

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4814800号  
(P4814800)

(45) 発行日 平成23年11月16日(2011.11.16)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/075 (2006.01)

C O 7 K 14/075

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 1

A 6 1 K 39/235 (2006.01)

A 6 1 K 39/235

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 K 35/76

請求項の数 28 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-550042 (P2006-550042)  
 (86) (22) 出願日 平成17年1月18日(2005.1.18)  
 (65) 公表番号 特表2007-518414 (P2007-518414A)  
 (43) 公表日 平成19年7月12日(2007.7.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/000558  
 (87) 国際公開番号 W02005/071093  
 (87) 国際公開日 平成17年8月4日(2005.8.4)  
 審査請求日 平成19年9月13日(2007.9.13)  
 (31) 優先権主張番号 60/538,799  
 (32) 優先日 平成16年1月23日(2004.1.23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501209427  
 イステイチュート・デイ・リチエルケ・デ  
 イ・ビオロジア・モレコラーレ・ピ・アン  
 ジエレッティ・エツセ・ピー・アー  
 イタリア国、イー・〇・〇・四・〇・ボメツイア  
 (ローマ)、ピア・ポンテーナ・キロメ  
 トロ・三〇・六〇〇  
 (74) 代理人 100062007  
 弁理士 川口 義雄  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠  
 (74) 代理人 100140523  
 弁理士 渡邊 千尋  
 (74) 代理人 100119253  
 弁理士 金山 賢敦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チンパンジーアデノウイルスワクチン担体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1 ; 及び

(b) (a) の配列に相補的な配列

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する、単離されたチンパンジー核酸。

【請求項 2】

配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列であって、アデノウイルス E 1、E 2 及び E 4 からなる群から選択される少なくとも 1 個の遺伝子が機能的に欠失するよう改変された前記ヌクレオチド配列を有する核酸；及び

哺乳動物細胞においてその導入遺伝子の発現を支配する調節配列に操作可能に連結された、少なくとも 1 個の免疫原をコードする導入遺伝子

を含む、複製欠損チンパンジーアデノウイルス (C h A d) ベクター。

【請求項 3】

アデノウイルス E 1、E 2 及び E 4 からなる群から選択される少なくとも 1 個の遺伝子に対応するヌクレオチド配列が欠失している、請求項 2 に記載の複製欠損 C h A d ベクター。

【請求項 4】

E 1 の機能的欠失により特徴付けられる、請求項 2 に記載の複製欠損 C h A d ベクター。

【請求項 5】

E 1 及び E 3 の機能的欠失により特徴付けられる、請求項 2 に記載の複製欠損 C h A d ベクター。

【請求項 6】

配列番号 1 に含まれる E 1 スクレオチド配列中 b p 4 6 0 ～ b p 3 5 4 2 の領域が欠損／破壊されている、請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の複製欠損 C h A d ベクター。

【請求項 7】

前記ベクターが、H I V、H B V、H C V、H P V、H S V 1、H S V 2、S A R S C o V、L e i s h m a n i a m a j o r (リーシュマニア・メジャー)、P l a s m o d i u m m a l a r i a e (四日熱マラリア原虫)、エボラウイルス、ウエストナイルウイルス、デング熱ウイルス、インフルエンザ A、インフルエンザ B 及び M y c o b a c t e r i u m t u b e r c o l o s i s (マイコバクテリウム・テュバキュローシス) からなる群から選択される導入遺伝子を含む、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の C h A d ベクター。

【請求項 8】

前記ベクターが、配列番号 1 に含まれる E 1 スクレオチド配列中 b p 4 6 0 ～ b p 3 5 4 2 の領域で欠損／破壊されており、該ベクターがさらに、少なくとも 1 個の癌関連抗原 (T A A) をコードする導入遺伝子を含む、請求項 6 に記載の C h A d ベクター。

【請求項 9】

少なくとも 1 個の T A A が、H E R 2 N E U、C E A、E P C A M、P S A、P S M A、テロメラゼ、G P 1 0 0、M E L A N - A / M A R T - 1、M U C - 1、N Y - E S O - 1、サバイピン、ストロメリシン 3、チロシナーゼ、M A G E 3、C M L 6 8、C M L 6 6、O Y - T E S - 1、S S X - 2、S A R T - 1、S A R T - 2、S A R T - 3、N Y - C O - 5 8、N Y - B R - 6 2、H K L P 2、5 T 4 及び V E G F R 2 からなる群から選択される、請求項 8 に記載の C h A d ベクター。

【請求項 10】

E 1 a、E 1 b、E 2 a、E 2 b、E 4 o r f s 1、2、3、4、5、6、6 / 7、p I X、I V a 2、領域 L 1、L 2、L 3、L 4、L 5 からなる群から選択される、1 以上のアデノウイルス領域を発現し、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の複製欠損 C h A d ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスベクターをアデノウイルス E - 1 発現ヒト細胞に導入することと、得られるアデノウイルスを回収することと、を含む、複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクターを生成させる方法。

【請求項 12】

前記ヒト細胞が、2 9 3 細胞又は P E R . C 6 <sup>T M</sup> 細胞である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 2 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の複製欠損 C h A d ベクターを含む、ワクチン組成物。

【請求項 14】

配列番号 1 に記載のスクレオチド配列を有する核酸を含むアデノウイルス E 1 発現ヒト細胞であって、該配列番号 1 に含まれる E 1 スクレオチド配列中 b p 4 6 0 ～ b p 3 5 4 2 の領域が欠損／破壊されている、前記アデノウイルス E 1 発現ヒト細胞。

【請求項 15】

哺乳動物において抗原特異的免疫反応を増強するための、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の C h A d ベクターを含む組成物であって、増強反応を誘発するのに十分な量の前記 C h A d ベクターを含む、前記組成物。

【請求項 16】

前記 C h A d ベクターが、その E 1 遺伝子の完全欠失を含む、請求項 1 5 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 17】

前記 ChAd ベクターが、その E1 遺伝子の完全欠失を含み、さらに該ベクターが、その E3 遺伝子の欠失を含む、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 18】

前記増強された免疫反応が、HIV、HBV、HCV、HPV、HSV1、HSV2、SARS CoV、Leishmania major（リーシュマニア・メジャー）、Plasmodium malariae（四日熱マラリア原虫）、エボラウイルス、ウエストナイルウイルス、デング熱ウイルス、インフルエンザ A、インフルエンザ B 及び Mycobacterium tuberculosis（マイコバクテリウム・テュバキユローシス）からなる群から選択される感染物質由来の抗原に特異的である、請求項 15 または 16 に記載の組成物。

10

## 【請求項 19】

前記免疫反応が、TAA に特異的な増強免疫反応である、請求項 15 または 16 に記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記増強された免疫反応が、抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞の産生を含む、請求項 15、16 または 19 に記載の組成物。

## 【請求項 21】

未処置哺乳動物において免疫反応を誘発するための、請求項 2～6 のいずれか 1 項に記載の ChAd ベクターを含む組成物であって、一次免疫反応を誘発するのに十分な量の前記 ChAd ベクターを含む、前記組成物。

20

## 【請求項 22】

前記一次免疫反応が、HIV、HBV、HCV、HPV、HSV1、HSV2、SARS CoV、Leishmania major（リーシュマニア・メジャー）、Plasmodium malariae（四日熱マラリア原虫）、エボラウイルス、ウエストナイルウイルス、デング熱ウイルス、インフルエンザ A、インフルエンザ B、または Mycobacterium tuberculosis（マイコバクテリウム・テュバキユローシス）からなる群から選択される感染物質由来の抗原に特異的である、請求項 21 に記載の組成物。

## 【請求項 23】

前記免疫反応が、前記哺乳動物が寛容性を有する TAA に特異的な一次免疫反応である、請求項 21 に記載の組成物。

30

## 【請求項 24】

(a) 抗原特異的免疫反応が望まれる感染物質抗原をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む、該感染物質抗原に反応させるよう宿主に初回刺激を行うための第一のワクチン組成物；及び

(b) 少なくともその E1 遺伝子の機能的欠失、及び該 E1 遺伝子欠失の部位において、前記第一の初回刺激用組成物で送達される同じ感染物質抗原をコードする DNA の発現を支配することが可能であるプロモーター配列を含む、請求項 4 に記載の ChAd ベクターを含む、前記免疫反応を追加免疫するための第二のワクチン組成物

40

を含む、混合様式組成物であって、

前記第二の追加免疫用ワクチン組成物が、防御的免疫を付与する効果を有する免疫反応を誘発することを特徴とし、

HIV、HBV、HCV、HPV、HSV1、HSV2、SARS、Leishmania major（リーシュマニア・メジャー）、Plasmodium malariae（四日熱マラリア原虫）、エボラウイルス、ウエストナイルウイルス、デング熱ウイルス、インフルエンザ A、インフルエンザ B 及び Mycobacterium tuberculosis（マイコバクテリウム・テュバキユローシス）からなる群から選択される感染物質由来の抗原に対して免疫反応を誘導するための、前記混合様式組成物。

## 【請求項 25】

50

(a) 抗原特異的免疫反応が望まれる自己抗原をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む、該自己抗原に対して反応させるよう宿主に初回刺激を行い、それによって一次反応を誘発するための第一のワクチン組成物；及び

(b) 少なくともそのE1遺伝子の機能的欠失を含み、該E1遺伝子欠失の部位において、前記第一の初回刺激用組成物で送達される同じ自己抗原をコードするDNAの発現を支配することが可能であるプロモーター配列を含む、請求項4に記載のChAdベクターを含む、前記初回刺激された免疫反応を追加免疫するための第二のワクチン組成物

を含む、混合様式組成物であって、

前記第二の追加免疫用ワクチン組成物が、自己抗原に対する宿主の寛容性を打破する効果を有する免疫反応を誘発することを特徴とする、

自己抗原に対する宿主寛容性を打破するための、前記混合様式組成物。

#### 【請求項26】

ChAdベクターが、HER2、NEU、CEA、HEPCAM、PSA、PSMA、テロメラゼ、GP100、MELAN-A/MART-1、MUC-1、NY-ESO-1、サバイビン、ストロメリシン-3、チロシナーゼ、MAGE3、CML68、CML66、OY-TES-1、SSX-2、SART-1、SART-2、SART-3、NY-CO-58、NY-BR-62、HKLP2、5T4及びVEGFR2からなる群から選択される、自己抗原をコードするDNAを含む、請求項25に記載の混合様式組成物。

#### 【請求項27】

前記第一のワクチン組成物が、電気的刺激と組み合わせて筋肉内に投与されるプラスミドDNAを含む、請求項24または25に記載の混合様式組成物。

#### 【請求項28】

前記免疫反応が、抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の産生を含む、請求項24または25に記載の混合様式組成物。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

関連出願の相互参照

本願は、参照により本明細書中に組み込む、2004年1月23日提出の、米国仮出願第60/538,799の優先権を主張する。

#### 【0002】

本発明は、組み換えベクターの分野、とりわけ、哺乳動物宿主において免疫反応を誘発するための組み換え複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクターの産生及び使用に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

アデノウイルス(Ad)は、エンベロープのない20面体のキャプシド構造を有する、両性類、鳥類及び哺乳動物において見出される2本鎖DNAウイルスの大きなファミリーを含む(Straus, Adenovirus infections in humans. Adenoviruses. 451-498, 1984; Hierholzerら、J. Infect. Dis., 158:804-813, 1998; Schnurr及びDondero, Intervirology., 36:79-83, 1993; Jongら、J. Clin Microbiol., 37:3940-3945:1999)。レトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、宿主細胞のゲノムに組み込まれることなく、分裂細胞及び非分裂細胞の両方を含む、いくつかの哺乳動物種の多数の細胞タイプに形質導入することができる。

#### 【0004】

一般に、アデノウイルスDNAは、通常、非常に安定で、形質転換又は腫瘍形成が起こらない限り、エピソーム性のままである(例えば染色体外性)。さらに、アデノウイルス

10

20

30

40

50

ベクターは、臨床グレードの組成物の製薬規模の産生に容易に持って行くことができる、よく分かっている産生系において高収量に増殖させることができる。これらの特性及びそれらのよく調べられている分子遺伝学により、組み換えアデノウイルスベクターは、ワクチン担体としての使用のための優れた候補となっている。通常、組み換えアデノウイルスベクターの産生は、非機能的となるように欠失されている又は加工されているアデノウイルス遺伝子産物の機能を補完することができるパッケージング細胞株の使用に依存している。

#### 【0005】

現在、性質がよく調べられている2種類のヒトサブグループCアデノウイルス血清型（つまりhAd2及びhAd5）が、遺伝子治療のために使用される殆どのアデノウイルスベクターに対するウイルス骨格のソースとして広く使用されている。複製欠損ヒトアデノウイルスベクターに対してまた、様々な感染物質（例えば、ウイルス、寄生生物又は細菌病原体）及び、腫瘍関連抗原（TAA）を含む腫瘍細胞由来の様々な免疫原送達のためのワクチン担体としての試験が行われている。

#### 【0006】

実験動物（例えば、げっ歯類、サル及び非ヒト哺乳動物）において行われた研究から、ヒトパピローマウイルス（HPV-16）のE6及びE7癌タンパク質（He、Zら、（2001）*Virology*, 270:3583-3590）、狂犬病ウイルス糖タンパク質（Xiang, Zら、（1996）*Virology*, 219:220-227）、*Plasmodium falciparum*（熱帯熱マラリア原虫）のスポロゾイト周囲タンパク質（Rodriguez, Eら、（1997）*J. Immunol.* 158:1268-1274）ならびにその他の異種抗原由来の免疫原をコードする導入遺伝子を担う組み換え複製欠損ヒトアデノウイルスベクターが、その導入遺伝子産物に対する液性及び細胞性免疫反応の両方を誘導することが示されている。一般には、研究者らは、免疫反応を誘発すると予想される組み換えアデノウイルスベクターの高用量を用いる免疫付与プロトコルを用いて、又は、追加免疫付与として、異なる血清型由来であるが同じ導入遺伝子産物を担うアデノウイルスベクターの連続投与を利用する免疫付与プロトコルを用いることのいずれかにより、非ヒト実験系においてワクチン担体としてヒトアデノウイルスベクターを使用して、成功を報告している（Mastrangeliら、*Human Gene Therapy*, 7:79-87（1996））。

#### 【0007】

しかし、2型及び5型などの、遍在性ヒト血清型由来のワクチン担体は、ヒト集団において既存の液性及び細胞性免疫に直面すると予想されている。したがって、複製欠損組み換えヒトアデノウイルスが、成功裡にワクチン担体としてげっ歯類、サル及び非ヒト霊長類宿主を用いた実験系で利用されているにもかかわらず、ヒトの先天的及び適応的免疫により、ワクチン担体としてのこれらの血清型の利用が著しく制限されると予想される。この予想は、2型及び5型を含むサブグループCのアデノウイルス感染が、ヒト集団において固有であるという事実に基づくものである。その結果、大部分のヒトで、自然感染の結果として、生まれてから最初の5年間のうちに血清転換が起こっている。したがって、ヒトにおいて自然に感染し複製するウイルス由来のベクターは、ワクチン担体としての使用に対して最適な候補ではない可能性がある。

#### 【0008】

ヒトアデノウイルス由来ベクターの使用に関する別の問題は、組み換えウイルスを増殖させるために使用される産生方法により、複製可能なアデノウイルス（RCA）が混入しているベクターストックを生じるというリスクである。これは、ヒト293細胞などのE1補完ヘルパー細胞株において存在する、組み換えベクターとアデノウイルス遺伝子との重複配列間の相同組み換えにより起こる（Graham, F. L. ら（1977）*J. Gen. Virol.* 36:59-72）。臨床試験での使用のために調製されたベクターストックにおけるRCAの存在は、複製欠損ウイルスの移行及び拡大を促進する可能性があるため、安全性リスクの一要素である。欠損ウイルスの拡大により、宿主免疫反応が拡

10

20

30

40

50

大され、他の不都合な免疫病理学的結果を生じる可能性がある (Fallux, F. J. ら、Human Gene Therapy 9:1909-1917 (1998))。したがって、Food and Drug Administration (食品医薬品局) (FDA) 及びその他の規制機関は、臨床での使用を意図されるベクター調製物中に存在し得る R C A のレベルにおける制限を確立するガイドラインを広めてきた。R C A 制限を課す意図は、臨床試験で使用される組成物中での複製するアデノウイルスへの患者の曝露を確実に制限することにある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

10

したがって、引き続き、操作しやすく、製薬スケールに持って行きやすく、長期保存でき、ヒトの補完的細胞株で高レベルで複製することができ、免疫原性が高く、ヒトアデノウイルスの共通血清型と交差反応する中和 B 細胞エピトープを欠いており、規制当局により広められている安全性 R C A 基準に合致し、ヒトでの使用に適切な初回刺激／追加免疫に使用できる、ヒト宿主での使用に適したアデノウイルスワクチン担体の開発が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、チンパンジーアデノウイルス由来の組み換え複製欠損アデノウイルスベクター及びヒト E 1 発現細胞株においてチンパンジーアデノウイルスベクターを生成させるための方法に関する。本発明はまた、ヒトにおける使用に適切な臨床グレードのベクターストックを生成させるための方法及び、防御的及び／又は治療的免疫反応を誘発するために、開示するベクターをワクチン担体として使用するための手段を提供する。本発明はさらに、免疫原をコードする導入遺伝子を送達し、発現を支配するように設計されたワクチン組成物を調製するための、本発明の組み換えアデノウイルスを使用するための方法を提供する。ある実施形態において、本発明は、感染物質由来の免疫原をコードする導入遺伝子を含むワクチン投与のための、ワクチン担体としての、開示するベクターの使用をもくろむ。第二の実施形態において、本発明は、癌ワクチンを調製及び投与するための、開示するベクターの使用をもくろむ。特定の実施形態において、本発明は、T A A をコードする導入遺伝子を含む癌ワクチンの調製及び投与をもくろむ。

20

30

【0011】

ある局面において、本発明は、本明細書中で、ChAd3 (配列番号 1) (図 5 A-5 K)、ChAd6 (配列番号 2) (図 6 A-6 K)、CV32 (配列番号 3) (図 7 A-7 K)、CV33 (配列番号 4) (図 8 A-8 K) 及び CV23 (配列番号 5) (図 9 A-9 J) と呼ばれる、5 種類のチンパンジーアデノウイルス (ChAd) の完全ゲノム配列を開示する。

【0012】

ChAd3 及び ChAd6 は、本明細書中で開示する方法に従い単離された新規アデノウイルスを表す。ChAd3 及び ChAd6 のゲノムは、それぞれ 37741 及び 36648 塩基対の長さである。この ChAd3 ヘキソン遺伝子 (配列番号 41) は、配列番号 1 のヌクレオチド (nt) 19086 から 21965 (停止コドンを除く。) を含有し、ChAd3 繊維遺伝子 (配列番号 42) は、配列番号 1 の nt 32805 から 34487 (停止コドンを除く。) を含有する。ChAd6 ヘキソン遺伝子は、配列番号 2 の nt 18266-21124 (配列番号 43) (停止コドンを除く。) を含有し、その繊維遺伝子 (配列番号 44) は、配列番号 2 の nt 32218 から 33552 (停止コドンを除く。) を含有する。全長ヘキソンペプチドの多配列アラインメントから推定される配列相同性に基づき、ChAd3 は、ヒトサブグループ C に分類され、ChAd6 は、ヒトサブグループ E に分類される。

40

【0013】

CV32、CV33 及び CV23 アデノウイルスのゲノムは、それぞれ、36, 606

50

、36, 535及び32, 020塩基対の長さである。CV32 (Pan6) (ATCC N. VR-592)、CV33 (Pan7) (ATCC N. VR-593) 及びCV23 (Pan5) (Esoterix Inc., ) は、全て、ヒトAd4 (hAd4) に関連することが分かっている (サブグループE) (Wigand, Rら、Intervirology 1989, 30: 1-9)。しかし、ヘキソン配列アラインメントに基づいて、CV32は、その後、hAd4よりも、ヒトサブグループDメンバーに密接に類似するものとして特徴付けられた。

#### 【0014】

第二の局面において、本発明は、本明細書中で開示する方法に従い単離された21種類のさらなるチンパンジーアデノウイルス (ChAd20、ChAd4、ChAd5、ChAd7、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd8、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82) の繊維及びヘキソン遺伝子に対するヌクレオチド配列を提供する。

10

#### 【0015】

ChAd20、ChAd4、ChAd5、ChAd7、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19に対する繊維遺伝子ヌクレオチド配列は、それぞれ図10から図19に記載されており、本明細書中で、配列番号6から15 (配列番号6、ChAd20) ; (配列番号7、ChAd4) ; (配列番号8、ChAd5) ; (配列番号9、ChAd7) ; (配列番号10、ChAd9) ; (配列番号11、ChAd10) ; (配列番号12、ChAd11) ; (配列番号13、ChAd16) (配列番号14、ChAd17) 及び (配列番号15、ChAd19) と呼ばれる。

20

#### 【0016】

ChAd8、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82に対する繊維遺伝子ヌクレオチド配列は、本明細書中で (配列番号58、ChAd8)、(配列番号60、ChAd22)、(配列番号62、ChAd24)、(配列番号64、ChAd26)、(配列番号66、ChAd30)、(配列番号68、ChAd31)、(配列番号70、ChAd37)、(配列番号72、ChAd38)、(配列番号74、ChAd44)、(配列番号76、ChAd63) 及び (配列番号78、ChAd82) と呼び、配列リストに記載する。

30

#### 【0017】

ChAd20、ChAd4、ChAd5、ChAd7、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19に対するヘキソン遺伝子ヌクレオチド配列は、図21-30にそれぞれ記載され、本明細書中で、配列番号16から25 : (配列番号16、ChAd20) ; (配列番号17、ChAd4) ; (配列番号18、ChAd5) ; (配列番号19、ChAd7) ; (配列番号20、ChAd9) ; (配列番号21、ChAd10) ; (配列番号22、ChAd11) ; (配列番号23、ChAd16) ; (配列番号24、ChAd17) 及び (配列番号25、ChAd19) と呼ぶ。

40

#### 【0018】

ChAd8、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82に対するヘキソン遺伝子ヌクレオチド配列は、本明細書中で、(配列番号97、-ChAd8)、(配列番号99、ChAd22)、(配列番号101、ChAd24)、(配列番号103、ChAd26)、(配列番号105、ChAd30)、(配列番号107、ChAd31)、(配列番号109、ChAd37)、(配列番号111、ChAd38)、(配列番号113、ChAd44)、(配列番号115、ChAd63) 及び (配列番号117、ChAd82) と呼び、配列リストに記載する。

#### 【0019】

50

第三の局面において、本発明は、本明細書中で開示する方法に従い単離された、21種類のさらなるチンパンジーアデノウイルス（ChAd20、ChAd4、ChAd5、ChAd7、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd8、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82）の繊維及びヘキソントタンパク質に対するアミノ酸配列を提供する。

#### 【0020】

本明細書中で開示され主張される繊維タンパク質は、（配列番号83、ChAd3）、（配列番号84、ChAd6）、（配列番号48、ChAd20）、（配列番号49、ChAd4）、（配列番号50、ChAd5）、（配列番号51、ChAd7）、（配列番号52、ChAd9）、（配列番号53、ChAd10）、（配列番号54、ChAd11）、（配列番号55、ChAd16）、（配列番号56、ChAd17）、（配列番号57、ChAd19）、（配列番号59、ChAd8）、（配列番号61、ChAd22）、（配列番号63、ChAd24）、（配列番号65、ChAd26）、（配列番号67、ChAd30）、（配列番号69、ChAd31）、（配列番号71、ChAd37）、（配列番号73、ChAd38）、（配列番号75、ChAd44）、（配列番号77、ChAd63）及び（配列番号79、ChAd82）と呼ばれる。図20Aから20Gは、本明細書中で開示され主張される繊維タンパク質のアミノ酸配列を、C1（配列番号85）、CV68（配列番号86）、Pan5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号80）、Pan6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号81）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号82）の繊維タンパク質のアミノ酸配列と比較するアラインメントを提供する。

#### 【0021】

本明細書中で開示され主張されるヘキソントタンパク質は、（配列番号122、ChAd3）、（配列番号123、ChAd6）、（配列番号87、ChAd20）、（配列番号88、ChAd4）、（配列番号89、ChAd5）、（配列番号90、ChAd7）、（配列番号91、ChAd9）、（配列番号92、ChAd10）、（配列番号93、ChAd11）、（配列番号94、ChAd16）、（配列番号95、ChAd17）、（配列番号96、ChAd19）、（配列番号98、ChAd8）、（配列番号100、ChAd22）、（配列番号102、ChAd24）、（配列番号104、ChAd26）、（配列番号106、ChAd30）、（配列番号108、ChAd31）、（配列番号110、ChAd37）、（配列番号112、ChAd38）、（配列番号114、ChAd44）、（配列番号116、ChAd63）及び（配列番号118、ChAd82）と呼ばれる。図31Aから31Jは、本明細書中で開示され主張されるヘキソントタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、Pan5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、Pan6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）のヘキソントタンパク質のアミノ酸配列との比較を与える。ヘキソントタンパク質の多配列アラインメントにより、熟練者は、ヒトアデノウイルス血清型の提案される分類に従う系統発生解析を行うことが可能となる（Rux, J. J. ら、（2003）J. Virol. 77 : 9553-9566）。

#### 【0022】

代替的局面において、本発明はさらに、21種類のさらなるチンパンジーアデノウイルス分離株を提供する。ChAd20、ChAd4、ChAd5、ChAd7、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17及びChAd19を含有する試料を、Budapest Treatyのもと、オリジナル委託物として、European Collection of Cell Cultures（ECACC、Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdom）により、2003年12月12日に委託した。この委託物に対して、次の受託番号が割り当てられた：03121201（ChAd4）、03121

202 (ChAd5)、03121203 (ChAd7)、03121204 (ChAd9)、03121205 (ChAd10)、03121206 (ChAd11)、03121207 (ChAd16)、03121208 (ChAd17)、03121209 (ChAd19) 及び 03121210 (ChAd20)。

【0023】

ChAd8、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63 及び ChAd82 を含有する試料を、Budapest Treaty のもと、オリジナル委託物として、ECC (Prton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdom) により、2005 年 1 月 12 日に委託した。これらの委託物に対して、次の受託番号が割り当てられた：05011201 (ChAd8)、05011202 (ChAd22)、05011203 (ChAd24)、05011204 (ChAd26)、05011205 (ChAd30)、05011206 (ChAd31)、05011207 (ChAd37)、05011208 (ChAd38)、05011209 (ChAd44)、05011210 (ChAd63) 及び 05011211 (ChAd82)。

【0024】

これらの委託物は、International Recognition of the Deposit of Microorganisms of the Purposes of Patent Procedure における Budapest Treaty の条項に従い維持される。これらの委託物は、当業者に対する便宜としてのみ、なされたものであり、委託物が 25 U. S. C. § 112 のもとで要求されることの承認ではない。特許の付与において、37 C. F. R. § 1. 808 (b) において規定される要件を除き、委託した物質の公共に対する利用可能性における制限は全て、変更不能に取り除かれる。

【0025】

さらなる局面において、本発明はまた、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞に感染することができ、コードされる導入遺伝子産物の発現を支配することができる、複製欠損組み換えアデノウイルスベクターを提供する。本明細書中で示されるように、開示するベクターは、免疫反応が望まれる免疫原を含有する導入遺伝子の送達に対する使用のためのワクチン担体としての使用に適する。特定の実施形態において、本発明は、ヒト E1 発現（つまりパッケージング）細胞株において高レベルで複製することができる、組み換え複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクターを提供する。ある実施形態において、本発明は、PER. C6<sup>TM</sup> 細胞において複製できる組み換えアデノウイルスを提供する。

【0026】

一般に、本発明に包含される組み換えベクターは、ヒト集団において一般に直面させられるアデノウイルス血清型に対して既存の免疫を回避するワクチン担体を提供する。とりわけ、本発明の組み換えベクターは、本明細書中で、ヒトアデノウイルス由来ベクターの共通血清型と交差反応する中和 B エピトープを欠いていることが示される、ベクター骨格配列を含有する。

【0027】

本発明はさらに、アデノウイルス部分及びプラスミド部分を含み、該アデノウイルス部分が通常、a) ウイルス左端 (ITR 及びパッケージングシグナル)、pIX 遺伝子の一部及びウイルスゲノム右端と；b) 遺伝子発現カセットと、を含む、群特異的シャトルベクターを提供する。この群特異的シャトルベクターは、同じ血清型サブグループ（つまり、サブグループ A、B、C、D 又は E）に割り当てられ、本明細書中で開示されるヌクレオチド配列を操作するために、及び／又は、E1 領域を欠くチンパンジーアデノウイルスゲノムを含有するアデノウイルスプレプラスミドを生じる、同じサブグループに属する他のチンパンジーアデノウイルスをクローニングするために、使用することができるアデノウイルスの間で観察される、ヌクレオチド配列相同性を活用するように設計されている。

## 【0028】

本発明の他の局面には、アデノウイルスワクチンベクター及び／又はアデノウイルスプラスミドベクターを含有する宿主細胞が含まれ、該ベクターの生成方法には、アデノウイルスワクチンベクターを、アデノウイルスE1タンパク質を発現する宿主細胞に導入することと、得られたアデノウイルスワクチンベクターを回収することと、が含まれる。特定の実施形態において、本発明は、アデノウイルスE1発現ヒト細胞に、開示するアデノウイルスベクターの1つを導入することと、得られた組み換えアデノウイルスを回収することと、を含む、複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクターを生成する方法を提供する。

## 【0029】

本発明の別の局面はまた、本発明のアデノウイルスベクターを含有するワクチン組成物を提供する。組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターを含有する組成物は、単独で、又はその他のウイルス性もしくは非ウイルス性ベースのDNA／タンパク質ワクチンと組み合わせて、投与し得る。これらはまた、幅広い治療計画の一部として投与し得る。これらの組成物は、予防的又は治療的設定のいずれかで、哺乳動物宿主、好ましくはヒト宿主に投与することができる。本明細書中で示されるように、初回刺激追加免疫計画又は血清学的に区別されるAdベクターの複数回注射など、単独又は組合せ方式での開示するワクチン組成物の投与の結果、その導入遺伝子によりコードされる免疫原を特異的に認識することができる、哺乳動物における免疫反応が誘導される。

## 【0030】

本明細書中で開示され主張される方法の1つは、少なくとも、その野生型E1遺伝子の機能的欠失を含有し、少なくとも1個の標的抗原をコードするヌクレオチド配列の発現を支配することができるプロモーターを含む配列を担う、組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターの十分量を、哺乳動物（未処置又は標的抗原に対して免疫活性となるように初回刺激されているもののいずれか）に投与することを含み、本組み換えベクターの投与が抗原特異的免疫反応を誘発（又は刺激）する。

## 【0031】

ある実施形態において、本発明は、感染物質に対して免疫反応（予防的又は治療的）を誘導するように設計された方法を提供する（例えば、ウイルス性もしくは細菌病原体又は哺乳動物寄生生物）。第二の実施形態において、本発明は、TAAなどの、自己抗原に対する寛容性を打破する、哺乳動物において免疫反応を誘導するように設計された方法を提供する。本発明のこの局面は、癌ワクチンの調製及び投与のための、ワクチン担体としての、開示するベクターの使用をもくろむ。

## 【0032】

本発明のさらに他の実施形態及び長所は、次の本発明の詳細な説明から容易に明らかとなる。

## 【0033】

本発明の詳細な説明

本明細書及び添付の請求項の範囲を通して使用される場合、次の定義及び略語が適用される。

## 【0034】

「カセット」という用語は、その転写及び翻訳調節配列に従って発現されるべき、少なくとも1個の核酸配列を含有する核酸分子を指す。カセットを変化させることにより、様々な配列及び配列の組合せの発現を支配するために組み込まれるベクターが生じる。本発明との関連において、本カセットに存在する核酸配列は通常、免疫原をコードする。5'及び3'末端に存在するように操作された制限部位のために、本カセットを容易に挿入、除去又は別のカセットで置換することができる。

## 【0035】

「cis作用エレメント」という用語は、遺伝子を制御するヌクレオチド配列に連結されるヌクレオチド配列を指す。DNAに存在するcis作用エレメントは、転写を制御し

10

20

30

40

50

、mRNAに転写されたものは、RNAプロセッシング、ターンオーバー及びタンパク質合成を制御することができる。

【0036】

「ベクター」という用語は、宿主生物又は宿主組織にDNA断片を導入することができる、ある手段を指す。プラスミド、ウイルス（アデノウイルスを含む。）、バクテリオファージ及びコスミドを含む、様々なタイプのベクターがある。

【0037】

「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼが結合する、DNA鎖上の認識部位を指す。プロモーターは、転写活性を開始し、駆動させるために、RNAポリメラーゼと開始複合体を形成する。本複合体は、エンハンサーなどの活性化配列又はサイレンサーなどの抑制配列により修飾され得る。

10

【0038】

「医薬的有效量」という用語は、宿主細胞に形質導入し、免疫反応を誘発するための導入遺伝子発現の十分なレベルを与える、特定の投与経路において効果的な、組み換えアデノウイルスの量を指す。

【0039】

「複製能のある」組み換えアデノウイルス（AdV）という用語は、原型を保つ、又は機能的な必須初期遺伝子（つまり、E1A、E1B、E2A、E2B及びE4）を有するアデノウイルスを指す。野生型アデノウイルスは、複製能がある。

【0040】

20

「複製欠損」組み換えAdVという用語は、ウイルス複製に必須の遺伝子産物を、少なくとも機能的に欠損する、又は完全除去されるように加工されているため、複製ができないようにされているアデノウイルスを指す。本発明の組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターは、複製欠損である。

【0041】

「哺乳動物」という用語は、ヒトを含む、あらゆる哺乳動物を指す。

【0042】

核酸配列との関連における、「%配列同一性」又は「同一」という用語は、最大一致に対して並べた場合に同じである、2つの配列における残基を指す。配列同一性比較の長さは、そのゲノムの全長（例えば約36kbp）、遺伝子のオープンリーディングフレームの全長、タンパク質、サブユニット又は酵素〔例えば、アデノウイルスコード領域を与える表を参照のこと。〕又は少なくとも約500から5000ヌクレオチドの断片にわたり得、それが望ましい。しかし、より小さい断片（例えば、少なくとも約9ヌクレオチド、通常は少なくとも約20から24ヌクレオチド、少なくとも28から32ヌクレオチド、少なくとも36以上のヌクレオチド）の間での同一性もまた望ましい。同様に、「%配列同一性」は、タンパク質の全長にわたる、又はその断片にわたるアミノ酸配列に対して容易に決定し得る。適切であるものとして、断片は、少なくとも約8アミノ酸の長さであり、約700アミノ酸以下であり得る。適切な断片の例を本明細書中で述べる。

30

【0043】

初期設定で本明細書中で定義されるようなアルゴリズム及びコンピュータープログラムを用いて、同一性が容易に決定される。好ましくは、このような同一性は、タンパク質、酵素、サブユニットの全長にわたるか、又は少なくとも約8アミノ酸の長さの断片にわたる。しかし、同一性は、同一遺伝子産物が置かれている使用に適した、より短い領域に基づくものであり得る。

40

【0044】

一般に、アデノウイルスコンストラクト、遺伝子コンストラクトは、本明細書中に含有される遺伝子を参照して名付ける。例えば、「pChAd3 ΔE1 gag」は、E1領域が欠失している、ChAd3 チンパンジーアデノウイルスゲノムを含有するプラスミドコンストラクトを指す。このプラスミドにおいて、E1領域は、ヒトCMVプロモーターと、次いでウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルの調節下でHIV gag 遺伝子を

50

含有する免疫原発現カセットにより置換される。同様に、pCV33DE1-E3 NSmutは、E1及びE3領域が欠失しており、ヒトCMVプロモーターと、次いでウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルの調節下において、HCV非構造遺伝子を含む免疫原発現カセットで置換されている、CV33 チンパンジーアデノウイルスゲノムを含有する、本明細書中で開示される第二のプラスミドコンストラクトを指す。

**【0045】**

略語「Ag」は抗原を指す。

**【0046】**

本明細書及び添付の請求項の範囲を通して使用される場合、単数体「a」、「an」及び「the」は、文脈において明確に示されない限り、複数形の意味を含む。

10

**【0047】**

アデノウイルス (Ad) は、いくつかの鳥類及び哺乳動物宿主において同定されている、エンベロープがない20面体のウイルスである。ヒトAd (hAd) は、全ての既知のヒト及び動物の多くのAd系を含む (例えば、ウシ、ブタ、イヌ、マウス、ウマ、サル及びヒツジ)、マストアデノウイルス属に属する。ヒトアデノウイルスは、ラット及びアカゲザル赤血球の赤血球凝集特性、DNA相同性、制限酵素切断パターン、G+C含量の割合及び発癌性を含む、多くの、生物学的、化学的、免疫学的及び構造的基準に基づいて、6個のサブグループ (AからF) に分けられる (Straus, 1984, Adenoviruses, H. Ginsberg編, pps. 451-498, New York: Plenus Press及びHorwitz, 1990 Virology, B. N. Fields及びD. M. Knipe編, pps. 1679-1721)。今日までに、51種類の異なる血清型が認識され、これらの赤血球凝集特性及び生物物理的及び生化学的基準に基づき、サブグループにグループ分けされている。

20

**【0048】**

アデノウイルスビリオンは、20面体で対称であり、血清型によって、60から90 nmの直径である。この20面体キャプシドは、3つの主要なタンパク質、ヘキソン (II)、ペントンベース (III) 及びノブ付き繊維 (IV) ならびに、多くの少量のタンパク質 (つまり、VI、VII、IX、II Ia及びIV a2) からなる (W. C. Russell, J. Gen. Virol., 81: 2573-2604 (2000))。ヒトにおいて観察される、既存の免疫のある局面は、液性免疫であり、この結果、ウイルスタンパク質に対して特異的な抗体が産生され持続され得る。アデノウイルスにより誘発される液性反応は主に、主要な構造タンパク質：ヘキソン、ペントン及び繊維に対するものである。

30

**【0049】**

公表されている報告から、複数の血清型に対する抗体を含有するタイターが共通であること (Dambrosio, E. (1982) J. Hyg. (London) 89: 209-219) 及び既存のタイターの大部分が、中和活性を有することが、分かっている。アデノウイルスに対する中和免疫は、タイプ特異的であり、アデノウイルスの特定の血清型による感染により、その血清型のみに対する免疫が与えられる。いくつかの報告から、ヘキソンに対して向けられる抗体が、最強であり、最も中和能力が高いことが示唆されている (Toogood, C. I. A., Crompton, J. 及びHay R. T. (1992) J. Gen. Virol. 73, 1429-1435)。したがって、タイプ特異的中和に関与するエピトープが、様々な血清型由来のヘキソン配列のアラインメントにより同定される7個の超可変領域に位置すると仮定することは、理にかなっている (Crawford-Miksza, L及びD. P. Schnurr (1996) J. Virol. 70: 1836-1844)。

40

**【0050】**

タイプ特異的中和抗体の存在と、同じ血清型に基づくベクターにより免疫反応を誘発できないこととの間の正相関は、未処置動物への処置動物からの免疫血清の受動転移を含む、様々な方法により分かっている。一般に、特異的なウイルス血清型に対して既存の液性

50

免疫により、ベクター投与の治療効率が低下する。さらに、特異的ウイルス血清型に基づくベクターの投与により、同じ血清型の再投与を防御する、ベクターに対する免疫反応が誘発される。

#### 【0051】

特定の実施形態において、本発明は、h A dの共通血清型に対する既存の免疫の結果に付随する不都合な影響を回避する方法を提供する。とりわけ、本発明は、ヒトにおいて回避しない血清型を特徴とするチンパンジーアデノウイルスベクターの使用をもくろむ。したがって、本発明は、ワクチン担体として、共通ヒト血清型と交差反応する中和B細胞エピトープを欠く、アデノウイルス（C h A d）ベクターを提供する。

#### 【0052】

アデノウイルス特異的細胞性免疫（C M I）が、交差反応性であり得ることが報告されているが、複数血清型の繰り返し注射に基づくワクチン接種実験が、1個のベクターを用いた免疫付与スケジュールよりも高い効率であることが示されている。これらの実験はさらに、ワクチン目的のベクター投与の主な制限が、そのベクターに対する液性の既存の免疫であることを示す。ワクチン担体としてのヒトアデノウイルスの使用に付随する問題を解決することができる可能性のある方法には、既存の免疫反応に直面することが予想される、アデノウイルスのさらに高用量の投与（例えば、サブグループC血清型）及び稀少なヒト血清型に基づくベクターの使用が含まれる。しかし、ワクチンの用量を高くして使用することにより、ワクチンのコストが上昇し、望ましくない副作用のリスクが増加し、前臨床試験の結果から、ヒトの代替的血清型は、h A d 5及びh A d 6よりも免疫原性が低いことが示唆されている。

#### 【0053】

本ベクターのアデノウイルス骨格エレメントに対する宿主の液性及び細胞性免疫反応の問題を回避する、及び複製能のあるアデノウイルス（R C A）が混入し得るヒトアデノウイルス由来ベクターストックの使用のリスクを最小化する試みにおいて、いくつかの非ヒトアデノウイルスの特徴が調べられ、ワクチン担体として開発されている（S o u d o i s, C ら（2000）J. V i r o l o g y, 74:10639-10649; F a r i n a, S. F ら（2001）J. V i r o l o g y, 75:11603-11613; C o h e n, C. J. ら（2002）J. G n e. V i r o l o g y, 83:151-155）。既存の免疫に関連する問題を回避するための非ヒトアデノウイルス配列の使用に内在する前提は、共通ヒトアデノウイルス血清型に対する中和抗体が非ヒトウイルスを交差中和しないと思われる観察に基づくものである。しかし、ウイルス及び細胞性の要因の不適合により、非ヒト細胞株で増殖させなければならないという欠点を特徴とする、代替的ベクター系（ウシ、ヒツジ、イヌ）の大部分に対して、実用上の限界がある。

#### 【0054】

W i l s o n らは、チンパンジーの腸間膜リンパ節からもともと単離された、チンパンジーアデノウイルス タイプ68（C V 68）C 68に基づく複製欠損ベクターの特性を述べる報告を公表し（B a s n i g h t, M ら（1971）A m. J. E p i d m i o l. 94:166-171）、C V 68は、完全に配列決定され、ヒトアデノウイルスと全体的な構造が類似していることが分かった（F a r i n a, S. F ら、J. V i r o l. 75（23）:11603-11613（2001））。このウイルスのゲノムは、36,521塩基対の長さであり、ヒトアデノウイルスのサブグループEと、最も類似しているものとして述べられており、配列決定されたヒトA d 4オープンリーディングフレームの殆どと90%の同一性がある。C V 68 I T Rは、130塩基対の長さであり、主要なアデノウイルスの初期及び後期遺伝子の全てが存在する。C V 68は、ヒトにおいて循環せず、共通ヒト血清型のものと交差反応する中和B細胞エピトープを欠く血清型を特徴とする。チンパンジーアデノウイルスがヒトアデノウイルスと類似しているにもかかわらず、チンパンジー血清型に対する交差反応性中和免疫は、ヒトにおいて立証されていない（F a r i n a, S. F. ら、J. V i r o l. （2001）75（23）:11603-13）。

## 【0055】

CV68由来の組み換えベクターは、コクサッキーウイルス及びアデノウイルス受容体を発現する細胞の形質導入を支持するのに十分にヒト血清型と類似であるものとして述べられている（Cohen, Cら、J. Gen. Virol. 83:151-155 (2002)）。注目に値すべきは、CV68が、ヒトアデノウイルス5型からのE1を含有するその複製293細胞を支持するのに十分なレベルでヒトアデノウイルスと類似していることを特徴とすることである（Farina, S. F. ら、J. Virol. 75 (23):11603-11613 (2001)）。さらに、ヒト血清型5E1の隣接配列が、CV68由来ベクター配列のそれと非相同的であるという観察から、相同組み換えは起こらないと予想される。したがって、CV68由来ワクチンストックにRCAが混入する可能性は低いと推測される。

10

## 【0056】

同じ研究者グループは、続いて、マウスにおける、狂犬病ウイルス糖タンパク質に対する抗体の誘導のためのワクチン担体としての、CV68由来アデノウイルス配列の使用を報告した。CV68の複製欠損体は、E1A及びE1B遺伝子をミニジーンカセットで置換することにより作製された。狂犬病ウイルス糖タンパク質をコードする導入遺伝子産物を含有するE1欠失含有アデノウイルス組み換え体（AdC68rab. gp）で免疫付与したマウスは、狂犬病ウイルスに対する防御免疫を生じ、別の狂犬病ウイルスの致死用量を用いた病原体付与に対して耐性を保持した（Xiang, Zら、J. Virol. 76 (5):2667-2675 (2002)）。HIV-1のgagのコドン最適化した短縮型を発現する、第二のCV68コンストラクトは、最近、マウスにおいて活発なgag-特異的CD8<sup>+</sup>T細胞反応を誘導することが報告された。ワクチン誘導反応は、ワクシニアgag組み換えウイルスを用いた病原体投与に対して防御を与えることが示された（Fitzgerald, J. C. ら、J. Immunol. 170:1416-1422 (2003)）。CV68gag又はAd5gagベクターを用いて、ヒトアデノウイルス血清型5に対して前もって免疫付与したマウスの実験的ワクチン接種から、CV68ワクチンによるものよりも、Ad5によって誘発されるウイルス病原体付与に対して、gag特異的T細胞及び防御が顕著に低下することが示された。C68gagワクチンの効率の低下は、Ad5特異的CD8<sup>+</sup>T細胞（Id）の交差反応性により生じた。

20

## 【0057】

このデータと合わせて考えると、サル由来複製欠損アデノウイルスベクターが、共通ヒト血清型に基づくベクターよりも、ヒトワクチン担体としての使用により適している可能性があることが示唆される。本明細書中で示されるように、ヒトAd5（図36）に対して強く免疫付与されたマウスを、ChAd3-gagアデノウイルスベクターで免疫付与できるという実験結果から、既存の抗ヒトAd5免疫が、ChAdベクターにより誘発されるgag特異的CMI反応を低下させなかったことが示される。これらの結果は、ヒトAd5交差反応性B及びT細胞エピトープが、ChAd3又はChAd6ベクターにおいて存在しないという結論と合致する。

30

## 【0058】

一般に、アデノウイルスゲノムは、よく調べられており、いくつかの異なる血清型が存在するにもかかわらず、特異的機能が同じように位置しつつアデノウイルスゲノムの全体的構成において、いくつかの共通の保存がある。Wilsonらにより開示されたチンパンジーアデノウイルス C1及びCV68のヌクレオチド配列及び各ウイルスのE1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4及びL5遺伝子の位置は、米国特許第6,083,716号（Chimpanzee Adenovirus Vectors）及びPCT公開出願WO03/000851（Methods for Rapid Screening of Bacterial Transformants and Novel Simian Adenoviral proteins.）により与えられる（これらの教示は、参照により本明細書中に組み込む。）。

40

## 【0059】

50

アデノウイルスゲノムの端部には、逆方向末端反復（I T R）として知られている配列が含まれ、これは、ウイルス複製に必要である。ウイルスはまた、ウイルスコードプロテアーゼを含有し、これは、感染性ビリオンを生成するのに必要とされる構造タンパク質の一部のプロセッシングに必要である。アデノウイルスゲノムの構造は、宿主細胞の形質導入後、ウイルス遺伝子が発現される順番で述べられる。より具体的には、ウイルス遺伝子は、転写がDNA複製開始の前に起こるか、後に起こるかに従い、初期（E）又は後期（L）遺伝子と呼ばれる。形質導入の初期において、アデノウイルスのE 1、E 2、E 3及びE 4遺伝子が、ウイルス複製に対して宿主細胞を準備するために発現される。このウイルスは、ウイルスゲノムの必須の初期領域1（E 1）を欠失させることにより、複製欠損にされ得る。Brodyら、1994 Ann NY Acad Sci., 716:90-101。後期の間、ウイルス粒子の構造要素をコードする、後期遺伝子L 1-L 5の発現のスイッチが入る。後期遺伝子は全て、1個のプロモーターの調節下となり、ペントン（L 2）、ヘキソン（L 3）、100kDa 足場タンパク質（L 4）及び繊維タンパク質（L 5）を含むタンパク質をコードし、これらは、アデノウイルスDNAがキャプシド化されるようになる、新しいウイルスを形成する。ウイルスの血清型に依存して、1個の宿主細胞において、10,000から100,000の子孫アデノウイルス粒子が生じ得る。最終的に、アデノウイルス複製プロセスにより、細胞溶解が起こる。

10

#### 【0060】

本明細書中で開示される複製欠損アデノウイルスベクターは、開示されているチンパンジー核酸配列からの特定のヌクレオチド配列の欠失により、及び導入遺伝子の挿入、発現又はその他の遺伝子操作に有用な他のDNA配列由来の配列の挿入により構築される。したがって、本明細書中で述べる組み換えチンパンジーアデノウイルスは、1又は複数のチンパンジーアデノウイルス由来のアデノウイルス配列又はチンパンジーアデノウイルスもしくはヒトアデノウイルス由来の配列を含有し得る。適切なポリヌクレオチド配列は、組み換えにより、合成により、又は天然ソースから単離して、作成され得る。本発明の特定の局面における使用に適切なアデノウイルス配列には、共通ヒト血清型と交差反応する中和B細胞エピトープを欠失している配列が含まれる。

20

#### 【0061】

最低限、本発明の組み換えチンパンジーアデノウイルス（例えばベクター）は、少なくとも1個の免疫原発現カセットと組み合わせて、複製及びビリオンのキャプシド化に必要なチンパンジーアデノウイルス cis作用エレメントを含有する。通常、このcis作用エレメントは、少なくとも1個の抗原をコードする導入遺伝子を含む発現カセットに隣接する。より具体的に、本発明のベクターは、アデノウイルスの、不可欠なcis作用5'逆方向末端反復（I T R）配列（これは、複製の開始点として機能する。）、3' I T R配列、パッケージング／エンハンサードメイン及び異種分子をコードするヌクレオチド配列を含有する。本発明のベクターは、組み換えベクターが、最少のアデノウイルス配列のみを含有するか、特定遺伝子における機能的欠失（例えばE 1及び／又はE 3又はE 4領域）のみがある全体のアデノウイルスゲノムを含有するかに関わらず、チンパンジーアデノウイルスキャプシドを含有する。

30

#### 【0062】

一般に、本明細書中で開示するアデノウイルスベクターは、複製欠損アデノウイルスゲノム（このアデノウイルスゲノムは、機能的E 1遺伝子を持たない。）と；a）免疫反応が望まれる少なくとも1個の免疫原をコードする核酸と、b）該免疫原をコードする核酸配列と機能可能に連結された異種（つまり、アデノウイルス配列に関して）プロモーターとを含有する免疫原発現カセットと；転写終結因子と、を含有する。

40

#### 【0063】

より具体的には、本発明は、E 1、E 2、E 3及びE 4からなる群から選択される、少なくとも1個の初期遺伝子を欠く、組み換えアデノウイルスゲノムからなる複製欠損ベクターを提供する。ある実施形態において、この複製欠損ベクターは、本明細書中で開示するアデノウイルス分離株の1つ（例えば、ChAd 3、ChAd 6、ChAd 4、ChAd

50

d 5、ChAd 7、ChAd 9、ChAd 10、ChAd 11、ChAd 16、ChAd 17、ChAd 19、ChAd 20、ChAd 8、ChAd 22、ChAd 24、ChAd 26、ChAd 30、ChAd 31、ChAd 37、ChAd 38、ChAd 44、ChAd 63又はChAd 82)のE1遺伝子を、免疫原発現カセットで置換又は破壊することにより調製される。例えば、ChAd 3(配列番号1)又はChAd 6(配列番号2)のE1遺伝子を欠失させる／破壊することにより、ベクターを調製することができる。あるいは、ChAd 3、ChAd 6、ChAd 4、ChAd 5、ChAd 7、ChAd 9、ChAd 10、ChAd 11、ChAd 16、ChAd 17、ChAd 19、ChAd 8、ChAd 22、ChAd 24、ChAd 26、ChAd 30、ChAd 31、ChAd 37、ChAd 38、ChAd 44、ChAd 63及びChAd 82又はChAd 20を含む、本明細書中で開示する他のアデノウイルス分離株のいずれか1つから、複製欠損ベクターを調製することができる。他の実施形態において、本発明の複製欠損ベクターは、機能的E3遺伝子を欠失するように、場合によっては加工されている、本明細書中で開示するChAdのうち1個に由来するアデノウイルスゲノムを含む。初期遺伝子を完全に除去するか、又はその遺伝子を非操作可能又は非機能的にすることによって、本明細書中で開示するチンパンジーアデノウイルス配列は、複製欠損になされうると理解されたい。

10

#### 【0064】

本発明は、1又は複数の選択された遺伝子産物を発現するアデノウイルスの能力を破壊する「機能的欠失」などの改変があることを特徴とするベクターを包含すると理解されたい。本明細書中で使用される場合、「機能的欠失」という用語は、広く、特定の遺伝子産物を非機能的にする効果を有する改変を包含する。一般に、機能的欠失は、アデノウイルス遺伝子の部分的又は全体的欠失の形をとる。しかし、これらに限定されないがフレームシフト突然変異を導入する改変を行うことを含む、その他の操作でもまた機能的欠失を達成することを当業者は容易に認めるであろう。例えば、本発明の組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターは、本ウイルスのアデノウイルスE1A及び／又はE1B発現能力を妨害する、又は機能的に欠失させるよう設計されている改変を導入することにより、複製欠損になされ得る。

20

#### 【0065】

E2遺伝子の群からの1又は複数の遺伝子の発現を妨害する、又は機能的に欠失させるよう設計されている改変を導入することにより、複製欠損アデノウイルスベクターを得ることができることは周知である。より詳しく述べると、ポリメラーゼ遺伝子又は、末端直前のタンパク質遺伝子もしくはDNA結合タンパク質遺伝子を不活性化することにより、複製欠損ベクターを構築することができる。さらに、E4領域により発現される遺伝子の欠失又は不活性化は、複製欠損chimpAdベクターを構築するための代替的方法である。初期遺伝子欠失又は不活性化を、さらに短縮されたベクターを作製するために、組み合わせることができる。あるいは、複製欠損ChAdベクターはまた、後期遺伝子L1からL5などの他のウイルス遺伝子において、さらなる改変を含み得る。さらに、異なる血清型から得られたヘキソン及び繊維遺伝子を組み合わせることにより、新規アデノウイルスワクチン担体を生成させることができる。ヘキソン及び繊維遺伝子シャッフリング法の利用によってもまた、研究者らは、ChAdの生物学的特性を変化させ、様々な指向性を有する、又は新しい血清学的特性を有する、ベクターの作製を促進することができる。

30

40

#### 【0066】

本発明は、単独で、又は何らかの組合せで、その改変遺伝子の生物学的活性を効果的に破壊する、遺伝子全体又はその一部の欠失を含む組み換えアデノウイルスベクターを包含すると理解されたい。本明細書中で示されるように、E1遺伝子の機能的欠失と組み合わせて、異種のAd5E4配列をベクターに導入することは、望ましいものであり得るが、例えば、E4領域により発現される遺伝子の機能的欠失を有する組み換えサルアデノウイルスを構築することができる。あるいは、アデノウイルス遅初期(delayed early)E3遺伝子の機能を削除し得るが、E3の機能は、組み換えアデノウイルス

50

粒子の産生に必要ではないため、本発明で有用なウイルスをパッケージングすることが可能な組み換え体を作製するために、この遺伝子産物を置換する必要はない。

#### 【0067】

本発明のある実施形態において、使用される複製欠損アデノウイルスベクターは、E1及び場合によってはE3における欠失を含有する、チンパンジーサブグループCアデノウイルスである。例えば、ChAd3の場合、適切なE1欠失／破壊は、bp460からbp3542の領域に導入することができる（配列番号1を参照。）。ChAd6の場合、適切なE1欠失／破壊は、bp457からbp3425の領域に導入することができる（配列番号2を参照。）。CV32の場合、E1欠失は、好ましくは、bp456からbp3416である（配列番号3を参照。）；CV33の場合、E1欠失は、好ましくは、bp456からbp3425（配列番号4を参照。）であり、CV23の場合、E1欠失は、好ましくは、bp456からbp3415（配列番号5を参照。）である。CV32及びCV33に対するE3欠失は、好ましくは、それぞれ、bp27446からbp31911（配列番号3を参照。）であり、bp27146からbp31609（配列番号4を参照。）である。当業者は、配列相同性及び多配列アラインメントに基づき、他のチンパンジー分離株に対する同等な配列を容易に決定することができる。

10

#### 【0068】

E1欠失アデノウイルスベクターを構築するために、そのベクター骨格の構造及び導入遺伝子を含有する核酸配列の組成に関して多くのことを決定しなければならないことを、当業者は、容易に認めるであろう。例えば、研究者らは、E1欠失の大きさが導入遺伝子の大きさに適合するか否かを調べなければならない。適合しない場合、そのベクターの骨格にさらなる欠失を導入しなければならない。

20

#### 【0069】

導入遺伝子を有する核酸配列は、遺伝子又は遺伝子の機能的部分であり得、通常は、発現カセットの形態で存在する。通常、遺伝子発現カセットには、（a）タンパク質又は関心のある抗原をコードする核酸と；（b）そのタンパク質をコードする該核酸に機能可能に連結された異種のプロモーターと；（c）転写終結シグナルと、が含まれる。本核酸は、DNA及び／又はRNAであり得、2本鎖又は1本鎖であり得る。この酸は、所望する宿主における発現のために、コドン最適化され得る（例えば、哺乳動物宿主）。

#### 【0070】

導入遺伝子が導入される骨格内の部位及びその導入遺伝子の方向に関しても決定を行わなければならない。より具体的に、E1パラレル（5'から3'に転写）又は反パラレル（そのベクター骨格に対して、3'から5'方向に転写）方向で、導入遺伝子を挿入することができる。さらに、そのベクターが、同定されその導入遺伝子に機能可能に連結される必要があるワクチン担体としての使用のために調製されている、哺乳動物宿主細胞においてその導入遺伝子の発現を支配することが可能な適切な転写調節エレメントである。「操作可能に連結された」配列には、それらが調節する核酸配列に隣接する発現調節配列及び、トランスで作用する、又は調節される核酸配列を調節するのに離れて作用する調節配列の両方が含まれる。

30

#### 【0071】

調節配列には、転写開始、終結、エンハンサー及びプロモーター配列などの適切な発現調節配列；スプライシング及びポリアデニル化シグナルなどの効率的RNAプロセッシングシグナル；翻訳効率を促進する配列（例えば、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を促進する配列及び場合によっては、タンパク質分泌を促進する配列が含まれる。これら及び他の共通のベクターエレメントの選択は、従来のものであり、多くの適切な配列が当業者にとり周知である（例えば、Sambrookら、及びそこで引用する文献、例えば、3.18-3.26ページ及び16.17-16.27、及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989）。

40

#### 【0072】

50

具体的な実施形態において、本プロモーターは、真核RNAポリメラーゼにより認識される異種のプロモーター（つまり、アデノウイルス配列に対して。）である。好ましい実施形態において、このプロモーターは、「強力」又は「効率的」プロモーターである。強力なプロモーターの例は、前初期ヒトサイトメガロウイルスプロモーターである（Chapmanら、1991 Nucleic Acids Res 19:3979-3986（参照により組み込む。）。）。（CMV）なしで、又はイントロンA配列（CMV-intA）とともに、ヒトCMVプロモーターを使用することができるが、EF1αプロモーター、マウスCMVプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、SV40初期／後期プロモーター及びβアクチンプロモーターを含む、強力な免疫グロブリン又はその他の真核遺伝子プロモーターなどのその他の既知のプロモーターの多くのいずれかを使用し得ることを当業者は、認識するであろう。

10

#### 【0073】

本発明において使用できるプロモーターのさらなる例は、強力な免疫グロブリンプロモーター、EF1αプロモーター、マウスCMVプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、SV40初期／後期プロモーター及びβアクチンプロモーターであるが、本発明の方法に従い、意図する宿主において発現を実行することができるあらゆるプロモーターを使用することができることを、当業者は認め得る。このプロモーターは、Tetオペレーター配列などの調節可能配列を含み得る。転写及び発現の調節の可能性を与えるこれらのような配列は、遺伝子転写の抑制が求められる場合に有用である。

#### 【0074】

20

適切な遺伝子発現カセットはまた、転写終結配列も含む。好ましい転写終結因子は、ウシ成長ホルモン終結因子である。CMV-intA-BGH終結因子の、プロモーター／転写終結の組合せは、特に好ましいが、その他のプロモーター／終結因子の組合せもまた使用し得る。本明細書中で示されるように、ウシ成長ホルモン終結／ポリアデニル化シグナル（bGHPA）又は次のように定義される50ヌクレオチド長の短い合成polyAシグナル（SPA）：即ちAATAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTGTTGGTTTTTGTGTG（配列番号26）である。一般に、適切な終結配列を例示する。導入遺伝子を含む核酸配列の後であって、E3'アデノウイルスITR配列の前に、polyAシグナルを挿入する。

#### 【0075】

30

本明細書中で述べられる組み換えアデノウイルスベクターには、アデノウイルスの1又は複数の株由来のアデノウイルス配列が含まれる。適切な配列は、天然のソースから得ることができ、組み換えにより、合成により、又は他の遺伝子操作もしくは化学的方法により作製することができる。特定の実施形態において、この組み換えチンパンジーアデノウイルスは、非チンパンジーアデノウイルスポリヌクレオチド配列を含むキメラ組み換え体である。適切な非チンパンジーアデノウイルス配列は、ヒトアデノウイルス株から得ることができる。例えば、hAd5-E4（Ad5-nt32816からnt35619）又はAd5-E4-orf6（Ad5-nt33193からnt34077）（Ad5 GenBank Accession No:M73260）により、ネイティブのE4領域を置換することができる。

40

#### 【0076】

一般に、本発明の組み換えアデノウイルスベクターにより送達される免疫原（抗原性分子）は、コードされる産物の転写及び／又は翻訳を宿主細胞において指示するのに必要な調節配列を与えるヌクレオチド配列と組み合わせ、導入遺伝子によりコードされるポリペプチド、タンパク質又は酵素産物を含む。この導入遺伝子の組成は、ベクターの意図する使用に依存する。例えば、哺乳動物宿主において、感染物質に対して特異的な、抗体反応又は細胞性免疫反応を誘発するために免疫原性組成物が設計されている場合、病原体特異的免疫を受容者に与えると予想される少なくとも1個の免疫原性産物をコードする核酸配列を利用することが適切である。あるいは、癌ワクチンとしての使用のためにその組成物が調製される場合、適切な導入遺伝子は、TAAなどの自己抗原の免疫原性部分を

50

含有し得、それは、特定のTAAに対する宿主寛容性を打破するため、及び癌の発症を防ぐか、又は腫瘍成長を防ぐのに十分な長期（例えば記憶）反応を誘発するために十分な効力の防御的免疫反応を誘発する目的に関して選択される。したがって、哺乳動物宿主に感染する幅広い病原性物質（これらに限定されないが、ウイルス、寄生生物、細菌及び真菌など。）又は癌もしくは腫瘍細胞から、適切な免疫原性遺伝子産物を得ることができる。試験免疫原の特定の設定で本明細書中において本発明を説明しているが、本発明は、本明細書中で例示される抗原の使用に限定されないことを理解されたい。より具体的には、本発明は、これらに限定されないがTAAなどの、免疫原としての、異種及び自己抗原の両方の使用をもくろむ。

#### 【0077】

ある実施形態において、本発明は、感染物質により発現される抗原（つまり免疫原）に対する免疫反応を誘導する、免疫原性組成物（例えばワクチン）を提供する。例えば、ヒト及び／又は非ヒト動物種に感染するウイルスに対する免疫反応を誘発することが望ましい。予防的及び／又は治療的免疫反応が望まれるウイルスファミリーの例には、アプソウイルス、カルディオウイルス、エンテロウイルス、ヘパトウイルス、パレコウイルス、リノウイルスなどの6種類の異なる属を含むピコルナウイルス科（*Picornaviridae*）ファミリーが含まれる。免疫反応が望まれるピコルナウイルスの例は、口蹄疫ウイルス、脳筋炎ウイルス、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、ヒトA型肝炎ウイルス、ヒトパレコウイルス、リノウイルスである。カリシウイルス科（*Caliciviridae*）には、ウイルスのノーウォーク群により生じるヒトにおける流行性胃腸炎及び、ウサギ出血性疾患ウイルスに関するウサギにおける出血性疾患及びネコカリシウイルスにより生じる呼吸器疾患のような、動物におけるその他の疾患を伴う、様々な属が含まれる。

#### 【0078】

免疫反応を誘発することが望まれ得るウイルスの別のファミリーは、ヒトならびに多くの様々な動物種から単離された、ウイルスを含むアストロウイルス科（*Astroviridae*）である。ヒトアストロウイルスは、胃腸炎及び低年齢児の下痢に関連する。あるいは、2つの属：アルファウイルス及びルビウイルスを含む、ウイルスのトガウイルス科（*Togaviridae*）のメンバーに対する免疫を哺乳動物宿主に付与することが望まれ得る。アルファウイルスは、関節炎（つまり、チックングニアウイルス、シンドビスウイルス）又は脳炎（つまり、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス）などの、ヒト及び獣医学の疾患に関与する。

#### 【0079】

風疹ウイルスは、代替的なウイルス標的を与え、ルビウイルス属のメンバーのみが、発熱及びリンパ節炎を伴う軽度発疹疾患の流行に関与する。風疹ウイルス感染はまた、妊娠初期に母親が感染した際の、胎児の異常にも関与する。フラビウイルス科（*Flaviviridae*）は、重要なヒトならびに動物病原体を含む、3種類の属：フラビウイルス属、ペスチウイルス属及びヘパチウイルス属からなる別のウイルスファミリーである。フラビウイルス属メンバーの多くは、発熱、脳炎及び出血熱を含む、様々な疾患を引き起こす、節足動物媒介性ヒト病原体である。デング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイル熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスは、世界中が関心を持っている、又はある地域（風土病的）で関心が持たれている主要な病原体である。ペスチウイルス属には、ウシウイルス性下痢ウイルス、ブタコレラウイルス、ボーダー病ウイルスなどの、経済的に非常に重要な動物病原体が含まれる。C型肝炎ウイルスは、急性及び慢性肝炎に関与する、ヘパチウイルス（*Hepacivirus*）属の唯一のメンバーである。組み換えアデノウイルスにより発現されるHCVTanパク質は、世界中で1億7千万人を侵すウイルス感染の結果を制限する、防御的ならびに治療的免疫反応を誘発することができる。

#### 【0080】

あるいは、感染に対する防御を獲得するために、組み換えアデノウイルスベクターによ

10

20

30

40

50

り、コロナウイルス科 (Coronaviridae) のメンバー由来の抗原を発現させることができる。重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-Coウイルス) に対する防御は、これらに限定されないが、ヌクレオキャプシド (N) タンパク質、ポリメラーゼ (P) タンパク質、膜 (M) 糖タンパク質、スパイク (S) 糖タンパク質、小型エンベロープ (E) タンパク質又はそのウイルスにより発現されるその他の何らかのポリペプチドを含む、1又は複数のSARS-Coタンパク質を発現する、ChAd3、4、5、6、7、9、10、11、16、17、19、20、ChAd8、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82を含む群から選択される1又は複数のチンパンジーアデノウイルスで免疫付与することにより獲得することができる。狂犬病ウイルスを含むラブドウイルス科 (Rhabdoviridae) メンバーは、ウイルスタンパク質を発現する組み換えワクチンの標的であり得る。

10

# 【0081】

その他の可能な標的には、重症出血熱の流行に関与する、エボラ様ウイルス及びマルブルグ様ウイルス属が含まれるフィロウイルス科 (Filoviridae) ; 麻疹、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルスのような、ヒトにおいて知られる最も流行しているいくつかのウイルス及びニューカッスル病及び牛痘ウイルスなどの獣医学的に関心のあるウイルスを含むパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) ; インフルエンザA、B、Cウイルスを含むオルトミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae) ; リフトバレー熱、Sin Nombre (シンノンブレ)、ハンタ、プーマウイルスなどの重要なヒト病原体を含む、節足動物から脊椎動物宿主に主に伝染するブニヤウイルス科 (Bunyaviridae) ; リンパ球性脈絡髄膜炎、ラッサ熱、アルゼンチン出血熱、ポリビア出血熱ウイルスを含む、アレナウイルス科 (Arenaviridae) ; 主にウマ及びヒツジにおいて中枢神経疾患を引き起こすウイルスを含む、ボルナウイルス科 (Bornaviridae) ; 世界中での幼児及び低年齢児における重症下痢疾患の最も重要な原因である、ロタウイルスファミリー及び、ヒト及び他の動物両方に伝染し得るオルビウイルス (ブルータング病、伝染性出血性疾患ウイルス) を含む、レオウイルス科 (Reoviridae) ; ヒト免疫不全ウイルス1及び2 (HIV-1及びHIV-2) 及びヒトT細胞白血病ウイルスタイプE1及び2 (HTLV1及び2) のような、重要なヒト病原体ならびにヒツジ及びヤギに伝染するマエディ/ビスナウイルス、ウマに伝染するウマ感染性貧血ウイルス、ウシに伝染するウシ免疫不全ウイルス、ネコに伝染するネコ免疫不全ウイルスなどの非ヒトレンチウイルスを含むウイルスの大きなグループである、レトロウイルス科 (Retroviridae) ; ポリオーマウイルス科 (Polyomaviridae) グループ小型DNA癌原性ウイルス、典型ウイルスは、それぞれマウス及びアカゲザルに感染するポリオーマ及びSV40、(SV40に非常に関連しているBK及びJCウイルスは、ヒト患者から単離された。) ; パピローマウイルス科 (Papillomaviridae) は、いぼ及びコンジローマを発生させる、ヒトを含む高等脊椎動物に感染するDNAウイルスの群からなる。パピローマウイルス感染は、ヒト及び動物両方での癌の発生に関連する。ヒトパピローマウイルスは、子宮頸癌、膣癌及び皮膚癌に関与する。ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae) は、ヒト及びその他の哺乳動物に対するいくつかの重要な病原体が分類される亜科を含む。抗原の適切なソースは、これらに限定されないが、単純ヘルペスウイルス1及び2、水疱瘡ウイルス、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス6A、6B及び7、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスである。抗原のさらに適切なソースは、サル痘ウイルス、伝染性軟属腫 (Molluscum contagiosum) ウイルス、天然痘ウイルスのようなポックスウイルス科 (Poxviridae) のメンバー; ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) の典型メンバーである、B型肝炎ウイルスならびに、D型肝炎 (hepatitis delta) ウイルス、E型肝炎ウイルスのような、急性及び/又は慢性肝炎を引き起こすその他のウイルスである。

20

30

40

50

## 【0082】

本発明のアデノウイルスベクターはまた、細菌、真菌、寄生生物病原体を含む非ウイルス性病原体により発現されるタンパク質に対して、ヒト又は動物において免疫反応を刺激するように設計される免疫原性組成物の調製に適切である。例えば、本明細書中で開示するベクターは、これらに限定されないが、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)、*Streptococcus pyogenes* (化膿レンサ球菌)、*Streptococcus Ppneumoniae* (肺炎レンサ球菌)、*Vibrio cholerae* (コレラ菌)、*Clostridium tetani* (破傷風菌)、*Neisseria meningitis* (髄膜炎菌)、*Corynebacterium diphtheriae* (ジフテリア菌)、*Mycobacteria tuberculosis* (マイコバクテリウム・テュバキュローシス)、*Mycobacteria leprae* (ライ菌)、*Listeria monocytogenes* (リステリアモノサイトジェン) 及び *Legionella pneumophila* (レジオネラニューモフィラ) に対するワクチンを調製するために使用することができる。予防的又は治療的ワクチンを調製することが望まれ得る、真菌及び哺乳動物寄生生物の例には、*Candida albicans* (カンジダアルビカンス)、*Aspergillus fumigatus* (アスペルギウス・フミガタス)、*Histoplasma capsulatum* (ヒストプラズム・カプスラーツス)、*Plasmodium malariae* (四日熱マラリア原虫)、*Leishmania major* (リーシュマニア・メジャー)、*Trypanosome cruzi* (トリパノソーマ・クルジ) 及び *brucei* (ブルシェイ)、*Schistosoma haematobium* (ビルハルツ住血吸虫)、*mansonii* (マンソン住血吸虫) 及び *japonicum* (日本住血吸虫)；*Entamoeba histolytica* (エンタモエバ・ヒストリチカ) 及びヒトフィラリアに關与することが知られているフィラリアの多数の種が含まれる。

## 【0083】

癌は、一般に、細胞周期の維持又は細胞増殖の調節に關与するポリペプチドをコードする遺伝子の脱制御を含む（例えば、増殖因子、癌遺伝子、受容体及び腫瘍抑制因子）。癌に關わる遺伝子の多くの産物は、様々な腫瘍細胞の表面で発現される。T 及び B リンパ球により認識され得る様々な腫瘍抗原が、ヒト及び動物の癌で同定されている。腫瘍細胞において発現されるのに加えて、正常組織及び／又は胎児発生中にも発現されるため、抗癌ワクチン試験での使用に適切なヒト腫瘍関連抗原 (TAA) の大部分は、「自己抗原」として説明される。TAA に対する標的集団の免疫寛容性により、多くの癌ワクチンが効果がないとされる理由が説明される。

## 【0084】

腫瘍抗原は、T/B 細胞反応を刺激することができる、変化した細胞性タンパク質の例である、Ras、p53 又は Bcr-Abl タンパク質などの、癌原遺伝子又は腫瘍抑制遺伝子で変化が起こる正常細胞遺伝子の発癌突然変異体により産生され得る。腫瘍抗原は、腫瘍細胞で過剰発現されるか（チロシナーゼ、GP100、MART は、メラニン産生細胞において低レベルで正常に発現され、メラノーマにおいて過剰発現される。）、又は腫瘍細胞において異常に発現される（メラノーマ及び多くの癌腫において発現されるが、精巣及び胎盤において正常に発現される、MAGE、BAGE、GAGE。）。腫瘍抗原は、発癌ウイルスの産物であり得る：子宮頸部癌により発現される、パピローマウイルス E6 及び E7 タンパク質；EBV+リンパ腫及び上咽頭癌により産生される、EBV EBNA-1 タンパク質；SV40 誘導実験的腫瘍における SV40 T 抗原。癌胎児性抗原は、癌細胞及び正常な発生過程（胎児）の組織において高レベルで発現されるが、成人組織では発現されない。癌胎児性抗原 (CEA) 及び  $\alpha$ -フエトタンパク質 (AFP) は、よく特性が調べられている癌胎児性抗原の例である。

## 【0085】

最近の証拠により、免疫反応を誘発する、したがってワクチン治療に対する免疫原に適

10

20

30

40

50

切な抗原のクラスを生じさせることができるTAAの存在が裏付けられている。しかし、抗原のクラスとして、TAAは、周知のとおり弱い免疫原であり、TAAに非常に特異的なT細胞は、T細胞発生の過程で欠失するか、アネルギー化されている。したがって、特定のTAAに対する、腫瘍を有する宿主の免疫反応は非常に弱いと予想される。標的TAAに対する宿主の寛容性を打破するという固有の必要性があるため、実験的臨床ワクチン研究は、特に、TAA特異的T細胞反応を促進するTAA免疫付与ストラテジーの開発に焦点を当てている。一般に、効果的な癌ワクチンは、免疫寛容性を乗り越え、かつ、宿主の免疫反応を、予防的及び／又は防御的なレベルに上げなければならない。多くの実験的ワクチン研究における抗腫瘍効果は、TAAに対するT細胞反応に相関がある。

#### 【0086】

代替的实施形態において、本発明は、腫瘍抗原に対する免疫反応を誘導するために使用することができる、免疫原性組成物（例えば、癌ワクチン）をもくろむ。適切な組成物は、腫瘍抗原をコードする核酸配列を含有する組み換えチンパンジーアデノウイルス及び生理学的に許容可能な担体を含有する。特定の实施形態において、カセットのコード配列エレメントは、癌関連抗原などの自己抗原由来の免疫原性ペプチド配列などの、1個の免疫原をコードし得る。ある実施形態において、免疫原をコードする核酸配列（つまり導入遺伝子）は、特定の哺乳動物種での発現のためにコドン最適化され得る。他の実施形態において、コード配列は、1又は複数のコドン最適化された腫瘍抗原などの、複数の免疫原をコードし得る。例えば、開示するアデノウイルスベクターを利用する癌ワクチンは、HER2/neu、CEA、Hepcam、PSA、PSMA、テロメラゼ、gp100、Melan-A/MART-1、Muc-1、NY-ESO-1、サバイビン、ストロメリン3、チロシナーゼ、MAGE3、CML68、CML66、OY-TES-1、SSX-2、SART-1、SART-2、SART-3、NY-CO-58、NY-BR-62、hKLP2、VEGFなどの、自己抗原の組合せをコードし得る。

#### 【0087】

効果的な癌ワクチンの開発には、ワクチン接種された患者において抗原特異的免疫を誘発するストラテジー及び活性のある免疫付与終了後に免疫反応の生成が持続することの検証が必要である。このストラテジーの成功は、標的抗原に対して向けられる測定可能な免疫反応が、癌発生又は再発に対する防御に相関するか否かに依存する。細胞性免疫及び液性免疫両方のエフェクターメカニズムにより、腫瘍細胞が殺滅されることが示されている。しかし、実験系からのデータにより、腫瘍細胞の除去に対して、抗原特異的T細胞が、最も強力な免疫メカニズムを与えることが示唆される。腫瘍特異的抗原（例えばTAA）のエフェクターT細胞による認識により、TAAが腫瘍拒絶抗原として機能することができるようになると予想される。公表されている実験から、CD8<sup>+</sup>及びCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞反応の刺激が、最善の腫瘍クリアランスの達成に重要であることが示唆されている（Greenberg, P. D. (1991) Adv. Immunol. 49:281-355; Pardoll, D. M. (1998) Curr. Opin. Immunol. 10:588-94）。臨床反応（つまり効能）は、インターフェロンγ分泌細胞毒性T細胞の増加と関与する。本ワクチン担体の効率を明らかにするための、本明細書中で使用される、ELISPOTアッセイなどのアッセイの出現により、研究者らは、ワクチン接種計画に対するT細胞反応を測定できるようになり、それにより癌ワクチンの開発が促進される。

#### 【0088】

癌ワクチンは、予防的又は治療的の何れかであり得る。癌ワクチンの予防的使用の基礎をなす一般的な仮定は、腫瘍を有する対象において、TAAが非常に弱い免疫原であるか機能的に非免疫原性であるということである。より具体的には、癌免疫学の分野において、癌に罹患した患者における免疫療法として、ワクチンを使用することができる。したがって、既存の腫瘍又は悪性腫瘍により発現されるTAAに向けられる免疫反応を誘発するように、癌ワクチンを設計することができる。したがって、特定の实施形態において、治療的癌ワクチンは、従来の治療法に対する耐性が進展しているか、従来の治療後に再発

が起こる可能性が高い、腫瘍を有する患者における使用を意図する。

#### 【0089】

アデノウイルスの高い免疫原性により、アデノウイルスベクターは、自己抗原に対する宿主寛容性を打破するために設計されたワクチン担体の関連における使用のための、特に優れた候補となる。自己免疫疾患において最初に記載された、エピトープ又は決定基拡大の現象は、MHCクラスI及びMHCクラスII限定反応の両方と関与し、HER2/neuタンパク質特異的T細胞免疫の発生と相関がある。エピトープ拡大は、免疫原性タンパク質の特定部分に対する免疫反応の生成を表し、次いで、同じタンパク質に存在する、他の抗原性決定基に対する免疫の自然な拡大が起こる。例えば、Disissらは、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子と混合した、HER-2タンパク質の強力なTヘルパーエピトープ由来のペプチドを含有するワクチンを投与した、HER-2/neu過剰発現悪性腫瘍がある患者の84%でエピトープ拡大を観察した(J. Clin. Oncol. (2002) 20(11):2624-2632)。重要なことは、エピトープ拡大が、HER-2/neuタンパク質ドメイン反応の生成と相関したことであり、このことから、免疫付与が効果的に免疫寛容性を回避したことが示唆される。

10

#### 【0090】

癌ワクチンに対する標的としての、開示するアデノウイルスベクター及び方法の使用に適切なTAAは、いくつかの特徴を保持すべきである。例えば、標的TAAは、好ましい発現プロファイルを有さなければならず、これは、正常組織と比較して、腫瘍又は悪性腫瘍組織において、選択的に発現されるか、過剰発現されることを意味する。さらに、腫瘍発生に関与するTAAは、癌進行の様々な段階で保持される可能性がより高いので、適切な標的TAAはまた、腫瘍進行及び転移を通じて保持されるべきである。適切な標的TAAはまた、腫瘍内で均一に発現される。第三に、適切な標的TAAは、絶対的な免疫寛容性に対する対象であってはならない。より具体的には、関心のあるTAAに対して認識し、かつ反応することができるT細胞は、宿主のT細胞レパートリーから完全に欠失されていないことのいくつかの証拠があるべきである(Berinstein, N. L., J. Clin. Oncol. 29(8):2197(2002))。

20

#### 【0091】

癌胎児性抗原(CEA)は、抗癌ワクチンのための標的抗原としての使用のために魅力的なTAAとなる多くの特徴を有する。これは、有利な発現パターンを特徴とする、Igスーパーファミリーのメンバーである。これは、全ヒト癌の50%を超えるものにおいて、発現され、腫瘍発生プロセスに関わっており、このことから、その発現が、癌進行を通して、選択され、保持され得ることが示唆される。さらに、CEAに対する免疫寛容性が絶対的ではないことが分かっている。公表された研究から、ヒトT細胞が、CEAを発現する癌細胞を、認識し、活性化し、溶解させることが分かっている(Berinstein, N. L., J. Clin. Oncol. 29(8):2197(2002))。例えば、その後のペプチドベースのインビトロ刺激と組み合わせた、CEAを発現する組み換えワクシニアウイルスを用いた患者への免疫付与により、自己腫瘍を細胞溶解できる、CD8<sup>+</sup>MHC-限定CTLが生成した(Tsang, K. Y, ら, J. Natl. Cancer Inst., (1995) 87:982-990)。あるいは、手術後の結腸直腸癌患者に対する組み換えCEAを用いた免疫付与が、組み換えCEAに対する、弱い抗体及び細胞性応答を誘導したことが報告された(Samanci, Aら(1998) Cancer Immunol. Immunother. 47:131-142)。さらに、結腸直腸癌と診断された患者への抗CEA 抗イディオタイプ抗体の投与により、抗CEA抗体が生じ、イディオタイプ特異的T細胞増殖が起こった(Foon, L, A. ら(1995) J. Clin. Invest., 96:334-342)。文献により、また、いくつかの異なるワクチン接種法を用いて、癌患者におけるCEAに対する寛容性を乗り越えることができることが示される(つまり、組み換えCEA又は組み換えオルトボックスもしくはアビボックスCEAウイルスを用いたワクチン接種、抗イディオタイプ抗体の投与、CEAアゴニストエピトープによる樹状細胞のパルシング)。

30

40

50

## 【0092】

CEAは、正常胎児結腸で発現される、正常結腸粘膜では非常に低い、癌胎児性糖タンパク質である。これは、多くの腺癌、特に結腸、膵臓、乳房、肺、直腸及び胃の腺癌においても過剰発現される。多くの結腸直腸癌及びある癌腫は、血清中で測定可能な高レベルのCEAを産生し、それにより、特に結腸直腸癌の患者において、最も広く使用される悪性の血清マーカーの1つとなっている。

## 【0093】

本発明の組成物及び方法における使用のための適切な免疫原を提供する第二のTAAは、HER2/neu（neuとも呼ばれる。）癌遺伝子の産物である。CEAのように、HER2/neuは、有利な発現パターンを有し、絶対的寛容性の対象ではない。より具体的には、HER2/neu転写産物及び185kDポリペプチド産物の発現を検出したところ、皮膚及び乳房を含む様々な組織の正常成人上皮細胞及び胃腸組織、生殖管及び尿路では低レベルであり；胚発生中の対応する胎児組織では高レベルであった（Pressら、Oncogene 5:953-962（1990））。いくつかの証拠から、ヒト乳癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮内膜癌及び結腸直腸癌でのHER-2の増幅と悪性形質転換との間の関連が示唆される（Disis及びCheever, Adv. Cancer Research 71:343-371（1997））。一般に、HER2/neuの過剰発現は、癌患者に対して、予後が悪いこと及び再発率が高いことと相関がある（Slamonら、Science 244:707-712（1989））。したがって、HER2/neuタンパク質に特異的なワクチンは、多くの様々なヒト悪性腫瘍における疾患再発の予防において、広く適用でき、利用できると思われる。

## 【0094】

HER2/neuは、生来のチロシンキナーゼ活性を保持し、上皮細胞増殖因子（EGF）受容体に対する高い相同性を示す膜貫通糖タンパク質をコードする（Akizawaら、（1986）Science 232:1644-1646）。癌免疫療法に対してHER2を標的として利用した最初の臨床研究の1つでは、HER-2特異的モノクローナル抗体Herceptinが乳癌の治療に対して用いられた（Goldenberg MM（1999）Clin. Ther. 21:309-318）。これにより、自己抗原提示細胞を活性化するためのHER-2ドメインを含有する組み換え融合タンパク質の使用を含む、効果的な抗腫瘍反応を誘発するための、免疫系のT細胞アームに対する標的としてのHER-2の使用に焦点を当てたその後の試みが導かれた。公表されている報告により、neu発現性の、乳癌及び卵巣癌に罹患している多くの癌患者において、HER2/neu癌遺伝子のタンパク質産物に対する免疫反応が得られることが分かっている（例えば、抗原特異的抗体及びT細胞を産生する。）

## 【0095】

様々な中間体プラスミド及びシャトルベクターへの組み換えアデノウイルス配列、導入遺伝子及び他のベクターエレメントのアセンブリー及び、組み換えウイルス粒子を産生させるためのプラスミド及びベクターの使用は全て、当業者にとって周知の標準的教科書に記載されているような従来技術を使用することにより達成される（Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版、Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY（1989））。そのような技術には、これらに限定されないが、従来のcDNAクローニング技術、アデノウイルスゲノム由来の重複オリゴヌクレオチド配列の使用、相同組み換え、ポリメラーゼ連鎖反応、標準的トランスフェクション技術、寒天重層におけるウイルスのプラーク生成及びその他の関連方法が含まれる。

## 【0096】

原核細胞におけるポリヌクレオチドの調製を促進するために、プラスミド型のアデノウイルスベクターを調製することが多い（アデノウイルスプレプラスミド）。このアデノウイルスプレプラスミドは、アデノウイルス部分及びプラスミド部分を含有する。このアデノウイルス部分は、基本的に、本発明のアデノウイルスベクター（E1、場合によっては

E 3 領域が、非機能性であるか欠失している、アデノウイルス配列を含有する。) 及び都合のよい制限部位に隣接した免疫原発現カセットを含有するアデノウイルス部分と同じである。

#### 【0097】

アデノウイルスプレプラスミドのプラスミド部分は、抗生物質の発現が真核細胞において起こらないように、原核プロモーターの転写調節下に、抗生物質耐性マーカーを含有することが多い。アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子及びその他の医薬適合性の抗生物質を使用し得る。原核生物における発酵によるポリヌクレオチドの高レベル産生を促進するために、アデノウイルスプレプラスミドが原核性の複製起点を含有し、高コピー数であることが好都合である。多くの市販の原核クローニングベクターによりこれらの利益を得られる。必須でないDNA配列を除去することが望ましい。ベクターが真核細胞において複製できることもまた望ましい。これにより、ポリヌクレオチドワクチン配列の、受容者のゲノムへの組み込みのリスクが最小に抑えられる。特定の組織タイプにポリヌクレオチドの発現を限定することが望ましいかどうかを問わず、組織特異的プロモーター又はエンハンサーを使用し得る。

10

#### 【0098】

アデノウイルス骨格DNA及び適切なシャトルベクター（特異的欠失を標的とするように、及び結果として得られるプラスミドに所望する制限部位を組み込むように設計される。）を用いた相同組み換えにより、アデノウイルスプレプラスミド（望ましい欠失及び挿入を有する複製欠損アデノウイルスのゲノムを含有するプラスミド）を生成させることができる。例えば、所望する欠失を考慮したアデノウイルス末端のPCR及び適切なクローニングプラスミドへの個別のセグメントの、続いて行われるクローニングなど、本技術分野で広く理解され認識される一般的方法を用いて、この目的における用途のシャトルベクターを生成させることができる。次に、アデノウイルスプレプラスミドを消化し、リン酸カルシウム共沈殿又はその他の適切な手段を介して補完的な細胞株にトランスフェクションすることができる。次に、ウイルス複製及び増幅が起こり、これは、顕著な細胞変性効果により明らかになる現象である。次に、ウイルス複製の完了後、感染細胞及び培地を回収する（一般に、トランスフェクションから、7日から10日後。）。

20

#### 【0099】

一般に、所望するアデノウイルスプレプラスミドの構築及びアセンブリー後、アデノウイルスE1を発現しているヒト細胞株に導入することにより、アデノウイルスプレプラスミドをウイルスとする。パッケージング細胞株とベクターのウイルス遺伝子との間の相補により、ベクターのアデノウイルス導入遺伝子配列を複製させ、ビリオンキャプシド中にパッケージングされ、その結果、組み換えアデノウイルスの産生が起こる。本発明の方法での使用のために、当業者にとって公知のあらゆる様々な方法により、得られたウイルスを単離し、精製し得る。

30

#### 【0100】

チンパンジーアデノウイルス遺伝子の、1又は複数の選択した欠失をウイルスベクターに導入したとき、産生細胞株中に存在する配列による産生プロセスの間に、欠失遺伝子産物の機能を補われ得ることは、当業者にとって容易に明らかである。したがって、パッケージングに必要ながそのベクターにおいて機能しないアデノウイルス機能の一部又は全てを特徴とする、永久的に形質転換された細胞株により、操作した遺伝子の機能を与えることができる（例えば、E1A、E1B、E2A、E2B、E4のいずれか。）。あるいは、その機能を与えるのに必要な遺伝子を含有するコンストラクトを用いて、適切な細胞に感染又は一時的トランスフェクションを行うことにより、適切なパッケージング細胞株に対して必要なアデノウイルス機能を与えることができる。

40

#### 【0101】

したがって、本発明はまた、E1発現ヒト細胞株においてチンパンジーアデノウイルスベクターを生成させる方法を提供する。より具体的には、公知の細胞株293及びPER.C6<sup>TM</sup>を含むE1補完細胞株中に、開示されたベクターを増殖させることができる

50

。これらの両細胞株は、アデノウイルス E1 遺伝子産物を発現する。PER. C6<sup>TM</sup> は、1997 年 1 月 3 日公開の WO 97/00326 に記載されている（これは、参照により本明細書中に組み込む。）。これは、複製欠損第一世代アデノウイルスの産生を補完するが、相同組み換えによる複製能のあるアデノウイルスの生成を防ぐように設計されている E1 遺伝子セグメントにより形質導入されている初代ヒト網膜芽細胞株である。293 細胞は、Graham ら（1977）J. Gen. Virol. 36:59-72（これも、参照により本明細書中に組み込む。）において記載されている。「第一世代アデノウイルス」という用語が、E1 領域が非機能的であるか欠失しているかのいずれかであり、場合によっては E3 領域が非機能的であるか欠失している、複製欠損アデノウイルスを指すことを、当業者は、認識するであろう。

10

#### 【0102】

臨床試験においてワクチン組成物としての使用を意図する複製欠損アデノウイルスベクターのバッチは、RCA 不含であることが証明されているべきである（Fallaux, F. J. ら（1998）Human Gene Therapy, 9:1909-1917）。実施に際し、これは、費用のかかるスクリーニングプログラムを確立し利用する必要がある、手間のかかるプロセスである。RCA 生成が高頻度に起こることにより、生成したバッチに対する失敗率が高まるだけでなく、スケールアップが非常に制限されることを、当業者は認めるであろう。ベクターのヌクレオチド配列とヘルパー産生／パッケージング細胞株のゲノムに存在するアデノウイルス配列との間の配列相同性を削除することにより、相同組み換えにより生成する RCA が混入するベクターのバッチ産生の可能性が取り除かれると思われる。

20

#### 【0103】

通常、組み換え複製欠損アデノウイルスベクターは、トランスにおいて E1 遺伝子産物を与える細胞株中に増殖する。ベクターが、同じ又は非常に似た血清型由来である場合、トランスでの必須の E1 遺伝子産物の供給は、非常に効果的である。例えば、E1 欠失（つまり ΔE1）グループ C 血清型（Ad2 及び Ad5）ベクターが、Ad5 E1 領域を含有し、発現する、293 又は PER. C6 細胞において増殖できることは、周知である。しかし、293 及び PER. C6 産生細胞に存在する Ad5 E1 配列が、必ずしも非グループ C 血清型の複製を完全に補完し得るとは限らないことが観察されている。したがって、サブグループ C 以外の E1 欠失血清型、例えば、サブグループ A、B、D、E 及び F 由来のものの複製は、対応する野生ウイルスと比較して、より低効率であるか、又は 293 又は PER. C6 細胞において全く複製し得ない。これは、Ad5（グループ C）E1 B 55K 遺伝子産物が、非グループ C 血清型の E4 orf6 遺伝子産物と機能的に相互作用できないからである。

30

#### 【0104】

Ad5 E1 発現細胞における複製効率の低下は、様々なサブグループのベクターによって変化し得る。サブグループ D 及び E アデノウイルス由来の ΔE1 ベクターが、293 及び Per. C6<sup>TM</sup> 細胞において様々な効率でレスキュー可能であり、増殖可能である一方、サブグループ B の ΔE1 ベクターは、増殖能が完全に損なわれている（Vogels R ら、（2003）Aug. Replication-deficient human Adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. J Virol. 77 (15): 8263-71）。

40

#### 【0105】

Ad5 E1b 55k とベクター発現 E4 orf6 タンパク質との間の相互作用が、同じサブグループのメンバー内で保存されているにもかかわらず、このことは、非 C 血清型の E4 orf6 タンパク質が発現される場合、十分安定ではないであろうことを示す。E1b 55k/E4 orf6 複合体の形成が不十分であるか不安定であるこ

50

とから、Δ E 1 ベクターの増殖が低下しなくなる。したがって、成功裡に、かつ効率よく、グループ B 血清型の組み換えアデノウイルスをレスキューするために、関心のある血清型の E 1 領域を発現する細胞株を生成させることが必要とされ得ることが、実験的に分かっている。293 又は P E R . C 6 <sup>T M</sup> などの、A d 5 E 1 を発現する細胞において、発現を E 1 b 55 K タンパク質に限定することができる。あるいは、適切な A d 5 E 1 発現細胞株を、A d 5 E 1 に加えて全体の A d 5 E 4 領域（又は E 4 o r f 6 のみ）を発現するように、改変することができる。A d 5 E 1 及び o r f 6 の両方を発現する細胞株の生成は、代替的なアデノウイルス血清型を補完するのに有用である；例えば、A b r a h a m s e n ら、1997 J. V i r o l. 8946-8951 を参照のこと。

10

**【0106】**

A d 5 補完細胞株への E 4 ( o r f 6 ) の組み込みは、トランスで血清型特異的 E 1 遺伝子産物を与える血清型特異的細胞株の生成であるとして知られている。あるいは、非グループ C ベクター増殖効率は、ネイティブ E 4 領域の、A d 5 o r f 6 での置換によるウイルス骨格の改変により向上させ得る。ネイティブ o r f 6 のみを A d 5 又は他のサブグループ C ウイルス ( A d 1、A d 2、A d 6 ) 由来の o r f 6 と置換することによって、同様の結果を得ることができる。米国特許第 5, 849, 561 号は、A d 5 - E 4 遺伝子の一部も発現する A d 5 - E 1 補完細胞株における、E 1 欠失非グループ C アデノウイルスベクターの補完を開示する。

**【0107】**

20

V i g n e らに発行された米国特許第 6, 127, 175 号は、アデノウイルスの E 4 領域の一部、好ましくは、o r f 6 / o r f 6 / 7 を発現する、安定的にトランスフェクションされた哺乳動物細胞株を開示する。このような細胞株は、E 4 領域を欠く組み換え A d ゲノムの補完に有用である。

**【0108】**

ワクチン組成物を含む、開示するアデノウイルスベクターを含有する組成物は、本発明の重要な局面である。哺乳動物宿主、好ましくはヒト宿主に、予防的又は治療的設定のいずれかで、これらの組成物を投与することができる。宿主 / ワクチンとして可能なものには、これらに限定されないが、霊長類、特にヒト及び非ヒト霊長類が含まれ、商業用動物又は家畜として重要なあらゆる非ヒト哺乳動物が含まれる。組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターを含有する組成物は、単独で又はその他のウイルス性もしくは非ウイルス性ベースの D N A / タンパク質ワクチンと組み合わせて投与し得る。これらはまた、広範囲の治療計画の一部として投与し得る。

30

**【0109】**

本発明の特定の実施形態において、自己抗原又は腫瘍関連抗原に対する宿主の寛容性を打破するために設計された免疫付与プロトコールにおいて、開示するベクターを使用し得る。多くの T A A の同定により、癌治療に対する、活性のあるワクチン接種アプローチの開発が可能となった。プロセッシングされ、提示される細胞表面抗原及び細胞内抗原の両方が、有用な標的を与える。一般に、自己抗原に対する宿主寛容性を打破する、開示する方法には、( a ) 抗原特異的免疫反応が望まれる自己抗原をコードするヌクレオチド配列を担う、第一の C h A d ベクター又はプラスミドベクターを含有する第一のワクチン組成物を投与することにより、自己抗原に対する抗原特異的反応を刺激することと、( b ) 少なくともゲノムの E 1 遺伝子の機能的欠失を含有し、その E 1 遺伝子部位において配列が、初回刺激段階で送達された同じ自己抗原をコードする D N A の発現を支配することができるプロモーターを含有する、異なる血清型の組み換え C h A d ベクターを含有する第二のワクチン組成物を投与することにより、( a ) の免疫反応を保持し、拡大することとが含まれ、それにより、自己抗原に対する寛容性を打破する効果を有する免疫反応を宿主が備える。

40

**【0110】**

したがって、熟練者は、宿主寛容性を打破するための使用に適切であり得るいくつかの

50

異なる免疫付与プロトコルを設計するために、この開示を利用することができる。例えば、最初又は初回免疫付与が、T A Aなどの特定の自己抗原をコードするプラスミドDNAを含み、何らかのその後の免疫付与が、C h A dベクターを含む、プロトコルを利用することができる。自己抗原をコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドDNA配列は、1又は複数の注射において、電気刺激あり、又はなしで、筋肉内に送達され得る。例えば、エレクトロポレーションを介した、T A AをコードするプラスミドDNAの複数回（例えば、3もしくは4もしくは5）筋肉内注射と、それに続く、同じT A Aをコードする導入遺伝子を含むC h A dベクターの1又は複数の筋肉内注射に基づく免疫付与プロトコルは、本明細書中で開示され主張される一般的方法に包含される。

#### 【0111】

あるいは、寛容性を打破するための適切なプロトコルは、自己抗原をコードする導入遺伝子を含むC h A d又はh A dベクターを用いた、1又は複数の初回刺激免疫付与と、それに続く、同じもの又は、初回免疫付与に使用されるベクターと交差反応しないことが知られている、異なるC h A dベクターを用いた、1又は複数の追加免疫付与を含み得る。例えば、初回刺激のためにC h A d 3を用い、追加免疫のためにC h A d 6を用いる免疫付与プロトコル、又は初回刺激のためにC h A d 3を用い、続いて追加免疫のためにC h A d 6及びC h A d 9を用いる免疫付与プロトコルを、宿主寛容性を打破するために使用し得る。特定の実施形態において、本発明は、HER2/neu、CEA、EpCaM、PSA、PSMA、テロメラゼ、gap100、Melan-A/MART-1、Muc-1、NY-ESO-1、サバイビン、ストロメリシン 3、チロシナーゼ、MAGE3、CML68、CML66、OY-TES-1、SSX-2、SART-1、SART-2、SART-3、NY-CO-58、NY-BR-62、hKLP2、VEGFからなる群から選択される、少なくとも1個の腫瘍関連抗原を含む自己抗原の使用をもくろむ。特定の実施形態において、本発明は、癌に罹患している哺乳動物に、T A Aをコードする組み換えチンパンジーアデノウイルスを送達することによる、選択された悪性腫瘍に特異的な腫瘍関連抗原に対する免疫反応（例えば液性又は細胞性）を誘導するための方法を提供する。本発明のこの局面の好ましい実施形態において、誘発される免疫反応は、抗原特異的CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞の産生を特徴とする免疫反応で構成される。

#### 【0112】

本発明の免疫原性組成物は、予防的又は治療的設定のいずれかで、哺乳動物宿主、好ましくはヒト宿主に投与することができる。可能性のある宿主/ワクチンには、これらに限定されないが、霊長類、特にヒト及び非ヒト霊長類が含まれ、商業用動物又は家畜として重要なあらゆる非ヒト哺乳動物が含まれる。組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターを含む組成物は、単独で又はその他のウイルス性もしくは非ウイルス性ベースのDNA/タンパク質ワクチン組み合わせで、投与し得る。これらはまた、広範囲の治療計画の一部として投与し得る。本発明の方法での使用に適切な組成物は、緩衝液、生理食塩水もしくはリン酸緩衝生理食塩水、スクロース、その他の塩及びポリソルベートなどの、生理学的に許容可能な成分と組み合わせで、本発明の組み換えウイルスベクターを含むし得る。この組成物は、筋肉内注射時に組織に刺激を与えない。この組成物は、好ましくは、使用時まで凍結される。場合によっては、本発明のワクチン組成物は、これらに限定されないが、アジュバント、安定化剤、pH調整剤又は保存料などの、他の成分を含むように処方し得る。このような成分は、当業者にとって周知である。

#### 【0113】

本発明の組み換えチンパンジーアデノウイルスが、宿主細胞に形質導入され、受容者/ワクチンに対して治療的利益又は防御的免疫を与える免疫反応を誘発するのに十分な導入遺伝子の発現量を与えるために、選択した投与経路において効果的な組み換えウイルス量である「効果的な量」で、ヒト又は獣医学的宿主に投与されることが想定される。

#### 【0114】

ワクチン受容者に導入されるべき本ワクチン組成物におけるウイルス粒子量は、使用さ

10

20

30

40

50

れる転写及び翻訳プロモーターの強さ及び発現される遺伝子産物の免疫原性に依存する。一般に、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{12}$  粒子（つまり、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$  又は  $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、）、好ましくは、約  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{11}$  粒子の免疫学的又は予防的有効量を、直接筋肉組織に投与する。皮下注射、皮内導入、皮膚を介した押印（*impresso*）及び腹腔内又は吸入送達などのその他の投与様式ももくろまれる。

#### 【0115】

本発明の組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターは、混合様式の初回刺激／追加免疫ワクチン接種計画の一部として、又は様々な血清型ベクターの複数注射に基づくワクチン接種計画において、単独で投与し得る。通常、少なくとも1個の免疫原を含有する初回刺激投与は、特定の病原体又は自己抗原に対する効果的な免疫反応を必要とする哺乳動物宿主に投与される。この投与は、効果的に、その後の抗原の同定において、宿主が免疫原に対してすぐに免疫反応を促進又は増強することができるように、免疫反応を刺激する。初回刺激及び追加免疫に対して代替的処方を利用する、混合様式ワクチン接種スキームの結果、免疫反応が促進される。初回刺激－追加免疫投与は通常、対象を少なくとも1回刺激することと（ウイルスベクター、プラスミド、タンパク質などによる。）、規定の時間の経過後、次に、追加免疫を行うこと（ウイルスベクター、プラスミド、タンパク質などによる。）を含む。複数免疫付与は、通常1回から4回であるが、さらに多く行い得る。初回刺激と追加免疫との間の時間の長さは、通常、約4ヶ月から1年の間で変化し得るが、当業者が認める場合、他の時間枠を使用し得る。中和免疫が明らかとなる前に、各ベクターの複数回注射を約2週間の時間枠内で投与することができる。

#### 【0116】

本発明のある実施形態において、アデノウイルスワクチンベクターの複数回の投与でワクチンを与え、このウイルスワクチンは、プラスミドワクチンの投与を伴う計画で与え得る。本明細書中で開示するベクターと組み合わせた使用に適切なプラスミドワクチンは、免疫原コード配列及び転写終結因子配列に機能可能に連結された、免疫原をコードする核酸配列の発現を支配することができる異種のプロモーターと組み合わせた、免疫反応の初回刺激又は増強が望ましい、少なくとも1個の免疫原をコードするプラスミドを含む。

#### 【0117】

例えば、組み換え複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクターの様々な血清型の複数注射を利用する投与計画を使用することができる。あるいは、プラスミドワクチンの最初の投与（つまり初回刺激投与）及び、該プラスミドワクチンにおいて送達された同じ免疫原のコード配列を含有する複製欠損組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターを含有する第二の投与（つまり追加免疫投与）を個体に与え得る。あるいは、その個体に少なくとも1個の免疫原をコードするヒトアデノウイルスワクチンベクターの最初の投与を行い、次いで、本明細書中で開示する複製欠損組み換えチンパンジーアデノウイルスベクター（これは、初回刺激投与において送達された同じ免疫原のコード配列を含有する。）を含有する第二の投与を行い得る。第二の代替的实施形態において、本発明のベクターを含有するワクチン組成物を最初に投与し、次いで、プラスミドワクチン投与を行い得る。これらの実施形態のいずれかにおいて、ウイルスベクター又はプラスミド形態のいずれかで、同じ免疫原の複数回投与を個体に行い得る。これは、規定の最小時間をあけて投与を行い得る。

#### 【0118】

目的の1個のタンパク質又は抗原が、本発明の組み換え複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクターにより送達されるのに加えて、別個のビヒクルを介して、又は同じビヒクルを介してのいずれかで、2以上のタンパク質又は抗原を送達することができる。複数のオープンリーディングフレームを含むアデノウイルスプレプラスミドの生成のための、適切なシャトルプラスミドに、複数の遺伝子／機能的同等物を連結することができる。この複数の遺伝子／機能的同等物に対するオープンリーディングフレームを、別個のプロモ-

ター及び転写終結配列に、機能可能に連結することができる。

#### 【0119】

本明細書中で示されるように、適切な免疫付与計画において、様々なアデノウイルス血清型を用いることができる。このようなプロトコールの一例は、第一の血清型（例えばChAd3又はChAd6）の組み換えアデノウイルスベクターを含有する初回刺激投与と、その後の、第二の血清型の組み換えチンパンジーアデノウイルスベクターを含有する追加免疫投与である。代替的な実施形態において、この初回刺激投与は、異なるタンパク質／抗原をコードする遺伝子をそれぞれ含有する、別個のアデノウイルスビヒクルの混合物を含み得る。このような場合、この追加免疫投与は、初回免疫投与で送達された同じ又は類似の抗原セットをコードする遺伝物質を含有する組み換えウイルスベクターを投与する、という条件で、別個のタンパク質／抗原をコードする遺伝子をそれぞれ含有するベクターの混合物を含み得る。これらの複数の遺伝子／ベクター投与様式をさらに組み合わせることができる。特異的抗原からの複数であるが別個の成分を含む、併用様式計画に着手することは、さらに、本発明の範囲内にある。

10

#### 【0120】

ヒトベクターのウイルスエレメントに対して向けられた既存の免疫により中和されないチンパンジーアデノウイルス由来の組み換えベクターを使用することにより、ワクチン担体としてのヒトAdベクターの使用に対する代替法が得られる。アデノウイルスが高免疫原性であるため、アデノウイルスベクターは、自己抗原に対する宿主寛容性を打破するために設計されたワクチン担体の関連での使用のための特に優れた候補である。さらに、ヒトウイルスと同等の効率での、ヒト細胞、特にPer.C6<sup>TM</sup>細胞株でのchimpウイルスの増殖能により、調節の観点及び治療法又はワクチンの大規模産生に対する両方から、顕著な有利性が与えられる。したがって、本発明は、遺伝子ワクチン接種のためのワクチン担体として、単独で、又は組み合わせて、使用し得る、組み換えウイルス調製を可能にする、チンパンジーアデノウイルス配列、ベクター及びプラスミドのコレクションを提供する。

20

#### 【0121】

本明細書中で言及した公表物は全て、本発明との関連で使用され得る方法及び物質を説明し開示する目的のために、参照により組み込む。明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

30

#### 【0122】

添付の図面を参照しながら本発明の好ましい実施形態を説明してきたが、本発明がまさにその実施形態に限定されず、添付の特許請求の範囲で定義される本発明の範囲又は精神から逸脱することなく、様々な変更及び改変が当業者によりなされ得ることを理解されたい。

#### 【0123】

次の実施例は、本発明を説明するが、限定するものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0124】

ChAdの単離、クローニング、配列決定及び特性決定

チンパンジーアデノウイルスの単離

ウイルス輸送培地（VTM； Microtest M4-R Multi-Microbe Transport Medium, Remel Inc.）において便検体を回収し、次にNIRC（New Iberia Research Center 4401 W. Admiral Doyle Drive New Iberia, LA 70560）で $-70^{\circ}\text{C}$ にて凍結又は直接凍結した。この検体を細胞培養物への接種のために処理するまで $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。この検体を細胞培養物へ接種する際、この検体を解凍し、次に過剰の氷冷ウイルス輸送培地中でボルテックスした。前記検体を懸濁液へ入れて解離させた後、それらを1500から1800 rpmで10分間遠心分離

40

50

した。上清を0.8  $\mu$ mシリンジフィルター及び0.2  $\mu$ mシリンジフィルターを通じて連続して濾過し、次にこの濾過した材料を細胞培養物へ接種した（シェルバイアルへ200から250  $\mu$ l、及び試験管培養物へ250から300  $\mu$ l）。処理した各検体を293細胞もしくはA549細胞を播種した試験管培養物及びシェルバイアル培養物へと接種した。

#### 【0125】

対照（ポジティブ及びネガティブ）培養物を、1セットの試料を接種する各場合に調製した。設定におけるシェルバイアルに全て接種したら、それらを室温にて60 $\pm$ 10分間、2000rpm（900xg）で遠心分離した。培養物中の熱損傷を防止するため、ローターの回転が停止した直後に前記バイアルを遠心分離機から取り出した。遠心分離後、交差汚染を防止するため、各バイアルにおいて新鮮な滅菌済みパスツールピペットを使用して、接種材料を前記シェルバイアルから吸引した。各洗浄につき1.0mlの新鮮な培地を使用して、前記培養物を3回洗浄した。3回目の洗浄の後、新鮮な培地（1.0ml）を各バイアルへピペットを介して添加し、前記シェルバイアルを35から37℃のインキュベーターの中で3日から4日間（約96時間）静置した。

10

#### 【0126】

培養期間の終了時に、上清を前記培養物から吸引し、各洗浄に対して約1.0mlの緩衝液を使用して、免疫蛍光アッセイ（IFA）緩衝液で各バイアルにおける細胞層を2回洗浄した。1.0mlの冷アセトン各バイアルへ添加する（2から8℃で10分間）ことにより、細胞を固定した。アセトン洗浄したスライドを、シェルバイアルカバースリップと関連付けた検体認識番号で標識した。このシェルバイアルカバースリップを、一次マウス抗アデノウイルス抗体 [MAB8052、Chemicon] を使用してアデノウイルス感染細胞の蛍光標識用に処理した。蛍光顕微鏡を使用して、スライドを評価する。ウェル（1+から4+）にわたる免疫蛍光がカバーする範囲に留意して、10倍の対物レンズを使用して各調製物をスキャンした。40倍の対物レンズを使用して特異的免疫蛍光の有無を確認した。前記シェルバイアルについて記載したものと同一手順で、試験管培養物に接種した（例えば、ネガティブ対照を最初に処理し、次いで、臨床検体及びポジティブ対照）。この接種材料を36から38℃にて60分から120分間吸着させた。吸着時間後、この検体／対照を試験管から吸引し、新鮮な培地と交換した。

20

#### 【0127】

接種から3日から4日後、及び、その後週に1回、この培養試験管から培地を吸引し、1.5mlの新鮮な培地と交換した。培養試験管をCPEについて、接種後少なくとも21日間、少なくとも1日おきに目で見えて観察した。チンパンジー検体で接種した培養物を対照と比較し、CPEの程度を観察することによって評価した。14日後に、CPEを示さない培養物を新鮮な試験管培養物へ通し、21日後にCPEに対して陰性である培養試験管を陰性とみなした。3+から4+のCPEの培養試験管を10秒間ボルテックスした。細胞を試験管壁から、滅菌済みの1.0ml血清学用ピペットを使用して回収し、培養上清中で懸濁した。5mlのスナップキャップ試験管に検体認識番号及び日付を付した後、-70℃で保存した。この細胞懸濁液 500  $\mu$ lを、培養試験管からスナップキャップ試験管へ移し、アデノウイルスを検出するための間接免疫蛍光抗体技術（シェルバイアルを染色するための手段と同等）を使用して処理するまで、2℃から8℃で最長1日間保存した。

30

40

#### 【0128】

チンパンジーアデノウイルス増幅

ATCC又はEsoterix Inc., . Austin, Texasから購入した野生型チンパンジーアデノウイルスCV32、CV33、CV23及びCV68（ATCC受託番号：CV32、VR-592；CV33、VR-593；）及びオリジナルの分離株を、ヒトE1発現細胞株PER.C6<sup>TM</sup>又は293を使用することによって以下のように増殖させた。簡潔には、10% ウシ胎児血清（FBS GibcoBRL, Life Technologies）、1% ペニシリンーストレプトマイシン、2

50

mM グルタミン及び10mM  $MgCl_2$  (Per. C6<sup>TM</sup>) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; GibcoBRL, Life Technologies) 中で細胞を培養した。5% ウマ血清 (GibcoBRL, Life Technologies) を添加したDMEM中でアデノウイルス感染を行った。細胞の100%がウイルスにより誘導される細胞病理学的効果 (CPE) を呈したら、感染した細胞及び培地を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞溶解させた。

#### 【0129】

野生型チンパンジーアデノウイルス (CV) ストックを全て、増幅の第一継代後に96穴プレートに播種した293細胞を感染させることによってクローニングした。ウイルスクローニングは、ウイルス増幅の第一継代で得られる細胞溶解液の希釈を制限することによって行った。5個の単離されたクローンを拾い、連続して増殖させた。増幅の3回から4回の連続した継代の後、5つの2層細胞ファクトリー (NUNC) 上に播種した細胞において、アデノウイルスの大規模調製を行った (1つの細胞ファクトリーにつき2億個の細胞)。塩化セシウム密度勾配における超遠心段階を2回行い、細胞溶解液から、精製したウイルス粒子を得た。

#### 【0130】

ウイルスゲノムDNAの配列決定

1% SDS-TEN中のプロテイナーゼK (0.5mg/ml) で (55℃で2時間) 消化することにより、精製ウイルス調製物  $3 \times 10^{12}$  ppから、ゲノムDNAを単離した。フェノールクロロホルム抽出ならびにエタノール沈殿の後、このゲノムDNAを水中で再懸濁し、ゲノム配列決定に供した。

#### 【0131】

全長のAdゲノム配列決定のため、精製ウイルスDNAを霧状にし、無作為にせん断された断片を得た。E. コリDNAポリメラーゼ及びポリヌクレオチドキナーゼのKlenow断片を用いて、このDNA断片を平滑末端化にした。平滑末端断片を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、1から3kbの範囲の大きさの断片を精製し、pUC19ベクターのSmaI部位へとクローニングし、ショットガンライブラリを作製した。ライゲーションを使用してコンピテントXL1-Blue MRF' を形質転換した。X-gal及びIPTGを含有するLB寒天上での白色/青色スクリーニングにより陽性コロニーを同定した。プラスミドDNAの3個から4個の96穴ブロックをライブラリから単離し、pUC順方向プライマー及び逆方向プライマーを用いて配列決定した。配列決定の読み取りは全て、Phred-Phrapソフトウェアパッケージを使用して性質及びベクター配列についてスクリーニングした。このスクリーニングを通過した読み取りをコンティグに集めた。プライマーは、ギャップを閉鎖し、両端のDNA配列を決定するために、アデノウイルスDNAを直接配列決定するよう設計した。

#### 【0132】

ChAd3 (配列番号1)、ChAd6 (配列番号2)、CV32 (配列番号3)、CV33 (配列番号4)、及びCV23 (配列番号5) を含む選択されたウイルスについて完全なウイルスゲノム配列決定が行われた。表1は、ChAd3、ChAd6、Pan5 (CV23)、Pan6 (CV32)、Pan7 (CV33)、C1及びC68アデノウイルスゲノムのヌクレオチド配列間の同一性の割合を要約するデータを提供する。アライメントは、FASTAパッケージ第2版の一部としてのALIGNプログラムを使用して計算した (William R. Penson, University of Virginia; Myers & Miller, CABIOS 1989, 4: 11-17)。

#### 【0133】

## 【表 1】

## チンパンジーアデノウィルスゲノム間のヌクレオチド配列同一性の割合 %

|       | ChAd3 | ChAd6 | Pan5 | Pan6 | Pan7 | C1   | C68  |    |
|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|----|
| ChAd3 | 100   | 68.1  | 68.5 | 68.2 | 68.3 | 64.2 | 68.0 |    |
| ChAd6 |       | 100   | 95.5 | 94.5 | 95.5 | 73.6 | 91.4 |    |
| Pan5  |       |       | 100  | 94.9 | 96.7 | 73.9 | 92.7 |    |
| Pan6  |       |       |      | 100  | 95.1 | 73.6 | 91.3 |    |
| Pan7  |       |       |      |      | 100  | 73.8 | 93.0 | 10 |
| C1    |       |       |      |      |      | 100  | 74.3 |    |
| C68   |       |       |      |      |      |      | 100  |    |

## 【0134】

新規のアデノウィルス分離株（例えば、ChAd20、ChAd4、ChAd5、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82）の特徴を調べるために、ヘキソン及び繊維遺伝子のヌクレオチド配列もプライマリーウォーキングにより決定した。繊維遺伝子は、配列番号6から15（配列番号6、ChAd20；（配列番号7、ChAd4）；配列番号8、ChAd5）；配列番号9、ChAd7）；配列番号10、ChAd9）；配列番号11、ChAd10）；配列番号12、ChAd11）；配列番号13、ChAd16）；配列番号14、ChAd17）；配列番号15、ChAd19）及び（配列番号58、ChAd8）、（配列番号60、ChAd22）、（配列番号62、ChAd24）、（配列番号64、ChAd26）、（配列番号66、ChAd30）、（配列番号68、ChAd31）、（配列番号70、ChAd37）、（配列番号72、ChAd38）、（配列番号74、ChAd44）、（配列番号76、ChAd63）及び（配列番号78、ChAd82）である。図20Aから20Gは本明細書中で開示され主張される前記ChAd分離株の繊維タンパク質のアミノ酸配列の比較を与える。

## 【0135】

ヘキソン遺伝子配列は、配列番号16から25（配列番号16、ChAd20）；配列番号17、ChAd4）；配列番号18、ChAd5）；配列番号19、ChAd7）；配列番号20、ChAd9）；配列番号21、ChAd10）；配列番号22、ChAd11）；配列番号23、ChAd16）；配列番号24、ChAd17）；配列番号25、ChAd19）、（配列番号97、ChAd8）、（配列番号99、ChAd22）、（配列番号101、ChAd24）、（配列番号103、ChAd26）、（配列番号105、ChAd30）、（配列番号107、ChAd31）、（配列番号109、ChAd37）、（配列番号111、ChAd38）、（配列番号113、ChAd44）、（配列番号115、ChAd63）及び（配列番号117、ChAd82）である。図31Aから31Jは、本明細書に開示され主張されるChAd分離株のヘキソンタンパク質のアミノ酸配列の比較を与える。

## 【0136】

## チンパンジーアデノウィルスの分類

異なるチンパンジーアデノウィルス株の分類は、6個のサブグループへのヒトアデノウィルス血清型のすでに提唱されている分類（Horowitz, MS (1990) *Adenoviridae and their replication*. Virology B. N. Fields及びD. M. Knipe, 編 (Raven Press, New York) pp. 1679-1740) に従い、Align Xプログラム (Informax, Inc) を使用することによるアミノ酸及びヌクレオチド配列

アラインメントにより得た。

#### 【0137】

新たな分離株の最初の分類は、異なる制限エンドヌクレアーゼによるウイルスゲノムの制限パターンを観察すること及びヘキソン遺伝子の超可変領域7（HVR7）の配列分析により得られた。このために、HVR7に隣接する高度に保存された領域に関して2つのプライマー：TGTCCTACCACTCTTGCTTGA（配列番号45）及びGTGGAARGGCACGTAGCG（配列番号46）を設計した。精製ウイルスDNA又は未精製293細胞溶解液をテンプレートとして使用するPCRによりこのHVR7を増幅した後配列決定した。HVR7配列分析に基づいて、我々は、新たに単離されたウイルスを、ヒトAdウイルスについて提唱されるサブグループ（A～F）へ分類した（Horowitz, MS (1990) Adenoviridae and their replication. Virology B. N. Fields and D. M. Knipe編 (Raven Press, New York) pp. 1679-1740)。

10

#### 【0138】

図35に示される系統発生樹はヒト及びチンパンジーのアデノウイルスヘキソンアミノ酸配列のアラインメントにより得られた。この結果は、Align Xプログラム（Informax, Inc）を使用することによるヘキソンHVR7に限定したヌクレオチド配列アラインメントに基づく最初の分類と一致する。この系統樹は、PAUPSEARCH（Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc.）を使用する全長のヘキソンペプチド配列の多配列アラインメントから推定し、TREEVIEWにより可視化を行い、操作した。Wisconsin Packageにおいて実装されるPAUPSEARCHプログラムを使用してブートストラップ信頼分析を実行した。各アラインメントについて、検索基準として「Heuristic Search」を用い、最適性基準としてMaximum Parsimonyを用いて、前記プログラムを1000個の複製物に関して実行し、報告する信頼値は、50%多数決コンセンサス（50% majority-rule consensus）から得た。

20

#### 【実施例2】

#### 【0139】

ChAdシャトルベクター及び発現ベクターの構築及びレスキュー  
ベクター構築及びレスキュー

30

ウイルスゲノムの左右両端由来のウイルスDNA配列を含有する適切なシャトルベクターを用いて、相同組み換えにより、ゲノムウイルスDNAを標準プラスミドベクターにクローニングした（図2）。下記でさらに詳しく述べるように、グループ特異的シャトルベクターを開発するために、同一血清型サブグループに分類されるウイルス間で観察される配列相同性を利用した。サブグループD及びEへ分類されるチンパンジーアデノウイルスのゲノムウイルスDNAは、両サブグループに属するウイルスをクローニングするための共通のシャトルベクターの構築が可能となるのに十分な相同性を生じた。

#### 【0140】

サブグループD/Eシャトルベクターの構築

40

ChAd6ウイルスゲノムを完全に配列決定し（配列番号2）、得られた情報を使用して、サブグループD及びEのチンパンジーアデノウイルスの相同組み換えによるクローニングを促進するためにシャトルベクターを構築した。

#### 【0141】

本明細書でpARS ChAd6-3と呼ばれるChAd6シャトルベクターの構築を図1に記載する。図32は、本明細書に記載されるクローニング実験で使用するオリゴヌクレオチド配列（配列番号26から40及び配列番号45から46）のリストを提供する。簡潔に述べると、オリゴヌクレオチド、5'-ATGGAATTCTTTTAAACCATCATCAATAATATACCTC-3（配列番号27）及び5'-CGCTGGCACTCAAGAGTGGCCTC-3'（配列番号28）を使用して、PCRによ

50

りChAd6 DNAの左端由来の457bpを増幅し、EcoRI及びSnaBIで消化し、EcoRI-SnaBIで切断しておいたpNEBAd35-2ヘクロニングし、pNEBChAd6-LIを得た。右のChAd6 ITR (bp36222からbp36648)を、PCRにより、オリゴヌクレオチド5'-ATGAAGCTTGTTTAAACCCATCATCAATAATATACCT-3' (配列番号29)及び5'-ATCTAGACAGCGTCCATAGCTTACCG-3' (配列番号30)を用いて増幅し、制限酵素HindIII及びXbaIで消化し、HindIII-XbaIで切断しておいたpNEBChAd6-LIヘクロニングし、その結果、pNEBChAd6-RLIを得た。最後に、ChAd6ゲノムDNA配列のヌクレオチド3426から3813に対応するDNA断片を、オリゴヌクレオチド5'ATGCTACGTAGCGATCGCGTGAGTAGTGTGGGGGTGGGTGGG-3' (配列番号31)及び5'-TAGGCGCGCCGCTTCTCCTCGTTCAGGCTGGCG-3' (配列番号32)を用いて増幅し、SnaBI及びAscIで消化した後にSnaBI-AscIで消化しておいたpNEBChAd6-RLIにライゲーションし、その結果、pNEBChAd6-RLIdE1を得た。

10

#### 【0142】

DH5a E. コリ株における組み換え及びプラスミド増幅効率を向上させるため、ChAd6の左右両方のITRを含有する1306bp断片及びpIX遺伝子断片を、pNEBChAd6-RLIdE1から、PmeI消化により切り出し、pMRKAd5SEAPからの、オリゴヌクレオチド5'-GATCTAGTTAGTTTAAACGAATTCTGGATCTGCGACGCG-3' (配列番号33)及び5'-TTCGATCATGTTTAAACGAATAAAGAAATTCGGATCC-3' (配列番号34)を使用するPCR増幅により得られた異なるプラスミドベクターへ移した。この最後のライゲーション段階により、ChAd6シャトルベクター pARSCChAd6-3が生じた。

20

#### 【0143】

サブグループCシャトルベクターの構築

ChAd3ウイルスゲノムを完全に配列決定し (配列番号1)、得られた情報を使用して、サブグループCチンパンジーアデノウイルスの相同組み換えによるクローニングを促進するためにシャトルベクターを構築した。

30

#### 【0144】

簡潔には、本明細書でpChAd3EGFPと呼ばれるサブグループCチンパンジーアデノウイルスをクローニングするのに使用されるシャトルベクターを以下のように構築した。pIXコード化領域を含有するChAd3 DNA断片 (ヌクレオチド3542から4105)を、オリゴヌクレオチド5'-TATTCCTGCGATCGCTGAGGTGGGTGAGTGGGCG-3' (配列番号35)及び5'-TAGGCGCGCCCTTAAACGGCATTGTGGGAG-3' (配列番号36)を使用するPCRにより増幅し、SgfI-AscIにより消化し、その後SgfI-AscIで消化したpARSCV32-3へとクローニングし、pARS-ChAd3Dを得た。ChAd3右端 (nt37320から37441)を、オリゴヌクレオチド5'-CGTCTAGAAAGACCCGAGTCTTACCAAGT-3' (配列番号37)及び5'-CGGGATCCGTTTAAACCATCATCAATAATATACCTTATT-3' (配列番号38)を用いたPCRにより増幅し、XbaI及びBamHIで消化した後、XbaI及びBamHIで制限酵素処理したpARS-ChAd3Dへライゲーションし、pARS-ChAd3RDを得た。ChAd3ウイルスDNA左端 (nt1から460)を、オリゴヌクレオチド5'-ATGGAATTCTGTTTAAACCATCATCAATAATATACCTT-3' (配列番号39)及び5'-ATGACGCGATCGCTGATATCCTATAATAATAAAGCAGACTTTTG-3' (配列番号40)を用いたPCRにより増幅し、EcoRI及びSgfIで消化した後、EcoRI及びSgfIで切断したpARS-ChAd3RDヘクロニングし、その結果、pARS-ChAd3

40

50

d 3 R L Dを得た。このウイルスDNAカセットはまた、酵素切断によってプラスミドDNAからウイルスDNAが放出されるよう、両 I T Rの端にある制限酵素部位 (P m e I) を含有するように設計された。

#### 【0145】

サブグループBシャトルベクターの構築

サブグループBシャトルの構築は、サブグループC及びD/Eシャトルの構築についてすでに記載したストラテジーに従った。簡潔には、p A R S - C h A d 3 R L Dが左端、p I X領域、右端を、C h A d 3 0の対応する断片と置換することによって改変した。さらに、C h A d 3 0のE 4領域を、C h A d 3 0 E 4プロモーター調節の下でクローニングされるA d 5 E 4 o r f 6と置換した。このシャトルプラスミドを、p C h A d 3 0 E G F Pシャトルベクターと命名した。

10

#### 【0146】

Δ E 1チンパンジーアデノウイルスベクターの構築

サブグループB：サブグループBのチンパンジーアデノウイルスベクターをE. コリ株 B J 5 1 8 3における相同組み換えにより構築した。B J 5 1 8 3細胞に対して、B s t E I I及びB s t 1 1 0 7 Iで消化したp C h A d 3 0 E G F Pシャトルベクターと、C h A d 8及びC h A d 3 0の精製ウイルスDNAとを用いて、同時形質変換した。p I X遺伝子、直線化したp C h A d 3 0 E G F Pシャトルの両端に存在する右 I T R DNA配列及びウイルスゲノムDNAの間の相同組み換えにより、プラスミドベクターにおける挿入が可能になり、E G F P発現カセットにより置換されるE 1領域が同時に欠失した。ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) プロモーター及びウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル (B g hポリA) に基づいた発現カセットを構築して、分泌されるアルカリフォスファターゼ (S E A P)、E G F P、H I V g a g、H C V NS領域 (C h A d 6シャトルベクターについて図3に記載されるようなもの。)、並びにヒト及びアカゲザル由来のC E A及びH E R 2 n e uのような腫瘍関連抗原を発現させた。全ての発現カセットを相同組み換えによりC h A d 3 0ベクターへと挿入した。

20

#### 【0147】

サブグループC：サブグループCのチンパンジーアデノウイルスベクターをE. コリ株 B J 5 1 8 3における相同組み換えにより構築した。B s t E I I及びB s t 1 1 0 7 Iで切断したp C h A d 3 E G F Pシャトルベクターと、C h A d 3、C h A d 1 1、C h A d 1 9及びC h A d 2 0の精製ウイルスDNAと、を用いて、B J 5 1 8 3細胞に対して同時形質変換を行った。p I X遺伝子、直線化したp C h A d 3 E G F Pシャトルの端に存在する右 I T R DNA配列と、ウイルスゲノムDNAとの間の相同組み換えにより、プラスミドベクターにおける挿入が可能になり、E G F P発現カセットにより置換されるE 1領域が同時に欠失した。ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) プロモーター及びウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル (B g hポリA) に基づいた発現カセットを構築して、分泌されるアルカリフォスファターゼ (S E A P)、E G F P、H I V g a g、H C V NS領域 (C h A d 6シャトルベクターに対して図3に記載されるようなもの。)、並びにヒト及びアカゲザル由来のC E A及びH E R 2 n e uのような腫瘍関連抗原を発現させた。

30

40

#### 【0148】

サブグループD及びE：サブグループD及びEのチンパンジーアデノウイルスに基づいたΔ E 1ベクターを構築するため、シャトルベクターp A R S - C h A d 6 - 3をA s c Iで消化し、E. コリ株 B J 5 1 8 3に、C V 3 2、C V 3 3、C V 6 8、C h A d 4、C h A d 5、C h A d 6、C h A d 7、C h A d 9、C h A d 1 0及びC h A d 1 6の精製ウイルスDNAを用いて同時形質転換した。p I X遺伝子及び直線化したp C h A d 6 - 3の端に存在する右 I T R DNA配列と、ウイルスゲノムDNAとの間の相同組み換えにより、プラスミドベクターにおける挿入が可能となり、E 1領域が同時に欠失した。(図2及び図4)。ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) プロモーター及びウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル (B g hポリA) に基づいた発現カセットを構築して、

50

分泌されるアルカリフォスファターゼ（SEAP）、EGFP、HIVgag、HCV NS領域（図3）、並びにヒト及びアカゲザル由来のCEA及びHER2 neuのような腫瘍関連抗原を発現させた。図4に記載されるようなΔE1アデノウイルスプラスミドへの相同組み換えによって転移されるpARS ChAd6-3ベクターの1個のSnaBI部位へ全発現カセットを挿入した。

#### 【0149】

ΔE1ベクターのレスキュー及び増幅

6cmの細胞培養皿に播種された $5 \times 10^6$ 個のPER.C6<sup>TM</sup>細胞を、エンドヌクレアーゼ消化によりプラスミド配列から放出されるクローン化されたウイルスベクター10μgでトランスフェクションした。Lipofectamine（Invitrogen）を使用してDNAトランスフェクションを行った。トランスフェクションした細胞及び培地を、トランスフェクションから5から10日後に回収し、凍結解凍により溶解した。次に、レスキューしたベクターを293細胞又はPER.C6<sup>TM</sup>細胞での連続継代により増幅した。総計1から $2 \times 10^9$ 個の細胞において、5から10個の細胞ファクトリー（NUNC, Inc.）上に播種した細胞を感染させることによって大規模増幅を行った。塩化セシウム勾配上での2回の超遠心により、精製ベクター調製物を得て、10%グリセロールを含有するPBSに対して透析し、分注して-70℃にて保存した。

#### 【実施例3】

#### 【0150】

中和実験

本明細書で開示されるチンパンジーアデノウイルスに対する中和抗体のヒト血清における普及率を評価するため、中和アッセイを実行した。このアッセイにより、分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）に対する遺伝子を担うチンパンジーアデノウイルスがヒト293細胞に対して形質導入する能力に及ぼす血清プレインキュベーションの効果を評価した。中和タイターは、ウイルスのみのポジティブ対照において観察されるSEAP活性の50%の低下を与える血清の希釈度として定義される。

#### 【0151】

CV33-SEAP、CV32-SEAP及びChAd3-SEAPの $2 \times 10^6$ 個から $1.5 \times 10^7$ 個の自然粒子を完全培地100μlに希釈し、完全培地に希釈したヒト又はチンパンジー血清等量に添加した。各血清試料を様々な希釈率で試験した（1/18希釈から開始して、1/4希釈を5回行い、1:4608まで。）。試料を37℃で1時間プレインキュベーションし、その後96穴プレートへ播種した293細胞（1個のウェルあたり $3 \times 10^4$ 個の細胞）へ添加した。インキュベーションの1時間後に接種材料を除去し、細胞に新鮮培地を再供給し、24時間後、培地50μlを取り出し、SEAP活性を化学発光アッセイにより測定した。ウイルスのみのポジティブ対照において観察されるSEAP活性の50%低下を与える血清の希釈度として、中和タイターを定義する。100検体のヒト血清のパネルをChAd中和活性について検査した。並行して同じパネルをAd5 SEAPベクターに関して検査した。

#### 【0152】

#### 【表2】

### チンパンジーアデノウイルスに対する中和抗体の普及率

|      | ウイルス |      |      |       |        |       |        |
|------|------|------|------|-------|--------|-------|--------|
| タイター | hAd5 | CV32 | CV33 | ChAd3 | ChAd30 | ChAd9 | ChAd10 |
| <200 | 77%  | 96%  | 100% | 92%   | 100%   | 92%   | 100%   |
| >200 | 33%  | 4%   | 0%   | 8%    | 0%     | 6%    | 0%     |

#### 【0153】

表2で与える結果は、チンパンジーアデノウイルス由来のベクターに対して向けられた

、中和抗体のヒト血清における普及率が非常に低いことを示す。C V 3 2 ベクターにおいて200の閾値を超えるタイターを示すものは、4検体の血清のみであるのに対し、C h A d 3 S E A P ベクターについては、8検体が200を超えるタイターを示した。一方、検査したチンパンジー血清のパネルは、抗チンパンジーA d免疫性の普及率が非常に高いことを示した。これらの知見から、予想したように、チンパンジーA dに基づくベクターがヒトにおいて中和される機会が非常に少ないことが確認された。それゆえこれらの知見は、A d 5などの共通のヒトA d血清型に基づいたウイルスベクターの投与を制限する、既存の抗ヒトA d免疫性の問題に対する理想的な解決を呈示する。

#### 【実施例4】

##### 【0154】

##### C h A d ベクター親和性

A d 5 ベクター及びC h A d ベクターを介した遺伝子導入の効率を、異なる組織由来のヒト初代細胞のパネルにおけるE G F P 発現により評価した。ヒト軟骨細胞、骨芽細胞、ケラチン生成細胞、メラニン細胞、骨格筋細胞及びメラニン細胞を製造者の説明書に従って培養した。ヒト単球細胞、未成熟及び成熟樹状細胞(D C)を記載されているように得た(R o m a n i, N. ら、1996, J. I m m u n o l. M e t h o d s, 1996, 137.)。形質導入された蛍光細胞をF A C S 分析により検出した。試験するヒト初代細胞のパネルには、心臓循環器疾患、関節リウマチ、組織工学(骨、皮膚及び軟骨)及びワクチン接種の分野におけるインビボ及びエクシボでの遺伝子導入を利用した異なる治療ストラテジーに対する重要な標的細胞である細胞が含まれる。図38Aから図38Dで示す結果は、異なる細胞タイプの感染の差異に基づく効率により示されるように、C A R に代わる受容体を、異なるチンパンジーアデノウイルスが認識できることが示唆される。

##### 【0155】

##### マウス免疫付与実験

##### 方法及び材料

##### 免疫付与プロトコール及び脾臓細胞/P B M C 調製

免疫付与：緩衝液 0.1 mL で希釈した、選択したアデノウイルスを用いてマウスに免疫付与した。各ベクター用量を50 µ l ずつ2つに分割し、マウスの両側の大腿四頭筋に注射した。

##### 【0156】

脾臓細胞調製：マウスを注射3週間後に屠殺し、それらの脾臓を摘出し、R 1 0 (10 % F C S、55 mM 2-メルカプトエタノール、1 M H E P E S 緩衝液、2 mM L-グルタミン、R P M I 培地1640中の1xペニシリンーストレプトマイシン溶液) 10 mL に移した。スチール製の網を介して脾臓を細分化し、R 1 0 2 mL でこの網を洗浄した後、脾臓細胞を50 mL のファルコンチューブに移し、1200 rpm で10分間室温(r t)にて遠心分離した。上清を除去し、A C K 溶解緩衝液(G i b c o B R L F o r m u l a t i o n # 7 9 - 0 4 2 2 D G) 3 mL を添加した。細胞を5分間r tでインキュベーションした。1x P B S 45 mL を添加し、試験管を上述のように遠心分離した。R 1 0 30 mL で洗浄した後、細胞をR 1 0 5 mL 中で再懸濁し、70 µ m ナイロン細胞濾過器(F a l c o n 2 3 5 0)を介して濾過した。細胞 10 µ L をT u r k 溶液(M e r c k 0 4 0 4 1 7 3 4 5) 990 µ L で希釈し、計数した。最終的に、細胞をR 1 0 中で、10<sup>7</sup>個細胞/mLに希釈した。

##### 【0157】

末梢血単核球(P B M C)調製：マウス血液試料(150 µ L)を2 mLのエッペンドルフチューブへ50 µ L P B S / 2 % E D T A とともに移した。1 mL A C K 緩衝液を各チューブへ添加した。R T で5分間穏やかに混合し、インキュベーションした。試料を微量遠心器において1500 rpm で5分間遠心分離した。上清を除去し、同じ免疫付与コホート由来の白血球ペレットを合わせた。A C K 緩衝液インキュベーションを繰り返した後、P B M C のペレットを、R 1 0 培地 1 mL に再懸濁した。

##### 【0158】

I F N -  $\gamma$  E L I S P O T アッセイ

Millipore MAIP45プレートを、PBSで2.5  $\mu$ g/mLに希釈した、100  $\mu$ l/ウェルの精製ラット抗マウスI F N -  $\gamma$ モノクローナル抗体 (Pharmingen、cat. 551216) でコーティングし、4℃で一晩 (o/n) インキュベーションした。プレートを滅菌済みPBSで2回洗浄し、CO<sub>2</sub> インキュベーターの中でR10 200  $\mu$ l/ウェルとともに2時間インキュベーションすることにより、非特異的結合部位をブロックした。HIV gagを発現するAdベクターによる免疫付与実験において、9マーのペプチド (AMQMLKETI、Balb/CマウスにおいてマッピングされるCD8 HIV GAG エピトープ) (配列番号47) をR10中で2  $\mu$ g/mLに希釈し、50  $\mu$ l/ウェルの量でウェルに添加した。HCV-NS発現ベクターを用いて行った免疫付与実験において、NS3ヘリカーゼドメインをカバーするペプチドのプールならびにヘリカーゼドメインに含まれるマッピングされたCD8エピトープを呈示する9マーのペプチドを使用した。ヒトCEA抗原を発現するChAdによる免疫化実験を、全アミノ酸配列をカバーする、重複する15マーペプチドのプールにより評価した。対照としてDMSO及びコンカナバリンAを使用した。細胞を各ウェルへ5  $\times$  10<sup>5</sup> 及び2.5  $\times$  10<sup>5</sup> の量で添加した。CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて一晩インキュベーションした後、プレートを0.05% Tween 20/PBSで洗浄し、アッセイ緩衝液 (5% FBS、0.005% Tween 20、PBS) で1/250に希釈したビオチン化ラット抗マウスI F N -  $\gamma$ モノクローナル抗体 (Pharmingen、Cat. 554410) 50  $\mu$ l/ウェルを添加した。プレートを4℃で一晩インキュベーションし、上述のように洗浄した。ストレプトアビジン-アルカリフォスターゼ複合体 (BD 554065) をアッセイ緩衝液で1/2500に希釈し、50  $\mu$ L/ウェルの量で室温にて2時間添加した。洗浄後、BCIP/NBT 1ステップ溶液 (Pierce 34042) 50  $\mu$ L/ウェルを添加してプレートを発色させた。ウェルを脱イオン水で洗浄することにより反応を停止させた。スポットをELISPOTリーダーにより自動計数した。

## 【0159】

マウス I F N -  $\gamma$  細胞内染色 (ICS)

脾臓細胞をR10 1mL中2  $\times$  10<sup>6</sup> 個細胞に希釈し、2  $\mu$ g/mLの濃度の上述と同じ抗原で刺激した。対照として、DMSO及びブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB) を使用した。CO<sub>2</sub> インキュベーター中で一晩インキュベーションした後、細胞をFACS緩衝液 (1% FCS、0.01% NaN<sub>3</sub>、PBS) で洗浄し、精製した抗マウスCD16/CD32Fcブロック (クローン2.4G2、Pharmingen、cat. 553142) を1/25に希釈し、100  $\mu$ L/試料の量で添加し、4℃で15分間インキュベーションした。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液で1:50に希釈したAPC標識抗マウスCD3e (クローン145-2C11、Pharmingen #553066)、PE標識抗マウスCD4 (クローンL3T4、BD Pharmingen、cat. 553142) 及びPerCP標識抗マウスCD8a (クローン53-6.7、Pharmingen、cat. 553036) を100  $\mu$ L/試料の量で添加した。細胞をrtで30分間インキュベーションし、洗浄し、固定し、浸透させ (Becton Dickinson、FACS Perm2)、PermWash (100  $\mu$ L/試料) 中で1:50に希釈したFITC標識抗マウスI F N -  $\gamma$  (Pharmingen、cat. 554411) とともにRTにて30分間インキュベーションした。洗浄後、細胞を1% ホルムアルデヒド/PBS 500  $\mu$ Lに再懸濁し、CellQuestソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて細胞内サイトカイン染色 (ICS) をFACS-Caliburフローサイトメーターで分析した。

## 【実施例5】

## 【0160】

ChAdベクターはマウスにおいて強いCMI反応を誘発する

本明細書に開示されるChAdベクターが細胞性免疫反応 (CMI) を誘発する能力を、HIV gag導入遺伝子を発現するベクターを使用してマウスにおいて評価した。簡潔

10

20

30

40

50

に述べると、5匹のB a l b / Cマウスの群に、様々なベクターを、マウス1匹あたり $10^5$ から $10^{10}$  v p の、10倍ずつ増加する用量で注射した。

【0161】

注射から3週間後に、脾臓細胞中のg a g特異的C D 8<sup>+</sup> T細胞を定量することにより、免疫反応の強さを調べた。B a l b / Cマウスにおいてマッピングされるg a g C D 8<sup>+</sup> T細胞エピトープを再現するペプチドによるインビトロ刺激後に、E L I S P O Tアッセイによって又はI F N- $\gamma$ 細胞内染色及びF A C S分析によって、I F N- $\gamma$ 分泌C D 8<sup>+</sup> T細胞の数を調べた。

【0162】

表3で報告する5匹の免疫付与動物から得られた結果は、9マーのC D 8<sup>+</sup> g a gエピトープ又はg a gペプチドプールとのインキュベーション後の、脾臓細胞100万個あたりのスポット形成細胞数として示す。g a gペプチドプールは、全g a g配列を包含する10-a aまで重複する20-a aペプチドからなる。ポジティブの値を太字で示す。

10

【0163】

表3で与えるデータから、本明細書に開示され主張されるC h A dベクターの投与により、h A d 5によって誘発される反応に匹敵する強い細胞性免疫反応が誘発されることが示される。ポジティブの免疫付与結果（免疫付与ブレイクポイント）を生じる最低のベクター用量で観察することによって、発明者らは、 $10^6$  p pベクター用量でのブレイクポイントを有するもっとも有力なサブグループCのC h A d 3 g a gである、様々なベクターの効力を評価した。免疫付与ブレイクポイントによる評価を図33に示す。

20

【0164】

【表 3】

チンパンジーAdベクターで免疫付与したBalbcマウスにおけるGag特異的T細胞反応

| ワクチン接種       | 10 <sup>5</sup> vp |     | 10 <sup>6</sup> vp |      | 10 <sup>7</sup> vp |       | 10 <sup>8</sup> vp |        | 10 <sup>9</sup> vp |      | 10 <sup>10</sup> vp |      |
|--------------|--------------------|-----|--------------------|------|--------------------|-------|--------------------|--------|--------------------|------|---------------------|------|
|              | Δ                  | Gag | Δ                  | Gag  | Δ                  | Gag   | Δ                  | Gag    | Δ                  | Gag  | Δ                   | Gag  |
| ChAd3DE1gag  | 1                  | neg | 1                  | 944  | 1                  | 1298  | 1                  | 1258   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 3                  | neg | 1                  | 1039 | 1                  | 1958  | 1                  | 1962   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 1                  | neg | 1                  | 859  | 1                  | 1923  | 1                  | 1931   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 1                  | neg | 1                  | 1620 | 1                  | 1386  | 1                  | 1369   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 1                  | neg | 1                  | 1529 | 5                  | 1442  | 4                  | 1436   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| CV33DE1gag   | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 2                  | 475   | 1                  | 2910   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 433   | 1                  | 401    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 243   | 1                  | 634    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 505   | 2                  | 3457   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 683   | 2                  | 1684   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| CV68DE1gag   | NT                 | NT  | 3                  | neg  | 1                  | 340   | 2                  | 332    | 0                  | 406  | 2                   | 635  |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 512   | 0                  | 536    | 1                  | 256  | 3                   | 1172 |
|              | NT                 | NT  | 0                  | neg  | 2                  | 458   | 3                  | 944    | 2                  | 462  | 2                   | 505  |
|              | NT                 | NT  | 7                  | neg  | 0                  | 148   | 1                  | 519    | 0                  | 488  | 2                   | 1184 |
|              | NT                 | NT  | 0                  | neg  | 2                  | 1418  | 1                  | 243    | 0                  | 240  | 1                   | 789  |
| ChAd9DE1gag  | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 7                  | 389   | 1                  | 609    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 508   | 1                  | 739    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 299   | 16                 | 291    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 2                  | 507   | 8                  | 926    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 0.5                | neg  | 1                  | 36    | 40                 | 1034   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| ChAd10DE1gag | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 83    | 1                  | 822.5  | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 42.5  | 1                  | 1033   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 48    | 1                  | 1339.5 | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 4                  | 51    | 1                  | 1132   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 466.5 | 1                  | 521.5  | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| ChAd6DE1gag  | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 34    | 1                  | 721    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 10                 | 4     | 1                  | 560    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 24    | 1                  | 624    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 225   | 3                  | 3002   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | 276   | 4                  | 1738   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| ChAd11DE1gag | 1                  | neg | 1                  | neg  | 0                  | 573   | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 0                  | neg | 0                  | neg  | 0                  | 919   | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 0                  | neg | 1                  | neg  | 1                  | 1438  | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 2                  | neg | 0                  | neg  | 0                  | 0     | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 1                  | neg | 1                  | neg  | 0                  | 456   | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| ChAd20DE1gag | 0                  | neg | 0                  | neg  | 0                  | 1     | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 2                  | neg | 0                  | neg  | 0                  | 408   | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 0                  | neg | 0                  | neg  | 0                  | 414   | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 1                  | neg | 0                  | neg  | 0                  | 2     | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | 0                  | neg | 0                  | neg  | 1                  | 311   | NT                 | NT     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| ChAd7DE1gag  | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | neg   | 1                  | 1044   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 3                  | neg  | 1                  | neg   | 1                  | 606    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 8                  | neg   | 1                  | 407    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 1                  | neg   | 2                  | 567    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 3                  | neg   | 1                  | 1677   | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| CV32DE1gag   | NT                 | NT  | NT                 | NT   | 1                  | neg   | 0                  | 83     | 0                  | 291  | 0                   | 194  |
|              | NT                 | NT  | NT                 | NT   | 3                  | neg   | 0                  | 382    | 0                  | 805  | 2                   | 380  |
|              | NT                 | NT  | NT                 | NT   | 0                  | neg   | 1                  | 97     | 0                  | 136  | 1                   | 501  |
|              | NT                 | NT  | NT                 | NT   | 1                  | neg   | 5                  | 96     | 4                  | 1162 | 0                   | 1115 |
|              | NT                 | NT  | NT                 | NT   | 2                  | neg   | 1                  | 328    | NT                 | NT   | 0                   | 596  |
| ChAd4DE1gag  | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 0                  | neg   | 0                  | 0      | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 0                  | neg  | 0                  | neg   | 0                  | 159    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 0                  | neg  | 0                  | neg   | 0                  | 1      | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 0                  | neg   | 0                  | 234    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 0                  | neg   | 1                  | 0      | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
| ChAd16DE1gag | NT                 | NT  | 0                  | neg  | 0                  | neg   | 0                  | 243    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 0                  | neg  | 0                  | neg   | 1                  | 296    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 0                  | neg  | 2                  | neg   | 1                  | 68     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 0                  | neg  | 0                  | neg   | 1                  | 433    | NT                 | NT   | NT                  | NT   |
|              | NT                 | NT  | 1                  | neg  | 0                  | neg   | 1                  | 28     | NT                 | NT   | NT                  | NT   |

## 【実施例 6】

## 【0165】

ChAd3ベクター及びCV33GAGベクターはGAG特異的CD8+T細胞を特徴とするCMI反応を誘発する。

## 【0166】

HIVgag導入遺伝子を含むChAdベクターに反応して誘発されるCMI反応の特徴を調べるために、様々な用量のベクターで免疫付与した5匹のマウスのコホートからプールされた脾臓細胞を細胞内IFN-γ染色により分析した。表3及び表4に示されるデータは個別の実験において回収された。

## 【0167】

脾臓細胞を R10 1 mL で  $2 \times 10^6$  個細胞に希釈し、 $2 \mu\text{g/mL}$  の濃度で上述と同じ抗原で刺激した。対照として、DMSO 及び SEB (ブドウ球菌エンテロトキシン B) を使用した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで一晩インキュベーションした後、細胞を FACS 緩衝液 (1% FCS、0.01% NaN<sub>3</sub>、PBS) で洗浄し、精製抗マウス CD16/CD32 Fc ブロック (クローン 2.4G2、Pharmingen、cat. 553142) を 1/25 に希釈し、100  $\mu\text{L}$ /試料の量で添加し、4℃で15分間インキュベーションした。細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、FACS 緩衝液中で 1:50 希釈した、APC 標識抗マウス CD3e (クローン 145-2C11、Pharmingen、cat. 553066)、PE 標識抗マウス CD4 (クローン L3T4、BD Pharmingen、cat. 553142) 及び PerCP 標識抗マウス CD8a (クローン 53-6.7、Pharmingen、cat. 553036) を 100  $\mu\text{L}$ /試料の量で添加した。細胞を室温で 30 分間インキュベーションし、洗浄し、固定し、浸透させ (Becton Dickinson、FACS Perm2)、PermWash (100  $\mu\text{L}$ /試料) で 1:50 に希釈した FITC 標識抗マウス IFN- $\gamma$  (Pharmingen、cat. 554411) とともに RT で 30 分間インキュベーションした。洗浄後、細胞を 1%ホルムアルデヒド/PBS 500  $\mu\text{L}$  に再懸濁し、CellQuest ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて FACS-Calibur フローサイトメーターで分析した。

【0168】

表4は、gag 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞又は CD4<sup>+</sup>T 細胞のいずれかである gag 特異的 CD3<sup>+</sup>T 細胞の割合を要約するデータを与える。ポジティブの結果を太字で示す。本明細書で与えるデータから、様々な血清型サブグループ (つまりサブグループ C、D 及び E) へと分類される ウイルス由来の ChAd ベクターにより誘発される免疫反応の細胞特性が同様であり、gag 特異的反応は全て、CD8<sup>+</sup>T 細胞を主に特徴とすることが示される。さらに、多量のベクターで gag 特異的 CD4<sup>+</sup> 反応が全ての免疫付与実験で明らかになることを留意すること。ICS アッセイにより、ChAd3 ベクターが  $10^6$  個のベクター用量で抗 gag CD8<sup>+</sup> 反応を刺激できることが確認された。

【0169】

【表4】

様々なサブグループのチンパンジーアデノウィルスベクターで免疫付与したマウスにおける gag 特異的 T 細胞の特徴

| ワクチン         |                                    | 10 <sup>5</sup> |     | 10 <sup>6</sup> |       | 10 <sup>7</sup> |        | 10 <sup>8</sup> |        | 10 <sup>9</sup> |       |
|--------------|------------------------------------|-----------------|-----|-----------------|-------|-----------------|--------|-----------------|--------|-----------------|-------|
|              |                                    | DMSO            | gag | DMSO            | gag   | DMSO            | gag    | DMSO            | gag    | DMSO            | gag   |
| ChAd3DE1gag  | %CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.01%           | 4.65% | 0.01%           | 17.15% | 0.04%           | 24.71% | NT              | NT    |
|              | %CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.00%           | 0.07% | 0.03%           | 0.08%  | 0.04%           | 0.28%  | NT              | NT    |
| CV33DE1gag   | %CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.02%           | 0.01% | 0.01%           | 0.83%  | 0.03%           | 8.69%  | NT              | NT    |
|              | %CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.00%           | 0.00% | 0.00%           | 0.04%  | 0.01%           | 0.10%  | NT              | NT    |
| ChAd9DE1gag  | %CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.02%           | 0.01% | 0.01%           | 0.68%  | NT              | NT     | 0.04%           | 4.73% |
|              | %CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.00%           | 0.00% | 0.00%           | 0.00%  | NT              | NT     | 0.00%           | 0.01% |
| ChAd10DE1gag | %CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.02%           | 0.01% | 0.01%           | 0.57%  | NT              | NT     | 0.02%           | 5.04% |
|              | %CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.00%           | 0.00% | 0.00%           | 0.00%  | NT              | NT     | 0.00%           | 0.01% |
| ChAd6DE1gag  | %CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.00%           | 0.01% | 0.00%           | 0.59%  | 0.01%           | 14.28% | NT              | NT    |
|              | %CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.00%           | 0.00% | 0.00%           | 0.05%  | 0.01%           | 0.12%  | NT              | NT    |
| ChAd7DE1gag  | %CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.01%           | 0.02% | 0.01%           | 0.00%  | 0.02%           | 5.00%  | NT              | NT    |
|              | %CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> | NT              | NT  | 0.00%           | 0.01% | 0.00%           | 0.00%  | 0.01%           | 0.21%  | NT              | NT    |

【実施例7】

【0170】

ChAdベクターは、HCV NS特異的T細胞反応を誘発する。

#### 【0171】

CV32-NSmutベクター及びCV33-NSmutベクターの効力をMRKAd6NSmutの効力に対して、C57/Black6において評価した。10<sup>7</sup>から10<sup>9</sup> vp/マウスの、10倍ずつ増加する量のベクターを動物に注射した。単回注射の3週間後に、NS3タンパク質のヘリカーゼドメインにおいてマッピングされるCD8+T細胞エピトープを再現する9マーペプチドでT細胞を刺激して、IFN-γ ELISPOT及びIFN-γ細胞内染色により、CMIを分析した。表5で与えるデータは、NS3 9マーペプチド非存在下（偽）又は存在下におけるインキュベーション後の、100万個の脾臓細胞あたりのスポット形成細胞数を要約する。

#### 【0172】

HCV-NSを発現するCV32ベクター及びCV33ベクターの両者は強いT細胞反応を刺激することが本データから示される。CV32ベクターに対する最初の陽性結果が10<sup>9</sup> vp/用量を注射することにより得られたという観察に基づき、CV32DE1E3 NSmutベクターの免疫付与効力は、ヒトサブグループCのAd6DE1E3 NSmutベクターよりも、約1/100と、低いと思われる。MRKAd6NSmutを使用する並行した実験から、10<sup>7</sup> vp/動物の用量が細胞性免疫性を刺激するのに十分であることが示された。それゆえ本結果から、gag発現ベクターによる実験（表3参照）においても観察されたヒトサブグループCベクター（hAd5及びhAd6など）に対して、CV32由来のベクターの免疫付与効力が低いことが確認される。

#### 【0173】

#### 【表5】

MRKAd6NSmut、CV32NSmut又はCV33NSmutで免疫付与したマウスにおけるHCV NS特異的T細胞反応

| ワクチン接種      | 10 <sup>7</sup> vp |     | 10 <sup>8</sup> vp |      | 10 <sup>9</sup> vp |      | 10 <sup>10</sup> vp |     |
|-------------|--------------------|-----|--------------------|------|--------------------|------|---------------------|-----|
|             | 偽                  | NS3 | 偽                  | NS3  | 偽                  | NS3  | 偽                   | NS3 |
| MRKAd6NSmut | 1                  | 345 | 1                  | 449  | NT                 | NT   | NT                  | NT  |
|             | 1                  | 248 | 1                  | 1590 | NT                 | NT   | NT                  | NT  |
|             | 1                  | 1   | 1                  | 549  | NT                 | NT   | NT                  | NT  |
|             | 1                  | 262 |                    |      | NT                 | NT   | NT                  | NT  |
|             |                    |     |                    |      | NT                 | NT   | NT                  | NT  |
| CV33NSmut   | 1                  | 1   | 1                  | 195  | 2                  | 338  | NT                  | NT  |
|             | 1                  | 2   | 1                  | 409  | 1                  | 1136 | NT                  | NT  |
|             | 1                  | 1   | 1                  | 396  | 1                  | 497  | NT                  | NT  |
|             | 1                  | 2   | 2                  | 172  | 1                  | 344  | NT                  | NT  |
|             | 1                  | 237 |                    |      | 1                  | 163  | NT                  | NT  |
| CV32NSmut   | neg                | neg | 1                  | 181  | 1                  | 118  | 1                   | 176 |
|             | neg                | neg | 1                  | 71   | 1                  | 239  | 1                   | 238 |
|             | neg                | neg | 1                  | 56   | 1                  | 862  | 1                   | 555 |
|             | neg                | neg | 1                  | 459  | 1                  | 219  | 1                   | 545 |
|             | neg                | neg | 1                  | 195  | 1                  | 123  | 1                   | 578 |

#### 【実施例8】

#### 【0174】

抗Ad5既存免疫はChAd3gagにより誘発される抗GAG CMIを抑制しない。

#### 【0175】

高い血清普及率の（seroprevalent）Ad5に対する既存免疫性のChAd3免疫付与への影響を調べるために、1コホートにつきBalbCマウス5匹の4コホートに対して、大腿四頭筋にAd5野生型1回10<sup>10</sup> vpを第0週及び第2週の2回注射してプレ免疫付与した。対照として1コホート5匹の2コホートのマウスに緩衝液のみを同じ時点で注射した。次に、Ad5でプレ免疫付与したマウスのコホートに対して、A

Ad5 gag ベクター又はChAd3 gag ベクターのいずれか  $10^6$  vp 又は  $10^7$  vp / マウスで免疫付与した。対照（未処理の）マウスのコホートを、Ad5 gag ベクター又はChAd3 gag ベクター  $10^6$  vp / マウスで免疫付与した。

#### 【0176】

抗Ad5及びChAd3の中和免疫性を、Ad5ベクター及びChAd3 SEAPベクターを使用して上述の中和アッセイにより第4週に評価した。BalbCマウスにおいてマッピングされるgagエピトープを含有するgag9マーペプチドで刺激した、精製脾臓細胞においてELISPOT分析により抗gag免疫性を評価した。図36で報告する結果から、抗Ad5免疫性がChAd3 gag により誘発される抗gagCMIを抑制しないのに対し、予測されるように、抗Ad5免疫性がAd5 gag 免疫付与を完全に遮断することが示された。

10

#### 【実施例9】

#### 【0177】

ChAd3 hCEA免疫化はヒトCEAを発現するトランスジェニックマウスにおいて強いCEA特異的免疫反応を誘発する。

#### 【0178】

本明細書で開示し主張するChAdベクターが自己抗原に対して免疫反応を誘発し、それゆえにその寛容性を打破する能力も、ヒトCEAを発現するトランスジェニックマウスにおいて評価した（Clarke, Pら、Cancer Res. (1988) 58 (7) : 1469-77.）。

20

#### 【0179】

8匹のマウスのコホートの大腿四頭筋にChAd3 hCEA又はAd5 hCEA  $10^{10}$  vp を既に述べたように注射した。aa497から端（aa703）までのヒトCEAアミノ酸配列を包含する15マーペプチドのプールで刺激したPBMCに対して、CEAに対する免疫反応を75日目まで毎週モニタリングした。CEAペプチドプールインキュベーションに反応した、CD4-CD8+T細胞分泌性インターフェロン- $\gamma$ を調べるICSによって、抗CEA免疫性を評価した。

#### 【0180】

図37で報告する結果から、ChAd3 hCEAベクター免疫付与が、同じ導入遺伝子が発現するAd5よりも、ヒトCEAに対するCD8+T細胞反応をより持続するよう刺激することが示される。

30

#### 【0181】

霊長類免疫付与実験

方法及び材料

免疫付与プロトコール

本明細書に開示し主張するChAdベクターがアカゲザル（本明細書でサルと呼ばれる。）においてCMIを誘発する能力も評価した。サルを麻酔し（ケタミン／キシラジン）、本ワクチンをツベルクリンシリンジ（Becton-Dickinson）を使用して両側の三角筋へ0.5mlずつ筋肉内に送達した。全ての場合において、このサルの体重は、3から10kgであり、各ワクチンの用量は緩衝液1ml中で投与した。

40

#### 【0182】

免疫付与手法の間、何回か回収した血液試料から、血清及び末梢血単核球（PBMC）を調製した。動物の取り扱い及び処置は全て、the Guide for Care and Use of Laboratory animals, Institute of Laboratory animal Resources, National Research Councilに記載の原則に従い、the Institutional animal Care and Use Committeeにより承認される基準に従った。

#### 【0183】

ELISPOTアッセイ

50

アカゲザルについてのIFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイを、いくつかの改変を行い、上述のプロトコール(Allenら、2001 J. Virol. 75(2):738-749)に従って実行した。gag特異的刺激について、10-aaの重複がある全HIV-1 gag配列を包含する20-aaのペプチドからペプチドプールを調製した(Synpep Corp., Dublin, CA)。HCV NS特異的刺激について、10-aaの重複があるNS3からNS5bの全HCV-NS配列を包含する15-aaペプチドから、6個のペプチドプールを調製した。

#### 【0184】

HER2 neu及びCEA特異的刺激を、10-aaの重複がある全タンパク質の配列を包含する15-aaのペプチドで実行した。

10

#### 【0185】

2から4 x 10<sup>5</sup>個の末梢血単核球(PBMC) 50  $\mu$ lを各ウェルへ添加した。小さなサイズを80 fLでカットオフして、細胞をBeckman Coulter Z2粒子アナライザーを使用して計数した。培地 50  $\mu$ l又はペプチドあたり8  $\mu$ g/mlのgagペプチドプールのいずれかをこのPBMCへ添加した。この試料を37°C、5%CO<sub>2</sub>で20時間から24時間インキュベーションした。このように、スポットを発色させ、プレートの特注の画像化装置及びImageProプラットフォーム(Silver Spring, MD)に基づいた自動計数サブルーチンを使用して処理した。計数を10<sup>6</sup>個の細胞インプットに対して正規化した。

#### 【0186】

20

細胞内サイトカイン染色(ICS)

2 x 10<sup>6</sup> PBMC/mL完全RPMI培地 1mL(17 x 100mmの丸底ポリプロピレンチューブ(Sarstedt, Newton, NC)に入れた。)に、抗hCD28(クローンL293、Becton-Dickinson)及び抗hCD49d(クローンL25、Becton-Dickinson)モノクローナル抗体を、終濃度1  $\mu$ g/mLとなるように添加した。gag特異的刺激については、ペプチドプール 10  $\mu$ L(ペプチド1個につき0.4mg/mL)を添加した。同様の条件をHCV NS特異的刺激について使用した。このチューブを37°Cで1時間インキュベーションした後、5mg/mLのブレフェルジンA(Sigma) 20  $\mu$ Lを添加した。細胞を37°C、5%CO<sub>2</sub>、90%湿度で16時間インキュベーションした。冷PBS/2%FBS 4 mLを各チューブへ添加し、細胞を1200rpmで10分間遠心分離してペレットを得た。細胞をPBS/2%FBS中に再懸濁し、いくつかの蛍光標識mAbを使用して表面マーカーに対して染色した(30分間、4°C)(そのモノクローナル抗体は、チューブ1本あたり20  $\mu$ lの、抗hCD3-APC、クローンFN-18(Biosource); 20  $\mu$ l 抗hCD8-PerCP、クローンSK1(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); 及び20  $\mu$ L 抗hCD4-PE、クローンSK3(Becton Dickinson)であった。)。この段階から、試料を暗所で取り扱った。細胞を洗浄し、750  $\mu$ L 1xFACS Perm緩衝液(Becton Dickinson)中で室温にて10分間インキュベーションした。この細胞をペレットにし、PBS/2%FBS中に再懸濁し、FITC-抗hIFN- $\gamma$ 、クローンMD-1(Biosource) 0.1  $\mu$ gを添加した。30分間のインキュベーションの後、細胞を洗浄し、PBS中に再懸濁した。Becton Dickinson FACS Calibur機器の4色チャンネル全部を使用して試料を分析した。本データを分析するため、下部側及び前方に散乱するリンパ球集団を最初にゲーティングした。サイトカイン陽性反応についての共通の蛍光のカットオフをCD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>の両集団について使用し、試料の偽反応及びgagペプチド反応チューブの両者に対して使用した。

30

40

#### 【実施例10】

#### 【0187】

ChAd $\Delta$ E1-gagベクターを使用する同種初回刺激-追加免疫法はサルにおける

50

g a g 特異的 T 細胞を誘発する。

【0188】

1 コホート 3 匹の動物のコホートに以下のコンストラクトのいずれかを第 0 週及び第 4 週で筋肉内注射により与えた。すなわち CV32ΔE1-gag 10<sup>10</sup> vp 又は CV33ΔE1-gag 10<sup>10</sup> vp 又は MRKAd5ΔE1gag 10<sup>10</sup> vp 及び 10<sup>8</sup> vp であった。4 週間隔で回収した PBMC を、ELISPOT アッセイにより分析した。Gag ペプチドプール非存在下（偽）又は存在下でのインキュベーション後の、100 万個の PBMC あたりのスポット形成細胞数を示す表 6 で与える結果から、非ヒト霊長類において gag 特異的 T 細胞の有意なレベルを CV32ΔE1-gag 及び CV33ΔE1gag の両者が誘導できることが確認される。興味深いことに、単回投与（第 4 週）後、CV32ΔE1-gag 反応は、10<sup>8</sup> vp/投与の MRKAd5ΔE1-gag に匹敵し、10<sup>10</sup> vp/投与の MRKAd5-gag のそれより低かったことに留意すること。10<sup>10</sup> vp/投与の CV33ΔE1-gag は、10<sup>10</sup> vp/投与の MRKAd5-gag のそれに匹敵する反応を誘導する。この結果は 2 回目の投与後の第 8 週で確認された。

【0189】

【表 6】

Mrkad5ΔE1-Gag、CV32ΔE1-Gag、CV33ΔE1-Gag で免疫付与したサルにおける Gag 特異的 T 細胞反応

| ワクチン接種<br>T=0 | ベクター用量              | サル番号   | 飼育前 |     | T=4 |      | T=8 |      |
|---------------|---------------------|--------|-----|-----|-----|------|-----|------|
|               |                     |        | 偽   | Gag | 偽   | Gag  | 偽   | Gag  |
| CV32ΔE1gag    | 10 <sup>10</sup> vp | 01C023 | 1   | 0   | 14  | 353  | 3   | 278  |
|               |                     | 01C029 | 1   | 3   | 13  | 605  | 3   | 419  |
|               |                     | 01C032 | 1   | 0   | 5   | 274  | 1   | 179  |
| CV33ΔE1gag    | 10 <sup>10</sup> vp | 01C033 | 0   | 0   | 9   | 1545 | 1   | 659  |
|               |                     | 01C036 | 4   | 5   | 4   | 1540 | 13  | 881  |
|               |                     | 01D303 | 0   | 3   | 19  | 949  | 10  | 628  |
| MRKAd5gag     | 10 <sup>8</sup> vp  | 01D267 | 0   | 0   | 4   | 473  | 0   | 341  |
|               |                     | 01D279 | 1   | 4   | 44  | 831  | 6   | 336  |
|               |                     | 01D284 | 4   | 5   | 4   | 264  | 5   | 129  |
| MRKAd5gag     | 10 <sup>10</sup> vp | 99C218 | 0   | 3   | 5   | 2500 | 0   | 1580 |
|               |                     | 99C227 | 6   | 1   | 4   | 529  | 5   | 365  |
|               |                     | 99D185 | ND  | ND  | 0   | 425  | 0   | 310  |

【実施例 11】

【0190】

ChAd ベクターは、異種初回刺激－追加免疫法において HCV NS 特異的 T 細胞反応を誘発する。

【0191】

個別の実験において、2 匹及び 3 匹のサルのグループに第 0 週、第 4 週で動物 1 匹につき 10<sup>8</sup> vp 又は 10<sup>10</sup> vp で MRKAd6NSoptmut ベクターを用いて免疫付与を行った。この動物を第 24 週で、同じ用量の同じウイルスで追加免疫し、10<sup>10</sup> 個 vp/動物で CV33-NSmut により第 104 週に再度追加免疫を行った。この結果は、HCV NS ペプチドプールの非存在下（偽）又は存在下でのインキュベーション後の 100 万個の PBMC あたりのスポット形成細胞数を要約する表 7 及び表 8 に示す。

【0192】

IFN-γ ELISPOT により評価されるように、T 細胞免疫性は 10<sup>10</sup> vp を注射した動物において最初の投与後第 4 週で（表 8）、及び 10<sup>8</sup> vp で注射した動物において第 8 週（2 回目の投与後）で（表 7）ピークの反応を示した。この反応は第 24 週で

の注射により促進されなかった（同種追加免疫）のに対し、強い促進効果がCV33-Nsmutによる注射の後に観察された（異種追加免疫）。

【0193】

【表7】

10<sup>8</sup> vp/動物でMRK Ad6NSoptmutにより免疫付与し、CV33-Nsmutにより追加免疫したサルにおけるHCV NS特異的T細胞反応

| ワクチン  | MRKAd6NSoptmut 10 <sup>8</sup> vp |      |                    |      |                 |      | CV33-Nsmut 10 <sup>8</sup> vp |      |                  |      |                  |      |
|-------|-----------------------------------|------|--------------------|------|-----------------|------|-------------------------------|------|------------------|------|------------------|------|
|       | 初回刺激 I 投与後<br>T=4                 |      | 初回刺激 II 投与後<br>T=8 |      | 同種追加免疫前<br>T=24 |      | 同種追加免疫後<br>T=28               |      | 異種追加免疫前<br>T=104 |      | 異種追加免疫後<br>T=108 |      |
| サルの番号 | 95116                             | 138T | 95116              | 138T | 95116           | 138T | 95116                         | 138T | 95116            | 138T | 95116            | 138T |
| アールF  | 44                                | 112  | 77                 | 124  | 115             | 175  | 105                           | 55   | 120              | 150  | 188              | 2228 |
| アールG  | 20                                | 2110 | 86                 | 1975 | 201             | 1105 | 94                            | 884  | 120              | 192  | 96               | 4580 |
| アールH  | 12                                | 18   | 54                 | 22   | 169             | 221  | 28                            | 9    | 81               | 33   | 447              | 543  |
| アールI  | 14                                | 53   | 62                 | 47   | 163             | 189  | 96                            | 18   | 80               | 67   | 71               | 515  |
| アールL  | 33                                | 86   | 58                 | 44   | 353             | 608  | 235                           | 33   | 110              | 131  | 224              | 308  |
| アールM  | 184                               | 75   | 168                | 138  | 204             | 336  | 67                            | 44   | 55               | 46   | 2028             | 1570 |
| DMSO  | 14                                | 3    | 44                 | 7    | 104             | 79   | 33                            | 6    | 57               | 40   | 33               | 65   |

【0194】

【表8】

10<sup>10</sup> vp/動物でMRK Ad6NSoptmutにより免疫付与し、CV33-Nsmutにより追加免疫したサルにおけるHCV NS特異的T細胞反応

| ワクチン  | MRKAd6NSoptmut 10 <sup>10</sup> vp |      |      |                    |      |      |                 |      |      | CV33-Nsmut 10 <sup>10</sup> vp |      |      |                  |      |      |                  |      |      |
|-------|------------------------------------|------|------|--------------------|------|------|-----------------|------|------|--------------------------------|------|------|------------------|------|------|------------------|------|------|
|       | 初回刺激 I 投与後<br>T=4                  |      |      | 初回刺激 II 投与後<br>T=8 |      |      | 同種追加免疫前<br>T=24 |      |      | 同種追加免疫後<br>T=28                |      |      | 異種追加免疫前<br>T=104 |      |      | 異種追加免疫後<br>T=108 |      |      |
| サルの番号 | 98D209                             | 106Q | 113Q | 98D209             | 106Q | 113Q | 98D209          | 106Q | 113Q | 98D209                         | 106Q | 113Q | 98D209           | 106Q | 113Q | 98D209           | 106Q | 113Q |
| アールF  | 3110                               | 263  | 404  | 1340               | 300  | 723  | 678             | 61   | 583  | 321                            | 123  | 1438 | 204              | 192  | 326  | 1581             | 1525 | 1714 |
| アールG  | 2115                               | 642  | 1008 | 1070               | 316  | 2205 | 685             | 71   | 701  | 251                            | 178  | 1758 | 166              | 106  | 625  | 1118             | 524  | 4238 |
| アールH  | 373                                | 72   | 19   | 358                | 43   | 43   | 424             | 24   | 42   | 51                             | 23   | 18   | 92               | 45   | 55   | 413              | 58   | 211  |
| アールI  | 103                                | 37   | 347  | 80                 | 36   | 531  | 237             | 39   | 169  | 12                             | 35   | 485  | 66               | 79   | 376  | 459              | 85   | 2738 |
| アールL  | 149                                | 22   | 10   | 93                 | 36   | 29   | 279             | 46   | 48   | 11                             | 49   | 51   | 89               | 109  | 73   | 199              | 76   | 431  |
| アールM  | 314                                | 428  | 19   | 153                | 243  | 20   | 333             | 81   | 38   | 38                             | 134  | 11   | 41               | 81   | 9    | 228              | 1440 | 227  |
| DMSO  | 0                                  | 1    | 3    | 16                 | 16   | 5    | 128             | 8    | 9    | 8                              | 10   | 16   | 20               | 51   | 12   | 18               | 13   | 5    |

【0195】

チンパンジーAdベクターによる異種追加免疫の効率を第二の実験において評価した。3匹のサルのコホートに対して、第0週及び第4週に、MRKAd5gag（10<sup>10</sup> vp/動物）、MRKAd6NSmut（10<sup>10</sup> vp/動物）又は両ベクター（各ベクターにつき10<sup>10</sup> vp/動物）の組み合わせで免疫付与し、その後第24週で同じ抗原で追加免疫した（同種追加免疫）。同種追加免疫を同じ抗原で実行し、異種追加免疫をCV33gag、CV32NSmut又は前記2つのベクターの組み合わせで実行した。表9で与える結果は、HCV NSペプチドプール非存在下（偽）又は存在下でのインキュベーション後、100万個のPBMCあたりのスポット形成細胞数を要約する。

【0196】

同じコホートを、第51週に、CV33gag（10<sup>10</sup> vp/動物）、CV32NSmut（10<sup>10</sup> vp/動物）及び前記2つのベクターの組み合わせ（各ベクターにつき10<sup>10</sup> vp/動物）で再度追加免疫した。表9で与える結果はさらに、この反応がワクチンの初回用量の注射後第4週で観察されるピークを下回るため、同種追加免疫が効果的ではなかったことを示す。異種チンパンジーベクターによる免疫付与後第54週で、IFN-γELISPOTにより強い免疫促進効果が測定された。

【0197】

【表 9】

チンパンジーAdベクターによる免疫付与は、10 vp/動物でMRK Ad5gag又はMRK Ad6NSoptmutにより免疫付与したサルにおけるGag 及びHCV NS特異的T細胞反応を効率よく促進する。

| ワクチン | MRKAd5gag    |        |              |        |                |        | CV33gag        |        |                |        |                |        |
|------|--------------|--------|--------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| 時点   | 投与 1 後 (T=4) |        | 投与 2 後 (T=8) |        | 同種追加免疫前 (T=24) |        | 同種追加免疫後 (T=28) |        | 異種追加免疫前 (T=51) |        | 異種追加免疫後 (T=54) |        |
| 動物ID | 00D105       | 00D076 | 00D299       | 00D105 | 00D076         | 00D299 | 00D105         | 00D076 | 00D299         | 00D105 | 00D076         | 00D299 |
| アールF | 18           | 35     | 60           | 16     | 29             | 14     | 37             | 76     | 40             | 37     | 27             | 44     |
| アールG | 16           | 23     | 49           | 4      | 28             | 31     | 54             | 95     | 106            | 81     | 2              | 46     |
| アールH | 45           | 51     | 57           | 18     | 31             | 42     | 55             | 88     | 55             | 47     | 11             | 32     |
| アールI | 21           | 21     | 48           | 4      | 26             | 11     | 19             | 54     | 26             | 38     | 6              | 6      |
| アールL | 15           | 21     | 58           | 9      | 31             | 20     | 71             | 183    | 128            | 106    | 6              | 27     |
| アールM | 39           | 24     | 49           | 26     | 14             | 49     | 38             | 93     | 39             | 59     | 6              | 19     |
| Gag  | 1764         | 2208   | 2762         | 574    | 1906           | 1959   | 391            | 935    | 702            | 2123   | 336            | 736    |
| DMSO | 9            | 13     | 37           | 7      | 14             | 13     | 16             | 76     | 33             | 26     | 3              | 11     |

10

| ワクチン | MRK Ad5gag + MRKAd6NSmut |        |              |        |                |        | CV33gag + CV32NSmut |        |                |        |                |        |
|------|--------------------------|--------|--------------|--------|----------------|--------|---------------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| 時点   | 投与 1 後 (T=4)             |        | 投与 2 後 (T=8) |        | 同種追加免疫前 (T=24) |        | 同種追加免疫後 (T=28)      |        | 異種追加免疫前 (T=51) |        | 異種追加免疫後 (T=54) |        |
| 動物ID | 00D088                   | 00D099 | 00D240       | 00D088 | 00D099         | 00D240 | 00D088              | 00D099 | 00D240         | 00D088 | 00D099         | 00D240 |
| アールF | 438                      | 118    | 105          | 720    | 116            | 154    | 206                 | 108    | 242            | 408    | 99             | 219    |
| アールG | 21                       | 784    | 1483         | 44     | 362            | 940    | 19                  | 234    | 548            | 47     | 781            | 844    |
| アールH | 24                       | 53     | 8            | 46     | 27             | 19     | 13                  | 66     | 93             | 49     | 41             | 87     |
| アールI | 83                       | 28     | 9            | 90     | 24             | 8      | 16                  | 40     | 68             | 33     | 16             | 42     |
| アールL | 13                       | 14     | 13           | 16     | 17             | 9      | 28                  | 101    | 140            | 39     | 27             | 78     |
| アールM | 39                       | 31     | 6            | 101    | 27             | 16     | 21                  | 73     | 107            | 44     | 26             | 78     |
| Gag  | 2138                     | 1044   | 1063         | 2260   | 505            | 819    | 454                 | 241    | 456            | 1100   | 368            | 716    |
| DMSO | 5                        | 6      | 3            | 8      | 5              | 1      | 10                  | 18     | 43             | 9      | 13             | 28     |

| ワクチン | MRKAd6 NSmut |        |              |        |                |        | CV32NSmut      |        |                |        |                |        |
|------|--------------|--------|--------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| 時点   | 投与 1 後 (T=4) |        | 投与 2 後 (T=8) |        | 同種追加免疫前 (T=24) |        | 同種追加免疫後 (T=28) |        | 異種追加免疫前 (T=51) |        | 異種追加免疫後 (T=54) |        |
| 動物ID | 00D065       | 00D116 | 00D159       | 00D065 | 00D116         | 00D159 | 00D065         | 00D116 | 00D159         | 00D065 | 00D116         | 00D159 |
| アールF | 139          | 44     | 82           | 92     | 121            | 63     | 62             | 116    | 54             | 44     | 42             | 23     |
| アールG | 154          | 253    | 119          | 77     | 156            | 108    | 93             | 165    | 126            | 104    | 59             | 39     |
| アールH | 1284         | 41     | 211          | 768    | 35             | 124    | 394            | 84     | 77             | 24     | 817            | 48     |
| アールI | 302          | 22     | 1174         | 221    | 16             | 1069   | 134            | 31     | 561            | 18     | 133            | 478    |
| アールL | 28           | 16     | 48           | 35     | 32             | 21     | 141            | 113    | 78             | 19     | 48             | 17     |
| アールM | 1329         | 1007   | 36           | 579    | 392            | 30     | 314            | 293    | 43             | 558    | 398            | 22     |
| Gag  | 15           | 9      | 7            | 13     | 5              | 2      | 36             | 33     | 36             | 9      | 23             | 14     |
| DMSO | 16           | 4      | 5            | 9      | 6              | 4      | 23             | 17     | 8              | 1      | 9              | 3      |

20

## 【実施例 1 2】

## 【0 1 9 8】

TAAを含むChAdベクターによるワクチン接種は寛容性を打破し、サルにおけるTAA特異的T細胞反応を誘発する。

## 【0 1 9 9】

チンパンジーアデノウイルスベクターが自己抗原に対する寛容性を打破し、ヒトアデノウイルスベクターにより初回刺激された免疫反応を促進するためのチンパンジーベクターの有用性を証明するのに十分に免疫原性があるか否かを調べるために設定した実験を、1コホート4匹のサルのコホートにおいて実施した。腫瘍関連抗原CEAを含むAd5DE1 RhCEA (10<sup>11</sup> vp) の3回の注射を第0週、第2週及び第4週に行って動物に免疫付与した後、第16週、第18週及び第20週に、CV33DE1 RhCEA (10<sup>11</sup> vp) によるワクチン接種を行った。アカゲザルCEAペプチドを用いて、IFNγ ELISPOTにより、T細胞反応を測定した。

30

## 【0 2 0 0】

アカゲザルCEA C及びDペプチドプール非存在下 (DMSO) 又は存在下のインキュベーション後の100万個のPBMCあたりのスポット形成細胞数を与える図34に報告される結果により、2つの異なるAd血清型によるワクチン接種に基づく免疫付与プロトコルが、非ヒト霊長類において、CEAに対してT細胞反応を持続させるに到ることが確認される。

40

## 【0 2 0 1】

本発明はその特定の好ましい実施形態に関して詳細に記載されているが、改変及びバリエーションが、記載され、主張される本発明の精神及び範囲内であることは理解されよう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0 2 0 2】

【図 1】図 1 は、ChAd6シャトルベクター (pARS ChAd6-3) を構築する

50

ために使用されるクローニングストラテジーを要約する概略図である。

【図2】図2は、E. コリ株BJ5183での相同組み換えによりChAd6ウイルスゲノムをクローニングするために使用されるクローニングストラテジーを説明する概略図である。

【図3】図3は、pARS ChAd6-3 GAG: pARS ChAd6-3 SEAP; pARS ChAd6-3 EGFP及びpARS ChAd6-3 NS MUTを含む、様々なChAd6シャトルプラスミドのエレメントを説明する概略図である。

【図4】図4は、ChAd6ΔE1発現ベクターをクローニングするために使用される相同組み換えスキームを説明する概略図である。

【図5A】図5Aは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

10

【図5B】図5Bは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5C】図5Cは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5D】図5Dは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5E】図5Eは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5F】図5Fは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5G】図5Gは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5H】図5Hは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5I】図5Iは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5J】図5Jは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図5K】図5Kは、ChAd3（配列番号1）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

20

【図6A】図6Aは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6B】図6Bは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6C】図6Cは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6D】図6Dは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6E】図6Eは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6F】図6Fは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6G】図6Gは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6H】図6Hは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6I】図6Iは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図6J】図6Jは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

30

【図6K】図6Kは、ChAd6（配列番号2）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7A】図7Aは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7B】図7Bは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7C】図7Cは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7D】図7Dは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7E】図7Eは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7F】図7Fは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7G】図7Gは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7H】図7Hは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7I】図7Iは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

40

【図7J】図7Jは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図7K】図7Kは、CV32（配列番号3）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図8A】図8Aは、CV33（配列番号4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図8B】図8Bは、CV33（配列番号4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図8C】図8Cは、CV33（配列番号4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図8D】図8Dは、CV33（配列番号4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図8E】図8Eは、CV33（配列番号4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図8F】図8Fは、CV33（配列番号4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図8G】図8Gは、CV33（配列番号4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

【図8H】図8Hは、CV33（配列番号4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。

50

- 【図 8 I】図 8 I は、C V 3 3（配列番号 4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 8 J】図 8 J は、C V 3 3（配列番号 4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 8 K】図 8 K は、C V 3 3（配列番号 4）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 A】図 9 A は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 B】図 9 B は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 C】図 9 C は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 D】図 9 D は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 E】図 9 E は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 F】図 9 F は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 G】図 9 G は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 H】図 9 H は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 I】図 9 I は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 9 J】図 9 J は、C V 2 3（配列番号 5）のゲノムヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 0】図 1 0 は、C h A d 2 0（配列番号 6）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 1】図 1 1 は、C h A d 4（配列番号 7）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 2】図 1 2 は、C h A d 5（配列番号 8）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 3】図 1 3 は、C h A d 7（配列番号 9）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 4】図 1 4 は、C h A d 9（配列番号 1 0）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 5】図 1 5 は、C h A d 1 0（配列番号 1 1）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 6】図 1 6 は、C h A d 1 1（配列番号 1 2）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 7】図 1 7 は、C h A d 1 6（配列番号 1 3）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 8】図 1 8 は、C h A d 1 7（配列番号 1 4）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 1 9】図 1 9 は、C h A d 1 9（配列番号 1 5）の繊維遺伝子のヌクレオチド配列を与える。
- 【図 2 0 A】図 2 0 A は、C h A d 3、C h A d 4、C h A d 5、C h A d 6、C h A d 7、C h A d 8、C h A d 9、C h A d 1 0、C h A d 1 1、C h A d 1 6、C h A d 1 7、C h A d 1 9、C h A d 2 0、C h A d 2 2、C h A d 2 4、C h A d 2 6、C h A d 3 0、C h A d 3 1、C h A d 3 7、C h A d 3 8、C h A d 4 4、C h A d 6 3 及び C h A d 8 2 の繊維タンパク質のアミノ酸配列の、C 1（配列番号 8 5）、C V 6 8（配列番号 8 6）、P A N 5（C V 2 3 とも呼ばれる。）（配列番号 8 0）、P A N 6（C V 3 2 とも呼ばれる。）（配列番号 8 1）及び P a n 7（C V 3 3 とも呼ばれる。）（配列番号 8 2）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。
- 【図 2 0 B】図 2 0 B は、C h A d 3、C h A d 4、C h A d 5、C h A d 6、C h A d 7、C h A d 8、C h A d 9、C h A d 1 0、C h A d 1 1、C h A d 1 6、C h A d 1 7、C h A d 1 9、C h A d 2 0、C h A d 2 2、C h A d 2 4、C h A d 2 6、C h A d 3 0、C h A d 3 1、C h A d 3 7、C h A d 3 8、C h A d 4 4、C h A d 6 3 及び C h A d 8 2 の繊維タンパク質のアミノ酸配列の、C 1（配列番号 8 5）、C V 6 8（配列番号 8 6）、P A N 5（C V 2 3 とも呼ばれる。）（配列番号 8 0）、P A N 6（C V 3 2 とも呼ばれる。）（配列番号 8 1）及び P a n 7（C V 3 3 とも呼ばれる。）（配列番号 8 2）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。
- 【図 2 0 C】図 2 0 C は、C h A d 3、C h A d 4、C h A d 5、C h A d 6、C h A d

7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82の繊維タンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号85）、CV68（配列番号86）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号80）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号81）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号82）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

【図20D】図20Dは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82の繊維タンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号85）、CV68（配列番号86）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号80）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号81）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号82）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

10

【図20E】図20Eは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82の繊維タンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号85）、CV68（配列番号86）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号80）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号81）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号82）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

20

【図20F】図20Fは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82の繊維タンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号85）、CV68（配列番号86）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号80）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号81）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号82）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

30

【図20G】図20Gは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82の繊維タンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号85）、CV68（配列番号86）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号80）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号81）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号82）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

【図21】図21は、ChAd20（配列番号16）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

40

【図22】図22は、ChAd4（配列番号17）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

【図23】図23は、ChAd5（配列番号18）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

【図24】図24は、ChAd7（配列番号19）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

【図25】図25は、ChAd9（配列番号20）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

【図26】図26は、ChAd10（配列番号21）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配

50

列を与える。

【図27】図27は、ChAd11（配列番号22）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

【図28】図28は、ChAd16（配列番号23）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

【図29】図29は、ChAd17（配列番号24）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

【図30】図30は、ChAd19（配列番号25）のヘキソン遺伝子のヌクレオチド配列を与える。

【図31A】図31Aは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソンタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

10

【図31B】図31Bは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソンタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

20

【図31C】図31Cは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソンタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

30

【図31D】図31Dは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソンタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

40

【図31E】図31Eは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソンタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

【図31F】図31Fは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd

50

7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

【図31G】図31Gは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

10

【図31H】図31Hは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

20

【図31I】図31Iは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

30

【図31J】図31Jは、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63及びChAd82のヘキソタンパク質のアミノ酸配列の、C1（配列番号124）、CV68（配列番号125）、PAN5（CV23とも呼ばれる。）（配列番号119）、PAN6（CV32とも呼ばれる。）（配列番号120）及びPan7（CV33とも呼ばれる。）（配列番号121）からの参照繊維タンパク質配列との比較を与える。

【図32】図32は、本明細書中で開示される、オリゴマー及びプライマーを含む、人工的配列、配列番号26から40及び配列番号45及び46のリストを与える。

40

【図33】図33は、様々な血清型サブグループ（つまり、サブグループC、E及びD）に属するChAdベクターの免疫付与ブレイクポイントを図示したものである。gag-発現する、ChAd3、ChAd11、ChAd20、CV33、CV68、ChAd6、ChAd9、ChAd10、CV32、ChAd4、ChAd7及びChAd16ベクターで免疫付与したマウスにおいてタイター決定実験を行うことにより、測定可能な免疫反応を誘発する最低用量を調べた。

【図34】図34は、ヒトアデノウイルスベクター（MRKAd5 ThCEA）と、次いで、12週間の間隔後、チンパンジーアデノウイルスベクター（CV33 RhCEA）で連続的に免疫付与したアカゲザルにおいて誘発されるCEA特異的T細胞反応のグラ

50

フである。IFN $\gamma$ -ELISPOTアッセイにより免疫反応を評価した。データは、アカゲザルCEA C及びDペプチドプールの非存在下(DMSO)及び存在下でのインキュベーション後の、末梢血単核球(PBMC)百万個あたりのスポット形成細胞(SFC)の数を示す。

【図35】図35は、PAUPSEARCH(Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc.)を用いて、TREEVIEWにより視覚化し操作した、全長ヘキソンペプチド配列の多配列アラインメントから推定される、ヒト及びチンパンジーアデノウイルスの系統樹を与える。

【図36】図36は、hAd5に前もって曝露したマウスへのChAd3及びhAd5 gagベクターの投与に対する反応において得られた免疫付与結果を表すグラフである。精製脾臓細胞を用いて、IFN $\gamma$ -ELISPOTにより、免疫付与から3週間後に、細胞性免疫を評価した。

10

【図37】図37は、ChAd3hCEA及びAd5hCEAで免疫付与したヒトCEAトランスジェニックマウスにおいて誘発された、抗CEA CMIのキネティクスを表すグラフである。CEAペプチドプールで刺激したPBMCのICSにより、CMIを評価した。結果は、IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>/総PBMCの%として表す。

【図38A】図38Aは、EGFPを発現し、様々なサブグループ(B、C、D、E)に属する様々なChAdベクターの、moi 50、250及び1250に曝露した様々なヒト初代細胞の感染効率を表すグラフである。結果は、蛍光細胞/総細胞の%として表す。

20

【図38B】図38Bは、EGFPを発現し、様々なサブグループ(B、C、D、E)に属する様々なChAdベクターの、moi 50、250及び1250に曝露した様々なヒト初代細胞の感染効率を表すグラフである。結果は、蛍光細胞/総細胞の%として表す。

【図38C】図38Cは、EGFPを発現し、様々なサブグループ(B、C、D、E)に属する様々なChAdベクターの、moi 50、250及び1250に曝露した様々なヒト初代細胞の感染効率を表すグラフである。結果は、蛍光細胞/総細胞の%として表す。

【図38D】図38Dは、EGFPを発現し、様々なサブグループ(B、C、D、E)に属する様々なChAdベクターの、moi 50、250及び1250に曝露した様々なヒト初代細胞の感染効率を表すグラフである。結果は、蛍光細胞/総細胞の%として表す。

30

【図 1】

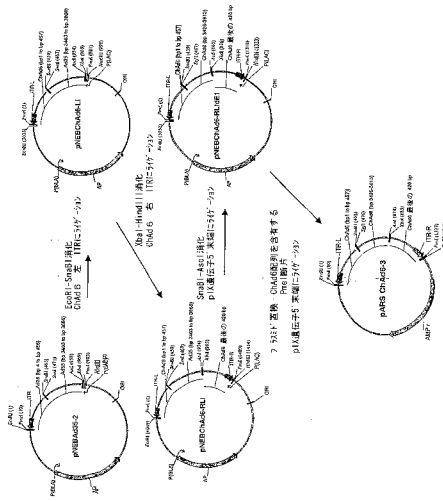


FIG. 1

【図 2】

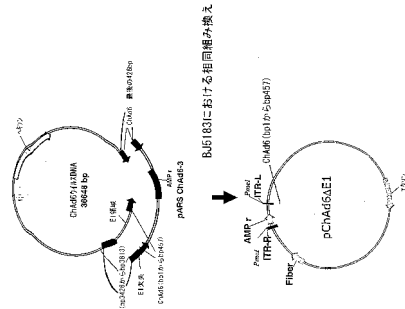


FIG. 2

【図 3】

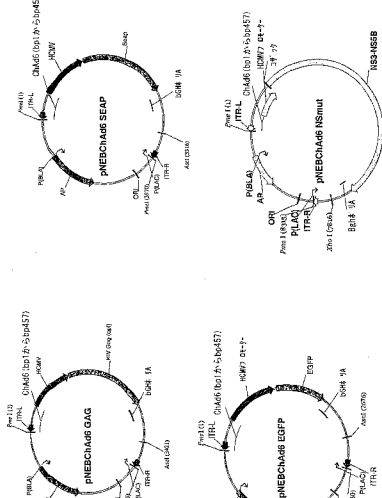


FIG. 3

【図 4】

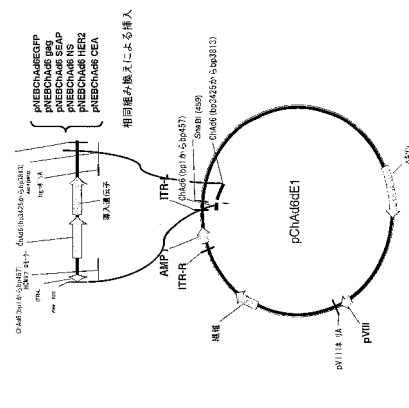


FIG. 4

【図 5 B】

[illegible]

FIG. 5E

【図 5 D】

[illegible]

FIG. 5F

【図 5 F】

|        |            |             |            |            |            |            |
|--------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 17470: | GTGGTACATG | CCAGAGG92CA | CTCCGCGCC  | GCACACACGA | CTACGATCGA | CTGACGCGAC |
| 17461: | ATGAGTACAC | AGAGATCGAC  | CTGAGGAGG  | CGGAGCGCGG | CGCTACGCGC | GACCTCTGCG |
| 17462: | ATGAGTACAC | AGAGATCGAC  | CTGAGGAGG  | CGGAGCGCGG | CGCTACGCGC | GACCTCTGCG |
| 17581: | GTGAGTACAC | AGATGCGGAC  | CTGAGGAGG  | CGGAGCGCGG | CGCTACGCGC | GACCTCTGCG |
| 17464: | ATGAGTACAC | AGAGATCGAC  | CTGAGGAGG  | CGGAGCGCGG | CGCTACGCGC | GACCTCTGCG |
| 17465: | ATGAGTACAC | AGAGATCGAC  | CTGAGGAGG  | CGGAGCGCGG | CGCTACGCGC | GACCTCTGCG |
| 17761: | CCGCGATCGC | CTGATGCTGC  | GTGTGAGGAG | CGGAGCGCGG | CGCTACGCGC | GTGAGTCTGC |
| 17821: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 17822: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 17941: | AGAGAGTCTG | TGAGTCTGTC  | GTGCTGACG  | GGAGGAGCGG | CGGAGCGCGG | CGGAGCGCGG |
| 18601: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18602: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18121: | TGACGATCTG | CTAAATCTGC  | AAATTAATGA | AAAAAAAAGA | AAATCAATCA | AAATGATCTG |
| 18181: | ATCTCTACGC | TCGATGCTGC  | TCGATGCTGC | TTTGTGATGC | GAATGATCTG | GAATGATCTG |
| 18182: | ATCTCTACGC | TCGATGCTGC  | TCGATGCTGC | TTTGTGATGC | GAATGATCTG | GAATGATCTG |
| 18301: | GCACATGATG | GTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | TTGATGCTGC | GAATGATCTG | GAATGATCTG |
| 18302: | GCACATGATG | GTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | TTGATGCTGC | GAATGATCTG | GAATGATCTG |
| 18421: | CTCAAGTCTG | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18401: | CTCAAGTCTG | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18601: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18661: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18662: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18781: | CTGATGCTGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18782: | CTGATGCTGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18961: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 18962: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19021: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19022: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19261: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19262: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19321: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19322: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19441: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19442: | CGGCGATCGC | GTGATGCTGC  | CAGCTCATGC | TAAAGTCTGC | TTGATGCTGC | TACGATATGC |
| 19621: | AAAAATCTGC | TAAAGTCTGC  | CTGATGCTGC | TAAAGTCTGC | TAAAGTCTGC | TAAAGTCTGC |
| 19622: | AAAAATCTGC | TAAAGTCTGC  | CTGATGCTGC | TAAAGTCTGC | TAAAGTCTGC | TAAAGTCTGC |
| 19801: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 19802: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 19921: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 19922: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20011: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20101: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20102: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20103: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20281: | GTGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20341: | ATGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20342: | ATGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20521: | ATGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20641: | ATGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20791: | ATGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |
| 20821: | ATGATGCTGC | CTGATGCTGC  | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC | CTGATGCTGC |

FIG. 5F

【図 5 H】

|       |            |           |           |           |            |            |
|-------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| 24163 | GGTGTGGT   | CTGCTGCT  | TTCGCGATG | CTGCTGCT  | ATCTGCTGCT | CTCTGATGCT |
| 24423 | CAAGACAGGA | TGCTGATG  | CTGCTGCTG | GTGAGAGAG | AGAGACAGAC | CTACTGCGCG |
| 24483 | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG | CAAGCTCTG | AGAGAGAG  | CCGCGCGAG  | CTGCTGCTG  |
| 24543 | CTGCTGCTG  | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 24603 | CTGCTGCTG  | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | ATGATGCTG  | TGAGAGAGAG |
| 24663 | CTGCTGCTG  | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 24723 | CTGCTGCTG  | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | ATGCTGCTG  | TGCTGCTGCT |
| 24783 | TGCTGCTG   | GATGAGAG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | AGAGAGAG   | FATGCTGCTG |
| 24843 | CTGCTGCTG  | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 24903 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG  |
| 24963 | CAAGACCG   | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG | TGCTGCTG  | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25023 | CAAGACCG   | TGCTGCTG  | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | ATGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25143 | CTGCTGCTG  | TGCTGCTG  | AGAGAGAG  | AGAGAGAG  | AGAGAGAG   | AGAGAGAG   |
| 25203 | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | TGCTGCTG   | CTGCTGCTG  |
| 25263 | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25323 | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25383 | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25443 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25503 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25563 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25623 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25683 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25743 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25803 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25863 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25923 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 25983 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26043 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26103 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26163 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26223 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26283 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26343 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26403 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26463 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26523 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26583 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26643 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26703 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26763 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26823 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26883 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 26943 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27003 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27063 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27123 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27183 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27243 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27303 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27363 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27423 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27483 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27543 | AGAGAGAG   | CTGCTGCTG | AGAGAGAG  | CTGCTGCTG | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  |
| 27603 |            |           |           |           |            |            |

FIG. 5









FIG. 7E

FIG. 7J

【図 7 K】

34801 CGGCGCTCTC GCGCTCTGGA AGCTACGCTGTG TCAAGATTTCT AAAACAGCCA CTCTCTCAGA  
34802 CCGTGCACGA GATTTAGGCG CTGAGGCTGTG ATGAGATGCT CATATGCTCT GATGCTCTGT  
34921 ATGACATCGA CCGCTCTGGA ATGGCGCGAG CCAGGCGAGA TGATCTCAAT TTGCTTGCGTT  
34981 TGCTGTACGG CGGCGGAGGG AAGACAGAGA AAGACAGAGA TTAATCTTTA ATCCAAACGG  
35041 TCTGAGAGCA GTTCAAAAGG AAGATCAGGG AGATGCGAC TCTGCGGCC CTGCTGTGCG  
35101 TGGAALAAACA CAGCGAGGCT AAGATGTATA CGGTCTCTGA GATCTCTCAC GGTGCTGCTG  
35161 AGCAAAAGCT CCGAGCGCAC ATCAGAGACA AGCATATGAG GAAAGCGGGA GGGTTCTCTA  
35221 ATTCCTCAAC CAGCACTTTA CAGCTCTCGA CGATCCCGAC ATAAATTTCA TTTTCTCAGC  
35281 CTTGAAATGAT TCGACATGAT TCTCTAGGTA AATCTAGGCT AGCATAGATA AAGAGCTGCG  
35341 CGAGAGCGCT CCGACCGGCT ATCTCTAAGC AGACCTCTAT AATTCAGAGA TATCTTGCTC  
35401 CTGATTTGCT TCGAGCAGAT TGAAAGGCGG AATATCAAAA TCTCTGCGCG GATCCCTGAG  
35461 CTCTCTCTCT AGATATGAT GTAGATGCTT TTTGATATCT TCTCTGAAAT TTTTGAALG  
35521 AGGACGCCCA GGAATAGAG AAGGATGAGC CAGATATGAG ATAAACGAGA GTCCGCCCCA  
35581 GTAGGCAATTG CGAATATGTA GATTAAGATA AGCATGCTGT CTAGAGCGCG TGATATCTTC  
35641 CAGTAATCTG CAGACAAAT CCGTATAGCA ATTTTATAGA AATATACAGA AAAAAAATC  
35701 TTTCCGCTGCG ACTTTTAGGG CCTCGGAGAC AAGCATGAGG TAAGTGTGAG GGGTCCCTTC  
35761 CAGCTATGCT ATTTAGCTGA TCTGTAAAGA AAGAAAAAAT AAAACATTTA ACCATATGCT  
35821 TGCTGCTGAC AGCTCTGATA ATGCTTTCTCT CCGAGCTCAG CAGAGCGTAG GGGTCTGCG  
35881 CGGACCGCT CTGAALATGT TCTCTPUGRT TGAAAGCAT CAGAGAGAGA GGTTCGTGCG  
35941 GCGCGCGCTG AATGATCTGA GAGAGAGCAT AGCATCCCGG GAACATTGGA GTCTGTGAGT  
3601 GAAAAAAGCG GCGGAGGAGA CGATAGAGCG ATCTATGAGC TCACTCTGAA GTACAGCAAA  
36091 CGATGCGCT CGGAGTAGG CAGAAATTT CTAGGTGCTT AAAAAATGA ATCTATCTCC  
36131 TCTCTCAGG CGAGCGAGCG TCCGATCTCC TCGATAGATA CATAGAGAGC CTGCGGCTCC  
36181 ATGATCTAGC GATGCTGAGC AGGACCGAG CAGACAGGCG CGAGAGCTCA GAGAAAGAC  
36241 TGAGATCTGA CTCTGCGC GCTCTCTGAC TCAATATATA GCGGCAAGAC TACATCTGAG  
36301 TAAAGGCTAA ATCTTAAAGA TACCGGCCCA ATATCTAAGC AGGCGAGAGA GCGGCGAGG  
36361 AAGCGGCTAG ACATCAGAGA AAAACAGCGC ATCTCTTCAA AGCGCGCAAG TCGCTCTATT  
36421 CTGCGCTCTC CAGCTGAGCT CATCAAGACA CAGCTCTCTGA ATCTCTGAGA CGTTTAAAGA  
36481 CAGTCTGCTG CAGTCAATGA AGGTGCTGCG CTCTCTGAGC CAGCTCTCTG AGCTCTCTCT  
36541 CAAATCTCAA CAGCTCTATT CAGATATTAG GCGGCGCAAA AGTCTGAGGT ATATTATATT  
36601 TGAGTG (説明参照)

FIG. 7K

【図 8 A】

1 CATCATCAAT AATGACCTC AAATCTTTGG TCGCGTTTAA TATCGAAGT AGCTTTTGA  
61 ATTTTGAGAG GAGGAGAGGT GATTTGCCCA GAGAGCGGCG AGCTTTAGGG CGGCGGCGG  
121 TGACCTTTTG ATGACCTGCG CTGAGCGGCG AGCTCTCTCT CAGTCTCTG TGCGAAGAT  
181 GATCTCAAG CTGAGAGGCT TTGAGAGGCT AATATCTGAA TTCTCTGCG CTCTCTGCA  
241 GGAAGATGAG TGTCTTGGG CGGATGCGAG TGAAAACGGG CCATTTCTCG CGGAGACGT  
301 ATGAGGAGAG TGAAATCTCG ATTAATTTCTG CTTTATGAGC AGGAGAGGAT ATTTCCGAG  
361 GGTCTCTGAG GATCTCTGAG ATCTCTGAGC AGCTCTGAGT GAGCTCTGAG TCGCTCTGAG  
421 TTCTCTGAGT GGTCTCTGAG TCGCTCTGAG TTATCTGAGC GATCTCTGAG TCGCTCTGAG  
481 TTTAACTGCT GGTCTCTGAG TCGAGAGGCG ATCTCTGAGT GCGAGAGGAT AGATTTCTCT  
541 GGTCTCTGAG TCGAGAGGCG ATCTCTGAGT GCGAGAGGAT GAGCTCTGAG TCGCTCTGAG  
601 ATTAATCTTT TCTCTGAGT GGAAGAGAGA TTTCTGAGT AGCTCTGAGT GGTCTCTGAG  
661 GGTCTGAGC TCTGAGGCT CTTATGAGCT TTTAGAGGCG TTTCTGAGT GATTTCTGAG  
721 ATTTGAGGCT GAGATGCTCG GAGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
781 GGTCTGAGC GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
841 GGTCTCTGAG TACCGAGAGC CCGGAGAGAG GTGAGAGAAA GATCTCTGAG CTTTAAAGGCT  
901 AAGAGCTGAG CCGGAGAGAG TCGAGAGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
961 AGGAGAGGAG TCGAGAGAG TCGAGAGAG GATTTTAAAG TCGAGAGAG AGCTTTAGCC  
1021 TGAGAGGCT TACTCTGCGC GAGAGAGGCT GTAGAGCTTG TGATTTCTCT GCGATTAAGT  
1081 CTGAGAGAG GATTTTAAAG TCTATATGAG AGCTTTAGAG CTTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
1141 AGGAGAGGAG TACTTTACTT TATTTTGAAG GCGAGAGGCT GATCTCTGAG TCGCTCTGAG  
1201 ATTTATGAT ATTTCTTTT AGCTTCTGAG CCGGCTCTGAG AGGAGAGGAG GAGCTCTGAG  
1261 TCGAGAGAG TTTCTGAG CCGAGAGAT GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
1321 AGGAGAGGAG CAGGAGAGG CAGGAGAGG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1381 CAGAGAGGAG AGGAGAGGAG TTTGAGAGG TTTGAGAGG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1441 CAGAGAGGAG AGGAGAGGAG TTTGAGAGG TTTGAGAGG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1501 ATCTCTGAG TACTTTAGG GGTCTTTTAT GATCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1561 GAGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1621 GAGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1681 TCGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1741 AGGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1801 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1861 AGGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1921 CAGTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
1981 TCGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2041 ATCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2101 CAGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
2161 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2221 CAGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2281 AGGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2341 ATCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2401 AGGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2461 TCGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2521 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2581 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2641 AGGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2701 CAGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2761 TCGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2821 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2881 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
2941 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
3001 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
3061 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
3121 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
3181 TCGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
3241 TCGAGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
3301 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
3361 ATTTGAGGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG  
3421 GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG TCGAGAGGAG GGTCTCTGAG

FIG. 8A

【図 8 B】

3481 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
3541 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
3601 CAGAGAGGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
3661 TGAGAGGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
3721 TGAGAGGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
3781 CAGAGAGGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
3841 CAGAGAGGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
3901 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
3961 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4021 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4081 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4141 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4201 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4261 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4321 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4381 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4441 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4501 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4561 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4621 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4681 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4741 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4801 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4861 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4921 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
4981 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5041 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5101 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5161 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5221 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5281 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5341 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5401 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5461 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5521 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5581 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5641 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5701 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5761 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5821 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5881 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
5941 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6001 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6061 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6121 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6181 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6241 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6301 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6361 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6421 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6481 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6541 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6601 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6661 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6721 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6781 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6841 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
6901 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG

FIG. 8B

【図 8 C】

6961 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7021 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7081 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7141 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7201 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7261 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7321 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7381 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7441 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7501 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7561 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7621 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7681 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7741 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7801 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7861 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7921 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
7981 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8041 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8101 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8161 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8221 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8281 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8341 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8401 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8461 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8521 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8581 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8641 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8701 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8761 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8821 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8881 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
8941 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9001 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9061 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9121 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9181 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9241 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9301 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9361 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9421 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9481 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9541 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9601 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9661 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9721 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9781 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9841 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9901 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
9961 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
10021 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
10081 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
10141 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
10201 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
10261 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
10321 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG  
10381 GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG AGGAGAGGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG GGTCTCTGAG

FIG. 8C

【図 8 E】

[illegible]

FIG. 8D

[illegible]

FIG. 8F

【図 8 G】

[illegible]

FIG. 8E

[illegible]

FIG. 80

【図 8 I】

[illegible]

FIG. 8D

【図 8 K】

|      |            |             |             |             |             |             |
|------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 4591 | GACCTCCGAC | CACCTCTGAG  | GCCTCTCAGAG | TGATAGGAAT  | CCCATCTATCG | CTGTAGTACG  |
| 4586 | TGATACACAT | GACCAACCTG  | GAACTGGGCGA | GATCCCAACCA | GATGATATCGA | TTTTTGTGGG  |
| 4592 | GTTCGGGAG  | CGCGGGGAG   | GAGAAGACAG  | GACAGAACAT  | GATGTATCTT  | TATCTCAAAAC |
| 4593 | GGTCTCCGAG | CACCTCTCAA  | TGAAAGTCCG  | GGAGATCGCA  | CTCTCTCGAG  | CGCGTGTTT   |
| 4594 | GTTCGGMAAT | AAACACGAGC  | TGAAAGTCTG  | TACGGTCTTG  | CNAGATGTCT  | ACGGTGTGTT  |
| 4591 | CAGCAAAAG  | CTCCACGCG   | AATACACGGA  | ACAGAAAGT   | AGCGAAGAG   | GGAGGGTTCT  |
| 5165 | CTAATCTCTG | GATCAATCAT  | TACATCTCTG  | GCACATCCG   | CAGAATAAT   | TGATTTTCTC  |
| 5202 | AGCTCTCAAT | GATTCATCTG  | AGTCTCTGAG  | GTAAATCCCA  | CGACGCACT   | ATAAGAGCT   |
| 5283 | CGCGACGAG  | CGCCTCTACG  | GGATCAATTA  | AGCAACCCCT  | CATATTTCTC  | AGATATTTCT  |
| 5284 | CTCTCTGGTG | ACCTCTACGA  | AGCTGATGAT  | CGAGATATCA  | CGAGACGCCCT |             |
| 5403 | AGGCTCTCG  | CTCCAGCATTA | AGCTGATGAT  | CTCTTTCTTA  | CTCTCTCGCA  | AAATTTTAGG  |
| 5462 | CATAGAGCCA | CACGAGATGA  | GATPATGGCA  |             | CAGATAGAAC  | GAAGTGTATC  |
| 5521 | CAATGTCGCA | CTGACCAATG  | CAGAGTGTCT  | ATAGACATGG  | TGGGTAGAG   | CGTGTATGAC  |
| 5581 | CTCCAGATTA | CTGGACAGCA  | ATATCACGAG  | GCANTTTCTA  | AGAGATATCA  | CAGAGAGAAA  |
| 5641 | ATCTCCATCG | TGCATCTCTG  | GGCTCTCGGG  | ACACAGATCT  | AGATTAAGTAT | AAAGGGTGTCT |
| 5704 | CTCCACATG  | GTATGTATGAC | TATCTTTGTA  | AAATCAAAA   | ATTAACACTT  | AAACATATCT  |
| 5765 | AGCTCCGCGA | ACAGATGTGT  | AATCTCTCTT  | CTCCAGCAAC  | AGGAGAGCCA  | CGGGGTCTCT  |
| 5822 | GGCGACGCGG | CTGTAAATAT  | TGTCCTGATG  | ATGTAAAGAC  | ATTCACAGAC  | GGCTTTCTCG  |
| 5881 | GGCGCGCGCG | TGATATGATG  | GACAGATAGA  | ATFUAACCCG  | GGAACTATGG  | GTCTCCGAGG  |
| 5941 | TGGAAGAAAG | CGCCCGGACG  | AGCCACATAG  | CATCTACATG  | CTCATCTCTCA | ATCTCCAGCA  |
| 6001 | AGCATGCCCA | CGCCGATAGA  | GCCACAAATG  | CTCTGGTGGT  | TACAGAAATC  | AATTTCTCTG  |
| 6066 | CTCTCCAGCA | CGCCGAGBAG  | CGCCGACATG  | CTCTCGATAG  | ACATACAAGA  | CTCCAGGATG  |
| 6121 | CTAATGTCTG | CGAGCGCATG  | CACACACAGC  | AGCCAGAGTG  | CAGAGAAAGG  | CTGACATCTA  |
| 6181 | ACCTCCGCTG | CGCCCTCTCT  | CGCCAGATCT  | AGCCAGATCT  | TGACATCAGC  | TAAAGCGCTA  |
| 6241 | GTCTATTAAA | TACCTGCCCA  | ATAATACATG  | ACGCCGACCA  | CAGCGTCCAG  | AAACGGTCTG  |
| 6301 | CCATCAAAA  | AAATGTCCGC  | AGTCTCTCGG  | AGCCGCAACG  | CTGAGATCTT  | TCCGGGTCTG  |
| 6361 | CACCTGATCT | CACTGATCTG  | CGATCTCTCA  | ATCTCTCTCG  | CGGCGGATCT  | CGGCGGATCT  |
| 6421 | CCGCGCTGCT | AAAGTGGCGC  | GTCTCTCCGC  | CAATCTACCT  | CTCTCTCTCC  | CAAAATCAAA  |
| 6481 | CACTCATTTT | GCATATTATC  | GGCCACAAA   | AGTTTGAGGT  | ATATATTATG  | TGATG       |

FIG. 8K

【図 9 B】

[illegible]

FIG. 9B

【图 9 D】

[illegible]

FIG. 9D

【図 9 F】

[illegible]

FIG. 9E

|       |            |            |            |            |            |            |
|-------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 17601 | gaagcgtctc | ccagpccatc | ggcagcagcc | tctgaaagac | tgtaaataac | aacgtgacac |
| 17602 | gaagctcttc | ctctgctctc | ggctctcttc | acgtgagpac | tcaactcttc | ctctgctgac |
| 17603 | gaagctcttc | ctctgctctc | ggctctcttc | acgtgagpac | tcaactcttc | ctctgctgac |
| 17599 | aacggcgttc | ctctgctctc | ggctctcttc | tggagctgac | ttaagacttc | cggtgctgac |
| 17604 | ctcaaaactc | acagccagac | ggctgacgac | ggcagcagac | gaagcagctc | ggctgagagc |
| 17605 | ctcaaaactc | acagccagac | ggctgacgac | ggcagcagac | gaagcagctc | ggctgagagc |
| 17614 | ctgtgacgac | tggccacacg | gggtctcgac | aacagcagac | acagcgtctc | ggcgagcgtc |
| 17613 | ctgtgacgac | tggccacacg | gggtctcgac | aacagcagac | acagcgtctc | ggcgagcgtc |
| 17612 | ctgtgacgac | tggccacacg | gggtctcgac | aacagcagac | acagcgtctc | ggcgagcgtc |
| 17611 | ctgtgacgac | tggccacacg | gggtctcgac | aacagcagac | acagcgtctc | ggcgagcgtc |
| 17610 | ctgtgacgac | tggccacacg | gggtctcgac | aacagcagac | acagcgtctc | ggcgagcgtc |
| 17609 | ctgtgacgac | tggccacacg | gggtctcgac | aacagcagac | acagcgtctc | ggcgagcgtc |
| 18005 | ctgtgacgac | tggccacacg | gggtctcgac | aacagcagac | acagcgtctc | ggcgagcgtc |
| 18004 | ctgtgacgac | tggccacacg | gggtctcgac | aacagcagac | acagcgtctc | ggcgagcgtc |
| 18221 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | aactgacgac | gacactgacg | cagacgtctc |
| 18220 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | aactgacgac | gacactgacg | cagacgtctc |
| 18185 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18201 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18200 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18421 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18420 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18419 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18418 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18601 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18600 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18781 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18780 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18841 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 18840 | ctgtgacgac | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 19021 | aacagcagac | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19020 | aacagcagac | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19141 | aacagcagac | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19201 | attgagcttc | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19200 | attgagcttc | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19341 | attgagcttc | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19340 | attgagcttc | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19501 | attgagcttc | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19500 | attgagcttc | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19621 | gaacatctc  | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19620 | gaacatctc  | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19801 | gaacatctc  | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19800 | gaacatctc  | ggcagcagac | acagagcttc | aaactgctc  | gagctgcttc | gagctgcttc |
| 19941 | ggctgctctc | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 19940 | ggctgctctc | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 20041 | ggctgctctc | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 20040 | ggctgctctc | ctctgctctc | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 20241 | ggcagcagac | ggcagcagac | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 20240 | ggcagcagac | ggcagcagac | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 20441 | ggcagcagac | ggcagcagac | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 20440 | ggcagcagac | ggcagcagac | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 20641 | ggcagcagac | ggcagcagac | ctctgctctc | actgctgctc | aaagacgctc | gagctgcttc |
| 20640 | ggcagcagac | ggcagcagac | ctctgctctc |            |            |            |

FIG. 9F

【図 9 H】

[illegible]

FIG. 9G

[illegible]

FIG. 9H

## 【図 9 I】

27841 caccagaagc ggcgcgcgc tcaattttt ccaacacacg atttccctta acatgagatc  
 27901 ccccttttat ccaacacagc gaagattgc cagaaagac acgtctccac cgaagatgac  
 27961 agacacagac tgcgtcaaaa cctgttgttg aggttatgga caaggttagt gacaaacacg  
 28021 cctgtgtatg acatttatgc acactgtgac cccctgtgtg tctgtatgga cgaagatgac  
 28081 tgcctcttat tcatgtatgc caactgtgga agtattgga aatagatgac accatcatgt  
 28141 cactagaagg cttcattgta caccacaaaa agatgtacgt gaagacataa taagtgtgac  
 28201 cactgtatg acatttatgc caactgtgac cctgtgtgga tctgtatgga cgaagatgac  
 28261 gcaattgttg accactgata cgcgtcgaga tcttaaaac gcttaccaca tcaacataca  
 28321 acttgagact ggtctcaca tgcagacac aggtgtacat gtctgtatgga aaaaatgga  
 28381 gcaacagctt acatttatgc ccaacacacg cccctgtgga tctgtatgga cgaagatgac  
 28441 aagatgact agacttaca trtgtgtgac aagatgtgac agttagatg tggcgcagtt  
 28501 tttccctata gttgttatga ctgagactgt aatctccaca accagagaag taacacgtgc  
 28561 tctgtcttga cttaaatgt atgaaaatg agttgttgga agtgtgtgaa caatagatgc  
 28621 agactattgt aatttcagac agggatgac taacactgct gaaagctata ctaagtgtat  
 28681 aggtttatgt ccaatctaca aagaatgac taataacaca agtgggtgtg caaaagtcca  
 28741 cactgttgga aaggttact taatgtgga tgcgggaaa cccacgggac tcaattatga  
 28801 tttcaatgaa acaagtgtat aatttgtac tctgtgtatt aacttcaac ggcagtgtgg  
 28861 ggtgtatgaa caataaaat acaactgtgc ctgtacttca tctacattgt ctaactgtgc  
 28921 caaaataaaa accactgtgc taccactgt tctgtatgt gaaaacactt gaaaacataa  
 28981 aaaaataaaa agttcaagtg tttttatgt caacagttt ccaagatgtt ggcagtgtat  
 29041 tttcttccca cctctcagag aagaatgata caacacacct tccctcgaga cagctgtgaa  
 29101 cactgtatg cctgtgtgga tgcagctgtg tttgtgttcc acatttccaa caatttccaa  
 29161 ggcagtgctg cctgtgtgga tgcagtgatg gaaccccc ggcagctccc gaactgtgaa  
 29221 cctctcagag aagatgtgga gatttcttc ggcgtgtgg atcaggttta tctgaaaga  
 29281 gcaagaagac ggcagtgtg atcagatgt gcgaagga tccctgttga gttctgtc  
 29341 aggcctcgga ccaatgtgct tgcgcgtgc tgcgtcagac tctgtatgag ggcgtcggg  
 29401 tcaaggtgtg tctgtatgag agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtcagag ggcgtcggg  
 29461 ggcagagac ggcagtgtg cctgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 29521 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 29581 ccaacacacg ggcagtgtg agtgcgtgag agtgcgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 29641 agtgcgtgag ggcagtgtg agtgcgtgag agtgcgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 29701 agtgcgtgag ggcagtgtg agtgcgtgag agtgcgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 29761 ggcagtgctg cctgtgtgga tgcagtgatg gaaccccc ggcagctccc gaactgtgaa  
 29821 cctctcagag aagatgtgga gatttcttc ggcgtgtgg atcaggttta tctgaaaga  
 29881 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 29941 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30001 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30061 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30121 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30181 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30241 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30301 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30361 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30421 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30481 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30541 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30601 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30661 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30721 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30781 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30841 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30901 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 30961 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 31021 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 31081 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 31141 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 31201 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg  
 31261 agtgcgtgag agtgcgtgag tgcgtgtgag tgcgtgtgag agtgcgtgag ggcgtcggg

FIG. 9I

## 【図 9 J】

31321 aaaaattgag ctagatgta aaaaacac agagagaggt tccggg tggc cggcgagat  
 31381 gattcgagaa gattgataa ccccgagac attggtgttc ggggtt gaaa aaaaagcgc  
 31441 agagagagaa taagtgact a caatgttag tcttagtgc agcaaa gaga cgcagtgagg  
 31501 agagagacaa aatttccag gtgtgtgaa aatgtatga cctccc tctt gacagagag  
 31561 aaaaagcgc gattcttc a ggttacaata caaagcttca ggtctc atag cttacagga  
 31621 agagagacaa aaaaagcgc aagatgag aagagtgag ccttaa cctg tccacagct  
 31681 cctgtgttca tatatgccc agatctaac tgcgttagg gcaaaa gttt aaaaatccc  
 31741 gcaaaatc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc  
 31801 agagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc  
 31861 aaaaagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc  
 31921 agagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc  
 31981 taaaagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc cccagagc

(続列番号)

FIG. 9J

## 【図 10】

1 ATGAGAGGCA CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 61 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 121 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 181 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 241 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 301 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 361 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 421 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 481 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 541 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 601 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 661 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 721 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 781 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 841 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 901 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 961 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1021 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1081 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1141 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1201 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1261 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1321 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1381 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1441 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1501 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1561 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1621 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1681 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA

(続列番号)

FIG. 10

## 【図 11】

1 ATGAGAGGCA CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 61 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 121 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 181 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 241 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 301 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 361 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 421 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 481 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 541 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 601 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 661 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 721 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 781 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 841 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 901 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 961 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1021 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1081 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1141 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1201 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1261 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1321 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1381 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1441 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1501 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1561 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1621 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1681 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA

(続列番号)

FIG. 11

## 【図 12】

1 ATGAGAGGCA CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 61 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 121 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 181 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 241 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 301 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 361 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 421 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 481 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 541 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 601 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 661 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 721 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 781 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 841 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 901 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 961 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1021 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1081 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1141 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1201 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1261 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1321 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA

(続列番号)

FIG. 12

## 【図 13】

1 ATGAGAGGCA CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 61 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 121 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 181 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 241 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 301 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 361 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 421 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 481 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 541 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 601 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 661 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 721 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 781 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 841 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 901 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 961 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1021 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1081 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1141 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1201 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1261 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA  
 1321 AGAGAGGAGC CCAAAATGTC TGACGAGAC TTGACCCGCG TGACGAGGAA

(続列番号)

FIG. 13

【图 16】

[illegible]

FIG. 16

【图 17】

|     |             |             |             |            |            |              |
|-----|-------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|
| 61  | GTATGACAAAG | AGCGCTCTGCG | GTTGATGATG  | CTCTGGACAG | CCGTCTTACG | CTAG GATGAC  |
| 62  | GAGACACAGC  | CTGCTGCTG   | GTATGATATC  | CTGCTGACAG | GGGCTCTGAC | GGGCTCTGAC   |
| 121 | GAGACAGGCC  | TGGGGGCTTG  | CTGCTGCGGA  | CTGCGCTGAC | CTGCTGCGCA | CAGAGACAGGAC |
| 122 | GAAATGACAG  | TCAAGATGCG  | AGAGCGAGTG  | GAGCTGAGCT | CTCGGAGAAA | CTATCATCTCC  |
| 141 | AACAGCGAGC  | CAGAGCGCGC  | CGGCCCTCTG  | AGTTTCTTAC | ACAGACATCT | TCTCCCTCATAT |
| 161 | AGCTTATGCA  | AGAGAGAGAT  | CTGCTGCTG   | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG    |
| 162 | AGCTTATGCA  | AGAGAGAGAT  | CTGCTGCTG   | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG    |
| 421 | CTGACGACCA  | ACGCCTCTAC  | CTGCTGATTA  | CAGATCTCTC | TCACCTCTCA | CACAGACAGC   |
| 422 | CTGACGACCA  | ACGCCTCTAC  | TGGACACATCA | AATGTGACAT | CTGCTGCTG  | TAGC ATATAG  |
| 601 | CTGACGACCA  | ACGCCTCTAC  | CTGCTGCTG   | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG    |
| 602 | CTGACGACCA  | ACGCCTCTAC  | CTGCTGCTG   | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG  | CTGCTGCTG    |
| 61  | TGAATCTTGA  | TATTAATCTT  | AGAGAAATCT  | ATGCTGCTG  | ACATCTGATC | AAAGACAGGC   |
| 721 | TGAATCTTGA  | TATTAATCTT  | AGAGAAATCT  | ATGCTGCTG  | ACATCTGATC | AAAGACAGGC   |
| 722 | TGAATCTTGA  | TATTAATCTT  | AGAGAAATCT  | ATGCTGCTG  | ACATCTGATC | AAAGACAGGC   |
| 811 | AACTCTGGGG  | CTGCTCTTGC  | ATCTTGACAG  | AGCTGAGCTA | TCTTGCTCAT | GAGC AAGATG  |
| 812 | AACTCTGGGG  | CTGCTCTTGC  | ATCTTGACAG  | AGCTGAGCTA | TCTTGCTCAT | GAGC AAGATG  |
| 901 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 902 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 91  | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 92  | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 101 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 102 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 103 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 104 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 105 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 106 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 107 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 108 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 109 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 110 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 111 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 112 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 113 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 114 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 115 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 116 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 117 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 118 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 119 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 120 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 121 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 122 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 123 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 124 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 125 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 126 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 127 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC  | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC | CTGCTCTTGC   |
| 128 | CTGCTCTTGC  | TAGCTCTTGC  |             |            |            |              |

FIG. 17

【图 20 A】

[illegible]

FIG. 20A

I NEG:  
I NPDEF  
I NPPT  
I NPPT  
I NPPT  
I NPPT  
I NPPT  
I NPPT

[illegible]



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| C01 | CH1 | CH2 | CH3 | CH4 | CH5 | CH6 | CH7 | CH8 | CH9 | CH10 | CH11 | CH12 | CH13 | CH14 | CH15 | CH16 | CH17 | CH18 | CH19 | CH20 | CH21 | CH22 | CH23 | CH24 | CH25 | CH26 | CH27 | CH28 | CH29 | CH30 | CH31 | CH32 | CH33 | CH34 | CH35 | CH36 | CH37 | CH38 | CH39 | CH40 | CH41 | CH42 | CH43 | CH44 | CH45 | CH46 | CH47 | CH48 | CH49 | CH50 | CH51 | CH52 | CH53 | CH54 | CH55 | CH56 | CH57 | CH58 | CH59 | CH60 | CH61 | CH62 | CH63 | CH64 | CH65 | CH66 | CH67 | CH68 | CH69 | CH70 | CH71 | CH72 | CH73 | CH74 | CH75 | CH76 | CH77 | CH78 | CH79 | CH80 | CH81 | CH82 | CH83 | CH84 | CH85 | CH86 | CH87 | CH88 | CH89 | CH90 | CH91 | CH92 | CH93 | CH94 | CH95 | CH96 | CH97 | CH98 | CH99 | CH100 | CH101 | CH102 | CH103 | CH104 | CH105 | CH106 | CH107 | CH108 | CH109 | CH110 | CH111 | CH112 | CH113 | CH114 | CH115 | CH116 | CH117 | CH118 | CH119 | CH120 | CH121 | CH122 | CH123 | CH124 | CH125 | CH126 | CH127 | CH128 | CH129 | CH130 | CH131 | CH132 | CH133 | CH134 | CH135 | CH136 | CH137 | CH138 | CH139 | CH140 | CH141 | CH142 | CH143 | CH144 | CH145 | CH146 | CH147 | CH148 | CH149 | CH150 | CH151 | CH152 | CH153 | CH154 | CH155 | CH156 | CH157 | CH158 | CH159 | CH160 | CH161 | CH162 | CH163 | CH164 | CH165 | CH166 | CH167 | CH168 | CH169 | CH170 | CH171 | CH172 | CH173 | CH174 | CH175 | CH176 | CH177 | CH178 | CH179 | CH180 | CH181 | CH182 | CH183 | CH184 | CH185 | CH186 | CH187 | CH188 | CH189 | CH190 | CH191 | CH192 | CH193 | CH194 | CH195 | CH196 | CH197 | CH198 | CH199 | CH200 | CH201 | CH202 | CH203 | CH204 | CH205 | CH206 | CH207 | CH208 | CH209 | CH210 | CH211 | CH212 | CH213 | CH214 | CH215 | CH216 | CH217 | CH218 | CH219 | CH220 | CH221 | CH222 | CH223 | CH224 | CH225 | CH226 | CH227 | CH228 | CH229 | CH230 | CH231 | CH232 | CH233 | CH234 | CH235 | CH236 | CH237 | CH238 | CH239 | CH240 | CH241 | CH242 | CH243 | CH244 | CH245 | CH246 | CH247 | CH248 | CH249 | CH250 | CH251 | CH252 | CH253 | CH254 | CH255 | CH256 | CH257 | CH258 | CH259 | CH260 | CH261 | CH262 | CH263 | CH264 | CH265 | CH266 | CH267 | CH268 | CH269 | CH270 | CH271 | CH272 | CH273 | CH274 | CH275 | CH276 | CH277 | CH278 | CH279 | CH280 | CH281 | CH282 | CH283 | CH284 | CH285 | CH286 | CH287 | CH288 | CH289 | CH290 | CH291 | CH292 | CH293 | CH294 | CH295 | CH296 | CH297 | CH298 | CH299 | CH300 | CH301 | CH302 | CH303 | CH304 | CH305 | CH306 | CH307 | CH308 | CH309 | CH310 | CH311 | CH312 | CH313 | CH314 | CH315 | CH316 | CH317 | CH318 | CH319 | CH320 | CH321 | CH322 | CH323 | CH324 | CH325 | CH326 | CH327 | CH328 | CH329 | CH330 | CH331 | CH332 | CH333 | CH334 | CH335 | CH336 | CH337 | CH338 | CH339 | CH340 | CH341 | CH342 | CH343 | CH344 | CH345 | CH346 | CH347 | CH348 | CH349 | CH350 | CH351 | CH352 | CH353 | CH354 | CH355 | CH356 | CH357 | CH358 | CH359 | CH360 | CH361 | CH362 | CH363 | CH364 | CH365 | CH366 | CH367 | CH368 | CH369 | CH370 | CH371 | CH372 | CH373 | CH374 | CH375 | CH376 | CH377 | CH378 | CH379 | CH380 | CH381 | CH382 | CH383 | CH384 | CH385 | CH386 | CH387 | CH388 | CH389 | CH390 | CH391 | CH392 | CH393 | CH394 | CH395 | CH396 | CH397 | CH398 | CH399 | CH400 | CH401 | CH402 | CH403 | CH404 | CH405 | CH406 | CH407 | CH408 | CH409 | CH410 | CH411 | CH412 | CH413 | CH414 | CH415 | CH416 | CH417 | CH418 | CH419 | CH420 | CH421 | CH422 | CH423 | CH424 | CH425 | CH426 | CH427 | CH428 | CH429 | CH430 | CH431 | CH432 | CH433 | CH434 | CH435 | CH436 | CH437 | CH438 | CH439 | CH440 | CH441 | CH442 | CH443 | CH444 | CH445 | CH446 | CH447 | CH448 | CH449 | CH450 | CH451 | CH452 | CH453 | CH454 | CH455 | CH456 | CH457 | CH458 | CH459 | CH460 | CH461 | CH462 | CH463 | CH464 | CH465 | CH |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|

501

CI    TRED  
CV68    TAGE.  
PANS    TAKE.  
PANG    TAGE.  
PANT    TAGE.  
CHAD3    TAGE.  
CHAD4    TAGE.  
CHAD5    TAGE.  
CHAD6    TAKE.  
CHAD7    TAGE.  
CHAD8    TRED  
CHAD9    TAGE.  
CHAD10    TAGE.  
CHAD11    TAGE.  
CHAD16    TAGE.  
CHAD17    TAGE.  
CHAD19    TAGE.  
CHAD20    TAGE.  
CHAD21    TAGE.  
TRED  
CHAD22    TAGE.  
CHAD26    TAGE.  
CHAD30    TRED  
CHAD31    TAGE.  
CHAD37    TRED  
CHAD38    TAGE.  
CHAD44    TAGE.  
CHAD63    TAGE.  
CHAD82    TAKE.

|      |             |             |             |            |             |              |
|------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|--------------|
| 1    | ATGGCGGACC  | CATCGATGAT  | GCCGCGGATG  | TGCTGATGAG | ACATCTCGAG  | CCAGAGGAGCGC |
| 61   | TCGGAGTACC  | TGGGCGCCGG  | GTCTGGTCAG  | GTCTGCGCGG | CGGCTGCGGG  | CTGATCTAGCC  |
| 121  | TCGGAGTANCA | TGGGCGCCGG  | GTCTGCGTGG  | GTCGCGCACG | ACGATGTGAGC | CCAGAGTGGG   |
| 181  | TCGCGGATCG  | TGGGCGCCGG  | GTCTGCGTGG  | GTCGCGCACG | ACGATGTGAGC | CTGATCTGATC  |
| 241  | AAGCGTCAGC  | TGAGGATGAG  | GTCTGCGTGG  | GTCGCGCACG | ACGATGTGAGC | CTGATCTGATC  |
| 301  | TTTGATCATCT | GCGGAGGTCT  | GGACCGCGGT  | CCGATCTTCA | AGCGCTTCTC  | TGGCGACGCC   |
| 361  | TACCAACTCG  | TGGCGCCGCG  | GGGCGCGT    | ACCCATCTTG | AGCGTGAGTA  | TGGCGTACTG   |
| 421  | GCGCTTSTGA  | TTGTTTGGAG  | AGCGAGAGAG  | TGATGAGGAA | AGCGTGAGTA  | TGGCGGAGGA   |
| 481  | AGCGATCAGC  | TGAGGATGAG  | TGATGATGCG  | CGAGCGCTCG | AGCGTGAGTA  | TGGCGGAGGA   |
| 541  | AAGAGAGAGG  | TAGCAGTACG  | CTAATGATCG  | CGGATGACG  | CGCGACAGAC  | TGGTATGATC   |
| 601  | GATTAACACG  | TGCGACACAG  | ACCATCAAGT  | GGAGATGATG | AGCGTGAGTA  | CAGACAGATT   |
| 661  | AGTATGAGAG  | TGAGGATGAG  | GTCTGCGTGG  | GTCTTAAGAA | ACGCTCTCTA  | CTAGATGATG   |
| 721  | TATGATGAGC  | CTACTATGAG  | GAGCGAGTGG  | GCGGCGATCG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 781  | KAMGAAAGAT  | AACTGATAGT  | GCATTTACTT  | TGCTATCTTC | ATGCGACGCG  | CGGATATCTA   |
| 841  | GAATCAATCT  | AGCGACAGG   | TTGTTTGGAG  | AGCGAGATG  | TATCTGCGTA  | CAGACAGATT   |
| 901  | ACAGCTATCG  | ACAGCTATCG  | CCAGCAGAGC  | GAGACAGAGC | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 961  | CAGCGCTCAT  | CGCGACGCG   | TAACTACAT   | GTCTCTAGAG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1021 | TATFCAACCA  | GCATCTGAGC  | CTAGGAGGAT  | CTTGGAGATG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1081 | GTGAGGATCG  | AAAGTACAGC  | AAACACAGAG  | CTGTCTATAC | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1141 | GTGAGGATCG  | AAAGTACAGC  | AAACACAGAG  | CTGTCTATAC | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1201 | GTGAGGATCG  | AAAGTACAGC  | AAACACAGAG  | CTGTCTATAC | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1261 | GCGGCGGTAA  | TAACTGATAG  | AACTCTCTCA  | AAATGATGAA | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1321 | GCCTATGAG   | AAAGTACAGC  | AAACACAGAG  | CTGTCTATAC | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1381 | CTCTATCTCT  | CTGACATCTC  | TAAATGATG   | CCATCATGAC | TGCAATATCT  | CAGACATCTC   |
| 1441 | ACCTCTCTAG  | ATTATGATAG  | CAGAGCGATG  | GTCGCGCCGG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1501 | ACCTCTCTAG  | ATTATGATAG  | CAGAGCGATG  | GTCGCGCCGG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1561 | ACCTCTCTAG  | ATTATGATAG  | CAGAGCGATG  | GTCGCGCCGG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1621 | ACCTCTCTAG  | ATTATGATAG  | CAGAGCGATG  | GTCGCGCCGG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1681 | ACCTCTCTAG  | ATTATGATAG  | CAGAGCGATG  | GTCGCGCCGG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1741 | ACCTCTCTAG  | ATTATGATAG  | CAGAGCGATG  | GTCGCGCCGG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1801 | ACCTCTCTAG  | ATTATGATAG  | CAGAGCGATG  | GTCGCGCCGG | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1861 | CTTCTCTCTCA | TGGGCGACCA  | CGCGCTCTCT  | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1921 | AGCGACGATC  | CTTCTCTCTCA | TACATCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 1981 | AGCGACGATC  | CTTCTCTCTCA | TACATCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2041 | AGCGACGATC  | CTTCTCTCTCA | TACATCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2101 | TACAGCTATC  | CGCGCTCTCT  | TGCGCTCTCT  | CAGAGCGATC | CTTCTCTCTCA | CTAGATGATG   |
| 2161 | KAMGAGGTTCT | CGCGCTCTCT  | TGCGCTCTCT  | CAGAGCGATC | CTTCTCTCTCA | CTAGATGATG   |
| 2221 | ACCGCGACAG  | AGTCTGATCG  | GAGCGCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2281 | TGAGACATGA  | AGTCTGATCG  | GAGCGCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2341 | CAGCGCTCTCT | AGTCTGATCG  | GAGCGCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2401 | CAGCGCTCTCT | AGTCTGATCG  | GAGCGCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2461 | CAGCGCTCTCT | AGTCTGATCG  | GAGCGCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2521 | CAGCGCTCTCT | AGTCTGATCG  | GAGCGCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2581 | CAGCGCTCTCT | AGTCTGATCG  | GAGCGCTCTCT | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2641 | CTATCTCTAG  | TGGGCGACCA  | CGCGCTCTCT  | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2701 | CTATCTCTAG  | TGGGCGACCA  | CGCGCTCTCT  | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |
| 2761 | CTATCTCTAG  | TGGGCGACCA  | CGCGCTCTCT  | CGCGCTCTCT | AGCGTGAGTA  | CTAGATGATG   |

|      |             |              |             |             |             |             |
|------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1    | ATGGCGCACCC | CATGTAGCTG   | GGCCGACGTG  | GGGTATGATG  | ACATGTCGATG | ACAGAGGAGT  |
| 61   | TGCGATATGAC | TGATGATCCGGG | TGTGTGTGACG | TGTGCCGCGG  | CGACGACGAC  | C7ATCTTCATG |
| 121  | CTCGATGACGA | AGTTTATGAGA  | CGACACGATG  | GCGACGACG   | AGAGTATGATG | CGATCCAGTCG |
| 181  | AGCCAGAGCGG | GTGATCTCTGG  | CTGTCTGCTG  | GTGGACGCGG  | AGAGATGACG  | CTATCTGCTG  |
| 241  | AAATGCTGATG | CGCTCTCTGG   | CTGTGGGACG  | AAAGCTCTGG  | TGGACATCTG  | CGATGATGAC  |
| 301  | TTTATCACTG  | GGCGCTCTCT   | GGATGGCTGAC | CTGACGTCTG  | AMCCTCTCTG  | CGGCGACGCC  |
| 361  | TAAACACAGC  | GTGATCTCCCA  | GGAGGACGCG  | AATTGACAGC  | ATGTGAGGCA  | TAAACAGAGC  |
| 421  | GGCATATATG  | CCATATGAGCA  | TACGAGAGATG | CTCATATCTG  | TGATGAGGCTG | CATGGGAGGAG |
| 481  | ATATATCTG   | CTGATGATGAT  | CTCTTAACAT  | GGATCTGATG  | TGATGATGAT  | TGACATATCTG |
| 541  | GAAMTTATGT  | CAGACAAATAC  | ATTATCACTG  | GAGCGCGCAA  | TAGGAGAGGA  | AAATGGGCAA  |
| 601  | GACATCATAT  | CTCATATATG   | CTGTAAAGAG  | TGTAAAGAGG  | ATATGATGAT  | GAGAGCATCTG |
| 661  | ATGATGATG   | CTGATGAGAC   | TACGATATGAT | TAAGACAGGA  | ATGATGATG   | ATGATGATG   |
| 721  | GAGATGGTGA  | ATCATATTTGA  | GTAGACATGCA | GCGTTTCTTG  | ATATATCAAA  | TCTGTGCGCG  |
| 781  | GGAAATGATG  | CAAAATCTTGA  | CGATGATGCA  | GAATGTGTATG | TGTATATGAA  | AAATGTGTAAT |
| 841  | GTGGAGACCC  | CAGATATCTG   | TGTGTGTATG  | AGACACGAGG  | CTCATAGATG  | CGATCTAAGG  |
| 901  | ATGATGATG   | CGATGATCAT   | CGAGCTGTAC  | AGAGCATGAT  | CGATGATGAT  | CGAGATGATG  |
| 961  | TTTATTTATG  | TTTGTATGTA   | CAGACAGCAT  | GGAATATGAT  | GTGTGTCTGT  | TGTGTGAGCC  |
| 1021 | TTCTCAACTG  | ATATGCTGGT   | GTGATGATGCA | GACAGACGAG  | CGAGGCTGTG  | CTGATCTGAT  |
| 1081 | TTTCTTGATG  | TTTGTATGTA   | CGAATACAGG  | TATTTGTATG  | TGTGTGATGAT | CTGATCTGAT  |
| 1141 | ATGATGATG   | CTGATGATG    | CGATCTTATG  | ACAGCTGTGT  | CTGATCTGAT  | CTGATCTGAT  |
| 1201 | TATTTGCTCT  | CTCTTGATG    | AGCAAGGCAC  | AAATTTGCTGT | ACCAAGGTGT  | TAAACCAAAA  |
| 1261 | ATGACGAATG  | GCAACGATGCA  | TGTGGAGACG  | GATTCCTGAC  | TTTCAAGATG  | CATGATGATG  |
| 1321 | TGCAAGAGAT  | ATATTTATCT   | GAATCTGATG  | AACTCCGACG  | CGAACCTGTG  | GAGAGATTTT  |
| 1381 | CTGTATCTG   | CTGTATCTG    | GTATCTCTCG  | GAATTTCTG   | CTGATCTCTG  | CTGATCTCTG  |
| 1441 | ACCTTCGATG  | GCAACACCAA   | CGATCTGATG  | TACATCTGAC  | GGAAGATGTG  | CGCTCTCTCG  |
| 1501 | CTGTGGGAGG  | CTCATCATCT   | CGATGCGGCG  | CGGTGCTGAG  | TGGACCCCAT  | GGATCAATCTG |
| 1561 | ATGCTGATG   | CTCATCTG     | CAAGCGCGCG  | CTGCTGCTG   | CTGCTGCTG   | CTGCTGCTG   |
| 1621 | GGGATCTGAT  | CTGCTCTCTG   | CTATCGGATG  | CCGCGAAGAT  | TTTGTGCTAT  | CGAGAGCTATG |
| 1681 | CTGCTCTCTG  | CGGAGTCTCA   | TGTGACGAC   | TGGAGACTCT  | CGAAGAGAGT  | CGATCATGAT  |
| 1741 | CTCGAGATG   | CTGCTGGGAA   | CGACGTCGCG  | ACGAGCGGAG  | CTCTCATCTG  | CTGTACACATG |
| 1801 | ATGATCTATG  | CTGATCTCTG   | CTTCTGCTCG  | CGCGACAG    | CTGATCTCTG  | CTGATCTCTG  |
| 1861 | ATGATCTATG  | AGGACACACG   | CGACGATCTG  | TTCACAGCTG  | CTGCTCTGCG  | CGATCTCTG   |
| 1921 | CTGTACGCCA  | TCCGCGGACG   | CGATCTGACG  | GTGTCATCTG  | CATGCTCTCT  | GGATCTCTCTG |
| 1981 | GGCGCTCTG   | GGGCGGTGTC   | CTTTCAGCTG  | TGTAGAACAG  | CGGAGACGAG  | CGCTGTGGGG  |
| 2041 | CTGATCTCTG  | GGGCTGATTT   | GGTCTCTGAT  | GGCTCTGAT   | GGCTCTGAT   | GGCTCTGAT   |
| 2101 | CTATCTCAAC  | ACAGCTTTCTG  | GAGGCTCTG   | ATATGCTCTG  | ACTCTCTCTG  | CAGCTGTGGG  |
| 2161 | GGACACGACG  | GGCTCTTGAG   | CGACACAGG   | TGTAAATATG  | AGGATCAACG  | CGAGAGGAGG  |
| 2221 | GGATATGATG  | GGGCAATCTG   | CAGATGACAG  | AGAGCTCTCTG | TGCTGGGTGAT | CTGATGTGCG  |
| 2281 | CTGATGATCA  | GGGCTCTGAC   | GGGCTCTGAC  | GGCTCTGACG  | GGCTCTGACG  | GGCTCTGACG  |
| 2341 | TTCTCTTTCT  | CGATGATGCA   | CGGATGATG   | CGGATGATG   | TGGAGAGGAT  | CATCTACAGG  |
| 2401 | GATCTACAGG  | CGGCTACGCT   | GGCTCTACAG  | CGACACAGCT  | GGAGCTCTG   | CGGCTCTCTG  |
| 2461 | CTGATCTCTG  | GGGCTCTGAG   | CGAGCTCTG   | CGAGCTCTG   | CGAGCTCTG   | CGAGCTCTG   |
| 2521 | AAAGGAGGCT  | CTGATCTCTG   | CGACAGGAA   | AGATTTCTCT  | AGGAGAGGCT  | CTATGTGAGG  |
| 2581 | ATCTCCCTCT  | CGAGCAATCT   | ATGCTGTATG  | GGGCGCTGCA  | CGAGCTCTCTG | CGAGCAATCTG |
| 2641 | CTTATGATCA  | ACTTCCGCCA   | CGATGAGAG   | ATGATATCTG  | AGGATGACG   | CGATGATGAG  |
| 2701 | CTGATCTCTG  | CTGATCTCTG   | CTGTAGATG   | TTGGAGATG   | TTGGAGATG   | CTGATCTCTG  |
| 2761 | CGGCTCTCTG  | TGATGCGCTG   | CTATCTGCGG  | ACGCCCTCTG  | CGCGCGGTAA  | CGGCTCTCTG  |
| 2821 | TAA         | (終止符号)       |             |             |             |             |

FIG. 22

【図 23】

```

1  ATGGCCAGCC CATCGATGCT GCCCGAGTGG GCGTACATGG ACATGCGCGG ACAGGAGCGT
61  TGGGAGTACC TGAGTCGCGG TCTGGCTGAG CCGACAGACG CTACTCTAGT
121  CTGGGGAGCA AGTTTAGAGAA CCCCACGGTG GCGCCGACGG ACCGATGTGAC CAGCGACGGC
181  AGCCAGCGCG TGAGCTGCGG CTTCGTGGCC GTGGCGCGGG AGGACAGACG CTACTGTGAC
241  AAGATGCGCT ACAGCGTGGC GTGGCGCGGG TGAGACAGCG CAGCAGTAC
301  TTGACATGCT GCGCGTGGCT GAGTGGCGGG CCGTACCTGCA AACCTTACTC GCGCAGCGCT
361  TACAGACAGC TGAGTCCCAA GCGGCGCGGG ACCTTCAGCG AGGAGAGCGT AAAAAGAGCT
421  GCGCAATATG TGAGTCCCAA TGCGGAGAT CTCTCTATGG GTTATGCTGG CATGGAGAGA
541  ATTGACATGG ATAAAGATGG CTCTCAAAAT GGAACGGATG ACAGCAAGGA TGAGGATAT
581  GAATTTATAT CAGCAAAAGC ATATCAAGCT TGAGCGGCAA TAGAGAGAGA AAATGTGCAA
601  GAACCTATTT CCGTATATGG AGGAGAGCTG TGAGCAAAAG ATACCAAAAT GAACCATGTC
661  TATGCTCTGT TTGGCAGAGC TCGTACAGGA AAGAGAGGAG AGGTAAAAAT AAAAGAGAT
721  GGAGATGTTA AGTCTATTTA CAGAGAGCTA GCGTCTTTTG ATATCCCAA TTCTGGCGGG
781  GGAAATGAGA CAATGTATTA CAGATATGCA GATATGTTTA TGATACAGGA AAATGTAAAT
841  CTGGAAGCCG CAGATATGTA TATTTGTATG AAGCAGGAGA CTTCAGTGA GCGCTCAAG
901  GTCAACTTGT GTACGAGATC CAGCCGATAC AGCCCAAT ATATTGGCTT CAGAGACAAAT
961  TTATGTGGCT TTATGTATTA CAGACAGCT GGAATATGAG GTTGTGGTGG TGGTCAAGCG
1021  TCTCACTGTA AGTCTGTGCT GCGCTTCCGA GCGAGAGAGA CAGAGTGTCT CTACAGAGCT
1081  TTGCTGTGCT CTCTGGTGA CAGACAGCGG TATTTCTGTA TTGCGATCA GCGCGTGGCG
1141  AGTTATATAT CTGATGGGCG CATATATGAA AACATATGTT TGGAGATGA ATTCGCAAGC
1201  TATGCTCTTC CCGTGGAGTG AGCAGAGTAC AATTTGGTTT ACAGAGTGT TAACCAAA
1261  ACTGCAAGTG CCGAGAGTGA GTGGGAGAGA GTTTCAGCG TTTCAGATCA CATAGAGATA
1321  TGCAAGAGCA ATATCTATGT CAGAGAGTAT AACCTCCAGG CCAACCTTGT GAGAGTCTT
1381  CTCTACAGTA AGTGGCGCT GTAGCTGGCT GATCTTATGA ACTACAGCGC GCGCAACATC
1441  ACCGTCAGTA CCGAGAGAGA CCGCTCATG TGAATGAGC GAGAGATGCT GCTCTCGCTG
1501  CTGGTGGGAG CCGTACATCA CATCGCGCGG CCGTGTGGCG AGGAGCCCAT GAGACAGAGT
1561  AATCTCTTCA ACACAGCGCG CAGCGGGGCG CTGCGTACG TCGTCTATCT CTGGGAGAAC
1621  GCGGCTCTAG TCGCTCTTCA CATCTAGGTT CCGGAGAGAT TTPTTGGCTT CAGAGAGTCT
1681  CTCTCTCTCT CCGGCTCTCA CAGCTCTGAG TGAGCTCTCT CAGAGAGTCT CAGAGAGTCT
1741  CTGAGAGGCT GCGCTGCGCA GAGCTCTGCG AACCGAGGGT GCGTCTATCT CTTCACAGC
1801  ATCAAGCTCT AGGCGAGCTT GTTCCGAGT GCGCGAGAGA CCGGCTGAC GCGTGGAGCG
1861  ATCTGAGGCT GCGCGAGGCT TGAGAGAGCT AGCTCTGAGG GTCTGAGTGT
1921  CTCTAGGCTA CCGTGGGAGA GCGCGAGGCT GCGTCTATCT CCGTCTGCTG GCGAGAGATG
1981  GCGGCTCTCT CCGGCTGCTG CTTCAGCGCG CTGAGCGCG CCGGAGAGCG CTGCGTGGG
2041  TCGGCTGCTG AGGCTCTCTT CCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2101  TACTCTAGC AGGCTCTCTT CCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2161  GCGAGAGGCT GCGCTCTCTT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2221  GAGTACAGC GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2281  CAGTACAGC GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2341  TCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2401  GAGTACAGC GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2461  GCGGCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2521  AAGAGAGGCT GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2581  ATCTCTCTCT CCGAGAGCTT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2641  CTCTAGGCTA ACTGCGGAGA GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2701  TCGAGCTCTCT CCGAGAGCTT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2761  GCGGCTCTCT CCGAGAGCTT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2821 TAA (配列番号18)

```

FIG. 23

【図 24】

```

1  ATGGCCAGCC CATCGATGCT GCCCGAGTGG GCGTACATGG ACATGCGCGG ACAGGAGCGT
61  TGGGAGTACC TGAGTCGCGG TCTGGCTGAG CCGACAGACG CTACTCTAGT
121  CTGGGGAGCA AGTTTAGAGAA CCCCACGGTG GCGCCGACGG ACCGATGTGAC CAGCGACGGC
181  AGCCAGCGCG TGAGCTGCGG CTTCGTGGCC GTGGCGCGGG AGGACAGACG CTACTGTGAC
241  AAGATGCGCT ACAGCGTGGC GTGGCGCGGG TGAGACAGCG CAGCAGTAC
301  TTGACATGCT GCGCGTGGCT GAGTGGCGGG CCGTACCTGCA AACCTTACTC GCGCAGCGCT
361  TACAGACAGC TGAGTCCCAA GCGGCGCGGG ACCTTCAGCG AGGAGAGCGT AAAAAGAGCT
421  GCGCAATATG TGAGTCCCAA TGCGGAGAT CTCTCTATGG GTTATGCTGG CATGGAGAGA
541  ATTGACATGG ATAAAGATGG CTCTCAAAAT GGAACGGATG ACAGCAAGGA TGAGGATAT
581  GAATTTATAT CAGCAAAAGC ATATCAAGCT TGAGCGGCAA TAGAGAGAGA AAATGTGCAA
601  GAACCTATTT CCGTATATGG AGGAGAGCTG TGAGCAAAAG ATACCAAAAT GAACCATGTC
661  TATGCTCTGT TTGGCAGAGC TCGTACAGGA AAGAGAGGAG AGGTAAAAAT AAAAGAGAT
721  GGAGATGTTA AGTCTATTTA CAGAGAGCTA GCGTCTTTTG ATATCCCAA TTCTGGCGGG
781  GGAAATGAGA CAATGTATTA CAGATATGCA GATATGTTTA TGATACAGGA AAATGTAAAT
841  CTGGAAGCCG CAGATATGTA TATTTGTATG AAGCAGGAGA CTTCAGTGA GCGCTCAAG
901  GTCAACTTGT GTACGAGATC CAGCCGATAC AGCCCAAT ATATTGGCTT CAGAGACAAAT
961  TTATGTGGCT TTATGTATTA CAGACAGCT GGAATATGAG GTTGTGGTGG TGGTCAAGCG
1021  TCTCACTGTA AGTCTGTGCT GCGCTTCCGA GCGAGAGAGA CAGAGTGTCT CTACAGAGCT
1081  TTGCTGTGCT CTCTGGTGA CAGACAGCGG TATTTCTGTA TTGCGATCA GCGCGTGGCG
1141  AGTTATATAT CTGATGGGCG CATATATGAA AACATATGTT TGGAGATGA ATTCGCAAGC
1201  TATGCTCTTC CCGTGGAGTG AGCAGAGTAC AATTTGGTTT ACAGAGTGT TAACCAAA
1261  ACTGCAAGTG CCGAGAGTGA GTGGGAGAGA GTTTCAGCG TTTCAGATCA CATAGAGATA
1321  TGCAAGAGCA ATATCTATGT CAGAGAGTAT AACCTCCAGG CCAACCTTGT GAGAGTCTT
1381  CTCTACAGTA AGTGGCGCT GTAGCTGGCT GATCTTATGA ACTACAGCGC GCGCAACATC
1441  ACCGTCAGTA CCGAGAGAGA CCGCTCATG TGAATGAGC GAGAGATGCT GCTCTCGCTG
1501  CTGGTGGGAG CCGTACATCA CATCGCGCGG CCGTGTGGCG AGGAGCCCAT GAGACAGAGT
1561  AATCTCTTCA ACACAGCGCG CAGCGGGGCG CTGCGTACG TCGTCTATCT CTGGGAGAAC
1621  GCGGCTCTAG TCGCTCTTCA CATCTAGGTT CCGGAGAGAT TTPTTGGCTT CAGAGAGTCT
1681  CTCTCTCTCT CCGGCTCTCA CAGCTCTGAG TGAGCTCTCT CAGAGAGTCT CAGAGAGTCT
1741  CTGAGAGGCT GCGCTGCGCA GAGCTCTGCG AACCGAGGGT GCGTCTATCT CTTCACAGC
1801  ATCAAGCTCT AGGCGAGCTT GTTCCGAGT GCGCGAGAGA CCGGCTGAC GCGTGGAGCG
1861  ATCTGAGGCT GCGCGAGGCT TGAGAGAGCT AGCTCTGAGG GTCTGAGTGT
1921  CTCTAGGCTA CCGTGGGAGA GCGCGAGGCT GCGTCTATCT CCGTCTGCTG GCGAGAGATG
1981  GCGGCTCTCT CCGGCTGCTG CTTCAGCGCG CTGAGCGCG CCGGAGAGCG CTGCGTGGG
2041  TCGGCTGCTG AGGCTCTCTT CCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2101  TACTCTAGC AGGCTCTCTT CCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2161  GCGAGAGGCT GCGCTCTCTT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2221  GAGTACAGC GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2281  CAGTACAGC GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2341  TCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2401  GAGTACAGC GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2461  GCGGCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2521  AAGAGAGGCT GCGTCTCTCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2581  ATCTCTCTCT CCGAGAGCTT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2641  CTCTAGGCTA ACTGCGGAGA GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2701  TCGAGCTCTCT CCGAGAGCTT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2761  GCGGCTCTCT CCGAGAGCTT GCGTCTATCT GCGTCTATCT GCGTCTATCT CCGGAGCTCT
2821 TAA (配列番号18)

```

FIG. 24

【図 25】

```

1  ATGGCCAGCC CATCGATGCT GCCCGAGTGG GCGTACATGG ACATGCGCGG ACAGGAGCGT
61  TGGGAGTACC TGAGTCGCGG TCTGGCTGAG CCGACAGACG CTACTCTAGT
121  CTGGGGAGCA AGTTTAGAGAA CCCCACGGTG GCGCCGACGG ACCGATGTGAC CAGCGACGGC
181  AGCCAGCGCG TGAGCTGCGG CTTCGTGGCC GTGGCGCGGG AGGACAGACG CTACTGTGAC
241  AAGATGCGCT ACAGCGTGGC GTGGCGCGGG TGAGACAGCG CAGCAGTAC
301  TTGACATGCT GCGCGTGGCT GAGTGGCGGG CCGTACCTGCA AACCTTACTC GCGCAGCGCT
361  TACAGACAGC TGAGTCCCAA GCGGCGCGGG ACCTTCAGCG AGGAGAGCGT AAAAAGAGCT
421  GCGCAATATG TGAGTCCCAA TGCGGAGAT CTCTCTATGG GTTATGCTGG CATGGAGAGA
541  CAGCCGAGGAG CAGTCTATTA CAGTCTATTA CAGTCTATTA CAGTCTATTA CAGTCTATTA
601  TATGAGAGCA GCGCGTATTA ACCTGCGAGC GAGTATGAGC CTGCTATGAG CTCTCTCTCT
661  AGGCTAGCTA ATTTATGAGG AGGCTAGGCG AAGAGAGAGA CAGAGAGCTA TGAGAGAGT
721  GAGCTCTGTA TGAGTCTGAG CTCTCTCTCT GCGGAGAGT CAGCAGAGC TGGTCTCTCT
781  CCGAGAGATG TTTGCTATAC TGAGAGATG GATCTGAGAA CTATATGTA CCGTATGTA
841  TACAGAGAGC GAGCAGAGTA CAGCAGCTCT TCTCTATAT TTGCTAGCTA GCGTCTCTCT
901  AAGAGAGCTA ACTGAGAGG CTCTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
961  ACTGAGATTA TGAGTCTGAG GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1021  CAGAGAGAGC CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1081  AGGATTTTGA GTTATGAGGA TGAGGAGGCT GAGCAGATTA AGGCTCTCTCT GCGTCTCTCT
1141  GAATATGAGC GTTATGAGGA TGAGGAGGCT GAGCAGATTA AGGCTCTCTCT GCGTCTCTCT
1201  AGAGCAGATTA GTTATGAGGA TGAGGAGGCT GAGCAGATTA AGGCTCTCTCT GCGTCTCTCT
1261  AGGCTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1321  GAGCTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1381  TATGAGAGCA GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1441  TATGAGAGCA GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1501  CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1561  CTGCGTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1621  CCGGAGAGCT TTTTGGAGCT CAGAGAGCTCT CTGCTCTCTCT CCGGAGAGCT CAGAGAGCTCT
1681  TGGAGAGCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT
1741  CAGAGAGCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT
1801  GCGCAGAGC CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1861  TCGAGAGCT ACTCTCTCT GCGCAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1921  GCGCAGAGCT CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1981  CTGAGAGCT CCGGAGAGCT CTGCGTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2041  GCGTCTCTCT CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2101  ATGAGCTCTCT ACTCTCTCT GCGCAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2161  TTGAGAGCTA AGGCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2221  AAGAGCTCTCT TCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2281  GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2341  GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2401  CAGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2461  CCGGAGAGCT ACTCTCTCT GCGCAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2521  AAGTCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2581  GCGGCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2641  ATGAGTTTGG AGGCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2701  TTGAGCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2761  AGGCTCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2821 TAA (配列番号18)

```

FIG. 25

【図 26】

```

1  ATGGCCAGCC CATCGATGCT GCCCGAGTGG GCGTACATGG ACATGCGCGG ACAGGAGCGT
61  TGGGAGTACC TGAGTCGCGG TCTGGCTGAG CCGACAGACG CTACTCTAGT
121  CTGGGGAGCA AGTTTAGAGAA CCCCACGGTG GCGCCGACGG ACCGATGTGAC CAGCGACGGC
181  AGCCAGCGCG TGAGCTGCGG CTTCGTGGCC GTGGCGCGGG AGGACAGACG CTACTGTGAC
241  AAGATGCGCT ACAGCGTGGC GTGGCGCGGG TGAGACAGCG CAGCAGTAC
301  TTGACATGCT GCGCGTGGCT GAGTGGCGGG CCGTACCTGCA AACCTTACTC GCGCAGCGCT
361  TACAGACAGC TGAGTCCCAA GCGGCGCGGG ACCTTCAGCG AGGAGAGCGT AAAAAGAGCT
421  GCGCAATATG TGAGTCCCAA TGCGGAGAT CTCTCTATGG GTTATGCTGG CATGGAGAGA
541  CAGCCGAGGAG CAGTCTATTA CAGTCTATTA CAGTCTATTA CAGTCTATTA CAGTCTATTA
601  TATGAGAGCA GCGCGTATTA ACCTGCGAGC GAGTATGAGC CTGCTATGAG CTCTCTCTCT
661  AGGCTAGCTA ATTTATGAGG AGGCTAGGCG AAGAGAGAGA CAGAGAGCTA TGAGAGAGT
721  GAGCTCTGTA TGAGTCTGAG CTCTCTCTCT GCGGAGAGT CAGCAGAGC TGGTCTCTCT
781  CCGAGAGATG TTTGCTATAC TGAGAGATG GATCTGAGAA CTATATGTA CCGTATGTA
841  TACAGAGAGC GAGCAGAGTA CAGCAGCTCT TCTCTATAT TTGCTAGCTA GCGTCTCTCT
901  AAGAGAGCTA ACTGAGAGG CTCTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
961  ACTGAGATTA TGAGTCTGAG GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1021  CAGAGAGAGC CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1081  AGGATTTTGA GTTATGAGGA TGAGGAGGCT GAGCAGATTA AGGCTCTCTCT GCGTCTCTCT
1141  GAATATGAGC GTTATGAGGA TGAGGAGGCT GAGCAGATTA AGGCTCTCTCT GCGTCTCTCT
1201  AGAGCAGATTA GTTATGAGGA TGAGGAGGCT GAGCAGATTA AGGCTCTCTCT GCGTCTCTCT
1261  AGGCTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1321  GAGCTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1381  TATGAGAGCA GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1441  TATGAGAGCA GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1501  CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1561  CTGCGTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1621  CCGGAGAGCT TTTTGGAGCT CAGAGAGCTCT CTGCTCTCTCT CCGGAGAGCT CAGAGAGCTCT
1681  TGGAGAGCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT
1741  CAGAGAGCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT CAGAGAGCTCT
1801  GCGCAGAGC CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1861  TCGAGAGCT ACTCTCTCT GCGCAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1921  GCGCAGAGCT CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
1981  CTGAGAGCT CCGGAGAGCT CTGCGTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2041  GCGTCTCTCT CCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2101  ATGAGCTCTCT ACTCTCTCT GCGCAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2161  TTGAGAGCTA AGGCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2221  AAGAGCTCTCT TCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2281  GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2341  GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2401  CAGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2461  CCGGAGAGCT ACTCTCTCT GCGCAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2521  AAGTCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2581  GCGGCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2641  ATGAGTTTGG AGGCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2701  TTGAGCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2761  AGGCTCTCTCT CCGGAGAGCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT GCGTCTCTCT CCGGAGCTCT
2821 TAA (配列番号18)

```

FIG. 26



[illegible]

FIG. 31C

[illegible]

FIG. 31D

[illegible]

FIG. 31C

[illegible]

FIG. 31D



【図 3 1 J】

[illegible][illegible]

FIG. 31I

FIG. 31J

【図 3 2】

ATAAAGAACTCTTATGTTTCATATGACATCTGTGCTGTGCTTTTCTGTGTC (配列番号26)

ATCGATGCTGTTTCAATACCATCAATAATATACCTC (配列番号27)

CTGCTGGCACAAGATGGCGCTC (配列番号28)

ATCGAGCTTGTGTTAAACCCATCATCAATATATACCT (配列番号29)

ATTATGACACGGCTGCTAGCTATACCG (配列番号30)

ATTGATCGTAGCTAGCATGCTAGTATGATTTGTTGGGCTGGGGTGG (配列番号31)

TAGGCGCGCGCTCTCTCTCTGCTACGGTGGCG (配列番号32)

GATCTAGTTAGTTTAAACGAAATCTGGATCTGGGACDGGC (配列番号33)

TTGTCATCATGTTTAAACGGAGTATGATATACGATCGATCC (配列番号34)

TATTTCTCGATCTGCTGAAGGATGAGTGGT (配列番号35)

TAGCGCGCGCGCTTAAACGCATTTCTGCGAGC (配列番号36)

CGTTGAGAAGCCCGATCTTACAGC (配列番号37)

CGGATCGCTGTTTAAACCATCATCAATAATATACCTTAT (配列番号38)

ATTGGAATTCGTTTAAACCATCATCAATAATATACCTTT (配列番号39)

ATTAGCGGCAATCGGATATCTCCATATTAATTAACCGAGATCTTG (配列番号40)

TGCTCCACCACTCTTCTGCTGA (配列番号41)

TGTGAAGGCGACATGACG (配列番号42)

FIG. 32

【図 3 3】

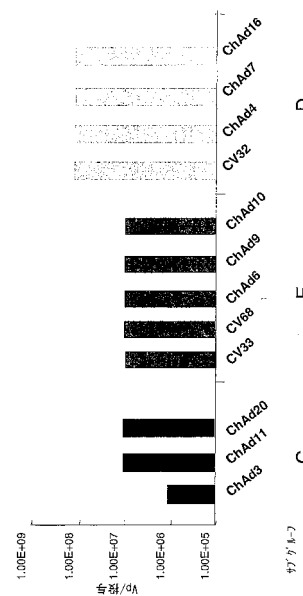


FIG. 33

【図 34】

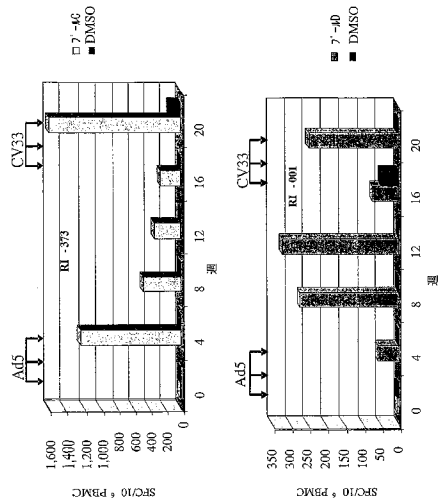


FIG. 34

【図 35】

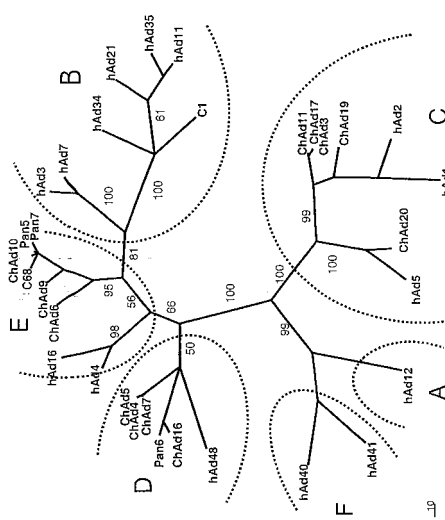


FIG. 35

【図 36】

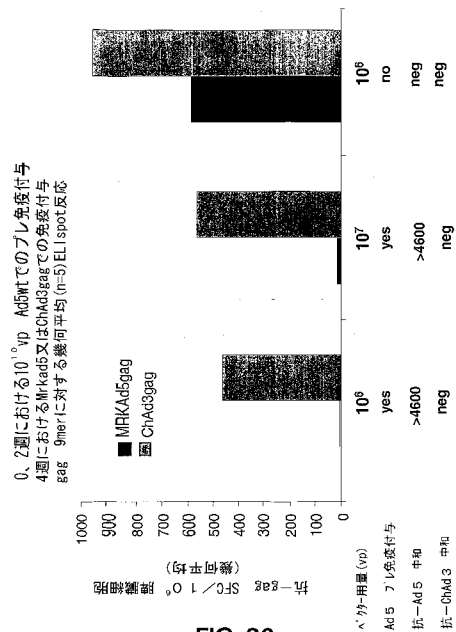


FIG. 36

【図 37】

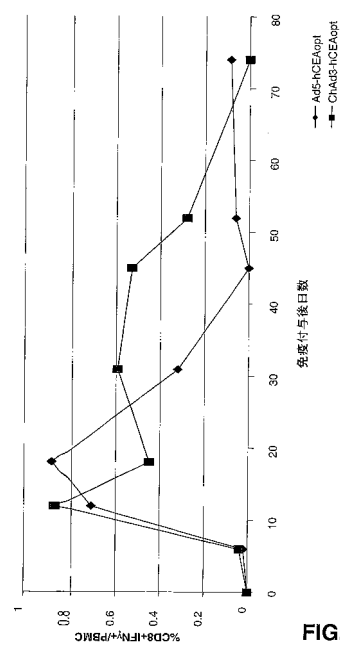


FIG. 37

【図 38 A】

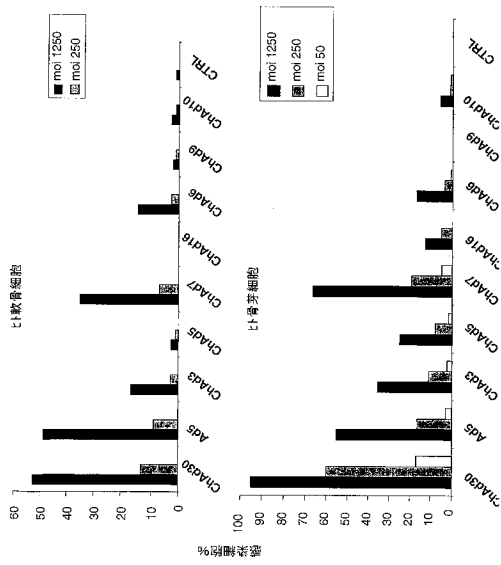


FIG. 38A

【図 38 B】

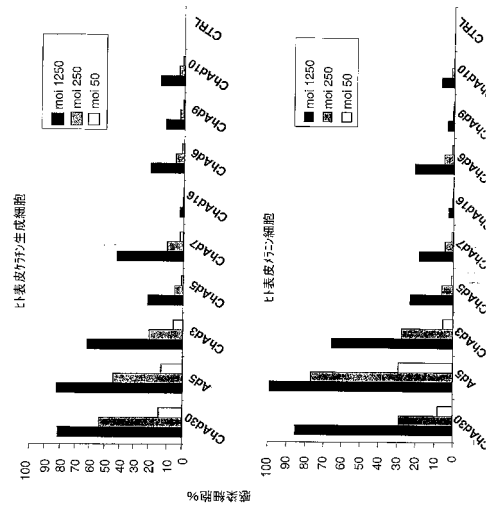


FIG. 38B

【図 38 C】

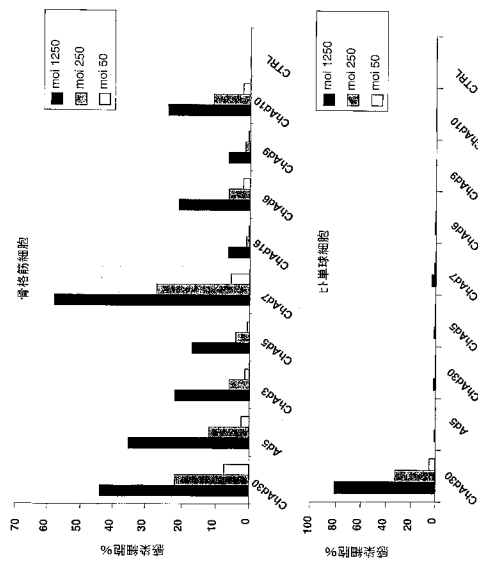


FIG. 38C

【図 38 D】

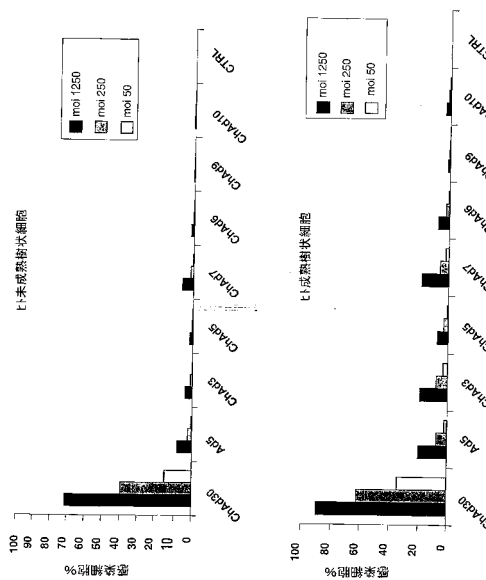


FIG. 38D

【配列表】

0004814800000001.xml

フロントページの続き

|                |           |                |
|----------------|-----------|----------------|
| (51)Int.Cl.    |           | F I            |
| A 6 1 K 39/29  | (2006.01) | A 6 1 K 39/29  |
| A 6 1 K 39/21  | (2006.01) | A 6 1 K 39/21  |
| A 6 1 K 39/015 | (2006.01) | A 6 1 K 39/015 |
| A 6 1 K 39/145 | (2006.01) | A 6 1 K 39/145 |
| A 6 1 K 39/04  | (2006.01) | A 6 1 K 39/04  |
| A 6 1 K 48/00  | (2006.01) | A 6 1 K 48/00  |
| A 6 1 P 31/12  | (2006.01) | A 6 1 P 31/12  |
| A 6 1 P 31/18  | (2006.01) | A 6 1 P 31/18  |
| A 6 1 P 31/14  | (2006.01) | A 6 1 P 31/14  |
| A 6 1 P 31/16  | (2006.01) | A 6 1 P 31/16  |
| A 6 1 P 31/06  | (2006.01) | A 6 1 P 31/06  |
| A 6 1 P 33/00  | (2006.01) | A 6 1 P 33/00  |
| A 6 1 P 31/10  | (2006.01) | A 6 1 P 31/10  |
| A 6 1 P 35/00  | (2006.01) | A 6 1 P 35/00  |

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 チリツロ, アゴステイーノ

イタリア国、イー０００４０・ボメツイア（ローマ）、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．  
６００、イ・エルレ・ビ・エンメ

(72)発明者 コロカ, ステファノ

イタリア国、イー０００４０・ボメツイア（ローマ）、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．  
６００、イ・エルレ・ビ・エンメ

(72)発明者 エルコレ, ブルーノ・ブルーニ

イタリア国、イー０００４０・ボメツイア（ローマ）、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．  
６００、イ・エルレ・ビ・エンメ

(72)発明者 メオラ, アンナリサ

イタリア国、イー０００４０・ボメツイア（ローマ）、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．  
６００、イ・エルレ・ビ・エンメ

(72)発明者 ニコシア, アルフレッド

イタリア国、イー０００４０・ボメツイア（ローマ）、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．  
６００、イ・エルレ・ビ・エンメ

(72)発明者 スボレノ, エリサベッタ

イタリア国、イー０００４０・ボメツイア（ローマ）、ビア・ポンテイーナ・キロメトロ・３０．  
６００、イ・エルレ・ビ・エンメ

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 国際公開第０３／０４６１２４（WO, A 1）

J Virol, vol.75, p.11603-11613 (2001)

Vaccine, vol.27, p.1293-1300 (2009)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C07K 14/075

PubMed