

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5889514号
(P5889514)

(45) 発行日 平成28年3月22日 (2016. 3. 22)

(24) 登録日 平成28年2月26日 (2016. 2. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 35/76 (2015. 01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 P 37/04 (2006. 01)	A 6 1 P 37/04
C 1 2 N 7/01 (2006. 01)	C 1 2 N 7/01

請求項の数 15 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2009-507838 (P2009-507838)	(73) 特許権者	502409813
(86) (22) 出願日	平成19年4月27日 (2007. 4. 27)		ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバー
(65) 公表番号	特表2009-535032 (P2009-535032A)		シテイ・オブ・ペンシルベニア
(43) 公表日	平成21年10月1日 (2009. 10. 1)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/010347		4 フイラデルフィア・スイート 2 0 0 ・ チ
(87) 国際公開番号	W02008/010864		エスナツトストリート 3 1 6 0
(87) 国際公開日	平成20年1月24日 (2008. 1. 24)	(74) 代理人	110000741
審査請求日	平成22年4月16日 (2010. 4. 16)		特許業務法人小田島特許事務所
審査番号	不服2013-9040 (P2013-9040/J1)	(72) 発明者	スーミトラ, ロイ
審査請求日	平成25年5月16日 (2013. 5. 16)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 8
(31) 優先権主張番号	60/796, 078		7 ウェイン・パグロード 2 4 0
(32) 優先日	平成18年4月28日 (2006. 4. 28)	(72) 発明者	ウイルソン, ジェイムズ・エム
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 3
			5 グラドウイン・ノースアビニヨンドライ
			ブ 1 3 5 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変アデノウイルスヘキソタンパク質およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変アデノウイルスヘキソタンパク質を含んでなるキャプシドを有するアデノウイルスであって、前記改変アデノウイルスヘキソタンパク質が、該ヘキソタンパク質の超可変領域 1 中に最低 2 5 個のアミノ酸の欠失、および該ヘキソタンパク質の超可変領域 1 に挿入された 5 ないし 4 5 個のアミノ酸残基からなる外因性アミノ酸配列を含んでなるが、但し、該外因性アミノ酸配列がアデノウイルス配列以外であり、かつ、該外因性アミノ酸配列が免疫原のアミノ酸配列である、上記アデノウイルス。

【請求項 2】

ヘキソタンパク質が 1 個より多くの欠失を含んでなる、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

【請求項 3】

天然の超可変領域の N 末端からの最低 1 アミノ酸および C 末端からの最低 1 アミノ酸が保持される、請求項 2 に記載のアデノウイルス。

【請求項 4】

改変アデノウイルスヘキソタンパク質が、その中に挿入された 1 個より多くの外因性分子を含んでなる、請求項 2 に記載のアデノウイルス。

【請求項 5】

外因性アミノ酸配列が長さ 2 5 アミノ酸残基を含んでなる、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

10

20

【請求項 6】

アデノウイルスがその中に挿入された 1 個より多くの外因性アミノ酸配列を含み、かつ、第二の外因性アミノ酸配列がターゲティング配列を含んでなる、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

【請求項 7】

ターゲティング配列が、細胞受容体のリガンドおよび抗体若しくはそのフラグメントのエピトープよりなる群から選択される、請求項 6 に記載のアデノウイルス。

【請求項 8】

ターゲティング配列が、二特異性抗体、抗ファイバーノブ (anti-fiber knob) Fab および抗受容体抗体よりなる群から選択される、請求項 6 に記載のアデノウイルス。

10

【請求項 9】

免疫原のアミノ酸配列が T 細胞エピトープである、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

【請求項 10】

T 細胞エピトープが中和エピトープである、請求項 9 に記載のアデノウイルス。

【請求項 11】

免疫原が H I V タンパク質からの抗原である、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

【請求項 12】

免疫原のアミノ酸配列が、tat タンパク質若しくはエンベロープタンパク質から選択される H I V タンパク質からのものである、請求項 11 に記載のアデノウイルス。

20

【請求項 13】

外因性アミノ酸配列が配列番号 12 に示される E Q E L L E L D K W A S L W である、請求項 11 に記載のアデノウイルス。

【請求項 14】

免疫原のアミノ酸配列が抗体エピトープである、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のアデノウイルスであって、該アデノウイルスは、さらに、該キョプシド内にパッケージングされた核酸分子を含んでなり、該核酸配列はパッケージングおよび複製に必要な 5' 及び 3' シスエレメント並びに宿主細胞中での発現を可能にする調節配列の制御下にある導入遺伝子を含む、アデノウイルス。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫原性処方では有用な改変アデノウイルスヘキソン (hexon) タンパク質に関する。

【背景技術】

【0002】

アデノウイルスは約 36 キロベース (kb) のゲノムサイズをもつ二本鎖 DNA ウィルスであり、多様な標的組織における高度に効率的な遺伝子移入および大きい導入遺伝子容量を達成するその能力により、遺伝子移入の応用に広範に使用されている。慣習的に、アデノウイルスの E1 遺伝子を欠失し、そして選択すべきプロモーター、目的の遺伝子の cDNA 配列およびポリ A シグナルよりなる導入遺伝子カセットで置き換えて、複製欠損組換えウィルスをもたらす。

40

【0003】

アデノウイルスは、多数の他の少ないタンパク質すなわち VI、VII、IX、IIa および IVa2 と一緒に、3 種の主要なタンパク質すなわちヘキソン (II)、ペントンベース (penton base) (III) およびノブをもつファイバー (knobbed fiber) (IV) よりなる正二十面体キャプシドを含む特徴的な形態を有する [非特許文献 1]。該ウィルスゲノムは、末端タンパク質が 5' 端 (末端逆位配列 (ITR) を有する) に共有結合された直鎖状二本鎖 DNA である。該ウィルス DNA は、

50

高度に塩基性のタンパク質 V I I、および μ と命名された小型ペプチドと緊密に会合している。別のタンパク質 V はこの DNA-タンパク質複合体でパッケージングされ、そしてタンパク質 V I を介して該キャプシドに構造的連結を提供する。該ウイルスはウイルスにコードされるプロテアーゼもまた含有し、これは成熟感染性ウイルスを生じるための構造タンパク質の数種のプロセッシングに必要である。

【0004】

遺伝子送達およびワクチン処方のためのアデノウイルスの使用が記述されている。組換えアデノウイルスは宿主細胞への分子の送達について記述されている。2種のチンパンジーアデノウイルス C 1 および C 6 8 (Pan 9) のゲノムを記述する特許文献 1 を参照されたい。また、チンパンジーアデノウイルス S A d 2 2 / Pan 5、Pan 6、Pan 7 ならびにサルアデノウイルス S V 1、S V 2 5 および S V 3 9 のゲノムから構築されるベクターを記述する特許文献 2；ならびに、ハイブリッドアデノウイルスベクターおよびサルアデノウイルス S A 1 8 から構築されるベクターを記述する特許文献 3 もまた参照されたい。

【0005】

アデノウイルスに対する多様な改変が以前に提案されている。こうした改変は、アデノウイルスファイバータンパク質への挿入 [非特許文献 2]；ターゲッティングのためのペントンタンパク質への挿入 [非特許文献 3]；ターゲッティングのためのアデノウイルスタンパク質 I X への挿入 [非特許文献 4]、およびターゲッティング [非特許文献 5；特許文献 4] ならびに抗原エпитープの挿入のためのアデノウイルスヘキソンの改変を包含する。

【0006】

より具体的には、ヒトアデノウイルス血清型 2 (H A d V - 2) のヘキソンタンパク質への外来ペプチドの挿入が C r o m p t o n ら [非特許文献 6] により報告された。R o b e r t s ら [非特許文献 7] により報告された H A d V - 2 の構造を参照して、該著者らは、H A d V - 2 ヘキソンの 17 アミノ酸 (281-297) を、ポリオウイルス決定子を内部に持つ 17 アミノ酸のペプチドで置き換えた。この置換を行ったヘキソンの領域は、現在、 β シート要素 β_7 と β_8 の間の D E 1 ループと称されている [非特許文献 8]。

【0007】

C r o m p t o n ら (1994) の研究は、ヒトアデノウイルス血清型 5 (H A d - V 5) (H A d V - 2 と同一の血清学的サブグループに属しかつそれに緊密に関係する) で、上に引用される V i g n e らにより再現された。より具体的には、V i g n e らは、H A d V - 5 のヘキソンに、C r o m p t o n らにより使用されたものに同一の場所でペプチドを挿入した (H A d V - 2 ヘキソンの H A d V - 5 ヘキソンとのタンパク質アライメントに基づく)。V i g n e らは、14 個の H A d V - 5 ヘキソン残基 (269-281) をポリオウイルスペプチドならびにインテグリンターゲッティングリガンドで置き換えた。

【0008】

アデノウイルスヘキソン超可変領域は、配列が血清型間でかなり異なる領域として記述されている (非特許文献 9；非特許文献 8)。

【0009】

必要とされるものは、宿主細胞への分子の代替送達方法である。

【0010】

【特許文献 1】米国特許第 6, 083, 716 号

【特許文献 2】国際特許公開第 WO 02/33645 号

【特許文献 3】国際特許公開第 WO 04/16614 号

【特許文献 4】L a t t a, M a r t i n e らによる米国特許出願第 U S 2 0 0 3 1 4 3 2 0 9 号

【非特許文献 1】W. C. R u s s e l l, J. G e n V i r o l., 81:2573

10

20

30

40

50

－2604（2000年11月）

【非特許文献2】Curiel, D. T.、Ann N Y Acad Sci.、886：158－71（1999）

【非特許文献3】Einfield, D. A. ら、J Virol. 73：9130－6（1999）

【非特許文献4】Dmitriev, I. P. ら、（2002）J Virol. 76：6893－9（2002）

【非特許文献5】Vigne, E. ら、J Virol. 73：5156－61（1999）

【非特許文献6】Crompton ら、（1994）J Gen Virol. 75：133－9（1994） 10

【非特許文献7】Roberts ら、（1986）、Science. 232：1148－51

【非特許文献8】Rux JJ ら、（2003）J Virol. 77：9553－66

【非特許文献9】Crawford-Miksza と Schnurr DP. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues J Virol. 1996 70：1836－44 20

【発明の開示】

【0011】

[発明の要約]

一局面において、本発明は、改変アデノウイルスヘキソタンパク質を含んでなるキャプシドを有するアデノウイルスを提供する。該アデノウイルスは、アデノウイルスヘキソタンパク質の少なくとも超可変領域1および／若しくは超可変領域4中の欠失、ならびに欠失（1個若しくは複数）の部位に挿入された外因性分子をもつヘキソタンパク質を含んでなる改変キャプシドを有する。

【0012】

別の局面において、本発明はアデノウイルスベクターの特異性の変更方法を提供する。本方法は、超可変領域（1個若しくは複数）中の欠失の最低1個に異種ターゲティングアミノ酸配列が挿入された、本明細書に記述されるところの改変アデノウイルスヘキソタンパク質をもつキャプシドを有するアデノウイルスを提供することを必要とする。 30

【0013】

なお別の局面において、本発明は、本発明の改変アデノウイルスヘキソタンパク質を含むキャプシドを有するアデノウイルスを被験体に提供する段階を含んでなる、アデノウイルスベクターにより送達される免疫原性分子に対する免疫応答の増強方法を提供し、前記アデノウイルスは、キャプシド中にパッケージングされた免疫原性分子をコードする核酸分子をさらに含有する。

【0014】

なお別の局面において、本発明は、ヘキソタンパク質の機能的に欠失された超可変領域中に外因性免疫原若しくは抗原を有する改変アデノウイルスヘキソタンパク質を有するキャプシドを有するアデノウイルスを含んでなる免疫原性組成物を提供する。 40

【0015】

なお別の局面において、本発明は、ヘキソタンパク質の機能的に欠失された超可変領域1および／若しくは超可変領域4中に異種免疫原若しくは抗原を有する改変アデノウイルスヘキソタンパク質を含んでなるキャプシドを有するアデノウイルスを含有する、自己プライミングする免疫原性組成物を提供する。こうしたアデノウイルスは、アデノウイルスにより保有される発現カセット中に第二の免疫原若しくは抗原をさらに含んでなる。

【0016】

50

本発明の他の局面および利点は、本発明の以下の詳細な記述から容易に明らかとなる。

【0017】

[発明の詳細な記述]

本発明は改変アデノウイルスヘキソタンパク質を提供する。こうした改変アデノウイルスヘキソタンパク質は最低1個の超可変領域中に部分的若しくは完全な欠失を有する。該改変アデノウイルスヘキソタンパク質は、その中に挿入された1個若しくはそれ以上の独立に選択される外因性分子を有し得る。一態様において、外因性分子は少なくとも超可変領域1若しくは超可変領域4の部位に挿入されるが、但し、該外因性分子はアデノウイルス由来でない。あるいは、改変アデノウイルスヘキソタンパク質は、指定される欠失の領域にいかなる挿入断片も欠くことができる。

10

【0018】

改変アデノウイルスヘキソタンパク質を使用して、アデノウイルスキャプシドおよび／若しくは感染性アデノウイルス粒子を生成し得る。従って、本明細書で使用されるところの改変アデノウイルスキャプシドは、本明細書に記述されるところの改変アデノウイルスヘキソタンパク質を含有するアデノウイルスキャプシドを指す。

【0019】

一態様において、本発明の改変アデノウイルスキャプシドは空でありうる。すなわち、それはウイルスゲノムを欠きかつ／若しくは発現カセットを含有しない。こうした改変アデノウイルスキャプシドをタンパク質の形態での送達のため組成物中に処方し得る。あるいは、こうした改変アデノウイルスキャプシドは、宿主細胞中での発現のための適するベクターによる送達のため組成物中に処方し得る。

20

【0020】

別の態様において、改変アデノウイルスキャプシドは、細胞への送達のため1種若しくはそれ以上の異種分子をその中にパッケージングさせている改変アデノウイルスキャプシドを有するアデノウイルス粒子の形態で製造する。別の方法で明記される場合を除き、本明細書で使用されるところの改変アデノウイルスベクターは、こうしたアデノウイルス粒子を指す。

【0021】

超可変領域1 (HVR1) および超可変領域4 (HVR4) はヒトサブグループCアデノウイルスで同定されている。これらの領域の構造は、アデノウイルスサブグループCゲノムの他の超可変領域、すなわちHVR2、HVR3、HVR4、HVR5、HVR6およびHVR7の構造がそうであるように定義されていない。ヒトアデノウイルス血清型2のヘキソタンパク質を便宜上配列番号1に再現する。ヒトアデノウイルス血清型5のヘキソタンパク質を便宜上配列番号2に再現する。

30

【0022】

理論により束縛されることを願わずに、発明者は、ヘキソンのこれらのHVR領域が多様なアデノウイルス間で長さおよび配列が大きく変動し、それにより多様な長さの多様な分子の挿入に対する寛容性を有する柔軟性の構築物を提供するため、本発明の改変アデノウイルスヘキソタンパク質が有利であると考え。従って、本発明は、免疫応答の標的を定めかつ増強するのに有用な多様な異種分子の挿入を可能にする、高度に柔軟性の構築物を提供する。

40

【0023】

「機能的」という用語は、天然の産物と同一レベルでは必ずしもないとは言えその天然の機能を遂行する産物（例えばタンパク質若しくはペプチド）を指す。「機能的」という用語は、ある産物をコードしかつそれから所望の産物が発現され得る遺伝子もまた指すことがある。「機能の欠失」は、その天然の機能を遂行する該産物の能力を破壊する欠失を指す。

【0024】

本明細書で使用されるところの、HVRに関して本明細書に記述される欠失は、ヘキソ

50

ンタンパク質中でHVRを構成するアミノ酸配列の全部若しくは一部の除外を必要とし得る。例えば、45アミノ酸のHVR（例えばAd2若しくはAd5のHVR1）について、1から45アミノ酸までの欠失が行われていてもよく、例えば1から5まで、最低10、最低25、最低30、最低35若しくはそれ以上のアミノ酸の欠失が行われていてもよい。一態様において、天然の超可変領域のN末端からの最低1アミノ酸およびC末端からの最低1アミノ酸が保持される。

【0025】

本明細および請求の範囲を通じて使用されるところの「含んでなる（comprise）」および「含有する（contain）」という用語、ならびに他の変形物のなかでも「含んでなる（comprises）」、「含んでなること」、「含有する（contains）」および「含有すること」を包含するその変形物は、他の成分、要素、整数、段階などを包括する。「よりなる」若しくは「よりなること」という用語は、他の成分、要素、整数、段階などを除外する。

【0026】

一態様において、改変アデノウイルスはHVR1および／若しくはHVR4に欠失を含有するキャプシドを有する。別の態様において、改変アデノウイルスは、これらの領域の一方若しくは双方、およびまた別の選択されたHVR、例えばHVR2、HVR3、HVR5、HVR6若しくはHVR7にも改変を含有するキャプシドを有する。

【0027】

超可変領域1は、HAdV-2の残基の番号付け〔配列番号1、R. J. Robertsら、A consensus sequence for the adenovirus-2 genome、p. 1-51、W. Doerfler（編）Adenovirus DNA、Marinus Nijhoff Publishing、ボストン中〕に基づくHAdV-5〔配列番号2〕およびHAdV-2〔配列番号1〕のヘキソソタンパク質の残基139ないし167若しくは残基147から162内に位置する。超可変領域4は、同一の番号付けスキームに基づき、HAdV-2のヘキソソタンパク質の残基222から271内に位置する。それら自身の番号付けに関する他のアデノウイルスのHVRの位置を提供する例示的一アライメントについては例えば図3を参照されたい。こうしたアライメントの製造は当該技術分野の熟練内に十分にある。

【0028】

この情報を与えられれば、当業者は、ヒトサブグループCアデノウイルス内の多様な血清型からのもの、若しくはサブグループCアデノウイルス外の血清型からのものを包含する多様なアデノウイルス配列のヘキソソ配列のアライメントを利用して、対応する超可変領域を容易に決定し得る。数種のアデノウイルスの配列およびそれらの超可変領域の位置の具体的に説明するアライメントについては、例えば、Crawford-MikszaとSchnurr、上に引用される、およびRux, JJら、（2003）、上に引用されるを参照されたい。他の適するアデノウイルス配列は、記述された他のヒトおよびヒト以外の配列のなかから容易に選択しうる。

【0029】

本明細書に記述されるところのアライメントは、インターネットのウェブサーバを通じてアクセス可能な「Clustal W」のような多様な公的に若しくは商業的に利用可能な多配列アライメントプログラムのいずれかを使用して実施する。あるいは、Vector NTIユーティリティもまた使用される。上述されたプログラムに含有されるものを包含する、ヌクレオチド配列の同一性を評価するのに使用し得る当該技術分野で既知の多数のアルゴリズムもまた存在する。別の例として、ポリヌクレオチド配列は、GCG Version 6.1中のプログラムFastAを使用して比較し得る。FastAはクエリ配列と参照配列の間の最良のオーバーラップ領域のアライメントおよび配列の同一性パーセントを提供する。例えば、核酸配列間の配列の同一性パーセントは、GCG Version 6.1（引用することにより本明細書に組み込まれる）に提供されるところのそのデフォルトのパラメータ（6のword sizeおよびスコアリングマトリックス

スについてのNOPAM係数)を用いてFastaを使用して決定し得る。同様に、アミノ酸アライメントを実施するためのプログラムが利用可能である。一般に、これらのプログラムはデフォルトの設定で使用されるとは言え、当業者はこれらの設定を必要とされるように変更し得る。あるいは、当業者は、参照されるアルゴリズムおよびプログラムにより提供されるもののような同一性若しくはアライメントのレベルを少なくとも提供する別のアルゴリズム若しくはコンピュータプログラムを利用し得る。

【0030】

適するアデノウイルスは、American Type Culture Collection、米国バージニア州マナサス(ATCC)、多様な学術的および商業的供給源から入手可能であるか、または、所望の領域は、既知技術を使用して、文献に公表された若しくはデータベース(例えばGenBankなど)から入手可能な配列を参照して合成しうる。適するアデノウイルスの例は、ヒトアデノウイルス血清型2[配列はR. J. Robertsr、A consensus sequence for the adenovirus-2 genome、p. 1-51、W. Doerfler(編)Adenovirus DNA. Martinus Nijhoff Publishing、ボストン中に公表されている、3型、4型[HADEV-4ゲノムの配列はS. Jacobsら、J Gen Virol 85(2004)、3361-3366に報告され、GenBank/EMBL/DDBJ受託番号AY487947に報告されている]、5型[配列はR. Kinlockら、1984. Adenovirus hexon: sequence comparison of subgroup C serotypes 2 and 5. J. Biol. Chem. 259:6431-6436に公表されている]、AV1およびAV 6[P. Pring-AkerblomとT. Adrian、1993、Res. Virol、144:117-121]、7、12[配列はJ. Sprengelら、J Virol、68:379-389(1994)に公表されている]、40[配列は、C I Toogoodら、J Gen Virol、70:3203-3214(1989)に公表されている]、ならびに、所望の細胞中で培養し得る現在同定されているヒトのタイプのいずれもさらに包含する[例えばHorwitz、"Adenoviridae and Their Replication"、VIROLOGY、第2版中pp. 1679-1721(1990)を参照されたい]を制限なしに包含する。同様に、ヒト以外の霊長類(例えばチンパンジー、アカゲザル、マカクおよび他のサル種)若しくは他のヒト以外の哺乳動物を感染させることが既知かつ所望の細胞中で増殖するアデノウイルスを、本発明のベクター構築物で使用し得る。こうした血清型は、とりわけ、チンパンジーアデノウイルスSAd22/Pan5[VR-591]、SAd23/Pan6[VR-592]、Sad24/Pan7[VR-593]ならびにSAd25/C68[Pan9、GenBank受託番号AF394196)および米国特許第6,083,716号];ならびに、SV1[VR-195];SV25[SV-201];SV35;SV15;SV-34;SV-36;SV-37、およびヒシアデノウイルス[VR-275]を制限なしに包含するサルアデノウイルスを制限なしに包含する。SAd22/Pan5(C5ともまた命名される)、SAd23/Pan6(C6ともまた命名される)、Sad24/Pan7(C7ともまた命名される)、SV1、SV25およびSV39の配列は記述されている[2003年6月5日に公開された第WO 03/046124号、第US-2005-0069866-A1号、2005年3月31日としてもまた公開されている](引用することにより組込まれる)。ハイブリッドアデノウイルスベクター、およびサルアデノウイルスSA18から構築されたベクターを記述する国際特許公開第WO 04/16614号明細書もまた参照されたい。SAd22/Pan5[配列番号4]、SAd23/Pan6[配列番号3]、SAd24/Pan7[配列番号5]、SV1[配列番号10]、SV25[配列番号7]、SV39[配列番号8]およびSA18[配列番号9]のヘキソントンパク質の配列を本明細書に再現する。しかしながら、当業者は、他のアデノウイルス株由来の匹敵する領域を容易に選択しかつこれらの血清型の代わりに(若しくはそれらとともに)本発明で使用しうることを

10

20

30

40

50

理解するであろう。

【0031】

これらの技術を使用して、アデノウイルスサブグループCのHVR1および／若しくはHVR4または他のHVRに類似である他のアデノウイルス配列中の超可変領域もまた同定しうる。本発明の改変アデノウイルスヘキソンは、これらの改変に加え、他の超可変（HVR）領域の1個若しくはそれ以上に対する改変を含有する。

【0032】

一態様において、選択したHVRで機能の欠失を行い、そしてその中に分子を挿入しない。これは、多様な理由から、例えば別のHVR若しくはキャプシド中の他の場所に大きな挿入断片を収容するために望ましいかもしれない。こうした機能的に欠失されたアデノウイルスヘキソントタンパク質は、アデノウイルス粒子を製造するため、ならびに他の用途に利用し得る。

10

【0033】

別の態様において、改変アデノウイルスヘキソントタンパク質は、HVR領域の欠失に挿入された外因性分子を含有する。こうした外因性分子は、改変アデノウイルスヘキソントタンパク質（またはウイルス粒子若しくは空の形態のそれを含有するキャプシド）の標的を変える、改変アデノウイルスキャプシドの免疫原性を変える、および／あるいは外因性アミノ酸配列若しくは免疫学的に交差反応性の分子に対する免疫応答を誘導するのに有用でありうる。

【0034】

20

一態様において、アデノウイルスヘキソントタンパク質に挿入された外因性分子は、野生型アデノウイルスのアミノ酸配列、若しくはより具体的には工作されるべき野生型ウイルス成分タンパク質中の機能上同等な位置にその完全な配列が見出されない、長さ最低2、最低4、最低8、最低10、最低15、最低20、最低25若しくはそれ以上のアミノ酸残基のまたはより長い外因性アミノ酸配列である。ある態様において、外因性アミノ酸配列は、天然に存在しない、すなわち合成でまたは人工的に設計若しくは製造されたポリペプチドであるという意味で非天然でもまたありうる。ヘキソントタンパク質をコードする核酸分子の状況で、外因性分子は所望のアミノ酸配列をコードする核酸配列の形態にあり得ることが理解されるであろう。

【0035】

30

一態様において、外因性分子はターゲティングに有用なアミノ酸配列である。本明細書で使用されるところの「ターゲティング配列」は、改変アデノウイルスを指図するためのシグナルとして作用する特定のアミノ酸配列である。従って、一態様において、アデノウイルスキャプシドは、それが由来する天然の（野生型）ウイルスが結合しない所望の標的細胞に結合するように改変しうるか、または、それは、野生型ウイルスより制限された結合特異性を有するように、言い換えれば、野生型ウイルスが結合する標的細胞型のより広範な集団のなかから標的細胞の選択された1若しくは特定のサブセット若しくは型のみに結合するように、改変しうる。別の代替において、アデノウイルスは、その元の標的に結合する何らかの能力を保持し、そして付加的な標的が該外因性アミノ酸配列により提供される。ウイルスの向性が従って変えられる。これゆえに、「変えられた向性」により、改変ウイルスが、それが由来する野生型ウイルスのものに対し変えられたすなわち異なる標的細胞結合特異性を表すことを意味している。

40

【0036】

有用な外因性分子の例は、例えば、正に荷電したアミノ酸（例えばリシン残基若しくはシステイン残基）、インターフェロンおよびインターロイキンのようなサイトカイン；リンホカイン；病原性生物体（ウイルス、細菌若しくは寄生生物）、好ましくはHIVウイルス（ヒト免疫不全ウイルス）により認識される受容体のような膜受容体；第VIF因子および第IX因子のような凝固因子；ジストロフィン；インスリン；CFTR（嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子）タンパク質のような細胞のイオンチャンネルに直接若しくは間接的に参画しているタンパク質；アンチセンスRNA、あるいは病原性生物体の

50

ゲノム中に存在する病原性遺伝子により産生されるタンパク質の活性を阻害することが可能なタンパク質、またはその発現が調節解除される細胞遺伝子の活性を阻害することが可能なタンパク質（若しくはそれらをコードする遺伝子）、例えば癌遺伝子；例えば $\alpha 1$ -アンチトリプシン若しくはウイルスプロテアーゼ阻害剤のような酵素活性を阻害するタンパク質；例えば、標的配列への結合について天然のタンパク質と競合してそれによりHIVの活性化を予防することが可能であるHIVウイルスのtatタンパク質のトランスドミナントバリエーションのような、それらの生物学的機能を損なうように変異されている病原性タンパク質のバリエーション；宿主細胞の免疫を増大させるための抗原エпитープ；主要組織適合複合体クラスIおよびIIタンパク質、ならびにこれらの遺伝子の誘導因子であるタンパク質；抗体；免疫毒素をコードする遺伝子；毒素；成長因子若しくは成長ホルモン；細胞受容体およびそれらのリガンド；腫瘍抑制因子；限定されるものでないが癌遺伝子を挙げることができる心血管系疾患に関与するタンパク質；限定されるものでないが線維芽細胞増殖因子（FGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）および神経成長因子（NGF）を挙げることができる成長因子；enos、限定されるものでないがRb（網膜芽腫）遺伝子を挙げることができる腫瘍抑制遺伝子；リポタンパク質リパーゼ；スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）；カタラーゼ；酸素およびフリーラジカルスカベンジャー；アポリポタンパク質；ならびにpai-1（プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1）；細胞性酵素、若しくは病原性生物体により産生されるもの；自殺遺伝子；ホルモン、T細胞受容体（エпитープ）、抗体エпитープ、アフィボディ（affibody）、ならびに多様なタンパク質ライブラリーから同定されたりガンドを包含しうる。

10

20

【0037】

一態様において、細胞表面受容体のリガンドが外因性分子である。適するリガンドの例は、例えば、抗体または抗体フラグメント若しくは誘導体、一本鎖抗体（ScFv）、単一ドメイン抗体、およびFvフラグメントの相補性決定領域（CDR）のような抗体の最小認識単位を包含する。こうしたアミノ酸配列は、抗体の抗原結合部位または抗原結合若しくは認識領域（1個若しくはそれ以上）から得ることができるか若しくはそれらに由来することができ、そして、こうした抗体は天然でも若しくは合成でもよい。

【0038】

別の態様において、ウイルスタンパク質が外因性分子である。例えば、HSV-1 TK酵素は、（アシクロビル若しくはガンシクロビルのような）ある種のヌクレオシドアナログに対し、細胞のTK酵素と比較してより大きい親和性を有する。

30

【0039】

なお別の態様において、外因性分子は免疫原である。「免疫原性」分子は、細胞性免疫応答、抗体応答若しくは双方を誘導するものを包含しうる。病原体へのさらなる感染に対し保護的かつ／または疾患の症状若しくは他の状態に対し保護的である免疫応答を誘導するものを包含するワクチン分子。抗原は体液性（抗体）免疫応答を誘導することが可能である分子を指す。

【0040】

典型的には、免疫原性分子は、特定のウイルス、生物体（例えば細菌、真菌、酵母）若しくは他の供給源（例えば腫瘍）、または交差反応性の生物体若しくは供給源に対する特異的免疫応答を誘導する。しかしながら、ある態様において、例えば免疫応答をブーストすることにより非特異的免疫調節応答を誘導する免疫原性分子を利用することが望ましいかもしれない。例えば、こうした分子は、それに対する免疫応答が望ましい分子の前に若しくはそれと一緒にそれが送達されるかどうかによって依存して、ワクチン投与計画におけるプライム（prime）として若しくはアジュバントとして使用し得る。

40

【0041】

適する免疫原は、例えば、T細胞エпитープ（例えばCD4若しくはCD8エпитープ）、抗体エпитープ、またはペプチド、ポリペプチド、酵素、あるいは細菌、真菌、酵母および／若しくはウイルス由来の他のフラグメントを包含する。免疫原の適する供給源は、とりわけ、本明細書に記載される免疫原性導入遺伝子の産物である。なお他の免疫原は

50

当業者に容易に明らかであろう。

【0042】

従って、一局面において、本発明は、1種若しくはそれ以上の外因性分子を含有するように改変された改変アデノウイルスヘキソタンパク質を提供する。1種以上の外因性分子を利用する場合、該分子は同一であってもよい。別の態様において、外因性分子は異なってもよい。例えば、改変アデノウイルスヘキソタンパク質は、天然のターゲッティングを改変する1領域中の外因性分子、および天然の中和エピトープを改変しかつ／若しくは免疫応答を誘導する別の領域中の外因性分子を含有しうる。別の例において、改変アデノウイルスヘキソタンパク質は1種以上の型の外因性免疫原を含有しうる。独立に選択しうる適する外因性分子の多くの他の組合せが、当業者に明らかであろう。当業者に容易に明らかであろうとおり、ある種の分子はターゲッティング分子および免疫原双方として機能しうる。

10

【0043】

こうした外因性分子（例えばアミノ酸配列）を製造しかつそれらをウイルス若しくはウイルス成分に導入するための技術は、当該技術分野で公知であり、そして文献に広範に記述されている。従って、例えば、分子生物学若しくは遺伝子工学技術が、本発明の改変ウイルス若しくはウイルス成分として発現されることが可能な遺伝子配列を製造若しくは構築するために容易に利用可能である。例えば、ウイルス成分タンパク質をコードする核酸分子若しくはヌクレオチド配列は、外因性アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を導入するように、例えば、アデノウイルスタンパク質の全部若しくは一部および外因性アミノ酸配列を含んでなる融合タンパク質をコードするように、改変しうる。

20

【0044】

いかなるこうした付加的な若しくは外的なモチーフ若しくは機能も、「リンカー」配列によってウイルスに組み込まれることが便宜的若しくは必要でありうる。リンカー配列への結合を介するDNA若しくはアミノ酸配列の組み込みのためのこうした構築技術は、当該技術分野で既知であり、そしてタンパク質／遺伝子工学者の慣例の熟練内にある。

【0045】

別の態様において、本発明は、所望の分子を保有する発現カセットを含有しうる感染性アデノウイルス粒子の製造のために、外因性分子を含有する改変アデノウイルスキャプシドを利用する。適しては、発現カセットにより保有される分子は、産物若しくはそれと交差反応性の分子に対する免疫応答を誘導するのに有用な産物をコードする。

30

【0046】

一例において、本態様は、改変アデノウイルスキャプシドが、発現カセットにより送達される分子のアジュバントとして機能することを可能にする。別の例において、本態様は、改変アデノウイルスキャプシドが、発現カセットにより送達される分子の自己プライミングする構築物として機能することを可能にする。

改変アデノウイルスベクター

一態様において、本発明は改変アデノウイルスキャプシドを含んでなる組成物を提供する。

【0047】

40

本明細書で使用されるところの改変アデノウイルスキャプシドは、本明細書に記述されるところに改変されたアデノウイルスヘキソタンパク質を含有するアデノウイルスキャプシドを指す。加えて、改変アデノウイルスキャプシドは他の改変を含有しうる。こうした他の改変は、ヘキソタンパク質、または他のキャプシドタンパク質、例えばファイバータンパク質若しくはペントン中の他の改変を包含しうる。例えば、改変アデノウイルスヘキソンは、米国特許第5,922,315号明細書（引用することにより組込まれる）に記述されるところに換えられたヘキソタンパク質をさらに含有しうる。本方法で、アデノウイルスヘキシソンの最低1個のループ領域が、別のアデノウイルス血清型の最低1個のループ領域で換えられる。なお他の適する改変が記述されている〔2004年9月2日に公開された米国公開特許出願第20040171807号明細書。〕あるいは、若しくは加

50

えて、改変キャプシドは別の分子、例えば脂質、融合タンパク質と会合しうる。

【0048】

一局面において、本発明の組成物は改変アデノウイルスベクターを包含する。別の方法で明記される場合を除き、本明細書で使用されるところの改変アデノウイルスベクターは、改変アデノウイルスキャプシドを有しかつ1種若しくはそれ以上の異種分子を細胞に送達する発現カセットを該キャプシド中にパッケージングしたアデノウイルス粒子を指す。アデノウイルス成分は、本明細書に記述されたかつ当業者に入手可能であるもののような多様な異なるアデノウイルスから得ることができるか若しくはそれらに由来し得る。アデノウイルスゲノムは双方の鎖にオープンリーディングフレームを含有するため、多くの場合、特定のオープンリーディングフレームと遺伝子領域の間の混同を回避するために多様な領域の5'および3'端に、本明細書で言及がなされる。従って、本明細書でアデノウイルスゲノムの「左」および「右」端に言及がなされる場合、この言及は、当該技術分野で慣習的であるところの図解の形式で描かれる場合に、およそ36kbのアデノウイルスゲノムの端に対してである[例えば、Horwitz, "Adenoviridae and Their Replication", VIROLOGY、第2版中pp. 1679-1721 (1990)を参照されたい]。従って、本明細書で使用されるところのアデノウイルスゲノムの「左末端」は、ゲノムが直鎖状の形態で図解で描かれる場合に該図の一番左端に位置するアデノウイルスゲノムの部分を指す。典型的には、左端は地図単位0で開始しかつ少なくとも5'末端逆位配列(ITR)を包含するように右に伸長するゲノムの部分であることを指し、そして構造的遺伝子をコードするゲノムの内部領域を除外する。本明細書で使用されるところのアデノウイルスゲノムの「右末端」は、ゲノムが直鎖状の形態で図解で描かれる場合に該図の一番右端に位置するアデノウイルスゲノムの一部分を指す。典型的には、アデノウイルスゲノムの右端は、地図単位36で終端しかつ少なくとも3' ITRを包含するように左に伸長するゲノムの一部分を指し、そして構造的遺伝子をコードするゲノムの内部領域を除外する。

【0049】

「ミニ遺伝子」により、選択された異種遺伝子、ならびに宿主細胞での該遺伝子産物の翻訳、転写および／若しくは発現を駆動するのに必要な他の調節エレメントの組合せを意味している。

【0050】

典型的には、選択されたアデノウイルス遺伝子に対し天然の領域中に他のアデノウイルス配列を含有する核酸分子中にミニ遺伝子が配置されるようなアデノウイルスベクターを設計する。ミニ遺伝子は、所望の場合は既存の遺伝子領域の機能を混乱させるようにその領域に挿入しうる。あるいは、ミニ遺伝子は部分的に若しくは完全に欠失されたアデノウイルス遺伝子の部位に挿入しうる。例えば、ミニ遺伝子は、選択されうる他者のなかでも機能的E1欠失若しくは機能的E3欠失の部位のような部位に配置しうる。「機能的に欠失された」若しくは「機能の欠失」という用語は、遺伝子領域の十分な量が除去または例えば突然変異若しくは改変により別の方法で損傷されて、その結果該遺伝子領域が遺伝子発現の機能的産物を産生することがもはや可能でないことを意味している。所望の場合は該遺伝子領域全体を除去しうる。遺伝子破壊若しくは欠失の他の適する部位は、本出願の別の場所で論考する。

【0051】

例えば、組換えウイルスの生成に有用な産生ベクターについて、該ベクターは、ミニ遺伝子、およびアデノウイルスゲノムの5'端若しくはアデノウイルスゲノムの3'端いずれか、またはアデノウイルスゲノムの5'および3'双方の端を含有しうる。アデノウイルスゲノムの5'端は、パッケージングおよび複製に必要な5'シスエレメント；すなわち5'末端逆位配列(ITR)の配列(複製起点として機能する)および天然の5'パッケージングエンハンサードメイン(直鎖状Adゲノムをパッケージングするのに必要な配列およびE1プロモーターのエンハンサーエレメントを含有する)を含有する。アデノウイルスゲノムの3'端は、パッケージングおよびキャプシド形成に必要な3'シスエレ

ント（ITRを包含する）を包含する。適しては、組換えアデノウイルスは5'および3'双方のアデノウイルスのシスエレメントを含有し、また、ミニ遺伝子は5'および3'のアデノウイルス配列の間に配置される。本発明のいかなるアデノウイルスベクターも、付加的なアデノウイルス配列もまた含有しうる。

【0052】

本明細書に記述されるウイルス配列、ヘルパーウイルス（必要とされる場合）、および組換えウイルス粒子、ならびにベクターの構築で使用される他のベクター成分および配列は、上述されたとおり得られる。アデノウイルス配列のDNA配列を使用して、ベクターおよびこうしたベクターの製造に有用な細胞株を構築する。

【0053】

配列の欠失、挿入および他の突然変異を包含する本発明のベクターを形成する核酸配列の改変は、標準的分子生物学技術を使用して生成することができ、そして本発明の範囲内にある。

【0054】

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

【0055】

1. 導入遺伝子

導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質若しくは他の産物をコードする導入遺伝子に隣接するベクター配列に対し異種の核酸配列である。核酸コーディング配列は、宿主細胞中での導入遺伝子の転写、翻訳および／若しくは発現を可能にする様式で調節成分に効果的に連結される。導入遺伝子配列の組成は、生じるベクターがもたらされることができる使用に依存することができる。例えば、1つの型の導入遺伝子配列は、発現に際して検出可能なシグナルを生じるレポーター配列を包含する。こうしたレポーター配列は、β-ラクタマーゼ、β-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、例えばCD2、CD4、CD8を包含する膜結合型タンパク質、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質、およびそれらに対しそれらに向けられる高親和性抗体が存在するか若しくは慣習的手段により製造され得る当該技術分野で公知の他者、ならびにとりわけヘマグルチニン若しくはMycからの抗原標識ドメインに適切に融合された膜結合型タンパク質を含んでなる融合タンパク質をコードするDNA配列を制限なしに包含する。これらのコーディング配列は、それらの発現を駆動する調節エレメントと連合される場合に、酵素、X線撮影、比色、蛍光若しくは他の分光写真アッセイを包含する慣習的手段、蛍光活性化細胞分取アッセイ、ならびに酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）および免疫組織化学を包含する免疫学的アッセイにより検出可能なシグナルを提供する。例えば、マーカー配列がLacZ遺伝子である場合、該シグナルを保有するベクターの存在は、β-ガラクトシダーゼ活性のアッセイにより検出される。

【0056】

導入遺伝子がGFP若しくはルシフェラーゼである場合、該シグナルを保有するベクターはルミノメーターで色若しくは光産生により視覚的に測定しうる。しかしながら、望ましくは、導入遺伝子は、タンパク質、ペプチド、RNA、酵素、若しくは触媒RNAのような生物学および医学で有用である産物をコードする非マーカー配列である。所望のRNA分子は、tRNA、dsRNA、リボソームRNA、触媒RNAおよびアンチセンスRNAを包含する。有用なRNA配列の一例は、処置される動物での標的とされる核酸配列の発現を消滅させる配列である。

【0057】

導入遺伝子は、癌治療薬若しくはワクチンとして処置に、免疫応答の誘導に、および／または予防ワクチンの目的上使用しうる。本明細書で使用されるところの免疫応答の誘導

10

20

30

40

50

は、ある分子（例えば遺伝子産物）に対するT細胞および／若しくは体液性免疫応答を誘導する該分子の能力を指す。本発明は複数の導入遺伝子を使用することをさらに包含する。ある状況では、1タンパク質の各サブユニットをコードするのに、または異なるペプチド若しくはタンパク質をコードするのに異なる導入遺伝子を使用しうる。これは、タンパク質サブユニットをコードするDNAの大きさが大きい場合、例えば免疫グロブリン、血小板由来増殖因子若しくはジストロフィンタンパク質に望ましい。細胞が多サブユニットタンパク質を産生するためには、異なるサブユニットのそれぞれを含有する組換えウイルスに細胞を感染させる。あるいは、タンパク質の異なるサブユニットを同一の導入遺伝子によりコードしうる。この場合、単一遺伝子がサブユニットのそれぞれをコードするDNAを包含し、各サブユニットのDNAは配列内リボザイム進入部（IRES）により分離される。これは、サブユニットのそれぞれをコードするDNAの大きさが小さい、例えばサブユニットをコードするDNAおよびIRESの大きさの合計が5キロベース未満である場合に望ましい。IRESに対する一代替として、DNAは、翻訳後事象で自己切断する2Aペプチドをコードする配列により分離しうる。例えば、M. L. Donnellyら、J. Gen. Virol.、78（Pt 1）：13-21（1997年1月）；Furler, S. ら、Gene Ther.、8（11）：864-873（2001年6月）；Klump H. ら、Gene Ther.、8（10）：811-817（2001年5月）を参照されたい。この2AペプチドはIRESより有意により小さく、空間が制限要因である使用にそれを良好に適するようにする。しかしながら、選択された導入遺伝子は、いかなる生物学的活性産物若しくは他の産物、例えば研究に所望の産物もコードしうる。

10

20

【0058】

適する導入遺伝子は当業者により容易に選択されうる。導入遺伝子の選択は本発明の制限であると考えられない。

【0059】

2. 調節エレメント

ミニ遺伝子について上で同定された主要エレメントに加え、ベクターは、該プラスミドベクターでトランスフェクトしたか若しくは本発明により製造したウイルスに感染させた細胞中でのその転写、翻訳および／若しくは発現を可能にする様式で該導入遺伝子に作動可能に連結されている、必要な慣習的調節領域もまた包含する。本明細書で使用されるところの「作動可能に連結されている」配列は、目的の遺伝子と連続する発現制御配列、およびトランスで若しくは離れて作用して目的の遺伝子を制御する発現制御配列の双方を包含する。

30

【0060】

発現制御配列は、適切な転写開始、終止、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化（ポリA）シグナルのような効率的RNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を高める配列（すなわちコザックコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を高める配列；ならびに、所望の場合はコードされる産物の分泌を高める配列を包含する。天然、構成的、調節可能および／若しくは組織特異的であるプロモーターを包含する多数の発現制御配列が、当該技術分野で既知でありかつ利用されうる。

40

【0061】

構成的プロモーターの例は、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（場合によってはRSVエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（場合によってはCMVエンハンサーを伴う）[例えばBoshartら、Cell、41：521-530（1985）を参照されたい]、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクトチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター、およびEF1 α プロモーター[Invitrogen]を制限なしに包含する。

【0062】

50

調節可能なプロモーターは、外因性に供給される化合物、温度のような環境因子、若しくは特定の生理学的状態の存在（例えば急性期、細胞の特定の分化状態）により、または複製する細胞のみで、遺伝子発現の調節を可能にし、かつ、誘導、活性化、抑制若しくは「遮断」され得る。調節可能なプロモーターおよび調節可能な系は、Invitrogen、ClontechおよびAriadを制限なしに包含する多様な商業的供給源から入手可能である。多くの他の系が記述されており、そして当業者により容易に選択され得る。例えば、誘導可能なプロモーターは、亜鉛で誘導可能なヒツジメタロチオン（MT）プロモーターおよびデキサメサゾン（Dex）で誘導可能なマウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーターを包含する。他の調節可能な系は、T7ポリメラーゼプロモーター系 [第WO 98/10088号]；エクダイソン昆虫プロモーター [Noら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93:3346-3351 (1996)]、テトラサイクリンで抑制可能な系 [Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:5547-5551 (1992)]、テトラサイクリンで誘導可能な系 [Gossenら、Science、268:1766-1769 (1995)、Harveyら、Curr. Opin. Chem. Biol.、2:512-518 (1998) もまた参照されたい] を包含する。他の系は、カストラジオール、ジフェノールムリスレロン (diphenol murislerone) を使用するFK506ダイマー、VP16若しくはp65、RU486で誘導可能な系 [Wangら、Nat. Biotech.、15:239-243 (1997) およびWangら、Gene Ther.、4:432-441 (1997)] ならびにラパマイシンで誘導可能な系 [Magariら、J. Clin. Invest.、100:2865-2872 (1997)] を包含する。数種の調節可能なプロモーターの有効性は時間にわたり増大する。こうした場合に、複数のリプレッサーを直列に挿入すること（例えばIRESによりTetRに連結されたTetR）により、こうした系の有効性を高め得る。あるいは、所望の機能についてスクリーニングする前に最低3日待機し得る。この系の有効性を高めるための既知の手段により所望のタンパク質の発現を高め得る（例えばウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント (WPRE) を使用して）。

【0063】

別の態様において、導入遺伝子の天然のプロモーターを使用することができる。天然のプロモーターは、導入遺伝子の発現が天然の発現を模倣すべきであることが望ましい場合に好ましいかもしれない。天然のプロモーターは、導入遺伝子の発現を一時的に若しくは発達的に、または組織特異的様式で、あるいは特定の転写刺激に応答して調節しなければならない場合に使用しうる。さらなる一態様において、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位若しくはコザックコンセンサス配列のような他の天然の発現調節領域もまた、天然の発現を模倣するのに使用しうる。

【0064】

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

ンH鎖；T細胞受容体鎖）、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター（Andersenら、Cell. Mol. Neurobiol.、13：503－15（1993））、神経細線維軽鎖遺伝子（Piccioliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88：5611－5（1991））およびニューロン特異的vgf遺伝子（Piccioliら、Neuron、15：373－84（1995））のような神経型について既知である。

【0065】

場合によっては、治療上有用な若しくは免疫原性の産物をコードする導入遺伝子を保有するベクターは選択可能なマーカーもまた包含しうるか、または、レポーター遺伝子はとりわけ、ジェネチシン、ハイグロマイシン若しくはピューリマイシン耐性をコードする配列を包含しうる。こうした選択可能なレポーター若しくはマーカー遺伝子（好ましくはウイルス粒子にパッケージングされるべきウイルスゲノム外に配置される）を使用して、アンピシリン耐性のような細菌細胞中のプラスミドの存在を知らせることができる。ベクターの他成分は複製起点を包含しうる。これらおよび他のプロモーターおよびベクター要素の選択は慣習的であり、そして多くのこうした配列が入手可能である〔例えばSambrookら、およびその中に引用される参考文献を参照されたい〕。これらのベクターは、当業者に既知の技術とともに本明細書に提供される技術および配列を使用して生成される。

10

【0066】

こうした技術は、教科書〔Sambrookら、Molecular Cloning：A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー〕に記述されるもののようなcDNAの慣習的クローニング技術、アデノウイルスゲノムのオーバーラップオリゴヌクレオチド配列の使用、ポリメラーゼ連鎖反応、および所望のヌクレオチド配列を提供するいかなる適する方法も包含する。

20

【0067】

改変アデノウイルス粒子の製造

少なくとも、発現カセットを保有する改変アデノウイルスベクターは、複製およびピリオンキャプシド形成に必要なアデノウイルスシスエレメントを含有し、それらのシスエレメントは異種遺伝子に隣接する。すなわち、該ベクターは、複製起点として機能するアデノウイルスのシスに作用する5'末端逆位配列（ITR）の配列、天然の5'パッケージング／エンハンサードメイン（直鎖状Adゲノムをパッケージングするのに必要な配列、およびE1プロモーターのエンハンサーエレメントを含有する）、異種分子、ならびに5' ITR配列を含有する。例えば、米国特許第6,203,975号明細書（引用することにより本明細書に組込まれる）の「最小」ヒトAdベクターの製造について記述される技術は、組換えサルアデノウイルスに容易に適合し得るを、参照されたい。場合によっては、改変（例えば組換え）アデノウイルスは、上で定義された最小アデノウイルス配列以上を含有する。

30

【0068】

一態様において、アデノウイルスは、E1a若しくはE1b遺伝子が機能的に欠失され、そして場合によっては他の突然変異、例えば温度感受性突然変異若しくは他の遺伝子中の欠失を有している。他の態様において、組換えアデノウイルス中に無傷のE1aおよび／若しくはE1b領域を保持することが望ましい。こうした無傷のE1領域は、アデノウイルスゲノム中のその天然の位置に配置しても、若しくは天然のアデノウイルスゲノム中の（例えばE3領域の）欠失の部位に置いてよい。

40

【0069】

ヒト（若しくは他の哺乳動物）細胞への遺伝子の送達のための有用なアデノウイルスベクターの構築において、ある範囲のアデノウイルス核酸配列を該ベクターで使用し得る。例えば、アデノウイルス後初期遺伝子E3の全部若しくは一部分を、該組換えウイルスの一部を形成するアデノウイルス配列から除外してよい。E3の機能は組換えウイルス粒子

50

の機能および産生に無関係であると考えられる。E 4 遺伝子の少なくとも O R F 6 領域、およびより望ましくはこの領域の機能の冗長性により E 4 領域全体の欠失を有する改変アデノウイルスベクターもまた構築しうる。本発明のなお別のベクターは、後初期遺伝子 E 2 a 中に欠失を含有する。欠失はアデノウイルスゲノムの後期遺伝子 L 1 から L 5 のいずれでもまた行いうる。同様に、中期遺伝子 I X および I V a₂ 中の欠失がいくつかの目的上有用でありうる。他の欠失を他の構造的若しくは非構造的アデノウイルス遺伝子中で行いうる。上で論考された欠失は個別に使用しうる。すなわち、本発明での使用のためのアデノウイルス配列は単一領域のみに欠失を含有しうる。あるいは、それらの生物学的活性を破壊するのに効果的な遺伝子全体若しくはそれらの部分の欠失を、いかなる組合せでも使用しうる。例えば、例示的一ベクター中で、アデノウイルス配列は、E 1 遺伝子および E 4 遺伝子、若しくは E 1、E 2 a および E 3 遺伝子、若しくは E 1 および E 3 遺伝子、または E 3 の欠失を伴う若しくは伴わない E 1、E 2 a および E 4 遺伝子、などの欠失を有しうる。上で論考された通り、こうした欠失は、所望の結果を達成するために温度感受性突然変異のような他の突然変異と組合せで使用しうる。

10

【0070】

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

20

【0071】

改変アデノウイルスが最小 A d 配列のみを含有するか、または E 1 および／若しくは E 3 領域の機能的欠失のみを伴う A d ゲノム全体を含有するかに関係なく、一態様において、該改変ウイルスはヒト若しくはサルアデノウイルス由来のキャプシドを含有する。あるいは、他の態様において、シュードタイピングした（*pseudotyper*）アデノウイルスを本発明の方法で使用しうる。こうしたシュードタイピングしたアデノウイルスは、元のアデノウイルスキャプシドの供給源と異なる供給源アデノウイルスからのアデノウイルス配列を保有する核酸分子がパッケージングされたアデノウイルスキャプシドタンパク質を利用する。これらのアデノウイルスは、当業者に既知である方法を使用して製造しうる。

30

【0072】

1. ヘルパーウイルス

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

40

【0073】

ヘルパーウイルスは、Wu ら、J. Biol. Chem.、264:16985-16987 (1989)；K. J. Fisher と J. M. Wilson、Biochem. J.、299:49 (1994 年 4 月 1 日) に記述されるところのポリカチオン複合物にもまた形成しうる。ヘルパーウイルスは場合によっては第二のレポーターミニ遺伝子を含

50

有しうる。多数のこうしたレポーター遺伝子が当該技術分野に既知である。アデノウイルスベクター上の導入遺伝子と異なるヘルパーウイルス上のレポーター遺伝子の存在は、Adベクターおよびヘルパーウイルス双方が独立にモニターされることを可能にする。この第二のレポーターは、精製に際しての生じる組換えウイルスとヘルパーウイルスの間の分離を可能にするのに使用する。

【0074】

2. 相補性細胞株

上述された遺伝子のいずれかが欠失された改変アデノウイルス (Ad) を生成するため、ウイルスの複製および感染性に必須の場合は、欠失された遺伝子領域の機能を、ヘルパーウイルス若しくは細胞株、すなわち相補性若しくはパッケージング細胞株により組換えウイルスに供給しなければならない。多くの状況において、ヒトE1を発現する細胞株を、Adベクターをトランス補完する (trans complement) のに使用し得る。これは、本発明のAd配列と現在利用可能なパッケージング細胞中に見出されるヒトAdE1配列の間の多様性により、本ヒトE1含有細胞の使用が複製および産生過程の間の複製能力のあるアデノウイルスの生成を予防するために、とりわけ有利である。しかしながら、ある状況において、E1欠失アデノウイルスの生産に利用し得るE1遺伝子産物を発現する細胞株を利用することが望ましいであろう。こうした細胞株は記述されている。例えば米国特許第6, 083, 716号明細書を参照されたい。

【0075】

所望の場合は、本明細書に提供される配列を、選択された親細胞株中での発現のためのプロモーターの転写制御下に適する親供給源若しくはトランス相補性アデノウイルス供給源からのアデノウイルスE1遺伝子を少なくとも発現するパッケージング細胞若しくは細胞株を生成するのに利用しうる。調節可能若しくは構成的プロモーターを本目的上使用しうる。こうしたプロモーターの例は本明細の別の場所に詳細に記述する。親細胞は、いずれかの所望のAdSAd22/Pan5、Pan6、Pan7、SV1、SV25若しくはSV39遺伝子を発現する新規細胞株の生成のため選択する。制限なしに、こうした親細胞株は、とりわけ、HeLa [ATCC受託番号CCL 2]、A549 [ATCC受託番号CCL 185]、HEK 293、KB [CCL 17]、Detroit [例えばDetroit 510、CCL 72] およびWI-38 [CCL 75] 細胞でありうる。これらの細胞株は全部、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 20110-2209から入手可能である。他の適する親細胞株を他の供給源から得てもよい。

【0076】

こうしたE1発現細胞株はアデノウイルスE1欠失ベクターの生成に有用である。加えて、若しくは、あるいは、本発明は、1種若しくはそれ以上のサルアデノウイルス遺伝子産物、例えばE1a、E1b、E2aおよび／若しくはE4 ORF6を発現し、組換えサルウイルスベクターの生成での使用のための本質的に同一手順を使用して構築し得る細胞株を提供する。こうした細胞株を利用して、それらの産物をコードする不可欠の遺伝子が欠失されたアデノウイルスベクターをトランス補完、若しくはヘルパー依存性ウイルス (例えばアデノ随伴ウイルス) のパッケージングに必要なヘルパー機能を提供し得る。本発明の宿主細胞の製造は選択されたDNA配列の集成のような技術を必要とする。この集成は慣習的技術を利用して達成しうる。こうした技術は、公知でありかつ上に引用されたSambrookらに記述されるcDNAおよびゲノムクローニング、ポリメラーゼ連鎖反応と組合せたアデノウイルスゲノムのオーバーラップオリゴヌクレオチド配列の使用、合成法、ならびに所望のヌクレオチド配列を提供するいずれかの他の適する方法を包含する。

【0077】

なお別の代替において、不可欠のアデノウイルス遺伝子産物は、アデノウイルスベクターおよび／若しくはヘルパーウイルスによりトランスに提供される。こうした一例におい

て、適する宿主細胞は、原核生物（例えば細菌）細胞、ならびに昆虫細胞、酵母細胞および哺乳動物細胞を包含する真核生物細胞を包含するいずれの生物学的生物体からも選択しうる。とりわけ望ましい宿主細胞は、A549、WEHI、3T3、10T1/2、HEK 293細胞若しくはPERC6（その双方は機能的アデノウイルスE1を発現する）[Fallaux, FJら、(1998)、Hum Gene Ther、9:1909-1917]、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2、ならびにヒト、サル、マウス、ラット、ウサギおよびハムスターを包含する哺乳動物由来の初代線維芽細胞、肝細胞および筋芽細胞のような細胞を制限なしに包含するいずれかの哺乳動物種のなかから選択する。細胞を提供する哺乳動物種の選択は本発明の制限でなく；また、哺乳動物細胞の型、すなわち線維芽細胞、肝細胞、腫瘍細胞などもそうでない。

10

【0078】

3. ウイルス粒子の集成および細胞株のトランスフェクション

一般に、ミニ遺伝子を含んでなるベクターをトランスフェクションにより送達する場合、該ベクターは、約5 μ gから約100 μ gまでのDNA、および好ましくは約10ないし約50 μ gのDNAの量で、約 1×10^4 細胞ないし約 1×10^{13} 細胞、および好ましくは約 1×10^5 細胞に送達する。しかしながら、宿主細胞に対するベクターDNAの相対量は、選択されたベクター、送達方法および選択された宿主細胞のような因子を考慮に入れて調節しうる。

【0079】

ベクターは、裸のDNA、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、エピソーム、ウイルスなどを包含する、当該技術分野で既知若しくは上で開示されたいずれのベクターでもありうる。ベクターの宿主細胞への導入は、トランスフェクションおよび感染を包含する、当該技術分野で既知若しくは上で開示されたところのいずれの手段によっても達成しうる。アデノウイルス遺伝子の1種若しくはそれ以上は、宿主細胞のゲノム中に安定に組込まれても、エピソームとして安定に発現されても、若しくは一過性に発現されてもよい。遺伝子産物は全部、エピソーム上で一過性に発現されうるか、若しくは安定に組込まれうるか、または遺伝子産物の数種が安定に発現されうる一方で他者が一過性に発現される。さらに、アデノウイルス遺伝子のそれぞれのプロモーターは、構成的プロモーター、誘導可能なプロモーター若しくは天然のアデノウイルスプロモーターから独立に選択しうる。プロモーターは、生物体若しくは細胞の特定の生理学的状態により（すなわち

20

30

【0080】

宿主細胞への（プラスミド若しくはウイルスとしての）分子の導入もまた、当業者に既知かつ本明細を通じて論考されるところの技術を使用して達成しうる。好ましい態様において、標準的トランスフェクション技術、例えばCaPO₄トランスフェクション若しくは電気穿孔法を使用する。

【0081】

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

40

【0082】

例えば、所望のミニ遺伝子を含むウイルスベクターの構築および集成後に、該ベク

50

ターをヘルパーウイルスの存在下に *in vitro* でパッケージング細胞株にトランスフェクトする。相同的組換えがヘルパーおよびベクター配列の間で起こり、それはベクター中のアデノウイルスー導入遺伝子配列が複製かつビリオンキャプシドにパッケージングされることを可能にして、組換えウイルスベクター粒子をもたらす。こうしたウイルス粒子の本製造方法はトランスフェクションに基づく。しかしながら本発明はこうした方法に制限されない。

【0083】

生じる組換え改変アデノウイルスは選択された導入遺伝子の選択された細胞への移入において有用である。

【0084】

改変アデノウイルスベクターの使用

本発明の改変アデノウイルスベクターは、*in vitro*、*ex vivo* および *in vivo* でのヒト若しくは家畜被験体（ヒト以外の霊長類、サル以外の霊長類および他の哺乳動物を包含する）への遺伝子移入に有用である。

【0085】

一態様において、本明細書に記述される改変アデノウイルスベクターは、異種遺伝子によりコードされる産物の製造のための発現ベクターとして *in vitro* で使用し得る。例えば、適する細胞株を該改変アデノウイルスに感染させ若しくはそれらでトランスフェクトし、そして慣習的様式で培養し、該改変アデノウイルスが遺伝子産物をプロモーターから発現することを可能にする。該遺伝子産物をその後、培養物からの既知の慣習的タンパク質単離および回収方法により、培地から回収しうる。

【0086】

別の態様において、本発明の改変アデノウイルスベクターは、選択された導入遺伝子を選択された宿主細胞に *in vivo* 若しくは *ex vivo* で送達し得る効率的な遺伝子移入ベヒクルを提供する。例えば、本発明の改変アデノウイルスベクターは、下述されるところの治療若しくは免疫原性分子の送達に利用し得る。一態様において、治療若しくはワクチン投与計画は、組換えアデノウイルスベクターの反復送達を必要とすることができる。こうした投与計画は、典型的に、ウイルスキャプシドが変えられている一連のウイルスベクターの送達を必要とする。ウイルスキャプシドは、各その後の投与のため、または特定の1血清型のキャプシドの予め選択された数の投与（例えば1、2、3、4回若しくはそれ以上）後に、変化させうる。従って、一投与計画は、第一のキャプシドをもつAdの送達、第二のキャプシドをもつAdでの送達、および第三のキャプシドでの送達を必要としうる。他の態様において、本発明の改変Adキャプシドを当業者に明らかであろうとおりの単独で、1種の別のものと、若しくは他のAd血清型とともに使用する投与計画を選択しうる。場合によっては、こうした投与計画は、ヒト以外の霊長類のアデノウイルス、ヒトアデノウイルス、若しくは本明細書に記述されるような人工的（例えばキメラ）血清型のキャプシドをもつAdの投与を必要としうる。投与計画の各相は、単一Ad血清型キャプシド、次いで別のAd血清型キャプシドを用いる一連のもので一連の注入（若しくは他の送達経路）の投与を必要としうる。あるいは、本発明の改変Adベクターを、他のウイルス系、ウイルス以外の送達系、タンパク質、ペプチド、および他の生物学的活性分子を包含する他のアデノウイルスに媒介されない送達系を必要とする投与計画で利用しうる。

【0087】

以下の節は、本発明の改変アデノウイルスキャプシド（例えばタンパク質の形態の）若しくは改変アデノウイルスベクターを介して送達しうる例示的分子に焦点を当てるであろう。

【0088】

一態様において、本明細書に記述される改変Adベクターは、公表された遺伝子治療方法に従ってヒトに投与される。選択された導入遺伝子を有する本発明のウイルスベクターは、好ましくは生物学的に適合性の溶液若しくは製薬学的に許容できる送達ベヒクルに懸

10

20

30

40

50

濁して患者に投与しうる。適するベヒクルは滅菌生理的食塩水を包含する。製薬学的に許容できる担体であることが既知かつ当業者に公知の他の水性および非水性の等張無菌注入溶液ならびに水性および非水性の無菌懸濁液を、本目的上使用しうる。

【0089】

改変アデノウイルスベクターは所望の生理学的効果を提供するのに十分な量で投与する。慣習的かつ製薬学的に許容できる投与経路は、限定されるものでないが、網膜への直接送達および他の眼内送達法、肝への直接送達、吸入、鼻内、静脈内、筋肉内、気管内、皮下、皮内、直腸、経口、眼内、内耳内、ならびに他の非経口投与経路を挙げることができる。投与経路は、所望の場合は組合せても、または導入遺伝子若しくは状態に依存して調節してもよい。投与経路は、処置されている状態の性質に主として依存することができる。

10

【0090】

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

20

【0091】

1. 治療分子

一局面において、改変アデノウイルスヘキソンタンパク質は、ターゲッティングを促進するため、および／若しくは本明細書に記述されるところの治療投与計画での使用のために、1 種若しくはそれ以上の治療的導入遺伝子の挿入断片を含有し得る。別の局面において、本発明の改変アデノウイルスベクターは、1 個若しくは治療的導入遺伝子をその中にパッケージングされて保有しうる。

30

【0092】

導入遺伝子によりコードされる有用な治療的産物は、インスリン、グルカゴン、成長ホルモン（GH）、副甲状腺ホルモン（PTH）、成長ホルモン放出因子（GRF）、卵巣刺激ホルモン（FSH）、黄体化ホルモン（LH）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、血管内皮増殖因子（VEGF）、アンジオポエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、エリスロポエチン（EPO）、結合組織増殖因子（CTGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、上皮成長因子（EGF）、トランスフォーミング成長因子 α （TGF- α ）、血小板由来成長因子（PDGF）、インスリン成長因子 I および II（IGF-I および IGF-II）、TGF、アクチビン、インヒビンを包含するトランスフォーミング成長因子スーパーファミリーのいずれか 1 種、若しくは骨形成タンパク質（BMP）BMP 1～15 のいずれか、成長因子のヘレグリン／ニューレグリン／ARIA/neu 分化因子（NDF）ファミリーのいずれか 1 種、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン NT-3 および NT-4/5、絨毛様神経栄養因子（CNTF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、ニューロツリン、アグリニン、セマフォリン／コラプシンのファミリーのいずれか 1 種、ネトリン-1 およびネトリン-2、肝細胞増殖因子（HGF）、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグならびにチロシンヒドロキシ

40

50

ラーゼを制限なしに包含するホルモンならびに増殖および分化因子を包含する。

【0093】

他の有用な導入遺伝子産物は、トロンボポエチン (TPO)、インターロイキン (IL) IL-1からIL-25 (例えばIL-2、IL-4、IL-12およびIL-18を包含する)、単球化学遊走物質タンパク質、白血病阻害因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、Fasリガンド、腫瘍壊死因子、およびインターフェロン、ならびに幹細胞因子、flk-2/flt3リガンドのようなサイトカインおよびリンホカインを制限なしに包含する免疫系を調節するタンパク質を包含する。免疫系により産生される遺伝子産物もまた本発明で有用である。これらは、免疫グロブリンIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、一本鎖抗体、T細胞受容体、キメラT細胞受容体、一本鎖T細胞受容体、クラスIおよびクラスII MHC分子、ならびに工作された免疫グロブリンおよびMHC分子を制限なしに包含する。有用な遺伝子産物は、補体調節タンパク質、膜補助因子タンパク質(MCP)、崩壊促進因子(DAF)、CR1、CF2およびCD59のような補体調節タンパク質もまた包含する。なお他の有用な遺伝子産物は、ホルモン、成長因子、サイトカイン、リンホカイン、調節タンパク質および免疫系タンパク質の受容体のいずれか1種を包含する。本発明は、低密度リポタンパク質(LDL)受容体、高密度リポタンパク質(HDL)受容体、超低密度リポタンパク質(VLDL)受容体を包含するコレステロール調節のための受容体、例えばアポリポタンパク質(apo)Aおよびそのアイソフォーム(例えばapoA1)、apoEならびにE2、E3およびE4を包含するそのアイソフォーム)、SRB1、ABC1を包含する脂質の調節で有用なタンパク質、ならびにスカベンジャー受容体を包含する。本発明は、グルココルチコイド受容体およびエストロゲン受容体、ビタミンD受容体ならびに他の核受容体を包含するステロイドホルモン受容体スーパーファミリーのメンバーのような遺伝子産物もまた包含する。加えて、有用な遺伝子産物は、jun、fos、max、mad、血清応答因子(SRF)、AP-1、AP2、myb、MyoDおよびミオゲニン、ETSボックス含有タンパク質、TFE3、E2F、ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ZF5、NFAT、CREB、HNF-4、C/EBP、SP1、CCAATボックス結合タンパク質、インターフェロン調節因子(IRF-1)、ウィルムス腫瘍タンパク質、ETS結合タンパク質、STAT、GATAボックス結合タンパク質、例えばGATA-3、ならびに翼状らせんタンパク質のフォークヘッドファミリーのような転写因子を包含する。

【0094】

他の有用な遺伝子産物は、カルバモイル合成酵素I、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノコハク酸合成酵素、アルギノコハク酸リアーゼ、アルギナーゼ、フマリルアセト酢酸加水分解酵素、フェニルアラニン水酸化酵素、 α -1アンチトリプシン、グルコース-6-ホスファターゼ、ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素、シスタチオン β -合成酵素、分枝鎖鎖ケト酸脱炭酸酵素、アルブミン、イソバレリル-CoA脱水素酵素、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ、メチルマロニルCoAムターゼ、グルタリルCoA脱水素酵素、インスリン、 β -グルコシダーゼ、ピルビン酸カルボキシレート、肝ホスホリラーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシン脱炭酸酵素、H-プロテイン、T-プロテイン、嚢胞性線維症膜貫通調節因子(CFTR)配列、およびジストロフィンcDNA配列を包含する。他の有用な遺伝子産物は、血友病Aの処置に有用な(例えば、第VII因子、ならびに、場合によっては結合により作動可能に連結されたヘテロ二量体のL鎖およびH鎖を包含するそのバリエーション)、ならびにBドメイン欠失第VII因子、米国特許第6,200,560号および同第6,221,349号明細書を参照されたい]、ならびに血友病Bの処置に有用な(例えば第IX因子)ものを包含する。

【0095】

なお他の有用な遺伝子産物は、挿入、欠失若しくはアミノ酸置換を含有する天然に存在しないアミノ酸配列を有するキメラ若しくはハイブリッドポリペプチドのような天然に存在しないポリペプチドを包含する。例えば、一本鎖の工作された免疫グロブリンはある種

10

20

30

40

50

の免疫無防備状態の患者で有用であり得る。他の型の天然に存在しない遺伝子配列は、アンチセンス分子、および標的の過剰発現を低下させるのに使用し得るリボザイムのような触媒核酸を包含する。

【0096】

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

10

【0097】

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

20

【0098】

本発明の改変アデノウイルスベクターは、例えば同一の導入遺伝子の再送達を必要とする投与計画で、若しくは他の導入遺伝子の送達を必要とする組合せ投与計画で、導入遺伝子の複数のアデノウイルス媒介性送達望ましい治療的投与計画にとりわけ良好に適する。こうした投与計画は、改変アデノウイルスベクターの投与、次いで同一血清型のアデノウイルスからのベクターでの再投与を必要としうる。とりわけ望ましい投与計画は、第一の投与で送達されるウイルスベクターの血清型がその後の投与の1種若しくはそれ以上で利用されるウイルスベクターの血清型と異なる、本発明の改変アデノウイルスベクターの投与を必要とする。例えば、一治療的投与計画は、改変アデノウイルスの投与、および同一若しくは異なる血清型の1種若しくはそれ以上の改変アデノウイルスでの反復投与を必要とする。別の例において、一治療的投与計画は、アデノウイルスベクターの投与、次いで第一の送達されるアデノウイルスベクターの血清型と異なる本発明の改変アデノウイルスベクターでの反復投与、および場合によっては前の投与段階のベクターの血清型と同一であるか若しくは好ましくは異なる別のベクターでのさらなる投与を必要とする。これらの投与計画は、本発明のキメラ血清型を使用して構築されるアデノウイルスベクターの送達に制限されない。むしろ、これらの投与計画は、本発明のキメラベクターの1種若しくはそれ以上と組合せの人工的な、ヒト、若しくはヒト以外の霊長類または他の哺乳動物起源のものでありうる他のアデノウイルス血清型（改変されていようがそうでなかろうが）のベクターを容易に利用し得る。こうした血清型の例は本文書の別の場所で論考されている。さらに、これらの治療的投与計画は、アデノウイルス以外のベクター、ウイルス以外のベクター、および／若しくは多様な他の治療上有用な化合物若しくは分子と組合せの、本発明の改変アデノウイルスベクターの同時若しくは連続いずれかの送達を必要としうる。本発明はこれらの治療的投与計画に制限されず、多様なそれらは当業者に容易に明らかであろう。

30

40

50

【0099】

2. 免疫原性導入遺伝子の送達

以前に記述されたとおり、改変アデノウイルスヘキソタンパク質それ自身は、選択された免疫原に対する免疫応答を誘導する選択されたペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質を含有するように改変しうる。こうした改変アデノウイルスヘキソタンパク質それ自身を、ターゲティングに、アジュバントとして、および／若しくは特異的免疫応答を誘導するのにそれ自身が有用であるアデノウイルスキャプシドを生成するのに使用しうる。さらなる一態様において、こうした改変アデノウイルスキャプシドを、適する発現カセット若しくはミニ遺伝子がパッケージングされているウイルス粒子の生成で使用する。

【0100】

従って、一態様において、本発明の改変アデノウイルスベクターはさらに、選択された免疫原に対する免疫応答を誘導するペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質をコードする導入遺伝子を、改変アデノウイルスキャプシド内にパッケージングされて含有する。本発明のこうした改変アデノウイルスは、自己プライミング効果、アジュバント効果を提供することができ、かつ／または、該ベクターにより発現される挿入される異種タンパク質（1種若しくは複数）に対する細胞溶解性T細胞および／若しくは抗体の誘導で高度に有効でありうる。

【0101】

本発明のアデノウイルスは免疫原性組成物としてもまた使用しうる。該組換えアデノウイルスは、免疫応答の誘導に決定的に重要かつ病原体の蔓延を制限することが可能な抗原（1種若しくは複数）が同定されかつそのcDNAが入手可能であるいかなる病原体に対する予防的若しくは治療的ワクチンとしても使用し得る。

【0102】

こうしたワクチン（若しくは他の免疫原性）組成物は、上述されたところの適する送達ベヒクル中で処方される。一般に、免疫原性組成物の用量は治療組成物について上で定義された範囲にある。選択された遺伝子の免疫のレベルをモニターしてブースターの必要性（あれば）を決定し得る。血清中の抗体力価の評価後に、至適のブースター免疫化が望ましいかもしれない。

【0103】

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

【0104】

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

【0105】

例えば、免疫原は多様なウイルス科から選択しうる。それに対する免疫応答が望ましいとみられる所望のウイルス科の例は、一般的な風邪の症例の約50%の原因であるライノウイルス属；ポリオウイルス、コックサッキーウイルス、エコーウイルス、およびA型肝炎ウイルスのようなヒトエンテロウイルスを包含するエンテロウイルス属；ならびに主と

10

20

30

40

50

してヒト以外の動物での口蹄疫の原因であるアプトウイルス属を包含するピコルナウイルス科を包含する。ウイルスのピコルナウイルス科内で、標的抗原はVP1、VP2、VP3、VP4およびVP6を包含する。他のウイルス科は、流行性胃腸炎の重要な原因病原体であるノーウォーク群のウイルスを包含するカルシウイルス (*calcivirus*) 科を包含する。ヒトおよびヒト以外の動物で免疫応答を誘導するための抗原の標的設定における使用に望ましいなお別のウイルス科は、シンドビスウイルス、ロスリバーウイルス、ならびにベネズエラ、東部および西部ウマ脳炎ウイルスを包含するアルファウイルス属、ならびに風疹ウイルスを包含するルビウイルス属を包含するトガウイルス科である。フラビウイルス科は、デング熱、黄熱病、日本脳炎、セントルイス脳炎およびダニ媒介脳炎ウイルスを包含する。他の標的抗原は、C型肝炎、または感染性気管支炎ウイルス (家禽) 、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス (ブタ)、ブタヘマグルチナチン (*hemagglutinin*) 脳脊髄炎ウイルス (ブタ)、ネコ感染性腹膜炎ウイルス (ネコ)、ネコ腸コロナウイルス (ネコ)、イヌコロナウイルス (イヌ) のような多数のヒト以外のウイルス、ならびに、一般的な風邪および／または非A、BすなわちC型肝炎を引き起こすことがあるヒト呼吸器コロナウイルスを包含するコロナウイルス科から生成しうる。加えて、ヒトコロナウイルスは重症急性呼吸器症候群 (SARS) の推定の原因病原体を包含する。コロナウイルス科内で、標的抗原は、E1 (Mすなわちマトリックスタンパク質ともまた呼ばれる)、E2 (Sすなわちスパイクタンパク質ともまた呼ばれる)、E3 (HEすなわちヘマグルチン-エルテロース (*elterose*) ともまた呼ばれる) 糖タンパク質 (全部のコロナウイルスに存在するわけではない) 若しくはN (ヌクレオキャプシド) を包含する。なお他の抗原は、ベシクロウイルス (例えば水疱性口内炎ウイルス) および一般的なリッサウイルス (例えば狂犬病) 属を包含するラブドウイルス科を標的としうる。ラブドウイルス科内で、適する抗原はGタンパク質若しくはNタンパク質に由来しうる。マルブルクおよびエボラウイルスのような出血性熱ウイルスを包含するフィロウイルス科が抗原の適する供給源となりうる。パラミクソウイルス科は、パラインフルエンザウイルス1型、パラインフルエンザウイルス3型、ウシパラインフルエンザウイルス3型、ルブラウイルス (流行性耳下腺炎ウイルス)、パラインフルエンザウイルス2型、パラインフルエンザウイルス4型、ニューカッスル病ウイルス (ニワトリ)、牛痘、麻疹およびイヌジステンパーを包含するモルビリウイルス、ならびにRSウイルスを包含するニューモウイルスを包含する。インフルエンザウイルスはオルトミクソウイルス科内で分類され、そして抗原の適する供給源である (例えばHAタンパク質、N1タンパク質)。ブニヤウイルス科は、ブニヤウイルス (カリフォルニア脳炎、ラクロス)、フレボウイルス (リフトバレー熱)、ハンタウイルス (プーマラ (*puremala*) はヘマハギン (*hemahagin*) 熱ウイルスである)、ナイロウイルス (ナイロビ羊病)、および多様な割り当てられていないブンガウイルス (*bungavirus*) 属を包含する。アレナウイルス科はLCMおよびラッサ熱ウイルスに対する抗原の供給源を提供する。レオウイルス科は、レオウイルス、ロタウイルス (小児で急性胃腸炎を引き起こす)、オルビウイルスおよびカルチウイルス (*cultivirus*) 属 (コロラドダニ熱)、レボンボ (ヒト)、ウマ脳症、ブルータングを包含する。レトロウイルス科は、ネコ白血病ウイルス、HTLV I および HTLV II、レンチウイルス亜科の (*lentivirinal*) (ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウマ感染性貧血ウイルスおよびスプマウイルス亜科の (*spumavirinal*) を包含する) のようなヒトおよび家畜の疾患を包含するオンコリウイルス (*oncorivirinal*) 亜科を包含する。レンチウイルスのなかで多くの適する抗原が記述され、そして容易に選択し得る。

【0106】

適するHIVおよびSIV抗原の例は、gag、pol、Vif、Vpx、VPR、Env、Tat、NefおよびRevタンパク質、ならびにそれらの多様なフラグメントを制限なしに包含する。例えば、Envタンパク質の適するフラグメントは、gp120、gp160、gp41のようなそのサブユニット、若しくは例えば長さ最低約8アミノ酸

10

20

30

40

50

のそれらのより小さいフラグメントのいずれも包含しうる。同様にtatタンパク質のフラグメントを選択しうる。[米国特許第5, 891, 994号および同第6, 193, 981号明細書を参照されたい。] D. H. Barouchら、J. Virol.、75(5) : 2462-2467 (2001年3月)、およびR. R. Amaraら、Science、292 : 69-74 (2001年4月6日) に記述されるHIVおよびSIVタンパク質もまた参照されたい。別の例において、HIVおよび／若しくはSIV免疫原性タンパク質若しくはペプチドを使用して、融合タンパク質若しくは他の免疫原性分子を形成しうる。例えば、2001年8月2日に公開された第WO 01/54719号、および1999年4月8日に公開された同第WO 99/16884号明細書に記述されたHIV-1 Tatおよび／若しくはNef融合タンパク質、ならびに免疫化処方参照されたい。本発明は、本明細書に記述されるHIVおよび／若しくはSIV免疫原性タンパク質若しくはペプチドに制限されない。加えて、これらのタンパク質に対する多様な改変が記述されているか、若しくは当業者により容易になされ得る。例えば米国特許第5, 972, 596号明細書に記述される改変gagタンパク質を参照されたい。さらに、いずれの所望のHIVおよび／若しくはSIV免疫原も単独若しくは組合せで送達しうる。こうした組合せは単一ベクター若しくは複数のベクターからの発現を包含しうる。場合によっては、別の組合せは、タンパク質の形態の免疫原の1種若しくはそれ以上の送達を伴う、1種若しくはそれ以上の発現された免疫原の送達を必要としうる。こうした組合せを下により詳細に論考する。

【0107】

パポウイルス科は、ポリオーマウイルス亜科(BKUおよびJCUウイルス)ならびにパピローマウイルス亜科(癌若しくは乳頭腫の悪性進行と関連する)を包含する。アデノウイルス科は呼吸器疾患および／若しくは腸炎を引き起こすウイルス(Ex、Ad7、ARD、O. B.)を包含する。パルボウイルスはネコパルボウイルス科(ネコ腸炎)、ネコ汎白血球減少症ウイルス、イヌパルボウイルスおよびブタパルボウイルスを包含する。ヘルペスウイルス科は、シンプレックスウイルス(HSVI、HSVII)、ワリセロウイルス(varicellivirus)(偽性狂犬病、带状疱疹)属を包含するアルファヘルペスウイルス亜科、およびサイトメガロウイルス属(HCMV、ムロメガロウイルス)を包含するベータヘルペスウイルス亜科、ならびに、リンホクリプトウイルス属、EBV(バーキットリンパ腫)、感染性鼻気管炎、マレック病ウイルスおよびラジノウイルスを包含するガンマヘルペスウイルス亜科を包含する。ポックスウイルス科は、オルトポックスウイルス(大疱瘡(天然痘)およびワクシニア(牛痘))、パラポックスウイルス、アビポックスウイルス、カプリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、スイポックスウイルス属を包含するチョルドポックスウイルス亜科、ならびにエントモポックスウイルス亜科を包含する。ヘパドナウイルス科はB型肝炎ウイルスを包含する。抗原の適する供給源となりうる1種の分類されないウイルスはD型肝炎ウイルスである。なお他のウイルス供給源は、トリ伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスおよびブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルスを包含しうる。アルファウイルス科はウマ動脈炎ウイルスおよび多様な脳炎ウイルスを包含する。

【0108】

本発明のウイルスは、ヒトおよびヒト以外の脊椎動物を感染させる細菌、真菌、寄生性微生物若しくは多細胞寄生生物を包含する他の病原体に対しヒト若しくはヒト以外の動物を免疫するのに有用であるか、または癌細胞若しくは腫瘍細胞からである免疫原もまた保有しうる。細菌性病原体の例は病原性グラム陽性球菌を包含する肺炎球菌；ブドウ球菌；ならびに連鎖球菌を包含する。病原性グラム陰性球菌は髄膜炎菌；淋菌を包含する。病原性の腸グラム陰性桿菌は、腸内細菌科；シュードモナス菌、アシネトバクテリア(acinetobacteria)およびエイケネラ(eikenella)；類鼻疽；サルモネラ(salmonella)；シゲラ(shigella)；ヘモフィルス(haemophilus)；モラクセラ(moraxella)；軟性下疳菌(H. ducreyi)(軟性下疳を引き起こす)；ブルセラ(brucella)；野兔病菌(Fran

cisella tularensis) (野兎病を引き起こす) ;エルジニア (Yersinia) (パスツレラ菌) ;ストレプトバチルス モニリフォルミス (Streptobacillus moniliformis) およびらせん菌を包含し ;グラム陽性桿菌はリステリア菌 (Listeria monocytogenes) ;豚丹毒菌 (Erysipelothrix rhusiopathiae) ;ジフテリア菌 (Corynebacterium diphtheria) (ジフテリア) ;コレラ ;炭疽菌 (B. anthracis) (炭疽) ;ドノヴァン症 (鼠径部肉芽腫) ;およびバルトネラ症を包含する。病原性嫌気性細菌により引き起こされる疾患は、破傷風 ;ボツリヌス中毒 ;他のクロストリジウム属 ;結核 ;らい ;および他のミコバクテリウムを包含する。病原性のスピロヘータ疾患は梅毒 ;トレポネーマ症 ;イチゴ腫、ピンタおよび風土病性梅毒 ;ならびにレプトスピラ症を包含する。より高病原性の細菌および病原性真菌により引き起こされる他の感染症は、アクチノミセス症 ;ノカルジア症 ;クリプトコックス症、ブラストミセス症、ヒストプラスマ症およびコクシジオイデス真菌症 ;カンジダ症、アスペルギルス症およびムコール症 ;スポロトリクス症 ;パラコクシジオイドミコーシス、ペトリエリジオシス (Petritelliosis)、トルロプシス症、菌腫およびクロモミコーシス ;ならびに皮膚糸状菌症を包含する。リケッチア感染症は、発疹チフス、ロッキー山熱、Q熱およびリケッチア痘を包含する。マイコプラスマおよびクラミジア感染症の例は :マイコプラスマ肺炎 ;性病性リンパ肉芽腫 ;オウム病 ;および周産期クラミジア感染症を包含する。病原性真核生物は病原性原生動物および蠕虫を包含し、また、それらにより生じられる感染症は :アメーバ症 ;マラリア ;リーシュマニア症 ;トリパノソーマ症 ;トキソプラスマ症 ;ニューモシスチス カリニ (Pneumocystis carinii) ;トリカンス (Trichans) ;トキソプラスマ (Toxoplasma gondii) ;バベシア症 ;ジアルジア症 ;旋毛虫症 ;フィラリア症 ;住血吸虫症 ;線虫 ;吸虫 (trematodes) すなわち吸虫 (flukes) ;および条虫 (cestode) (条虫 (tapeworm)) 感染症を包含する。これらの生物体および / 若しくはそれらにより産生される毒素の多くは、疾病対策センター (Centers for Disease Control) [(CDC)、米国保健福祉省の部門] により生物学的攻撃での使用に関する潜在性を有する剤と同定された。例えば、これらの生物学的剤のいくつかは、炭疽菌 (Bacillus anthracis) (炭疽)、ボツリヌス菌 (Clostridium botulinum) およびその毒素 (ボツリヌス中毒) ;ペスト菌 (Yersinia pestis) (ペスト)、大疱瘡 (天然痘)、野兎病菌 (Francisella tularensis) (野兎病)、ならびにウイルス性出血熱 [フィロウイルス (例えばエボラ、マルブルク)、ならびにアレナウイルス (例えばラッサ、マチュポ)] (それらの全部は現在カテゴリーAの病原体に分類されている) ;コクシエラ ブルネティ (Coxiella burnetii) (Q熱) ;ブルセラ属 (Brucella) スピーシーズ (ブルセラ症)、バークホルデリア マレイ (Burkholderia mallei) (鼻疽)、バークホルデリア シュードマレイ (Burkholderia pseudomallei) (類鼻疽)、トウゴマ (Ricinus communis) およびその毒素 (リシン毒素)、ウェルシュ菌 (Clostridium perfringens) およびその毒素 (ϵ 毒素)、ブドウ球菌属 (Staphylococcus) スピーシーズおよびそれらの毒素 (エンテロトキシンB)、オウム病クラミジア (Chlamydia psittaci) (オウム病)、水の安全性に対する脅威 (例えばコレラ菌 (Vibrio cholerae))、クリトスポリジウム パルブム (Cryptosporidium parvum)、発疹チフス (発疹チフスリケッチア (Rickettsia powazekki))、ならびにウイルス性脳炎 (アルファウイルス、例えばベネズエラウマ脳炎 ;東部ウマ脳炎 ;西部ウマ脳炎) (それらの全部は現在カテゴリーBの剤として分類されている) ;ならびにニパンウイルスおよびハンタウイルス (現在カテゴリーCの病原体として分類されている) を包含する。加えて、そのように分類されるか若しくは異なって分類される他の生物体が、将来同定かつ / 若しくはこうした目的上使用されうる。本明細書に記述されるウイルスベクタ

10

20

30

40

50

ーおよび他の構築物が、これらの生物学的剤への感染若しくはそれらとの他の有害反応を予防かつ／若しくは処置することができるこれらの生物体、ウイルスからの抗原、それらの毒素若しくは他の副生成物を送達するのに有用であることが容易に理解されるであろう。

【0109】

T細胞の可変領域に対する免疫原を送達するための本発明のベクターの投与は、それらのT細胞を排除するための細胞傷害性リンパ球（CTL）を包含する免疫応答を導き出す。関節リウマチ（RA）において、該疾患に關与するT細胞受容体（TCR）の数個の特異的可変領域が特徴づけられている。これらのTCRはV-3、V-14、V-17およびV α -17を包含する。従って、これらのポリペプチドの最低1種をコードする核酸配列の送達は、RAに關与するT細胞を標的とすることができる免疫応答を導き出すことができる。多発性硬化症（MS）において、該疾患に關与するTCRの数個の特異的可変領域が特徴づけられている。これらのTCRはV-7およびV α -10を包含する。従って、これらのポリペプチドの最低1種をコードする核酸配列の送達は、MSに關与するT細胞を標的とすることができる免疫応答を導き出すことができる。強皮症において、該疾患に關与するTCRの数個の特異的可変領域が特徴づけられている。これらのTCRはV-6、V-8、V-14およびV α -16、V α -3C、V α -7、V α -14、V α -15、V α -16、V α -28ならびにV α -12を包含する。従って、これらのポリペプチドの最低1種をコードするキメラアデノウイルスの送達は、強皮症に關与するT細胞を標的とすることができる免疫応答を導き出すことができる。

【0110】

3. 送達方法

選択された遺伝子の治療レベル若しくは免疫のレベルをモニターして、ブースターの必要性（あれば）を決定し得る。血清中のCD8+ T細胞応答、若しくは場合によっては抗体力価の評価後に、任意のブースター免疫化が望ましいことがある。場合によっては、本発明のアデノウイルスベクターは、単回投与で、または多様な組合せ投与計画で、例えば他の有効成分を必要とする投与計画若しくは治療クールとともに、またはプライムブースト（prime-boost）投与計画で送達しうる。多様なこうした投与計画が当該技術分野で記述されており、そして容易に選択しうる。例えば、プライムブースト投与計画は、タンパク質、若しくはこうした抗原をコードする配列を保有する組換えウイルスのような伝統的抗原を含む第二の若しくはさらなるブースターの投与に対し免疫系をプライミングするための、DNA（例えばプラスミド）に基づくベクターの投与を必要としうる。例えば、2000年3月2日に公開された国際特許公開第WO 00/11140号明細書（引用することにより組込まれる）を参照されたい。あるいは、免疫化投与計画は、抗原を保有するベクター（ウイルス若しくはDNAいずれかに基づく）若しくはタンパク質に対する免疫応答をブーストするための本発明の改変アデノウイルスベクターの投与を必要としうる。なお別の代替において、免疫化投与計画は、タンパク質の投与、次いで抗原をコードするベクターを含むブースターを必要とする。

【0111】

一態様において、本発明は、本発明の改変アデノウイルスベクターの送達を必要とする投与計画での、選択された抗原に対する免疫応答のプライミングおよびブースト方法を提供する。こうした投与計画は、選択された免疫原を保有するプラスミドDNAベクターの送達、ならびに／またはプライムおよび／若しくはブーストベヒクルからの多タンパク質の発現を必要としうる。例えば、HIVおよびSIVに対する免疫応答を生成するのに有用なタンパク質サブユニットの発現のための多タンパク質投与計画を記述するR. R. Amara, Science, 292: 69-74 (2001年4月6日)を参照されたい。例えば、プライムは、単一転写物若しくは複数の転写物からGag、Pol、Vif、VPXおよびVprならびにEnv、TatおよびRevを送達しうる。あるいは、SISのGag、PolおよびHIV-1 Envは単一構築物で送達される。なお他の投与計画は、国際特許公開第WO 99/16884号および同第WO 01/54719

号明細書に記述されている。

【0112】

しかしながら、プライムブースト投与計画は、HIVに対する免疫化若しくはこれらの抗原の送達に制限されない。例えば、プライミングは、第一のベクターを用いて送達すること、次いで第二のベクター、若しくはタンパク質の形態の抗原それ自身を含有する組成物でブーストすることを必要としうる。一例において、プライムブースト投与計画は、抗原が由来するウイルス、細菌若しくは他の生物体に対する保護免疫応答を提供し得る。別の望ましい態様において、プライムブースト投与計画は、それに対する治療が投与されている状態の存在の検出のための慣習的アッセイを使用して測定し得る治療効果を提供する。

10

【0113】

プライミング組成物は、身体の多様な部位で、用量依存性の様式（所望の免疫応答が標的とされている抗原に依存する）で投与しうる。本発明は、注入（1個若しくは複数）の量若しくは部位、または製薬学的担体に制限されない。むしろ、該投与計画は、そのそれぞれが毎時、毎日、毎週若しくは毎月または毎年投与される単一用量若しくは投薬量を包含しうるプライミングおよび／若しくはブースト（*boosting*）段階を必要としうる。一例として、哺乳動物は、担体中約10 μ gないし約50 μ gの間のプラスミドを含有する1若しくは2用量を受領しうる。DNA組成物の所望の量は、約1 μ gないし約10,000 μ gの間のDNAベクターの範囲にわたる。投薬量は被験体の体重1kgあたり約1 μ gから1000 μ gのDNAまで変動しうる。送達の量若しくは部位は、望ましくは哺乳動物の同一性および状態に基づき選択する。

20

【0114】

哺乳動物への抗原の送達に適するベクターの投薬量単位は本明細書に記述されている。ベクターは、等張の生理的食塩水；等張塩溶液、若しくはこうした投与の当業者に明らかであろう他の製剤のような製薬学的に若しくは生理学的に許容できる担体に懸濁若しくは溶解されることにより、投与のため調製する。適切な担体は当業者に明白であることができ、そして投与経路に大きな部分依存するであろう。本発明の組成物は、生物分解性の生物適合性ポリマーを使用する徐放製剤中で上述された経路に従って、若しくはミセル、ゲルおよびリポソームを使用するその場での送達により、哺乳動物に投与しうる。場合によっては、本発明のプライミング段階は、本明細書で定義されるような、プライミング組成物、適する量のアジュバントとともに投与することもまた包含する。

30

【0115】

好ましくは、ブースト組成物（*boosting composition*）は、哺乳動物被験体にプライミング組成物を投与した約2ないし約27週後に投与する。ブースト組成物の投与は、プライミングDNAワクチンにより投与されると同一の抗原を含有する若しくは送達することが可能なブースト組成物の有効量を使用して達成される。ブースト組成物は、同一ウイルス供給源（例えば本発明のアデノウイルス配列）若しくは別の供給源由来の組換えウイルスベクターから構成しうる。あるいは、「ブースト組成物」は、プライミングDNAワクチンでコードされると同一の抗原を、しかしタンパク質若しくはペプチドの形態で含有する組成物であり得、その組成物は宿主中で免疫応答を誘導する。別の態様において、ブースト組成物は、哺乳動物細胞中でその発現を指図する制御配列の制御下に該抗原をコードするDNA配列、例えば公知の細菌若しくはウイルスベクターのようなベクターを含有する。ブースト組成物の主要件は、該組成物の抗原が、プライミング組成物によりコードされるものと同一の抗原若しくは交差反応性抗原であることである。

40

【0116】

別の態様において、本発明の改変アデノウイルスベクターは、多様な他の免疫化および治療的投与計画での使用にもまた良好に適する。こうした投与計画は、異なる血清型キャプシドのAdベクターと同時に若しくは連続して本発明のアデノウイルスベクターの送達を必要としうる（本発明のアデノウイルスベクターがAd以外のベクターと同時に若しくは連続して送達される投与計画、本発明のアデノウイルスベクターがタンパク質、ペプチ

50

ド、および／または他の生物学的に有用な治療若しくは免疫原性化合物と同時に若しくは連続して送達される投与計画)。こうした用途は当業者に容易に明らかであろう。

【0117】

従って、本発明は、本発明の改変アデノウイルスヘキソタンパク質を含んでなる多様な処置およびワクチン投与計画での使用のための免疫原性組成物を提供する。一態様において、改変アデノウイルスヘキソンは、空の改変アデノウイルスキャプシド（すなわち標的細胞のための送達のためのいかなるミニ遺伝子もその中にパッケージングしていない改変アデノウイルスヘキソンを含有するアデノウイルスキャプシド）の形態で被験体に送達しうる。別の態様において、標的細胞中でこのヘキソンを発現するベクターを利用しうる。なお別の態様において、ミニ遺伝子を保有する改変アデノウイルス粒子を被験体に送達する。

10

【0118】

こうした改変アデノウイルス粒子は、その改変キャプシド中にターゲッティング配列を含有しうる。しかしながら、こうした改変アデノウイルス粒子は、自己プライミングする免疫原性組成物の基礎を形成しうる。こうした自己プライミングする組成物は、アデノウイルスキャプシド中の外因性アミノ酸配列が免疫原である場合に製造することができ、そして、該キャプシドは免疫原をコードする核酸配列もまたその中にパッケージングしている。本明細書に記述されるところのキャプシドタンパク質中の免疫原、およびキャプシド内にパッケージングされた分子内に含有される免疫原は同一であることができ、同一のウイルス若しくは生物体に対する免疫応答を誘導しうる。別の態様において、本発明の自己

20

【実施例】

【0119】

以下の実施例は具体的に説明し、そして本発明をそれらの具体的に説明される態様に制限することを意図していない。

【0120】

発明者は、ヘキソン（上に引用されるRuxら、（2003）により定義されるところのHVR1領域の25アミノ酸の欠失（ALEINLEEDDDNEDEVDEQAQQK、配列番号11）を含有する生存可能なアデノウイルス変異体を生成し得ることを示した。

30

【0121】

発明者は、所望のペプチド配列（本実施例において、HIV中和エピトープを内部に持つことが報告されたHIVエンベロープタンパク質の区分に対応するペプチド配列EQELLEDKWLW、配列番号12）をコードする外因性DNAセグメントを、該欠失の代わりに挿入し得ることをさらに示す。

【0122】

実施例1：HAdV-5ヘキシソンの挿入変異

40

それが外来ペプチド配列をコードするようにヘキシソンのDNA配列を変異させるために着手されたクローニング段階は、後に続くとおりであった。

【0123】

ヘキソンコーディング領域を内部に持つHAdV-5ゲノムからのAscIフラグメントを、プラスミドpNEB193（New England Biolabsから購入した）にサブクローニングして、pNEBAscを創製した（図1を参照されたい）。

【0124】

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）突然変異誘発を該ヘキソンで実施して、挿入部位に新たなSpeI部位を創製した。SpeI部位を創製するためのPCR突然変異誘発の詳細は、後に続くとおりである。

50

【0125】

反応1および2のPCR鋳型はpNEBAsc（プラスミドpNEB193にクローン化したヘキソン領域を含有するAd5 AscIフラグメント）である。反応1および2の産物を合わせ、そして反応3の鋳型として使用した。PCR酵素はTgoポリメラーゼであった。全3反応の循環は後が続くとおりであった。すなわち、94°-30秒、45°-60秒、72°-60秒、40回。

【0126】

反応1のため、プライマー「5hex1」（GACCGCCGTTGTTGTAACCC、配列番号13）および「lt rev」（GTTGTCAATCGTCCACTAGTCCCTCTTCTTCTAGGTTTATTTCAAG、配列番号14）を使用して、713bpのフラグメントを増幅した。

10

【0127】

反応2のため、プライマー「rt fwd」（GGACTAGTGGACGATGACAAACGAAGACGA、配列番号15）および「rt rev」（ATGGTTTCAATTGGGGTAGTTC、配列番号16）を使用して、259bpのフラグメントを増幅した。

【0128】

反応3のため、反応1および反応2から生じるフラグメントを、プライマー「5hex1」および「rt rev」を使用して一緒に縫い合わせて（sewn）、951bpの産物をもたらした。縫い合わせた951bpの産物をB1pIで切断し；生じる518bpのフラグメントを使用してpNEBAscの天然のB1pIフラグメントを置き換えて、pNEBAscSpeを生じた。これは、ヘキソンアミノ酸配列中のEEEとDDDの間（aa#149と150の間）にSpeI部位を含有するGGACTAGTG〔配列番号15のnt 1-9〕（アミノ酸GLVをコードする）を挿入する。]

20

【0129】

所望のペプチド配列をコードする合成DNAフラグメントを該SpeI部位に挿入した。該手順の詳細は後が続くとおりであった。

【0130】

オリゴマー「CD4 top」（CTAGGCTGCTACGGCGTGAGCGCCACCAAGCTGGGG、配列番号18）および「CD4 bot」（CTAGCCCAGCTTGGTGGCGCTCACGCCGTAGCAGC、配列番号19）を一緒にアニーリングした後、SARSコロナウイルスのスパイクタンパク質からのBalb/cマウスCD4エピトープをpNEBAscSpeのSpeI部位に挿入して、pNEBAscSpe-spikeCD4を生じた。これは、GLGCYGVSA TKLGLV（配列番号20）をヘキシソンのEEEとDDDの間（aa#149と150の間）に置く。

30

【0131】

SARSコロナウイルスのスパイクタンパク質からのBalb/cマウスCD8エピトープを挿入するため、オリゴマー「CD8 top」（CTAGGGACCAAGCACCGGCAACTACAAGTACCGCTACCTGCGCCACGGCAAGCTGCGCCCCGGG、配列番号21）および「CD8 bot」（CTAGCCCGGGGCGCAGCTTGGCCGTGGCGCAGGTAGCGGTACTTGTAGTTGTAGTTGCCGGTGGTGGTCC、配列番号22）を一緒にアニーリングし、そしてpNEBAscSpeのSpeI部位に挿入して、pNEBAscSpe-spikeCD8を生じた。これは、アミノ酸配列GLGTSTGNYNKYRYLRHGKLRPGLV（配列番号23）をヘキシソンのEEEとDDDの間（aa#149と150の間）に置く。

40

【0132】

E1およびE3欠失HAdV-5ベクターの天然のヘキソンを含有するプラスミド分子クローン（pSRAd5eGFP）を、挿入された外来配列とともにヘキソンを含有するもので置き換えて、変異させたヘキソンを内部に持つ新たなプラスミド分子クローン（そ

50

れぞれ p H 5 s C D 4 および p H 5 s C D 8) を創製した。

【0133】

P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) 突然変異誘発を該ヘキソンで実施して、挿入部位に新たな B s p E I 制限酵素部位を創製した。B s p E I 部位を創製する P C R 突然変異誘発の詳細は後に続くとおりであった。

【0134】

p N E B A s c (プラスミド p N E B 1 9 3 にクローン化したヘキソン領域を含有する A d 5 A s c I フラグメント) が反応 1 および 2 の鋳型であった。反応 1 および 2 の産物を合わせ、そして反応 3 の鋳型として使用した。

【0135】

N E B から購入しかつ製造元の説明書に従って使用した P h u s i o n ^{T M} ハイフィデリティ (h i g h - f i d e l i t y) P C R キット。全 3 反応の循環は：98 ° - 5 秒、55 ° - 15 秒、72 ° - 60 秒、25 回であった。

【0136】

反応 1 のため、プライマー「5 h e x 1」(G A C C G C C G T T G T T G T A A C C C、配列番号 24) および B s p S O E r e v (C G T G A G T T C C G G A A G T A G C A G C T T C A T C C C A T T C G、配列番号 25) を使用して 678 b p のフラグメントを増幅した。反応 2 のため、プライマー B s p S O E f w d (T G C T A C T T C C G G A A C T C A C G T A T T T G G G C A G G C G、配列番号 26) および 5 h e x 4 (G G A A G A A G G T G G C G T A A A G G、配列番号 27) を使用して、1379 b p のフラグメントを増幅した。

【0137】

反応 3 のため、反応 1 および反応 2 から生じるフラグメントを、プライマー 5 h e x 1 および 5 h e x 4 を使用して一緒に縫い合わせ、そして 2037 b p の産物を R s r I I + A v r I I で切断し；生じる 1908 b p のフラグメントを p N E B A s c / R s r I I + A v r I I に連結して、p N E B A s c B s p E I を生じた。これは、A L E I N L E E E D D D N E D E V D E Q A E Q Q K [配列番号 11] をコードする 75 b p を欠失し、そしてヘキソン配列中に B s p E I 部位を含有する T C C G G A (S G をコードする配列番号 27 の n t 71 - 3) を挿入する。

【0138】

所望のペプチド配列をコードする合成 DNA フラグメントを B s p e I 部位に挿入した。該手順の詳細は後に続くとおりであった。H I V 2 F 5 エピトープ領域を p N E B A s c B s p E I に挿入するため、オリゴマー「2 F 5 t o p」(C C G G C G A G C A G G A G C T G C T G G A G C T G G A C A A G T G G G C C A G C C T G T G G T、配列番号 28) および「2 F 5 b o t」(C C G G A C C A C A G G C T G G C C C A C T T G T C C A G C T C C A G C A G C T C C T G C T C G、配列番号 17) をアニーリングし、そして B s p E I 部位に挿入して、プラスミド p N E B A s c 2 F 5 を生じた。これは、アミノ酸配列 A L E I N L E E E D D D N E D E V D E Q A E Q Q K (配列番号 11) を、上で実施した 25 アミノ酸欠失の代わりに置く。

【0139】

E 1 および E 3 欠失 H A d V - 5 ベクターの天然のヘキソンを含有するプラスミド分子クローン (p S R A d 5 e G F P) を、欠失若しくは挿入された外来配列を伴うヘキソンを含有するもので置き換えて、変異させたヘキソンを内部に持つ新たなプラスミド分子クローン (それぞれ p H 5 h e x B s p e I および p H 5 2 F 5) を創製した。

【0140】

感染性組換え H A d V - 5 ベクターを、変異させたヘキソンを内部に持つ該新たなプラスミド分子クローン (P a c I で直鎖状にした) を H E K 293 細胞にトランスフェクトすることにより、変異させたヘキソンを伴い生成させた。

【0141】

改変ヘキソンタンパク質を含有するこの新たな H A d V - 5 ベクターを、本明細書に記

10

20

30

40

50

述されるところの多様な応用で使用する。

【0142】

本明細に引用される全刊行物は引用することにより本明細書に組込まれる。本発明はとりわけ好ましい態様に関して記述した一方、本発明の技術思想から離れることなく改変を行い得ることが認識されるであろう。こうした改変は、付随する請求の範囲の範囲内にあることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0143】

【図1】ヘキソンコーディング領域を内部に持つヒトアデノウイルス5型ゲノム(HAdV-5)のプラスミドpNEB193(New England Biolabsから購入した)へのサブクローニングから生じるプラスミドpNEBAscの地図である。

10

【図2A】天然のアデノウイルスヘキソンおよび緑色蛍光タンパク質マーカー遺伝子を含むE1およびE3欠失HAdV-5ベクターの分子クローンである、プラスミド(p)SRAd5eGFPの地図である。

【図2B】HAdV-5バックボーン、およびSARSコロナウイルスのスパイクタンパク質からのCD4エピトープを含む変異させたヘキソンを含むプラスミド分子クローンである、pH5sCD4eGFPの地図である。

【図2C】E1、E3欠失HAdV-5ゲノム、およびSARSコロナウイルスのスパイクタンパク質からのCD8エピトープを含む変異させたヘキソンを含むプラスミド分子クローンである、pH5sCD8eGFPの地図である。

20

【図2D】E1、E3欠失HAdV-5ゲノム、およびHIV-2F5エピトープ領域を含む変異させたヘキソンを含むプラスミド分子クローンである、pH5-2F5eGFPの地図である。

【図2E】E1、E3欠失HAdV-5ゲノム、および挿入断片を含む変異させたヘキソンを含むプラスミド分子クローンである、pH5-hexBspeEIの地図である。

【図3】サルアデノウイルスSAdV-23(旧命名法の下でPan6若しくはC6)；SAdV-22(旧命名法の下でSAd22/Pan5若しくはC5)；SAdV-24(旧命名法の下でPan7若しくはC7)；およびSAdV-25(旧命名法の下でC68)の超可変領域(HVR)1、2、3、4、5、6および7を含むアデノウイルスヘキソンタンパク質の部分のアライメントである。HVRの位置をこれらの配列について示し、配列のそれぞれに関する番号付けを示す。SAdV-23について、該フラグメントは配列番号3のアミノ酸131ないし495であり；SAdV-22について、該フラグメントは配列番号4のアミノ酸131ないし486であり；SAd24について、該フラグメントは配列番号5のアミノ酸131ないし485であり；SAd25について、該フラグメントは配列番号6のアミノ酸131ないし486であり；hAd5について、該フラグメントは配列番号2のアミノ酸131ないし509である。

30

【図 1】

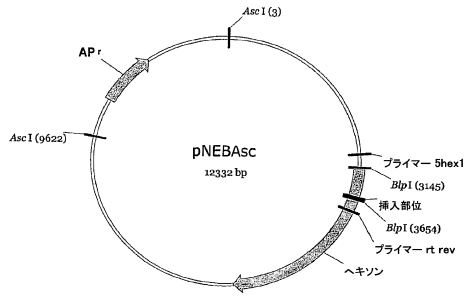
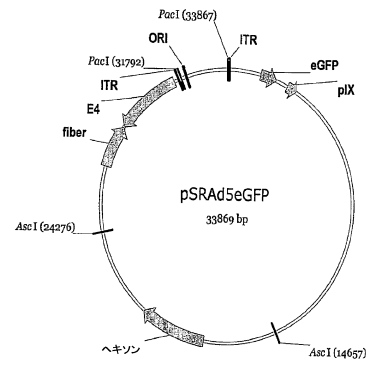


FIG. 1

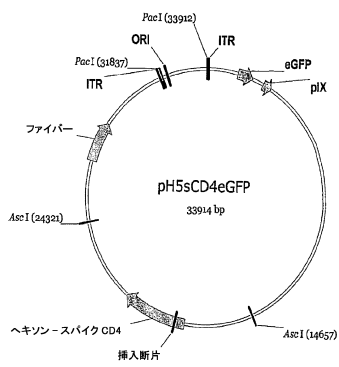
【図 2 A】

Fig. 2A



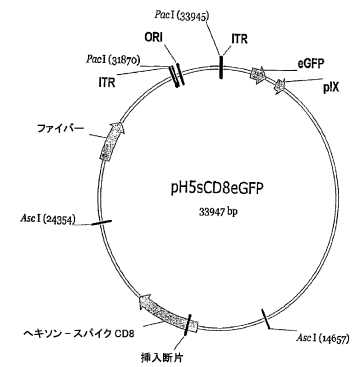
【図 2 B】

Fig. 2B



【図 2 C】

FIG 2C



【図 2 D】

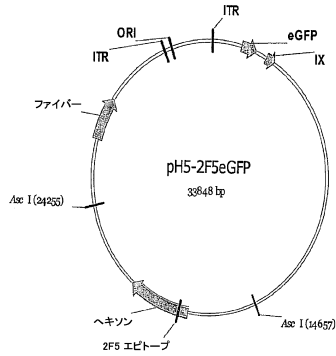


FIG 2D

【図 2 E】

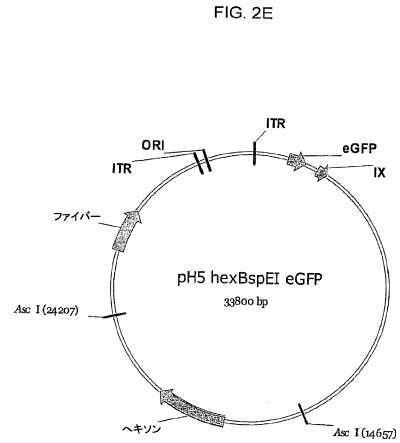


FIG. 2E

【図 3】

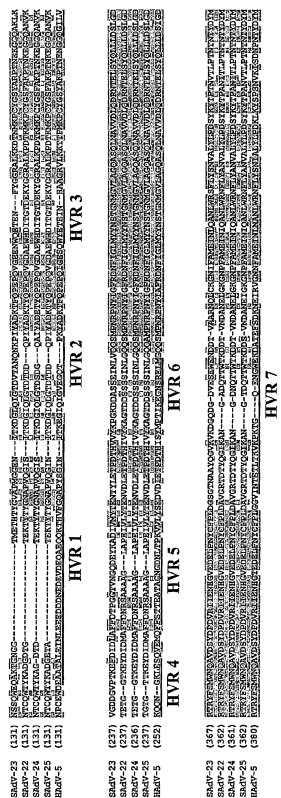


FIG. 3

【配列表】

0005889514000001.app

フロントページの続き

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 小堀 麻子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表2001-517080 (JP, A)

特表2002-523105 (JP, A)

J. Gen. Virol. (1994) Vol. 75, p. 133-139

Molecular Therapy (2000) Vol. 1, p. 18-30

J. Virol. (2005) Vol. 79, No. 21, p. 13656-13666

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

C12N7/00-08

PUBMED

WPI

BIOSIS

CA

MEDLINE

REGISTRY

JSTPLUS