

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-506948

(P2006-506948A)

(43) 公表日 平成18年3月2日(2006.3.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/21 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/21	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/39	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-584268 (P2003-584268)	(71) 出願人	502200830
(86) (22) 出願日	平成15年4月9日(2003.4.9)		チルドレンズ ホスピタル, インコーポ
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月8日(2004.10.8)		レイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/010865		アメリカ合衆国 オハイオ 43205,
(87) 国際公開番号	W02003/087324		コロンバス, チルドレンズ ドライブ
(87) 国際公開日	平成15年10月23日(2003.10.23)		700
(31) 優先権主張番号	60/371,501	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成14年4月9日(2002.4.9)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体遺伝子送達およびそのための組換えAAV

## (57) 【要約】

本発明は、一般に、遺伝子送達のための組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)の使用に関し、より具体的には、哺乳動物における標的細胞に抗体遺伝子を送達するためのrAAVの使用に関する。HIV-1ウイルスを中和する抗体をコードするrAAVの投与を例示する。能動免疫ストラテジーおよび受動免疫ストラテジーの両方に関する有意な障害に起因して、本発明は、上述のHIV-1 gp160に対するヒトモノクローナル中和抗体およびAAV固有の遺伝子送達特性の存在を利用するアプローチを用いる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

r A A V / I g G 1 b 1 2 ゲノム。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の r A A V / I g G 1 b 1 2 ゲノムを含むポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の r A A V / I g G 1 b 1 2 ゲノムを含むパッケージング細胞。

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載の r A A V / I g G 1 b 1 2 ゲノムを含む精製 r A A V / I g G 1 b 1 2  
。

10

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の r A A V / I g G 1 b 1 2 を含む組成物。

## 【請求項 6】

細胞において I g G 1 b 1 2 抗体を産生する方法であって、細胞を請求項 4 に記載の精製 r A A V / I g G 1 b 1 2 の有効量で形質転換して該細胞における I g G 1 b 1 2 抗体の発現を誘発する工程を包含する、方法。

## 【請求項 7】

動物において I g G 1 b 1 2 抗体を産生する方法であって、請求項 5 に記載の組成物の有効量を患者に投与して、該動物における I g G 1 b 1 2 抗体の発現を誘発する工程を包含する、方法。

20

## 【請求項 8】

前記動物が人間である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

r A A V / S c F v X 5 ゲノム。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の r A A V / S c F v X 5 ゲノムを含むポリヌクレオチド。

## 【請求項 11】

請求項 9 に記載の r A A V / S c F v X 5 ゲノムを含むパッケージング細胞。

## 【請求項 12】

請求項 9 に記載の r A A V / S c F v X 5 ゲノムを含む精製 r A A V / S c F v X 5 。

30

## 【請求項 13】

請求項 12 に記載の r A A V / S c F v X 5 を含む組成物。

## 【請求項 14】

細胞において S c F v X 5 抗体ポリペプチドを産生する方法であって、細胞を請求項 12 に記載の精製 r A A V / S c F v X 5 の有効量で形質転換して該細胞における S c F v X 5 抗体ポリペプチドの発現を誘発する工程を包含する、方法。

## 【請求項 15】

動物において S c F v X 5 抗体ポリペプチドを産生する方法であって、請求項 13 に記載の組成物の有効量を患者に投与して、該動物における S c F v X 5 抗体ポリペプチドの発現を誘発する工程を包含する、方法。

40

## 【請求項 16】

前記動物が人間である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

抗 H I V - 1 抗体ポリペプチドをコードする精製 r A A V 。

## 【請求項 18】

1 つ以上の請求項 17 に記載の r A A V を含む組成物。

## 【請求項 19】

細胞において抗 H I V - 1 抗体ポリペプチドを産生する方法であって、細胞を請求項 17 に記載の精製 r A A V の有効量で形質転換して該細胞における抗 H I V - 1 抗体ポリペプチドの発現を誘発する工程を包含する、方法。

50

## 【請求項 20】

動物において抗 HIV - 1 抗体ポリペプチドを産生する方法であって、請求項 18 に記載の組成物の有効量を患者に投与して、該動物における抗 HIV - 1 抗体ポリペプチドの発現を誘発する工程を包含する、方法。

## 【請求項 21】

前記動物が人間である、請求項 20 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2002年4月9日に出版された米国仮出願番号60/371,501の一部継続である。 10

## 【0002】

## (発明の分野)

本発明は、一般には遺伝子送達のための組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)の使用に関し、より具体的には、哺乳動物における標的細胞への抗体遺伝子を送達するためのrAAVの使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

## (背景)

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、複製不全のバルボウイルスであり、その1本鎖DNAゲノムは、逆方向末端反復(ITR)の145ヌクレオチドを含む約4.7kb長である。AAV血清型2(AAV2)ゲノムのヌクレオチド配列は、Srivastavaら、J. Virol., 45:555-564(1983)に示されており、Ruffinら、J. Gen. Virol., 75:3385-3392(1994)によって訂正されている。ウイルスDNA複製(rep)、キャプシド形成/パッケージングおよび宿主細胞の染色体組込みを指示するシス作動性配列は、ITRの範囲に含まれる。3つのAAVプロモーター(p5、p19およびp40(その相対的なマップ位置にちなんで名付けられる))は、rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする2つのAAV内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。単一のAAVイントロン(ヌクレオチド2107および2227)の差次的なスプライシングと相まって、この2つのrepプロモーター(p5およびp19)は、rep遺伝子からの4つのrepタンパク質(rep78、rep68、rep52およびrep40)の産生を生じる。repタンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製を担う複数の酵素特性を保有する。cap遺伝子は、p40プロモーターから発現され、この遺伝子は、3つのキャプシドタンパク質(VP1、VP2およびVP3)をコードする。選択的スプライシングおよびコンセンサスでない翻訳開始部位は、3つの関連するキャプシドタンパク質の産生を担う。単一のコンセンサスポリアデニル化部位がAAVゲノムのマップ位置95に位置する。AAVの生活環および遺伝学は、Muzyczka、Current Topics in Microbiology and Immunology, 158:97-129(1992)において総説されている。 40

## 【0004】

野生型のAAVがヒト細胞に感染すると、ウイルスゲノムが19番染色体に組み込まれ、細胞の不顕性感染を生じ得る。細胞がヘルパーウイルス(例えば、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス)に感染するまで、感染性ウイルスの産生は生じない。アデノウイルスの場合、遺伝子E1A、E1B、E2A、E4およびVAがヘルパー機能を提供する。ヘルパーウイルスに感染すると、AAVプロウイルスがレスキューおよび増幅され、AAVとアデノウイルスの両方が産生される。

## 【0005】

AAVは、免疫原性ペプチド/ポリペプチドを発現するためのワクチンベクターとして、および、例えば、遺伝子治療において、外因性のDNAを細胞に送達するためのベクタ 50

ーとして、A A Vを魅力的にする独特の特性を保有する。培養中の細胞のA A V感染は、非細胞障害性であり、ヒトおよび他の動物の天然の感染は、静的であり、無症候性である。さらに、A A Vは、多くの哺乳動物細胞に感染し、インビボにおいて多くの異なる組織を標的化する可能性を提供する。さらに、A A Vは、分裂細胞および非分裂細胞にゆっくりと形質導入し、転写的に活性な核エピソーム（染色体外エレメント）として、本質的にはこれらの細胞の寿命の間持続し得る。A A Vプロウイルスゲノムは、プラスミドにクローニングされたDNAとして感染性であり、このことは、組換えゲノムの構築物を実現可能にする。さらに、A A Vの複製、ゲノムのキャプシド形成および組み込みを指向するシグナルがA A VゲノムのITR内に含まれるので、ゲノムの内側約4.3 kb（複製キャプシドタンパク質および構造キャプシドタンパク質（rep-cap）をコードする）の

10

#### 【0006】

H I V - 1は、米国において後天性免疫不全症候群（A I D S）の原因物質であると考えられている。世界保健機構によって評価されたように、4千万人以上が現在H I Vに感染しており、2千万人がすでにA I D Sで死亡している。従って、H I V感染は、世界規模の流行病であると考えられる。

20

#### 【0007】

現在認識されている2つのH I V株（H I V - 1およびH I V - 2）が存在する。H I V - 1は、世界中でA I D Sの主要な原因である。H I V - 1は、ゲノム配列変化に基づいてクレードに分類されている。例えば、クレードBは、北米、ヨーロッパ、南米の一部およびインドで最も優勢であり；クレードCは、サハラ以南のアフリカにおいて最も優勢であり；そして、クレードEは、東南アジアにおいて最も優勢である。H I V - 1感染は、主に、性的感染、母子感染、または汚染された血液もしくは血液製剤への曝露を通じて生じる。

30

#### 【0008】

現在認識されている2つのH I V株（H I V - 1およびH I V - 2）が存在する。H I V - 1は、世界中でA I D Sの主要な原因である。H I V - 1は、ゲノム配列変化に基づいてクレードに分類されている。例えば、クレードBは、北米、ヨーロッパ、南米の一部およびインドで最も優勢であり；クレードCは、サハラ以南のアフリカにおいて最も優勢であり；そして、クレードEは、東南アジアにおいて最も優勢である。H I V - 1感染は、主に、性的感染、母子感染、または汚染された血液もしくは血液製剤への曝露を通じて生じる。

#### 【0009】

H I V - 1は、ウイルス構造タンパク質および酵素の内部コア、ならびにウイルスの複製に必要とされるタンパク質、および2つの同一の直鎖状RNAのゲノムを取り囲む脂質エンベロープからなる。脂質エンベロープにおいて、ウイルス糖タンパク質41（gp41）が、ウイルス表面から延びて、感受性細胞の表面上レセプターと相互作用する別のウイルスエンベロープ糖タンパク質120（gp120）を係留する。H I V - 1ゲノムは、約10,000ヌクレオチドのサイズであり、9つの遺伝子を含む。H I V - ゲノムは、全てのレトロウイルスに共通の3つの遺伝子（gag遺伝子、pol遺伝子およびenv遺伝子）を含む。gag遺伝子は、コア構造タンパク質をコードし、env遺伝子はgp120およびgp41エンベロープタンパク質をコードし、そして、pol遺伝子はウイルスの酵素である逆転写酵素（RT）、インテグラーゼおよびプロテアーゼ（pro）をコードする。ゲノムは、ウイルスの複製に必須の2つの他の遺伝子である、ウイルスプ

40

50

ロモータートランスアクチベーターをコードする *tat* 遺伝子および、また、遺伝子の転写を促進する *rev* 遺伝子を含む。最後に、*nef* 遺伝子、*vpu* 遺伝子、*vpr* 遺伝子および *vif* 遺伝子は、レンチウイルスに固有であり、Trono, Cell, 82: 189-192 (1995) に記載される機能のポリペプチドをコードする。

#### 【0010】

HIV-1 がヒト細胞に感染するプロセスは、ウイルスの表面上タンパク質と細胞の表面上タンパク質との相互作用を含む。一般的な理解は、HIV感染の最初の段階が、HIV-1の糖タンパク質(gp)120の細胞CD4タンパク質への結合であるということである。この相互作用は、ウイルスgp120に立体構造の変化を生じさせ、他の細胞表面タンパク質(例えば、CCR5タンパク質またはCXCR4タンパク質)に結合し、ウイルスの細胞との引き続く融合を可能にする。従って、CD4は、HIV-1に対する主要なレセプターとして記載されており、一方で、他の細胞表面タンパク質がHIV-1に対するコレセプターとして記載されている。

10

#### 【0011】

HIV-1感染は、ウイルス感染とAIDSの発症との間の無症候性の期間により特徴付けられる。AIDSへの進行速度は、感染した個人間で異なる。AIDSは、CD4陽性細胞(例えば、ヘルパーT細胞および単球/マクロファージ)が感染され、そして消耗されると発症する。AIDSは、日和見感染症、悪性腫瘍の危険の増加および細胞媒介性免疫の欠失に代表的な他の症状として顕性化する。The Centers for Disease Control and Preventionの小児、青年および成人の疾患の臨床分類は、SleasmanおよびGoodenow, J. Allergy Clin. Immunol., 111(2): S582-S592(2003)の表Iに示される。

20

#### 【0012】

AIDSへの進行の可能性の予測は、ウイルス負荷(ウイルスの複製)のモニタリング、および感染した個体におけるCD4陽性T細胞の測定を包含する。ウイルス負荷が高いほど、個人はよりAIDSを発症する可能性が高い。CD4陽性T細胞数が低いほど、個人がAIDSを発症する可能性が高い。

#### 【0013】

現在、抗レトロウイルス薬物療法(ART)は、HIV感染を処置するか、または1個人から別の個人へのHIV-1の伝染を防ぐ唯一の手段である。せいぜい、ARTを用いてさえ、HIV-1感染は、一生の薬物療法を必要とする慢性状態であり、疾患へのゆっくりとした進行がなお存在し得る。ウイルスが不顕性の保有者において持続し得るため、ARTは、HIV-1を根絶しない。さらに、処置レジメンは、毒性であり得、毎日複数の薬物を使用しなければならない。従って、HIV-1感染に対する有効なワクチンおよび処置を開発する緊急の必要性が存在する。

30

#### 【0014】

過去数年にわたって、HIV感染に対する安全かつ有効なワクチンに向けて進歩がなされており、複数のアプローチが動物モデルおよびヒトにおいてとられている。ワクチン候補物の多くは、測定可能かつ有意な抗原特異的T細胞応答を誘発した。対照的に、ワクチン候補物の多くは、HIV-1の重要な単離体を広く中和する血清抗体を誘導できない。従って、このような抗体がHIV-1感染および疾患に対する重要な保護であると考えられる場合、現在のHIV-1ワクチン候補物の設計には重大なギャップが残る。

40

#### 【0015】

エンベロープ免疫原でのワクチン接種後の中和抗体の誘導の欠落を説明するために、いくつかの仮説が提示される。まず、誘発された抗エンベロープ抗体のほとんどが、成熟したオリゴマーエンベロープ複合体を認識せず、むしろプロセシングされていないgp160前駆体または単量体のgp120に結合する。このことは、部分的に、成熟したエンベロープスパイクの三量体構造に起因し、この構造は、低い固有免疫原性の分子を生じる。露出された表面ドメインの伸長性のグリコシル化は、スパイクの重要な部分を非免疫原性

50

にし、分子のいわゆる「静的表面」を生じる。第2に、三量体部分のコンパクトな構造は、三量体のコアの内部に位置されるタンパク質エピトープの抗体認識と立体的に干渉する。重要なことには、これらの同じエピトープが、プロセシングされていないgp160前駆体または単量体のgp120タンパク質上に容易に露出され、タンパク質の非中和化表面にマッピングされる。結果として、広範なクレードにまたがる様式で主要なウイルス単離体を中和する、ヒトモノクローナル抗体を単離することは、非常に困難である。実際、種々の技術を用いる努力にも拘らず、わずか6つのこのような抗体(Zwickyら、*J. Virol.*, 75:12198-12208, 2001に記載されるb12、2G12、2F5、Z13および4E10、ならびにMouillardら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 6913-6918, 2002に記載されるX5)が同定されている。このような抗体がHIV-1に感染したヒトにおいて稀であるという事実は、従来のワクチン接種法を用いて広範に反応性な抗体を誘発するのに、病気(と定義されるが実質的には障壁である)を強調するようにして働く。

10

## 【0016】

この問題のための1つの可能な解決策は、所望の中和活性を有する抗体調製物(モノクローナルまたはポリクローナル)を予防的に投与することであり得る。HIV-1に関して、非ヒト霊長類における研究は、受動的に投与された中和抗体がSIV/SHIV/HIV感染に対して有意な保護を提供し得ることを示唆する。この型の「受動免疫」スキームは、重篤な呼吸器合胞体ウイルス感染の危険性がある幼児の標的化された集団に対して大規模に首尾良く適用されている。しかし、このようなHIV感染に対する戦略は、重大な欠陥を有する。無期限にわたって、頻繁に多数の人に抗体調製物を投与することは、非常にコストがかかり、非実用的である。

20

## 【発明の開示】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0017】

## (発明の要旨)

本発明は、HIV-1感染に対して有効な予防的および治療的処置の開発への必要性を認識する。能動免疫戦略および受動免疫戦略の両方に関する有意な障害に起因して、本発明は、上述のHIV-1 gp160に対するヒトモノクローナル中和抗体およびAAV固有の遺伝子送達特性の存在を利用するアプローチを用いる。

30

## 【0018】

第1の局面において、本発明は、rAAVゲノムを提供する。このrAAVゲノムは、標的細胞において機能的である、転写制御DNA、特にプロモーターのDNAおよびポリアデニル化シグナル配列のDNAに作動可能に連結されている1つ以上の抗体ポリペプチドをコードするDNAの遺伝子カセットに隣接するAAV ITRを含む。この遺伝子カセットはまた、イントロン配列を含み、哺乳動物細胞において発現される場合にRNA転写物のプロセシングを促進し得る。本発明のrAAVゲノムは、AAVのrep DNAおよびcap DNAを欠失する。rAAVゲノムのAAV DNAは、組換えウイルスが由来し得る任意のAAV血清型由来であり得る。

## 【0019】

特に、本発明は、軽鎖および重鎖ポリペプチドをコードする二重プロモーターの遺伝子カセットを意図する。1つの実施形態において、遺伝子カセットは、以下を含む：(1)形質導入される細胞において活性な2つの恒常性プロモーター、(2)プロモーターエレメントまたは重鎖および軽鎖コード配列の迅速な置換を可能にするいくつかの固有の制限酵素部位、(3)インフレームの抗体遺伝子クローニングを促進する固有の制限部位、(4)可能性のあるプロモーター干渉を減らすための、第1の発現カセットに対する強力な転写終止部位3'、ならびに(5)2つのプロモーターのうちの1つの転写制御下にて、各々挿入される目的のモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードするポリヌクレオチド配列。

40

## 【0020】

50

本発明は、ウイルスタンパク質（例えば、HIV、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、Epstein Barrウイルスおよび呼吸器合胞体ウイルスのタンパク質）および細菌タンパク質、ならびに抗体の供給が有効な処置である慢性疾患状態に関する他のタンパク質（例えば、疾患状態が生じるときにのみ発現されるタンパク質、または疾患状態の非存在下での発現と比べて発現がアップレギュレートされるタンパク質）に指向する抗体を発現するrAAVゲノムを意図する。慢性疾患状態の例としては、以下が挙げられる：癌、炎症性疾患（例えば、慢性関節性リウマチおよび炎症性腸疾患）、およびプリオン関連疾患（例えば、狂牛病、Creutzfeldt-Jakob病、Gerstmann-Straussler-Scheinker症候群、致死性家族性不眠症、クールーおよびAlpers症候群）。主要なHIV-1単離体（例えば、モノクローナル抗体IgG1b12、2F5、Z13、45E10、F105およびX5）を中和するモノクローナル抗体をコードするゲノムが特に意図される。これらの抗体は、Zwickら、J. Virol., 75:12198-12208, 2001; Babaら、Nat. Med., 6:200-206, 2000; およびMoulardら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 6913-6918, 2002)に多様に記載されている。Z13のアミノ酸配列は、Genebank登録番号AY035845およびAY035846（配列番号18および19）に示され、2F5の重鎖DNAおよび軽鎖DNAならびにアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号22および23ならびに配列番号24および25に記載される。ヒトCMVの最初期のプロモーター/エンハンサー、SV40小T-抗原イントロン、b12重鎖コード配列、ウシ成長ホルモンポリアデニル化部位、HTLV1型の長い末端反復配列のRセグメントおよびU5配列の一部を用いて改変されたヒト伸長因子-1プロモーター、I117イントロン、b12軽鎖コード配列ならびにSV40ポリアデニル化部位を含む二重プロモーターの遺伝子カセットが本明細書中で具体的に例示される。この遺伝子カセットを含むrAAVゲノムは、rAAV/IgG1b12ゲノムに指向する。ヒトCMVの最初期のプロモーター/エンハンサー、SV40小T-抗原イントロン、X5重鎖可変領域コード配列、(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>リンカー、X5軽鎖可変領域コード配列およびSV40ポリアデニル化部位を含む遺伝子カセットがまた、本明細書中で具体的に例示される。この遺伝子カセットを含むrAAVゲノムは、rAAV/ScFvX5ゲノムに指向する。

#### 【0021】

本発明は、rAAVゲノムによってコードされる抗体ポリペプチドを意図し、この抗体ポリペプチドは、任意のクラス（IgG、IgA、IgD、IgMまたはIgE）またはそのサブクラスのインタクトな免疫グロブリン分子、四量体、二量体、単鎖抗体、二官能性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全に新規の組換え抗体、化学的手段または生物学的的手段によって新規に合成された抗体、Fabフラグメント、F(ab)<sub>2</sub>、ならびに他の免疫活性部分、フラグメント、セグメントおよび他のより小さい部分抗体構造もしくはより大きい部分抗体構造であり得、これらの全てが十分な結合活性を有し、従って、本発明の方法において治療的に有用である。さらに、本発明は、「ヒト化」抗体の使用を意図するので、例えば、フレームワークおよび/または相補性決定領域の同一性のいくらかの変化（すなわち、抗体の抗原特異性を決定するのに重要な上記抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のCDRまたは超可変領域）が、両方とも許容および予想される。従って、本発明に従って、本発明において有用な抗体ポリペプチドのアミノ酸配列は、感染（急性および慢性の感染）および慢性疾患を処置する、公知の効用のこれらの抗体からのいくらかの配列変化を示し得る。このような配列変化は、5%程度であり得、それによって、本明細書中で有用な抗体配列が、既知の効用の抗体と少なくとも95%の同一性を有する。上記のように、抗体ポリペプチドは、任意の抗体クラスであり得る（または任意の抗体クラス由来であり得る）。抗体クラスは、処置される感染および/または疾患状態ならびに抗体ポリペプチドの所望の作用および作用部位を考慮して、当業者により選択され得るか、または改変され得る。

#### 【0022】

10

20

30

40

50

別の局面において、本発明は、本発明の r A A V ゲノムを含む D N A ベクターを提供する。このベクターは、感染性のウイルス粒子への r A A V ゲノムのアセンブリのために、A A V のヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、E 1 欠失アデノウイルスまたはヘルペスウイルス）での感染に許容性の細胞に輸送される。パッケージングされている A A V ゲノム、r e p 遺伝子および c a p 遺伝子ならびにヘルパーウイルス機能が細胞に提供される A A V 粒子を産生する技術は、当該分野の技術水準である。r A A V の産生は、以下の成分が単一の細胞（本明細書中でパッケージング細胞と称する）内に存在することを必要とする：r A A V ゲノム、r A A V ゲノムとは別の A A V r e p 遺伝子および A A V c a p 遺伝子、ヘルパーウイルス機能。A A V r e p 遺伝子および A A V c a p 遺伝子は、組換えウイルスが r A A V ゲノム I T R 以外の異なる A A V 血清型由来であり得る、任意の A A V 血清型由来であり得る。

10

## 【0023】

パッケージング細胞の作製方法は、A A V 粒子産生のための全ての必要な成分を安定に発現する細胞株を作製することである。例えば、r A A V ゲノム、r A A V ゲノムから単離した A A V r e p および c a p 遺伝子、ならびに選択マーカー（例えば、ネオマイシン体制遺伝子）を含むプラスミド（または複数のプラスミド）を細胞のゲノムに組み込む。次いで、パッケージング細胞株にヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス）を感染させる。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、r A A V の大規模産生に適することである。適切な方法の他の例は、プラスミドよりむしろ、アデノウイルスまたはバキュロウイルスを用いて、パッケージング細胞内に r A A V ゲノムならびに / または r e p および c a p 遺伝子を組み込む。

20

## 【0024】

従って、本発明は、感染性の r A A V を産生するパッケージング細胞を提供する。1つの実施形態において、パッケージング細胞は、癌細胞（例えば、H e L a 細胞、293細胞および P e r C . 6 細胞（同族の293株））に安定に形質導入され得る。別の実施形態において、パッケージング細胞は、低い継代の293細胞（アデノウイルスのE1で形質転換したヒト胎性腎臓細胞）、M R C - 5 細胞（ヒト胎性線維芽細胞）、W I - 3 8 細胞（ヒト胎性線維芽細胞）、V e r o 細胞（サル腎臓細胞）および F R h L - 2 細胞（アカゲザル胎性肺細胞）のような形質転換された癌細胞でない細胞である。

30

## 【0025】

別の局面において、本発明は、本発明の r A A V ゲノムを含む r A A V （すなわち、感染性のキャプシド化された r A A V 粒子）を提供する。1つの実施形態において、r A A V は、r A A V / I g G 1 b 1 2 である。別の実施形態において、r A A V は、r A A V / S c F v X 5 である。r A A V は、カラムクロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配によってのような、当該分野で標準的な方法によって精製され得る。

## 【0026】

別の実施形態において、本発明は、本発明の r A A V を含む組成物を企図する。これらの組成物を用いて、ウイルス感染（急性および慢性のウイルス感染）、特に A I D S 、細菌感染（急性、亜急性および慢性の細菌感染）および他の慢性疾患状態を、処置および / または予防し得る。1つの実施形態において、本発明の組成物は、目的の抗体ポリペプチドをコードする r A A V を含む。他の実施形態において、本発明の組成物は、異なる目的の抗体ポリペプチドをコードする2つ以上の r A A V を含み得る。中和 H I V - 1 について特に、いくつかの抗 H I V - 1 抗体ポリペプチドの発現および分泌を生じる r A A V 混合物の投与は、ウイルスの中和を増加させ得る。投与は先行し、同時にかまたは引き続き A R T が施され得る。

40

## 【0027】

本発明の組成物は、薬学的に受容可能なキャリア中に r A A V を含む。この組成物はまた、賦形剤およびアジュバントのような他の成分を含み得る。受容可能なキャリア、賦形剤およびアジュバントは、レシipient に対して無毒性であり、好ましくは、使用される投薬量および濃度では不活性である。このようなものとしては、緩衝液（例えば、リン酸

50

緩衝液、クエン酸緩衝液または他の有機酸緩衝液)；抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸)；低分子量ポリペプチド；タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン)；親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン)；アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン)；単糖、二糖および他の炭水化物(グルコース、マンノースまたはデキストリンが挙げられる)；キレート化剤(例えば、EDTA)；糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール)；塩形成対イオン(例えば、ナトリウム)；および/または非イオン性界面活性剤(例えば、Tween、pluronicまたはポリエチレングリコール(PEG))が挙げられる。

**【0028】**

10

本発明の方法において投与されるrAAVの力価は、例えば、特定のrAAV、投与の様式、処置の目標、標的化される個体および細胞型に依存して変化し、当該分野の標準的な方法によって決定され得る。

**【0029】**

インビボまたはインビトロで標的細胞にrAAVを形質導入する方法は、本発明によって企図される。インビボ方法は、本発明のrAAVを含む有効量の組成物を、rAAVの投与を必要とする動物(人間を含む)に投与する工程を包含する。この用量がウイルスによる感染または慢性疾患状態の発症の前に投与される場合、投与は予防的である。この量がウイルスによる感染または慢性疾患状態の発症の後に投与される場合、投与は治療的である。有効量とは、処置される感染または疾患状態に関する少なくとも1つの症状を緩和(排除または減少)し得るのに十分な用量である。1つの実施形態において、症状の緩和は、疾患状態へのウイルス感染の進行を妨げる。別の実施形態において、症状の緩和は、疾患状態への進行または疾患状態の進行(ウイルス感染によるものであってもなくても)を防ぐ。ウイルス感染(急性および慢性のウイルス感染を含む)、細菌感染(急性、亜急性および慢性感染を含む)および処置される患者の慢性疾患状態としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：HIV-1感染、B型肝炎ウイルス感染、C型肝炎ウイルス感染、Epstein Barrウイルス感染、呼吸器合胞体ウイルス感染、骨髄炎、結核、慢性関節性リウマチ、炎症性大腸疾患、伝染性海綿状脳症(例えば、Creutzfeldt-Jakob病およびクールー)、Gerstmann-Strausler-Scheinker症候群、致死性家族性不眠症、Alpers症候群および癌。この方法において、感染または疾患状態に関連するタンパク質またはペプチドと特異的に反応する抗体ポリペプチドをコードするrAAVが投与される。有効量の組成物の投与は、当該分野で標準的な経路(例えば、非経口、静脈内、経口、頬側、経鼻、経肺、脳内、骨内、眼内、経直腸または経膈によってであり得る。本発明のrAAVのAAV成分の投与経路および血清型(特に、AAV ITRおよびキャプシドタンパク質)は、処置される感染および/または疾患状態、ならびに抗体ポリペプチドを発現する標的細胞/組織を考慮して、当業者によって選択および/または適合され得る。

20

30

**【0030】**

特に、本発明のrAAVの実際の投与は、rAAV組換えベクターを動物の標的組織内に輸送する任意の物理的な方法を用いて達成され得る。簡単にrAAVをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることが、筋肉組織での発現に有用なビヒクルを提供するのに十分であることが示されており、(DNAを分解する組成物が通常の様式でベクターを妨害するが)ベクターと同時に投与され得るキャリアまたは他の成分についての制限は知られていない。rAAVのキャプシドタンパク質は、rAAVが筋肉のような目的の特定の標的組織に標的化されるように改変され得る。薬学的組成物は、注射用処方物としてか、または局所用処方物として経皮輸送によって筋肉へと送達されるように調製され得る。筋肉内注射および経皮輸送の両方についての多数の処方物がこれまでに開発されており、本発明の実施において使用され得る。rAAVは、投与および扱いを容易にするために任意の薬学的に受容可能なキャリアと共に使用され得る。

40

**【0031】**

50

筋肉内注射の目的のために、ゴマ油もしくはピーナッツ油のようなアジュバント中、または、プロピレングリコール水溶液中の溶液、ならびに滅菌水性溶剤が使用され得る。このような水性溶剤は、必要な場合緩衝化され得、そして、液体賦形剤がまず生理食塩水もしくはグルコースで等張にされる。遊離酸としての r A A V 溶液 ( D N A は酸性リン酸基を含む ) または薬学的に受容可能な塩が、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適度に混合された水中で調製され得る。r A A V の分散物はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびこれらの混合物中、ならびに油中に調製され得る。保存および使用の通常の条件下にて、これらの調製物は、微生物の増殖を防ぐために保存剤を含む。この関係で、使用される滅菌水性媒体は全て、当業者に周知の標準的な技術によって容易に入手可能である。

10

**【 0 0 3 2 】**

注射用途に適切な薬学的形態としては、滅菌水溶液または滅菌分散物、および滅菌注射用溶液または滅菌注射用分散物の即席の調製物のための滅菌粉末が挙げられる。全ての場合において、この形態は、滅菌でなければならず、かつ、容易に注入能が存在する程度に流動性でなければならない。この形態は、製造および保存の条件下において安定でなければならず、かつ、微生物 ( 例えば、細菌および真菌 ) の汚染作用に対して保護されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール ( 例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど )、これらの適切な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング剤 ( 例えば、レシチン ) を使用することによって、分散剤の場合には必要とされる粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗生物質および抗真菌剤 ( 例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど ) によってもたらされ得る。多くの場合、等張化剤 ( 例えば、糖または塩化ナトリウム ) を含むことが好ましい。注射用組成物の延長した吸収は、吸収遅延剤 ( 例えば、一ステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン ) を使用することによってもたらされ得る。

20

**【 0 0 3 3 】**

滅菌注射溶剤は、上記で列挙した種々の他の成分と共に適切な溶媒中で必要量の r A A V を組み込むことによって調製され、その後、必要に応じて、フィルター滅菌される。一般に、分散物は、滅菌活性成分を塩基性の分散媒体および上に列挙したもののうち必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製され得る。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、本発明の好ましい方法は、真空乾燥技術および凍結乾燥技術であり、これらは、活性成分の粉末 + 前もって滅菌濾過したその溶液からの任意の追加の所望の成分を得る。

30

**【 0 0 3 4 】**

r A A V の形質導入はまた、インビトロで実行され得る。1つの実施形態において、所望の標的筋肉細胞が被験体から取り出され、r A A V で形質導入され、そして、被験体へと再び戻される。あるいは、これらの細胞が被験体において不適切な免疫応答を惹起しない場合、同系または異種の筋肉細胞が使用され得る。

**【 0 0 3 5 】**

形質導入された細胞を被験体に形質導入および再導入する適切な方法は、当該分野で公知である。1つの実施形態において、細胞は、例えば、適切な培地中で、r A A V を筋肉細胞と合わせることによってインビトロで形質導入され得、サザンブロットおよび/もしくは P C R のような従来技術を用いてか、または選択マーカーを用いて、目的の D N A を保有する細胞についてスクリーニングされ得る。次いで、形質導入された細胞は、薬学的組成物中に処方され得、そして、この組成物は、種々の技術によって ( 例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射および腹腔内注射によって、または、例えば、カテーテルを用いて平滑筋および心筋内に注射することによって ) 被験体に導入され得る。

40

**【 0 0 3 6 】**

本発明の r A A V を用いる細胞の形質導入は、抗体ポリペプチドの持続的な発現を生じ

50

る。従って、本発明は、動物、好ましくは人間に対して抗体ポリペプチドを発現する r A A V の送達方法を提供する。これらの方法は、組織（筋肉、肝臓および脳を含むがこれらに限定されない）を本発明の 1 つ以上の r A A V を用いて形質導入する工程を包含する。形質導入は、組織的特異的制御エレメントを含む遺伝子カセットを用いて行われ得る。例えば、本発明の 1 つの実施形態は、筋肉特異的制御エレメント（これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アクチン由来の制御エレメントおよび myo D 遺伝子ファミリー由来のようなミオシン遺伝子ファミリー由来の制御エレメント（Weintraubら., Science 251:761-766, 1991を参照のこと）、単球特異的エンハンサー結合因子 MEF-2（CserjesiおよびOlson, Mol. Cell Biol. 11:4854-4862, 1991）、ヒト骨格アクチン遺伝子由来の制御エレメント（Muscatら., Mol. Cell Biol. 7:4089-4099, 1987）、心臓アクチン遺伝子由来の制御エレメント、筋肉クレアチンキナーゼ配列エレメント（Johnsonら., Mol. Cell Biol. 9:3393-3399, 1989を参照のこと）およびマウスクレアチンキナーゼエンハンサー（mCK）エレメント、骨格速収縮（fast-twitch）トロポニンC 遺伝子、遅収縮（slow-twitch）心臓トロポニンC 遺伝子および遅収縮トロポニンI 遺伝子：虚血（hypozia）誘導性核因子由来の制御エレメント（Semenzaら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5680-5684, 1991）、ステロイド誘導性エレメントおよび糖質コルチコイド応答性エレメント（GRE）を含むプロモーター（MaderおよびWhite, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5603-5607, 1993を参照のこと）ならびに他の制御エレメント）によって指向される筋肉細胞および筋肉組織を形質導入する方法を提供する。

#### 【0037】

筋肉組織は、インビボでの遺伝子送達および遺伝子治療の魅力的な標的である。なぜならば、筋肉組織は、生命の維持に必要な器官でなく、かつアクセスしやすいからである。本発明の方法における r A A V の筋肉細胞および組織への送達を実施するために、単鎖抗体（scFv）または Fab 誘導体の使用が、筋肉組織からのより有効な抗体の分泌を促進するために企図される。本発明により企図される単鎖抗体は、HIV-1 中和単鎖抗体 X5 であり、この抗体の DNA およびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 20 および 21 に示される。さらに、代替的な血清型（例えば、AAV-1 および AAV-5）に基づく r A A V は、AAV-2 よりも効率的に骨格筋細胞を形質導入し得る。

#### 【0038】

r A A V は、高い効率で筋肉細胞または筋肉組織を形質導入し、種々の導入遺伝子の長期間の発現を指示することが示されている。このシステムの柔軟性のために、軽鎖および重鎖抗体遺伝子が単一の r A A V に組み込まれ得、次いで、抗体を発現する r A A V がインビボで筋肉を形質導入するのに使用され得ることが企図される。本発明は、形質導入した筋繊維由来の生物学的に活性な抗体ポリペプチドの持続性の発現を企図する。

#### 【0039】

「筋肉細胞」または「筋肉組織」は、例えば、消化管、膀胱および血管ならびに心臓からの任意の種類（骨格筋、平滑筋を含む）由来の細胞または細胞群を意味し、体の任意の領域から切除される。このような筋肉細胞（例えば、筋芽細胞、筋細胞、筋管、心筋細胞および心筋芽細胞）は、分化していても未分化であってもよい。筋肉組織が容易に循環系にアクセス可能であるので、インビボで筋肉細胞および組織により産生および分泌されたタンパク質は、理論的には、全身送達のために血流に入り、それによって、筋肉からの持続性の治療レベルのタンパク質分泌を提供する。

#### 【0040】

用語「形質導入」は、インビボまたはインビトロのいずれかで、レシピエントの細胞による機能的な抗体ポリペプチドの発現を生じる本発明の複製不全 r A A V を介する、レシピエントの細胞への抗体ポリペプチド DNA の送達をいうのに使用される。

#### 【0041】

H I V - 1 に指向する抗体が、ウイルスのレセプターへの結合を阻害することによってウイルスを中和し得ることが知られている。本発明は、ウイルスを中和する抗体ポリペプチドをコードする本発明の r A A V の有効量をそれを必要とする患者に投与する方法を提供する。本発明に従う中和は、当該分野で公知のインビトロまたはインビボのアッセイによって測定される、主要なウイルス単離体の感染の減少である。複数のアッセイが当該分野で公知である。中和は、以下のうちの1つ以上を包含し得る：ウイルスの細胞上のレセプターとの相互作用をブロックするウイルスの表面上の抗原への抗体の結合、補体媒介性のウイルスの溶解および/またはファゴサイトーシスを生じるウイルスの表面上の抗原への抗体の結合、F c 媒介性のエフェクター系の活性化を生じるウイルスに感染した細胞表面上の抗原への抗体の結合、ならびに抗体依存性の細胞傷害性 ( A D C C ) または補体依存性の細胞傷害性による感染細胞の溶解/排除、ウイルスの複製の阻害を生じるウイルスに感染した細胞表面上の抗原への抗体の結合、感染細胞からのウイルスの放出の阻害を生じるウイルスに感染した細胞表面上の抗原への抗体の結合、ならびにウイルスの細胞-細胞伝達の阻害を生じる細胞表面上の抗原への抗体の結合。細胞内免疫による中和がまた企図される。さらに、細菌の中和が企図される。

10

## 【 0 0 4 2 】

中和は、患者からのウイルスもしくは細菌の排除を生じ得(すなわち、殺菌)、または、ウイルスもしくは細菌によって生じる疾患状態の進行を遅延し得る。1つの実施形態において、本発明の方法は、H I V - 1 中和抗体ポリペプチドをコードする本発明の r A A V の有効量の投与を含み、H I V - 1 に感染した患者の A I D S への進行を防ぐ。好ましい方法は、個体において以下のうちの1つ以上を生じる：ウイルス負荷の減少、低ウイルス負荷の維持、C D 4 陽性 T 細胞の増加、C D 4 陽性 T 細胞の安定化、日和見感染症の発症または重篤度の減少、悪性腫瘍の発症の減少および細胞媒介性免疫の欠損に代表的な症状の発症または重篤度の減少。上述のものは、当該技術に従って、各々、A I D S を進行しているかまたは A I D S に進行する傾向にある個体と比較される。

20

## 【 0 0 4 3 】

本明細書中に記載されるように(実施例5を参照のこと)、有意なレベルのH I V - 1 中和活性が、抗H I V - 1 モノクローナル抗体 I g G 1 b 1 2 を発現する本発明の r A A V ベクターの単回筋肉内投与後6ヶ月にわたるマウスの血清において見出される。このアプローチは、「免疫」の前に抗体の親和性および特異性を前もって決定させ、H I V エンペロープタンパク質に対する活性化体液性免疫応答の必要性を回避する。

30

## 【 0 0 4 4 】

( 詳細な説明 )

以下の実施例は、本発明を例示する。実施例1は、抗体ポリペプチド発現のための二重プロモーターの r A A V の構築を記載し、実施例2は、r A A V 産生を記載し、実施例3は、r A A V を形質導入したマウスにおける循環 I g G <sub>1</sub> の産生を記載し、実施例4は、筋肉由来の I g G 1 b 1 2 によるH I V - 1 の中和活性を記載し、そして、実施例5は、筋肉における r A A V の残留性および I g G 1 b 1 2 の産生を記載する。実施例6は、抗体ポリペプチド発現のための単一プロモーターの r A A V の構築を記載し、実施例7はマカクへの r A A V 投与を記載し、そして、実施例8は、ヒトへの r A A V 投与を記載する。実施例9は、ウイルス感染に有用なものの以外の抗体ポリペプチドをコードする r A A V を含む、本発明において有用な r A A V を記載する。

40

## 【 実施例 】

## 【 0 0 4 5 】

( 実施例 1 )

( 抗体発現のための二重プロモーターの r A A V の構築 )

標的筋肉細胞内に効率のよい抗体発現を達成するために、二重プロモーターの r A A V を構築して、同じ形質導入した細胞内に重鎖および軽鎖タンパク質の、最適な同時発現を生じた。図1に示すように、得られた二重プロモーターの r A A V は以下の特徴を有した：( 1 ) r A A V ベクター ( h C M V プロモーター / エンハンサー および ヒト E F 1 -

50

プロモーター)において、骨格筋内で活性な2つの構成的プロモーター；(2)ベクターに組み込まれ、プロモーターエレメントまたは重鎖および軽鎖コード配列の迅速な置換を可能にする、いくつかの固有の8塩基対制限酵素部位；(3)IgG1b12の重鎖および軽鎖のリーダーペプチド配列に指向性の変異誘発を行い、インフレイムの抗体遺伝子クローニングを促進する固有の制限部位(重鎖リーダーについてMluI、そして軽鎖リーダーについてBssHII)を導入した；(4)RT-PCRによりIgG1b12重鎖イントロンを取り除き、ベクターサイズを減らし、野生型AAVのパッケージング制限内に残す；ならびに(5)可能性のあるプロモーター干渉を減少するための第1の発現カセットの3'側の強力な転写終止部位。最近、安定な産生細胞株アプローチ(Clarkら、Hum. Gene Ther. 6:1329-1341, 1995)を用いて、高力価のrAAV/IgG1b12ベクター産生を可能にするために、rAAV/IgG1b12プラスミドベクター配列を、以前に記載されたように、またAAV-2 rep-capヘルパー配列およびネオマイシン耐性遺伝子を有する、3部からなる長いプラスミド(pAAV/IgG1b12/rep-cap/neo tk)(Clarkら、Hum. Gene Ther. 6:1329-1341, 1995)にクローニングした。次いで、この3部からなるプラスミドを用いて、最適なHeLaベースのrAAV/IgG1b12産生細胞株(CE71)を作製した。

#### 【0046】

ヒトモノクローナル抗体IgG1b12の軽鎖および重鎖に対するコード配列は、プラスミドpDR12由来であり、本明細書中でそれぞれ配列番号14および16にて示す。IgG1b12の重鎖および軽鎖に対する得られたアミノ酸配列を、本明細書中で、それぞれ配列番号15および17として示す。IgG1b12およびプラスミドpDR12の単離は、Burtonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137, 1991およびScience 266:1024-1027(1994)に記載されている。

#### 【0047】

続いて、二重プロモーターのrAAVクローニングプラスミドpAAV/IgG1b12を以下のようにして構築した。まず、プラスミドpCMV/(Clontech)をPstIで消化して2.7kbのベクタープラスミドDNAフラグメントを単離し、自己同士で再度連結し、アンピシリン耐性ベクター(pB)を作製した。次いで、PCRを用いて、プラスミドpCMV/P由来のhCMVプロモーター/エンハンサーおよびSV40イントロン(808bp)を増幅し、PCRを以下のプライマーを用いて実施した：CMV 順方向：TCTAGAAATTCCTTAATAAGTCGTACATAACTTACGG(配列番号1)；CMV 逆方向：TCTAGAAATTCCTGCCCGGGCTACAATTC CGCAGCTTTTAG(配列番号2)。

#### 【0048】

得られたフラグメントをプラスミドpBの固有のEcoRI部位にクローニングしてプラスミドpCMVを作製した。これらのプライマーを、EcoRI部位が5'末端および3'末端で固有のPacIおよびSrfI部位に隣接するように設計した。その後、PCRを用いて、プラスミドpGT62lacZ(InVivoGen)を鋳型として、それぞれ以下のプライマーを用いて、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル(190bp)およびEF1-プロモーター(770bp)を、別々に増幅した：BGH 順方向：TTAGTGTCGCCGGGCACTCGCTGATCAGCCTCGACT(配列番号3)；BGH 逆方向：TAGTGTCCTCGAGAAATCCTCCCCCTTGCTGTC(配列番号4)；EF1 順方向：TTAGTGTCCTCGAGAACTAACA TACGCTCTCCA(配列番号5)；EF1 逆方向：GTGTCCTGCAGGTA TTTAAATGTGGGAATTCGTCTTAGGCCCTCCTACCGGTGATCTC(配列番号6)。その後、得られたPCRフラグメントをXhoIで消化し、再度連結して、BGH 順方向プライマーおよびEF1-逆方向プライマー(配列番号3および6)を用いて、第2ラウンドのPCRを行い、単一のDNAフラグメントを生成

した。これらのプライマーは、それぞれ、5'のSrfI部位ならびに3'のAvrII、EcoRI、SwaIおよびPstI部位を組み込んだ。この960bpのDNAフラグメントを固有のSrfIおよびPstI部位でプラスミドpCMVに一方方向でクローニングした。得られたプラスミド(pCMV/EF1)は、ここで、BGHポリアデニル化部位を有するCMVプロモーターおよび、引き続きEF1-プロモーターを保有した。

#### 【0049】

SV40ポリアデニル化シグナル(プラスミドpGT62lacZから単離した)を含む270塩基対のDNAフラグメントをプラスミドpCMV/EF1のEcoRI/SwaI部位に直接クローニングして、pCMV/EF1aを得た。プラスミドpDR12および単離した総RNAでCHO細胞を形質転換して、IgG1b12重鎖cDNA(1,463bp)を単離した。RNAをRT-PCRに供し、以下のプライマーを用いてpZeroベクター(Invitrogen)にクローニングした：重鎖cDNA 順方向：TACTTCGCCCGGGCTAATTCGCCGCCACCATGGAA(配列番号8)；重鎖cDNA 逆方向：TACTTCGCCCGGGCTTTAATTCATTTACCCGGAGACAGGG(配列番号9)。これらのプライマーは、隣接するSrfI部位を組み込み、この部位は、プラスミドpCMV/EF1aの固有のSrfI部位へのIgG1b12重鎖のクローニングを容易にした。プラスミドpCMV/HC/EF1aを得た。IgG1b12軽鎖遺伝子をプラスミドpDR12から直接PCRで増幅し、720bpの生成物を以下のプライマーを用いてプラスミドpZeroにクローニングした：軽鎖 順方向：CCTCACCTAGGCCACCATGGGTGTGCCACGCTGG(配列番号9)；軽鎖 逆方向：CCTCACCTAGGATTAACAATCTCTCCCTGTT(配列番号10)。軽鎖プライマーは、隣接するAvrII制限部位を組み込み、この部位は、軽鎖をプラスミドpCMV/HC/EF1aのAvrII部位にクローニングしてプラスミドpCMV/HC/EF1a/LCを生じるのに使用された。

#### 【0050】

次いで、部位指向性の変異誘発を用いて重鎖リーダーペプチド配列に固有のMluI制限部位を導入し、同じストラテジーを用いて軽鎖リーダーペプチド配列にBssHI部位を導入した。次いで、二重発現カセットを4.5kbのPacI/SrfI DNAフラグメントとして単離し、プラスミドpAAV/3-gal/rep-cap/neo tk(Clarkら、Hum. Gene Therapy 6:1329-1341, 1995)のAAV ITRの間にクローニングし、pAAV/IgG1b12/rep-cap/neo tkを作製した。この3部からなるプラスミドは、ネイティブのrep-cap AAVヘルパー配列ならびに安定な細胞株選択のためのネオマイシン耐性遺伝子を含む。

#### 【0051】

プラスミドpAAV/IgG1b12/rep-cap/neo tkおよびrAAV/IgG1b12のヒトIgG抗体を産生する能力は、いくつかの形質転換した細胞株(CHO-K1、HeLa、COS-7およびC2C12)を用いてインビトロでまず確認された。当該分野で標準の方法を用いたプラスミドトランスフェクションまたはrAAV/IgG1b12形質導入の後、細胞培養上清を、製造業者の指示に従って、1ヒトIgG サブタイプ1 ELISA Immunoassayキット(The Binding Site)を用いて分析した。このアッセイの感度は、2.9mg/mlのヒトIgGである。このアッセイは、細胞培養上清が検出可能なレベルのヒトIgGを含むことを決定した。

#### 【0052】

(実施例2)

(rAAV産生)

rAAV/IgG1b12を産生して、当該分野で公知の方法を用いて精製した(Clarkら、Hum. Gene Therapy 10:1031-1039, 1999)；

10

20

30

40

50

Clarkら、Hum. Gene Therapy 6:1329-1341, 1995)。簡単には、産生細胞株(CE71)を単離し、その後、HeLa細胞をプラスミドpAAV/IgG1b12/rep-cap/neo tkでトランスフェクションし、引き続きG418(700 µg/ml)で薬剤選択した。200個の別々の細胞株をスクリーニングし、その後、野生型のアデノウイルス5型(moi = 20)を感染させ、CE71を、細胞あたりの最も高いDNase耐性粒子(DRP)を産生するものとして同定した( $10^4$  DRP/細胞)。大規模のベクター産生のために、 $10^{10}$ 個のCE71細胞をCorning Cell Cube接着細胞バイオリクター中で増殖させ、引き続き、野生型のAd5(moi = 20)で感染させた。アデノウイルスのCPE(72時間)の発生の後、rAAV/IgG1b12を、以前に詳述されたようにヘパリンクロマトグラフィーを用いて粗CE71細胞溶解物から精製した(Clarkら、Hum. Gene Therapy 10:1031-1039, 1999)。Clarkら、1999に詳述されるように、Prism 7700 Taqman配列決定検出システム(PE Applied Biosystems)を使用するリアルタイムPCR法によって精製したrAAV/IgG1b12について、DRPの力価を決定した。rAAV/IgG1b12の定量に使用したプライマーおよび蛍光プローブセットは以下の通りである; CMV 順方向プライマー: 5' - TGGAAATCCCCGTGAGTCAA - 3' (配列番号11)、CMV 逆方向プライマー: 5' - CATGGTGATGCGGT TTTGG - 3' (配列番号12)、およびプローブ、5 - FAM - CCGCTATCCACGCCCATTTGATG - TAMRA - 3' (配列番号13)。

#### 【0053】

感染性のrAAV/IgG1b12の力価は、rAAV/IgG1b12ストックの限界希釈およびアデノウイルスの存在下でのrep-cap発現細胞株(C12)の感染を使用して決定した。終点力価決定を、以前に記載されたように、C12細胞において複製するrAAV/IgG1b12ゲノムの定量的PCR検出に基づいて行った(Clarkら、Gene Therapy 3:1124-1132, 1996)。これらの実験に用いたrAAV/IgG1b12の算出したDRP対IU比は28:1であった。

#### 【0054】

(実施例3)

(rAAVで形質導入したマウスにおける循環IgG<sub>1</sub>の産生)

免疫不全のRag1マウスの、両方の大腿四頭筋にrAAV/IgG1b12を接種した。Rag1マウスを用いて抗ヒトIgG応答を回避した。

#### 【0055】

全ての実験をChildren's Hospital Institutional Animal Care and Use Committeeに従って実施した。6週齢のRag-1マウス(C.129S7(B6)-Rag1<sup>tm1M<sup>o</sup>m</sup>)をThe Jackson Laboratory(Bar Harbor, Maine)から購入し、マイクロアイソレーターバリアの入れ物内に収容した。この研究は、16匹の動物からなった: 6匹は $5 \times 10^{11}$ のrAAV/IgG1b12のDNase耐性粒子(DRP)を受け; 6匹は、 $5 \times 10^{10}$ のDRPを受け; 2匹は - グルクロニダーゼを発現する無関係のrAAVベクター(rAAV/GUS、 $4 \times 10^{11}$  DRP)を受け; そして、2匹にはPBS賦形剤を与えた(ベクターDNA分析のためのみに使用した)。

#### 【0056】

チレタミンHCl/ゾレザパムHCl(Telazol, Ft. Dodge, IA)を筋肉内注射してマウスを麻酔にかけた。大腿にわたって5mmの皮膚切開を行い、50 µlのウイルス頭濁液またはPBSを、28ゲージ針を用いて、筋肉の長軸に沿って大腿四頭筋に注射した。注射手順に起因する副作用は、いずれのマウスにおいても特筆すべきものでなかった。麻酔下で後眼窩洞から血液サンプルを採取した。屠殺するとき、大腿四頭筋全体を摘出して、横断面に沿って二等分し、非架橋固定液(Histochoice, Amresco, Solon, OH)で半分を固定してパラフィンで包埋し、他の半分

を、後のDNA分析のために液体窒素で急速凍結した。脛骨の外側の筋肉をコントロール組織として採取した。

【0057】

全ての生存している11匹のrAAV/IgG1b12マウスにおいて、接種後6週間でヒトIgG<sub>1</sub>を検出した；1匹は無関係の原因で2週間で死亡した。平均すると、高用量のrAAV/IgG1b12を受けた動物は、低用量を受けた動物よりも7~28倍高いIgG<sub>1</sub>を有した。最大IgG<sub>1</sub>濃度は、注射後12週で観察され、次いで、先の3ヶ月にわたってプラトーに達した。高用量の動物の血清の大部分は、常に4~5μg/mlの間のヒトIgG<sub>1</sub>を有し、最大レベルは8μg/mlを超えた。低用量の群において、抗体レベルは、ベクターの接種後20週間、増加し続け、0.5~1.0μg/mlの範囲の循環抗体レベルを有した。 10

【0058】

いくつかの血清をまた、抗HIV gp120終点ELISA力価を決定するためにアッセイした。抗HIV gp120 ELISAを、以下のようにして実行した。Immulon 4免疫アッセイプレート(Dynatech)を、4で16時間、炭酸塩緩衝液(BupH, Pierce, Rockford, IL)中に希釈したチャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞(Quality Biological, Gaithersburg, MD)で産生した組換えHIV-1<sub>LAI</sub> gp120でコートした(100ng/ウェル)。抗原を除去し、ウェルをBlotto(1xPBS中5%のスキム乾燥ミルク pH7.4)中1%の正常ヤギ血清を用いて、25で1時間ブロッキングした。マウス血清をPBS中0.1%(v/v)のTriton-X 100に希釈して、30分間インキュベートし、次いで、PBS中0.1%(v/v)のTriton-X 100に浸漬することで5回洗浄した。ヤギ抗ヒトIgG<sub>1</sub> HRP結合体化2次抗体(1:5,000)を1時間添加した(Pierce, Rockford, IL)。比色定量(colorometric)基質である3,3',5,5'テトラメチルベンジジン(TMB)を添加し、30分後に1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止した。両方のELISAアッセイを、Perkin-Elmer HTS 7000プレートリーダーにて450nmで読んだ。終点力価をOD<sub>450</sub>値を得る血清希釈の逆数を取って導き、この値は、対応する抗原を含まないコントロールのウェルよりも少なくとも2倍高かった。 20 30

【0059】

16週で4倍より高い用量を受けた動物から採取した血清の限界希釈は、終点力価が1:800~1:3,200の範囲であることを明らかにした。これらのデータは、筋肉がgp120結合特異性を保持するIgG1b12を分泌することと一致した。

【0060】

(実施例4)

(筋肉由来のIgG1b12はHIV-1を中和する)

IgG<sub>1</sub>およびgp120 ELISAのデータがインビボでの抗体発現を確認したが、これらのアッセイは、分泌されたIgG1b12がHIV-1を中和する能力を保持するかどうかには取り組んでいなかった。したがって、6匹の高用量の動物からの20週の血清サンプルを、MT-2細胞殺傷アッセイを用いてTCLA株HIV-1 IIBに対する中和活性について分析した。これらのアッセイは、Finterニュートラルレットを利用し、Herzogら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5804-5809, 1997に記載されるように生存細胞を定量した。力価を50%の細胞がウイルス誘導性の殺傷から保護される血清希釈の逆数として報告した。この50%終点は、このアッセイにおけるp24 Gag抗原合成の90%以上の減少に一致する(Buresら、AIDS Res. Hum. Retroviruses 16: 2019-2035, 2000を参照のこと)。SHIV-89.6の中和を、マイトジェンで刺激したヒト末梢血単核細胞(PBMC)において、Buresら(前出)に記載されるp27 Gag抗原合成の減少を用いて測定した。ウイルスストックをH9細胞(HIV- 40 50

1 I I I B ) またはヒト P B M C ( S H I V - 8 9 . 6 ) のいずれかで作製した。

【 0 0 6 1 】

6 匹中 5 匹の動物からの血清は、以下の表 1 に記載するように検出可能な中和活性を有した。

【 0 0 6 2 】

( 表 1 . H I V - 1 I I I B に対する血清の中和力価 )

【 0 0 6 3 】

【 表 1 】

マウス <sup>a</sup>	注射後の週 (力価) <sup>b</sup>		予想された IgG1b12 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>c</sup>	観察されたヒト IgG <sub>1</sub> 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>d</sup>
	0	20		
RA1	< 20	93	6.7	5.1
RA2	< 20	56	4.0	5.9
RA3	< 20	55	4.0	6.0
RB1	< 20	44	3.2	5.3
RB2	< 20	47	3.4	4.0
RB3	< 20	< 20	0.0	2.8

10

20

<sup>a</sup> 各マウスに、四頭筋に単一用量 ( $5 \times 10^{11}$  DRP) の r A A V / I g G 1 b 1 2 を与えた。

【 0 0 6 4 】

<sup>b</sup> 抗体媒介性の中和を、M T - 2 細胞殺傷性アッセイにおいて測定した。力価は、50%の細胞がウイルス誘導性の殺傷から保護される血清希釈の逆数であり、これは、p 2 4 G a g 抗原合成の90%以上の減少に一致する。

30

【 0 0 6 5 】

<sup>c</sup> 観察された中和力価を達成するために必要な精製 I g G 1 b 1 2 の濃度。

【 0 0 6 6 】

<sup>d</sup> 血清におけるヒト I g G<sub>1</sub> の実際の濃度。

【 0 0 6 7 】

これらのデータを拡張するために、ほぼ最初の ( p r i m a r y - l i k e ) H I V - 1 単離体 ( H I V 8 9 . 6 e n v を含む S H I V - 8 9 . 6 ) を中和する、マウス血清の能力もまた試験した。注射後 1 6、2 0 および 2 4 週に、中和活性を血清プールで観察した ( 表 2 ) ; 用量が有限であるので、血清をプールした。これらのデータは、筋肉起源の I g G 1 b 1 2 が T C L A および最初の H I V - 1 単離体の両方を中和する予想された能力を保持することを示した。

40

【 0 0 6 8 】

( 表 2 . S H I V 8 9 . 6 に対する血清の中和力価 )

【 0 0 6 9 】

【表 2】

試験サンプル <sup>a</sup>		p27 (pg/ml)	% 減少 <sup>b</sup>
希釈		1725	0
IgG1b12 (4 µg/ml)		89	95
プールした マウス血清 (注射後の 週)	0	711	59
	16	225	87
	20	326	81
	24	527	69

10

<sup>a</sup> マウス R A 1、R A 2、R A 3、R B 1、R B 2、および R B 3 由来の血清からなる、前免疫（時間 0）されたプール。これらの同じマウス由来の血清を、示された回収日（注射後 16 週、20 週または 24 週）でプールした。全てのプールを 1 : 4 希釈でアッセイした。

【0070】

<sup>b</sup> p 27 抗原における減少 % を血清の不在下での p 27 合成の量に対して計算した。

20

【0071】

(実施例 5)

(筋肉における r A A V ベクターの残存性およびタンパク質生成)

筋肉が抗体産生部位であったという証拠を得るために、接種後 24 週で摘出した筋肉組織において、r A A V ゲノムの残存性およびヒト I g G タンパク質の発現をアッセイした。r A A V / I g G 1 b 1 2 ベクター DNA の残存性を、リアルタイム定量的 P C R を用いて分析した。各動物からの約 50 % の左右の四頭筋をゲノム DNA 単離のために用い、C M V プロモーターに特異的な P C R プライマー / プロブ対を用いる T a q m a n P C R に供した。表 3 に示すように、全ての接種された筋肉組織は、かなりのレベルのベクター DNA を保有し、これは、核あたり 0 . 4 ~ 1 0 コピーの間の範囲であった。平均すると、高用量を受けていた動物からの筋肉は、低用量の動物からの筋肉と比較して、筋肉あたり 5 倍多いベクター DNA を保有した。

30

【0072】

(表 3 . マウスの筋肉におけるベクター DNA の残存性)

【0073】

【表 3】

ベクター/用量 <sup>a</sup>	マウス	ゲノムコピー/核 <sup>b</sup>
PBS	RF3	0.003
	RF4	0.012
rAAV/IgG1b12 5 X 10 <sup>10</sup>	RC1	9.0
	RC2	5.5
	RC3	0.5
	RD2	1.2
	RD3	4.5
rAAV/IgG1b12 5 X 10 <sup>11</sup>	RA1	42.5
	RA2	3.2
	RA3	20.0
	RB1	27.1
	RB2	0.4
	RB3	19.3

<sup>a</sup> 用量はDNase耐性粒子(DRP)として測定される;材料および方法を参照のこと。

## 【0074】

<sup>b</sup> 値は、rAAV注射後の四頭筋において観察される核あたりのrAAVゲノムの平均を示す。60ngの筋肉DNA(10,000核当量)を、CMVプライマー/プローブセット(配列番号1および2)を用いる定量的Taqman PCRによって分析した。

## 【0075】

接種された筋肉内のインサイチュ抗体発現を示すために、ヒトIgG<sub>1</sub>についての免疫ペルオキシダーゼ染色を、パラフィン包埋した筋肉組織について行った。ヒトIgG<sub>1</sub>重鎖(Fc特異的)検出のための筋肉組織を、連続薄切し(6μm)、連続的なエタノール浴を伴うAmericlear中にて脱パラフィンし、引き続いて、1xPBS+0.2% Tween 20で洗浄した。まず、組織切片を製造業者の指示書に従って、Antigen Retrieval Citra Solution(BioGenex)を用いて処理し、次いで、Power Block試薬(BioGenex)を用いて10分間ブロッキングした。1:100希釈のポリクローナルウサギ抗ヒトIgG抗血清(DAKO, A0424)を切片とともに4℃で18時間インキュベートした。十分に洗浄した後、ビオチン化抗ウサギ二次抗体(1:100希釈;Vector Laboratories)を添加し、30分間インキュベートした。製造業者の指示書に従ってアビジン/ビオチン-ペルオキシダーゼ結合体(VECTASTAIN Elite ABC-ペルオキシダーゼ, Vector Laboratories)を用いて抗原を可視化した。AECペルオキシダーゼ基質(DAKO)中で5分間切片をインキュベートして発色させた。

## 【0076】

全ての高用量動物は、分泌されたタンパク質のER/ゴルジ局在化に一致する特定の筋繊維の明らかな、しばしば点状の免疫染色を示した。コントロールのrAAV/GUS四

10

20

30

40

50

頭筋組織は、ヒト IgG<sub>1</sub> の存在についてネガティブであった（動物 RF1、RF2）。

【0077】

（実施例6）

（抗体発現のための単一プロモーターの rAAV の構築）

ヒト CMV の最初期のプロモーター/エンハンサー、SV40 小 T - 抗原イントロン、X5 重鎖可変領域コード配列、(Gly<sub>3</sub> Ser)<sub>4</sub> リンカー、X5 軽鎖可変領域コード配列および SV40 ポリアデニル化部位を含む遺伝子カセットに隣接する AAV ITR を含む rAAV ゲノムを、標準の DNA 操作技術を用いて構築した。この遺伝子カセットは、1 本鎖の X5 抗体ポリペプチド (ScFvX5) をコードした。図 2 を参照のこと。AAV ITR を、McCarty ら、Gene Therapy, 8, 1248012 54, 2001 に記載されるように改変し、rAAV ゲノムを 2 本鎖の自己相補性 DNA としてウイルス粒子にパッケージングさせた。

10

【0078】

遺伝子カセットの ScFvX5 を産生する能力を、インビトロにて HeLa 細胞を用いて確認した。この遺伝子カセットを、裸の DNA として HeLa 細胞に一過的にトランスフェクトした。ScFvX5 をトランスフェクトされた細胞によって産生し、当該分野の標準的な方法によって HIV-1 gp120 に結合することを示した。

【0079】

rAAV/ScFvX5 ゲノムを、AAV 血清型 1 キャプシドにパッケージングすること以外は、本質的に上記の実施例 2 に記載した方法によってパッケージングし、次いで、精製した。得られた rAAV/ScFvX5 を、上記実施例 3、4 および 5 に記載したマウスモデルにおいて、および、以下の実施例 6 に記載するマカクモデルにおいて試験し得る。

20

【0080】

（実施例7）

（マカクへの rAAV 投与）

マカクサルの SIV での感染は、AIDS 様疾患を誘導し得る。これらの感染された動物は、ヒトの HIV-1 での感染およびヒトにおける AIDS の発症についてのモデルとして使用され得る。特に、SIV ウイルスに感染したマカクは、ヒトの AIDS に特徴的な症状（例えば、CD4 陽性 T 細胞の枯渇、日和見感染症、神経性疾患および悪性腫瘍などの発症）を発症する。さらに、SIV は、投与経路（例えば、経直腸および経膺）によって動物に感染し得、ヒトにおいて HIV の伝染を再生する。例えば、Nathanson, International Journal of STD & AIDS, 9 (補遺 1): 3-7 (1998) を参照のこと。従って、SIV/マカクモデルは、AIDS ワクチンの開発および単為生殖に関する主要な動物モデルである。例えば、Hora, Cell, 110: 135-138 (2002) (サルの実験で用いられたストラテジーの成功が、「多数の候補ワクチンを治験に駆り立てた」ことを考察している) を参照のこと。grants1.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFAMH-99-009.html (1999年1月29日) (「ヒトの AIDS が神経病を発症させることの根底にあるメカニズムを解読および理解を補助するための AIDS の SIV モデルの重要性」を考察している) もまた参照のこと。

30

40

【0081】

さらに、サルにおけるチャレンジ研究が、免疫不全ウイルスおよび/またはウイルスの感染から生じる疾患に対する保護を確立するため、そして、ワクチンまたはワクチンの概念がヒトにおける用途に対しての見込みを有するか否かを確立する手段として使用され得る。Schultz, AIDS Research and Human Retroviruses, 14 (3): S261-S263 (1998) を参照のこと。

【0082】

従って、マカクモデルは、rAAV/IgG1b12 および/または他の HIV-1 中和抗体をコードする rAAV の投与の有利な効果を確認するために使用され得る。例えば

50

、rAAV/IgG1b12は、チャレンジHIV-1ウイルス(例えば、SIVsm/E660(通常用いられるチャレンジウイルス以外の、よりストリンジェントなチャレンジを提示するマカクにおいてよりAIDS様疾患を誘導するウイルス株))での感染の前、または感染後に、マカクへ1回以上の筋肉内注射によって投与される。中和抗体レベルをPolacinoら、J. Virol., 73(10): 8201-8215(1999)に記載されるように、種々の時点で測定する。

【0083】

rAAVの投与は、SIVに曝露したマカクにおいて、以下のうちの1つ以上を生じる：ウイルス負荷の減少、低ウイルス負荷の維持、CD4陽性T細胞の増加、CD4陽性T細胞の安定化、日和見感染症の発症または重篤度の減少、悪性腫瘍の発症の減少、および細胞媒介性免疫の欠損に代表的な症状の発症または重篤度の減少。上述のものは、当該技術に従って、各々、AIDS様疾患が進行しているか、またはAIDS様疾患を進行する傾向にあるマカクと比較する。

10

【0084】

(実施例8)

(ヒトへのHIV-1抗体ポリペプチドをコードするrAAVの投与)

rAAV/IgG1b12、rAAV/ScFvX5、他のHIV-1抗体ポリペプチドをコードするrAAV(または、以下の2つ以上の混合物)を、HIV-1による感染に感受性の個体または、HIV-1により感染した個体に投与され、AIDSの進行を防ぐかまたは遅延する。

20

【0085】

例えば、1回以上のrAAVの筋肉内注射が個体に投与される。rAAVによってコードされる抗体ポリペプチドの産生レベルを、当該分野の標準的な技術によってモニタリングする。AIDSに進行する可能性を、当該分野で標準的な技術による、HIV-1ウイルス負荷およびCD4陽性T細胞の測定によりモニタリングする。ウイルス負荷が高いほど、個体はAIDSを発症する傾向が高い。CD4陽性T細胞のカウントが少ないほど、個体がAIDSを発症する傾向が高い。

【0086】

rAAVの投与は、HIV-1に感染した場合の個体において、以下のうちの1つ以上を生じる：ウイルス負荷の減少、低ウイルス負荷の維持、CD4陽性T細胞の増加、CD4陽性T細胞の安定化、日和見感染症の発症または重篤度の減少、悪性腫瘍の発症の減少、および細胞媒介性免疫の欠失の代表的な状態の発症または重篤度の減少。上述のものを、当該技術に従って、各々、AIDSが進行しているかまたはAIDSに進行する傾向にある個体と比較する。

30

【0087】

(実施例9)

(他の抗体ポリペプチドをコードするrAAV)

他のrAAV(例えば、同種移植拒絶のための抗体ポリペプチドOrthoclone OKT3、PCTA補助剤としてのReopro、非ホジキンリンパ腫のためのRituxan、臓器拒絶のためのSimulect、慢性関節性リウマチおよびクローン病のためのRemicade、臓器拒絶のためのZenapax、RSV感染のためのSynagis、転移性乳癌のためのHerceptin、急性骨髄性白血病のためのMylotarg、慢性リンパ球白血病のためのCampath、非ホジキンリンパ腫のためのEvalinおよび慢性関節性リウマチのためのHumiraをコードするrAAV)を、本明細書中に記載される方法に従って、作製および使用し得る。これらは、記された感染または疾患状態のためのヒトの用途に適用され得る。

40

【0088】

本発明は、特定の実施形態観点から記載されているが、変更および改変が想起されることが当業者に理解される。従って、添付の特許請求の範囲に見えるような限定のみが、本発明に対して決定され得るべきである。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】図1は、pCMV/HC/EF1a/LCと命名された二重プロモーターのrAAVゲノムを示す。固有の制限部位を、図の上部に表示する。ゲノム成分を以下のように表示する：「HC」および「LC」は、それぞれ重鎖抗体遺伝子および軽鎖抗体遺伝子を示し、「CMVp」はヒトCMVの最初期のプロモーター/エンハンサーを示し、そして「I」はSV40小T-抗原イントロンを示す。抗体リーダー配列を「L」で表示し、そして「pA」は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化部位を示す。二次転写ユニットは、ヒト伸長因子-1（EF-1）プロモーターを含み、そして、HTLV-1型末端反復配列のRセグメントおよびU5配列（R-U5'）の部分を用いて、DNAおよびRNAの安定性を増強するように改変されている。このプロモーターはまた、I117イントロンを含み、これは、プラスミドpGT62LacZ（InvivoGen Inc.）由来である。軽鎖ポリアデニル化部位はSV40由来である。

10

【図2】図2は、ヒトCMVの最初期のプロモーター/エンハンサー（「CMV」と表す）、SV40小T-抗原イントロン（「SV40sd/sa」）、X5重鎖可変領域コード配列（「V<sub>H</sub>」）、(Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>リンカー（「linker」）、X5軽鎖可変領域コード配列（「V<sub>L</sub>」）およびSV40ポリアデニル化部位（「SV40polyA」）を含む遺伝子カセットを含むrAAV/X5ゲノムを示す。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Clark et al.  
 <120> ANTIBODY GENE TRANSFER AND RECOMBINANT AAV THEREFOR  
 <130> 28335/39282  
 <140> To be assigned  
 <141> Herewith  
 <150> US 60/371,501  
 <151> 2002-04-09  
 <160> 25  
 <170> PatentIn version 3.1 10  
 <210> 1  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> CMV forward primer  
 <400> 1  
 tctagaattc ttaattaag tcgttacata acttacgg 38  
 <210> 2  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence 20  
 <220>  
 <223> CMV reverse primer  
 <400> 2  
 tctagaattc tgcccgggct acaattccgc agcttttag 39  
 <210> 3  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> BGH forward primer 30  
 <400> 3  
 ttagtgtagc cgggcactcg ctgatcagcc tcgact 36  
 <210> 4  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> BGH reverse primer

<400> 4  
 tagtgtctcg agaatectcc cccttgctgt c 31

<210> 5  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> EF1 forward primer

<400> 5  
 ttagtgtctc gagaactaac atagctctc ca 32

<210> 6 10  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> EF1 Reverse primer

<400> 6  
 gtgtctgcag gtatttaaat gtgggaattc gtcttaggcc ctectaccgg tgatctc 57

<210> 7  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220> 20  
 <223> Heavy chain cDNA forward primer

<400> 7  
 tacttcgccc gggctaattc gccgccacca tggaa 35

<210> 8  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Heavy chain cDNA Reverse primer

<400> 8  
 tacttcgccc gggctttatt catttaccog gagacaggg 39 30

<210> 9  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Light Chain forward primer

<400> 9  
 cctcacctag gccaccatgg gtgtgccacg ctgg 34

<210> 10  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Light chain reverse primer  
  
 <400> 10  
 cctcacctag gattaacact ctcccctggt 30  
  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence 10  
  
 <220>  
 <223> CMV forward primer  
  
 <400> 11  
 tggaaatccc cgtgagtcaa 20  
  
 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> CMV reverse primer  
  
 <400> 12 20  
 catggtgatg cggttttgg 19  
  
 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Synthetic Probe  
  
 <400> 13 22  
 ccgctatcca cgcccattga tg  
  
 <210> 14 30  
 <211> 1431  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 14  
 atggaatgga gctgggtcctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactcccag 60  
 gttcagctgg ttcagtccgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttct 120  
 tgtcaggctt ctggatacag attcagtaac tttgtattc attgggtgcg ccaggccccc 180  
 ggacagaggt ttgagtggat gggatggatc aatccttaca acggaacaa agaattttca 240  
 gcgaagtcc aggacagagt cacctttacc gcggacacat ccgcgaacac agcctacatg 300

gagttgagga gcctcagatc tgcagacacg gctgtttatt attgtgcgag agtggggcca 360  
 tatagtggg atgattctcc ccaggacaat tattatatgg acgtctgggg caaagggacc 420  
 acgggtcatcg tgagctcagc ttccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaacctcc 480  
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 540  
 gaaccgggta cgggtgctcg gaactcaggc gccttgacca gggcggtgca caccttcccc 600  
 gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 660  
 agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 720  
 gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgccagca 780  
 cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc 840  
 atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtgggtgggg acgtgagcca cgaagacct 900  
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggcggc gtggagggtc ataatgcaa gacaaagccg 960  
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag 1020  
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggctctca acaaagccct cccagcccc 1080  
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg 1140  
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1200  
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1260  
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc 1320  
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1380  
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 1431

10

<210> 15  
 <211> 476  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe  
 35 40 45

Ser Asn Phe Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser  
 65 70 75 80

20

30

Ala Lys Phe Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln  
115 120 125

Asp Asn Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val  
130 135 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser  
145 150 155 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
165 170 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
225 230 235 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
245 250 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
260 265 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
275 280 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
290 295 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
305 310 315 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
325 330 335

10

20

30

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
340 345 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
355 360 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
370 375 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
385 390 395 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
420 425 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
435 440 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
450 455 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470 475

<210> 16  
<211> 708  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
atgggtgtgc ccactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60  
gagatcgttc tcacgcaggc tccaggcacc ctgtctctgt ctccagggga aagagccacc 120  
ttctctgta ggtccagtca cagcattcgc agccgcccgc tacgctggta ccagcacaaa 180  
cctggccagg ctccaaggct ggtcatacat ggtgtttcca atagggcctc tggcatctca 240  
gacaggttca ggggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagagtggag 300  
cctgaagact ttgcactgta ctactgtcag gtctatggtg cctcctcgta cacttttggc 360  
caggggacca aactggagag gaaacgaact gtgcctgcac catctgtctt catcttcccg 420  
ccatctgatg agcagttgaa atctgggact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480  
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtactcc 540  
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600

10

20

30

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660  
 ggccctgagat cgccccgcac aaagagcttc aacaggggag agtggttaa 708

<210> 17  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17

Met Gly Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ala Pro Gly Thr Leu Ser  
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser  
 35 40 45

Ile Arg Ser Arg Arg Val Arg Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Val Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser  
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Thr Arg Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr  
 100 105 110

Gly Ala Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys  
 115 120 125

Arg Thr Val Pro Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

10

20

30

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser  
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 18  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 18

10

Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ile Asn Tyr Tyr Trp Ser  
20 25 30

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Arg Pro Gln Trp Leu Gly His Ile  
35 40 45

Ile Tyr Gly Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser Arg Ile  
50 55 60

20

Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Arg Leu Asn  
65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala  
85 90 95

Ile Gly Val Ser Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp  
100 105 110

Gly Ser Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 19  
<211> 105  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 19

30

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Asn Leu Gly Trp  
20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala  
 35 40 45

Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe  
 65 70 75 80

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Arg Thr Phe Gly  
 85 90 95

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 20  
 <211> 840  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(840)  
 <223>

<400> 20  
 atg tgg tgg cgc ctg tgg tgg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg tgg 48  
 Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

ccc atg gtg tgg gcc gat att gtg ctg acg cag tct cca ggc acc ctg 96  
 Pro Met Val Trp Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu  
 20 25 30

tct ttg tct gca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag 144  
 Ser Leu Ser Ala Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

agt gtt agc agc ggc tcc tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggt cag 192  
 Ser Val Ser Ser Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 50 55 60

gct ccc agg ctc ctc atc tac ggt gca tcc acc agg gcc act ggc atc 240  
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile  
 65 70 75 80

cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc aca 288  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 85 90 95

atc ggc aga ctg gag cct gaa gat ctc gca gta tat tac tgt cag cag 336  
 Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 100 105 110

tat ggt acc tca ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aaa gtg gat atc 384  
 Tyr Gly Thr Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile  
 115 120 125

10

20

30

aaa cgt ggt ggc ggt ggc tcg ggc ggt ggc ggt tca ggt ggc ggt ggc 432  
 Lys Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140

tct aga tct tcc cag gtc cag ctt gtg cag tct ggg gct gag gtg aag 480  
 Ser Arg Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys  
 145 150 155 160

aag cct ggg tcc tcg gtg cag gtc tcc tgc aag gcc tct gga ggc acc 528  
 Lys Pro Gly Ser Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr  
 165 170 175

ttc agc atg tat ggt ttc aac tgg gtg cga cag gcc cct gga cat ggc 576  
 Phe Ser Met Tyr Gly Phe Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly  
 180 185 190

ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca tca aac tac 624  
 Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ser Asn Tyr  
 195 200 205

gca cag aag ttc cgg ggc aga gtc acg ttt acc gcg gac caa gcc acg 672  
 Ala Gln Lys Phe Arg Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Gln Ala Thr  
 210 215 220

agc aca gcc tac atg gag ctg acc aac ctg cga tct gac gac acg gcc 720  
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Thr Asn Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala  
 225 230 235 240

gtc tat tat tgt gcg aga gat ttt ggc ccc gac tgg gaa gac ggt gat 768  
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Phe Gly Pro Asp Trp Glu Asp Gly Asp  
 245 250 255

tcc tat gat ggt agt ggc cgg ggg ttc ttt gac ttc tgg ggc cag gga 816  
 Ser Tyr Asp Gly Ser Gly Arg Gly Phe Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 260 265 270

acc ctg gtc acc gtc tcc tca tga 840  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 275

<210> 21  
 <211> 279  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp 30  
 1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Ala Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Ser Val Ser Ser Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 50 55 60

10

20

30

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile  
65 70 75 80

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

Tyr Gly Thr Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile  
115 120 125

Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
130 135 140

Ser Arg Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys  
145 150 155 160

Lys Pro Gly Ser Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr  
165 170 175

Phe Ser Met Tyr Gly Phe Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly  
180 185 190

Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ser Asn Tyr  
195 200 205

Ala Gln Lys Phe Arg Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Gln Ala Thr  
210 215 220

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Thr Asn Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala  
225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Phe Gly Pro Asp Trp Glu Asp Gly Asp  
245 250 255

Ser Tyr Asp Gly Ser Gly Arg Gly Phe Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
260 265 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
275

<210> 22  
<211> 1446  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

10

20

30

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1446)  
 <223>

<400> 22  
 atg tgg tgg cgc ctg tgg tgg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg tgg 48  
 Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
  
 ccc atg gtg tgg gcc agg atc acg tta aag gaa tcg ggt cct ccg ctg 96  
 Pro Met Val Trp Ala Arg Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Pro Leu  
 20 25 30  
  
 gtg aaa ccc aca cag act ctc acg ctg acc tgt tcc ttc tct ggg ttc 144  
 Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe 10  
 35 40 45  
  
 tca ctg tcc gat ttt gga gtg ggt gta ggc tgg atc cgt cag ccc cca 192  
 Ser Leu Ser Asp Phe Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro  
 50 55 60  
  
 gga aag gcc cta gag tgg ctt gca atc att tat tgc gat gat gat aag 240  
 Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Ile Ile Tyr Ser Asp Asp Asp Lys  
 65 70 75 80  
  
 cgc tac agc cca tgc ctg aac acc aga ctc acc atc acc aag gac acc 288  
 Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Asn Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr  
 85 90 95  
  
 tcc aaa aat caa gtt gtc ctt gtc atg act agg gtg agt cct gtg gac 336  
 Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Val Met Thr Arg Val Ser Pro Val Asp 20  
 100 105 110  
  
 aca gcc acg tat ttc tgt gca cac agg agg ggc ccc acc acc ctg ttc 384  
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Thr Leu Phe  
 115 120 125  
  
 ggc gtg ccc atc gcc agg ggc ccc gtg aac gcc atg gac gtg tgg ggc 432  
 Gly Val Pro Ile Ala Arg Gly Pro Val Asn Ala Met Asp Val Trp Gly  
 130 135 140  
  
 cag ggc atc acc gtg acc atc agc agc gcc agc acc aag ggc ccc agc 480  
 Gln Gly Ile Thr Val Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 145 150 155 160  
  
 gtg ttc ccc ctg gcc ccc agc agc aag agc acc agc ggc ggc acc gcc 528  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala 30  
 165 170 175  
  
 gcc ctg ggc tgc ctg gtg aag gac tac ttc ccc gag ccc gtg acc gtg 576  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 180 185 190  
  
 agc tgg aac agc ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccc gcc 624  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 195 200 205  
  
 gtg ctg cag agc agc ggc ctg tac agc ctg agc agc gtg gtg acc gtg 672  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 210 215 220  
  
 ccc agc agc agc ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aac cac 720



aag tag  
Lys

1446

<210> 23  
<211> 481  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala Arg Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Pro Leu  
20 25 30

10

Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe  
35 40 45

Ser Leu Ser Asp Phe Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro  
50 55 60

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Ile Ile Tyr Ser Asp Asp Asp Lys  
65 70 75 80

Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Asn Thr Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr  
85 90 95

20

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Val Met Thr Arg Val Ser Pro Val Asp  
100 105 110

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Thr Leu Phe  
115 120 125

Gly Val Pro Ile Ala Arg Gly Pro Val Asn Ala Met Asp Val Trp Gly  
130 135 140

Gln Gly Ile Thr Val Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
145 150 155 160

30

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
165 170 175

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
180 185 190

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
195 200 205

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 210 215 220

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 225 230 235 240

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 245 250 255

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 260 265 270

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 275 280 285

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 290 295 300

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 305 310 315 320

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 325 330 335

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 340 345 350

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Glu  
 355 360 365

Lys Thr Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 370 375 380

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 385 390 395 400

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 405 410 415

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 420 425 430

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 435 440 445

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Asn His Glu  
 450 455 460

10

20

30

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 465 470 475 480

Lys

<210> 24  
 <211> 714  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(714)  
 <223>

10

<400> 24  
 atg cgc ccc acc tgg gcc tgg tgg ctg ttc ctg gtg ctg ctg ctg gcc 48  
 Met Arg Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15  
 ctg tgg gcc ccc gcc cgc gcc ggc gcc ctc caa ctg acc cag tct ccg tcc 96  
 Leu Trp Ala Pro Ala Arg Gly Ala Leu Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser  
 20 25 30  
 tcc ttg tct gca tct gtt gga gac aga atc acc atc act tgt cgg gca 144  
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 35 40 45  
 agt cag ggc gtt acc agt gct tta gcc tgg tat cga cag aag cca gga 192  
 Ser Gln Gly Val Thr Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 agt cct cct caa ctc cta atc tat gat gcc tcc tct tta gaa agt ggg 240  
 Ser Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly  
 65 70 75 80  
 gtc cca tcg agg ttc agc gcc agt ggt tct ggg acg gag ttc act ctc 288  
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu  
 85 90 95  
 acc atc agc acc ctg cgg cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa 336  
 Thr Ile Ser Thr Leu Arg Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110  
 caa tta cat ttt tac cct cac acc ttc gcc gcc gcc acc agg gtg gac 384  
 Gln Leu His Phe Tyr Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Asp  
 115 120 125  
 gtg agg cgg act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct 432  
 Val Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 130 135 140  
 gat gag cag ttg aaa tct ggg act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat 480  
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Val Cys Leu Leu Asn  
 145 150 155 160  
 aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc 528  
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 165 170 175

20

30

ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag 576  
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 180 185 190

gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac 624  
 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
 195 200 205

tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg 672  
 Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
 210 215 220

tcc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt taa 714  
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

10

<210> 25  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Met Arg Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Trp Ala Pro Ala Arg Gly Ala Leu Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser  
 20 25 30

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 35 40 45

20

Ser Gln Gly Val Thr Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Ser Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu  
 85 90 95

Thr Ile Ser Thr Leu Arg Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110

30

Gln Leu His Phe Tyr Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Asp  
 115 120 125

Val Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys  
 180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp  
 195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu  
 210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

10

20

【 1 】

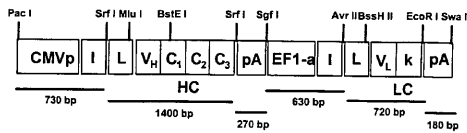


Figure 1

【 2 】

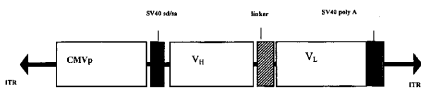


Figure 2

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N 15/02 (2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	C	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N	5/00	B	
<b>C 0 7 K 16/10 (2006.01)</b>	C 0 7 K	16/10		

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

(72) 発明者 クラーク, ケリー リード

アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 0 8 2, ウエスタービル, ウェッジウッド コート 2 6 1

(72) 発明者 ジョンソン, フィリップ アール. ジュニア

アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 0 5 4, ニュー アルバニー, ジョネル スクエア 7 8 7  
4

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA51 CA04 CA05 CA06 CA11 DA03 EA02 FA02 FA06  
FA10 GA11 GA18 HA03 HA08 HA14 HA17  
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01  
4B065 AA93X AA97Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA25 CA44  
4C084 AA13 NA13 NA14 ZB09 ZB33 ZC55  
4C085 AA03 AA38 BA69 BA80 BA90 BA91 BB07 BB11 BB17 CC07  
CC08 CC21 CC31 DD62 EE01 EE06 FF13  
4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 CA05 DA76 EA29 FA71 FA74