

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-541730

(P2008-541730A)

(43) 公表日 平成20年11月27日(2008.11.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
<b>C 12 N 7/00</b> (2006.01)	C 12 N 7/00	4 B 0 6 5
<b>C 12 N 5/10</b> (2006.01)	C 12 N 5/00	B 4 C 0 8 5
<b>A 61 K 39/235</b> (2006.01)	A 61 K 39/235	4 C 0 8 7
<b>A 61 K 39/39</b> (2006.01)	A 61 K 39/39	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

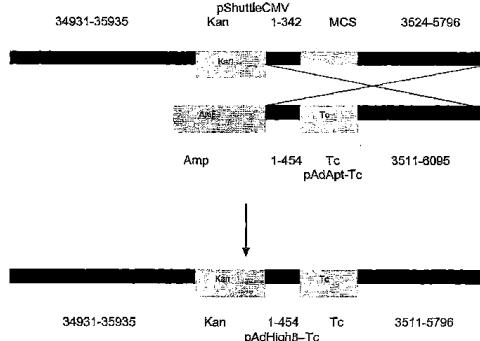
(21) 出願番号	特願2008-513739 (P2008-513739)	(71) 出願人	507388384 ヴァクシン インコーポレイテッド V A X I N, I N C. アメリカ合衆国 アラバマ州 35203 バーミンガム ファースト アヴェニュー ノース 1500 スイート ティー 126
(86) (22) 出願日	平成18年5月23日 (2006.5.23)	(74) 代理人	100073184 弁理士 柳田 征史
(85) 翻訳文提出日	平成20年1月28日 (2008.1.28)	(74) 代理人	100090468 弁理士 佐久間 剛
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/020350		
(87) 國際公開番号	W02006/127956		
(87) 國際公開日	平成18年11月30日 (2006.11.30)		
(31) 優先権主張番号	60/683,638		
(32) 優先日	平成17年5月23日 (2005.5.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】高力価かつ複製コンピテントアデノウイルス不含である組換えアデノウイルスベクターの迅速な作成法

## (57) 【要約】

一般的には、本発明は、遺伝子治療、免疫学およびワクチン技術の分野に関する。さらに特定すると、本発明は、複製コンピテントアデノウイルス (RCA) を含まないアデノウイルスベクターを迅速に高力価で生成できる新規な系に関する。また本発明は、これらのRCA不含アデノウイルスベクター、該RCA不含アデノウイルスベクターを含む免疫原性組成物もしくはワクチン組成物の調製法、これらのアデノウイルスベクター内で目的の異種核酸を発現させる方法、ならびに、これらのアデノウイルスベクターを用いて免疫原性応答を誘起する方法に関する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

組換えアデノウイルスベクターであって、配列番号1の配列を含む第一のアデノウイルス性配列、プロモーター配列、MCS、転写ターミネーター、配列番号2の配列を含む第二のアデノウイルス性配列、配列番号4の配列を含む第三のアデノウイルス性配列、細菌の複製起点ならびに抗生物質耐性遺伝子を包含し、配列番号2および配列番号4の配列は、原核細胞内で組換えアデノウイルス性シャトルプラスミドとアデノウイルス性骨格プラスミドとの間の相同組換えを起こさせさらにパッケージング細胞内でRCA不含Adベクターを産生できる組換えプラスミドを生成させる配列を含むことを特徴とする、組換えアデノウイルスベクター。

10

**【請求項 2】**

前記プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)主要前初期プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、-アクチンプロモーター、アルブミンプロモーター、伸長因子1-(EF1-)プロモーター、PKプロモーター、MFGプロモーターおよびラウス肉腫ウイルスプロモーターより成る群から選択されることを特徴とする請求項1記載の組換えアデノウイルスベクター。

**【請求項 3】**

前記転写ターミネーターは、SV40ポリアデニル化シグナルを含む真核細胞性ポリアデニル化シグナルであることを特徴とする請求項1記載の組換えアデノウイルスベクター。

**【請求項 4】**

前記細菌の複製起点は、PBR322の複製起点に由来することを特徴とする請求項1記載の組換えアデノウイルスベクター。

20

**【請求項 5】**

前記抗生物質耐性遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子およびゼオシン耐性遺伝子より成る群から選択されることを特徴とする請求項1記載の組換えアデノウイルスベクター。

**【請求項 6】**

前記原核細胞は大腸菌(E.coli)であることを特徴とする請求項1記載の組換えアデノウイルスベクター。

30

**【請求項 7】**

前記大腸菌(E.coli)はBJ5183株であることを特徴とする請求項6記載の組換えアデノウイルスベクター。

**【請求項 8】**

前記ベクターはpAdHighであることを特徴とする請求項1記載の組換えアデノウイルスベクター。

**【請求項 9】**

組換えアデノウイルスベクターであって、アデノウイルス血清型5型由来の1~454番の配列を含む第一のアデノウイルス性配列、プロモーター配列、ポリリンカー、転写ターミネーター、アデノウイルス血清型5型由来の3511~5796番の配列を含む第二のアデノウイルス性配列、34931~35935番の配列を含む第三のアデノウイルス性配列、細菌の複製起点、ならびに抗生物質耐性遺伝子を包含し、該第二および第三のアデノウイルス性配列は、原核細胞内で組換えアデノウイルス性シャトルプラスミドとアデノウイルス性骨格プラスミドとの間で相同組換えを起こせる配列を含むことを特徴とする、組換えアデノウイルスベクター。

40

**【請求項 10】**

前記プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)主要前初期プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、-アクチンプロモーター、アルブミンプロモーター、伸長因子1-(EF1-)プロモーター、PKプロモーター、MFGプロモーターおよびラウス肉腫ウイルスプロモーターより成る群から選択されることを特徴とする請求項9記

50

載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 1 1】

前記転写ターミネーターは、SV40ポリアデニル化シグナルを含む真核細胞性ポリアデニル化シグナルであることを特徴とする請求項 9 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 1 2】

前記細菌の複製起点は、pBR322の複製起点に由来することを特徴とする請求項 9 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 1 3】

前記抗生物質耐性遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子およびゼオシン耐性遺伝子より成る群から選択されることを特徴とする請求項 9 記載の組換えアデノウイルスベクター。

10

【請求項 1 4】

前記原核細胞は大腸菌 (E.coli) であることを特徴とする請求項 9 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 1 5】

前記大腸菌 (E.coli) はBJ5183株であることを特徴とする請求項 1 4 記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 1 6】

前記ベクターはpAdHighであることを特徴とする請求項 9 記載の組換えアデノウイルスベクター。

20

【請求項 1 7】

複製コンピテントアデノウイルス (RCA) を実質的に含まない組換えアデノウイルスの作成法であって：

a. 原核細胞内に第一のシャトルプラスミドと第二のシャトルプラスミドとを同時形質転換し、このとき、該第一のシャトルプラスミドは第一のアデノウイルス性配列および第一の抗生物質耐性遺伝子を包含し；該第二のシャトルプラスミドは、第一のシャトルプラスミド中に存在しない別のアデノウイルス性配列を含む第二のアデノウイルス性配列および第一の抗生物質耐性遺伝子とは別異の第二の抗生物質耐性遺伝子を包含しており、ここで、同時形質転換により、該第一および第二のシャトルプラスミド間で相同組換えが生じ、さらに、該第一および第二のシャトルプラスミド内の抗生物質耐性遺伝子を両者とも発現する原核細胞性形質転換体は、第一の組換えアデノウイルス性プラスミドを包含しており；

30

b. 前記原核細胞から前記第一の組換えアデノウイルス性プラスミドを回収し；

c. 前記第一の組換えアデノウイルス性プラスミドおよびアデノウイルス性骨格配列を別の原核細胞内に同時形質転換し、ここで、該原核細胞性形質転換体は、第二の組換えアデノウイルス性プラスミドを包含しており；

40

d. 前記原核細胞から前記第二の組換えアデノウイルス性プラスミドを回収し；

e. 前記第二の組換えアデノウイルス性プラスミドを用いてPER.C6パッケージング細胞にトランスフェクトし；

f. PER.C6細胞から組換えアデノウイルスを回収し、このとき、該組換えアデノウイルスは実質的にRCAを含んでいない

工程を含むことを特徴とする作成法。

【請求項 1 8】

前記第一のシャトルプラスミドがpShuttle-CMVであることを特徴とする請求項 1 7 記載の作成法。

【請求項 1 9】

前記第二のシャトルプラスミドがpAdApt-Tcであることを特徴とする請求項 1 7 記載の作成法。

【請求項 2 0】

50

前記抗生物質耐性遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子およびゼオシン耐性遺伝子より成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 7 載の作成法。

【請求項 2 1】

pShuttle-CMV内には存在しない別のアデノウイルス性配列は、アデノウイルス血清型5型由来の342～454番のアデノウイルス性配列、およびアデノウイルス血清型5型由来の3511～3533番のアデノウイルス性配列を含むことを特徴とする請求項 1 7 記載の作成法。

【請求項 2 2】

前記アデノウイルス性骨格プラスミドがpAdEasy1 であることを特徴とする請求項 1 7 記載の作成法。 10

【請求項 2 3】

前記原核細胞が大腸菌 (E.coli) であることを特徴とする請求項 1 7 記載の作成法。

【請求項 2 4】

前記大腸菌 (E.coli) がBJ5183株であることを特徴とする請求項 2 3 記載の作成法。

【請求項 2 5】

請求項 1 7 記載の作成法に従って作成された組換えアデノウイルス性ベクター。

【請求項 2 6】

請求項 1 7 記載の作成法に従って作成された組換えアデノウイルス。

【請求項 2 7】

複製コンビテントアデノウイルス (RCA) を実質的に含まない組換えアデノウイルスの作成法であって：

a. 1つもしくはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて第一および第二のシャトルプラスミドを消化し、このとき、該第一のシャトルプラスミドは第一のアデノウイルス性配列を包含し；該第二のシャトルプラスミドは、第一のシャトルプラスミド中に存在しない別のアデノウイルス性配列を包含し；

b. 前記第二のシャトルプラスミドから前記の別のアデノウイルス性配列を含むフラグメントを切り出し；

c. 前記の別のアデノウイルス性配列を含むフラグメントを前記第一のシャトルプラスミドに連結させて対フラグメントを置換して、第一の組換えアデノウイルス性プラスミドを得て； 30

d. 前記第一の組換えアデノウイルス性プラスミドおよびアデノウイルス性骨格プラスミドを別の原核細胞に同時形質転換し、ここで、原核細胞性形質転換体は第二の組換えアデノウイルス性プラスミドを包含しており；

e. 前記原核細胞から第二の組換えアデノウイルス性プラスミドを回収し；

f. 前記第二の組換えアデノウイルス性プラスミドをPER.C6パッケージング細胞にトランスフェクトし；さらに、

g. 細胞から組換えアデノウイルスを回収し、このとき、該組換えアデノウイルスは実質的にRCAを含まない；

工程を含むことを特徴とする作成法。 40

【請求項 2 8】

前記第一のシャトルプラスミドがpShuttle-CMVであることを特徴とする請求項 2 7 記載の作成法。

【請求項 2 9】

前記第二のシャトルプラスミドがpAdAptであることを特徴とする請求項 2 7 記載の作成法。

【請求項 3 0】

前記抗生物質耐性遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子およびゼオシン耐性遺伝子より成る群から選択されることを 50

特徴とする請求項 2 7 記載の作成法。

【請求項 3 1】

pShuttle-CMV内には存在しない別のアデノウイルス性配列は、アデノウイルス血清型5型由来の342～454番のアデノウイルス性配列、およびアデノウイルス血清型5型由来の351～3533番のアデノウイルス性配列を含むことを特徴とする請求項 2 7 記載の作成法。

【請求項 3 2】

前記アデノウイルス性骨格プラスミドがpAdEasy1 であることを特徴とする請求項 2 7 記載の作成法。

【請求項 3 3】

前記原核細胞が大腸菌 (E.coli) であることを特徴とする請求項 2 7 記載の作成法。

10

【請求項 3 4】

前記大腸菌 (E.coli) がBJ5183株であることを特徴とする請求項 3 3 記載の作成法。

【請求項 3 5】

請求項 2 7 記載の作成法に従って作成された組換えアデノウイルス性ベクター。

【請求項 3 6】

請求項 2 7 記載の作成法に従って作成された組換えアデノウイルス。

【請求項 3 7】

複製コンピテントアデノウイルス (RCA) を実質的に含まずかつ1つもしくはそれ以上の目的の異種核酸を発現する組換えアデノウイルスを、薬剤学的に許容される賦形剤と混合して含有する免疫原性組成物。

20

【請求項 3 8】

RCAを実質的に含まないアデノウイルスが、アデノウイルス血清型5型 (Ad5) であることを特徴とする請求項 3 7 記載の組成物。

【請求項 3 9】

RCAを実質的に含まないアデノウイルスは、請求項 1 7 記載の作成法に従って作成されたものであることを特徴とする請求項 3 7 記載の組成物。

【請求項 4 0】

RCAを実質的に含まないアデノウイルスは、請求項 2 7 記載の作成法に従って作成されたものであることを特徴とする請求項 3 7 記載の組成物。

30

【請求項 4 1】

1つもしくはそれ以上の目的の異種核酸は、インフルエンザA、インフルエンザB、インフルエンザC、循環組換え体、ハイブリッド型、臨床単離株および野生単離株を含むインフルエンザ株由来のインフルエンザ遺伝子を含むことを特徴とする請求項 3 7 記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記インフルエンザ遺伝子は、インフルエンザ血球凝集素遺伝子、インフルエンザマトリックス遺伝子、インフルエンザノイラミニダーゼ遺伝子およびインフルエンザ核タンパク質遺伝子を含むことを特徴とする請求項 4 1 記載の組成物。

【請求項 4 3】

アジュバントをさらに含有することを特徴とする請求項 3 7 記載の組成物。

40

【請求項 4 4】

複製コンピテントアデノウイルス (RCA) を実質的に含まずかつ1つもしくはそれ以上のインフルエンザ免疫原を発現する組換えアデノウイルスを、薬剤学的に許容される賦形剤と混合して含有する免疫原性組成物。

【請求項 4 5】

RCAを実質的に含まないアデノウイルスが、アデノウイルス血清型5型 (Ad5) であることを特徴とする請求項 4 4 記載の組成物。

【請求項 4 6】

RCAを実質的に含まないアデノウイルスは、請求項 1 7 記載の作成法に従って作成されたものであることを特徴とする請求項 4 4 記載の組成物。

50

**【請求項 4 7】**

RCAを実質的に含まないアデノウイルスは、請求項27記載の作成法に従って作成されたものであることを特徴とする請求項44記載の組成物。

**【請求項 4 8】**

1つもしくはそれ以上の前記インフルエンザ免疫原は、インフルエンザ赤血球凝集遺伝子、インフルエンザマトリックス遺伝子、インフルエンザノイラミニダーゼ遺伝子およびインフルエンザ核タンパク質遺伝子を含むことを特徴とする請求項44記載の組成物。

**【請求項 4 9】**

1つもしくはそれ以上の前記インフルエンザ免疫原は、インフルエンザA、インフルエンザB、インフルエンザC、循環組換え体、ハイブリッド型、臨床単離株および野生単離株を含むインフルエンザ株由来であることを特徴とする請求項44記載の組成物。

10

**【請求項 5 0】**

アジュバントをさらに含有することを特徴とする請求項44記載の組成物。

**【請求項 5 1】**

RCAを実質的に含まない組換えアデノウイルス内で1つもしくはそれ以上の異種核酸を発現させる方法であって：

a. 1つもしくはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて請求項1、9、25または35記載の組換えアデノウイルス性ベクターを消化することによってそれらのアデノウイルス性ベクターを直線化し；

b. 1つもしくはそれ以上の異種核酸を前記アデノウイルス性ベクター内に連結させるが、このとき、1つもしくはそれ以上の該異種核酸は、機能発揮できるようにプロモーターに連結されており；

c. 該アデノウイルス性ベクターを哺乳類パッケージング細胞内にトランスフェクトし；さらに、

d. 1つもしくはそれ以上の異種核酸を発現する組換えアデノウイルスを該哺乳類パッケージング細胞から回収する

工程を含むことを特徴とする方法。

20

**【請求項 5 2】**

前記アデノウイルスは、アデノウイルス血清型5型(Ad5)由来であることを特徴とする請求項51記載の方法。

30

**【請求項 5 3】**

1つもしくはそれ以上の前記異種核酸がインフルエンザ遺伝子を含むことを特徴とする請求項51記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記プロモーター配列は、サイトメガロウイルス(CMV)主要前初期プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、-アクチンプロモーター、アルブミンプロモーター、伸長因子1- (EF1-)プロモーター、P Kプロモーター、MFGプロモーター、ヘルペスウイルスプロモーターおよびラウス肉腫ウイルスプロモーターより成る群から選択されることを特徴とする請求項51記載の方法。

40

**【請求項 5 5】**

前記インフルエンザ遺伝子は、インフルエンザ赤血球凝集素遺伝子、インフルエンザマトリックス遺伝子、インフルエンザノイラミニダーゼ遺伝子およびインフルエンザ核タンパク質遺伝子を含むことを特徴とする請求項53記載の方法。

**【請求項 5 6】**

前記インフルエンザ遺伝子は、インフルエンザA、インフルエンザB、インフルエンザC、循環組換え体、ハイブリッド型、臨床単離株および野生単離株を含むインフルエンザ株由来であることを特徴とする請求項53記載の方法。

**【請求項 5 7】**

インフルエンザへの免疫応答を必要とする対象において免疫応答を誘起する方法であって、免疫学的に有効な量の請求項44記載の組成物を対象に投与することを特

50

徴とする方法。

【請求項 5 8】

前記インフルエンザ免疫原は、インフルエンザ赤血球凝集素、インフルエンザマトリックス、インフルエンザノイラミニダーゼおよびインフルエンザ核タンパク質を含むことを特徴とする請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 5 9】

前記インフルエンザ免疫原は、インフルエンザA、インフルエンザB、インフルエンザC、循環組換え体、ハイブリッド型、臨床単離株および野生単離株を含むインフルエンザ株由来であることを特徴とする請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 6 0】

前記組成物がアジュバントをさらに含有することを特徴とする請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 6 1】

目的の細胞内に1つもしくはそれ以上の異種核酸を導入し発現させる方法であって、複製コンピテントアデノウイルス(RCA)を実質的に含まない組換えアデノウイルスであって1つもしくはそれ以上の異種核酸を発現するものを細胞と接触させ、さらに、1つもしくはそれ以上の該異種核酸を発現するのに十分な条件下において、細胞を培養したまたは動物を飼育することを特徴とする方法。

【請求項 6 2】

前記細胞はヒト細胞であることを特徴とする請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 3】

前記アデノウイルスは、アデノウイルス血清型5型(Ad5)由来であることを特徴とする請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 4】

1つもしくはそれ以上の前記異種核酸がインフルエンザ遺伝子を含むことを特徴とする請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 5】

前記インフルエンザ遺伝子は、インフルエンザ赤血球凝集素遺伝子、インフルエンザマトリックス遺伝子、インフルエンザノイラミニダーゼ遺伝子およびインフルエンザ核タンパク質遺伝子を含むことを特徴とする請求項 6 1 記載の方法物。

【請求項 6 6】

前記インフルエンザ遺伝子は、インフルエンザA、インフルエンザB、インフルエンザC、循環組換え体、ハイブリッド型、臨床単離株および野生単離株を含むインフルエンザ株由来であることを特徴とする請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 7】

請求項 1 記載の組換えアデノウイルスベクター、アデノウイルス骨格プラスミドおよび大腸菌(E.coli)BJ5183細胞を含むキット。

【請求項 6 8】

前記組換えアデノウイルス性シャトルベクターは、pAdHighまたはその誘導体であることを特徴とする請求項 6 7 記載のキット。

【請求項 6 9】

前記アデノウイルス骨格プラスミドはpAdEasy1であることを特徴とする請求項 6 7 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2005年5月23日に受理された米国特許仮出願第60/683,638号について優先権を主張する。

【0 0 0 2】

さらに、2002年1月18日に受理された米国特許出願第10/052,323号、2002年4月5日に受

10

20

30

40

50

理された米国特許出願第10/116,963号、2003年1月16日に受理された米国特許出願第10/346,02号、ならびに、米国特許第6,706,693号、第6,716,823号、第6,348,450号、および1998年8月13日に受理されたPCT/US/98/16739号についても挙げておく。

### 【0003】

これらの出願、特許および本明細書中に引用している各文献、ならびにこれらの出願、特許および文献のそれぞれにおいて引用されている各文献（「出願引用文献」）、ならびに、それらの出願および特許の文書中または実施中において出願引用文献中で参照もしくは引用されている各文献、さらに、それらの実施中において特許取得性を高めるための全ての議論も参照として本明細書中に取り入れておく。

### 【0004】

一般的に、本発明は、免疫学、遺伝子治療およびワクチン技術の分野に関する。より詳しく述べると、本発明は、複製コンピテントアデノウイルス（RCA）を含まない、高力価のアデノウイルスベクターを迅速に作成できる新規な系に関する。また、本発明は、これらのRCA不含アデノウイルス性ベクター、これらのRCA不含アデノウイルスベクターを含む免疫原性もしくはワクチン組成物の調製法、これらのアデノウイルスベクター内で目的の異種核酸を発現させる方法、ならびに、これらのアデノウイルスベクターを用いて免疫原性応答を誘起する方法を提供する。

### 【背景技術】

### 【0005】

インフルエンザウイルスは、公衆衛生に対する再興性かつ突発性の脅威である。ウイルスの気道への感染には、通常、咳、発熱および筋肉痛を伴う。致死性インフルエンザ株の出現（非特許文献1）およびデザイナーインフルエンザウイルスの作出を可能にする技術の開発（非特許文献2；非特許文献3）の結果、致死性の武器または無力化剤として、強毒性インフルエンザ株または人為的に故意に外来性毒素をコードさせた人工ウイルスが流布することにより、ある地域が壊滅的な被害を被るという警告が発せられた。現在使用可能な、臨床承認を受けているインフルエンザワクチンは、3種の不活化ウイルスを含んでおり、1940年代初期から筋肉内注射用として用いられているものである（非特許文献4）。これらのワクチンを用いて毎年秋にワクチン接種を行うことにより、人類は、この接触感染症から効果的に保護されている（非特許文献5）。しかしながら、ワクチンの製造には、発育鶏卵を必要とすることから、ワクチンの製造速度には限界がある。新規なインフルエンザウイルス株が予測を超えて出現し、鳥インフルエンザによって養鶏場が壊滅状態に陥った場合、および／または、2004年に起こったように、製造設備に雑菌が混入した場合には、インフルエンザワクチンの不足が想定される。

### 【0006】

さらに最近では、インフルエンザワクチン接種に代わり、注射以外の投与法で使用する弱毒生インフルエンザウイルスワクチン（FluMist（商標））が開発されている（非特許文献6）。弱毒生ワクチンは鼻内スプレーを用いて気道に直接投与することにより、健康な小児、青年および成人（5～49歳）へのインフルエンザ感染を防ぐ。不活化インフルエンザウイルスワクチンと同様に、弱毒生ワクチンも発育鶏卵内で製造する。鶏卵内に鶏病原菌が存在していても、ホルムアルデヒド殺菌ウイルスワクチンでは問題にならないが、弱毒生ワクチンに対しては生物学的危険がある。弱毒生インフルエンザウイルスと野生のインフルエンザウイルスとの間の組換えによって毒性を持った再集合体が生成される可能性は、新たな生物学的危険に関する疑念を生み出す。弱毒生ワクチンの鼻内接種については、鼻水、のどの痛みまたは微熱などのような緩和な副作用を伴う。さらに、弱毒生ウイルスは、複製中に上気道の上皮細胞を破壊し、肺合併症を伴う二次感染を引き起こす可能性がある（非特許文献6；非特許文献7）。

### 【0007】

弱毒生および不活化インフルエンザワクチンの製造を発育鶏卵中で行う必要があることは、合理化された製造に対する大きな障害である。なぜならば、そのような過程は時間の浪費であり、ある種のインフルエンザウイルス株は鶏卵中では十分に増殖しないからであ

10

20

30

40

50

る（非特許文献8）。アデノウイルス（Ad）をベクターとするインフルエンザワクチンをヒトに鼻内および局所投与することにより、効果的かつ安全に免疫できたという結果（非特許文献8）から、発育鶏卵を用いずに、インフルエンザワクチンを用時製造するための新規な方法が示された。

#### 【0008】

アデノウイルスは、ワクチンキャリヤーとして優れている。その理由は、Adベクターは、イン・サイチュー（*in situ*）において、有糸核分裂細胞および有糸核分裂後の細胞に形質導入でき（非特許文献9）、高ウイルス力価（10<sup>11</sup>pfu/ml以上）の株を調製でき、イン・サイチュー（*in situ*）において、感染多重度（MOI）が高い形質導入細胞が得られることである。さらに、Adベクターは、ワクチンとして長期間使用されてきた実績に基づき、安全である。ウイルスは、異種核酸の高レベル発現を誘導でき、ベクターは、多対応性のものを大量に作出できる。経鼻ワクチンキャリヤーとしてのE1/E3-欠損Ad5ベクターの能力は、動物モデル内に事前に存在していたAd5に対するいかなる免疫によっても抑制されなかつたという結果が示されている（非特許文献10；非特許文献11）。Ad5をベクターとする経鼻インフルエンザワクチンの力価と、ヒト体内に存在する抗Ad5中和抗体との間にも相関はない（非特許文献8）。遺伝子治療とは異なり、Adをベクターとするワクチンは、異種核酸発現の臨界レベルを要することなく、免疫反応カスケードを介して免疫応答を誘発する。複製欠損Adをベクターとする経鼻インフルエンザワクチンは、FluMist（商標）よりも安全なはずである。なぜならば、後者は気道中で複製し、その他の循環株もしくは組換え体との遺伝子再配列を経て新規なインフルエンザウイルス株の作出に寄与する可能性があるからである。さらに、Adをベクターとするインフルエンザワクチンの製造は、発育鶏卵を必要としない合理化された方法で行うことができる。

10

20

30

#### 【0009】

複製欠損組換えAdベクターの構築に対して従来から行われていた方法では、哺乳類パッケージング細胞中、トランスフェクトされた2つのプラスミド間で相同組換えを行うことを含む、長時間かつ労力を要する一連の段階を必要とする（非特許文献12）。相同組換えは大腸菌（*E.coli*）中において可能であるという発見（非特許文献13；非特許文献14）により、組換えは細菌細胞中で一晩で行えるようになり、ブラーク精製が不要になり、製造過程が合理化された。AdEasy系（非特許文献14）は、図6に示すように、大腸菌（*E.coli*）中で相同組換えを行うことによって組換えAdを作出するための手っ取り早い方法の一例である。一般的には、カナマイシン（Kan）耐性をコードしている直線シャトルベクタープラスミドをアデノウイルス由来の骨格プラスミド（例えば、pAdEasy1など）（ここで、該骨格プラスミドはアンピシリン（Amp）耐性をコードしている）と混合し、さらに、コンピテント*E.coli* BJ5183細胞に同時形質転換する。次に、組換え体は、Kan耐性に対して選択を行い、制限エンドヌクレアーゼ分析と合わせて分子量によって確認した。最後に、哺乳類パッケージング細胞系（例えば、293細胞など）に組換えプラスミドをトランスフェクトさせることにより、組換えAdベクターを作出した。

#### 【0010】

AdEasy系を用いて大腸菌（*E.coli*）内で組換えベクター產生を行う場合の重要な段階は、Ad骨格プラスミドをあらかじめ選択することによって高めることができ、その後、シャトルベクタープラスミドへ輸送する（非特許文献15）。pAdEasyプラスミドプールの中で、形質転換後に大腸菌（*E.coli*）細胞内で生き残ることができるのはわずかなフラクションに過ぎないと考えられるが、これは、大きなプラスミド（pAdEasy1プラスミドの大きさは33kbである（非特許文献14））は、その長いDNA鎖にニックができるなどによって損傷を受ける可能性が高いからであり、ならびに／または、大きなプラスミドが細胞複製機構に接続する効率は低いと考えられるからである。従って、大腸菌（*E.coli*）細胞内ではレプリコンとして存在できないAd骨格プラスミドとシャトルベクタープラスミドとの間の相同組換えは、選択可能な組換えプラスミド生成を妨げるものであり、なぜならば、そのような組換え体は得られないからである。2段階AdEasier系（非特許文献15）を用いることにより、損傷があり、非複製性のAd骨格プラスミドを先に排除してから生産的方法で

40

50

相同組換えを行えるようになり、それによって組換え体の選択過程における成功率が高まった(AdEasy(商標)XLアデノウイルス性ベクター系;非特許文献16)。全体的に見ると、この2段階形質転換プロトコールは、細菌内での相同組換えを含む広範な用途があると考えられる。

【0011】

ヒトの293細胞において產生させたE1欠損Adベクターに関する最重要課題は、複製コンピテントアデノウイルス(RCA)の出現である。このような混入物は、293細胞によって表示されるE1部位を規定している同一配列とベクター骨格との間の相同組換えを介して生じる(非特許文献17;非特許文献18)。RCAは、野生型Adと同様に、感染宿主内で複製でき、疾病を引き起こす可能性があることから、生物学的に危険だと見なされている。RCA不含Adベクターは、pAdAptなどのPER.C6-相互性シャトルプラスミドを用い、PER.C6細胞内で產生されている(非特許文献19)。PER.C6ゲノム中のAd5ヌクレオチド(ヌクレオチド番号459~3510)は、pAdAptに基づくシャトルプラスミド(Crucell)との二重交差型相同組換えをあらかじめ含んでおり、該シャトルプラスミドは、重複配列を全く含んでいない。Ad株からRCAを排除することにより、癌遺伝子となりうるE1a、および宿主内でAdが複製することによって誘導される病因への暴露の危険性が低下する。

10

【0012】

しかしながら、PER.C6-制御性pAdAptに基づくシャトルプラスミドを使用することでは、pAdEasy1を用いた大腸菌(E.coli)内での相同組換えは行えない。その理由は、「左腕」のアデノウイルス性配列が消失しているからである。PER.C6細胞内にpAdAptとAd骨格プラスミドとを同時トランスフェクトすることによって行う組換えAdベクターの作成(非特許文献19)は、長い時間と労力を要する。一般的には、大腸菌(E.coli)細胞内で起こる相同組換えを利用したAdEasy系を用い、2~3サイクルのラーク精製を省略することにより、新規なAdベクターの構築に要する時間を1~2ヶ月短縮できる。

20

【0013】

結論として、好ましくはアデノウイルス性ベクター系を用い、安全なインフルエンザワクチンを迅速に製造することが望まれている。しかしながら、現在のアデノウイルス性ベクター、特に293細胞などのヒト細胞から生成されたベクターは、基本的には、RCA調製段階において疾病のリスクを有している。本発明は、アデノウイルスに基づくワクチンもしくは免疫原性組成物を迅速に調製するための新規の系を提供することによってこれらの問題を解決に導くが、そのようなワクチンもしくは免疫原性組成物は、安全性を高めるという利点も備えている。

30

【非特許文献1】スバラオ(Subbarao)ら、1998年

【非特許文献2】ホフマン(Hoffmann)ら、2002年

【非特許文献3】ニューマン(Neumann)ら、1999年

【非特許文献4】フレイデア(Pfleidere)ら、2001年

【非特許文献5】ニコル(Nichol)ら、1995年

【非特許文献6】ヒルマン(Hilleman)、2002年

【非特許文献7】マーウィック(Marwick)、2000年

40

【非特許文献8】ヴァン・カンベン(Van Kampen)ら、2005年

【非特許文献9】シー(Shi)ら、1999年

【非特許文献10】シー(Shi)ら、2001年

【非特許文献11】シャン(Xiang)ら、1996年

【非特許文献12】グラハム(Graham)およびプレヴェック(Prevec)、1995年

【非特許文献13】チャーティール(Chartier)ら、1996年

【非特許文献14】ヒー(He)ら、1998年

【非特許文献15】ゼン(Zeng)ら、2001年

【非特許文献16】Strategies15(3):58-59,2002

【非特許文献17】ロバート(Robert)ら、2001年

【非特許文献18】ツー(Zhu)ら、1999年

50

【非特許文献 19】ファロー (Fallaux) ら、1998年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

インフルエンザワクチン調製のための迅速な製造系は、毎年起こるインフルエンザの流行との戦いにおいて、長年求められていたものである。致死性インフルエンザ株の出現 (スバラオ (Subbarao) ら、1998年) および生物兵器として使用されるデザイナーインフルエンザウイルス (designer influenza viruses) の可能性 (ホフマン (Hoffmann) ら、2002年; ニューマン (Neumann) ら、1999年) などから、インフルエンザワクチンの迅速製造に関し、新規な技術開発の緊急性が強調されている。本発明は、なかでも、新規なアデノウイルス性ベクター、および異種核酸 (適時のインフルエンザ抗原などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない) をコードしているRCA (複製コンピテントアデノウイルス) 不含Adベクターを作出することによって高力価ワクチンを調製する方法を提供することにより、当該分野におけるこのような問題を解決するものである。該方法は、発育鶏卵中でのインフルエンザウイルス増殖を必要とせず (ヴァン・カンペン (Van Kampen) ら、2005年)、経鼻スプレーによる非複製インフルエンザワクチン投与を促進し (シー (Shi) ら、2001年; ヴァン・カンペン (Van Kampen) ら、2005年)、さらに、製造に要する時間および費用を削減する。

10

【課題を解決するための手段】

【0015】

20

本発明の第一の側面においては、組換えアデノウイルス性ベクターを調製するが、該ベクターは、配列番号1を含む第一のアデノウイルス性配列、プロモーター配列、複クローニング部位 (multiple cloning site: MCS) 、転写ターミネーター、配列番号2を含む第二のアデノウイルス性配列、配列番号4を含む第三のアデノウイルス性配列を含んでおり、このとき、配列番号2と配列番号4は、原核細胞内において組換えアデノウイルス性シャトルプラスミドとアデノウイルス性骨格プラスミドとの間で相同組換えを生じさせる重複配列を含む。

【0016】

30

1つの実施態様においては、プロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) 主要前初期プロモーター、シミアンウイルス40 (SV40) プロモーター、- アクチンプロモーター、アルブミンプロモーター、伸長因子1- (EF1-) プロモーター、P Kプロモーター、MFGプロモーター、ヘルペスウイルスプロモーター、ルイス肉腫ウイルスプロモーター、またはその他任意の真核細胞性プロモーターなどより成る群から選択される。

【0017】

40

転写ターミネーターは、SV40ポリアデニル化シグナルまたはその他任意の真核細胞性ポリアデニル化シグナルを用いることができる。細菌の複製起点としては、pBR322の複製起点由来のものを用いることができる。別の実施態様においては、アデノウイルス性シャトルプラスミドおよび骨格プラスミド内の抗生物質耐性遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子およびゼオシン耐性遺伝子より成る群から選択される。原核細胞は、大腸菌 (E.coli) 、好ましくはE.coli BJ5183細胞を用いることができる。

好みの実施態様においては、アデノウイルス性シャトルベクターはpAdHighであり、これは、アデノウイルス血清型5型由来の1~454番の配列を含む第一のアデノウイルス性配列、プロモーター配列、MCS、転写ターミネーター、pIXプロモーターを有するアデノウイルス血清型5型由来の3511~6055番の配列を含む第二のアデノウイルス性配列、細菌の複製起点および抗生物質耐性遺伝子を含んでおり、ここで、第一および第二のアデノウイルス性配列は、原核細胞内において組換えアデノウイルス性シャトルプラスミドとアデノウイルス性骨格プラスミドとの間で相同組換えを起こさせる配列を含む。

【0018】

50

別の側面からみると、本発明は、複製コンピテントアデノウイルス（RCA）を実質的に含まない組換えアデノウイルスを作出する方法に関し、これは、原核細胞内に第一のシャトルプラスミドと第二のシャトルプラスミドとを同時形質転換させる過程を含み、ここで、該第一のシャトルプラスミドは、第一のアデノウイルス性配列と第一の抗生物質耐性遺伝子を有し、該第二のシャトルプラスミドは、第一のシャトルプラスミド内に存在していないアデノウイルス性配列を含む第二のアデノウイルス性配列および第一の抗生物質耐性遺伝子とは異なる第二の抗生物質耐性遺伝子を含み、同時形質転換によって第一および第二のシャトルプラスミド間で相同組換えが起こり、さらに、該原核細胞性形質転換体は、最初に組み換えられたアデノウイルス性シャトルプラスミドを含む第一および第二のシャトルプラスミド内の両方の抗生物質耐性遺伝子を発現し；最初に組み換えられたアデノウイルス性シャトルプラスミド（pAdHigh<sub>10</sub>）を該原核細胞から回収し；大腸菌（E.coli BJ5183）などの原核細胞にAdHighシャトルプラスミドおよびアデノウイルス性骨格プラスミドを同時形質転換し、このとき、原核細胞性形質転換体は導入遺伝子をコードしている二番目に組み換えられたアデノウイルス性プラスミドを產生し；該原核細胞から二番目に組み換えられたアデノウイルス性プラスミドを回収し；二番目に組み換えられた該アデノウイルス性プラスミドをPER.C6細胞にトランスフェクトし；さらに、該PER.C6細胞から組換えアデノウイルスを回収するが、このとき、該組換えアデノウイルスはRCAを実質的に含まない。

## 【0019】

Ad5配列（459～3510番）を含む別の細胞も、AdHighシャトルプラスミドを用いてRCA不含Adベクターを作出するためのパッケージング細胞系として使用できる。<sub>20</sub>

## 【0020】

pAdHighシャトルプラスミド作出の1つの実施態様においては、第一のシャトルプラスミドはpShuttle-CMVである。別の実施態様においては、第二のシャトルプラスミドはpAdAptである（ハヴエンガ（Havenga）, M.J.ら、2001年；ファン・デル・トゥーセン（von der Thuesen）, J.H.ら、2004年）。

## 【0021】

pAdHigh中にはさらにアデノウイルス性配列が存在するが、pShuttle-CMV中では消失しており（ヒー（He）ら、1998年）、後者は、アデノウイルス血清型5型のアデノウイルス性ヌクレオチド342番～454番およびアデノウイルス血清型5型のアデノウイルス性ヌクレオチド3511～3533番を含んでいる。ヌクレオチド3511～3533番の間のセグメントは、アデノウイルス性pIXプロモーターの一部である。機能性pIXプロモーターの欠失により、AdEas系が293細胞内では高力価のAdを產生するが、PER.C6細胞内では產生できないことが説明できる。前者はpIXを発現するが、後者は発現しないのである。<sub>30</sub>

## 【0022】

原核細胞は大腸菌（E.coli）、好ましくはE.coli BJ5183である。

## 【0023】

本発明を別の側面からみると、複製コンピテントアデノウイルス（RCA）を実質的に含まない組換えアデノウイルスの作出法に関し、その方法は、第一および第二のシャトルプラスミドを1つもしくはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、ここで、該第一のシャトルプラスミドは第一のアデノウイルス性配列を有し、該第二のシャトルプラスミドは、該第一のシャトルプラスミド内に存在しない別のアデノウイルス性配列を有し；該第二のシャトルプラスミドから別のアデノウイルス性配列を含むフラグメントを切り出し；該フラグメントを第一のシャトルプラスミド内の適切な部位に挿入することにより、第一のシャトルプラスミドの対フラグメントと置換し、それによって遺伝子欠失（例えば、pIXプロモーター欠失など）が修復された第一の組換えアデノウイルス性プラスミドが得られ；該第一の組換えアデノウイルス性シャトルプラスミド（pAdHigh<sub>40</sub>）およびアデノウイルス性骨格プラスミドとを原核細胞に同時形質転換し、このとき、原核細胞性形質転換体は第二の組換えアデノウイルス性プラスミドを產生し；該原核細胞から該第二の組換えアデノウイルス性プラスミドを回収し；該第二の組換えアデノウイルス性プラスミドをPE

10

20

30

40

50

R.C6細胞にトランスフェクトし；該細胞から組換えアデノウイルスを回収するが、このとき、該組換えアデノウイルスはRCAを実質的に含まない。

【0024】

また、本発明は免疫学的組成物に関し、そのような組成物は、複製コンピテントアデノウイルス(RCA)を実質的に含まず、1つもしくはそれ以上の目的の異種核酸を発現する組換えアデノウイルスを薬剤学的に許容される賦形剤にあらかじめ混合した状態で含む。

【0025】

1つの実施態様においては、1つもしくはそれ以上の目的の異種核酸は、インフルエンザA型、インフルエンザB型、インフルエンザC型、循環組換え型、ハイブリッド型、臨床単離体、および野外単離体を含むインフルエンザ株由来のインフルエンザ遺伝子を有する。インフルエンザ遺伝子は、インフルエンザ赤赤血球凝集素、インフルエンザマトリックス遺伝子、インフルエンザノイラミナダーゼおよびインフルエンザ核タンパク質遺伝子を含む。免疫原性組成物は、アジュバントをさらに含む場合がある。

10

【0026】

本発明を別の側面からみると、組換えアデノウイルスの調製法に関し、該組換えアデノウイルスは、複製コンピテントアデノウイルス(RCA)を実質的に含まず、1つもしくはそれ以上のインフルエンザ免疫原を発現し、薬剤学的に許容される賦形剤にあらかじめ混合した状態である。

【0027】

本発明を別の側面からみると、複製コンピテントアデノウイルス(RCA)を実質的に含まない組換えアデノウイルス内において、1つもしくはそれ以上の目的の異種核酸を発現させる方法に関し、そのような方法は、1つもしくはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで本発明に従うアデノウイルス性ベクターDNAを消化することによって該アデノウイルス性ベクターを直線化し；1つもしくはそれ以上の異種核酸を該アデノウイルス性ベクターに連結するが、このとき、該1つもしくはそれ以上の異種核酸は、機能発揮できるようにプロモーター配列に結合させ；該アデノウイルス性ベクターDNAをPER.C6またはその他のパッケージング細胞内にトランスフェクトし；該細胞から、1つもしくはそれ以上の目的の異種核酸を発現する組換えアデノウイルスを回収する段階を含む。

20

【0028】

また、本発明は、必要な対象内において、インフルエンザに対する免疫応答を誘起する方法に関し、そのような方法は、対象に、本発明に従う組成物の免疫学的有効量を投与することを含む。

30

【0029】

さらに、本発明は、目的の細胞内に1つもしくはそれ以上の異種核酸を導入し、それらを発現させる方法に関し、そのような方法は、複製コンピテントアデノウイルス(RCA)を実質的に含まない組換えアデノウイルスを細胞に接触させることを含み、ここで、該組換えアデノウイルスは1つもしくはそれ以上の異種核酸を発現し、該異種核酸を発現させるのに十分な条件下において該細胞を培養する、もしくは該細胞を宿している動物を飼育する。

40

【0030】

本発明は、本発明に従うpAdHighシャトルプラスミド、アデノウイルス性骨格プラスミドおよび大腸菌(E.coli)BJ5183細胞を含むキットにも関する。

【0031】

これらおよびその他の実施態様については、以下の項に開示されているか、または、以下の項から明かであり、包含されている。

【0032】

以上の発明の開示の記載は例示であり、本発明を記載されている特定の実施態様に制限するためのものではなく、以下の図面と合わせることによって理解できるはずである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

50

本明細書においては、「含む」、「含んでいる」、「含有する」および「有する」という語は、米国特許法に帰属する意味を有し、「含む」、「含んでいる」ことを意味し；同様に、「基本的に含んでいる」または「基本的に含む」とは、米国特許法に帰属する意味を有し、説明されている事象の基本的もしくは新規な性質が変わらない限りは、説明されている事象以外の事象の存在を許容するが、当該分野の過去の実施態様は除く。

【0034】

「核酸」または「核酸配列」とは、単鎖または二本鎖型のデオキシリボヌクレオイックオリゴヌクレオチドまたはリボヌクレオイックオリゴヌクレオチドをさす。この語には、天然のヌクレオチドの既知のアナログを含む核酸（例えば、オリゴヌクレオチドなど）を包含する。また、この語は、合成骨格を有する核酸様構造物をも包含する（エクステイン（Eckstein）、1991年；バーガ（Baserga）ら、1992年；ミリガン（Milligan）、1993年；WO97/03211；WO96/39154；マタ（Mata）、1997年；ストラウス-ソークアップ（Strauss-Soukup）、1997年；サムスタッグ（Samstag）、1996年などを参照）。

10

【0035】

本明細書において使用している「組換え体」とは、合成された、または、イン・ビトロ（*in vitro*）でその他の操作を受けたポリヌクレオチド（例えば、「組換えポリヌクレオチド」など）であって、組換えポリヌクレオチドを用い、細胞もしくはその他の生体系内での遺伝子生成物の產生に供するもの、あるいは、組換えポリヌクレオチドによってコードされているポリペプチド（「組換えポリペプチド」）をさす。「組換え手法」とは、本発明に従うベクター内のポリペプチドコード配列の発現（例えば、誘導的発現または構成的発現など）のための発現力セットまたはベクターに対し、起源の異なる多様なコード領域もしくはドメインもしくはプロモーター配列を有する核酸を切り出し、連結することも包含する。

20

【0036】

「異種の」という語は、核酸に関して用いる場合、天然には通常見出されない細胞またはウイルス内に存在する核酸、あるいは、天然には見出されないような関係を有する2つもしくはそれ以上の配列を含む核酸、あるいは、発現レベルまたは細胞内での他の核酸もしくは他の分子との物理的関係が、天然には見出されない状態になるように組換え操作されている核酸をさす。例えば、一般的には、異種核酸は、組換えによって產生され、無関係な遺伝子に由来する2つ以上の配列を天然には見出されないような様式で配置することによって得られ、例えば、本発明に従うアデノウイルス性ベクター内に組み込まれているプロモーター配列に機能発揮できるように連結されたヒト遺伝子などが挙げられる。一例として、目的の異種核酸は、免疫原性遺伝子生成物をコードでき、このとき、ワクチンまたはワクチン組成物としてアデノウイルスを治療的または予防的に投与する。異種配列は、プロモーターおよび配列の多様な組み合わせを含むが、それらの例については、本明細書中に詳述する。

30

【0037】

「抗原」とは、免疫系によって認識され、免疫応答を誘導する物質である。本明細書中で類義語として用いられているのは「免疫原」という語である。

40

【0038】

「逆方向末端反復配列」または「ITR」とは、アデノウイルスに関して通常使用される事柄をさし、機能的に等価な（例えば、直線アデノウイルスゲノムの右側および左側に接している配列（モチーフ）のセットをさすなど）、ならびに、アデノウイルスゲノム性核酸の複製に必要な全てのITR配列およびそれらの変異体を含む。本発明に従うベクターおよびベクター系のAd配列はITRsに接しており、好ましくは、該Ad配列は、血清型5型アデノウイルス由来である。血清型の異なるアデノウイルス間において、ITR内の配列保存度は高い（例えば、シュミッド（Schmid）、1995年などを参照））。

【0039】

本明細書において「対象」とは、哺乳類、鳥類、は虫類、両生類または魚類などの脊椎動物であり、より好ましくは、ヒト、または、コンパニオンアニマル、飼い慣らされた動

50

物、食料製造用動物、飼料製造用動物、家畜、ゲーム用動物、競走用動物、競技用動物（例えば、ウシ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマおよびトリなどが挙げられるが、これらに限定されるわけではない）などである。好ましくは、脊椎動物はヒトである。脊椎動物の免疫系は全て同様に機能することから、記載している用途は、全ての脊椎動物系に適用できる。

【0040】

遺伝子または核酸の「発現」は、細胞性遺伝子の発現のみを包含するものではなく、クローニング系および他の任意の関係における核酸の転写および翻訳をも包含する。

【0041】

「遺伝子生成物」という語は、基本的には、他の核酸（例えば、tRNA、sRNPsなどのような非コード制御RNAsなど）によってコードされているタンパク質およびポリペプチドをさす。

【0042】

本明細書において使用している「ベクター」とは、独立体を有する環境から別の環境下に移動させる、または移動を可能にするための道具である。例えば、組換えDNA技術において用いられるある種のベクターは、DNAセグメント（例えば、異種DNAセグメントなど）などの独立体を標的細胞内に移動させることができる。本発明は、組換えアデノウイルスベクターを含む。

【0043】

「プラスミド」という語は、本発明に従うポリヌクレオチド、ならびに、組換え、Adへの複製、および宿主内での導入遺伝子の発現に必要なエレメントを含むDNA転写ユニットをさす。環状プラスミド型が好ましく、スーパーコイル化しているか、またはしていないものを用いる。直線型のものも本発明の範疇に含まれる。

【0044】

ベクター内での発現用の外来性DNA（例えば、目的のエピトープ、および／もしくは抗原、および／もしくは治療性のエピトープをコードしているなど）、およびそのような外来性DNAを調製するための文献、ならびに、核酸分子の発現を増幅させる転写および／もしくは翻訳因子の発現に関する文献、さらに、「目的のエピトープ」、「治療性」、「免疫応答」、「免疫学的応答」、「防御免疫応答」、「免疫学的組成物」、「免疫原性組成物」および「ワクチン組成物」などに関しては、1999年11月23日に交付された米国特許第5,990,091号、WO 98/00166号、WO 99/60164号、および本明細書中に引用している文献、ならびに、それらの特許およびPCT出願中の引用文献および実施記録についての文献を参照のこと。それらの全てを参考文献として本明細書中に引用しておく。従って、米国特許第5,990,091号およびWO 98/00166号、WO 99/60164号、ならびにこれらの特許およびPCT出願の中の引用文献ならびに実施記録についての文献、ならびに本明細書中に引用されているその他の文献もしくは参照として本明細書中に取り入れられている文献は、本発明の実行に役立つはずであり、本明細書に引用されている全ての外来性核酸分子、プロモーターおよびベクターは、本発明の実行に使用できる。この点に関しては、米国特許第6,706,693号、第6,716,823号、第6,348,450号、米国特許出願番号第10/424,409号、第10/052,323号、第10/116,963号、第10/346,021号、ならびに1999年2月25日にPCT/US98/16739号から発刊されたWO 99/08713号も挙げられる。

【0045】

本明細書において使用している「免疫原性組成物」および「免疫学的組成物」および「免疫原性もしくは免疫学的組成物」という語は、本発明に従うアデノウイルス性ベクターおよびウイルスから発現される目的の異種核酸に対して免疫応答を誘起する任意の組成物を包含し、例えば、対象に投与後、標的免疫原または目的の免疫原に対して免疫応答を誘起する。「ワクチン効果のある組成物」、および「ワクチン」および「ワクチン組成物」という語は、目的の抗原に対して防御免疫応答を誘導する、または抗原に対して有効に防御を発揮する任意の組成物を包含し、例えば、対象に投与または注射後、標的抗原もしくは免疫原に対して防御免疫応答を誘起し、あるいは、本発明の新規なアデノウイルスベク

10

20

30

40

50

ターから発現される抗原もしくは免疫原に対して有効な防御を提供する。「薬剤学的組成物」という語は、治療性タンパク質（例えば、エリスロポエチン（EPO）など）または免疫調節タンパク質（例えば、GM-CSFなど）を発現するベクターを含む任意の組成物を意味する。

【0046】

「免疫学的有効量」とは、目的の遺伝子をコードしている組換えベクターの量または濃度であって、対象に投与した場合に、目的の遺伝子生成物に対して免疫応答を誘導するような量である。

【0047】

「循環組換え型」とは、2つもしくはそれ以上の亜型または株の間で遺伝子再集合が起こった組換えウイルスをさす。本発明の文脈中では、別の表現としては「ハイブリッド型」が用いられている。

【0048】

「臨床単離体」とは、例えば、頻用されるウイルスの実験株であって、感染した患者から単離し、さらに、高増殖シャトルウイルスの実験室適合親株を用いて実験細胞もしくは実験対象内で繰り返し発現させたものなどをさす。

【0049】

「野生単離体」とは、感染した患者または環境から単離したウイルスをさす。

【0050】

本発明に従う方法を適切に適用することにより、予防用ワクチンとして疾病を阻止し、または、治療用ワクチンとして疾病の症状を緩和できる。

【0051】

本発明に従う組換えベクターは、単独または免疫学的組成物の一部として対象に投与できる。本発明に従う組換えベクターを用い、イン・ビボ（*in vivo*）でタンパク質を発現させることにより、目的とする対象にタンパク質を送達または投与することもできる。

【0052】

本発明に従って得られた免疫学的組成物および／もしくは抗体および／もしくは発現生成物は、イン・ビボ（*in vivo*）で発現させることができ、また、そのような免疫学的組成物および／もしくは発現生成物および／もしくは抗体は、通常使用される方法で使用でき、さらに、そのような免疫学的組成物および／もしくは発現生成物および／もしくは抗体を発現する細胞は、イン・ビトロ（*in vitro*）および／もしくはイクス・ビボ（*ex vivo*）用として使用でき、例えば、そのような用途および応用としては、診断、アッセイ、イクス・ビボ（*ex vivo*）治療などが挙げられ、ここで、遺伝子生成物および／もしくは免疫学的応答を発現する細胞は、イン・ビトロ（*in vitro*）で拡張し、宿主または動物内に再導入する（米国特許第5,990,091号、WO 99/60164号およびWO 98/00166号ならびにそれらに引用されている文献を参照）。さらに、本明細書に記載されている方法に従って単離された、もしくは本明細書に記載されている投与法に従ってイン・ビトロ（*in vitro*）で拡張された細胞から単離された発現抗体または遺伝子生成物は、組成物として投与でき、サブユニットエピトープもしくは抗原もしくは治療剤もしくは抗体と同様に投与することにより、免疫を誘導し、治療応答を刺激し、ならびに／または受動免疫を刺激する。

【0053】

本明細書において使用している「アデノウイルス」とは、アトアデノウイルス（*Adenovirus*）属、マストアデノウイルス属および鳥アデノウイルス属を含む全てのアデノウイルスを包含する。今日では、アデノウイルスの51以上のヒト血清型が確定されている（例えば、フィールズ（Fields）ら、「ウイルス学2（Virology 2）」第67章（第3版、リッピンコット・ラーヴェン（Rippincott-Raven）出版社）などを参照）。アデノウイルスには血清群A、B、C、D、EまたはFが存在する。アデノウイルスには、血清型2型（Ad2）、血清型11型（Ad11）、血清型35型（Ad35）などがあり、好ましくは血清型5型（Ad5）であるが、これらの例に限定されるわけではない。

【0054】

10

20

30

40

50

アデノウイルスはエンベロープを持たないDNAウイルスである。アデノウイルス由来のベクターは、遺伝子転移に対して特に有用な多数の特徴を有する。本明細書において使用している「組換えアデノウイルスベクター」とは、1つもしくはそれ以上の異種ヌクレオチド（例えば、2、3、4、5もしくはそれ以上の異種ヌクレオチドなど）を有するアデノウイルスベクターである。例えば、アデノウイルスの生物学については詳細に明らかにされており、アデノウイルスは重篤なヒト病理には関与しておらず、該ウイルスは、宿主細胞内に自身のDNAを非常に効率的に導入し、該ウイルスは広範な種類の細胞に感染でき、宿主範囲が広く、該ウイルスは、比較的容易に大量に産生でき、さらに、ウイルス性ゲノムの初期領域1（「E1」）内の欠失によって複製の検出ができる。

## 【0055】

10

アデノウイルス（Ad）のゲノムは、約36,000塩基対（bp）からなる二本鎖直鎖DNA分子であり、各鎖の5'末端に55kDaの末端タンパク質が共有結合している。Ad DNAは、約100bpからなる同一の逆方向末端反復配列（ITRs）を有し、それらの正確な長さは、血清型に応じて異なる。ウイルスの複製起点は、ゲノム末端に存在するITRs内に存在している。DNA合成は2つの段階で起こる。始めに、鎖の置換によって複製が進行し、娘二本鎖分子と、親置換鎖が生成する。置換鎖は一本鎖であり、いわゆる「パンハンドル」中間体を形成でき、これによって複製が開始され、娘二本鎖分子が生成される。別の方法としては、複製はゲノムの両端から同時に進行し、パンハンドル構造の形成は不要である。

## 【0056】

20

増殖性感染サイクル中においては、ウイルスゲノムは2つの相で発現される：すなわち、ウイルスDNA複製までの期間である初期相およびウイルスDNA複製の開始と同時に開始する後期相である。初期相の間は、E1、E2、E3およびE4領域によってコードされている初期遺伝子生成物のみが発現し、それらの生成物は、ウイルス構造タンパク質の合成に対して細胞を整える多数の機能を有する（バーク（Berk）, A.J.、1986年）。後期相の間は、初期遺伝子生成物に加えて、後期遺伝子生成物が発現され、宿主細胞のDNAおよびタンパク質合成が停止される。その結果、細胞はウイルスDNAおよびウイルス構造タンパク質の産生のみを行うようになる（トゥーズ（Tooze）, J.、1981年）。

## 【0057】

30

アデノウイルスのE1領域は、アデノウイルスが標的細胞に感染した後、最初に発現される領域である。この領域は2つの転写ユニット、E1AおよびE1B遺伝子を有し、いずれも、齧歯類初代（胚性）培養細胞の癌遺伝子性形質転換に必要である。E1A遺伝子生成物の主機能は、静止細胞を細胞サイクルに導いて細胞のDNA合成を再開させ、E1B遺伝子およびウイルスゲノムの他の初期領域（E2、E3およびE4）を転写活性化することである。E1A遺伝子を単独で用いて初期細胞にトランスフェクションすることにより、無制限の増殖（不死化）が誘導されるが、完全な形質転換は起こっていない。しかしながら、ほとんどの場合において、E1Aの発現により、プログラムされた細胞死（アポトーシス）が誘導され、時折不死化が起こる（ヨケムセン（Jochimsen）ら、1987年）。アポトーシスの導入阻止および完全な形態学的形質転換のためには、E1B遺伝子の同時発現が必要である。確立された不死化細胞系においては、E1Aを高レベルで発現させることにより、E1B不在下において完全な形質転換を起こすことができる（ロバーツ（Roberts）ら、1981年）。

## 【0058】

40

E1Bにコードされているタンパク質は、細胞機能の方向を変えてウイルスを複製させる際にE1Aを補助する。E1Bの55kDaおよびE4の33kDaのタンパク質は、コンプレックスを形成し、基本的に核に局在しており、その機能は、宿主タンパク質の合成阻止、およびウイルス遺伝子の発現促進である。それらの主な影響は、核から細胞質へのウイルスmRNAの選択的輸送を確立することであり、それに付随して、感染後期相が開始する。E1Bの21kDaのタンパク質は、増殖性感染サイクルの一時的制御の修正に重要であり、従って、ウイルスのライフサイクルが完了する前に宿主細胞が不完全死することを防ぐ。E1Bの21kDaの遺伝子生成物を発現できない突然変異ウイルスは、宿主細胞の染色体DNAの過剰分解（deg発現型）および細胞変性効果の増強（cyt表現型；テリング（Telling）ら、1994年）にともなっ

50

て感染サイクルが短い。さらに、E1A遺伝子が突然変異を起こしている場合には、degおよびcyt表現型が抑制されていることから、これらの表現型はE1Aの機能であることが示唆される（ホワイト（White）ら、1988年）。さらにまた、E1Bの21kDaのタンパク質は、E1Aが他のウイルス遺伝子のスイッチを入れることによって発現速度が低下する。E1Bの21kDaのタンパク質が、どのようなメカニズムでこのようなE1A依存的作用によって衰退するのかはまだ解明されていない。

【0059】

対照的に、例えば、レトロウイルス、アデノウイルスなどは宿主細胞のゲノム内に融合することはなく、細胞分裂しない細胞に感染でき、さらに、イン・ビボ（*in vivo*）で効率的に組換え遺伝子を輸送できる（ブロディ（Brody）ら、1994年）。これらの特徴から、アデノウイルスは、イン・ビボ（*in vivo*）遺伝子輸送、例えば、そのような操作を必要としている細胞、組織および対象内に目的の異種核酸を入れるなどにおける魅力的な候補である。

10

【0060】

アデノウイルス組換え体を用いた本発明に従う実施態様においては、E1欠損もしくは欠失、E3欠損もしくは欠失、ならびに／または、E4欠損もしくは欠失のアデノウイルスベクター、あるいは、全てのウイルス性遺伝子が欠失している「実質のない」アデノウイルスベクターが使用できる。アデノウイルスベクターは、E1、E3もしくはE4遺伝子に突然変異を有する場合、または、これらのもしくは全てのアデノウイルス性遺伝子内に欠失がある場合がある。E1が突然変異を起こすことにより、ベクターには安全性に余裕が生じるが、これは、E1欠損アデノウイルス突然変異体は、非許容細胞内では複製欠損性であるといわれており、さらに、少なくとも非常に弱められているからである。E3が突然変異を起こすことにより、抗原の免疫原性が増強されるが、これは、アデノウイルスがMHCクラス1分子を抑制制御している機構が破壊されるからである。E4が突然変異を起こすことにより、後期遺伝子発現が抑制されてアデノウイルスベクターの免疫原性が低下し、同じベクターを用いたワクチン再接種が可能になる。本発明は、E1、E3、E4、E1およびE3、E1およびE4が欠失している、または突然変異を起こしている任意の血清型または血清群のアデノウイルスベクターを包含する。また、本発明はヒトアデノウイルスのAd5株を含む。

20

【0061】

「実質のない」アデノウイルスベクターとは、アデノウイルスベクターファミリーの中の最新型である。複製には、ヘルパーウイルス、ならびにE1およびCreを発現する特殊なヒト293細胞系、また、天然の環境とは異なる条件を必要とする。ベクターは全てのウイルス性遺伝子を取り去られていることから、ワクチンキャリヤーとしてのベクターは非免疫原性であり、ワクチン再接種のために複数回接種できる。さらに、「実質のない」アデノウイルスベクターは、目的の異種核酸を収容するための36kbのスペースを有することから、細胞内に多数の抗原もしくは免疫原を同時輸送できる。

30

【0062】

当該分野において既知のその他のアデノウイルスベクター系としては、AdEasy系（ヒー（He）ら、1991年）およびそれを変形したAdEasier系（ゼン（Zeng）ら、2001年）などが挙げられる。後者が開発されたことにより、293細胞内で組換えAdベクターが迅速に生成できるようになったが、これは、シャトルプラスミドとAd骨格プラスミドとの間の相同組換えが大腸菌（*E.coli*）細胞内で一晩で進行するからである。しかしながら、293細胞内で産生されたAdベクターには、ヒトへの使用に際して生物学的危険となる可能性があるRCAが微量に混入していた。RCAの生成は、Adベクターと293細胞のゲノムとの間の重複配列によって生じる（ファロー（Fallaux）ら、1998年；ツー（Zhu）ら、1999年）。

40

【0063】

PER.C6ゲノムとの重複配列を全く含まないPER.C6-相互性シャトルプラスミドを用いてPER.C6細胞にAd骨格プラスミドをトランスフェクトした後、RCA不含Adベクターが生成したが（ファロー（Fallaux）ら、1998年）、ヒト細胞を背景とする相同組換えによってAdベクターを構築する方法は、大腸菌（*E.coli*）細胞内でのAdEasy組換え系と比較すると時間

50

がかかる。AdEasy由来のAdベクターは、PER.C6細胞内で迅速に生成できるが、力価が低い( $<10^8$  プラーク形成単位 (pfu) / ml)。これはおそらく、PER.C6パッケージング細胞によってトランス型補足がなされていないpShuttle-CMV中の欠損配列によるものと考えられる(ヒー(He)ら、1998年)。

#### 【0064】

AdをベクターとするRCA不含インフルエンザワクチンを迅速かつ高力価で生成するためは、pShuttle-CMV中の欠損配列を修理し、新規なシャトルプラスミドを作出することがひつようである。そのようなシャトルプラスミドは、本発明の実施態様において定義され、pAdHighと名付けられている。Adをベクターとするインフルエンザワクチンは、AdEasyと同等の速度でAdHighから作出されるとことが期待されるが、これは、大腸菌 (E.coli)、特に、E.coli BJ5183中で実施するアデノウイルス性骨格プラスミドpAdEasy1を用いた相同組換えに関しては、両系のシャトルプラスミドが同一の構成成分を含んでいるからである(ヒー(He)ら、1998年)。

10

#### 【0065】

pAdEasy1はアデノウイルス性配列を有し、これは、目的の異種核酸を発現するpShuttle-CMVおよびpAdHighなどのようなシャトルプラスミドと組換えを行ったときに、アデノウイルスのキャプシド内にパッケージされた異種核酸(例えば、免疫原および/または治療性遺伝子など)をコードしているE1/E3 - 欠損アデノウイルスゲノムを生成する。pAdEasy1の配列は当該分野において既知であり、公表されており、ストラタジーン(Stratagene)社から市販されている。AdEasy由来のAdベクターとは対照的に、AdHigh由来のAdベクターは、PER.C6-相互性ベクター由来のものと同程度の高力価まで増殖し、さらに、PER.C6細胞内で產生した場合には、RCAの混入が避けられるが、これは、AdHigh由来のAdベクター中のAd配列が、PER.C6-相互性シャトルプラスミドpAdAptから生成したものと同一だからである(クルーセル(Crucell)；オランダ国ライデン)。

20

#### 【0066】

本発明は、RCA不含Adベクターを產生できる新規なアデノウイルスシャトルプラスミドの作出法を提供し、その方法は、第一および第二のシャトルプラスミドを原核細胞内に同時形質転換することを含み、ここで、該第一のシャトルプラスミドは、アデノウイルス性配列のサブフラグメントおよび第一の抗生物質耐性遺伝子を有し、該第二のシャトルプラスミドは、該第一のシャトルプラスミド中に存在しないアデノウイルス性配列を含むアデノウイルス性配列のサブフラグメントおよび該第一の抗生物質耐性遺伝子とは別異の第二の抗生物質耐性遺伝子を有する。この方法においては、pAdHighは、RCA不含組換えアデノウイルスの作出に必要なアデノウイルス性配列を含む2つのシャトルプラスミドを相同組換えすることによって生成される。

30

#### 【0067】

第一のシャトルプラスミドとしては、pShuttle-CMV、または、他のプラスミド由来のアデノウイルス性配列との相同組換えに有用なアデノウイルス性配列を含む別のシャトルプラスミドを用いることができる。pShuttle-CMVは市販されており、その配列は共通ドメイン(public domain)内に存在する(ヒー(He)ら、1998年)。pShuttle-CMVは、1つもしくはそれ以上の目的の異種核酸を挿入する場合に使用される複数のクローニング部位を有し、これらは、機能発揮できるようにCMVプロモーターに連結されている。pShuttle-CMVはカナマイシン耐性遺伝子も有する。

40

#### 【0068】

第二のシャトルプラスミドは、第一のシャトルプラスミド中に存在しない別のアデノウイルス性配列を含むアデノウイルス性配列のサブフラグメントを有しており、pAdAptを用いることができる(ファロー(Fallaux)ら、1998年、ファン・デル・トゥーセン(von der Thuesen), J.H.ら、2004年；ハヴェンガ(Havenga), M.J.、2001年)。pAdAptなどの第二のシャトルプラスミド内に存在する別の配列としては、Ad5由来の配列などが挙げられるが、アデノウイルスの他の血清型由来の配列を含んでいる場合もある。これらの配列は、Ad5

50

由来のアデノウイルス性配列の1~454番に対応する配列番号1、およびAd5由来のアデノウイルス性配列の3511~6095番に対応する配列番号3を含む。また、本発明は、アデノウイルスのその他の血清型由来の対応する配列の使用も包含しており、そのような血清型としては、Ad2、Ad7、Ad11およびAd35などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。当業者であれば、BLASTなどの配列整合法（アルツシュル（Altschul）, S.F. ら、1990年）を熟知しているはずであり、そのような方法によってアデノウイルスの他の血清型もしくは血清群内の適切な配列を確認できる。本発明に従う方法においては、これらの配列もしくはそれらの配列の変異体を含む任意のシャトルプラスミドを用いることができる。

## 【0069】

本発明は、上述の第一および第二のシャトルプラスミドを相同組み換えすることにより、あるいは、第二のシャトルプラスミドからアデノウイルス性配列をさらに切り出し、連結反応によって第一のプラスミド内に挿入することにより、組換えアデノウイルス性プラスミドを作出することに関する。1つの実施態様においては、本発明は、1つもしくはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて第一および第二のシャトルプラスミドを消化することによるpAdHighの作出法を提供し、ここで、該第一のシャトルプラスミドは、第一のアデノウイルス性配列および第一の抗生物質耐性遺伝子を有し、該第二のシャトルプラスミドは、該第一のシャトルプラスミド内に存在しない別のアデノウイルス性配列を有しており、そのような別のアデノウイルス性配列を該第一のシャトルプラスミドに挿入することにより、最初に組み換えられたアデノウイルス性シャトルプラスミドpAdHigh が得られる。当業者であれば、核酸のクローニングおよび操作法には熟知しており、不要な実験を要しないはずである。

10

20

30

## 【0070】

プラスミドの回収は当該分野において既知であり、原核細胞性形質転換体を溶解し（例えば、フレンチプレス、アルカリ溶解、窒素空洞化などの方法が挙げられるが、これらに限定されるわけではない）、さらに、塩化セシウム遠心分離、エタノール沈澱、カラムクロマトグラフィー（例えば、Quiagen prepなどを使用）などによってプラスミドを精製することによって行う。本発明に従う方法においては、任意の方法でトランスフェクトした細胞が用いられる。そのようなトランスフェクト法としては、リン酸カルシウム沈澱、陽イオンリピド、リポソーム、マイクロインジェクションおよびウイルス送達による感染などが挙げられる。

## 【0071】

本発明に従うアデノウイルスベクターは、イン・ビトロ（*in vitro*）およびイン・ビボ（*in vivo*）において、細胞への核酸輸送に有用である。特に、本発明に従うベクターを都合良く使用することにより、動物、より好ましくは哺乳類細胞に核酸を送達または輸送できる。目的の核酸は、ペプチドおよびタンパク質、好ましくは治療性（例えば、医療用または獣医療用など）または免疫原性（例えば、ワクチン用など）のペプチドもしくはタンパク質をコードしている核酸を含む。

40

## 【0072】

好ましくは、目的の異種核酸をコードしているコドンは、「ヒト型化」されたコドンであり、例えば、インフルエンザなどによって頻用されるコドンの代わりに、発現量が多いヒト遺伝子内で頻繁に現れるコドンなどである。そのようなコドンを用いることにより、ヒトもしくはその他の動物細胞内で異種核酸を効率的に発現できる。コドンの使用パターンについては、多様な種の高発現遺伝子に関する文献がある（例えば、ナカムラ（Nakamura）ら、1996年；ワン（Wang）ら、1998年；マクエヴァン（McEwan）ら、1998年など）。

## 【0073】

さらに別の方法としては、アデノウイルスベクターを培養細胞もしくは動物に感染させ、所望する遺伝子生成物を発現させる、例えば、目的のタンパク質もしくはペプチドを産生させることができる。好ましくは、タンパク質もしくはペプチドは培地内に分泌され、当該分野において既知の常套技術を用いて培地から精製できる。タンパク質の細胞外分泌

50

を指示するシグナルペプチド配列は当該分野において既知であり、そのような配列をコードしているヌクレオチド配列は、当該分野において既知の常套技術を用いることにより、目的のペプチドもしくはタンパク質をコードしているヌクレオチド配列に対し、機能発揮できるように連結できる。別 の方法としては、細胞を溶解し、発現された組換えタンパク質は、該細胞溶解物から精製できる。細胞は真核細胞である。好ましくは、細胞は動物細胞（例えば、昆虫、鳥類または哺乳類など）、より好ましくは哺乳類細胞である。アデノウイルスによる形質導入に関してコンピテントである細胞も好ましい。

## 【0074】

そのような細胞としては、PER.C6細胞、911細胞およびHEK293細胞が挙げられる。PER.C6細胞は、RCA不含Adベクターを増殖させる能力を有することから、有用である。PER.C6細胞は、E1遺伝子セグメントを用いて形質導入したヒト一次網膜芽細胞であり、該セグメントは、複製能のないアデノウイルスの産生を補うが、相同組換えによるRCAの生成を阻止するように指定されている。PER.C6については、1997年1月3日に刊行されたWO97/00326号に記載されており、その内容を参照として本明細書中に取り入れておく。さらに、HEK293細胞（グラハム（Graham）ら、1977年）は、本発明に従うアデノウイルス性配列と組換えを起こしてRCAを産生できるような重複配列を有することを特記しておく。

10

## 【0075】

また、本発明は、ワクチンとして有用なベクターを提供する。免疫原または抗原は、アデノウイルスキャプシド内に呈示されており、別の場合には、抗原は、組換えアデノウイルスゲノムに導入され、本発明に従うアデノウイルスに保有されている異種核酸から発現される。アデノウイルスベクターは、目的の任意の免疫原を提供できる。目的の免疫原は当該分野において既知であり、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（例えば、gp160、gp120、gp41などのようなエンベロープタンパク質など）、インフルエンザウイルス、gapタンパク質、癌抗原、HBV表面抗原（肝炎に対して免疫化するため）、狂犬病糖タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。免疫原のその他の例については、本明細書中に詳細に記載している。

20

## 【0076】

好ましくは、異種ヌクレオチド配列は、適切な発現調節配列に機能発揮できるように関与している。発現ベクターは発現調節配列を有しており、それらは例えば、複製起点（例えば、pBR322などの細菌性ベクター由来の細菌性起点、あるいは、自律複製配列（ARS）などの真核細胞性起点などを用いることができる）、プロモーター、エンハンサー、必要な情報処理部位（例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、パッケージングシグナルなど）、ならびに転写終了配列などである。

30

## 【0077】

例えば、本発明に従う組換えアデノウイルスベクターは、適切な転写 / 翻訳調節シグナルおよびポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモン由来のポリアデニル化シグナル、SV40ポリアデニル化シグナルなど）を有することが好ましく、それらは、異種核酸配列と機能発揮できるように関連し、標的細胞に送達される。所望する発現のレベルおよび組織特異性に応じ、多様なプロモーター / エンハンサー要素を用いることができる。プロモーターは、所望する発現パターンに応じ、構成性または誘導性のもの（例えば、メタロチオネインプロモーターなど）を用いる。プロモーターは、本来備わっているもの、もしくは外来性のものであり、天然もしくは合成の配列を用いることができる。外来性のものの場合、転写開始領域が導入された野生型宿主には、該転写開始領域が存在していないことを意味している。プロモーターは、目的の細胞または組織内で機能するように選択する。脳特異的、肝臓特異的および筋肉特異的（骨格筋、心筋、平滑筋および / または横隔膜特異的）プロモーターも本発明に包含される。哺乳類プロモーターも好ましい。

40

## 【0078】

プロモーターは「初期」プロモーターが好ましい。「初期」プロモーターは当該分野において既知であり、デ・ノボ（de novo）タンパク質合成が欠如している場合に、迅速かつ一時的に発現される遺伝子の発現を指示するプロモーターとして定義される。そのよう

50

なプロモーターには、「強い」プロモーターまたは「弱い」プロモーターがある。「強いプロモーター」および「弱いプロモーター」という語は当該分野において既知であり、プロモーターあたりの転写開始の相対頻度(回/分)によって定義される。「強い」または「弱い」プロモーターは、ポックスウイルスRNAポリメラーゼへのアフィニティーによつても規定できる。

【0079】

さらに好ましくは、異種ヌクレオチド配列は、例えば、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)主要前初期プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、-アクチンプロモーター、アルブミンプロモーター、伸長因子1-(EF1-)プロモーター、P-Kプロモーター、MFGプロモーターまたはルイス肉腫ウイルスプロモーターなどと機能発揮できるように関連している。その他の発現調節配列としては、免疫グロブリン遺伝子、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、ヘルペスウイルスなどに由来するプロモーターが挙げられる。本発明の実施においては、哺乳類の任意のウイルス性プロモーターも用いることができる。CMVプロモーターを用いて異種ヌクレオチドの転写を行わせる場合には、免疫適格動物中での発現が抑制制御されると考えられている(例えば、Guoら、1996年などを参照)。従って、異種ヌクレオチド配列は、該異種核酸の発現を抑制制御しないような変形CMVプロモーターに対して、機能発揮できるように関連させることができ。10

【0080】

さらに、本発明に従うベクターは、複クローニング部位(multiple cloning site:MCS)を有する場合があり、これは、第一のプロモーターの下流に位置している。MCSは、プロモーター配列と「イン・フレーム」の関係にある異種核酸分子に対して挿入部位を提供することにより、該プロモーター配列が目的の異種核酸分子に対して機能発揮できるように連結される。複クローニング部位は当業者において既知である。本明細書において使用している「機能発揮できるように連結された」という語は、記載されている構成成分が意図された様式で機能するような関係を意味する。20

【0081】

ベクターによっては、イン・ビトロ(in vitro)での組換えベクターの増幅および精製に使用する場合には、抗生物質耐性をコードしている選択的マーカーを用い、シャトルプラスミドとアデノウイルス性ベクターとの間の相同組換えをモニターする。本明細書に従う方法は、重複配列において、シャトルプラスミドとアデノウイルス性ベクターとの間で相同組換えを起こさせることについて記載している。各ベクターは別異の抗生物質耐性遺伝子を有しており、二重選択を行うことにより、組換えベクターを発現する組換え体を選択できる。本発明に従うベクターに組み込める抗生物質耐性遺伝子の例としては、アンピシリン、テトラサイクリン、ネオマイシン、ゼオシン、カナマイシン、ブレオマイシン、ヒグロマイシン、クロラムフェニコールなどが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。30

【0082】

1つ以上の異種ヌクレオチド配列が存在する実施態様においては、そのような異種ヌクレオチド配列は、1つの上流プロモーター、ならびに、1つもしくはそれ以上の下流インターナルリボソームエントリー部位(internal ribosome entry site:IRES)配列(例えば、ピコルナウイルスEMC IRES配列など)と機能発揮できるように関連している。40

【0083】

異種ヌクレオチド配列が標的細胞内で転写され、翻訳されるような実施態様においては、タンパク質をコードしている挿入配列を効果的に翻訳するためには、一般的に、特異的開始シグナルを要する。ATG開始コドンおよびそれに隣接する配列を含むこれらの外来性翻訳調節配列については、天然および合成の多様な起源のものが用いられる。

【0084】

治療用ペプチドおよびタンパク質としては、次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない:囊胞性線維症膜貫通調節タンパク質(CFTR)、ジストロフィン50

(ジストロフィンミニ遺伝子のタンパク質生成物を含む、例えば、ヴィンセント (Vinent) ら、1993年などを参照)、ユートロフィン (ティンスレー (Tinsley) ら、1996年)、凝血因子 (例えば、第XII因子、第IX因子、第X因子など)、エリスロポエチン、LDLレセプター、リボタンパク質リバーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、-グロブリン、-グロブリン、スペクトリン、-抗トリプシン、アデノシンデアミナーゼ、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、-グルコセレブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、リソソーム性ヘキソサミニダーゼ、分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ、ホルモン類、成長因子、サイトカイン類、自殺遺伝子生成物 (例えば、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフェリア毒素および腫瘍壞死因子など)、癌治療に使用される薬物に対して耐性を付与するタンパク質、腫瘍抑制遺伝子生成物 (例えば、p53、Rb、Wt-1など)、ならびに、治療を要する対象内で治療効果を有するその他任意のペプチドもしくはタンパク質など。

10

## 【0085】

本発明によって提供される組換えベクターは、免疫調節分子をコードしており、該分子は、液性および/もしくは細胞性免疫応答を誘発するためのアジュバントとして作用する。そのような分子としては、サイトカイン類、同時刺激分子、または、免疫応答の経過を変更できる任意の分子などが挙げられる。そのような分子は、免疫調節分子をコードしている遺伝子を含み、ここで、免疫調節遺伝子の例としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない: GM-CSF遺伝子、B7-1遺伝子、B7-2遺伝子、インターロイキン-2遺伝子、インターロイキン-12遺伝子およびインターフェロン遺伝子など。当業者であれば、この技術を変形し、抗原および/もしくは免疫原の免疫原性をさらに増強する方法を思いつくはずである。

20

## 【0086】

さらに、本発明は、外来性核酸分子が1つもしくはそれ以上の抗原またはそれらの一部、例えば、病原菌由来の1つもしくはそれ以上の目的のエピトープなどをコードしている方法に関し、そのようなエピトープとしては、例えば、アレルギー応答を変化させるようなエピトープ、抗原もしくは遺伝子生成物; 生理的機能を変化させるようなエピトープ、抗原もしくは遺伝子生成物; インフルエンザ赤血球凝集素、インフルエンザ核タンパク質、インフルエンザM2、破傷風毒素C-フラグメント、炭疽防御抗原、炭疽致死因子、狂犬病糖タンパク質、HBV表面抗原、HIV gp120、HIV gp160、ヒト癌胎児性抗原、マラリアCSP、マラリアSSP、マラリアMSP、マラリアpfg、および結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) HSP; ならびに/または、治療用もしくは免疫調節遺伝子、同時刺激遺伝子、および/もしくはサイトカイン遺伝子などが挙げられる。

30

## 【0087】

本発明の好ましい実施態様に従えば、組換えベクターはインフルエンザ免疫原もしくは抗原をコードしている、または発現する核酸分子を発現する。特に、生成物をコードしているインフルエンザの任意もしくは全ての遺伝子、またはオープンリーディングフレーム (ORF) は、単離、特性付けし、組換えベクター内に挿入できる。好ましいインフルエンザ遺伝子またはORFとしては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない: 赤血球凝集素、核タンパク質、マトリックスおよびノイラミニダーゼなど。得られた組換えアデノウイルスベクターを用い、対象を免疫化する、または対象に接種する。

40

## 【0088】

また、本発明は、インフルエンザに対して免疫応答を誘起する方法に関する。インフルエンザは、エンベロープを有し、一本鎖のマイナス鎖RNAウイルスであり、世界中で重篤な呼吸器疾患を引き起こしている。インフルエンザはオルソミクソウイルス科に属する唯一の属であり、A、BおよびCの3つの型に分類されている。インフルエンザビリオンは、一本鎖RNAゲノムを含む内部リボ核タンパク質複合体コア (螺旋状核タンパク質) および内側がマトリックスタンパク質 (M) で覆われている外部リボタンパク質エンベロープから構成されている。インフルエンザA型のゲノムをセグメントに分けると、直線で負の極性を有する一本鎖RNAの8個の分子 (インフルエンザC型では7個) になり、該一本鎖RNAは

50

、10個のポリペプチドをコードしており、それらは、RNA支配のRNAポリメラーゼタンパク質（PB2、PB1およびPA）およびヌクレオカプシドを形成する核タンパク質（NP）；マトリックスタンパク質（M1、M2）；リポタンパク質エンベロープから得られた2つの表面糖タンパク質；赤血球凝集素（HA）およびノイラミニダーゼ（NA）；作用がわかっていない非構造タンパク質（NS1およびNS2）である。ゲノムの転写および複製は核内で起こり、組み立ては原形質膜上への出芽を介して行われる。ウイルス遺伝子は混合感染中に再集合（例えば、相同組換えが進行するなど）することができる。

## 【0089】

インフルエンザウイルスは、HAを介して細胞膜糖タンパク質および糖脂質内のシアリルオリゴ糖へ吸着する。ビリオンの細胞内取り込みに続き、細胞内エンドソーム内において、HAのコンホーメーション変化が起こるが、ここで、エンドソームは、膜融合を促進することによってアンコーティングを開始する作用を有する。ヌクレオカプシドは核に移動し、ここで、感染の開始に必須の事象として、ウイルスmRNAが転写される。ウイルスmRNAは独特なメカニズムによって転写される。まず、ウイルス性エンドヌクレアーゼにより、細胞性異種mRNAsからキャップを有する5' - 末端が解裂し、次に、ウイルス性トランスクリプターゼによるウイルスRNA錆型の転写に対して該mRNAsがプライマーとして作用する。転写は、錆型の末端から15~22塩基の部位で終了し、このとき、オリゴ（U）配列は、ポリ（A）域が錆型とは無関係に付加することに対するシグナルとして作用する。生成した8個のウイルスmRNA分子のうち、6個はモノシストロン性伝達情報であり、これらは、HA、NA、NPで表されるタンパク質、ならびにウイルスポリメラーゼタンパク質PB1、PB2およびPAに直接翻訳される。残りの2つの転写体は、スプライシングを受け、それぞれ2つのmRNAsに分かれ、別異の読み枠内で翻訳されてM1、M2、NS1およびNS2を产生する。換言すると、8個のウイルスmRNA分子は10個のタンパク質をコードしており、それらの8個は構造タンパク質であり、2個は非構造性タンパク質である。

10

20

30

40

50

## 【0090】

インフルエンザAゲノムは負の極性を有する一本鎖RNAの8個のセグメントを含み、これらは、9個の構造タンパク質および1個の非構造タンパク質をコードしている。非構造タンパク質NS1は、インフルエンザウイルスが感染した細胞内には多量に存在するが、ビリオン内には検出されていない。NS1は、感染初期に核内で見出されるリンタンパク質であり、ウイルスサイクルの後期では細胞質内にも見出される（クルッグ（Krug）ら、1975年）。NS遺伝子内に欠損を有する温度感受性（ts）インフルエンザ突然変異体を用いた実験から、NS1タンパク質は、ウイルスに宿主細胞の遺伝子発現を阻止させ、かつ、ウイルス性タンパク質の合成を刺激させるという機序を有する転写および転写後調節物質であることが示唆された。転写後過程を調節する他の多くのタンパク質と同様、NS1タンパク質は、特定のRNA配列および構造と相互作用する。NS1タンパク質は、次のような別異のRNA種と結合することが報告されている：vRNA、ポリA、U6（sn）RNA、ウイルスmRNAの5'未翻訳領域およびdsRNA（キウ（Qiu）ら、1995年；キウ（Qiu）ら、1994年）。感染細胞内のcDNAからのNS1タンパク質の発現は、いくつかの効果に関係している：mRNAの核-細胞質輸送の阻害、プレmRNAのスプライシングの阻害、宿主mRNAのポリアデニル化の阻害およびウイルス性mRNAの翻訳刺激など（フォート（Fortes）ら、1994年；エナミ（Enami）、K.ら、1994年；デ・ラ・ルナ（de la Luna）ら、1995年；ル（Lu）、Y.ら、1994年；パーク（Park）ら、1995年）。

## 【0091】

インフルエンザAウイルスは、8本の一本鎖の負のウイルス性RNAs（vRNAs）のゲノムを有しており、それらのvRNAsは、計10個のタンパク質をコードしている。インフルエンザウイルスのライフサイクルは、宿主細胞の表面上のシアリル酸含有レセプターにHAが結合することから始まり、続いて、レセプターを介したエンドサイトーシスが起こる。後期エンドソーム内のpHが低いことによってHA内のコンホーメーションシフトが開始され、HA2サブユニットのN末端が露出する（いわゆる融合ペプチド）。融合ペプチドは、ウイルス性およびエンドソーム性の膜の融合を開始させ、マトリックスタンパク質（M1）とRNPとのコ

ンプレックスが細胞質内に放出される。RNPsは、vRNAを固定化する核タンパク質（NP）、ならびに、PA、PB1およびPB2タンパク質によって形成されているウイルス性ポリメラーゼコンプレックスを含む。RNPsは、核に輸送され、そこで転写および複製が起こる。RNAポリメラーゼコンプレックスは3つの別異の反応を触媒する：5' - キャップおよび3' - ポリA構造を有するmRNAの合成、相補的RNA（cRNA）の全長を合成、および鑄型としてcDNAを用いたゲノム性vRNAの合成。新規に合成されたvRNAs、NPおよびポリメラーゼタンパク質は、RNPs内に組み込まれ、核から輸出され、細胞質膜に輸送されて子世代ウイルス粒子の出芽が起こる。ノイラミニダーゼ（NA）タンパク質は、シアル化オリゴ糖からシアル酸を除去することにより、感染の後期においてきわめて重要な役割を果たし、それによって新規に構成されたビリオンが細胞表面から放出され、ウイルス粒子の自己凝集が妨げられる。ウイルスの構成には、タンパク質 - タンパク質およびタンパク質 - vRNAの相互作用が含まれるが、これらの相互作用の性質はほとんどわかっていない。

10

## 【0092】

インフルエンザBおよびインフルエンザCウイルスは、構造的および機能的にインフルエンザAウイルスと類似しているが、いくつか異なる点がある。例えば、インフルエンザBウイルスはイオンチャネル活性を有するM2タンパク質を持たない。その代わり、NA遺伝子生成物であるNBタンパク質を有しており、これは、同様にイオンチャネル活性を有し、従って、インフルエンザAウイルスのM2タンパク質と同様の機能を有する。同様に、インフルエンザCもイオンチャネル活性を有するM2タンパク質を持たない。しかしながら、C M1タンパク質がこの活性を有すると考えられている。

20

## 【0093】

そのようなインフルエンザA株としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：H10N4、H10N5、H10N7、H10N8、H10N9、H11N1、H11N13、H11N2、H11N4、H11N6、H11N8、H11N9、H12N1、H12N4、H12N5、N12N8、H13N2、H13N3、H13N6、H13N7、H14N5、H14N6、H15N8、H15N9、H16N3、H1N1、H1N2、H1N3、H1N6、H1N9、H2N1、H2N2、H2N3、H2N5、H2N7、H2N8、H2N9、H3N1、H3N2、H3N3、H3N4、H3N5、H3N6、H3N8、H4N1、H4N2、H4N3、H4N4、H4N5、H4N6、H4N8、H4N9、H5N1、H5N2、H5N3、H5N7、H5N8、H5N9、H6N1、H6N2、H6N4、H6N5、H6N6、H6N7、H6N8、H6N9、H7N1、H7N2、H7N3、H7N5、H7N7、H7N8、H8N4、H8N5、H9N1、H9N2、H9N3、H9N5、H9N6、H9N7、H9N8、H9N9、ハイブリッド亜型、循環組換え体、臨床および野生単離株など。それらのシークエンスはGenBankから入手でき、ウイルスの保存株はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection）（メリーランド州ロックビル）から入手可能であり、あるいは、公的に入手できる。

30

## 【0094】

インフルエンザ株Bとしては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：愛知、秋田、アラスカ、アナーバー、アルゼンチン、バンコク、北京、ベルギー、ボン、ブラジル、ブエノスアイレス、カナダ、チャコ、千葉、重慶、CNIC、コルドバ、チェコスロバキア、ディーク（Daeku）、ダーバン、フィンランド、福建、福岡、ジエノバ、広東、広州、ハノーバー、ハルピン、ハワイ、河北、河南、広島、香港、ヒューストン、湖南、茨城、インド、イスラエル、ヨハネスブルグ、鹿児島、神奈川、カンサス、ハリコフ、神戸、高知、ラティウム、リー（Lee）、レニングラード、リスボン、ロサンゼルス、ルサカ、リヨン、マレーシア、マプート、マールデルプラタ、メリーランド、メンフィス、ミシガン、三重、ミラノ、ミンスク、長崎、名古屋、南昌、ナッシュビル、ネブラスカ、オランダ国、ニューヨーク、NIB、寧夏、ノルウェー、オマーン、オレゴン、大阪、オスロ、パナマ、パリ、パルマ、ペルージャ、フィリピン、釜山、ケベック、ロチェスター、ローマ、佐賀、ソウル、山東、上海、深川、滋賀、静岡、四川、シエナ、シンガポール、サウスカロライナ、サウスダコタ、スペイン、ストックホルム、スイス、台湾、テキサス、徳島、東京、トレント、トリエステ、英國、ウスワイア、USSR、ユタ、ピクトリア、ウイーン、武漢、シュエンワー（Xuanwu）、山形、山梨、雲南に由来する株、ハイブリッド亜型、循環組換え体、臨床および野生単離株など。それらのシークエンスはGe 40

50

nBankから入手でき、ウイルスの保存株はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) (メリーランド州ロックヴィル) から入手可能であり、あるいは、公的に入手できる。

【0095】

インフルエンザC株としては次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：愛知、アナーバー、青森、北京、ベルリン、カリフォルニア、イングランド、五大湖地方、ギリシャ、広島、兵庫、JHB、ヨハネスブルグ、神奈川、カンサス、京都、ミシシッピ、宮城、奈良、ニュージャージー、埼玉、札幌、静岡、テラー、山形に由来する株、ハイブリッド亜型、循環組換え体、臨床および野生単離株など。それらのシークエンスはGenBankから入手でき、ウイルスの保存株はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) (メリーランド州ロックヴィル) から入手可能であり、あるいは、公的に入手できる。

10

【0096】

本発明に従う好ましい実施態様は、少なくとも1つ、好ましくは3つもしくはそれ以上のインフルエンザ免疫原（赤血球凝集素など）を含む免疫原性組成物を提供し、そのような免疫原は、地理的に異なる地域に由来し、または、特定の年のために、別異の株、循環組み換え体、臨床もしくは野生単離株を標的としている。現在市販されているインフルエンザワクチンは3価ワクチンであり、世界保健機構 (World Health Organization) によって定められた3種類の最も流行しているインフルエンザ株または循環組換え体に由来するインフルエンザ赤血球凝集素免疫原を含む。そのようなワクチンは、本明細書に記載している方法を用いて製造でき、本発明の一部として含まれる。さらに、特定の地理的地域を起源とし、目的の株または循環組換え体に由来する少なくとも3つの別異のノイラミニダーゼまたは核タンパク質インフルエンザ免疫原を含む免疫原性組成物も本発明に含まれる。

20

【0097】

インフルエンザ免疫原などの異種配列が対象内で発現することにより、対象内で、異種配列の発現生成物に対する免疫応答が起こる。従って、本発明に従う組換えベクターを免疫学的組成物またはワクチンに使用することにより、免疫応答を誘導する手段が提供され、このときの免疫応答は防御的であるが、必ずしもそうでなくても良い。本発明の実施において使用した分子生物学の技術については、サンブルック (Sambrook) らが記載している（1989年）。

30

【0098】

さらに別の、または追加の方法として、本発明の範疇に含まれる免疫原性もしくは免疫学的組成物においては、抗原をコードしているヌクレオチド配列から膜透過ドメインをコードしている部分を除去することができる。さらに別の、または追加の方法として、ベクターまたは免疫原性組成物は、異種tPAシグナル配列（例えば、ヒトtPAなど）および/または安定化イントロン（例えば、ウサギ - グロビン遺伝子のイントロンIIなど）をコードしているヌクレオチド配列を追有し、宿主内で発現できる。

【0099】

本発明は、イン・ビトロ (in vitro) もしくはイン・ビボ (in vivo) において、細胞内に異種ヌクレオチド配列を送達ならびに/または投与する方法も提供する。本発明に従えば、細胞は、本発明に従う少なくとも1つの欠失アデノウイルスベクターに感染する（詳細については本明細書に記載している）。細胞は、ウイルスの形質導入についての天然の過程に従ってアデノウイルスに感染させることができる。別の方法としては、当該分野において既知の他の任意の方法を用いて細胞内にベクターを導入できる。例えば、細胞を標的アデノウイルスベクターと接触させ（方法については以下に詳述している）、レセプターを介したエンドサイトーシスなどの別のメカニズムで取り込ませる。別の例としては、ベクターは、抗体もしくはその他の結合タンパク質を利用したインターナリゼーション細胞表面タンパク質の標的になる。

40

【0100】

50

本発明に従うウイルスベクターを投与する細胞としては、任意の型のものを用いることができる、例えば、次のようなものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない：神経細胞（末梢および中枢神経系の細胞を含む）、網膜細胞、上皮細胞（皮膚、腸、気管支、膀胱および胸部組織上皮を含む）、筋肉細胞（心筋、平滑筋、骨格筋および横隔膜筋を含む）、臍臍細胞（ランゲルハンス島細胞を含む）、肝細胞（例えば、実質細胞など）、纖維芽細胞、内皮細胞、生殖細胞、肺細胞（気管支細胞および肺胞細胞を含む）、前立腺細胞など。さらに、上述したように、細胞は、任意の種を起源とするものを用いることができる。アデノウイルスによって自然に形質導入される細胞が好ましい。アデノウイルスによって形質導入されたそのような細胞の例としては、HEK293細胞、PER.C6細胞および911細胞などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。1つの実施態様においては、PER.C6細胞を用いる。

10

#### 【0101】

2004年4月6日に交付された米国特許第6,716,823号、2004年3月16日に交付された米国特許第6,706,693号、2002年2月19日に交付された米国特許第6,348,450号、米国特許出願第0/052,323号、第10/116,963号、および第10/346,021号などを参照のこと。これらの内容を参照として本明細書中に取り入れておく。

20

#### 【0102】

発現された遺伝子生成物、抗体およびそれらの使用法；外来性核酸分子のイン・ビボ（*in vivo*）およびイン・ビトロ（*in vitro*）発現用ベクター；発現を指示する、もしくは発現されるべき核酸分子に対して機能発揮できるように連結されているプロモーター；そのようなベクター、また、そのようなベクター、核酸分子もしくは抗体を含む組成物（鼻内投与用組成物を含む）を調製する方法ならびに文書；投与量ならびに投与の様式および／もしくは経路などに関する情報については、エイナー（Einer）らまたはクォーク・バイオテック（Quark Biotech）社に対して1999年11月23日に交付された米国特許第5,990,091号、1999年5月14日に受理されたPCT/US99/11066号から1999年11月25日に刊行されたW099/60164号（フィッシャー（Fischer）またはローン・メリュー（Rhone Merieux）社）、1997年6月30日に受理されたPCT97/11486号から1998年1月8日に刊行されたW098/00166号（米国特許出願第08/675,556号および第08/675,566号の優先権を主張する）（ヴァン・ギンケル（van Ginkel）ら、1997年およびオスター・ハウス（Osterhaus）ら、1992年）などを参照のこと。本発明の実施にあたってはこれらを取り入れることができる。従って、エイナー（Einer）らまたはクォーク・バイオテック（Quark Biotech）社に対して1999年11月23日に交付された米国特許第5,990,091号、1999年5月14日に受理されたPCT/US99/11066号から1999年11月25日に刊行されたW099/60164号（フィッシャー（Fischer）またはローン・メリュー（Rhone Merieux）社）、1997年6月30日に受理されたPCT/US97/11486号から1998年1月8日に刊行されたW098/00166号（米国特許出願第08/675,556号および第08/675,566号の優先権を主張する）（ヴァン・ギンケル（van Ginkel）ら、1997年およびオスター・ハウス（Osterhaus）ら、1992年）、ならびに、本明細書中に引用されている全ての文献、また、エイナー（Einer）らまたはクォーク・バイオテック（Quark Biotech）社に対して1999年11月23日に交付された米国特許第5,990,091号、1999年5月14日に受理されたPCT/US99/11066号から1999年11月25日に刊行されたW099/60164号（フィッシャー（Fischer）またはローン・メリュー（Rhone Merieux）社）、1997年6月30日に受理されたPCT/US97/11486号から1998年1月8日に刊行されたW098/00166号（米国特許出願第08/675,556号および第08/675,566号の優先権を主張する）（ヴァン・ギンケル（van Ginkel）ら、1997年およびオスター・ハウス（Osterhaus）ら、1992年）において引用されている文献中に引用もしくは参照されている全ての文献を利用できる。1999年11月23日に交付された米国特許第5,990,091号、1999年5月14日に受理されたPCT/US99/11066号から1999年11月25日に刊行されたW099/60164号（フィッシャー（Fischer）またはローン・メリュー（Rhone Merieux）社）、1997年6月30日に受理されたPCT/US97/11486号から1998年1月8日に刊行されたW098/00166号（米国特許出願第08/675,556号および第08/675,566号の優先権を主張する）（ヴァン・ギンケル（van Ginkel）ら、1997年およびオスター・ハウス（Osterhaus）ら、1992年）中の情報は、

30

40

50

本発明の実施に関して信頼できる。例えば、発現生成物、抗体およびそれらの使用法、外来性核酸分子をイン・ビボ (in vivo)、イン・ビトロ (in vitro) で発現させるためのベクター、目的のエピトープもしくは抗原または治療剤などをコードしている外来性核酸分子、プロモーター、そのようなベクターもしくは核酸分子または発現生成物もしくは抗体を含む組成物、投与量など)。

#### 【0103】

ベクターの投与量は、患者または宿主に対し、遺伝子生成物（例えば、エピトープ、抗原、治療剤および／または抗体など）組成物に対する規定量を達成するような分量である。もちろん、本明細書中に例示されている投与量以上および以下の量も考慮されており、動物もしくはヒトに対して投与される任意の組成物（それらの構成成分も含む）、ならびに任意の特定の投与法に関しては、次のようなものを決定することが好ましい：適切な動物モデル（例えば、マウスなどの齧歯類など）において50%致死量（LD50）を決定することによって求められる毒性；ならびに、組成物の投与量、組成物中の構成成分の濃度および適切な応答を誘起するための投与のタイミング（ELISAおよび／もしくは血清中和分析などの手段による血清の滴定ならびにそれらの分析などによって行う）。そのような決定事項に関しては、当業者の知識、本明細書の開示および引用文献を利用すれば、不要な実験を要しない。

#### 【0104】

本発明に従う組成物の例としては、開口部または粘膜（例えば、経口、鼻内、肛門内、膣内、経口的、消化管内など）投与用の液体調製物、例えば、懸濁液、溶液、スプレー、シロップもしくはエリキシルなど；非経口、皮膚表面、皮下、皮内、筋肉内、鼻内または静脈内投与（例えば、注射による投与など）用の液体調製物、例えば、滅菌懸濁液もしくはエマルションなどが挙げられる。

#### 【0105】

2004年4月6日に交付された米国特許第6,716,823号、2004年3月16日に交付された米国特許第6,706,693号、2002年、2月19日に交付された米国特許第6,348,450号、米国特許出願第10/052,323号、第10/116,963号、および第10/346,021号などを参照のこと。それらの内容を参考として本明細書中に取り入れておくが、それらは、非侵襲性送達法（例えば、皮膚表面および鼻内投与など）によって免疫原性組成物またはワクチン組成物を接種、送達することについて開示している。

#### 【0106】

さらに、本発明は、本発明に従う組成物を順次投与する、または、本明細書に記載されている方法に従って順次使用する（例えば、ある状態に対する治療もしくは措置の一環として、および／もしくは、免疫学的組成物のブースター投与として、ならびに／または、プライム - ブースト (prime-boost) 療法において、本発明に従う組成物を周期的に投与するなど）。順次投与の時間および方式については、不要な実験をすることなく確認できる。

#### 【0107】

さらに、本発明は、ベクターを作成および使用するための組成物ならびに方法も含み、イン・ビボ (in vivo) および／もしくはイン・ビトロ (in vitro) および／もしくはイクス／ビボ (ex vivo) において遺伝子生成物および／もしくは免疫学的生成物および／もしくは抗体を産生する方法（例えば、イン・ビトロ (in vitro) および／もしくはイクス／ビボ (ex vivo) の場合は、本発明に従って非侵襲性投与を行った宿主から細胞を単離した後、例えば、そのような細胞をさらに拡張した後など）、ならびに、そのような遺伝子および／もしくは免疫学的生成物および／もしくは抗体の使用（診断、アッセイ、治療、処置などを含む）をも包含する。

#### 【0108】

ベクター組成物は、ベクターに適切なキャリヤーもしくは希釈剤を混合することによって調製し；さらに、遺伝子生成物および／もしくは免疫学的生成物および／もしくは抗体組成物は、そのような遺伝子生成物および／もしくは免疫学的生成物および／もしくは抗

10

20

30

40

50

体に適切なキャリヤーもしくは希釈剤を混合することによって同様に調製できる。例えば、米国特許第5,990,091号、WO99/60164号、WO98/00166号およびそれらに引用されている文献、本明細書に引用されているその他の文献、ならびに本明細書のその他の教示（例えば、キャリヤー、希釈剤などに関するものなど）などを参照のこと。

【0109】

そのような組成物においては、組換えベクターは、適切なキャリヤー、希釈剤または賦形剤（滅菌水、生理食塩水、グルコースなど）と混合されている。組成物は凍結乾燥することもできる。組成物は、投与経路および所望する調製法に従って、湿潤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、アジュバント、ゲル化もしくは増粘添加物、保存料、香料、色素などの補助物質を使用できる。「レミントンの薬剤学（REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE）第17版」（1985年）（参照として本明細書中に取り入れておく）などの標準的な教科書に従えば、不要な実験をすることなく適切な調製物が得られる。

10

【0110】

投与する組換えベクターの量は、患者（宿主）および治療すべき状態によって異なり、1もしくは数  $\mu\text{g}$  ~ 数百もしくは数千  $\mu\text{g}$ （例えば、1  $\mu\text{g}$  ~ 1mg、体重1kgあたり約100ng / 日 ~ 100mg / 日、好ましくは体重1kgあたり10pg / 日から10mg / 日）の幅がある。組換えアデノウイルスを投与する場合には、免疫学的、治療的または予防的に有効な投与量は、 $1 \times 10^7$  ~  $1 \times 10^{12}$  個のウイルス粒子もしくはplaques forming unit (pfu) を含んでいる。患者もしくは宿主に対し、遺伝子生成物（例えば、エピトープ、抗原、治療および／もしくは抗体など）の組成物が規定量に達するような量のベクターを非浸潤投与できる。もちろん、本発明は、本明細書に例示している以下および以上の投与量をも包含し、さらに、対象に投与する任意の組成物（それらの構成成分を含む）および任意の特定の投与法のために、毒性ならびに組成物の投与量、構成成分の濃度および投与タイミングを定めておくことが好ましい。毒性については、適切な動物モデル（例えば、マウスなどの齧歯類など）において致死量（LD）および50%致死量（LD50）を測定することにより；ならびに、組成物の投与量、組成物の構成成分の濃度および適切な応答を誘起するための投与のタイミングは、例えば、ELISAおよび／もしくは血清中和分析などの手段による血清の滴定およびそれらの分析などによって決定する。そのような決定事項に関しては、当業者の知識、本明細書の開示および引用文献を利用すれば、不要な実験を要しない。

20

【0111】

組換えベクターは、適量を投与することにより、本明細書および／もしくは本明細書中に引用している文献中に記載している投与量に応じてイン・ビボ（*in vivo*）で発現できる。例えば、ウイルス懸濁液の適切な範囲は実験的に定めることができる。1つ以上の組換え体によって1つ以上の遺伝子生成物が発現される場合には、各組換え体をそのような量で投与でき、または、各組換え体は、それらの量を構成する組換え体の総計として組み合わせて投与できる。

30

【0112】

しかしながら、組成物の投与量、それらの構成成分の濃度、および適切な応答を誘起するための投与のタイミングは、血清中の抗体滴定（例えば、ELISAおよび／もしくは血清中和分析など）などによって決定できる。そのような決定事項に関しては、当業者の知識、本明細書の開示および引用文献を利用すれば、不要な実験を要しない。さらに、連続投与に対する時間についても、本明細書の開示および当業者の知識を利用すれば不要な実験を要せずに確認できる。

40

【0113】

本発明に従う免疫原性または免疫学的組成物は、アジュバントを含む場合がある。適切なアジュバントとしては、fMLP (N-ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン；米国特許第6,017,537号)、ならびに／または、アクリル酸もしくはメタクリル酸ポリマーおよび／もしくは無水マレイン酸とそのアルケニル誘導体とのコポリマーなどが挙げられる。アクリル酸もしくはメタクリル酸のポリマーは、糖もしくはポリアルコール類からなるポリアルケニルエーテル類と橋かけ結合することができる。これらの化合物は、

50

「カルボマー」という名称で知られている(Pharneuropa, 第8巻第2号、1996年6月)。当業者であれば、米国特許第2,909,462号も参照できる(本明細書中に参照として取り入れておく)。該特許は、少なくとも3個のヒドロキシル基を有するポリヒドロキシル化化合物と橋かけ結合したアクリル酸ポリマーについて開示している: 1つの実施態様においては、ポリヒドロキシル化化合物は8個以下のヒドロキシル基を有しており; 別の実施態様においては、少なくとも3個のヒドロキシル基の水素原子が、少なくとも2個の炭素原子を含む不飽和脂肪族ラジカルと置換しており; また別の実施態様においては、ラジカルは約2~約4個の炭素原子を有している(例えば、ビニル類、アリル類およびその他のエチレン性不飽和基など)。不飽和ラジカルは、それ自身が、メチルなどの他の置換基を有する場合がある。Carbopol(登録商標)(ノヴェオン(Noveon)社、アメリカ合衆国オハイオ州)という名称で市販されている製品は、アジュバントとしての使用に非常に適している。該化合物は、アリルシクロロースまたはアリルペンタエリスリトールと橋かけ結合しており、Carbopol 974P、934Pおよび971Pという製品についての報告がある。

10

## 【0114】

マレイン酸無水物とアルケニル誘導体とのコポリマーに関しては、EMA(登録商標)(モンサント(Monsanto)社)について報告があり、それらは、マレイン酸無水物とエチレンとのコポリマーであって、直線または橋かけ結合を形成でき、例えば、ジビニルエーテルと橋かけ結合している。米国特許第6,713,068号およびレゲルソン(Regelson), W.ら、1960年なども参照のこと(参照として本明細書中に取り入れておく)。

20

## 【0115】

四級アンモニウム塩を含む陽イオン性脂質については米国特許第6,713,068号に記載されており(その内容を参照として本明細書中に取り入れておく)、本発明に従う方法および組成物に使用できる。これらの陽イオン性脂質の中でも、RMRIE(N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシクロキシ)-1-プロパンアンモニウム; WO96/34109号)が好ましく、中性脂質、とくにDOPE(ジオレオイル-ホスファチジル-エタノールアミン; ベール(Behr)、J.P.ら、1994年)と優先的に結合し、DMRIE-DOPEを形成する。

30

## 【0116】

組換えワクチンまたは免疫原性もしくは免疫学的組成物は、水中油型エマルションの状態に調製することもできる。水中油型エマルションは、例えば、軽質流動パラフィン(ヨーロッパ薬局方型); イソブレノイド油(スクワラン、スクワレン、EICOSANE(商標)またはテトラテトラコンタンなど); アルケンのオリゴマー化によって得られた油(例えば、イソブテンもしくはデセンなど); 直鎖アルキル基を含む酸またはアルコールのエステル類(例えば、植物油、オレイン酸エチル、プロピレングリコールジ(カプリレート/カブリート)、グリセリルトリ(カブリレート/カブリート)またはプロピレングリコールジオレエートなど); 分岐鎖脂肪酸またはアルコールのエステル類(例えば、イソステアリン酸エステルなど)などを基剤にできる。油は、乳化剤と組み合わせて使用してエマルションを生成することが好ましい。乳化剤としては非イオン性界面活性剤を用いることができ、例えば、ソルビタン、マンニド(mannide)(例えば、アンヒドロマンニトールオレエートなど)、グリセロール、ポリグリセロール、プロピレングリコール、ならびにオレイン酸、イソステアリン酸、リシノオレイン酸、またはヒドロキシステアリン酸のエステル類(以上の化合物は、場合によってはエトキシル化されている)、ならびにポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンコポリマー(例えは、Pluronic(登録商標)製品であるL121など)などが挙げられる。アジュバントは、乳化剤、ミセル形成剤、およびProvax(登録商標)(IDEFファーマシューティカルズ(IDEF Pharmaceuticals)社、カリフォルニア州サンディエゴ)という名称で市販されているような油の混合物である。

40

## 【0117】

組換えアデノウイルス、または、目的の異種核酸を1つもしくはそれ以上発現する組換えアデノウイルスベクター(例えば、本明細書に従うベクターなど)は、安定化剤を加え、液状、約5%、または、凍結乾燥状態において貯蔵および/または保存できる。凍結乾

50

燥は、既知の標準的な凍結乾燥法に従って実施できる。薬剤学的に許容される安定化剤としては、SPGA（シュクロースホスフェートグルタミンアルブミン；ボヴァーニック（Bovarnik）ら、1950年）、炭化水素類（例えば、ソルビトール、マンニトール、ラクトース、シュクロース、グルコース、デキストラン、トレハロースなど）、グルタミン酸ナトリウム（ツヴェコフ（Tsvetkov）, T. ら、1983年；イスラエリ（Israeli）, E. ら、1993年）、ペプトン、アルブミンもしくはカゼインなどのタンパク質、脱脂粉乳などを含むタンパク質（ミルズ（Mills）, C.K. ら、1988年；ウォルフ（Wolff）, E. ら、1990年）、ならびに緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、アルカリ金属リン酸緩衝液など）などが挙げられる。アジュvantおよび/またはビヒクリもしくは賦形剤を用いて凍結乾燥調製物を可溶化できる。

10

## 【0118】

以下の実施例によって本発明をさらに詳述するが、以下の例は本発明の多様な実施態様を例示するためのものであり、いかなる意味においても、本発明を制限するためのものではない。

## 【実施例】

## 【0119】

実施例1：インフルエンザHAを発現する複製欠損性アデノウイルスの作成

インフルエンザHAをコードしている2つのアデノウイルス（Ad）は、AdEasy系を用いて構築した。2003～2004年の流行期用に選択された2種類のインフルエンザウイルス株、A/パナマ/2007/99（H3N2）およびB/香港/330/01は、疾病対策予防センター（The Centers for Disease Control and Prevention: CDC）から供与された。A/パナマ/2007/99 HA遺伝子は、インフルエンザRNAを逆転写することによってクローニングし、次に、以下のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってHA遺伝子を増幅した。

20

## 【表1】

インフルエンザ遺伝子増幅のためのプライマー配列

細胞株	プライマー配列
A/パナマ/2007/99	5'-CACACAGGTACCGCCATGAAGACTATCATGCTTGAGC-3'
	5'-CACACAGGTACCTCAAATGCAAAATGTTGCACC-3'
B/香港/330/01	5'-CACACAGGTACCGCCATGAAGGCAATAATTGTACTAC-3'
	5'-CACACAGGTACCAAGTAGTAACAAAGAGCATTTCAATAACG-3'

30

## 【0120】

これらのプライマーは、A/パナマ/2007/99 HA遺伝子の5'および3'末端にアニールする配列、HA開始ATGコドンのすぐ上流に存在する真核細胞性リボソーム結合部位（コザック（Kozak）1986年）、および連続クローニング用のKpnI部位を有する。HA遺伝子の全長を含むKpnIフラグメントは、サイトメガロウイルス（CMV）初期プロモーターの転写制御下において、pShuttle-CMV（ヒー（He）ら、1998年）のKpnI部位に正しい方向で挿入した。A/パナマ/2007/99 HAをコードしているE1/E3-欠損Adベクター（AdPNM/2007/99.H3）は、AdEasy系を用いてヒト293細胞中で作成した。B/香港/330/01 HA遺伝子をコードしているAdベクター（AdHK330/01.B）は、表1に記載しているプライマー配列を用いて同様に構築した。

40

## 【0121】

両Adベクターは、DNAシークエンスを行うことによって評価し、293細胞内で $10^{11}$ pfu/mlまで増殖させた。A/パナマ/2007/99およびB/香港/330/01に対する血球凝集阻止（HI）抗体は、AdPNM2007/99.H3およびAdHK330/01.Bをそれぞれベクターとするインフルエンザワクチンを鼻内に点滴注入したマウスにおいて誘起された。しかしながら、大腸菌（*E. coli*）BJ5183細胞内で作成した組換えプラスミドを293細胞の代わりにPER.C6細胞にトランسفェクトした場合には、両ベクターとも低い力価（ $< 10^8$ pfu/ml）しか得られなかった。PER.C6で作成したAdPNM2007/99.H3ベクターをモレキュラー・メディシン・バイオ

50

サービス (Molecular Medicine Bioservices) 社 (カリフォルニア州ラホーヤ) に送り、PER.C6細胞内で大量生産したところ、4回拡張後に力価が $2 \times 10^7$ pfu/mlに達した。PER.C6細胞ではAdベクターの力価が上がらないことは、該細胞に本質的に問題があるからではない。なぜならば、発明者ら (未発表の結果) および他の研究者 (ファロー (Fallaux) ら、1998年; ムラカミ (Murakami) ら、2002年) により、pAdAptに基づくシャトルプラスミドから作成されたAdベクターは、PER.C6細胞内で高力価 ( $> 10^{11}$ pfu/ml) に達することが示されているからである。AdEasy系はPER.C6細胞との相性が良くないと考えられ、高力価のRCA不含Adベクターの調製には使用できない。

#### 【0122】

Adをベクターとするインフルエンザワクチンの構築は、AdEasy系を用いなくても従来の鶏卵に依存する調製系より短期間で行えるが、AdEasy系もしくはその等価物を用いることにより、シャトルプラスミドとAd骨格プラスミドとの相同組換えが大腸菌 (E.coli) 細胞内で一晩で行われ、その結果、さらに期間が短縮される。全体としては、従来使用していたAd構築法に代わり、AdEasy系を用いて新規なAdベクター構築するならば、1~2ヶ月の期間短縮が可能になる。この時間節約過程はインフルエンザワクチン製造には意味があり、その理由は、新インフルエンザウイルス株はこの期間内でパンデミックに至るからである。

#### 【0123】

しかしながら、293細胞でのRCAの作出、およびAdEasy系とPER.C6細胞との相性の悪さは、RCA不含のAdベクターの迅速かつ高力価産生に対する障害である。PER.C6細胞内において、AdEasy由来のAdベクターの産生力価が低いことは、pShuttle-CMVベクター内の欠損Ad配列に起因すると考えられる。なぜならば、該細胞内において、pAdApt由来のベクターは高力価で産生され、かつ、RCA不含Adベクターであるからである。AdEasy系とPER.C6細胞との不適合に関与している可能性があるAd配列は、Adヌクレオチドの342番~454番および3511番~3533番内に確認されており、これら2つのセグメントはpAdAptには存在するが (配列はCrucellから提供) pShuttle-CMVにはない。Adヌクレオチドの番号については、クロボチェックの番号付与系 (Chroboczek's numbering system) (クロボチェック (Chroboczek) ら、1992年) に準拠している。pIXプロモーター (バビス (Babiss) およびヴァレス (Vales) 、1991年) は、pAdApt内では完全な形で存在しているが、pShuttle-CMVでは欠損している。キャプシド接着剤としてのpIXは、Ad粒子の安定性に寄与している (ローザ - カラトラーヴァ (Rosa-Calatrava) ら、2001年)。pShuttle-CMVには欠損しているAd配列によってコードされている別の機能もあるはずである。pShuttle-CMVベクターは、大腸菌 (E.coli) BJ5183細胞での相同組換えを介し、pAdApt内の対部分と欠損していると考えられる配列とを置換することによって修復できる。

#### 【0124】

##### 実施例2:pAdHigh の構築

CrucellのシャトルプラスミドpAdAptは、制限酵素SgrAI + EcoRIおよびBstXI + EcoRIをそれぞれ用いて消化した。この操作と平行して、シャトルプラスミドpShuttle-CMVをSgrAI + BstXIで消化した。得られたpAdAptのSgrAI + EcoRIおよびBstXI + EcoRIフラグメントは、3種類の連結法を用い、pShuttle-CMVのSgrAI + BstXI部位に挿入し、複製欠損Adベクターを得た。インフルエンザHA遺伝子 (Adhigh PNM2007 / 99.H3) をコードしている複製欠損Adベクターは、組換えプラスミドをPER.C6細胞内にトランスフェクトすることによって作出了した。細胞変性効果 (CPE) は、トランスフェクトから約7日後に現れ、これは、293細胞内でAdEasy系がCPEを発現するのに要する時間 (ヒー (He) ら、1998年) と同程度であった。

#### 【0125】

##### 実施例3:pAdHigh の構築

欠損配列の修復を目的として、複クローニング部位に隣接しているpShuttle-CMVのCMVプロモーターおよび横に存在するAd配列を1つのユニットとし、相同組換えによってpAdApt由来の対部分と置換したが、これは、これら2つのシャトルプラスミドが広範囲にわた

10

20

30

40

50

って重複配列を共有しているからである。しかしながら、組換え体選択のためには新規なマークーも必要であった。プラスミドpBR322由来のテトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子の全長 (バックマン (Backman) およびボイヤー (Boyer) 、1983年; ペデン (Peden) 、1983年) は、生来のKpnI部位を有するプライマー-5' - GAGCTCGGTACCTTCTCATGTTGACAGCTTATCAT - 3' および 5' - TCTAGAGGTACCAACGCTGCCGAGATGCGCCGCGT - 3' を用い、PCRによって増幅した。増幅したTc遺伝子は、Amp耐性プラスミドであるpAdAptのKpnI部位に挿入して新規なプラスミドpAdApt-Tcを作成したが、これは、増殖培地にAmpおよびTcを添加することによって選択できる。

#### 【0126】

pShuttle-CMV内のAd配列は、高効率AdEasier組換えプロトコール (ゼン (Zeng) ら、2001年) を用い、pAdApt-Tc内の対部分と置換した。概説すると、pShuttle-CMVを大腸菌 (E. coli) BJ5183細胞内に形質転換し、カナマイシン (kan) 耐性の形質転換体を選択した。Kan抵抗性細胞は、すぐにpAdApt-Tcを用いて形質転換し、培養培地にkanおよびTcを添加することによって組換え体を選択した。相同組換えを介して、pAdApt-Tc内の対部分がpShuttle-CMV内の指定されたAd配列と置換した場合にのみ、組換え体は、大腸菌 (E. coli) BJ5183細胞にkanおよびTc耐性を付与できる。得られたpAdHigh プラスミドは、大腸菌 (E. coli) DH10B細胞に形質転換した。続いてDNAシークエンスを行ってプラスミドを確認した。

#### 【0127】

実施例4：インフルエンザHAをコードしているアデノウイルスベクターのAdHigh系を用いた構築

AdPNM2007 / 99.H3ベクター内のA / パナマ / 2007 / 99HA遺伝子を含むKpnIフラグメントをpAdHigh - TcのKpnI部位に挿入することにより、Tc遺伝子を置換した。ゼン (Zeng) らの記載 (2001年) に従い、得られたプラスミドは、大腸菌 (E. coli) BJ5183細胞内のAd骨格プラスミドであるpAdEasy1と組み換えた。HA遺伝子をコードしているAdベクターは、組換えプラスミドをトランスフェクトした後にPER.C6細胞内で生成した。RCAの混入度合は、 $3 \times 10^{11}$  個の細胞からは検出されない程度であった。

#### 【0128】

実施例5：AdApt由来、AdEasy由来、およびAdHigh 由来のアデノウイルスベクターの比較

インフルエンザHA遺伝子をコードしているAdApt由来、AdEasy由来およびAdHigh 由来のアデノウイルスベクターの増殖について、293細胞およびPER.C6細胞で確認した。AdApt、AdEasyおよびAdHigh のいずれか1つを用いて作成したアデノウイルスベクターは、if u対細胞の比が25 : 1になるように約 $10^6$  個の細胞に感染させた。感染後の細胞を2日間凍結した。溶解後、図6に示すように、Adeno-Xタイターキットを用いて溶解物を分析した。データは1個のウェルにおいて産生された力価の平均を表している。AdAptおよびAdHigh によって作成したアデノウイルスベクターは、ベクターをPER.C6細胞または293細胞のいずれで増殖させたかに関係なく、平均感染ユニットに顕著な差は見られなかった。対照的に、AdEasyによって作成したベクターについては、293細胞で増殖させたベクターとPER.C6細胞で増殖させたベクターとの間に顕著な差があり、293細胞で増殖させたベクターの平均感染ユニットは、PER.C6細胞におけるそれと比較した場合に、約3-log低かった。

#### 【0129】

赤血球凝集阻害抗体力価の誘起に関し、AdHigh 由来のアデノウイルスベクターの効果をAdApt由来のアデノウイルスベクターのそれと比較した。ICRマウスは、AdHPNM2007/99.H3 (AdHigh 由来) ベクターまたはAdPNM2007/99.H3 (AdApt由来) ベクターの $2.5 \times 10^8$  if uをそれぞれ経鼻投与することによって免疫した。このとき、各ベクターは同一のインフルエンザHAタンパク質をコードしている。免疫から1ヶ月後、赤血球凝集阻害活性を調べるために血清を回収した。

#### 【0130】

図7に示すように、両ベクターからほぼ同じHI力価が得られたことから、アデノウイル

10

20

30

40

50

スペクターの効果は、AdApt由来のアデノウイルスペクターを使用した場合と比較して、A dHigh 由来のアデノウイルスペクターを用いても低下しないことが示された。

## 【0131】

本発明の好ましい実施態様の詳細について記載してきたが、本発明は、請求項によって規定されるものであり、上述の特定の態様によって範囲を定められるものではないことはあきらかであり、上記の態様の多数の変形も本発明の範疇に含まれる。

## 【参考文献】

## 【0132】

1. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-10. 10
2. Babiss, L. E., and Vales, L. D. (1991). Promoter of the adenovirus polypeptide IX gene: similarity to E1B and inactivation by substitution of the simian virus 40 TATA element. *J Virol* 65, 598-605.
3. Backman, K., and Boyer, H. W. (1983). Tetracycline resistance determined by pBR322 is mediated by one polypeptide. *Gene* 26, 197-203.
4. Baserga, R., and Denhardt, D.T. (eds.) (1992), *Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 600, New York Academy of Sciences, New York, NY. 20
5. Behr, J.P. (1994) Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug Chem.* 5, 382-9.
6. Berk, A.J. (1986) Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Annu Rev Genet.* 20, 45-79.
7. Bovarnick, M.R., Miller, J.C., and Snyder, J.C. (1950) The influence of certain salts, amino acids, sugars, and proteins on the stability of rickettsiae. *J Bacteriol.* 59, 509-22.
8. Brody, S.L., and Crystal, R.G. (1994) Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer. *Ann N Y Acad Sci.* 716, 90-101; discussion 101-3. 30
9. Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* 70, 4805-4810.
10. Chroboczek, J., Bieber, F., and Jacrot, B. (1992). The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 186, 280-285.
11. de la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A., and Ortín, J. (1995) Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol.* 69, 2427-33.
12. Eckstein, F. (eds.) (1992) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, NY. 40
13. Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S., and Enami, M. (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol.* 68, 1432-7.
14. Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., et al. (1998). New

helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9, 1909-1917.

15. Fields, B.N., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E., and Knipe, D.M. (eds) (2001) *Fields – Virology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA.

16. Fortes, P., Beloso, A., and Ortin, J. (1994) Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* 13, 704-12.

17. Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schumperli, D., and Kole, R. (1998) Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4929-34.

10

18. Graham, F. L., and Prevec, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3, 207-220.

19. Guo, Z.S., Wang, L.H., Eisensmith, R.C., and Woo, S.L. (1996) Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 3, 802-10.

20. Havenga, M.J., Lemckert, A.A., Grimborgen, J.M., Vogels, R., Huisman, L.G., Valerio, D., Bout, A., and Quax, P.H. (2001) Improved adenovirus vectors for infection of cardiovascular tissues. *J Virol.* 75, 3335-42.

20

21. He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2509-2514.

22. Hilleman, M. R. (2002). Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 20, 3068-3087.

23. Hoffmann, E., Krauss, S., Perez, D., Webby, R., and Webster, R. G. (2002). Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 20, 3165-3170.

30

24. Jochemsen, A.G., Peltenburg, L.T., te Pas, M.F., de Wit, C.M., Bos, J.L., and van der Eb, A.J. (1987) Activation of adenovirus 5 E1A transcription by region E1B in transformed primary rat cells. *EMBO J.* 6, 3399-405.

25. Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.

26. Krug, R.M. and Soeiro, R. (1975) Studies on the intranuclear localization of influenza virus-specific proteins. *Virology* 64, 378-87.

27. Lu, Y., Qian, X.Y., and Krug, R.M. (1994) The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 8, 1817-28.

40

28. Marwick, C. (2000). Merits, flaws of live virus flu vaccine debated. *JAMA* 283, 1814-1815.

29. Mata, J.E., Joshi, S.S., Palen, B., Pirruccello, S.J., Jackson, J.D., Elias, N., Page, T.J., Medlin, K.L., and Iversen, P.L. (1997) A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of Burkitt's lymphoma cells in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 144, 189-97.

30. McEwan, N.R., and Gatherer, D. (1998) Adaptation of standard spreadsheet software for the analysis of DNA sequences. *Biotechniques* 24, 131-6, 138. 10

31. Milligan, J.F., Matteucci, M.D., and Martin, J.C. (1993) Current concepts in antisense drug design. *J Med Chem.* 36, 1923-37.

32. Mills, C.K., and Gherardi, R.L. (1988) Cryopreservation studies of *Campylobacter*. *Cryobiology* 25, 148-52.

33. Murakami, P., Pungor, E., Files, J., Do, L., van Rijnsoever, R., Vogels, R., Bout, A., and McCaman, M. (2002). A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. *Hum Gene Ther* 13, 909-920. 20

34. Nakamura, Y., Wada, K., Wada, Y., Doi, H., Kanaya, S., Gojobori, T., and Ikemura, T. (1996) Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases. *Nucleic Acids Res.* 24, 214-5.

35. Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., *et al.* (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9345-9350.

36. Nichol, K. L., Lind, A., Margolis, K. L., Murdoch, M., McFadden, R., Hauge, M., Magnan, S., and Drake, M. (1995). The effectiveness of vaccination against influenza in healthy, working adults. *N Engl J Med* 333, 889-893. 30

37. Osterhaus, A.D. and de Vries P. (1992) Vaccination against acute respiratory virus infections and measles in man. *Immunobiology* 184, 180-92.

38. Park, Y.W. and Katze, M.G. (1995) Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem.* 270, 28433-9.

39. Peden, K. W. (1983). Revised sequence of the tetracycline-resistance gene of pBR322. *Gene* 22, 277-280.

40. Pfleiderer, M., Lower, J., and Kurth, R. (2001). Cold-attenuated live influenza vaccines, a risk-benefit assessment. *Vaccine* 20, 886-894. 40

41. Qiu, Y., Krug, R.M. (1994) The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol.* 68, 2425-32.

42. Qiu, Y., Nemeroff, M., and Krug, R.M. (1995) The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA J.* 304-16.

43. Regelson, W., Kuhar, S., Tunis, M., Fields, J., Johnson, J., Gluesenkamp, E. (1960) Synthetic polyelectrolytes as tumour inhibitors. *Nature.* 186, 778-80.

44. Remington, J.P. (1985) REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 17<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, USA. 10

45. Robert, J. J., Gauffeny, I., Maccario, J., Jullien, C., Benoit, P., Vigne, E., Crouzet, J., Perricaudet, M., and Yeh, P. (2001). Degenerated pIX-IVa2 adenoviral vector sequences lowers reacquisition of the E1 genes during virus amplification in 293 cells. *Gene Ther* 8, 1713-1720.

46. Roberts, B.E., Miller, J.S., Kimelman, D., Cepko, C.L., Lemischka, I.R., and Mulligan, R.C. (1985) Individual adenovirus type 5 early region 1A gene products elicit distinct alterations of cellular morphology and gene expression. *J Virol.* 56, 404-13. 20

47. Rosa-Calatrava, M., Grave, L., Puvion-Dutilleul, F., Chatton, B., and Kedinger, C. (2001). Functional analysis of adenovirus protein IX identifies domains involved in capsid stability, transcriptional activity, and nuclear reorganization. *J Virol* 75, 7131-7141.

48. Sambrook, J., Russell, D.W., and Sambrook, J. (2001) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

49. Samstag, W., Eisenhardt, S., Offensperger, W.B., and Engels, J.W. (1996) Synthesis and properties of new antisense oligodeoxynucleotides containing benzylphosphonate linkages. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6, 153-6.

50. Schmid, S.I., and Hearing, P. (1995) Selective encapsidation of adenovirus DNA. *Curr Top Microbiol Immunol.* 199, 67-80. 30

51. Shi, Z., Curiel, D. T., and Tang, D. C. (1999). DNA-based non-invasive vaccination onto the skin. *Vaccine* 17, 2136-2141.

52. Shi, Z., Zeng, M., Yang, G., Siegel, F., Cain, L. J., Van Kampen, K. R., Elmets, C. A., and Tang, D. C. (2001). Protection against tetanus by needle-free inoculation of adenovirus-vectorized nasal and epicutaneous vaccines. *J Virol* 75, 11474-11482.

53. Strauss-Soukup, J.K., Vaghefi, M.M., Hogrefe, R.I., Maher, L.J., 3rd. (1997) Effects of neutralization pattern and stereochemistry on DNA bending by methylphosphonate substitutions. *Biochemistry*. 36, 8692-8. 40

54. Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., *et al.* (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279, 393-396.

55. Telling, G.C., Perera, S., Szatkowski-Ozers, M., and Williams, J. (1994) Absence of an essential regulatory influence of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein on viral growth and early gene expression in human diploid WI38, HeLa, and A549 cells. *J Virol.* 68, 541-7.

56. Tinsley, J.M., Potter, A.C., Phelps, S.R., Fisher, R., Trickett, J.I., and Davies, K.E. (1996) Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384, 349-53. 10

57. Tooze, J. (1980) DNA Tumor Viruses (Part 2): Molecular Biology of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

58. Tsvetkov, T., and Brankova, R. (1983) Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* 20, 318-23.

59. van Ginkel, F.W., McGhee, J.R., Liu, C., Simecka, J.W., Yamamoto, M., Frizzell, R.A., Sorscher, E.J., Kiyono, H., and Pascual, D.W. (1997) Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T helper cell responses to the vector and to its transgene. *J Immunol.* 159, 685-93. 20

60. Van Kampen, K. R., Shi, Z., Gao, P., Zhang, J., Foster, K. W., Chen, D. T., Marks, D., Elmets, C. A., and Tang, D. C. (2005). Safety and immunogenicity of adenovirus-vectorized nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans. *Vaccine*.

61. Vincent, N., Ragot, T., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Chafey, P., Gregoire, A., Briand, P., Kaplan, J.C., Kahn, A., and Perricaudet, M. (1993) Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nat Genet.* 5, 130-4. 30

62. von der Thusen, J.H., Fekkes, M.L., Passier, R., van Zonneveld, A.J., Mainfroid, V., van Berkel, T.J., and Biessen, E.A. (2004) Adenoviral transfer of endothelial nitric oxide synthase attenuates lesion formation in a novel murine model of postangioplasty restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 357-62.

63. Wang, T.T., Cheng, W.C., and Lee, B.H. (1998) A simple program to calculate codon bias index. *Mol Biotechnol.* 10, 103-6.

64. White, E., Denton, A., and Stillman, B. (1988) Role of the adenovirus E1B 19,000-dalton tumor antigen in regulating early gene expression. *J Virol.* 62, 3445-54. 40

65. Wolff, E., Delisle, B., Corrieu, G., and Gibert, H. (1990) Freeze-drying of *Streptococcus thermophilus*: a comparison between the vacuum and the atmospheric method. *Cryobiology* 27, 569-75.

66. Xiang, Z. Q., Yang, Y., Wilson, J. M., and Ertl, H. C. J. (1996). A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 219, 220-227.

67. Zeng, M., Smith, S. K., Siegel, F., Shi, Z., Van Kampen, K. R., Elmets, C. A., and Tang, D. C. (2001). AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination. *Biotechniques* 31, 260-262.

68. Zhu, J., Grace, M., Casale, J., Chang, A. T., Musco, M. L., Bordens, R., Greenberg, R., Schaefer, E., and Indelicato, S. R. (1999). Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 10, 113-121.

10

20

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0 1 3 3】

【図1】pShuttle-CMVシャトルプラスミドのプラスミド地図。

【図2】pAdAptシャトルプラスミドのプラスミド地図。

【図3】pShuttle-CMVシャトルプラスミドとpAdAptシャトルプラスミドとの相同組換えの図。pShuttle-CMVはカナマイシン（Kan）耐性遺伝子をコードしており、pAdApt-Tcはアンピシリン（Amp）耐性およびテトラサイクリン（Tc）耐性の遺伝子をコードしている。組換え体のみがKanおよびTcの両者に対して抵抗を示す。プラスミド内の個々のセグメントは特殊な色素でラベルし、特定の彩色凡例によって示される。

【図4】pAdHigh シャトルプラスミドのプラスミド地図。

【図5】pAdHighプラスミドおよびAd骨格プラスミドを用いた組換えAdベクターの構築を図式的に示した図。

【図6】アデノウイルスベクターの増殖を示すグラフ。AdApt由来、AdEasy由来、AdHigh由来の各ベクターは、それぞれインフルエンザHA遺伝子をコードしており、培養は293細胞およびPER.C6細胞内で行った。

【図7】赤血球凝集素阻害抗体価の誘起におけるAdHigh 由来およびAdApt由来のアデノウイルスベクターの効果を示すグラフ： 配列番号1はアデノウイルス血清型5型のヌクレオチド番号1～454番をさす； 配列番号2は、アデノウイルス血清型5型のヌクレオチド番号3511～5796番をさす； 配列番号3は、アデノウイルス血清型5型のヌクレオチド番号3511～6095番をさす； 配列番号4は、アデノウイルス血清型5型のヌクレオチド番号34931～35935番をさす。

【図2】

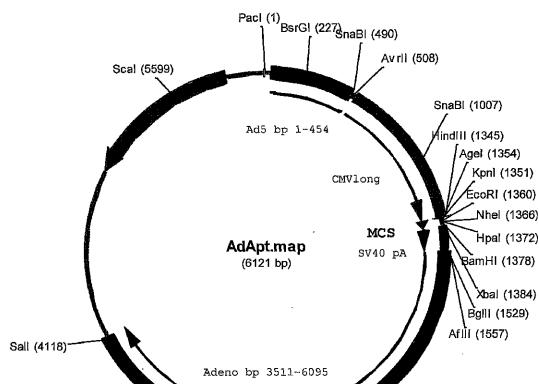


Figure 2

【図3】

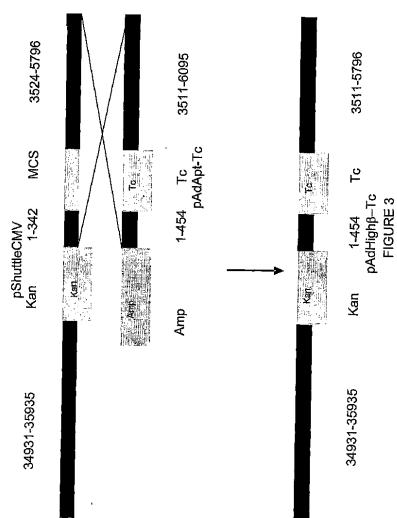
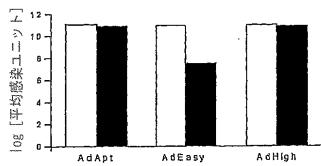


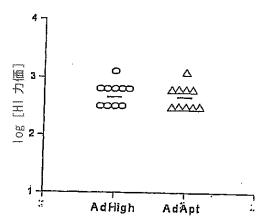
FIGURE 3

【図6】

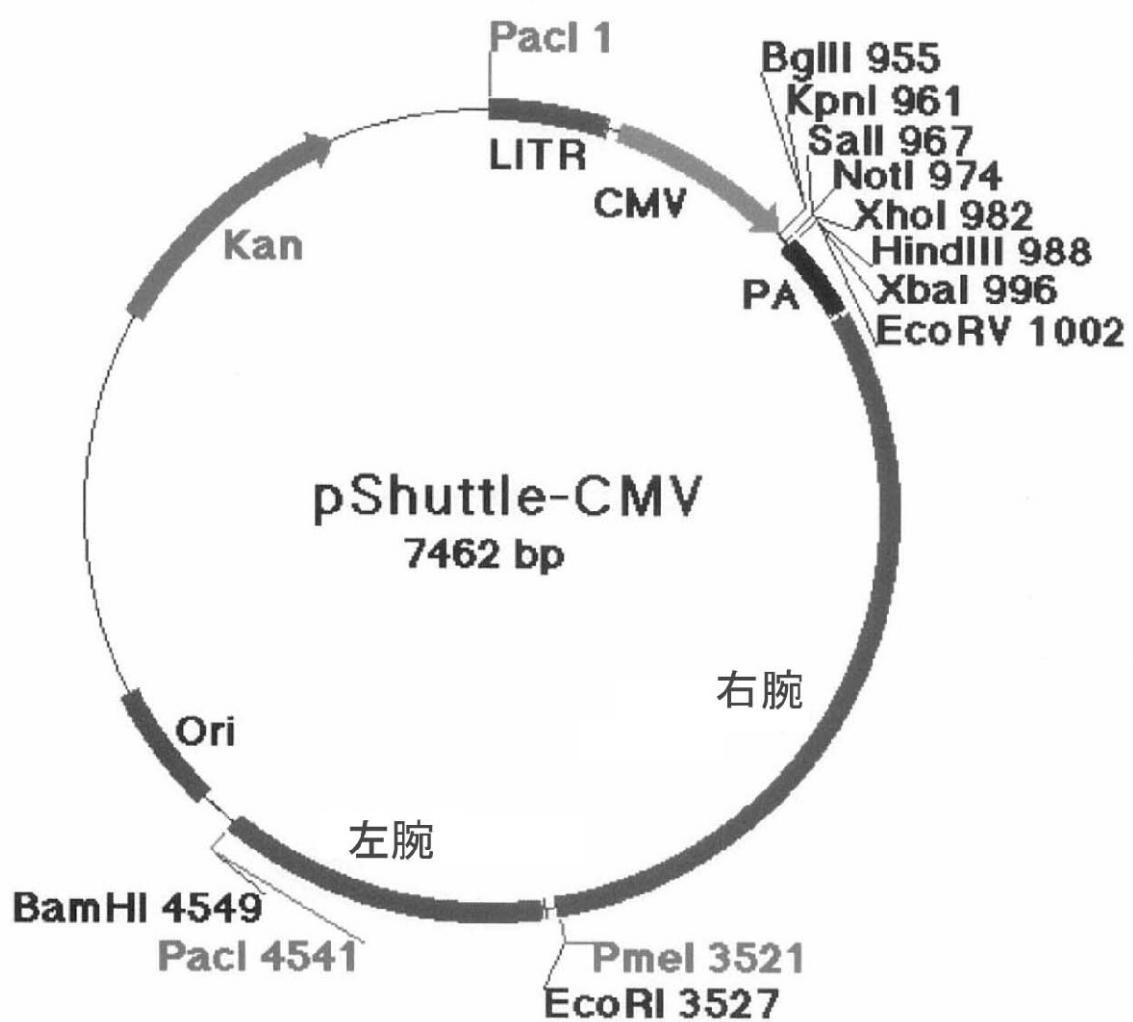
□ 293 細胞内にパッケージング  
■ PER. C6 細胞内にパッケージング



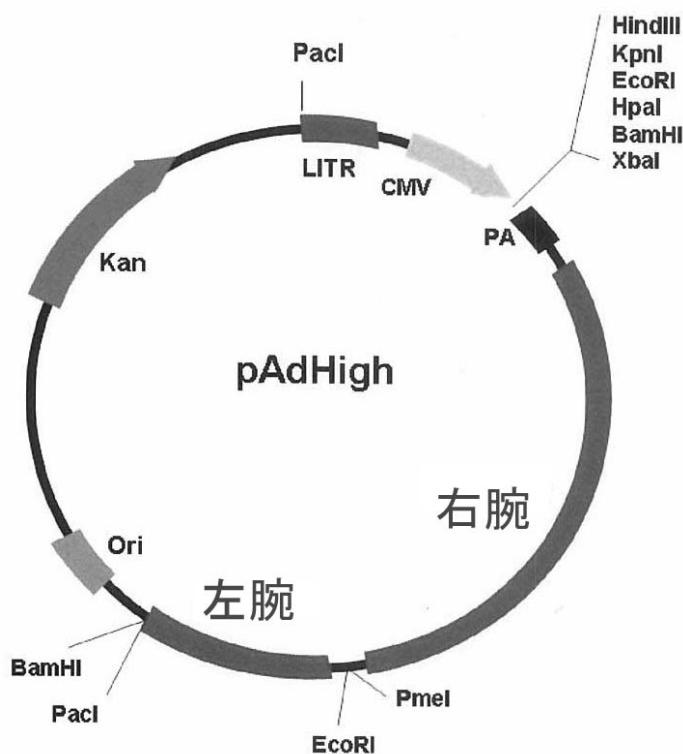
【図7】



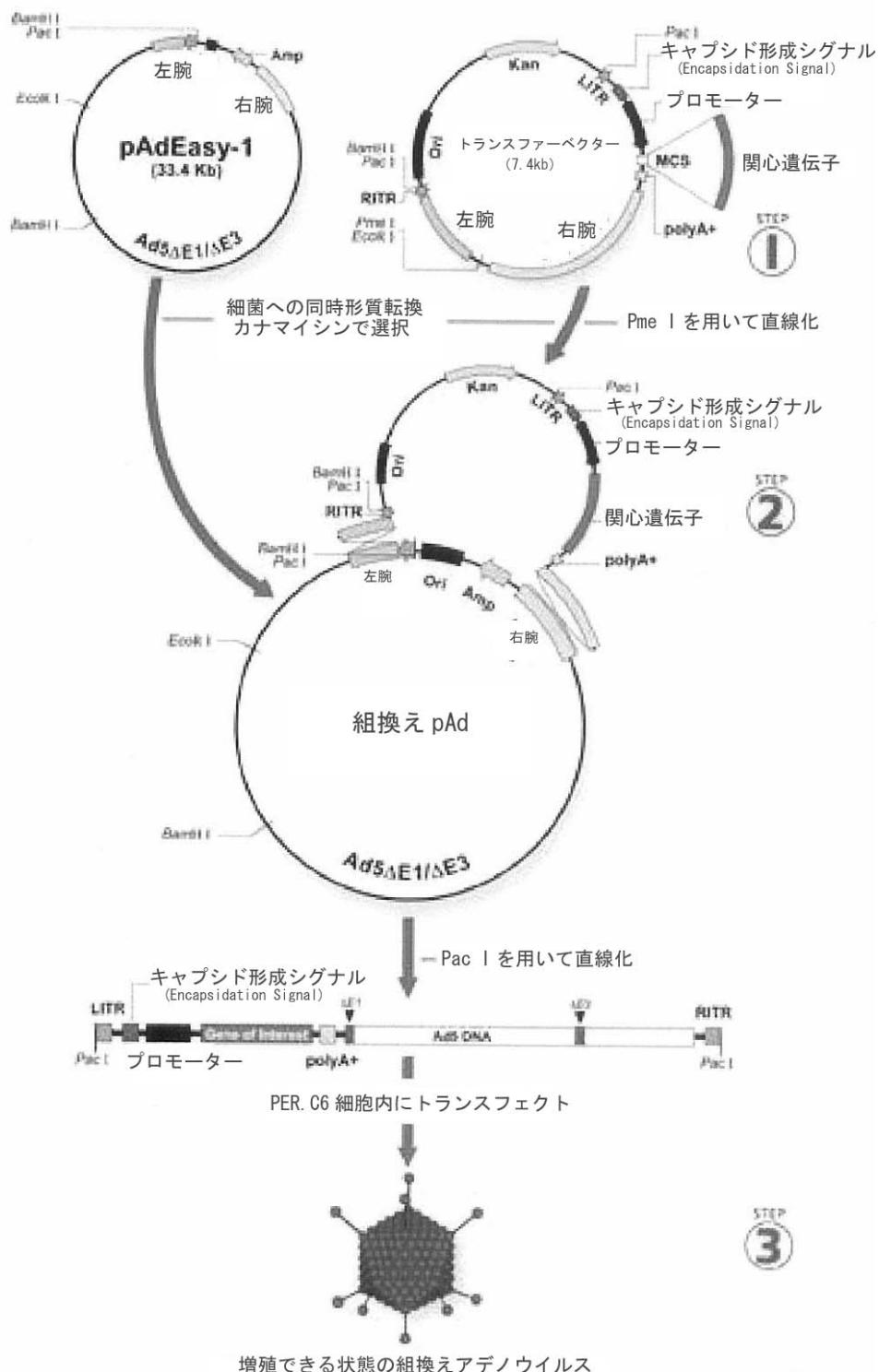
【図1】



【図4】



【図5】



## 【配列表】

2008541730000001.xml

## 【手続補正書】

【提出日】平成20年4月14日(2008.4.14)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008541730000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/20350
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:		
a. type of material <input checked="" type="checkbox"/> a sequence listing <input type="checkbox"/> table(s) related to the sequence listing		
b. format of material <input checked="" type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form		
c. time of filing/furnishing <input checked="" type="checkbox"/> contained in the international application as filed <input type="checkbox"/> filed together with the international application in electronic form <input type="checkbox"/> furnished subsequently to this Authority for the purposes of search		
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments:		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 06/20350
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8)- C12Q 1/64 (2007.01) USPC- 435/91.4 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 435/91.4		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 435/93.2, 424/199.1		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPA) Search terms: pAdEasy, pAdApt, influenza vaccine, replication competent, adenovirus		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,922,576 A (HE et al.) 13 July 1999 (13.07.1999), claim 24, col 5 ln 34-36, col 7 ln 26-31, col 8 ln 32-62 and col 9 ln 17-52;	1-69
Y	US 2005/0084480 A1 (BDUT et al.) 21 April 2005 (21.04.2005), Fig. 7 and para [0147],	1-69
Y	US 6,287,571 B1 (ERTI et al.) 11 September 2001 (11.09.2001), abstract, col 7 ln 34-51, col 8 ln 13-33, col 8 ln 66 - col 9 ln 8, col 10 ln 41-58 and col 11 ln 43-61	37-66
Y	US 5,976,552 A (VOLVOVITZ et al.) 02 November 1999 (02.11.1999), abstract, col 3 ln 43-46, col 3 ln 62-64 and col 12 ln 10-32	41-66
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  17 April 2007 (17.04.2007)	Date of mailing of the international search report  <b>20 AUG 2007</b>	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4900 PCT OSP: 571-272-7774	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 39/145 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/145	
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76	
<b>A 6 1 P 31/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/16	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,L,R,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 タン, デ - チュー シー

アメリカ合衆国 アラバマ州 35209 バーミンガム ピーコン パークウェイ ウエスト  
500 ケアオブ ヴァクシン インコーポレイテッド

(72) 発明者 ディアン, ジエンフォン

アメリカ合衆国 アラバマ州 35209 バーミンガム ピーコン パークウェイ ウエスト  
500 ケアオブ ヴァクシン インコーポレイテッド

(72) 発明者 ヴァン カムペン, ケント アール

アメリカ合衆国 アラバマ州 35209 バーミンガム ピーコン パークウェイ ウエスト  
500 ケアオブ ヴァクシン インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA02 DA02 DA06 EA02 EA04 FA02 FA07 GA11

HA03 HA17

4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA45  
4C085 AA03 BA55 BA77 CC08 DD23 DD62 EE06  
4C087 AA01 AA04 BC83 CA08 NA14 ZB33