸法/特性が厳密な境界又はパラメータではなく、機能的に同じか又は類似している、そこからのわずかな変形を排除しないことを示すことは理解されたい。少なくとも、そのような数値パラメータを含む言及は、当該技術分野で受容されている数学的及び工業的原理（例えば、四捨五入、測定又はその他の系統誤差、製造上の公差など）を使用して、最下位数を変化させない変動を含むであろう。

20

【 0 0 3 3 】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列（例えば、ヘキソン及びファイバーポリペプチド並びにそれらをコードするポリヌクレオチド）の文脈における用語「同一」又はパーセント「同一性」は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いて、又は目視による調査によって測定されるとおり、最大の一致について比較及び整列される場合に、同じあるか、又は特定のパーセンテージの同じであるアミノ酸残基若しくはヌクレオチドを有する2つ以上の配列又は部分配列を指す。

【 0 0 3 4 】

配列比較のために、通常1つの配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験配列及び参照配列をコンピューターに入力し、必要に応じて部分配列の座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次に、配列比較アルゴリズムが、指定されたプログラムパラメータに基づいて参照配列に対する試験配列のパーセント配列同一性を計算する。

30

【 0 0 3 5 】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)によって、又は目視による調査(一般に、Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc.とJohn Wiley & Sons, Inc.,の合併事業(1995年増補版)(Ausubel)を参照のこと)によって実行され得る。

40

【 0 0 3 6 】

パーセント配列同一性及び配列類似性を判定するのに好適なアルゴリズムの例は、BL

50

A S T及びB L A S T 2 . 0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、A l t s c h u l e t a l . ( 1 9 9 0 ) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0及びA l t s c h u l e t a l . ( 1 9 9 7 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2において記載される。B L A S T分析を実施するためのソフトウェアは、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o nを通して公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同一の長さの文字列とアラインメントさせた場合、いくつかの正の値の閾値スコアTと一致又はそれを満たす、クエリ配列中の長さWの短い文字列を同定することにより、高スコア配列対(H S P)をまず同定することを含む。Tは隣接文字列スコア閾値と称される(A l t s c h u l e t a l、上記)。これらの最初の隣接文字列ヒットは、より長いH S Pを含む文字列を探し出すための探索を開始するためのシードとして作用する。次に、文字列ヒットは、累積アラインメントスコアが増加し得る限り、各配列に沿って両方向に伸長される。

#### 【0037】

累積スコアは、ヌクレオチド配列に関して、パラメータM(一致残基の対に関する報酬スコア;常に $>0$ )及びN(不適正残基に関するペナルティスコア;常に $<0$ )を用いて計算される。アミノ酸配列に関して、スコアリングマトリックスは、累積スコアを計算するために使用される。各方向における文字列ヒットの伸長は、累積アラインメントスコアが、その最大到達値から量X減少する場合;1つ以上の負のスコアの残基のアラインメントが蓄積することにより、累積スコアが0以下となる場合;又はいずれかの配列の端に到達する場合に停止される。B L A S TアルゴリズムのパラメータW、T、及びXは、アラインメントの感度及び速度を決定する。B L A S T Nプログラム(ヌクレオチド配列用)は、ワード長(W)が11、期待値(E)が10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、及び両鎖の比較を初期設定として使用する。アミノ酸配列に関して、B L A S T Pプログラムは、ワード長(W)が3、期待値(E)が10、及びB L O S U M 6 2スコアリングマトリックスを初期設定として使用する(H e n i k o f f & H e n i k o f f , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 1 0 9 1 5 ( 1 9 8 9 ))。

#### 【0038】

パーセント配列同一性を計算することに加えて、B L A S Tアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析を行う(K a r l i n & A l t s c h u l , P r o c . N a t ' l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 5 8 7 3 - 5 7 8 7 ( 1 9 9 3 ))。B L A S Tアルゴリズムによりもたらされる類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の一致が偶然に起こる確率を示す最小合計確率( $P(N)$ )である。例えば、試験核酸と参照核酸の比較における最小合計確率が約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、及び最も好ましくは約0.001未満である場合、核酸は参照配列と類似していると考えられる。

#### 【0039】

2つの核酸配列又はポリペプチドが実質的に同一であることのさらなる指標は、以下に記載されるとおり、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、第2の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であることである。したがって、ポリペプチドは通常、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合には第2のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指標は、以下に記載されるとおり、2つの分子がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。

#### 【0040】

本明細書で使用する場合、用語「防御免疫」又は「防御免疫応答」は、ワクチン接種された対象が、このワクチン接種を行った対象の病原性因子による感染を防除できることを意味する。病原性因子は、例えば、抗原性遺伝子産物若しくは抗原性タンパク質、又はその断片であり得る。通常、「防御免疫応答」が発現された対象は、軽度~中程度の臨床症状を発現するにすぎないか又は症状を全く発現しない。通常、特定の因子に対する「防御

10

20

30

40

50

免疫応答」又は「防御免疫」を有する対象は、前記因子による感染の結果として死亡しない。

【0041】

用語「アジュバント」は、免疫系の刺激を引き起こす1種以上の物質として定義される。この文脈において、アジュバントは、本発明のアデノウイルスベクターに対する免疫応答を増強させるために使用される。

【0042】

本明細書で使用する場合、用語「抗原性遺伝子産物又はその断片」又は「抗原性タンパク質」は、細菌、ウイルス、寄生虫、若しくは真菌タンパク質、又はその断片を含み得る。好ましくは、抗原性タンパク質又は抗原性遺伝子産物は、宿主において防御免疫応答を高め、例えば、疾患又は感染症（例えば、細菌、ウイルス、寄生虫、若しくは真菌疾患又は感染症）に対する免疫応答を誘導し、且つ/又は疾患又は感染症に対して対象を保護する免疫を対象において疾患又は感染症に対してもたらず（すなわち、ワクチン接種する）ことができる。

【0043】

アデノウイルスベクター

特定のアデノウイルスへの曝露は、特定のアデノウイルス血清型に対する免疫応答をもたらす。アデノウイルスベクターの有効性に影響を及ぼす可能性がある。ヒトアデノウイルスによる感染はヒトにおいて一般的であるため、ヒト集団におけるヒトアデノウイルスに対する中和抗体の有病率は高い。個体におけるこのような中和抗体の存在は、ヒトアデノウイルス骨格に基づく遺伝子導入ベクターの有効性を低減すると予想され得る。有効性の低減を回避するための1つの方法は、中和抗体の標的であるアデノウイルスカプシドタンパク質上のエピトープを置き換えることである。カプシドタンパク質上の標的配列は、低い有病率であり、したがって中和抗体がヒト集団において希少である他のアデノウイルスに由来するタンパク質配列で置き換えられ得る。

【0044】

「カプシドタンパク質」は、特定のアデノウイルスの血清型及び/又は向性の決定に関与する、アデノウイルス（例えば、BLY6、HAdV-4）又はその機能的断片若しくは誘導体のカプシド上のタンパク質を指す。カプシドタンパク質は通常、ファイバー、ペントン及び/又はヘキソンタンパク質を含む。特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、アデノウイルスの全体又は全長カプシドタンパク質である。他の実施形態では、カプシドタンパク質は、アデノウイルスの全長カプシドタンパク質の断片又は誘導体である。特定の実施形態では、本発明のアデノウイルスベクターによってコードされるヘキソン、ペントン及びファイバーは、同じ又は異なるアデノウイルス骨格（すなわち、BLY6ヘキソン及びBLY6ファイバー、BLY6ヘキソン及びヒトアデノウイルスファイバー、ヒトアデノウイルスヘキソン及びBLY6ファイバーなど）のものである。

【0045】

「ヘキソンポリペプチド」は、アデノウイルスヘキソンコートタンパク質、その機能的断片、及び誘導体を指す。

【0046】

「ファイバーポリペプチド」は、アデノウイルスファイバータンパク質、その機能的断片、及び誘導体を指す。

【0047】

アデノウイルスに対する中和抗体の1つの標的は、主要なコートタンパク質であるヘキソンタンパク質である。血清型を定義し、中和抗体に結合するヘキソンタンパク質又はヘキソンタンパク質内の可変配列を、本明細書に記載されるそれらのゴリラ配列などの、ヒト集団では希少なアデノウイルスに由来するヘキソンタンパク質又はヘキソンタンパク質内の可変配列で置き換えることは、ヒトで一般的に見られる抗体による中和の影響を受けにくいアデノウイルスベクターの構築を可能にし得る。

【0048】

アデノウイルスに対する中和抗体の第2の標的は、ファイバータンパク質である。ファイバータンパク質又はファイバータンパク質内の可変配列を、本明細書に記載されるそれらのゴリラ配列などの、ヒト集団では希少なアデノウイルスに由来するファイバータンパク質又はファイバータンパク質内の可変配列で置き換えることは、ヒトで一般的に見られる抗体による中和の影響を受けにくいアデノウイルスベクターの構築を可能にし得る。上記のファイバー置換とヘキソン置換との組合せは、ヒト集団に一般的に存在する抗体による中和に対する追加の抵抗性を付与することができる。

【0049】

本開示は、単離されたサルアデノウイルス血清型に由来するヘキソンポリペプチド及び/又はファイバーポリペプチドをコードする単離された核酸配列並びに単離された核酸配列のうち少なくとも1つを含むアデノウイルスベクターを提供する。

10

【0050】

ポリペプチドの「機能的誘導体」は、適宜、例えば、ポリペプチドの1つ以上のアミノ酸が、欠失、挿入、改変及び/又は置換され得る、ポリペプチドの改変されたバージョンを指す。非改変アデノウイルスカプシドタンパク質の誘導体は、例えば：

(a) そのカプシド内に誘導体カプシドタンパク質を含むアデノウイルスが、非改変カプシドタンパク質を含むアデノウイルスと比較して、実質的に同じ又は低い血清有病率を保持し；且つ/又は

(b) そのカプシド内に誘導体カプシドタンパク質を含むアデノウイルスが、非改変カプシドタンパク質を含むアデノウイルスと比較して、実質的に同じ又は高い宿主細胞感染性を保持し；且つ/又は

20

(c) そのカプシド内に誘導体カプシドタンパク質を含むアデノウイルスが、非改変カプシドタンパク質を含むアデノウイルスと比較して、実質的に同じ又は高い免疫原性を保持し；且つ/又は

(d) そのカプシド内に誘導体カプシドタンパク質を含むアデノウイルスが、非改変カプシドタンパク質を含むアデノウイルスと比較して、実質的に同じ又は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。

【0051】

「アデノウイルスベクター」は、アデノウイルスゲノムの少なくとも一部分に由来するか又は含有する組換えベクターを指す。

30

【0052】

好ましい実施形態では、単離された核酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含むヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体をコードする。特定の実施形態では、ヘキソンポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含む。好ましい実施形態では、ヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体は、BLY6ヘキソンポリペプチド(配列番号2)のアミノ酸配列又は配列番号2のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体は、配列番号2のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。

40

【0053】

好ましい実施形態では、単離された核酸配列は、ファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体をコードする。ファイバーポリペプチドは、例えば、配列番号10のアミノ酸配列を含むファイバーノブポリペプチド；配列番号11のアミノ酸配列を含むファイバーシャフトポリペプチド；及び配列番号12のアミノ酸配列を含むファイバーテールポリペプチドのうち少なくとも1つを含み得る。好ましい実施形態では、ファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体は、BLY6ファイバーポリペプチド(配列番号3)のアミノ酸配列又は配列番号3のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも95%同一であるア

50

ミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 4 】

好ましい実施形態では、本明細書で開示されるヘキソンポリペプチドのうちの少なくとも1つをコードするヘキソン核酸配列、及び本明細書で開示されるファイバーポリペプチドのうちの少なくとも1つをコードする核酸配列を含む単離された核酸が提供される。

【 0 0 5 5 】

好ましい実施形態では、本発明の実施形態による、単離されたヘキソン核酸配列及び/又は単離されたファイバー核酸配列のうちの少なくとも1つを含むベクター、好ましくはアデノウイルスベクターが提供される。アデノウイルスベクターは、例えば、少なくとも1つの導入遺伝子；並びにヘキソンポリペプチド及び/又はファイバーポリペプチドをコードする核酸配列を含み、ヘキソンポリペプチドは、本明細書で開示されるヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含むポリペプチドを含み、且つファイバーポリペプチドは、本明細書に記載されるファイバーポリペプチドを含む。

10

【 0 0 5 6 】

典型的には、本発明のアデノウイルスベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、又はバキュロウイルスベクター上に組換えアデノウイルスゲノム全体を含む。本発明の核酸分子は、クローニングにより得られるか、又は合成的に生成されるRNAの形態又はDNAの形態であり得る。DNAは、二本鎖又は一本鎖であり得る。

【 0 0 5 7 】

当業者であれば、複数の血清型に由来する要素が単一の組換えアデノウイルスベクター、例えば、ヒト又はサルアデノウイルスにおいて組み合わせ得ることを認識するであろう。したがって、異なる血清型から望ましい特性を組み合わせるキメラアデノウイルスベクターが生成され得る。したがって、いくつかの実施形態では、本発明のキメラアデノウイルスベクターは、サルヘキソン及び/又はファイバーポリペプチド配列の既存の免疫の不在を、rAd4、rAd5、rAd26又はrAd35などの現存するアデノウイルスベクターの高いレベルの抗原送達能力及び抗原提示能力と組み合わせることができた。

20

【 0 0 5 8 】

ワクチンとして使用するためのアデノウイルスベクターの利点としては、報告されている膨大な数のアデノウイルスベクターを用いた研究、開発、製造及び臨床試験における長年の経験に基づく、操作の容易性、良好な大規模での製造可能性、及び優れた安全性の記録が挙げられる。ワクチンとして用いられるアデノウイルスベクターは一般に、導入遺伝子にコードされたタンパク質に対する良好な免疫応答、例えば細胞免疫応答をもたらす。本発明によるアデノウイルスベクターは、アデノウイルスの任意の型に基づいてもよく、特定の実施形態では、ヒトアデノウイルスであり、それは任意の群又は血清型であってもよい。好ましい実施形態では、組換えアデノウイルスは、群A、B、C、D、E、F又はGに由来するヒトアデノウイルスに基づく。他の好ましい実施形態では、組換えアデノウイルスは、ヒトアデノウイルス血清型5、11、26、34、35、48、49、又は50に基づく。他の実施形態では、それはサルアデノウイルス、例えばチンパンジーアデノウイルス又はゴリラアデノウイルスであり、それらは任意の血清型であってもよい。特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、チンパンジーアデノウイルス1、3、7、8、21、22、23、24、25、26、27.1、28.1、29、30、31.1、32、33、34、35.1、36、37.2、39、40.1、41.1、42.1、43、44、45、46、48、49、50、67、又はSA7P型に基づく。

30

40

【 0 0 5 9 】

より好ましい実施形態では、第2の組成物のチンパンジーアデノウイルスベクターは、ChAdV3である。組換えチンパンジーアデノウイルス血清型3 (ChAd3又はcAd3) は、ヒトアデノウイルス血清型5 (Ad5) のものと類似した特性を有する亜群Cのアデノウイルスである。ChAd3は、C型肝炎ウイルス (HCV) のための候補ワクチンを評価するヒト試験において安全であり且つ免疫原性であることが示されている (Barnes E, et al. 2012 Science translational

50

medicine 4 : 115 ra1)。ChAd3に基づくワクチンは、ヒトAd5ベクターワクチンに匹敵する免疫応答を誘導できたことが報告された。例えば、Peruzzi D, et al. 2009 Vaccine 27 : 1293 - 300及びQuinn KM, et al. 2013 J Immunol 190 : 2720 - 35 ; 国際公開第2005/071093号パンフレット ; 国際公開第2011/0130627号パンフレット等を参照されたい。

【0060】

アデノウイルスベクター、その構築方法及びその増殖方法は、当該技術分野でよく知られており、例えば、米国特許第5,559,099号明細書、同第5,837,511号明細書、同第5,846,782号明細書、同第5,851,806号明細書、同第5,994,106号明細書、同第5,994,128号明細書、同第5,965,541号明細書、同第5,981,225号明細書、同第6,040,174号明細書、同第6,020,191号明細書及び同第6,113,913号明細書、並びにそれぞれVirology, B.N. Fields et al., eds., 3rd ed., Raven Press, Ltd., New York (1996)の67及び68章に収録のThomas Shenk, 「Adenoviridae and their Replication」、M.S. Horwitz, 「Adenoviruses」、並びに本明細書で言及している他の参考文献に記載されている。一般的には、アデノウイルスベクターの構築は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、Watson et al., Recombinant DNA, 2nd ed., Scientific American Books (1992)、及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY (1995)、並びに本明細書で言及している他の参考文献に記載されているものなど、標準的な分子生物学的手法の使用を含む。

【0061】

特定の実施形態では、アデノウイルスベクターは、E1欠失及び/又はE3欠失を含む。E1又はE3欠失は、例えば、遺伝子の完全な欠失又は部分的な欠失を含むことができ、これによりE1又はE3遺伝子産物が機能的に欠損する。したがって、特定の実施形態では、アデノウイルスは、複製欠損であり、例えば、これは、ゲノムのE1領域に欠失を含むためである。当業者に知られるとおり、アデノウイルスゲノムから必須領域が欠失している場合、これらの領域でコードされる機能は、好ましくは、プロデューサー細胞によってトランスに提供される必要がある。すなわち、E1、E2及び/又はE4領域の一部又は全部がアデノウイルスから欠失している場合、これらは、プロデューサー細胞内、例えばそのゲノムに組み込まれるか、又はいわゆるヘルパーアデノウイルス若しくはヘルパープラスミドの形態で存在する必要がある。アデノウイルスは、E3領域内にも欠失を有し得るが、これは複製に不要であるため、そのような欠失は補完される必要はない。E1、E2、E3及びE4領域のうちの1つ以上はまた、目的の導入遺伝子(通常、プロモーターに連結されている)を不活性化されることになる領域に挿入するなど、他の手段によっても不活性化され得る。

【0062】

使用可能なプロデューサー細胞(当該技術分野及び本明細書では、「パッケージング細胞」又は「補完細胞」と称される場合がある)は、所望のアデノウイルスが増殖し得る任意のプロデューサー細胞であり得る。例えば、組換えアデノウイルスベクターの増殖は、アデノウイルス内の欠損を補完するプロデューサー細胞内で行われる。そのようなプロデューサー細胞は、好ましくは、それらのゲノム内に少なくとも1つのアデノウイルスE1配列を有し、これによりE1領域内に欠失を有する組換えアデノウイルスを補完することができる。任意のE1を補完するプロデューサー細胞、例えばE1により不死化されたヒ

10

20

30

40

50

ト網膜細胞、例えば911又はPER.C6細胞（米国特許第5,994,128号明細書を参照）、E1形質転換羊膜細胞（欧州特許第1230354号明細書を参照）、E1形質転換A549細胞（例えば、国際公開第98/39411号パンフレット、米国特許第5,891,690号明細書を参照）、GH329:HeLa（Gao et al., 2000, Hum Gene Ther 11:213-19）、293などを用いることができる。特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、例えば、HEK293細胞、又はPER.C6細胞、又は911細胞、又はIT293SF細胞などである。プロデューサー細胞内でのアデノウイルスベクターの産生は（Kovesdi et al., 2010, Viruses 2:1681-703）において概説される。

#### 【0063】

特定の実施形態では、アデノウイルスベクターは、1種以上のヒトアデノウイルス核酸配列を含むキメラアデノウイルスベクターである。ヒトアデノウイルス核酸は、例えば、ヒトアデノウイルス-4（Ad-4）、ヒトアデノウイルス-5（Ad-5）、ヒトアデノウイルス-26（Ad-26）、又はヒトアデノウイルス-35（Ad-35）から選択され得る。特定の実施形態では、E1欠損アデノウイルスベクターは、ヒトAd5のアデノウイルスのE4-orf6コード配列を含む。これは、Ad5のE1遺伝子を発現するよく知られた補完細胞株、例えば293細胞又はPER.C6細胞におけるそのようなアデノウイルスの増殖を可能にする（例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる Fallaux et al., 1998, Hum Gene Ther 9:1909-17, Havenga et al., 2006, J Gen Virol 87:2135-43; 国際公開第03/104467号パンフレットを参照のこと）。

#### 【0064】

特定の実施形態では、アデノウイルスベクターは導入遺伝子を含む。「導入遺伝子」は、ベクター中において天然に存在しない核酸である異種核酸を指し、本発明によれば、導入遺伝子は、対象において免疫応答を誘発する抗原性遺伝子産物又は抗原性タンパク質をコードし得る。導入遺伝子は、例えば、標準的な分子生物学的手法によってベクターに導入され得る。導入遺伝子は、例えば、アデノウイルスベクターの欠失したE1若しくはE3領域内、又はE4領域とrITRとの間の領域内にクローン化され得る。導入遺伝子は、一般に、発現制御配列に作動可能に連結される。好ましい実施形態では、導入遺伝子は、導入遺伝子挿入部位で挿入される。

#### 【0065】

必要に応じて、本発明の実施形態によるヘキソン及び/又はファイバーポリペプチドをコードする核酸配列、及び/又は導入遺伝子は、治療される宿主（例えば、ヒト）における適切な発現を確実にするためにコドン最適化され得る。コドン最適化は、当該技術分野において広く適用されている技術である。

#### 【0066】

導入遺伝子は、アデノウイルス由来のプロモーター（例えば、主要後期プロモーター）の制御下に置かれ得る（すなわち、作動可能に連結され得る）か、又は異種プロモーターの制御下に置かれ得る。好適な異種プロモーターの例としては、CMVプロモーター及びRSVプロモーターが挙げられる。好ましくは、プロモーターは、発現カセット内部の目的の異種遺伝子上流に位置する。

#### 【0067】

好ましい実施形態では、アデノウイルスベクターは、配列番号13又は配列番号14から選択される核酸配列を含む。

#### 【0068】

##### 免疫原性組成物

免疫原性組成物は、本発明における使用のための免疫学的有効量の精製された又は部分的に精製されたヒト又はサル（例えば、ゴリラ）アデノウイルスベクターを含む組成物である。前記組成物は、当該技術分野においてよく知られる方法に従ってワクチン（「免疫原性組成物」とも称される）として製剤化され得る。このような組成物は、免疫応答を増

10

20

30

40

50

強させるためのアジュバントを含み得る。製剤における各々の構成成分の最適な比は、本開示に鑑みて当業者によく知られる技術によって決定され得る。

【0069】

本発明の実施形態による免疫原性組成物は、本開示に鑑みて当業者に知られる方法を用いて作製され得る。液体医薬組成物としては、一般に、水、石油、動物油若しくは植物油、鉱油、又は合成油などの液体担体が挙げられる。生理食塩水溶液、ブドウ糖若しくは他の糖類溶液、又はエチレングリコール、プロピレングリコール若しくはポリエチレングリコールなどのグリコールが含まれてもよい。

【0070】

本発明に有用な免疫原性組成物は、アジュバントを含み得る。本発明による同時投与に好適なアジュバントは、人において潜在的に安全であり、十分に耐容性を示し且つ有効であるものであるべきであり、QS-21、Detox-PC、MPL-SE、MoGM-CSF、TiterMax-G、CRL-1005、GERBU、TERamide、PSC97B、Adjumer、PG-026、GSK-I, AS01、AS03、AS04、AS15、GcMAF、B-a lethine、MPC-026、Adjuvax、CpG ODN、Betafectin、Alum、及びMF59を含む。

10

【0071】

投与され得る他のアジュバントとしては、レクチン、増殖因子、サイトカイン及びリンホカイン、例えばアルファ-インターフェロン、ガンマインターフェロン、血小板由来増殖因子(PDGF)、顆粒球コロニー刺激因子(gCSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(gMCSF)、腫瘍壊死因子(TNF)、上皮増殖因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、及びIL-12又はこれらのコード核酸が挙げられる。

20

【0072】

本発明の組成物は、薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤又は当業者によく知られる他の物質を含み得る。このような物質は、無毒性でなければならず、活性成分の効力を阻害してはならない。担体又は他の材料の厳密な性質は、投与経路、例えば筋肉内、皮下、経口、静脈内、皮膚、粘膜内(例えば、腸)、鼻腔内又は腹腔内経路に依存し得る。

【0073】

防御免疫を誘導するための方法

本発明の別の一般的な態様は、必要とする対象において免疫応答を誘導する方法に関する。方法は、例えば、本明細書に記載されるアデノウイルスベクター及び薬学的に許容される担体を含むワクチンを対象に投与することを含み得る。また、本明細書ではワクチンを作製する方法も提供される。方法は、本明細書に記載されるアデノウイルスベクターを薬学的に許容される担体と組み合わせることを含む。

30

【0074】

本明細書に記載されるものを含むが、それらに限定されない本発明の実施形態による免疫原性組成物のいずれかは、本発明の方法においてワクチンとして使用され得る。

【0075】

ベクターを含む免疫原性組成物/ワクチンの投与は通常、筋肉内又は皮下である。しかしながら、静脈内、皮膚、皮内又は経鼻などの他の投与様式も同様に想定され得る。免疫原性組成物の筋肉内投与は、アデノウイルスベクターの懸濁剤を注射するためのニードルを使用することにより行われ得る。代替法は、組成物を投与する無針注射デバイスの使用(例えばBiojector(商標)を使用する)、又はワクチンを含有する凍結乾燥粉末である。

40

【0076】

静脈内、皮膚若しくは皮下注射、又は罹患部位での注射のために、ベクターは、パイロジェンフリーであり且つ好適なpH、等張性及び安定性を有する非経口的に許容される水溶液の形態となる。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸リ

50

ンゲル注射液などの等張媒体を用いて好適な溶液を調製することが十分に可能である。必要に応じて、保存剤、安定剤、緩衝剤、抗酸化剤及び/又は他の添加剤が含まれ得る。徐放性製剤もまた利用され得る。

【0077】

通常、投与は、感染又は症状の発症の前に目的の抗原（例えば、細菌、ウイルス、寄生虫、及び/又は真菌病原体）に対する免疫応答を発生させる予防的な目的を有することになる。本発明により治療又は予防され得る疾患及び障害は、免疫応答が防御的又は治療的な役割を果たすことができるものを含む。他の実施形態では、アデノウイルスベクターは、曝露後の予防のために投与され得る。

【0078】

ヒト又はサル（例えば、ゴリラ）アデノウイルスベクターを含有する免疫原性組成物を対象に投与すると、対象において目的の抗原に対する免疫応答が生じる。検出可能な免疫応答を誘導するのに十分な組成物の量は、組成物の「免疫原的有効用量」又は「有効量」と定義される。本発明の免疫原性組成物は、体液性及び細胞性免疫応答を誘導することができる。典型的な実施形態において、免疫応答は、防御免疫応答である。

【0079】

投与される実際の量、及び投与の速度及び時間経過は、投与されているものの性質及び重症度に依存することになる。治療の処方、例えば、投与量などの決定は、一般開業医や他の医師、又は獣医の場合は獣医師の責任の範囲内であり、通常、治療対象の障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法、及び開業医に知られるその他の要因を考慮する。上述の手法及びプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980において見出され得る。

【0080】

アデノウイルスベクターの作製及びこのような粒子の組成物への任意選択的な製剤化後、ベクターは、個体、特にヒト又は他の霊長類に投与され得る。投与は、ヒト又は別の哺乳動物、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ウシ、ロバ、サル、イヌ又はネコに対するものであり得る。非ヒト哺乳動物への送達は、治療目的である必要はないが、実験の状況、例えばアデノウイルスベクターに対する免疫応答の機構の究明に使用するためであり得る。

【0081】

1つの例示的なレジメンにおいて、アデノウイルスベクターは、約 $10^4$ ~ $10^{12}$ ウイルス粒子/mlの濃度を含有する約 $100\mu\text{l}$ ~約 $10\text{ml}$ の範囲の量で投与される（例えば、筋肉内）。好ましくは、アデノウイルスベクターは、 $0.1$ ~ $2.0\text{ml}$ の範囲の量で投与される。例えば、アデノウイルスベクターは、 $100\mu\text{l}$ 、 $500\mu\text{l}$ 、 $1\text{ml}$ 、 $2\text{ml}$ で投与され得る。より好ましくは、アデノウイルスベクターは、 $0.5\text{ml}$ の量で投与される。任意選択により、アデノウイルスベクターは、約 $10^7\text{vp/ml}$ 、 $10^8\text{vp/ml}$ 、 $10^9\text{vp/ml}$ 、 $10^{10}\text{vp/ml}$ 、 $5 \times 10^{10}\text{vp/ml}$ 、 $10^{11}\text{vp/ml}$ 、又は $10^{12}\text{vp/ml}$ の濃度で投与され得る。通常、アデノウイルスベクターは、ヒト対象に1回の投与で約 $10^9$ ~約 $10^{12}$ ウイルス粒子（vp）の量、より典型的には約 $10^{10}$ ~約 $10^{12}\text{vp}$ の量で投与される。

【0082】

初回ワクチン接種の後、目的の抗原をコードする同じアデノウイルスベクターを含むワクチン/組成物又は目的の同じ抗原をコードする異なるアデノウイルスベクターを含むワクチン/組成物からのブースト又はキックが続き得る。

【0083】

組成物は、必要に応じて、活性成分を含有する1つ以上の単位投薬形態を含むものであり得るキット、パック又はディスプレイで提示され得る。キットは、例えば、金属又はプラスチックのホイール、例えばプリスターパックを含み得る。キット、パック又はディスプレイに投与のための使用説明書を付随させてもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 4 】

本発明の組成物は、単独で又は他の治療と組み合わせて、治療対象の状態に応じて同時に又は順次に投与され得る。

## 【 0 0 8 5 】

## 実施形態

本発明はまた、以下の非限定的な実施形態を提供する。

## 【 0 0 8 6 】

実施形態 1 は、配列番号 1 のアミノ酸配列又は配列番号 1 のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含むヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体をコードする単離された核酸配列である。

10

## 【 0 0 8 7 】

実施形態 2 は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含むヘキソンポリペプチドをコードする単離された核酸配列である。

## 【 0 0 8 8 】

実施形態 3 は、ヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体が、B L Y 6 ヘキソンポリペプチド（配列番号 2）のアミノ酸配列又は配列番号 2 のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 2 のいずれか 1 つの単離された核酸配列である。

## 【 0 0 8 9 】

実施形態 4 は、実施形態 1 ~ 3 の核酸配列のいずれか 1 つを含み、且つファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体をコードする単離された核酸配列をさらに含む、単離された核酸配列である。

20

## 【 0 0 9 0 】

実施形態 5 は、ファイバーポリペプチドが、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含むファイバーノブポリペプチド配列を含む、実施形態 4 の単離された核酸配列である。

## 【 0 0 9 1 】

実施形態 6 は、ファイバーポリペプチドが、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含むファイバーシャフトポリペプチド配列を含む、実施形態 4 の単離された核酸配列である。

## 【 0 0 9 2 】

実施形態 7 は、ファイバーポリペプチドが、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含むファイバーテールポリペプチド配列を含む、実施形態 4 の単離された核酸配列である。

30

## 【 0 0 9 3 】

実施形態 8 は、ファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体が、B L Y 6 ファイバーポリペプチド（配列番号 3）のアミノ酸配列又は配列番号 3 のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態 4 ~ 7 のいずれか 1 つの単離された核酸配列である。

## 【 0 0 9 4 】

実施形態 9 は、ファイバーノブポリペプチド配列が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含むファイバーノブポリペプチド配列を含むファイバーポリペプチドをコードする単離された核酸配列である。

40

## 【 0 0 9 5 】

実施形態 1 0 は、ファイバーシャフトポリペプチド配列が、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含むファイバーシャフトポリペプチド配列を含むファイバーポリペプチドをコードする単離された核酸配列である。

## 【 0 0 9 6 】

実施形態 1 1 は、ファイバーテールポリペプチド配列が、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含むファイバーテールポリペプチド配列を含むファイバーポリペプチドをコードする単離された核酸配列である。

## 【 0 0 9 7 】

50

実施形態 12 は、ファイバーポリペプチドが、B L Y 6 ファイバーポリペプチド（配列番号 3）のアミノ酸配列を含む、実施形態 9 ~ 11 のいずれか 1 つの単離された核酸配列である。

【0098】

実施形態 13 は、実施形態 1 ~ 12 のいずれかの核酸を含むベクターである。

【0099】

実施形態 14 は、アデノウイルスベクターであり、且つ導入遺伝子をさらに含む、実施形態 13 のベクターである。

【0100】

実施形態 15 は、実施形態 13 又は 14 のベクターを含む組換え細胞である。

10

【0101】

実施形態 16 は、(a) 実施形態 15 の組換え細胞を、ベクターを産生するための条件下で増殖させること；及び (b) 組換え細胞からベクターを単離することを含む、ベクターを作製する方法である。

【0102】

実施形態 17 は、実施形態 14 のベクターを含む免疫原性組成物である。

【0103】

実施形態 18 は、実施形態 17 の免疫原性組成物を対象に投与することを含む、必要とする対象において免疫応答を誘導する方法である。

【0104】

20

実施形態 19 は、(a) 少なくとも 1 つの導入遺伝子；及び (b) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含むヘキソンポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノウイルスベクターである。

【0105】

実施形態 20 は、(a) 少なくとも 1 つの導入遺伝子；及び (b) B L Y 6 ヘキソンポリペプチド（配列番号 2）のアミノ酸配列を含むヘキソンポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノウイルスベクターである。

【0106】

配列番号 21 は、(a) 少なくとも 1 つの導入遺伝子；B L Y 6 ヘキソンポリペプチド（配列番号 2）のアミノ酸配列を含むヘキソンポリペプチドをコードする核酸配列；及び (c) B L Y 6 ファイバーポリペプチド（配列番号 3）のアミノ酸配列を含むファイバーポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノウイルスベクターである。

30

【実施例】

【0107】

実施例 1：新規のアデノウイルス単離物 B L Y 6 に基づく E 1 及び E 3 欠失ベクターの作製

新規のゴリラアデノウイルス単離物の B L Y 6（J A d 1 - W T と命名される）が、同定され、且つ配列決定された。このゴリラアデノウイルス単離物は、系統的にヒトアデノウイルス種 E（H A d V - E）に属することが見出された。B L Y 6 の全ゲノムヌクレオチド配列は、配列番号 5 であると決定された。

【0108】

40

B L Y 6 に基づく A d ベクターの作製のために使用される単一のプラスミド系の説明

p B L Y 6 . d E 1 . d E 3（配列番号 8；図 5）及び p B L Y 6 . d E 1 . d E 3 . 5 I X P（配列番号 9；図 6）は、単離物 B L Y 6 に基づく全長の E 1 及び E 3 欠失アデノウイルスベクターゲノムを保有するプラスミドである。これらのプラスミド内に含有される A d ベクターゲノム配列は、それぞれ配列番号 13 又は配列番号 14 において記載される。これらのプラスミドの各々の内部において、アデノウイルスベクターゲノムは、2 つの S w a I 制限酵素部位に隣接する（すなわち、1 つの S w a I 部位が、ベクターゲノムいずれの末端にも位置する）。これらの S w a I 部位は、好適な E 1 補完細胞（H E K 2 9 3、9 1 1、及び P E R . C 6 細胞など）のトランスフェクションによるウイルスレスキューの前にプラスミド骨格からの A d ベクターゲノムの切除を容易にすることを意味

50

する。これらのプラスミドによって構成されるA dベクターゲノムはさらに、E 1欠失、E 3欠失の位置、及び右逆位末端配列(R I T R)に隣接して導入される特定の制限酵素部位を保有する。これらの制限酵素部位は、完全A dゲノムプラスミドの文脈において固有なものとして選択された。それらは、前記のそれぞれの位置又はその任意の組合せのいずれかで挿入される1つ以上の導入遺伝子発現カセットを保有するA dベクターの標準的な分子クローニング手法による容易な構築を可能にする「導入遺伝子挿入部位」となる。A dベクターの設計及びプラスミドの構築は、以下の節においてより詳細に記載される。

#### 【0109】

B L Y 6に基づくA dベクターゲノムの設計

B L Y 6に基づくA dベクターゲノムはそれぞれ、E 1欠失、E 3欠失、異なる導入遺伝子挿入部位、並びに天然E 4オープンリーディングフレーム(o r f) 6及びo r f 6 / 7のヒトアデノウイルス- 5 (H A d V - 5)のものとの置換を含むように設計された。各アデノウイルスのE 1領域は、A s i S I制限酵素部位配列を含む導入遺伝子挿入部位により欠失され、且つ置換された。各アデノウイルスのE 3領域は、F s e I制限酵素部位配列を含む導入遺伝子挿入部位により欠失され、且つ置換された。別の導入遺伝子挿入部位は、各アデノウイルスの右逆位末端配列(I T R)に隣接するP a c I制限酵素部位配列の挿入によって作製された。E 4 o r f 6及びo r f 6 / 7コード配列を含むB L Y 6配列は、配列番号6によって置換された。この置換配列は、ヒトアデノウイルス- 5 (H A d V - 5)のE 4 o r f 6及びo r f 6 / 7コード配列(G e n B a n k 配列A C \_ 0 0 0 0 0 8の塩基対3 2 9 1 4 ~ 3 4 0 7 7)を含む。

#### 【0110】

2種類のE 1領域欠失が設計され、構築された。p B L Y 6 . d E 1 . d E 3によって構成されるB L Y 6に基づくA dベクターゲノムは、配列番号5のヌクレオチド4 5 3 ~ 3 0 1 6の除去に相当するE 1領域欠失を保有する。対照的に、p B L Y 6 . d E 1 . d E 3 . 5 I X Pによって構成されるB L Y 6に基づくA dベクターゲノムは、B L Y 6の全てのE 1コード配列(すなわち、配列番号5のヌクレオチド4 5 3 ~ 3 3 6 6)を除去するより広いE 1領域を含む配列欠失を保有する。さらに、この後者のA dベクターゲノムは、E 1 B 5 5 Kとp I Xコード配列の間の非コード配列区間のH A d V - 5のものによる置換を保有するように追加的に設計された(すなわち、配列番号5のヌクレオチド3 3 6 7 ~ 3 4 5 4に相当する配列は、G e n B a n k A C \_ 0 0 0 0 0 8のヌクレオチド3 5 1 0 ~ 3 6 0 8(すなわち、配列番号7)によって置換された)。

#### 【0111】

B L Y 6に基づくA dベクターゲノムを含む単一のプラスミドの構築

p B L Y 6 . d E 1 . d E 3 (配列番号8)は、遺伝子合成(G e n S c r i p tによって実施される)及び標準的な分子クローニング手順のいくつかの工程によって構築された。第一に、所望のA dベクターゲノムの左末端を含有する(すなわち、前述のE 1欠失を内部に持つ)3 5 8 6 b p DNA断片(配列番号15)が合成され、M f e I - N d e I制限断片として、E c o R I及びN d e I消化p B R 3 2 2 (G e n B a n k 受入番号 - J 0 1 7 4 9 . 1)に結合されて、B L Y 6中間体プラスミド1を得た。第二に、所望のA dベクターゲノムの右末端を含有する(すなわち、前述のE 3欠失、部分的なE 4配列置換、及びr I T Rに隣接する導入遺伝子挿入部位を内部に持つ)4 1 3 8 b p断片(配列番号16)が合成され、B a m H I - N d e I制限断片として、B a m H I及びN d e I消化B L Y 6中間体プラスミド1に結合されて、B L Y 6中間体プラスミド2を得た。第三に、中間のA dベクターゲノム断片を含有する4 5 6 3 b p断片(配列番号17)が合成され、B a m H I - M f e I制限断片として、B a m H I及びM f e I消化B L Y 6中間体プラスミド2に結合されて、B L Y 6中間体プラスミド3(配列番号18)を得た。第四に、B L Y 6ウイルスゲノム(配列番号5)の1 8 9 8 7 b p B s r G I - B s r G I制限断片が、B s r G I消化B L Y 6中間体プラスミド3に結合されて、最終プラスミドp B L Y 6 . d E 1 . d E 3 (配列番号8)を得た。

#### 【0112】

10

20

30

40

50

pBLY6.dE1.dE3.5IXP (配列番号9) は、前述のBLY6中間体プラスミド3 (配列番号18) が最初に所望のE1欠失及びAd5 pIXプロモーター挿入を含有するように改変されたことを除いてpBLY6.dE1.dE3と同じ方法で構築された。これは、後にAsiSI-AgeI制限断片としてAsiSI及びAgeI消化BLY6中間体プラスミド3に結合された638bp断片 (配列番号19) の合成によって行われた。

#### 【0113】

pBLY6.FLuc (配列番号20) 及びpBLY6.RSVF-2A-GLuc (配列番号21) は、それぞれE1欠失の位置で挿入された導入遺伝子発現カセットを備えるBLY6に基づくAdベクターゲノムを内部に持つpBLY6.dE1.dE3由来プラスミドである。これらのプラスミド内に保有されるAdベクターゲノム配列は、それぞれ配列番号22及び配列番号23において記載される。pBLY6.FLucは、ホタルルシフェラーゼ (FLuc) に関する導入遺伝子発現カセットを保有する。このカセットは、サイトメガロウイルス主要前初期プロモーター (すなわち、「CMVプロモーター」) によって駆動され、且つSV40由来ポリアデニル化シグナルを含有する。pBLY6.RSVF-2A-GLucは、「RSV-FA<sub>2</sub>-2A-GLuc」 (RSVF-2A-GLuc) に関する導入遺伝子発現カセットを保有し、これは、呼吸器多核体ウイルス株A2融合糖タンパク質、口蹄疫ウイルス2Aペプチド、及びガウシアルシフェラーゼ (GLuc) で構成されるキメラタンパク質である。FLucカセットのように、このカセットは、CMVプロモーターによって駆動され、SV40ポリアデニル化シグナルを保有する。加えて、このカセットは、5'非翻訳領域内にヒトアポリタンパク質A1遺伝子のイントロン2を含む配列を含有する。FLuc及びRSVF-2A-GLuc発現カセットはそれぞれ、いくつかの標準的な遺伝子合成及び分子クローニング工程によって構築された後、それらは、それぞれpBLY6.dE1.dE3の固有のAsiSI制限酵素部位に結合されて、pBLY6.FLuc及びpBLY6.RSVF-2A-GLucを生成した。

#### 【0114】

BLY6に基づくアデノウイルスベクターの作製及び生産

それぞれアデノウイルスベクターゲノム配列配列番号22及び配列番号23を含む、アデノウイルスベクター-BLY6.FLuc (JAd1NVT003とも命名される) 及びBLY6.RSVF-2A-GLuc (JAd1NVT001とも命名される) は、対応するAdベクターゲノムプラスミド (すなわち、pBLY6.FLuc及びpBLY6.RSVF-2A-GLuc) のE1補完PER.C6細胞へのトランスフェクションによって作製された。10%ウシ胎仔血清 (FBS) 及び10mM MgCl<sub>2</sub>が補充されたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中の接着培養物として増殖されたPER.C6細胞へのトランスフェクションの前に、Adベクターゲノムプラスミドは、SwaIで消化されて、プラスミドから対応するアデノウイルスベクターゲノムを放出した。トランスフェクションは、リポフェクタミントランスフェクション試薬 (Invitrogen; Carlsbad, CA) を用いて標準的な手順に従って実施された。ウイルスレスキュートランスフェクションの回収後、PER.C6細胞培養物に対する複数回の連続的な感染ラウンドによって、ウイルスをさらに増幅した。ウイルスを、以前に記載された2工程の塩化セシウム (CsCl) 密度勾配超遠心法を用いて粗製のウイルス回収物から精製した (Havenga et al., 「Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells」, J. Gen. Virol. 87 (8): 2135-43 (2006))。ウイルス粒子 (VP) 力価は、以前に記載された分光光度法に基づく手順によって測定された (Maizel et al., 「The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types

10

20

30

40

50

2, 7A, and 12」, *Virology*, 36(1): 115-25 (1968) )。

【0115】

新規のアデノウイルスベクターによって誘導される細胞性及び体液性免疫応答

実施例2及び3は、本明細書で生成された新規のベクターであるBLY6に基づくアデノウイルスベクターの免疫原性を評価するために実施された実験を記載する。これらの実験では、筋肉内免疫後のマウスにおいて、ベクターにコードされる(モデル)抗原に対する体液性及び細胞性免疫応答を誘導する能力について新規のベクターが評価された。ベクターは、2つの異なる抗原: ホタルルシフェラーゼ(FLuc)及びRSV-FA<sub>2</sub>-2A-GLuc(RSVF-2A-GLuc)を用いて試験された。RSVF-2A-GLucは、呼吸器多核体ウイルス株A2融合糖タンパク質、口蹄疫ウイルス2Aペプチド、及びガウシアルシフェラーゼ(GLuc)で構成されるキメラタンパク質である。各ベクターは、同じ抗原をコードする導入遺伝子カセットを保有するヒトアデノウイルス26型(HAdV-26、本明細書ではAd26とも称される)又はヒトアデノウイルス49型(HAdV-49、本明細書ではAd49とも称される)に基づくベンチマークベクターと並べて比較された。それぞれの抗原に対する免疫応答は、酵素免疫スポットアッセイ(ELISPOT)、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、及びRSVF-2A-GLuc抗原の場合は呼吸器多核体ウイルス中和アッセイ(VNA)などのよく知られる免疫学的アッセイを用いて測定された。

【0116】

実施例2: BLY6・FLucによって誘導される細胞性免疫応答

新規のアデノウイルスベクターBLY6の細胞性免疫原性を評価するために、Balb/Cマウスを、Ad26・FLuc、Ad49・FLuc(陽性対照)、ホタルルシフェラーゼを発現するBLY6ベクター(BLY6・FLuc)、又は導入遺伝子をコードしないアデノベクター(空のAd26)で筋肉内注射によって免疫化した。投与のために2つのベクター用量が試験された: マウス毎に $10^9$ 及び $10^{10}$ ウイルス粒子(vp)。免疫化の2週間後、マウスを殺し、脾細胞を15量体の重複FLucペプチドプールで一晩刺激した(実験構成 図1A)。細胞性免疫応答を、IFN-分泌細胞の相対的な数を測定するエクスピボELISPOTアッセイによって決定した(図1B)。結果は、高用量の免疫化( $10^{10}$ )で、BLY6により誘導される細胞性免疫応答が、Ad26・FLucに関して見られる応答とほとんど同程度に高かったことを示す。対照的に、低用量の免疫化( $10^9$ )で、BLY6・FLucは、Ad26・FLucより強い応答をもたらした。

【0117】

全体的に見て、本発明のFLuc発現組換えBLY6アデノウイルスベクターにより誘導される細胞性免疫応答は、明らかにマウスにおけるこのベクターの強力な免疫原性を示している。

【0118】

実施例3: BLY6・RSVF-2A-GLucによって誘導される細胞性及び体液性免疫応答

新規のアデノウイルスベクターBLY6の免疫原性はさらに、ベクターにコードされた(モデル)ワクチン抗原としてRSV-FA<sub>2</sub>-2A-GLuc(RSVF-2A-GLuc)を用いて評価された。Balb/Cマウスを、Ad26・RSVF-2A-GLuc(陽性対照)若しくはBLY6・RSVF-2A-GLuc(両方ともにマウス毎に $10^8$ 、 $10^9$ 及び $10^{10}$ ウイルス粒子)、又はAd26・FLuc若しくはBLY6・FLuc(両方ともにマウス毎に $10^{10}$ ウイルス粒子)で筋肉内において免疫化した。8週後にマウスを殺し、血清試料及び脾細胞を回収した(図2A)。様々な免疫パラメータを下記のとおり評価した。

【0119】

ウイルス中和アッセイを、呼吸器多核体ウイルス中和抗体を誘発するBLY6・RSV

F - 2 A - G L u c の能力を評価するために実施した。図 2 B は、免疫化の 8 週後に回収された血清試料について測定された呼吸器多核体ウイルス株 A 2 ( R S V A 2 ) V N A 力価を示す。各点は 1 頭のマウスを表し、バーは群平均を表し、点線は定量下限に相当する ( L L O Q = 6 , 8 8 ; 直線性試料の平均終点力価 ) 。結果は、B L Y 6 . R S V F - 2 A - G L u c による  $10^{10}$  v p 用量の免疫化により、同じ抗原をコードするベンチマークの A d 2 6 について見られたものより高い R S V A 2 中和力価が生じたことを示す。B L Y 6 . R S V F - 2 A - G L u c に対する力価は、免疫化のために使用される最大用量  $10^{10}$  v p で主に検出された。予想されるとおり、R S V A 2 特異的応答は、ホタルルシフェラーゼをコードするアデノベクターに対して検出されなかった。

#### 【 0 1 2 0 】

ベクターにコードされた抗原に対する細胞性免疫の誘導は、R S V - F A<sub>2</sub> 特異的 E L I S P O T アッセイによって評価された。この目的のため、免疫化の 8 週間後、免疫化されたマウスから脾細胞を単離し、R S V - F A<sub>2</sub> タンパク質を架橋する 1 5 量体の重複ペプチドで一晩刺激し、細胞性免疫応答を、I F N - 分泌細胞の相対的な数を測定するエクスピボ E L I S P O T アッセイによって決定した。データは、R S V F - 2 A - G L u c をコードする新規のベクター B L Y 6 によって誘発される抗原特異的細胞性免疫応答が、用量依存的であり、且つベンチマークベクターである A d 2 6 . R S V F - 2 A - G L u c によって誘導されるものと用量毎に同様の大きさであったことを示す ( 図 2 C ) 。予想されるとおり、R S V F - F A<sub>2</sub> 特異的応答は、ホタルルシフェラーゼをコードするアデノベクターで免疫化されたマウスの脾細胞から測定されなかった。

#### 【 0 1 2 1 】

R S V - F A<sub>2</sub> 特異的 I g G 抗体を誘発する R S V F - 2 A - G L u c 発現ベクターの能力を、E L I S A によって評価した。R S V F - 2 A - G L u c 導入遺伝子又はホタルルシフェラーゼ ( 対照 ) を発現する A d 2 6 ( 陽性対照 ) 及び B L Y 6 ベクターで免疫化されたマウスから免疫化の 8 週間後に回収された血清が、抗 R S V F A<sub>2</sub> I g G 抗体 E L I S A において試験された。特に、この E L I S A は、組換え安定型プレ融合 R S V - F A<sub>2</sub> タンパク質 ( プレ - R S V - F ) に対して結合可能な I g G 抗体を検出する。結果は、B L Y 6 . R S V F - 2 A - G L u c が、A d 2 6 . R S V F - 2 A - G L u c によって誘導されるものより高いプレ R S V - F 特異的 I g G 抗体力価を用量依存的に誘発したことを示す ( 図 2 D ) 。予想されるとおり、R S V - F A<sub>2</sub> 特異的抗体力価は、ホタルルシフェラーゼのみをコードするベクターで免疫化されたマウス由来の血清において検出されなかった。

#### 【 0 1 2 2 】

まとめると、データは、B L Y 6 ベクターが、H A d V - 2 6 に基づくベンチマークベクターによって誘導されるものと同様の又はより高い、コードされた抗原に対する強力な細胞性及び体液性免疫応答を誘導したことを示す。これらの免疫応答は、明らかにマウスにおける B L Y 6 ベクターの強力な免疫原性を示す。

#### 【 0 1 2 3 】

実施例 4 : 新規及び既存のアデノウイルスベクター間の血清学的交差中和の評価

新規の B L Y 6 アデノウイルスワクチンベクターとしてのそれらの潜在的な有用性に関して、本明細書で作製される新規アデノウイルスベクターは、好ましくは、ヒトアデノウイルス血清型 H A d V - 5 及び H A d V - 3 5 に基づくベクターなどの、ワクチンベクターとして現在既に開発中の既存のアデノウイルスベクターとは血清学的に異なるであろう。したがって、交差中和試験を、H A d V - 4、H A d V - 5、H A d V - 2 6、H A d V - 3 5 及び H A d V 4 9 に基づく新規の B L Y 6 アデノウイルスベクター及びいくつかの既存のベクター間で実施した。この目的のため、これらのアデノウイルスベクターの 1 つに対してそれぞれ産生されるマウス抗血清は、アデノウイルス中和アッセイにおいて各種ベクターの各々に対して試験された。このアッセイのために使用されるマウス抗血清は、マウス当たり  $10^{10}$  ベクター粒子によるそれらの免疫化の 2 週間又は 8 週間後に B a 1 b / C マウスから回収された。アデノウイルス中和アッセイは、以前に記載されたとおり

10

20

30

40

50

に行われた (Spangiers et al 2003, J. Clin. Microbiol. 41: 5046-5052)。簡潔に述べると、1:16の希釈度から始めて、血清を2倍ずつ段階希釈し、続いてホタルルシフェラーゼ (FLuc) を発現するアデノウイルスベクターと事前に混合した後、A549細胞とともに (細胞当たり500個のウイルス粒子の感染の多重度で) 一晚インキュベートした。感染の24時間後に測定された感染細胞ライセートにおけるルシフェラーゼ活性レベルは、ベクター感染効率を表した。所与のベクターに対する中和力価は、ベクター感染効率の90%の低減をもたらすことができる最高の血清希釈度として定義された。中和力価は、以下のカテゴリーに任意に分けられた: < 16 (中和なし)、16 ~ 200、200 ~ 2,000、及び > 2,000。結果は、試験されたベクターの間で大部分が交差中和を示さない (図3)。ベクター BLY6 と Ad26 の間で見られたいくつものわずかな、一方向の交差中和があっただけで、BLY6 抗血清は、16.12 (すなわち、16の検出下限値のすぐ上) の Ad26 に対して中和力価を表示し、Ad26 抗血清は、BLY6 に対して中和力価を示さなかった。このように、新規のアデノウイルスベクター BLY6 は、試験されたパネルに含まれるヒトアデノウイルスベクター、すなわち、Ad26、Ad35、Ad49、Ad5 及び Ad4 と交差中和を示さないか、又は非常にわずかに示した。したがって、このベクターは、場合によっては、例えば、異種プライム-ブーストワクチン接種レジメンの文脈において、或いは又はさらに、異なる疾患若しくは抗原に対する一連の2回以上の継続的なワクチン接種の文脈において、連続的な免疫化におけるこれらの又は他の異なるアデノウイルスベクターの1種以上と組み合わせて使用され得る。

10

20

#### 【0124】

実施例5: ヒト集団における新規のアデノウイルスベクターの血清有病率

有効なワクチンベクターとしてのそれらの潜在的な使用のために重要なことは、本明細書に記載される新規のアデノウイルスベクターが、ワクチン標的集団における高レベルの既存の抗ベクター体液性免疫によって妨げられないことである。したがって、BLY6ベクターは、米国 (US) 及び欧州連合 (EU) に居住する18歳~55歳までの成人に由来する200名のヒトコホート血清試料内のそれらの血清有病率について評価された。ベクターは、実施例3において実行され且つ以前に記載されたとおりの標準的なアデノウイルス中和アッセイを実施することによって、ヒト血清試料による中和について試験された (Spangiers et al 2003, J. Clin. Microbiol. 41: 5046-5052)。簡潔に述べると、1:16の希釈度から始めて、血清を2倍ずつ段階希釈し、続いてホタルルシフェラーゼ (FLuc) を発現するアデノウイルスベクターと事前に混合した後、A549細胞とともに (細胞当たり500個のウイルス粒子の感染の多重度で) 一晚インキュベートした。感染の24時間後に測定された感染細胞ライセートにおけるルシフェラーゼ活性レベルは、ベクター感染効率を表した。所与のベクターに対する中和力価は、ベクター感染効率の90%の低減をもたらすことができる最高の血清希釈度として定義された。中和力価は、以下のカテゴリーに任意に分けられた: < 16 (中和なし)、16 ~ 300、300 ~ 1,000、1,000 ~ 4000 及び > 4000。

30

#### 【0125】

結果は、BLY6アデノウイルスベクターが、試験されたヒト対象において対照 Ad5ベクター及びベンチマーク Ad26 及び Ad35ベクターより著しく低い血清有病率を有することを示す (図4)。さらに、新規の BLY6ベクターに対して見られた陽性中和力価は一般に、非常に低く、概して300より高くなかった。対照的に、Ad26 及び Ad5 に対して見られた陽性中和力価の大部分は、300より高かった。

40

#### 【0126】

まとめると、上のデータは、BLY6ベクターに対する既存の体液性抗ベクター免疫が、評価されたワクチン標的集団において低いと考えられ得ることを示し、これらのベクターがこれらの集団において有効なワクチンベクターとしての可能性を有することを示唆している。

50

## 【 0 1 2 7 】

実施例 6：懸濁 P E R . C 6 細胞中のアデノウイルスベクター生産性

臨床試験及びそれ以降に使用されるアデノウイルスベクターは、スケーラブルな無血清アデノウイルス生産プラットフォームで高力価まで容易に生産可能である必要がある。本明細書で懸濁 P E R . C 6 細胞又は s P E R . C 6 と呼ばれる懸濁適応 P E R . C 6 (登録商標)細胞は、バイオリクターでのアデノウイルスベクターの大規模製造を支援し、高力価で臨床グレードのベクター製剤、例えば、H A d V - 2 6 又は H A d V - 3 5 に基づく E 1 欠損ベクターを大量にもたらすことが示されているため、このようなプラットフォームとなる(欧州特許第 2 5 3 6 8 2 9 B 1 号明細書、欧州特許第 2 3 5 0 2 6 8 B 1 号明細書)。

10

## 【 0 1 2 8 】

本明細書に記載される新規のベクターが、s P E R . C 6 細胞に基づく生産プロセスに合うかどうかに関する最初の評価として、小規模のベクター生産性実験を、振盪フラスコ中で培養された s P E R . C 6 細胞に対して実施した。これらの生産性実験は、実施例 1 において記載される新規の A d ベクター B L Y 6 の F l u c コード化バージョンを用いて実行された。ベンチマーク対照として、H A d V - 2 6 に基づくベクター A d 2 6 . F l u c を使用した。4 m M の L - グルタミン ( L o n z a ) を補充した 1 0 m l の総量の P E R M E X C I S (登録商標)培地 ( L o n z a から入手可能)中において  $1 \times 10^6$  細胞 / m l の密度で振盪フラスコに播種された懸濁 P E R . C 6 細胞培養物が、様々なウイルス粒子 ( V P ) 対細胞比率で各種ベクターにより感染され、4 日間インキュベートされた。感染のために使用された様々な V P 対細胞比率は、7 0、1 5 0 及び 9 0 0 であった。感染細胞培養物の試料を毎日採取し、V P 力価を、これらの試料中において C M V プロモーター (試験された全てのベクターに存在する) に特異的なプライマー及びプローブを用いる定量的 P C R ( q P C R ) に基づくプロトコルによって決定した。このプロトコルでは、遊離のベクター D N A (すなわち、ウイルス粒子にパッケージされていないベクターゲノム) を除去するために、q P C R の前に試験試料を D N A 分解酵素処理する必要がある。

20

## 【 0 1 2 9 】

新規のベクター B L Y 6 . F l u c について得られた生産性の結果を図 8 に示す。B L Y 6 . F l u c は、全ての V P 対細胞感染比率及び試験された回収時点で、ベンチマーク対照ベクター A d 2 6 . F l u c よりも高い V P 力価を示した。これらの結果は、s P E R . C 6 に基づく無血清懸濁細胞培養物モデルに対して新規のベクター B L Y 6 の良好な生産性を実証している。

30

## 【 0 1 3 0 】

まとめると、上で示されるとおりの本発明の新規の B L Y 6 に基づく組換えアデノウイルスベクターによって誘導される体液性及び細胞性免疫応答の試験は、明らかにマウスにおけるこれらのベクターの強力な免疫原性を示す。加えて、これらのベクターは、特定の既存のアデノウイルスワクチンベクター候補 (例えば、A d 2 6 及び A d 3 5 ) に対して交差中和抗体応答を誘導しないか、若しくはほとんど誘導しないことを実証した。さらに、新規のベクターは、ヒトにおいて低い血清有病率を示した。最後に、新規のベクターは、高い収量で容易に生産され得る。低い血清有病率、強力な免疫原性及び生産性の組合せは、本発明の新規のアデノウイルスベクターが、様々な病原体に対する新規のワクチンベクター候補として有用である可能性があり、且つさらに遺伝子治療及び / 又は診断において有用性を有し得ることを示唆する。

40

## 【 0 1 3 1 】

上記の実施形態に対して、この広い発明概念から逸脱することなく変更を加えることができることが当業者に理解されるであろう。したがって、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されるものではなく、本明細書によって規定される本発明の趣旨及び範囲に含まれる変形形態を包含することが意図されることを理解されたい。

以下の態様を包含し得る。

50

[ 1 ] 配列番号 1 のアミノ酸配列又は配列番号 1 のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含むヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体をコードする単離された核酸配列。

[ 2 ] 前記ヘキソンポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するヘキソン超可変領域包含ポリペプチドを含む、上記 [ 1 ] に記載の単離された核酸配列。

[ 3 ] 前記ヘキソンポリペプチド又はその機能的誘導体が、配列番号 2 のアミノ酸配列又は配列番号 2 のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、上記 [ 2 ] に記載の単離された核酸配列。

[ 4 ] ファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体をコードする核酸配列をさらに含む、上記 [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれか一項に記載の単離された核酸配列。

10

[ 5 ] 前記ファイバーポリペプチドが、( 1 ) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含むファイバーノブポリペプチド配列、( 2 ) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含むファイバーシャフトポリペプチド配列、及び( 3 ) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含むファイバーテールポリペプチド配列からなる群から選択される少なくとも 1 つを含み、好ましくは、前記ファイバーポリペプチド又はその機能的誘導体が、配列番号 3 のアミノ酸配列又は配列番号 3 のアミノ酸配列とその全長にわたって少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、上記 [ 4 ] に記載の単離された核酸配列。

[ 6 ] ( 1 ) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含むファイバーノブポリペプチド配列；( 2 ) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含むファイバーシャフトポリペプチド配列、及び( 3 ) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含むファイバーテールポリペプチド配列からなる群から選択される少なくとも 1 つを含むファイバーポリペプチドをコードする単離された核酸配列。

20

[ 7 ] 前記ファイバーポリペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、上記 [ 6 ] に記載の単離された核酸配列。

[ 8 ] 上記 [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれかに記載の核酸を含むベクター。

[ 9 ] アデノウイルスベクターであり、且つ導入遺伝子をさらに含む、上記 [ 8 ] に記載のベクター。

[ 10 ] 前記アデノウイルスベクターがさらに、E 1 欠失及び E 3 欠失のうちの少なくとも 1 つを含む、上記 [ 9 ] に記載のアデノウイルスベクター。

[ 11 ] 前記アデノウイルスベクターが、1 種以上のヒトアデノウイルス核酸配列を含むキメラアデノウイルスベクターであり、好ましくは、前記ヒトアデノウイルス核酸配列が、ヒトアデノウイルス - 4、ヒトアデノウイルス - 5、ヒトアデノウイルス - 26、又はヒトアデノウイルス - 35 のうちの少なくとも 1 つに由来する、上記 [ 9 ] 又は [ 10 ] に記載のアデノウイルスベクター。

30

[ 12 ] 前記アデノウイルスベクターが、配列番号 13 及び配列番号 14 からなる群から選択される核酸配列を含む、上記 [ 9 ] ~ [ 11 ] のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。

[ 13 ] 上記 [ 8 ] ~ [ 12 ] のいずれか一項に記載のベクターを含む組換え細胞。

[ 14 ] ( a ) 上記 [ 13 ] に記載の組換え細胞を、前記ベクターを産生するための条件下で増殖させること；及び

40

( b ) 前記組換え細胞から前記ベクターを単離することを含む、ベクターを作製する方法。

[ 15 ] 上記 [ 9 ] ~ [ 12 ] のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターを含む免疫原性組成物。

[ 16 ] 必要とする対象において免疫応答を誘導する方法であって、上記 [ 15 ] に記載の免疫原性組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

[ 17 ] 上記 [ 9 ] ~ [ 12 ] のいずれかに記載のアデノウイルスベクターを薬学的に許容される担体と組み合わせることを含む、ワクチンを作製する方法。

50

【図面】

【図 1 - 1】

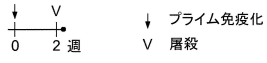


図 1A

【図 1 - 2】

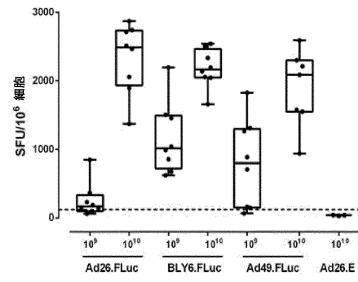


図 1B

10

【図 2 - 1】

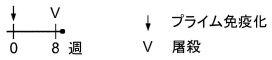


図 2A

【図 2 - 2】

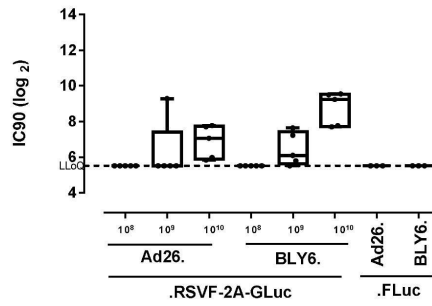


図 2B

20

30

40

50

【 図 2 - 3 】

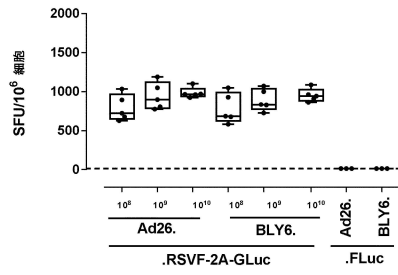


図 2C

【 図 2 - 4 】

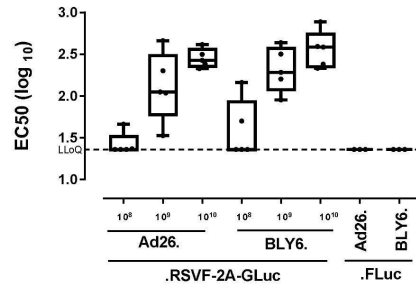


図 2D

10

【 図 3 】

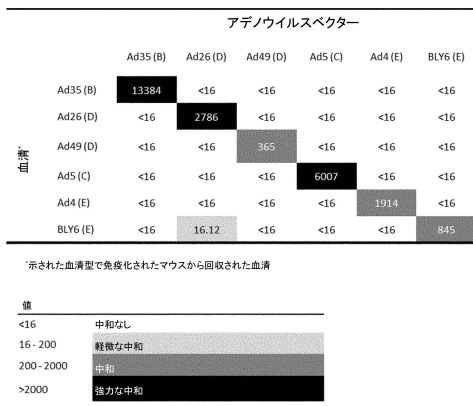


図 3

【 図 4 】

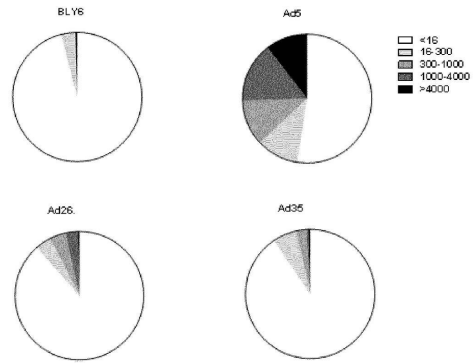


図 4

20

30

40

50

【 図 5 】

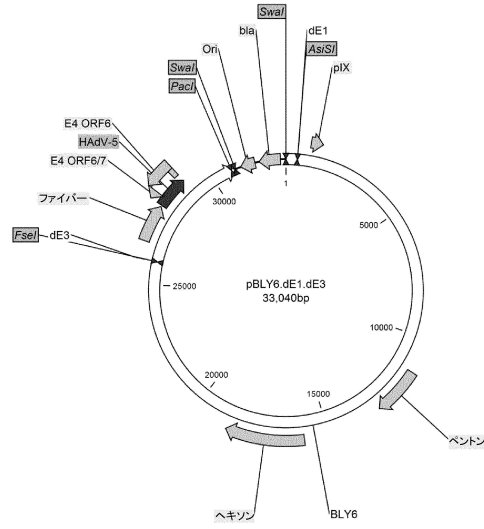


図 5

【 図 6 】

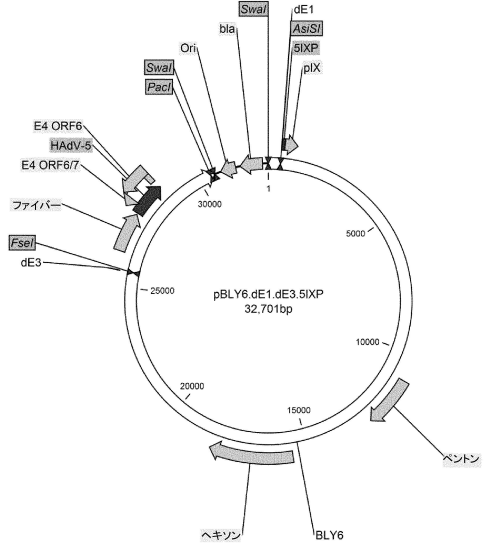


図 6

10

20

【 図 7 】

BLY6 MATPSLPLQ AYMH IAGDDA SEYLSPLQLVQ FARATDITYE LONKFRNPTV APFHDDVTR SORLIRFVP VQREDNTYSY 80  
 SA0/30-1 MATPSLPLQ AYMH IAGDDA SEYLSPLQLVQ FARATDITYE LONKFRNPTV APFHDDVTR SORLIRFVP VQREDNTYSY 80  
 BLY6 KVRTYLAVD NRVLDMASTY FD IRGLVDRG PSFKPYSGTA YNSLAPKAGP NSSOWQKEN NGGQDAKHTH YGVAATGGID 160  
 SA0/30-1 KVRTYLAVD NRVLDMASTY FD IRGLVDRG PSFKPYSGTA YNSLAPKAGP NSSOWQKEN NGGQDAKHTH YGVAATGGID 160  
 BLY6 IRRKGLQISL DEKEDNNEI YADKFGQEP QI GERNWQD ENYVGRALK KETKMKPCYG SCAPSTNKG GAQKVFREE 240  
 SA0/30-1 IRRKGLQISL DEKEDNNEI YADKFGQEP QI GERNWQD ENYVGRALK KETKMKPCYG SCAPSTNKG GAQKVFREE 240  
 BLY6 GQSIQVDDID LAFFDIPSTG GNGNTNVD KPDWNYTEN VNLETPDTH VYKPGTSDS SEANLTOCAM ANRPNYIGFR 319  
 SA0/30-1 GQSIQVDDID LAFFDIPSTG GNGNTNVD KPDWNYTEN VNLETPDTH VYKPGTSDS SEANLTOCAM ANRPNYIGFR 319  
 BLY6 DNFIGWMYN STGNMVLG QASQLNAVVD LQDRNTELSY QLLDLSLQDR TRYFSMNQA VDSYDPRV I ENHVEDEL 399  
 SA0/30-1 DNFIGWMYN STGNMVLG QASQLNAVVD LQDRNTELSY QLLDLSLQDR TRYFSMNQA VDSYDPRV I ENHVEDEL 399  
 BLY6 PNYCFPLDGA GTNAVYGVVK KEKNNGEWE DDTNVAONO ICKGNIYAME INLOANLWS FLYSNVALY PDSYKYTFAN 477  
 SA0/30-1 PNYCFPLDGA GTNAVYGVVK KEKNNGEWE DDTNVAONO ICKGNIYAME INLOANLWS FLYSNVALY PDSYKYTFAN 477  
 BLY6 WLTPTNTY DYNGRVVBP SLVDAYINIG ARWSDMDMN VNFPHHRA GIRYRSMLLQ NGRVYFPHQ VPQKFAIKR 559  
 SA0/30-1 WLTPTNTY DYNGRVVBP SLVDAYINIG ARWSDMDMN VNFPHHRA GIRYRSMLLQ NGRVYFPHQ VPQKFAIKR 559  
 BLY6 LLLPGSITY ENKFRDVM ILOGSLQDL RTDQASISFT SINLAYTFEP MAHKTASTLE AHLNRTDQS SENVYLSAAN 639  
 SA0/30-1 LLLPGSITY ENKFRDVM ILOGSLQDL RTDQASISFT SINLAYTFEP MAHKTASTLE AHLNRTDQS SENVYLSAAN 639  
 BLY6 MLYPIPANAT NVPIISPRN WAAFRGWSFT RLKTKETPSEL GSGFDPFYVY SGIIPYLDGT FYLNHTFKKY SIMFDSVSW 719  
 SA0/30-1 MLYPIPANAT NVPIISPRN WAAFRGWSFT RLKTKETPSEL GSGFDPFYVY SGIIPYLDGT FYLNHTFKKY SIMFDSVSW 719  
 BLY6 PNDRLLTPN EFEIKRTYDG EGVNADQNM TKDMLVOML SHYNIQVGF YIPEGYKDRM YSFRNFOPM SRQVQVNVY 799  
 SA0/30-1 PNDRLLTPN EFEIKRTYDG EGVNADQNM TKDMLVOML SHYNIQVGF YIPEGYKDRM YSFRNFOPM SRQVQVNVY 799  
 BLY6 KDYAVYTLAY OHNNSGFVGY LAPTRGGQOP YPANYYPYLI GKNAVSVTQ KKFICDRVWV RIPESSNFMS MGALDLOGN 879  
 SA0/30-1 KDYAVYTLAY OHNNSGFVGY LAPTRGGQOP YPANYYPYLI GKNAVSVTQ KKFICDRVWV RIPESSNFMS MGALDLOGN 879  
 BLY6 MLYANSAHAL DMNFEVDPMD ESTLLYVYVE VFDVVRVHQP HRGVEAVYL RTPFSAGNAT T 940  
 SA0/30-1 MLYANSAHAL DMNFEVDPMD ESTLLYVYVE VFDVVRVHQP HRGVEAVYL RTPFSAGNAT T 940

図 7

【 図 8 】

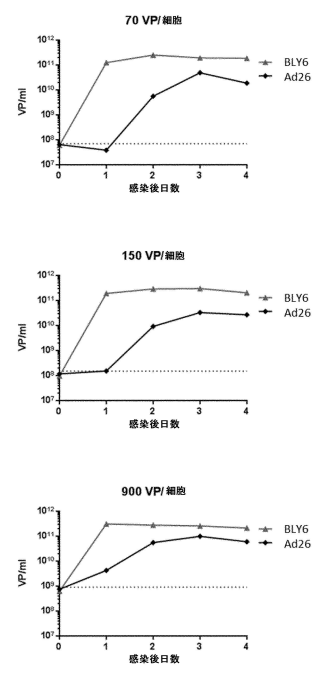


図 8

30

40

【 配列表 】

0007366014000001.app

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/34 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/34

Z N A

(72)発明者

ウイル, タコ, ジレス

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスウェッハ 4 - 6

(72)発明者

ロイ, ソウミトラ

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスウェッハ 4 - 6

(72)発明者

カーン, セリナ

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスウェッハ 4

(72)発明者

カスターズ, ジェローム, エイチ, エイチ, ヴイ,

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン, アルヒメーデスウェッハ 4 - 6

審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 1 4 3 3 0 2 ( U S , A 1 )

特表 2 0 0 9 - 5 2 3 0 0 7 ( J P , A )

特表 2 0 0 7 - 5 1 8 4 1 4 ( J P , A )

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 3 4

C 1 2 N 1 5 / 8 6 1

C 1 2 N 5 / 1 0

A 6 1 K 3 9 / 2 3 5

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 P 3 7 / 0 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q