

(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2011-521663

(P2011-521663A)

(43) 公表日 平成23年7月28日(2011.7.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-512159 (P2011-512159)	(71) 出願人	506061716
(86) (22) 出願日	平成21年6月1日 (2009.6.1)		プロジェクト、デ、バイオメディシナ、シー
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月7日 (2011.2.7)		マ、ソシエダッド、リミターダ
(86) 国際出願番号	PCT/ES2009/070194		PROYECTO DE BIOMEDI
(87) 国際公開番号	W02009/147271		C I N A C I M A, S. L.
(87) 国際公開日	平成21年12月10日 (2009.12.10)		スペイン、エー31008パンプローナ (
(31) 優先権主張番号	P200801682		ナバラ)、アベニダ・ピオ・ドセ22番、
(32) 優先日	平成20年6月4日 (2008.6.4)		オフィシナ1
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)	(74) 代理人	100117787
			弁理士 勝沼 宏仁
		(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高容量アデノウイルスをパッケージングするための系

(57) 【要約】

本発明は、ヘルパーウイルスの使用を必要とせず、宿主細胞のゲノム内に、ウイルス粒子の制御、複製およびパッケージングに必要なアデノウイルス遺伝子を組み込むことを特徴とする高容量アデノウイルスベクターの新規な生産およびパッケージング(キャプシド封入)系に関し、これにより長期間生産系の安定性が改良される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 転写レギュレーターをコードするヌクレオチド配列を含んでなる第 1 の発現カセット；

(b) 制限エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなり、(a) で定義されたポリヌクレオチドによりコードされる転写レギュレーターにより活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第 2 の発現カセット
を含んでなる、ポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 2】

カセット (a) によりコードされている転写レギュレーターが、活性化可能な転写レギュレーターである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 3】

活性化可能な転写レギュレーター (a) が、GAL4 の DNA 結合ドメイン、ヒトプロゲステロン受容体のリガンド結合ドメインおよび NF- κ B p65 の活性化ドメインにより形成される、請求項 2 に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 4】

カセット (b) によりコードされている制限エンドヌクレアーゼが、I-SceI である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 5】

(a) 転写レギュレーターをコードするヌクレオチド配列を含んでなる第 1 の発現カセット；

(b) 制限エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなり、転写レギュレーター (a) により活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第 2 の発現カセット、および

(c) 選択されたアデノウイルス E1A タンパク質、またはアデノウイルス E1A および E1B タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、転写レギュレーター (a) により活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第 3 の発現カセット
を含んでなる、ポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 6】

第 2 および第 3 のカセットが反対方向に転写される、請求項 5 に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 7】

第 2 および第 3 のカセットを制御する転写のレギュレーター配列が、転写レギュレーター (a) と同じ結合部位を共有する、請求項 6 に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 8】

カセット (a) によりコードされている転写レギュレーターが、活性化可能な転写レギュレーターである、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 9】

活性化可能な転写レギュレーター (a) が、GAL4 の DNA 結合ドメイン、ヒトプロゲステロン受容体のリガンド結合ドメインおよび NF- κ B p65 の活性化ドメインにより形成される、請求項 8 に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 10】

第 2 カセット (b) によりコードされている制限エンドヌクレアーゼが I-SceI である、請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 11】

少なくとも、 Ψ パッケージング配列と E1A タンパク質または E1A / E1B タンパク質をコードする配列を欠いている組換えアデノウイルスのゲノムを含んでなるヌクレオチド配列を含んでなり、組換えアデノウイルスゲノムを含んでなる該配列が、制限エンドヌ

10

20

30

40

50

クレアーゼに対する特異的認識配列により隣接されている、ポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 1 2】

インテグラーゼによる特異的認識のためのヌクレオチド配列をさらに含んでなり、該インテグラーゼ認識配列が、制限エンドヌクレアーゼの第 1 の認識配列に対して 5' 位にある、請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 1 3】

インテグラーゼによる認識のためのヌクレオチド配列が、P h i C 3 1 インテグラーゼに特異的な a t t B である、請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 1 4】

エンドヌクレアーゼの認識配列が、I - S c e I エンドヌクレアーゼに特異的である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクター。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 1 6】

アデノウイルス E 1 A タンパク質をコードする配列および、場合により、アデノウイルス E 1 B タンパク質をコードする配列をさらに含んでなる、宿主細胞。

【請求項 1 7】

請求項 5 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 1 8】

請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の、または請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の宿主細胞への請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドの組み込みにより得ることができるポリヌクレオチドまたは発現ベクターをさらに含んでなる、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 1 9】

請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは発現ベクターに由来するウイルスゲノムを隣接する制限標的が、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドに由来する転写レギュレーター (a) により活性化可能な転写レギュレーター配列の機能的制御下にあるエンドヌクレアーゼ制限により特異的に認識される、請求項 1 8 に記載の細胞。

【請求項 2 0】

高容量アデノウイルスの感染性粒子の生産およびパッケージングに好適な細胞の生産方法であって、

(i) 細胞を、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の第 1 のポリヌクレオチドもしくは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターで、または請求項 5 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドもしくは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターでトランスフェクトすること、および

(i i) 該細胞を、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターでトランスフェクトすること

を含んでなり、工程 (i) および (i i) は任意の順序でまたは同時に行うことができ、かつ、工程 (i) において細胞が請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドでトランスフェクトされる場合には、アデノウイルス E 1 A タンパク質および、場合により、アデノウイルス E 1 B タンパク質をコードする配列を含んでなる細胞が用いられる、方法。

【請求項 2 1】

工程 (i) および / または (i i) が、工程 (i) および (i i) で用いられたポリヌクレオチドに存在する選択マーカーに基づいて、第 1 および / または第 2 のポリヌクレオチドを安定に組み込んだ細胞が選択される付加的な選択工程を含む、請求項 2 0 に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 22】

請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドが、インテグラーゼによる特異的認識のためのヌクレオチド配列をさらに含んでなり、工程 (ii) で実施されるトランスフェクションが、該認識配列に特異的なインテグラーゼをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

特異的インテグラーゼが放線菌 *Phic31* ファージのインテグラーゼであり、特異的認識部位が attB 部位である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法によって生産することができる、細胞。

【請求項 25】

(a) 請求項 15 ~ 19 および 24 のいずれか一項に記載の細胞、および

(b) 高容量アデノウイルス

を含んでなる、高容量アデノウイルスの生産のための系。

【請求項 26】

高容量アデノウイルスベクターの生産方法であって、

(a) 宿主細胞を、生産を意図する高容量アデノウイルスのゲノムを含んでなるポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでトランスフェクトするか、または感染させる工程、

(b) 該トランスフェクト / 感染細胞を高容量アデノウイルスの複製およびパッケージングを可能とするのに十分な条件下で培養する工程、

(c) 高容量アデノウイルスのウイルス粒子を回収する工程、および、場合により、

(d) 工程 (a) ~ (c) を繰り返す工程 (工程 (c) で生産された高容量ウイルス粒子を次のサイクルの工程 (a) で用いる)

を含んでなり、

工程 (a) で用いられる宿主細胞が、

(i) 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドと、アデノウイルス E1A タンパク質および、場合により、アデノウイルス E1B タンパク質をコードする配列を含んでなる細胞 (この場合には、工程 (a) に先立ち、または同時に、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドおよび / または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)、

(ii) 請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる細胞 (この場合には、工程 (a) に先立ち、または同時に、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドおよび / または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)、

(iii) 請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる細胞 (この場合には、工程 (a) に先立ち、または同時に、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドでのトランスフェクション工程が行われ、該細胞はアデノウイルス E1A タンパク質および、場合により、アデノウイルス E1B タンパク質をコードする配列を含んでなる)、

(iv) 請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる細胞 (この場合には、工程 (a) に先立ち、または同時に、請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドおよび / または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)、

(v) 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、ならびにアデノウイルス E1A タンパク質および、場合により、アデノウイルス E1B タンパク質をコードする配列を含んでなる細胞、および

(vi) 請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドおよび請求項 11 ~

10

20

30

40

50

14のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる細胞からなる群から選択される、方法。

【請求項27】

工程(b)の培養が、請求項1～4および5～10のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドに含まれるヌクレオチド配列によりコードされる転写レギュレーターの特異的誘導剤の存在下で行われる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

転写レギュレーターが、GAL4のDNA結合ドメイン、ヒトプロゲステロン受容体のリガンド結合ドメインおよびNF- κ B p65の活性化ドメインにより形成され、誘導剤が、合成抗プロゲスチン、好ましくは、ミフェプリストンである、請求項27に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は、バイオテクノロジーの分野、より具体的には、標的細胞における異種遺伝子の発現のためのベクターの分野に関する。特に、本発明は、遺伝子導入に有用な高容量アデノウイルスベクターの生産およびパッケージングのための系に関する。

【0002】

背景

高容量アデノウイルス(HC)は、ガットレスアデノウイルスまたはヘルパー依存性アデノウイルスとしても知られ、齧歯類および霊長類の双方において、極めて低い関連免疫原性を示し、高い形質導入効率と広い向性を有することから、*in vivo*における遺伝子療法のためのベクターとして非常に魅力的である。これらのベクターは、それらの複製およびパッケージングのために必要なDNA配列のみを含んでおり、他のアデノウイルスの遺伝子を欠いているため、結果として最大36 kbまでの配列を収容することができるという特徴を持つ。ウイルスDNAの複製およびウイルス粒子内へのそのパッケージングのために、これらのベクターにシスで必要なアデノウイルス配列は、線状DNAの両端に位置するITR配列(逆方向末端反復配列)、およびパッケージングシグナル(Ψ)のみである(Grable and Hearing, 1992, J. Virol, 66: 723-731; Hearing and Shenk, 1983, Cell, 33: 695-703)。

【0003】

高容量アデノウイルスは総てのウイルスコード領域を欠いているため、ヘルパーまたは補助ウイルスと呼ばれる第2のウイルス、すなわち、欠陥ウイルスの複製および感染力を有するウイルス粒子へのその封入に必要な総てのタンパク質をコードし得るウイルスとともに細胞を重感染させた場合にのみ、それらの増殖が可能である。高容量アデノウイルスベクターを生産する場合、ヘルパーウイルスはE1アデノウイルス領域において欠失があり、また、ガットレスウイルスの後代の複製およびアセンブリに必要なウイルスタンパク質の全レパートリーをトランスで提供することを特徴とする。後者の増殖には、ヘルパーウイルスの前記E1領域の欠失を補足し得る細胞系統、例えば293系統(Graham, et al., 1977, J. Gene. Virol, 36: 59-74)、またはPerC6系統(Fallaux et al., 1998, Hum. Gene Ther., 9: 1909-1917)の使用が必要である。

しかしながら、この増殖系もまた、ヘルパーウイルスのゲノムをキャプシド封入し、高容量アデノウイルスの最終調製物を汚染する、望ましくないウイルス粒子の生成につながる。これまで、ヘルパーウイルスのパッケージングプロセスを阻止している前記の混入を排除しようとする様々な系が開発および記載されてきた。一般に、これらの系は、ヘルパーウイルスのパッケージングシグナル、そのゲノムサイズの増加、および、より詳しくは、ウイルス生産プロセス中のパッケージングシグナルの特異的排除における突然変異の組み込みに基づいている。

【0004】

10

20

30

40

50

Parksら(1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 13565-13570)は、C r e - l o x P組換え系によるヘルパーウイルスのψパッケージングシグナルの排除を記載している。この系では、ψシグナルはl o x P部位により隣接され、ウイルスの増殖は、C r eレコンビナーゼを発現する293細胞(293 C r e細胞)内で行われる。ヘルパーウイルスが細胞に入ると、レコンビナーゼはψシグナルを切り出し、パッケージングできないようにするが、その複製能は維持し、その結果、高容量アデノウイルスのパッケージングに必要なコード配列の発現が維持される。

【0005】

Grothら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97: 5995-6000)は、特異的に認識されるa t t B / a t t P部位がψシグナルを隣接して配置されている、一方向性レコンビナーゼ、特に、φC31レコンビナーゼの使用を提案している。P h i C31レコンビナーゼが、a t t B / a t t P部位に隣接された配列を切り出すと、それは認識配列を改変し、それらをa t t R / a t t L配列へ変換して、認識が再度起こるのを防ぎ、その結果、ψシグナルの再導入を防ぐ。

【0006】

Ngら(2001, Mol. Ther., 3: 809-815)は、高容量アデノウイルスの増殖が酵母F L Pレコンビナーゼ(293 F L Pおよび293 C r e F L P系統)を発現し得る293細胞中で行われ、ヘルパーウイルスのψシグナルが、該F L Pレコンビナーゼにより特異的に認識されるf r t部位により隣接されている、別の組換え系F L P / f r tを提案している。ガットレスウイルスの増幅効率(実行3回で 10^8 b f u / m l)、ならびにヘルパーウイルスの混入レベル(C s C 1勾配で精製後0.5%)は、従前のC r e - l o x P系を用いて生産されたものと極めて類似していた。

【0007】

これらの系の改良を試みるために、PalmerおよびNg(2003, Mol. Ther., 8: 846-852)は、ヘルパーウイルスのパッケージングシグナルの反転を包含した、C r e - l o x P系に由来する系を開発した。

【0008】

一方、Sargentら(2004, Gene Ther., 11: 504-511)は、35 k bより大きく、I Xタンパク質の遺伝子が欠失しているヘルパーウイルス、ならびに前記欠失を補足し得る293細胞系統が用いられる、サイズに基づく制限系を提案している。

【0009】

しかしながら、これらの改良にもかかわらず、これまで、これらの系に、生産工程に含まれる2つのウイルスの配列間の組換えを回避し、その結果、サンプルへの複製能を有するアデノウイルスの混入を回避できるようになったものはない。Albaらは最近の総説(2005, Gene Ther., 12 Suppl 1: S18-27)で、混入レベルは、使用する系に応じて、生産された高容量アデノウイルスのウイルス粒子の数に対して0.02%~1%の間で変動し得ると述べている。これらの混入レベルは、遺伝子療法の臨床診断法に用いるには高すぎると考えられる。

【0010】

さらに、高容量アデノウイルスを使用するためのもう1つの重要な限定要因は、それらの大規模生産が困難であることに関連している。現在、このタイプの生産法は複雑であり、効率が低く、ウイルスヘルパーを用いる重感染を何回も繰り返す必要がある。

【0011】

これを行うためには、手順を改良すると同時に、臨床使用に必要とされる量とともに質(ウイルス粒子の混入のない)で高容量アデノウイルスベクターを生産するための代替系の開発が必要である。

【0012】

この問題の理想的な解決方法は、高容量アデノウイルスベクターの大規模生産のための特定の細胞系統の開発であろう。しかしながら、ヘルパーウイルスの関与に依存しない生産系には、アデノウイルス遺伝子の高い発現レベルから生じる細胞傷害性の問題があり、

10

20

30

40

50

このことは、今まで、このタイプの生産系の開発を大いに制限してきた。これに対し、本発明者らは、感染の後期においてウイルス粒子の大量生産を可能にする構造タンパク質の発現を伴うDNAの複製の調整に必要な一連の事象を正確に再現することは、極めて難しいという事実を付け加えなければならない(Farley, et al., 2004, J. Virol, 78: 1782-1791)。

【0013】

WO0072887では、(i) E1、E3、E4領域ならびにpTPおよびDBP遺伝子を欠失させたアデノウイルスゲノムとともに、エプスタイン-バーウイルス(EBV)の複製エレメントに基づく、安定型の環状エピソームを少ないコピー数で含む、パッケージング細胞系統、および(ii)アデノウイルスゲノムの複製およびパッケージングに必要なエレメントを含み、エピソーム(E4領域、pTP遺伝子およびDBP)ならびに異種遺伝子が存在しないベクター、から形成される2成分系に基づく、ヘルパーアデノウイルスには依存しない高容量アデノウイルスの生産系を開示している。この系においては、(i)パッケージングシグナルを欠いており、かつ(ii)そのサイズがアデノウイルスのパッケージング容量を超えているために、エピソームはビリオン中にパッケージングされない。

10

【0014】

他方、WO0042208では、(i) E1、E3領域、およびビリオンのアセンブリ工程に關与する繊維タンパク質をコードする遺伝子(L5)を欠失させたアデノウイルスベクター、ならびに(ii)前記ベクターの複製およびパッケージングを補足し得る特定の細胞系統を含んでなる、ヘルパーウイルスに依存しないアデノウイルス生産系が開示されている。ウイルス粒子の複製およびパッケージングの工程に必要な総ての遺伝子は、アデノウイルスベクターの配列の中に含まれている。

20

【0015】

最後に、Catalucci et al. (2005, J. Virol, 79: 6400-6409)により最近記載された系は、エプスタイン-バーウイルスの複製起点からなるエピソームプラスミドの使用が、核抗原EBNA1(293EBNA)を安定して発現するよう改変された293細胞系統の核内におけるその維持を可能にすることを示唆している。このエピソームは、血清型5アデノウイルスのITR配列、アデノウイルスゲノムの、初期領域(E2)およびE4領域に含まれるORF6の遺伝子を含む。これらのアデノウイルス遺伝子の転写は、誘導プロモーターの制御下にあるが、キャプシドの形成に必要な他の遺伝子は、高容量アデノウイルスの配列の中に含まれている。

30

【0016】

一般に、これらのヘルパー非依存性アデノウイルスベクター生産系は総て、これらのアデノウイルスベクター総てがベクターの複製またはパッケージングの工程に必要な1以上のアデノウイルスの遺伝子を含むので、ベクターに挿入することができるDNA配列のサイズにより制限される。さらに、これらのアデノウイルス遺伝子の存在は、臨床応用する場合に、免疫原性作用があり得るというリスクを伴う。

【0017】

従って、このことは、補助アデノウイルスベクターの使用を必要とせず、またこれまでに知られている補助ベクターの欠点を克服する、高容量アデノウイルス生産系を得る技術の必要性を証明する。

40

【0018】

発明の概要

第1の態様において、本発明は、

(a) 転写レギュレーターをコードするヌクレオチド配列を含んでなる第1の発現カセット;

(b) 制限エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなり、(a)で定義されたポリヌクレオチドによりコードされる転写レギュレーターにより活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第2の発現カセット

50

を含んでなる、ポリヌクレオチド（本発明の第 1 のポリヌクレオチド）または発現ベクターに関する。

【0019】

第 2 の態様において、本発明は、

（a）転写レギュレーターをコードするヌクレオチド配列を含んでなる第 1 の発現カセット；

（b）制限エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなり、転写レギュレーター（a）により活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第 2 の発現カセット、および

（c）選択されたアデノウイルス E 1 A タンパク質、またはアデノウイルス E 1 A および E 1 B タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、転写レギュレーター（a）により活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第 3 の発現カセットを含んでなる、ポリヌクレオチド（本発明の第 2 のポリヌクレオチド）または発現ベクターに関する。

10

【0020】

別の態様において、本発明は、少なくとも、 Ψ パッケージング配列と E 1 A または E 1 A / E 1 B タンパク質をコードする配列を欠いている組換えアデノウイルスのゲノムを含んでなるヌクレオチド配列を含んでなり、組換えアデノウイルスゲノムを含んでなる該配列が、制限エンドヌクレアーゼに対する特異的認識配列により隣接されている、ポリヌクレオチド（本発明の第 3 のポリヌクレオチド）または発現ベクターに関する。

20

【0021】

別の態様において、本発明は、本発明の 1 つまたはいくつかのポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含んでなる宿主細胞に関する。

【0022】

別の態様において、本発明は、

（i）細胞を、本発明の第 1 のポリヌクレオチドもしくは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターで、または本発明の第 2 のポリヌクレオチドもしくは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターでトランスフェクトすること、および

（ii）該細胞を、本発明の第 3 のポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターでトランスフェクトすること

30

を含んでなり、工程（i）および（ii）は任意の順序でまたは同時に行うことができ、かつ、工程（i）において細胞が本発明の第 1 のポリヌクレオチドでトランスフェクトされる場合には、アデノウイルス E 1 A タンパク質および場合によりアデノウイルス E 1 B タンパク質をコードする配列を含んでなる細胞が用いられる、高容量アデノウイルスの感染性粒子の生産およびパッケージングに好適な細胞の生産方法に関する。

【0023】

別の態様において、本発明は、本発明による方法によって生産することができる細胞に関する。

【0024】

別の態様において、本発明は、

40

（a）本発明による細胞、および

（b）高容量アデノウイルス

を含んでなる高容量アデノウイルスの生産のための系に関する。

【0025】

別の態様において、本発明は、

（a）宿主細胞を、生産したい高容量アデノウイルスのゲノムを含んでなるポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでトランスフェクトするか、または感染させる工程、

（b）該トランスフェクト / 感染細胞を高容量アデノウイルスの複製およびパッケージングを可能とする条件下で培養する工程、

50

(c) 高容量アデノウイルスのウイルス粒子を回収する工程、および場合により、
(d) 工程(a) ~ (c)を繰り返す工程(工程(c)で生産された高容量ウイルス粒子を次のサイクルの工程(a)で用いる)
を含んでなり、

工程(a)で用いられる宿主細胞が、

(i) 本発明の第1のポリヌクレオチドと、アデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列とを含んでなる細胞(この場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、第3のポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)

(ii) 本発明の第2のポリヌクレオチドを含んでなる細胞(この場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明の第3のポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)、

(iii) 本発明の第3のポリヌクレオチドを含んでなる細胞(この場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、第1のポリヌクレオチドでのトランスフェクション工程が行われ、該細胞はアデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスのE1Bタンパク質をコードする配列を含んでなる)、

(iv) 本発明の第3のポリヌクレオチドを含んでなる細胞(この場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明の第2のポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)、

(v) 本発明の第1のポリヌクレオチド、本発明の第3のポリヌクレオチド、ならびにアデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列を含んでなる細胞、および

(vi) 本発明の第2のポリヌクレオチドおよび本発明の第3のポリヌクレオチドを含んでなる細胞
からなる群から選択される、高容量アデノウイルスベクターの生産方法に関する。

【0026】

発明の詳細な説明

本発明者らは、ヘルパーウイルスの使用を必要とせず、また宿主細胞のゲノム内にウイルス粒子の制御、複製およびパッケージングに必要なアデノウイルス遺伝子を組み込むことを特徴とし、この生産系の安定性を長期にわたって向上させる、高容量アデノウイルスベクターのための、新規の生産およびパッケージング系(キャプシド封入)を設計した。同様に、用いられる高容量アデノウイルスベクターは、該ベクターのクローニング能力が他のヘルパー非依存系または他の補助ベクターにおいて示されている能力を上回るように、ピリオンの複製およびパッケージングに必要な配列(ITR配列およびψシグナル)のみを含む。最後に、高容量ベクターにこれらのアデノウイルス遺伝子が存在しないことで、その臨床適用の際にベクターに対する免疫応答のリスクが排除される。

【0027】

本発明の第1のポリヌクレオチド(A1ポリヌクレオチド)

第1の態様において、本発明は、

(a) 転写レギュレーターをコードするヌクレオチド配列を含んでなる第1の発現カセット;

(b) 制限エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなり、(a)で定義されるポリヌクレオチドによりコードされる転写レギュレーターにより活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第2の発現カセット
を含んでなる、ポリヌクレオチド(以下、本発明のA1ポリヌクレオチド)または発現ベクターに関する。

【0028】

本発明において「転写レギュレーター」または「トランスアクチベーター」は、該遺伝子の非コード領域内の該タンパク質に特異的な認識領域へのその結合により、決定された

10

20

30

40

50

遺伝子の転写を活性化し得るタンパク質として等しく理解される。特定の実施形態では、該トランスアクチベーターまたは転写レギュレーターは、調節可能な転写レギュレーターである。本発明において「調節可能な転写レギュレーター」とは、該レギュレーターに特異的な結合部位を含んでなる遺伝子に応じて供給または除去することができる付加的因子によりその活性が調整され得る転写レギュレーターとして理解される。当業者ならば、調節された基底転写を最小限にして、調節された発現を可能にする限り、本発明が転写レギュレーターの発現を調節するためのいずれの方法をも含むことが分かるであろう。従って、誘導剤に応答し、誘導剤の不在下では基底発現を全く示さないか、または示してもごくわずかであり、かつ、3'位にある遺伝子の活性化を促進することができる誘導プロモーターにより転写アクチベーターを調節することができる。誘導剤の種類によって、誘導プロモーターはTetオン/オフプロモーター(Gossen and Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Gossen et al., 1995, Science 268:1766-1769; Rossi and Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); Pipオン/オフプロモーター(米国特許第6,287,813号);抗プロゲステロン依存性プロモーター(US 2004132086)、エクジソン依存性プロモーター(Christopherson et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6314-6318; No et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351, Suhr et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7999-8004およびWO 9738117)、メタロチオネン依存性プロモーター(WO 8604920)およびラパマイシン依存性プロモーター(Rivera et al., 1996, Nat. Med. 2:1028-32)に分類される。

10

20

【0029】

あるいは、本発明は、発現レベルの増大によってではなく、通常、レギュレーターの細胞質から核への移行により始められる転写活性の増大を引き起こす誘導剤によってその誘導が起こる転写レギュレーターの使用を包含する。この種の転写レギュレーターは通常、DNA結合ドメインすなわちDBD、リガンド結合ドメインすなわちLBD、および活性化ドメインすなわちADにより形成される。

【0030】

DNA結合ドメインは、合成、キメラまたは類似体DNA結合ドメインを含む、既知の特異的結合エレメントが存在するいずれのドメインでもよい。本発明に好適なDNA結合ドメインとしては、(i)一般に、3本の α ヘリックスからなる二次構造を有するおよそ61個のアミノ酸の鎖により形成されるホメオドメイン(Scott et al., 1989, Biochim. Biophys. Acta 989:25-48; Rosenfeld et al., 1991, Genes Dev. 5:897-907)、(ii)直列に組織された、一般式 Cys_2His_2 のDNAの2~3ダースのジンクフィンガーにより形成されるジンクフィンガー(例えば、TFIIIA、Zif268、GliおよびSRE-ZBP)(ここで、各モジュールは3~5塩基対のDNA領域と接触できる α ヘリックス、高親和性DNA結合部位を生じるのに必要な少なくとも3つのジンクフィンガー、および低親和性DNA結合部位を生じるための少なくとも2つのジンクフィンガーを含んでなる)、(iii)ヘリックス-ターン-ヘリックスすなわちHLHと呼ばれるDNA結合ドメイン、例えば、MAT1、MAT2、MATa1、Antennapedia、Ultrabithorax、Engrailed、Paired、Fushi tarazu、HOX、Unc86、Oct1、Oct2およびPit-1、(iv)ロイシンジッパー型のDNA結合ドメイン、例えば、GCN4、C/EBP、c-Fos/c-JunおよびJunBが挙げられる。本発明において好適なDNA結合ドメインの例としては、DNA結合ドメインGAL4、LexA、転写因子、グループH核受容体、ステロイド/甲状腺ホルモンスーパーファミリーの核受容体が挙げられる。当業者ならば、いくつかのDNA結合モチーフにより形成されたハイブリッドDNA結合ドメインを用いれば、それらを含んでなるエレメントのもの以外のDNA結合部位を認識し得ることが分かるであろう。従って、ジンクフィンガーおよびホメオボックスの結合により形成されたDNA結合ドメインを使用することが可能である。好ましい実施形態では、DNA結合ドメインは、サッカロミセス・セレビスエのGAL4タンパク質のものである。

30

40

50

【 0 0 3 1 】

本発明で用いるのに好適な、それらを含む転写アクチベーターの核局在を促進し得るリガンド結合配列としては、15 - デスオキシ - [デルタ] - プロスタグランジン J 2 の存在下で核に移行する P P A R (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)、9 - シス - レチノイン酸の α 、 β または γ 異性体の存在下で核へ移行するレチノイン酸受容体、レチノイン酸および T T N P B により活性化可能なファルネソイド X 受容体、24 - ヒドロキシコレステロールにより活性化可能な肝臓 X 受容体、安息香酸 4 - アミノブチルにより活性化可能な安息香酸 X 受容体、構成的アンドロスタン受容体、プレグノロン - 16 カルボニトリルにより誘導可能なプレグナン受容体、リファンピシンにより誘導可能なステロイドおよび生体異物受容体、メドロキシプロゲステロンならびにミフェプリストンアゴニストおよびアンタゴニストおよび 19 - ノルエチステロン誘導体により誘導可能なプロゲステロン受容体、グルココルチコイドにより活性化可能なグルココルチコイド受容体、T3 および / または T4 により活性化可能な甲状腺ホルモン受容体、エストロゲンおよびそれらの誘導体 (17 β - エストラジオールおよびエストラジオールなど) により活性化可能なエストロゲン受容体、「t e t - o f f」テトラサイクリン / ドキシサイクリンにより誘導可能な t T A トランスアクチベーター (Gossen and Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551)、「t e t - o n」テトラサイクリンにより誘導可能な r t T A トランスアクチベーター (Gossen et al., 1995, Science, 268: 1766-1769)、ムリステロン A またはエクジソン受容体の類似体リガンドにより誘導可能なトランスアクチベーター (No et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351)、R S L 1 リガンドにより誘導可能なトランスアクチベーター、例えば、Palli et al. (2003, Eur. J. Biochem., 270: 1308-1315) により最初に記載された R h e o S w i t c h 系、ラパマイシンまたはラパマイシン類似体により誘導可能なトランスアクチベーター (Ho et al., 1996, Nature, 382: 822-826; Amara et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 10618-10623)、ならびにそれぞれインデューサーおよびレプレッサーとして競合的に働くクーマイシン / ノボピオシンにより誘導可能なトランスアクチベーター (Zhao et al., 2003, Hum. Gene Ther., 14: 1619-1629) 由来の局在配列が挙げられる。好ましい実施形態では、該 L B D は、R U 4 8 6 またはミフェプリストンなどのプロゲステロンの誘導体を含む合成抗プロゲステンで活性化され得るが、Wang et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. US A. 1994, 91: 8180-4) により記載されているように患者においては効果を示さない、ヒトプロゲステロン受容体のリガンド結合ドメインである。

【 0 0 3 2 】

最後に、該活性化ドメインは、グループ H 核受容体、甲状腺またはステロイドホルモンの核受容体の活性化ドメイン、V P 1 6、G A L 4、N F - κ B、B 4 2、B P 6 4 または p 6 5 の活性化ドメインであり得る。好ましい実施形態では、該活性化ドメインはヒト N F - κ B タンパク質由来である。

【 0 0 3 3 】

好ましい実施形態では、該転写アクチベーターは、サッカロミセス・セレピシエの G A L 4 の D N A 結合ドメイン (Laughon and Gesteland, 1984, Mol. Cell Biol., 4: 260-267; Marmorstein et al., 1992, Nature, 356: 408-414)、ヒトプロゲステロン受容体のリガンド結合ドメイン (Kastner et al., 1990, Embo J., 9: 1603-1614; Wang et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8180-8184) およびヒト N F - κ B タンパク質の活性化ドメイン (Burcin et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 355-360; Deloukas and van Loon, 1993, Hum. Mol. Genet., 2: 1895-1900) を含んでなる、G A L 4 - h P R - p 6 5 と呼ばれる融合タンパク質である。この転写レギュレーターは、ミフェプリストンまたはその類似体 R U 4 8 7 により誘導可能である。ミフェプリストンの不在下で、該レギュレーター融合タンパク質はチミジンキナーゼの最小プロモーターから構成的に発現される。このタンパク質は主として核内に局在し、不活性である。インデューサーであるミフェプリストン、またはその類似体 R U 4 8 6 を加えると、これは G A L 4 - h P R - p 6 5 の h P R - L B D 領域に高い親和性で結合し、コンフォメーション変化を引き

起こし、結果としてタンパク質の二量体化およびその活性型への変換が起こる。これらのホモ二量体は、特異的部位（UAS：上流活性化配列）に結合することができ、該活性化配列に対して3'の配向に局在する遺伝子の転写を引き起こし、従って、目的遺伝子および実際の転写因子をコードする遺伝子の転写を活性化する（図2C）。

【0034】

当業者ならば、レギュレーターの核への移行またはそれらの活性型へのコンフォメーション変化を促進する外因性化合物の添加により活性が調節される、この種の転写レギュレーターは、それらの転写が特に微細な転写制御を受けることを必要としないことが分かるであろう。一般論として、トランスアクチベーターまたは転写レギュレーターをコードする配列は、その転写および発現を命令する好適なプロモーターに、また、ポリアデニル化シグナルにも関連している。この種のレギュレーターの転写は厳密に制御する必要がないために、それらは構成プロモーターの制御下に見られる。限定されないが、該最小プロモーターは、とりわけ、CMVもしくはRSVなどの構成的ウイルスプロモーター、またはPGKもしくはEF1などの真核細胞構成プロモーターであり得る。あるいは、転写レギュレーターをコードする遺伝子のプロモーター領域に、その発現が正のフィードバックサイクルによりその発現の増大を引き起こすように、転写レギュレーターに対する応答エレメントを含めることが可能である。一実施形態において、該転写レギュレーターは、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子（ P_{tk} ）の最小プロモーターと結合している、GAL4 DNA結合ドメインに対する1つまたはいくつかの結合エレメント、好ましくは、GAL4 DNA結合ドメインに対する4つの結合エレメントにより形成される領域により調節される。

【0035】

A1ポリヌクレオチドの第2のエレメントは、本発明の第1のポリヌクレオチド内に存在する第1の発現カセットにコードされている転写レギュレーターの機能的制御下にある制限エンドヌクレアーゼをコードする発現カセットを含んでなる。該制限エンドヌクレアーゼは、特定のDNA部位の認識および断裂により2本鎖DNAを切断する酵素である。本発明においてエンドヌクレアーゼとは、ヒト細胞のDNAゲノムの特異的部位を認識せず、従って、該細胞の天然ゲノムにおいて断裂を引き起こすことはないエンドヌクレアーゼである。限定されないが、該制限エンドヌクレアーゼは、とりわけ、I-SceI、PI-SceI、I-PpoI、I-DmoIまたはPI-TliIであり得る。特定の実施形態では、A1ポリヌクレオチドによりコードされる制限エンドヌクレアーゼは、サッカロミセス・セレビシエのI-SceIである。制限エンドヌクレアーゼのコード配列を含むポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの第1のエレメントによりコードされる転写レギュレーターに対する結合配列の機能的制御下にある。このようにして、プロモーターはエンドヌクレアーゼの転写および発現を活性化または抑制するトランスアクチベーターの結合に応答する。しかしながら、トランスアクチベーターのプロモーターと結合して相互作用する能力は、調節因子がリガンドまたは誘導剤に結合するかどうかによって変動する。結果として、誘導剤の利用可能性を制御することで、目的遺伝子の転写を調節することができる。誘導剤は遺伝子の転写および発現を活性化および促進することにより作用する場合もあれば、誘導剤の存在はその発現を抑制する場合もある。好ましい実施形態では、転写レギュレーターはGAL4-hPR-p65であり、制限エンドヌクレアーゼをコードするこのポリヌクレオチドは、GAL4 DNA結合ドメインに対する種々の数の結合配列に対して3'位にある。さらにより好ましい実施形態では、制限エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子は、GAL4転写因子の6つの結合配列およびE1b（ P_{E1b} ）アデノウイルス遺伝子のTATAボックスの配列（Lillie and Green, 1989, Nature, 338: 39-44）からなるレギュレーターエレメントに対して3'位にある。

【0036】

A1ポリヌクレオチドの特定の実施形態では、転写レギュレーターはGAL4-hPR-p65であり、制限エンドヌクレアーゼはI-SceIである。

【0037】

本発明の第2のポリヌクレオチド (A2ポリヌクレオチド)

第2の態様において、本発明は、

(a) 転写レギュレーターをコードするヌクレオチド配列を含んでなる第1の発現カセット；

(b) 制限エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなり、転写レギュレーター(a)により活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第2の発現カセット、および

(c) 選択されたアデノウイルスE1Aタンパク質またはアデノウイルスE1AおよびE1Bタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、転写レギュレーター(a)により活性化可能な転写調節配列の機能的制御下にある、第3の発現カセット
を含んでなる、ポリヌクレオチド(以下、A2ポリヌクレオチド)または発現ベクターに関する。

10

【0038】

A2ポリヌクレオチドのエLEMENT(a)および(b)は、本発明の第1のポリヌクレオチドの一部を形成し、従前に記載されているものに本質的に相当する。

【0039】

A2ポリヌクレオチドの成分(c)は、選択されたアデノウイルスE1Aタンパク質またはアデノウイルスE1AおよびE1Bタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現カセットを含んでなる。遺伝子E1Aおよび場合によりE1Bは、任意の種類のアデノウイルスまたはヒトアデノウイルス血清型(ヒトにおいて単離された)、例えば血清型2(A d 2)、5(A d 5)、11(A d 11)または3(A d 3)のゲノムに由来するものであり得る。特定の実施形態では、該成分はアデノウイルス血清型5のゲノム(GenBank: AC000008)の505番~3511番の範囲の配列を含む。この配列は、転写レギュレーター(a)により活性化可能な転写レギュレーター配列の機能的制御下にある。このようにして、プロモーターは、転写の活性化または抑制、および構造遺伝子E1AおよびE1Bの発現を行うトランスアクチベーターの結合に応答する。しかしながら、トランスアクチベーターのプロモーターと結合して相互作用する能力は、調節因子がリガンドまたは誘導剤に結合するかどうかによって変動する。結果として、誘導剤の利用可能性を制御することで、E1Aおよび場合によりE1B遺伝子の転写を調節することができる。好ましい実施形態では、本発明のA2ポリヌクレオチドの成分(c)は、GAL4転写因子の6つの結合配列およびE1b(P_{E1b})アデノウイルス遺伝子のTATAボックス配列(Lillie and Green, 1989, Nature, 338: 39-44)からなるハイブリッドプロモーターの制御下にある。

20

30

【0040】

当業者ならば、転写アクチベーターに応答するA2ポリヌクレオチドでの遺伝子の配向はその機能のために重要ではないことが分かるであろう。従って、好ましい実施形態では、第2および第3のカセットは、反対方向に転写される。別の好ましい実施形態では、第2および第3のカセットを制御する転写調節配列は転写レギュレーター(a)と同じ結合部位を共有している。好ましい実施形態では、制限エンドヌクレアーゼおよびアデノウイルスタンパク質をコードする遺伝子は、GAL4転写因子に対する6つの結合配列およびE1b(P_{E1b})アデノウイルス遺伝子のTATAボックス配列(Lillie and Green, 1989, Nature, 338: 39-44)からなる、同じハイブリッドプロモーターの制御下にある。さらにより好ましい実施形態では、本発明のA2ポリヌクレオチドの第2および第3のカセットは反対方向に転写され、GAL4転写因子のDNA結合ドメインに対する結合配列を共有する。

40

【0041】

A2ポリヌクレオチドの特定の実施形態では、第1の発現カセット(a)は転写レギュレーターGAL4-hPR-p65をコードする配列を含んでなり、第2の発現カセット(b)はGAL4タンパク質の1つまたはいくつかの結合部位の制御下にI-ScE制限エンドヌクレアーゼをコードする配列を含んでなり、第3の発現カセット(c)はGA

50

L 4 タンパク質の 1 つまたはいくつかの結合部位の制御下に E 1 A および E 1 B 遺伝子の配列を含んでなる。さらにより好ましい実施形態では、I - S c e I 制限エンドヌクレアーゼをコードする配列ならびに E 1 A および E 1 B 遺伝子の配列の発現を命令する調節可能なプロモーターは、G A L 4 - h P R - p 6 5 と同じ応答エレメントを共有する。

【 0 0 4 2 】

本発明の第 3 のポリヌクレオチド (B ポリヌクレオチド)

別の態様において、本発明は、組換えアデノウイルスのゲノムを含んでなり、少なくとも Ψ パッケージング配列および E 1 A タンパク質または E 1 A / E 1 B タンパク質をコードする配列を欠いているヌクレオチド配列を含んでなり、組換えアデノウイルスのゲノムを含んでなる該配列が、制限エンドヌクレアーゼに特異的な認識配列により隣接されている、ポリヌクレオチド (以下、B ポリヌクレオチド) または発現ベクターに関する。アデノウイルスゲノムの配列は、任意の種類のアデノウイルスまたはヒトアデノウイルス血清型 (ヒトにおいて単離された)、例えば、血清型 2 (A d 2)、5 (A d 5)、1 1 (A d 1 1) または 3 (A d 3) のゲノムから作製することができる。

【 0 0 4 3 】

好ましくは、制限エンドヌクレアーゼの認識配列は、両末端の I T R 配列 (ゲノムの複製および転写に好適な領域が見られる) に対して 5 ' および 3 ' の位置でアデノウイルスゲノムにより隣接されている。当業者ならば、この B ポリヌクレオチドに用いる制限標的は本発明の A 1 および A 2 ポリヌクレオチドにコードされている制限エンドヌクレアーゼに依存することが分かるであろう。よって、アデノウイルスを隣接する標的配列は、A 1 および A 2 ポリヌクレオチドによりコードされているエンドヌクレアーゼを表す際に従前に示したものと同一特徴および要件を有する制限エンドヌクレアーゼに対する特異的な認識配列である。限定されないが、これらの配列は、とりわけ、I - S c e I、P I - S c e I、I - P p o I、I - D m o I または P I - T l i I エンドヌクレアーゼによるそれらの認識に特異的なものであり得る。特定の実施形態では、それらは I - S c e I エンドヌクレアーゼによる認識に特異的なものである。

【 0 0 4 4 】

さらに、別の好ましい実施形態では、本発明による B ポリヌクレオチドは、パッケージング細胞のゲノムへの該ポリヌクレオチドの挿入を助ける配列を含んでなる。さらにより好ましい実施形態では、ゲノムへの組込みに好都合な配列は、インテグラーゼに対する特異的な認識配列である。好ましくは、インテグラーゼの標的配列は、エンドヌクレアーゼに対する第 1 の認識配列に対して 5 ' 位にある。

【 0 0 4 5 】

本発明の実施形態に好適なインテグラーゼの標的配列としては、限定されるものではないが、P 1 ファージの C r e レコンビナーゼの標的配列 (L o x P)、S . セレシエの F L P レコンビナーゼ (F r t) の標的配列、放線菌 Φ C 3 1 ファージのインテグラーゼの標的配列 (a t t B、a t t P)、T P 9 0 1 - 1 レコンビナーゼの標的配列および R 4 レコンビナーゼの標的配列または λ インテグラーゼの標的配列を含む。好ましい実施形態では、本発明の標的配列としては、2 つの特異的な部位または D N A 配列間の一方向組換えを媒介するファージのインテグラーゼに対する特異的な配列を含む。より詳しくは、インテグラーゼはセリンインテグラーゼファミリーに属し、それらが D N A 鎖の断裂に触媒的セリン残基を用いることを特徴とする (Thorpe and Smith, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 5505-5510)。これらのインテグラーゼにより認識される組換え部位 (a t t B および a t t P) は他のレコンビナーゼにより認識される組換え配列とは配列が異なり、それよりも短い。この種のインテグラーゼにより媒介される組込みは、組換え配列により厳格に制御される一方向プロセスである (Thorpe et al., 2000, Mol. Microbiol., 38: 232-241)。もう 1 つの重要な特徴は、宿主における a t t P および a t t B 間の組換えには補因子が働く必要がないということである。これらのインテグラーゼは現在、哺乳類細胞における遺伝子操作法に用いられており、外から導入された a t t P 部位または該 a t t P 部位と部分的な同一性を有する天然配列 (p s e u d o - a t t P) への遺伝物質

の効率的な組込みを媒介することが示されている。限定されないが、インテグラーゼの標的配列は、とりわけ、P h i C 3 1、T P 9 0 1 - 1またはR 4 インテグラーゼに対する特異的認識配列であり得る。特定の実施形態では、インテグラーゼの標的配列は、P h i C 3 1 ファージのインテグラーゼに特異的な細菌DNAのアンカー部位に相当するa t t Bである。このインテグラーゼは、このa t t B配列とヒト細胞のゲノムに存在するp s e u d o - a t t P配列の間の一方向組換えを媒介し得る。

【0046】

よって、別の好ましい実施形態では、Bポリヌクレオチドは、5'から3'方向に、場合により、インテグラーゼ認識配列、第1のエンドヌクレアーゼ認識、アデノウイルスゲノム（その限界はアデノウイルスのITRにより定義される）および第2の制限エンドヌクレアーゼ配列を含む。

10

【0047】

本発明のベクターおよび宿主細胞ならびにそれらを得るための方法

本発明のポリヌクレオチドは単離してもよいし、好適な宿主細胞において該ポリヌクレオチドの増幅を可能とするベクターの一部をなしてもよい。よって、別の態様において、本発明は、本発明のA 1、A 2またはBポリヌクレオチドを含んでなる、発現ベクターなどのベクターに関する。

【0048】

本発明のポリヌクレオチドの挿入に好適なベクターとしては、p U C 1 8、p U C 1 9、B l u e s c r i p tおよびそれらの誘導体、m p 1 8、m p 1 9、p B R 3 2 2、p M B 9、C o I E 1、p C R 1、R P 4などの原核生物における発現ベクター；p S A 3およびp A T 2 8などのファージおよび「シャトル」ベクター；2ミクロン、組込みプラスミド、Y E Pベクター、セントロメアプラスミドなどのプラスミド種ベクターなどの酵母における発現ベクター；ならびに同様にp A C系およびp V L系ベクターなどの昆虫細胞における発現ベクター；p I B I、p E a r l e y G a t e、p A V A、p C A M B I A、p G S A、p G W B、p M D C、p M Y、p O R E系ベクターなどの植物における発現ベクター；ならびにウイルスベクター（アデノウイルス、アデノウイルス随伴ウイルスならびにレトロウイルス、特に、レンチウイルス）ならびに非ウイルスベクター（p S i l e n c e r 4 . 1 - C M V (Ambion)、p c D N A 3、p c D N A 3 . 1 / h y g p H C M V / Z e o、p C R 3 . 1、p E F 1 / H i s、p I N D / G S、p R c / H C M V 2、p S V 4 0 / Z e o 2、p T R A C E R - H C M V、p U B 6 / V 5 - H i s、p V A X 1、p Z e o S V 2、p C I、p S V Lおよびp K S V - 1 0、p B P V - 1、p M L 2 dおよびp T D T 1ベクターなどの）に基づく真核細胞における同様の発現ベクターが挙げられる。該ポリヌクレオチドの挿入に特に適当なベクターは、宿主細胞で維持および／または複製および／または発現させることができる、ウイルスベクター（アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、S V 4 0およびαウイルスなど）に基づくか、または非ウイルスベクター（プラスミドなど）に基づく高等真核細胞における発現ベクターである。さらに詳しい実施形態では、該発現ベクターは、ex vivoで哺乳類細胞、特に、ヒト細胞をトランスフェクトまたは感染させるのに好適である。

20

30

40

【0049】

一般に、真核生物発現ベクターは、例えば、5'および3'に位置する配列の転写制御下に1以上のクローニングされた遺伝子と選択マーカを含む。限定されないが、これらの制御配列は、真核細胞で発現させることができるプロモーター（転写開始部位を含む）、リボソーム結合部位、RNAプロセッシングシグナル、転写終結部位および／またはポリアデニル化シグナルを含む。

【0050】

好ましくは、これらのベクターは、それを発現する細胞に表現型を与え、ベクターと接触された後にそのベクターを組み込んだ細胞の識別および／または選択を助けるリポーターまたは選択遺伝子を含んでなる。選択の表現型はトランスフェクションまたは感染前に

50

はその真核細胞で発現されないことが好ましい。本発明において有用なリポーター遺伝子としては、lacZ、ルシフェラーゼ、チミジンキナーゼ、GFPおよび同様のものが挙げられる。本発明において有用な選択遺伝子としては、例えば、G418アミノグルコシド耐性を与えるネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性を与えるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤(2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン:DFMO)耐性を与えるODC遺伝子、メトトレキサート耐性を与えるジヒドロ葉酸レダクターゼ(dihydrofolate reductase)遺伝子、ピューロマイシン耐性を与えるピューロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、ゼオシン耐性を与えるble遺伝子、9-β-D-キシロフラノースアデニン耐性を与えるアデノシンデアミナーゼ遺伝子、N-(ホスホノアセチル)-L-アスパルテートの存在下で細胞を増殖可能とするシトシンデアミナーゼ遺伝子、アミノプテリンの存在下で細胞を増殖可能とするチミジンキナーゼ遺伝子、キサンチンの存在下、かつ、グアニンの不在下で細胞を増殖可能とするキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンの代わりにインドールの存在下で細胞を増殖可能とする大腸菌(E. coli)のtrpB遺伝子、ヒスチジンの代わりに細胞のヒスチジノール使用を可能とする大腸菌のhisD遺伝子が挙げられる。選択遺伝子は、真核細胞での該遺伝子の発現に好適なプロモーター(例えば、プロモーターCMVまたはSV40)、翻訳の開始の最適化部位(例えば、いわゆるKozak則またはIRES則に従う部位)、ポリアデニル化部位(例えば、SV40またはホスホグリセリン酸キナーゼのポリアデニル化部位など)、またはイントロン(例えば、β-グロブリン遺伝子のイントロンなど)をさらに含み得るプラスミドに組み込まれる。あるいは、同じベクター中で同時にリポーター遺伝子と選択遺伝子の組合せを使用することもできる。

10

20

30

40

50

【0051】

本発明のポリヌクレオチドおよびそれらを含む発現ベクターは、当業者に公知であり、"Molecular Cloning: a Laboratory manual", J. Sambrook and D.W. Russel編、発行者: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第3版, 2001 (ISBN 978-0879695774)などの概論および手引き書で認知される分子生物学および遺伝子工学の従来技術により作製することができる。また、本発明のポリヌクレオチドのための発現ベクターの構築を助けることができる市販の系も存在する。よって、例えば、Aポリヌクレオチドを含む哺乳類細胞のための発現ベクターの構築は、ミフェリプリストンによる目的遺伝子の誘導発現のためのベクターの構築を可能とするGene Switch(商標)誘導発現系(Invitrogen, Carlsbad CA92008 USA, カタログ番号K1060-01およびK1060-2)、リガンドRLS1による目的遺伝子の誘導発現を可能とするRheo Switch(商標)誘導発現系(New England Biolabs, Beverly, MA01915-5599 USA)、または他の等価な市販の系などの系を用いれば容易となる。

【0052】

本発明のポリヌクレオチドおよびベクターは、組換えアデノウイルスを生産するためにベクターの増殖ビヒクルおよびパッケージング細胞の双方として働く宿主細胞の一部を形成していると思われる場合がある。よって、別の態様では、本発明は、本発明のA1、A2もしくはBポリヌクレオチド、または前述のポリヌクレオチドのいずれかを含んでなる発現ベクターを含んでなる宿主細胞に関する。これらの細胞をアデノウイルスの生産のためのパッケージング細胞として用いる場合には、それらはアデノウイルスの生産および感染を支えることができる必要がある。この実施形態によれば、好適な真核細胞はアデノウイルスの感染および複製を許容するいずれの細胞であってもよい。

【0053】

好ましい実施形態では、この細胞系統は安定な細胞系統である。限定されないが、宿主細胞はHeLa、A549、KB、HuH7細胞、またはアデノウイルスの生活環を支援することができる他の任意の真核細胞であり得る。E1AまたはE1A/E1Bポリペプチドがこの細胞により支援される場合(本発明のA1ポリヌクレオチドが用いられる場合)、その発現は、Bポリヌクレオチドに含まれるアデノウイルス遺伝子の発現の開始をよ

り良く制御するために誘導剤を介して調節可能なプロモーターの制御下にあってもよく、従って、過剰な発現タンパク質に由来する細胞傷害作用のリスクを最大制限することができ。この場合、該タンパク質を構成的に発現する細胞、例えば、293またはPerC6細胞が好適であろう。

【0054】

特定の実施形態では、該宿主細胞は哺乳類、好ましくは霊長類、特にはヒトに由来する。好ましい実施形態では、該細胞系統は肺癌腫系統である。いっそうより好ましい実施形態では、該宿主細胞はA549系統の細胞である。Giard et al. (1973, J. Natl. Cancer Inst, 51: 1417-1423)により誘導され、その後、Lieber et al. (1976, Int. J. Cancer, 17: 62-70)により深く特性決定されたこの細胞系統は、アデノウイルス感染に対して感受性が高く、ウイルス生産系統として高い能力を与える(Smith et al., 1986, J. Clin. Microbiol, 24: 265-268)。

10

【0055】

好ましい実施形態では、本発明は、本発明のA1ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞に関する。いっそうより好ましい実施形態では、該細胞は、アデノウイルスE1Aタンパク質をコードする配列および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列をさらに含んでなる。

【0056】

別の好ましい実施形態では、本発明は、本発明のA2ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞に関する。

20

【0057】

別の実施形態では、本発明は、本発明のBポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞に関する。

【0058】

別の実施形態では、本発明は、本発明のA1ポリヌクレオチドとBポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞に関する。いっそうより好ましい実施形態では、該細胞は、アデノウイルスE1Aタンパク質をコードする配列および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列をさらに含んでなる。

【0059】

別の実施形態では、本発明は、本発明のA2ポリヌクレオチドとBポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞に関する。

30

【0060】

本発明のA1およびBポリヌクレオチドを含んでなる細胞とA2およびBポリヌクレオチドを含んでなる細胞は双方とも、高容量アデノウイルスベクターの生産およびパッケージングに特に好適であり、このため、本発明のA1およびBポリヌクレオチドを含んでなる細胞とA2およびBポリヌクレオチドを含んでなる細胞は該ベクターの生産およびパッケージングのための手順および系に使用することができる。しかしながら、アデノウイルスの生産に特に有用なのは、Bポリヌクレオチド中で欠陥のあるアデノウイルスゲノムを隣接している標的部位がA1およびA2ポリヌクレオチドによりコードされている制限エンドヌクレアーゼに相当しているものであり、そうでなければ、A1またはA2ポリヌクレオチドによりコードされている制限エンドヌクレアーゼは、ゲノムの複製および転写に不可欠なアデノウイルスゲノムを放出するBポリヌクレオチドに作用することができないからである。

40

【0061】

本発明の宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを一時的に導入するか、または好ましくはベクターのポリヌクレオチドを安定に導入することにより得ることができる。これを行うためには、本発明のベクターと宿主細胞とを、細胞へのDNAの取り込みに好適な条件で接触させる必要がある。本発明のベクターを、当業者に公知のトランスフェクション法(Ausubel, F.M. et al, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc; 2003の第9.1節～第9.5節を参照)のいずれかをを用いて検討対象

50

の細胞に導入する。特に、これらの細胞は、DNAのリン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、ポリブレンとの共沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソームにより媒介される融合、リポフェクション、レトロウイルスによる感染およびバイオリスティックトランスフェクションによりトランスフェクトすることができる。

【0062】

よって、別の態様では、本発明は、

(i) 細胞を本発明のA1ポリヌクレオチドでトランスフェクトすること、および

(ii) 該細胞を本発明のBポリヌクレオチドでトランスフェクトすること

を含んでなり、

工程(i)および(ii)は任意の順序でまたは同時に行うことができ、かつ、アデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列を含んでなる細胞が用いられる、高容量アデノウイルスの感染性粒子の生産およびパッケージングに好適な細胞の生産方法に関する。

10

【0063】

よって、別の態様では、本発明は、

(i) 細胞を本発明のA2ポリヌクレオチドでトランスフェクトすること、および

(ii) 該細胞を本発明のBポリヌクレオチドでトランスフェクトすること

を含んでなり、

工程(i)および(ii)は任意の順序でまたは同時に行うことができる、高容量アデノウイルスの感染性粒子の生産およびパッケージングに好適な細胞の生産方法に関する。

20

【0064】

当業者ならば、上記の方法の工程(i)および(ii)は、細胞内に該ポリヌクレオチドまたはベクターが一時的に存在するように行うこともできるし、あるいは、A1/A2および/またはBポリヌクレオチドの安定発現が得られるように行うこともできることが分かるであろう。宿主細胞において本発明のベクターの安定発現を得たい場合には、そのDNAが染色体外の位置にある細胞系統のゲノムにそのDNAを組み込んだ細胞を選択することができるように、所定の抗生物質に対する耐性をコードする遺伝子を、トランスフェクションまたは感染工程中に含める必要がある。これらの細胞の選択を可能とする遺伝子は、本発明の目的構築物を含む同じベクターの一部として提供することもできるし、あるいは、該耐性遺伝子を含む第2のプラスミドと同時トランスフェクションを行うことにより別に提供することもできる。この後者の場合では、トランスフェクション混合物に、DNA構築物を含むプラスミドを、耐性遺伝子の組み込みの度に検討対象のプロモーターを含む遺伝子の高い組み込み率が得られるように、耐性遺伝子に対してモル過剰量で提供する。好ましくは、DNA構築物を含むプラスミドは、リポーター耐性遺伝子を含むベクターに対して少なくとも5倍過剰量で提供する。好ましくは、耐性遺伝子は本発明のベクター内に含まれる。トランスフェクションに好適な耐性遺伝子は従前に記載されている。よって、好ましい実施形態では、本発明によるA1およびBまたはA2およびBポリヌクレオチドを含んでなる細胞の生産方法は、工程(i)および(ii)で用いられたポリヌクレオチドに存在する選択マーカーに基づき、第1および/または第2のポリヌクレオチドを安定に組み込んだ細胞が選択される付加的な選択工程を含む。

30

40

【0065】

一方、A2ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでトランスフェクションを行うと、該ポリヌクレオチドを安定に(細胞は培養で最大4か月維持された)組み込む細胞クローンを選択することが可能であった。有利にも、E1A/E1Bタンパク質と制限エンドヌクレアーゼの発現は抑制され、細胞に害の無い基底発現レベルを維持すること、およびこの発現が用いる特定の構築物に好適な誘導剤の好適な量を培養物に添加することにより誘導および活性化され得ることが確認された。

【0066】

さらに、インテグラーゼ認識部位を含んでなるBポリヌクレオチドの変異体が用いられる特定の場合では、Bポリヌクレオチドの細胞ゲノムへの組み込みを可能とするために、B

50

ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを、インテグラーゼをコードし発現し、かつ、インテグラーゼの認識配列を認識するプラスミドとともに同時にトランスフェクトすることにより工程 (i i) を行う必要がある。好ましくは、インテグラーゼの認識部位が a t t B 部位である場合には、工程 (i i) は、P h i C 3 1 ファージのインテグラーゼをコードするプラスミドとの同時トランスフェクションを含み、これにより、この a t t B 配列とヒト細胞の染色体に存在する p s e u d o - a t t P 配列の間の組換えによる、細胞ゲノムへの B ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含むベクターの組込みが可能となる。この一方向組換えおよび組込みは P h i C 3 1 インテグラーゼにより媒介される。種々のウイルス領域の発現とそれに続く B ポリヌクレオチドに存在するウイルスゲノムの複製には、このウイルスの I T R 末端がフリーである必要があり、加えて、ウイルス E 1 A / E 1 B タンパク質が存在することも必要である。結果として、生じた細胞は欠陥アデノウイルスのゲノムを持つが、これは発現または複製することができない。組込みは無作為に B ポリヌクレオチドを生じることでもできるが、p s e u d o - a t t P 配列への組込みが主要であり、遺伝物質の損失も伴わない。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

前述の方法は高容量アデノウイルスベクターのパッケージングに好適な細胞システムの生産を可能とする。よって、別の態様では、本発明は、前述の方法のいずれかによって得られる細胞に関する。特に、本発明は、A 1 および B ポリヌクレオチドまたは A 2 および B ポリヌクレオチドを含んでなる (該ポリヌクレオチドが細胞ゲノムに安定に組み込まれ得るか、または一時的に見られる) 細胞を含む。

【 0 0 6 8 】

本発明のアデノウイルスベクターの生産およびパッケージングのための系および方法

本発明ポリヌクレオチドまたはそれらを含んでなるベクターを細胞システムに導入することにより生産されたパッケージング細胞は、そのアデノウイルスゲノムを含んでなるポリヌクレオチドによるトランスフェクションか、その遺伝子を含んでなる組換えアデノウイルスによる感染のいずれかにより、目的遺伝子を含んでなるアデノウイルスゲノムを細胞へ導入することによる高容量アデノウイルスベクターの作製に使用することができる。アデノウイルス / 目的遺伝子を含んでなるアデノウイルスゲノムを含んでなるポリヌクレオチドによる感染 / トランスフェクションを行い、それらの細胞と A 1 または A 2 ポリヌクレオチドに含まれる遺伝子の発現を促進する薬剤とを接触させた後、細胞内で転写レギュレーターが生産され始め、そしてそれらは制限エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子の転写を活性化する。これは次に、B ポリヌクレオチドに含まれる欠陥アデノウイルスゲノムを隣接している標的部位において働き、細胞ゲノムからのその切り出しが起こるが、これは該ゲノムの一部をなすアデノウイルス遺伝子が次に転写されるために必要な条件である。B ポリヌクレオチドからのアデノウイルス遺伝子の転写にはまた、A 2 ポリヌクレオチドにより (この場合には、それらは転写レギュレーターの活性化に応答する) 、または実際のパッケージング細胞に (これもまた転写レギュレーターの制御下にコードされている) 初期 E 1 A および E 1 B 遺伝子の発現も必要とされる。

【 0 0 6 9 】

よって、別の態様では、本発明は、
(a) 本発明による細胞と、
(b) 高容量アデノウイルス
を含んでなる、高容量アデノウイルスの生産のための系に関する。

【 0 0 7 0 】

別の態様では、本発明は、
(a) 宿主細胞を、生産を意図する高容量アデノウイルスのゲノムを含んでなるポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでトランスフェクトするか、または感染させる工程、
(b) 該トランスフェクト / 感染細胞を高容量アデノウイルスの複製およびパッケージングを可能とするのに十分な条件下で培養する工程、

(c) 高容量アデノウイルスのウイルス粒子を回収する工程および場合により、
 (d) 工程(a) ~ (c) を繰り返す工程(工程(c)で生産された高容量ウイルス粒子を次のサイクルの工程(a)で用いる)
 を含んでなり、

工程(a)で用いられる宿主細胞が、

(i) 本発明のA1ポリヌクレオチドと、アデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列とを含んでなる細胞(この場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明のBポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)、

(ii) 本発明のA2ポリヌクレオチドを含んでなる細胞(この場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明のBポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)、

(iii) 本発明のBポリヌクレオチドを含んでなる細胞(この場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明のA1ポリヌクレオチドでのトランスフェクション工程が行われ、該細胞はアデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列を含んでなる)、

(iv) 本発明のBポリヌクレオチドを含んでなる細胞(この場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明のA2ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程が行われる)、

(v) 本発明のA1ポリヌクレオチド、本発明のBポリヌクレオチド、ならびにアデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列を含んでなる細胞、および

(vi) 本発明のA2およびBポリヌクレオチドを含んでなる細胞
 からなる群から選択される、高容量アデノウイルスベクターの生産およびパッケージングのための方法に関する。

【0071】

高容量アデノウイルスベクターの生産およびパッケージングのための方法の工程(a)は、パッケージング細胞と高容量アデノウイルスまたは該アデノウイルスのゲノムを含んでなるポリヌクレオチドもしくはベクターとを接触させることを含んでなる。

【0072】

本発明による「高容量アデノウイルス」は、例えばAlba et al. (2005, Gene Therapy, 12:S18-S27)により記載されているように、アデノウイルスゲノムの、ITR 5'および3'領域とψパッケージング領域を除く総ての遺伝子を欠いていることを特徴とする、補助依存性またはガットレスと呼ばれる組換えアデノウイルスとして理解される。これらのアデノウイルスは、それらの固有のアデノウイルスゲノム配列を欠いているので、36 kDaまでの異種配列を許容する。本発明の方法に従ってこのガットレスベクターに組み込むことができる異種遺伝子としては、エリスロポエチン(EPO)、レプチン、コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)、チロトロピン放出ホルモン(TRH)、プロラクチン放出ホルモン(PRH)、メラトニン放出ホルモン(MRH)、プロラクチン放出ホルモン(PIH)、ソマトスタチン、副腎皮質刺激ホルモン(ATCH)、ソマトトロピンまたは成長ホルモン(GH)、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、チロトロピン(TSHまたは甲状腺刺激ホルモン)、プロラクチン、オキシトシン、抗利尿ホルモン(ADHまたはバソプレシン)、メラトニン、ミューラー管阻害因子、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、ガストリン、コレシストキニン(CCK)、セクレチン、PBGD、I型インスリン様成長因子(IGF-I)、II型インスリン様成長因子(IGF-II)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチド(PP)、レプチン、ニューロペプチドY、レニン、アンギオテンシンI、アンギオテンシンII、VII因子、IX因子、組織因子、VIII因子、X因子、トロンピン、V因子、XI因子、

10

20

30

40

50

X I I I 因子、インターロイキン 1 (I L - 1)、インターロイキン 2 (I L - 2)、腫瘍壊死因子 - α (T N F - α)、インターロイキン 6 (I L - 6)、インターロイキン 8 (I L - 8 およびケモカイン)、インターロイキン 1 2 (I L - 1 2)、インターロイキン 1 6 (I L - 1 6)、インターロイキン 1 5 (I L - 1 5)、インターロイキン 2 4 (I L - 2 4)、 α 、 β 、 γ インターフェロン、C D 3、I C A M - 1、L F A - 1、L F A - 3、ケモカイン (R A N T E S 1 α 、M I P - I α 、M I P - 1 β を含む)、ニューロン成長因子 (N G F)、血小板由来成長因子 (P D G F)、トランスフォーミング成長因子 - β (T G F - β)、骨形成タンパク質 (B M P)、繊維芽細胞成長因子 (F G F および K G F)、上皮成長因子 (E G F および関連のもの)、血管内皮成長因子 (V E G F)、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F)、グリア細胞由来神経栄養因子 (G D N F)、ケラチノサイト成長因子、内皮成長因子、 α - 1 抗トリプシン、腫瘍壊死因子、顆粒球およびマクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、カルジオトロフィン 1 (C T - 1)、オンコスタチン M (O S M)、アンフィレギュリン (A R)、シクロスポリン、フィブリノゲン、ラクトフェリン、組織型プラスミノーゲンアクチベーター (t P A)、キモトリプシン、免疫グロブリン、ヒルディン、スーパーオキシドジスムターゼ、イミグルセラゼ、 β - グルコセレブロシダーゼ、グルコシダーゼ - α 、 α - L - イズロニダーゼ、イズロネート - 2 - スルファターゼ、ガルスルファターゼ、 α - ヒトガラクトシダーゼ A、プロテイナーゼ阻害剤 α - 1、ラクターゼ、膵臓酵素 (リパーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ)、アデノシンデアミナーゼ、免疫グロブリン、アルブミン、A 型および B 型ボツリヌス菌毒素、コラゲナーゼ、ヒトデオキシリボヌクレアーゼ I、ヒアルロニダーゼ、

パパイン、L - アスパラギナーゼ、レビルジン、ストレプトキナーゼ、W O 0 3 3 1 1 5 5、W O 2 0 0 5 1 9 2 4 4 および W O 0 3 9 3 2 9 3 (その内容は引用することにより本明細書の一部とされる) に記載されているものなどのトランスフォーミング成長 β ペプチド (T G F - β)、干渉 RNA 分子 (s h R N A、s i R N A、m i R N A、リボヌクレオプロテイン U 1 の改変 R N A) の転写に好適な発現カセットをコードする遺伝子が挙げられる。該異種遺伝子の他、本発明で用いるガットレスアデノウイルスは、Parks et al. (1999, J. Virol., 73:8027-8034) により記載されている λ ファージゲノムに由来する s t u f f e r 配列または Sandig et al. (2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:1002-7) により記載されているような p S T K 1 2 0 に見られる s t u f f e r D N A などの s t u f f e r 領域を含み得る。これらの領域は通常、ヒトゲノムに存在し、かつ、該ヒト s t u f f e r D N A の代わりに Parks et al. (1999, J. Virol., 73:8027-8034) に記載されている λ ファージの 2 2 k b フラグメントを含んでなる対照アデノウイルスに対して異種の遺伝子の発現を増強することができる配列を含む。ヒト s t u f f e r D N A の全長は様々であるが、2 0 ~ 3 0 k b、好ましくは 2 0 ~ 2 5 k b、またはいっそうより好ましくは 2 1 ~ 2 3 k b の範囲であり、例えば 2 2 k b である。該 s t u f f e r D N A においてシスで働く配列の数は、2、3、4 またはそれ以上の中で様々であり、限定されるものではないが、1 6 . 2 k b の反復 a l p h o i d ドメイン (Smith et al., 1995, Mol. Cell. Biol., 15:5165-72 に記載) ; 例えば 6 型アデノウイルスの左端を含む 4 . 2 k b のフラグメントまたは免疫グロブリン κ の 2 コピーのマトリックス付着領域などのマトリックス付着領域 (M A R) (Betz et al., 1994, Cell, 77:239-248 に記載) ; 肝細胞制御領域 (H C R)、例えば、該 H C R を含んでなる 1 . 2 k b のフラグメント (Miao et al., 2000, Molecular Therapy, 1:522-32 に記載) ; またはニワトリリゾチームの 2 . 8 k b 領域 (Phi-Van et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10:2302-2307 により記載)、インターフェロン β の 5 ' 領域のマトリックス付着領域 (Bode et al. 1992, Science, 10:195-197 により記載) などの別のマトリックス付着領域またはテロメアもしくはセントロメア配列などの他の非コードヒト配列が挙げられる。

【 0 0 7 3 】

宿主細胞と、アデノウイルスゲノムを含んでなるポリヌクレオチドとの接触は、リン酸カルシウム、D E A E - デキストラン、ポリブレンによる D N A の共沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リボソームにより媒介される融合、レトロウイ

10

20

30

40

50

ルスによる感染およびバイオリスティックトランスフェクションによる該ポリヌクレオチドまたはそれを含んでなるベクターのトランスフェクションなど、当業者に公知の技術を用いて行う。あるいは、細胞と、増幅させたいアデノウイルスとを接触させることもでき、この場合には細胞を感染させるアデノウイルスの実際の能力により該ゲノムを細胞に導入することができる。

【0074】

「パッケージング細胞」は、本発明で記載され、少なくとも本発明のA1/A2ポリヌクレオチドまたはBポリヌクレオチドを含む任意の細胞と理解される。当業者ならば、種々のパッケージング細胞を使用できることが分かるであろう。しかしながら、本発明の1以上のポリヌクレオチド中にパッケージング細胞が存在するかしないかによって、工程(a)に先立ち、または同時に、これらの細胞と、パッケージング細胞には見られず、アデノウイルスゲノムの複製のため、ならびにアデノウイルス細胞のアセンブリに必要なポリペプチドを細胞で生産するために不可欠なエレメントを提供するために必要とされる本発明のポリヌクレオチドとを接触させるトランスフェクション工程を行わなければならない。よって、本発明のA1ポリヌクレオチドとアデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列を含んでなる細胞をパッケージング細胞として使用することができる。しかしながら、このパッケージング細胞の使用には、工程(a)に先立ち、または同時に、該細胞を本発明のBポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでトランスフェクトすることからなる工程が必要である。

10

20

【0075】

本発明のA2ポリヌクレオチドを含んでなる細胞を用いる場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明のBポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程を行うことができる。

【0076】

本発明のBポリヌクレオチドを含んでなる細胞をパッケージング細胞として用いる場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明のA1ポリヌクレオチドでのトランスフェクション工程を行うことができ、この場合、細胞は、アデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列をさらに含むことができる。

30

【0077】

本発明のBポリヌクレオチドを含んでなる細胞を用いる場合には、工程(a)に先立ち、または同時に、本発明のA2ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターでのトランスフェクション工程を行うことができる。

【0078】

また、本発明のA1ポリヌクレオチド、本発明のBポリヌクレオチドならびにアデノウイルスE1Aタンパク質および場合によりアデノウイルスE1Bタンパク質をコードする配列を含んでなる細胞、あるいは、本発明のA2およびBポリヌクレオチドを含んでなる細胞を使用することもできる。

【0079】

本発明の方法の工程(b)は、工程(a)で得られたトランスフェクト/感染細胞を高容量アデノウイルスの複製およびパッケージングを可能とする条件で維持することを含んでなる。このためには、該条件がA1またはA2ポリヌクレオチドによりコードされている転写レギュレーターの発現を可能とし、これがA1およびA2ポリヌクレオチドに存在するエンドヌクレアーゼの遺伝子のレギュレーター領域内のそれらの結合部位に、また、A2ポリヌクレオチドに存在するアデノウイルスE1AおよびE1B遺伝子のレギュレーター領域内のその結合部位に作用するようにする必要がある。これを行うため、A1およびA2ポリヌクレオチドによりコードされている転写レギュレーターが活性化可能なレギュレーターである場合には、工程(b)は細胞と転写レギュレーター活性化することができる薬剤とを接触させることを含む。好ましい実施形態では、A1およびA2ポリヌクレ

40

50

オチドによりコードされている転写レギュレーターは、従前に記載されているような G A L 4 - h P R - p 6 5 であり、この場合には、誘導剤はミフェプリストンである。

【 0 0 8 0 】

工程 (b) は、Shabram et al., (1997, Hum. Gene Ther., 8:453-465) により記載されているような H P L C に基づく R e s o u r c e Q 法などの標準的手段によって、または間接的に細胞内の細胞傷害作用の視覚的検査によって決定されるような、ウイルス粒子の濃度が十分高くなるのに必要な時間行う。場合により、細胞培養は新鮮培地の添加を含んでもよい。

【 0 0 8 1 】

工程 (c) では、工程 (b) で生じたアデノウイルスを細胞培養から回収する。これを行うため、当業者に公知のいずれかの方法 (トリプシン処理および遠心分離または濾過) によって培養培地の細胞を分離し、これらの細胞を不活性な溶液中で溶解させ (冷凍 / 解凍サイクル、ホモジナイゼーション、音波処理、キャビテーション、洗剤および類似品の使用)、アデノウイルス粒子を、C s C l 勾配での超遠心分離などの既知の方法により、またはイオンクロマトグラフィーと金属キレートアフィニティークロマトグラフィーの組合せ (Huyghe et al., 1996, Hum. Gene Ther., 6:1403-1416)、イオン交換クロマトグラフィーとゲル分画クロマトグラフィーの組合せ (W O 0 7 0 5 9 4 7 3)、ジエチルアミノエチル (D E A E) セルロースでのクロマトグラフィー (Haruna et al., 1961, Virology 13, 264-267)、ヒドロキシルアパタイトでのクロマトグラフィー (U S 2 0 0 2 / 0 0 6 4 8 6 0) ならびにソフトゲル (アガロース)、透過クロマトグラフィーを含む合成ポリマーに基づく多孔質ポリマー (フラクトゲル) および硬質カプセル中のソフトゲルに基づく材料 (例えば、C e r a m i c a H y p e r D (登録商標) F) (Rodrigues, 1997, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 699:47-61) などの種々のタイプのクロマトグラフィーにより精製することが必要である。

【 0 0 8 2 】

任意の工程 (d) は、工程 (a) ~ (c) を 1 回または数回繰り返すことからなる。これを行うため、サイクルの各工程 (a) では、前のサイクルの工程 (c) で得られたアデノウイルス粒子を出発材料として用いる。このようにして、本発明のプロセスを数回繰り返して、各サイクルでより多数のアデノウイルス粒子を得ることができる。

【 0 0 8 3 】

以下、本発明を、本発明の範囲の非限定的な例示として示される下記実施例に基づいて説明する。

【 実施例 】

【 0 0 8 4 】

実施例 1 : E 1 a および E 1 b アデノウイルス遺伝子の、また、I - S c e I 制限酵素の誘導発現のための p G a l 4 - 2 R U - E 1 - S c e I プラスミドの構築

本実施形態では、本発明で定義されるような A 2 ポリヌクレオチドを含む p G a l 4 - 2 R U - E 1 - S c e I プラスミド (図 1 A) を、アデノウイルス遺伝子 E 1 a および E 1 b の発現の、転写レベルでの制御のために具体的に設計した。この構築物内の、同じタイプの転写制御下に、I - S c e I 制限エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子が含まれていた。この A 2 ポリヌクレオチド内に含まれるヌクレオチド配列から、E 1 a、E 1 b および I - S c e I 遺伝子の発現を制御する転写レギュレーターが構成的に発現される。

【 0 0 8 5 】

本発明に含まれる転写調節のメカニズムは抗プロゲスチン系ミフェリプリストンにより媒介される (Burcin et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 355-360)。この調節は内因性ヒトホルモンに対して感受性がないが、ヒトにおいて二次的作用を避けるのに十分な低用量の合成抗プロゲスチン (R U 4 8 6) の存在下で活性な、融合タンパク質を介して起こる。

【 0 0 8 6 】

p G a l 4 - 2 R U - E 1 - S c e I プラスミドの構築に基づき、市販の系 G e n e S

w i t c h (商標) (Invitrogen, Carlsbad CA92008 USA, カタログ番号K1060-01およびK1060-2)が用いられている。この系は、A 2 ポリヌクレオチドを含むプラスミドの設計に必要な総ての遺伝成分を提供する。

【0087】

G e n e S w i t c h (商標)系の第1の成分は、転写アクチベーターとして働く融合 G A L 4 - h P R - p 6 5 タンパク質をコードする p S w i t c h ベクターである (図 2 A)。このタンパク質はサッカロミセス・セレピシエの G A L 4 タンパク質の D N A 結合ドメイン (D B D) (Laughon and Gesteland, 1984, Mol. Cell Biol., 4: 260-267; Marmorstein, et al., 1992, Nature, 356: 408-414)、ヒトプロゲステロン受容体の末端切断型リガンド結合ドメイン (h P R - L B D) (Kastner, et al., 1990, Embo J., 9: 1603-1614; Wang, et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8180-8184)およびヒト N F - κ B タンパク質の活性化ドメイン (A D) (Burcin, et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 355-360; Deloukas and van Loon, 1993, Hum. Mol. Genet., 2: 1895-1900)に分けられる。レギュレータータンパク質の発現は、サッカロミセス・セレピシエの G A L 4 の活性化配列 (U A S : 上流活性化配列) (Giniger et al., 1985, Cell, 40: 767-774; Wang et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8180-8184)と単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子 (P_{t_k}) の最小プロモーターの結合に由来するハイブリッドプロモーターの制御下にある。このプロモーターの活性化領域は、4 コピーの配列 5' - (T / C G G A G T A C T G T C C T C C G - 3' (配列番号 1) を含む。それらはそれぞれ、G A L 4 転写因子の D N A 結合ドメイン 2 分子に対して結合部位として働く (Marmorstein, et al., 1992, Nature, 356: 408-414)。

【0088】

G e n e S w i t c h (商標)の第2の成分は、目的遺伝子の発現を制御する p G e n e / V 5 - H i s A プラスミドである (図 2 B)。この場合、転写を制御するハイブリッドプロモーターは、G A L 4 転写因子の6つの結合配列および E 1 b (P_{E 1 b}) アデノウイルス遺伝子の T A T A ボックス配列 (Lillie and Green, 1989, Nature, 338: 39-44) からなる。

【0089】

ミフェリプリストンの不在下では、この系はチミジンキナーゼ最小プロモーターからレギュレーター融合 G A L 4 - h P R - p 6 5 タンパク質を構成的に発現する。このタンパク質は主として核に局在し、不活性である。インデューサーミフェリプリストンまたはその類似体 R U 4 8 6 を添加した際、これは G A L 4 - h P R - p 6 5 の h P R - L B D 領域と高い親和性で結合し、タンパク質の二量体化およびその活性型への変換をもたらすコンフォメーション変化が起こる。これらのホモ二量体は、p G e n e / V 5 - H i s A および p S w i t c h プラスミドに存在する G A L 4 の結合配列 (U A S) と相互作用し、目的遺伝子と実際の転写因子をコードする遺伝子の転写を活性化する (図 2 C)。

【0090】

本発明で示唆される、A d 5 の E 1 領域と I - S c e I エンドヌクレアーゼの遺伝子を誘導系 G e n e S w i t c h (商標)の制御下に置くというアイデアに基づき、まず、調節系と 505 番 ~ 3511 番の間のアデノウイルスゲノムの配列 (A d 5 (505 ~ 3511)) (GenBank: AC000008) とおよび I - S c e I のコード遺伝子の種々の組合せを設計した。これらの組合せにおいて、調節のメカニズムは1つまたは2つのプラスミドの使用に基づき、ここで、遺伝子 E 1 および遺伝子 I - S c e I はなお、単一のプロモーターの制御下にあるか、または同じもしくは異なる配向で配置された異なるプロモーターの制御下にある (図 3 A)。これらの組合せをそれぞれ、それらの E 1 領域および遺伝子 I - S c e I の発現調節能およびその細胞ゲノム内への安定な組込み能を決定するために試験する。これらの総てから、p G a l 4 - 2 R U - E 1 - S c e I 構築物は、ヘルパーの非依存的高容量アデノウイルス生産系の設計におけるその適用に最も好適であると考えられた。

【0091】

10

20

30

40

50

下記の構築物の増幅に用いた細菌株は大腸菌(*Escherichia coli*) DH5 α および大腸菌 S T B L 2 である。増殖は、選択培地としての、アンピシリン (100 μ g / ml) (Sigma-Aldrich) を添加した L u r i a B e r t a n i 培地 (L B) (Sigma-Aldrich, 28760 Madrid, Spain) で、DH5 α 株の場合は 37、S T B L 2 株の場合は 30 で行った。これらの細菌を、最初に Hanahan (1983, J. Mol. Biol, 166: 557-580) により記載された C a C l₂ プロトコールに従って形質転換させた。これを行うため、10 ~ 20 ng のプラスミド DNA を 100 μ l のコンピテント細胞と混合し、これを氷中で 30 分間維持した。その後、プロセスの効率を高めるために、この混合物を 42 で 1 分間インキュベートし、すぐに氷に移し、これをさらに 2 分間インキュベートした。最後に、1 ml の L B 培地を加え、攪拌下、37 で 1 時間インキュベートした。

10

【0092】

プラスミドの精製、およびアガロースゲルで分離した後の制限酵素による消化から生じた DNA フラグメントの精製は、それぞれ F X m i c r o p l a s m i d p r e p キット系 (GE Healthcare Europe, 8290 Barcelona, Spain) および Q I A q u i c k G e l 抽出キット (Qiagen, Valencia CA91355, USA) を用い、製造業者の推奨に従って行った。

【0093】

DNA フラグメントのクローニングでは、連結反応を、1 U の T 4 - DNA リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA01915-5599, USA) および 2 μ l の 10 倍反応バッファー (New England Biolabs) を含む最終量 20 μ l として設計した。平滑末端を有するフラグメントの場合には、反応は、1 U の T 4 - DNA リガーゼ (New England Biolabs)、2 μ l の 10 倍反応バッファー (New England Biolabs) および 2 μ l の 50% P E G 4000 を含む最終量 20 μ l として設計した。総ての場合で、これらの反応は総て、周囲温度で 2 時間インキュベートし、対応する大腸菌株に導入する前に 65 で 10 分間不活性化した。組換えクローンはベクターによりコードされている耐性マーカーに基づいて選択し、制限エンドヌクレアーゼによる消化および 1% アガロースゲルでの電気泳動によって確認した。

20

【0094】

p G a l 4 - 2 R U - E 1 - S c e I プラスミドの合成プロセスにおいて設計された P C R 反応は総て、1 U の T a q ポリメラーゼ酵素 (BioTaq, Bioline, London NW2 6EW, UK)、P C R バッファー (Bioline)、M g C l₂ 4 mM、0.4 mM の各 d N T P、10 p m o l の各プライマー、DNA および最終量 50 μ l までの無菌脱イオン水の存在下で行った。増幅条件は次の通りとした：95 で 4 分の変性 1 回；94 で 50 秒の変性、50 で 40 秒のプライマーハイブリダイゼーションおよび 72 で 40 秒の伸長を 29 回；72 で 5 分の最終伸長 1 回。増幅産物の分析のため、サンプルを 1.5 μ l のローディング溶液 (蒸留水中 0.25% のプロモフェノールブルー；40% グリセロール；100 mM E D T A) と混合し、それらを T A E 1 倍バッファー (40 mM T r i s B a s e；20 mM 氷酢酸；1 mM E D T A、pH 8.0) を用いたアガロースゲル (1%) での電気泳動により分析し、臭化エチジウム (0.5 μ g / ml) 染色により DNA を表した。

30

40

【0095】

p G a l 4 - 2 R U - E 1 - S c e I 調節プラスミドは下記のような 5 工程で設計した。

【0096】

1) p G e n e - リンカー R U 2 ベクターの構築：

リンカー R U 2 を含めるために、p S w i t c h プラスミドを S b f I (38 番) および B a m H I (2484 番) 制限酵素で線状化した。これは下記のプライマーから予め合成したものである。

リンカー R U - 1：

5' -GGACCACCAAGGATCCTCTAGAACCGTTTAAACACCACTAGTCCAACGCGTGATATCACCGCGGCCGCA-3' (

50

配列番号 2)

リンカー R U - 2 :

5' -GATCTGCGGCCGCGGTGATATCACGCGTTGGACTAGTGGTGTTTAAACGGTTCTAGAGGATCCTTGGTGGTCTCTGC
A-3' (配列番号 3)

【 0 0 9 7 】

アニーリング反応では、10 μ l の各プライマーを 50 mM 濃度でバッファー溶液 (50 mM Tris - HCl pH 8.0 ; 100 mM NaCl ; 1 mM EDTA) に混合した。反応条件は次の通りとした : 95 で 2 分および 52 10 分。次に、リンカー R U 2 プライマーを、T4 酵素キナーゼポリヌクレオチドを用い、製造業者 (New England Biolabs) の推奨に従ってリン酸化した。この反応物を 37 で 30 分インキュベートし、65 で 15 分間不活性化した。その後、リンカー R U 2 と p Switch ベクターとの連結を行い、これを大腸菌 DH5 α に形質転換させた。得られた構築物を p Switch - リンカー R U 2 と呼んだ。

10

【 0 0 9 8 】

次に、p Switch - リンカー R U 2 ベクターを FspI 酵素 (p Switch の 6623 番) および ApaI (p Switch の 2721 番) で消化し、p Switch ベクターの隣接配列のリンカー R U 2 ドラッグ部分遊離させた。このフラグメントを、予めこれらの同じ酵素で消化した p Gene V5 - His A ベクターにサブクローニングした。得られたベクターは p Gene - リンカー R U 2 と呼ばれ、p Gal4 - 2 R U - E1 - Scel ベクターの構築の基礎となる。

20

【 0 0 9 9 】

2) アデノウイルスの E1 領域のクローニング :

p GL3 - Basic ベクター (Groskreutz and Schenborn, 1997, Methods Mol. Biol., 63: 11-30) から、BamHI および XbaI で消化することにより、262 pb のフラグメントが遊離し、これは SV40 のポリアデニル化シグナル (SV40 pA) を含んでいた。この配列を、予めこれらの同じ酵素で消化した p Bluescript II KS (+) プラスミド (Stratagene, La Jolla CA92037, USA) にクローニングし、PBS - SV40 pA プラスミドを得た。

【 0 1 0 0 】

並行して、p Gene V5 - His A プラスミドを SalI (151 番) および PvuII (895 番) 酵素で順次消化したところ、ウシ成長ホルモン (BGHPA) のポリアデニル化シグナルを単離することができた。この 744 pb のフラグメントを、予め SalI および BamHI で線状化し、そして、その BamHI 末端を予めクレノウを用い、製造業者 (DNA ポリメラーゼ I、ラージ (クレノウ) フラグメント ; New England Biolabs) の推奨に従って平滑化した PBS - SV40 pA プラスミドにクローニングした。このようにして、BamHI 制限酵素の標的配列により連結されたポリアデニル化シグナル BGH および SV40 を含んでなる挿入部が作出された。

30

【 0 1 0 1 】

次に、p Gene Linker R U 2 - 2 pA プラスミドを合成した。これを行うため、PBS - BGHPA - SV40 pA ベクターを XbaI で消化したところ、2つのポリアデニル化配列を含む 623 pb のフラグメントが遊離し、これを p Gene - リンカー R U 2 プラスミドのリンカー R U 2 に存在するユニークな XbaI 部位内にクローニングした。挿入部が正しい向き (5' - SV40 pA - BGHPA - 3') であることを、PmeI で制限することにより確認した。

40

【 0 1 0 2 】

Ad5 の E1 領域をプライマー :

ad19 5' -GAGTGCCAGCGAGTAGAGTT-3' (配列番号 4) および

ad22 5' -GAATTCTCAATCTGTATCTTCATC-3' (配列番号 5)

を用いた PCR により増幅した。

【 0 1 0 3 】

50

得られた 3 k b の産物を P C R p G e m T - E a s y 産物 (Promega Biotech Iberica, 28108 Madrid, Spain) 用の特異的ベクターにクローニングした。E c d R I で消化することにより該 E 1 領域を精製し、p G e n e L i n k e r R U 2 - 2 p A ベクターの E c o R I 標的内にサブクローニングし、B G H p A ポリアデニル化シグナルから「下流に」配置した。得られたプラスミドを p G e n e L i n k e r R U 2 - 2 p A - E 1 と呼んだ。

【 0 1 0 4 】

3) G A L 4 - D B D / h P R - L B D / p 6 5 - A D 遺伝子 (転写レギュレーター) およびその自己調節プロモーター領域のクローニング

p S w i t c h ベクターを S b f I (3 8 番) および B a m H I (2 4 8 5 番) 制限酵素で消化し、転写レギュレーターに対する結合配列 (U A S 領域)、キナーゼタンパク質の最小プロモーター (P t k) および転写アクチベーター G A L 4 - D B D / h P R - L B D / p 6 5 - A D をコードする遺伝子を単離した。この 2 . 4 k b の S b f I - B a m H I フラグメントを、予め同じ酵素で消化した p G e n e L i n k e r R U 2 - 2 p A プラスミドにクローニングしたところ、ポリアデニル化配列 S V 4 0 p A の欠失が起こった。得られた構築物を p G e n e L i n k e r R U 2 - G a l 4 - B G H p A - E 1 の名称とした。

【 0 1 0 5 】

この第 2 のポリアデニル化シグナルを回収するため、S V 4 0 p A 配列を、B a m H I で消化することにより、最初の p G e n e L i n k e r R U 2 - 2 p A 構築物から精製した。0 . 2 k b のフラグメントを p G e n e L i n k e r R U 2 - G a l 4 - B G H p A - E 1 プラスミドの単一の標的 B a m H I 内にクローニングした。

【 0 1 0 6 】

4) I - S c e I 遺伝子のクローニング

I - S c e I エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子を p I - S c e I プラスミド (Chouluka, et al., 1994, C. R Acad. Sci, III, 317: 1013-1019) からプライマー :

S c e I - b 1 5' -AAACCATGGGATCAAGATCGC-3' (配列番号 6) および

S c e I - b 2 5' -CCCTCTAGATTATTTTCAGGAAAGTTTCGGAGGA-3' (配列番号 7)

を用いた P C R により得た。それを p G e m T - E a s y にクローニングした後、それを N o t I 制限酵素で消化することにより遊離させた。精製したフラグメントの末端を、クレノウ断片を用い、製造業者 (New England Biolabs) の推奨に従って平滑末端化した後、S p e I 制限酵素により 2 回目の消化を行った。最後に、精製した 0 . 8 k b のフラグメントを p G e n e V 5 - H i s A ベクターの S p e I (4 7 8 番) 標的と N o t I (5 2 2 番、クレノウで処理) 標的の間にクローニングした。クレノウによる処置は N o t I 標的の欠失を必然的に伴った。得られたプラスミドを p G e n e - I S c e I と呼んだ。

【 0 1 0 7 】

p G e n e - I S c e I プラスミドを X b a I で消化し、E 1 b アデノウイルス遺伝子 (P_{E1B}) の最小プロモーターの転写制御下にエンドヌクレアーゼ I - S c e I の遺伝子を含む 1 . 2 k b のフラグメントを遊離させた。このフラグメントを p G e n e L i n k e r R U 2 - G a l 4 - 2 p A - E 1 プラスミド内のポリアデニル化配列 B G H と E 1 領域の間に局在する S p e I 適合標的内にサブクローニングした。得られた構築物を p G e n e L i n k e r R U 2 - G a l 4 - 2 p A - I S c e I - E 1 と呼んだ。

【 0 1 0 8 】

5) I - S c e I およびアデノウイルス E 1 領域の転写の制御のための二重誘導プロモーターのクローニング

転写アクチベーターと結合するレギュレーター配列 (U A S) と最小プロモーター P_{E1B} を含む p G e n e V 5 - H i s A ベクターの領域は、プライマー :

P R U - 1 5' -AATACTAGTCCGAGCTCTTACGCGGGTC-3' (配列番号 8)、および

P R U - 2 5' -AATACGCGTGGTGGCCTGTGAAGAGAAAAA-3' (配列番号 9)

を用いた P C R による増幅によって得、それを p G e m T - E a s y ベクターにサブクロー

10

20

30

40

50

ーニングした。その後、N o t Iで消化することにより挿入部を遊離させ、それをG e n e L i n k e r R U 2 - G a l 4 - 2 p A - I S c e I - E 1構築物の、I - S c e Iの最小プロモーターP_{E 1 B}とアデノウイルスE 1領域の間にあるN o t I標的内にサブクローニングした。得られた構築物をp G a l 4 2 R U - S c e I - E 1と呼んだ(図3 B)。

【0109】

実施例2：パッケージングシグナルと遺伝子E 1 aおよびE 1 bが欠失した、I - S c e Iエンドヌクレアーゼをコードするアデノウイルスゲノムを哺乳類細胞に組み込むためのp R C A d 2プラスミドの構築

アデノウイルスゲノムを含む配列内で、他のウイルス遺伝子の発現をより強く制御するために、パッケージング配列と初期遺伝子E 1 aおよびE 1 bに相当する領域を欠失させた。同様に、このアデノウイルス配列は、両末端とも、それらの標的配列(T A G G G A T A A C A G G G T A A - 配列番号8)の大きさおよびそれらの高い特異性のために、その細胞ゲノム内の配列をトランスフェクトのために認識しないサッカロミセス・セレピシエのI - S c e I制限エンドヌクレアーゼの認識配列(Anglana and Bacchetti, 1999, Nucleic Acids Res., 27: 4276-4281)を境界とする。これらの配列を挿入することで、I - S c e Iタンパク質の存在下でのみウイルスゲノムの放出が助長される。このような消化により、ウイルスDNAの適切な転写および複製に必要なアデノウイルスのI T R末端が遊離状態で残る。

【0110】

最後に、この構築物の5'末端は放線菌ファージのP h i C 3 1レコンビナーゼにより媒介されるプロセスである細胞ゲノム内へのプラスミドの組み込みを促進するa t t B配列を含んでいた。この酵素は特異的な一方向を生じ、他のレコンビナーゼで見られるものよりも高い正味の組み込み頻度を有するので、哺乳類細胞における外因性DNAの組み込み系として大きな可能性を持つ(Thyagarajan et al., 2001, Mol. Cell. Biol., 21: 3926-3934)。P h i C 3 1インテグラーゼの認識配列はa t t Bおよびa t t Pと呼ばれ、配列が異なる。組み込み反応の後、生じたa t t配列は元のa t t Bおよびa t t P配列と異なり、二次的な組換え反応が阻止される。ヒト細胞において、P h i C 3 1は、a t t Pと部分的同一性を有する配列(p s e u d o - a t t Pと呼ばれる)が存在するゲノム点で組換え事象を媒介することができる(図4)。Thyagarajan et al. (2001, 前掲)によれば、p s e u d o - a t t P配列の総数は $10^2 \sim 10^3$ の間であり、これにより組み込み頻度は相同組換えにより媒介される組み込みの場合よりも2~3倍高くなり、さらにはC r eレコンビナーゼなどの他の特異的レコンビナーゼにより媒介されるものよりも10~100倍高くなる。

【0111】

下記の構築物の増幅のために用いた大腸菌株はD H 5 α 、S T B L 2およびB J 5 1 8 3であった。これらの細菌を、実施例1に記載のC a C l₂プロトコールに従って形質転換した。増殖は、選択培地としてアンピシリン(100 μ g/ml)(Sigma-Aldrich)を添加したL u r i a B e r t a n i培地(L B)にて、D H 5 α およびB J 5 1 8 3株の場合には37℃、大腸菌S T B L 2の場合には30℃で行った。

【0112】

p R c A d 2プラスミドの合成プロセスにおいて設計されたP C R反応は総て、実施例1に記載のものと同一条件で行った。核酸の精製および操作に適用した一般法も実施例1に記載されている。

【0113】

p R c A d 2ベクターは下記の4工程で設計した。

【0114】

1) a t t B - I S c e I - A d (1 ~ 1 9 0) 配列のクローニング

p R c A d 2ベクター構築の第一工程は、p T A - a t t Bプラスミド(Groth, et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 5995-6000)を鋳型として用い、プライマー：

10

20

30

40

50

a t t B - P 1 5' -AGATCTGTCGACGATGTAGGTCACGGTCTCCGAAGC-3' (配列番号 11) および

a t t B - P 2 5' -TTAATTAATTACCCTGTTATCCCTAGTCGACATGCCCCGCGTGA-3' (配列番号 12)

を用いた P C R による増幅であった。この増幅フラグメントを、P C R p G e m T - E a s y 産物 (Promega) に対する特異的ベクターに、製造業者の推奨に従ってサブクローニングした。この a t t B - P 2 プライマーはサッカロミセス・セレビスエの I - S c e I 制限酵素の認識配列を有するリンカーを含む。

【0115】

a t t B - I - S c e I フラグメント (316 pb) を p G e m T - E a s y ベクターから、制限酵素 N c o I および P a c I で消化することにより遊離させ、それを予めこれらの同じ酵素で消化した p G e m T / A 6 プラスミドにサブクローニングした。p G e m T / A 6 は、プライマー：

a d 6 3 : 5' -AGATCTAGGGATAACAGGGTAATCATCATCAATAATATACCTT-3' (配列番号 13) および

a d 6 4 : 5' -AGATCTCGGCGCACACCAAAAACGTC-3' (配列番号 14)

を用いた、1番～190番の間に含まれるアデノウイルスゲノム血清型5の領域の P C R により増幅し、それを p G e m T - E a s y ベクターにクローニングすることによる。

【0116】

得られた構築物 p G e m T / a t t B - A 6 において、I - S c e I の制限標的は a t t B 領域とアデノウイルスゲノムの1番の間に挿入されていた。

【0117】

2) A d (3528～4459) 領域のクローニング

512 pb の挿入部 a t t B - I S c e I - A d (1～190) を B g l I I 消化により切り出し、それを p R C / A 4 - A 5 ベクターにサブクローニングした。このベクターはプライマー：

a d 5 7 5' -AGATCTCGTGGCTTAAGGGTGGGAAA-3' (配列番号 15) および

a d 5 8 : 5' -TCTAGATTATATGGCTGGGAACATAGCC-3' (配列番号 16) を用いた、3528番～4459番の間に含まれるアデノウイルス配列を増幅し、それを、哺乳類細胞での選択のためのアンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子をさらに含む真核生物発現 p R C / R S V (Invitrogen) を用いてクローニングした産物である。p R C / R S V に A d (3528～4459) 配列を挿入するために、プライマー a d 5 7 および a d 5 8 の5'末端にそれぞれ B g l I I および X b a I 標的配列に含めた。この挿入部をベクターの13番～701番の間に組み込まれていた。

【0118】

ベクター p R C / A 4 - A 5 に a t t B - S c e I - A d (1～190) フラグメントを連結することから得られた構築物を p R C / A 6 - A 5 と呼んだ。このようにして、アデノウイルスの E 1 領域は欠失され、190番～3528番の間に存在すると思われた。

【0119】

3) A d (34901～35938) 領域のクローニング

アデノウイルスゲノムの3'末端 (34901番～35938番) をプライマー：

a d 5 9 : 5' -TCTAGATTATAGCTATGCTAACCAGCGTAG-3' (配列番号 17) および

a d 6 5 : 5' -GGTACCTAGGGATAACAGGGTAATCATCATCAATAATATACCTT-3' (配列番号 18)

を用いて増幅した。

【0120】

I - S c e I 制限酵素の標的配列 (下線) を a d 6 5 プライマーの5'末端に含めた。両プライマーはそれらの5'に X b a I (a d 5 9) および K p n I (a d 6 5) の制限標的を含む。この増幅産物である1060 pb のフラグメントを、p R C / A 6 - A 5 ベ

10

20

30

40

50

クターに挿入された A d (3 5 2 8 ~ 4 4 5 9) 領域の「下流」サブクローニングを容易にするためにこれらの酵素で切断した。得られた構築物を p R C / A 6 - A 7 と呼んだ。

【 0 1 2 1 】

4) p R c A d 2 プラスミドの取得

p R C / A 6 - A 7 プラスミドを X b a I で線状化し、製造業者の推奨に従い、アルカリ性ホスファターゼ (アルカリ性ホスファターゼ、ウシ腸管 (C I P) ; New England Biolabs) で脱リン酸化した。

【 0 1 2 2 】

同様に、p T G 3 6 0 2 プラスミド (Chartier, et al., 1996, J. Virol, 70: 4805-4810) を P a c I で消化し、アデノウイルス血清型 5 ゲノムの完全コピーを遊離させた。その末端をアルカリ性ホスファターゼで脱リン酸化することにより、その再循環を回避した。

10

【 0 1 2 3 】

線状化ベクター p R C / A 6 - A 7 と p T G 3 6 0 2 プラスミドの遊離した挿入部の双方を同時に用い、大腸菌 B J 5 1 8 3 (B J 5 1 8 3 エレクトロポレーションコンピテント細胞 ; Stratagene) のエレクトロコンピテント細菌株に導入を行った。これらの細胞は特に、目的遺伝子を含む導入ベクター (このベクターはアデノウイルスゲノムを含む) の相同配列間の組換えプロセスを促進するように設計される。この場合、両 D N A フラグメント (A d (3 5 2 8 ~ 4 4 5 9) および A d (3 4 9 0 1 ~ 3 5 9 3 8 領域) に含まれる相同領域が、その分析に p R C / A 6 - A 7 ベクター内およびウイルスの 4 4 5 9 番の後へのアデノウイルスゲノムの挿入を必要とする該組換えプロセスに好都合である (図 5) 。

20

【 0 1 2 4 】

エレクトロポレーションプロセスは製造業者の推奨に従い、Gene Pulser (Biorad) エレクトロポレーション系にて、以下のパラメーター : 電圧 2 . 5 k V 、抵抗 2 0 0 Ω 、容量 2 5 μ F 、パルス持続時間 5 分に設定して行った。最後に、1 m l の L B 培地を加え、この懸濁液を 3 7 ° C で 1 時間インキュベートした。次に、形質転換細胞の連続希釈液を作製した。それらを p R C / A 6 - A 7 プラスミドの選択抗生物質としてアンピシリン (1 0 0 μ g / m l) を添加した培養培地のプレートに播種した。インキュベーションを 3 7 ° C で耐性クローンが現れるまで継続した。

30

【 0 1 2 5 】

H i n d I I I を用いた制限分析により、得られたクローンの 1 つだけでアデノウイルスゲノムの適切な挿入部が確認され、これを p R c A d 2 と呼んだ。

【 0 1 2 6 】

この p R c A d 2 プラスミドは、E 1 領域に相当する 1 9 0 番 ~ 3 5 2 8 番の間に位置する領域を除き、完全なアデノウイルスゲノムを含む。この配列は I - S c e I の制限標的を境界とし、その 5 ' 末端に a t t B 配列を有する (図 5) 。

【 0 1 2 7 】

実施例 3 : 高容量アデノウイルスベクターの生産およびパッケージングのための安定な細胞系統の構築および特性決定

40

本発明は、高容量アデノウイルスベクターの生産およびパッケージングのために設計された安定な細胞系統の生産を提案する。これらの細胞はウイルスの複製、アセンブリおよび機能に必要な成分の総てを産生することができるであろう。

【 0 1 2 8 】

高レベルのウイルスタンパク質により行う細胞傷害性のため、ミフェリプリストンのより誘導可能な転写調節系は遺伝子 E 1 a および E 1 b の発現を制御し、また、残りのアデノウイルスゲノムの発現および複製の命令も行う。この同じ系が、真核細胞のゲノムに組み込まれたアデノウイルスゲノムの遊離に必要な I - S c e I 制限エンドヌクレアーゼの生産も制御し、これは第 2 のレベルの転写制御を提供する。この誘導 (従って、ウイルス粒子の生産) は、培養培地にミフェリプリストンまたはその類似体 R U 4 8 6 を添加した

50

際に始まる。

【0129】

生産プロセス中にヘルパーウイルスを使用する必要がないので、本発明者らにより開発された系によれば、ヘルパーウイルスのゲノムコピーを含むウイルス粒子の望ましくない残留混入のないウイルス抽出液を生産することができる。

【0130】

本実施形態では、肺癌腫 A 5 4 9 のヒト細胞系統を、非依存性高容量ヘルパーベクターの生産系の設計に用いた。Giard et al (1973, J. Natl. Cancer Inst., 51: 1417-1423) により誘導され、その後、Lieber et al. (1976, Int. J. Cancer, 17: 62-70) により深く特性決定されたこの細胞系統は、アデノウイルス感染に対して感受性が高く、ウイルス生産系統として高い能力を与える (Smith et al., 1986, J. Clin. Microbiol, 24: 265-268)。これらの細胞はそれらの形態に変動なく容易に培養することができ、重要な分化シグナルを示さずに 10 ~ 14 日の間生存を維持する。

10

【0131】

実施例 3 . 1 : アデノウイルスゲノム (B ポリヌクレオチド) の安定な組込みのための、p R c A d 2 プラスミドのトランスフェクションによる細胞系統の作出

高容量アデノウイルスの複製、キャプシド形成およびパッケージングに含まれるウイルスタンパク質の合成を実施可能なパッケージング細胞系統を生産するため、A 5 4 9 細胞を 10 cm^2 プレートにて 37、5 % CO_2 で、集密度 80 % に達するまでインキュベートした。これらの細胞をリポフェクタミンにより、3 μg の p R c A d 2 構築物 (ネオマイシン耐性を与える (neo^r)) と、放線菌 P h i C 3 1 ファージのインテグラーゼをコードし、細胞ゲノムへのプラスミドの安定な組込みを促進する 1 μg の p C M V - I n t プラスミド (Groth et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 5995-6000) とで同時にトランスフェクトした (図 6 A)。

20

【0132】

両プラスミドの DNA を予め O P T I - M E M 血清を含まない培地 (G i b c o (登録商標) : Invitrogen, Carlsbad CA92008, USA) 500 μl で希釈した。DNA と陽イオン脂質の間の複合体の形成を促進するために、試薬 P l u s R e a g e n t (Invitrogen) を 1 : 0 . 75 比 (DNA : P l u s R e a g e n t) で加えた。周囲温度で 5 分インキュベートした後、6 μl のリポフェクタミン L T X (Invitrogen) を加え、この混合物を再び周囲温度で 25 分インキュベートした。次に、この希釈液を細胞培養培地 : ウシ胎児血清 (G i b c o (登録商標)) ; 1 % L - グルタミン (0 . 85 % Na C l 中 200 m M ; Lonza Iberica, 08006 Barcelona, Spain) ; および 1 % ペニシリン / ストレプトマイシン (0 . 85 % Na C l 中 10 m g / m l ; G i b c o (登録商標)) を添加した D M E M に滴下した。37、5 % CO_2 で 4 時間インキュベートした後、培地を新鮮な D M E M 培地に置き換え、インキュベーションをさらに 24 時間継続した。最後に、培地を除去し、1 倍リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) (G i b c o (登録商標)) で洗浄した後に、トランスフェクト細胞をトリプシン (トリプシン - E D T A ; G i b c o (登録商標)) ですすぎ、それらを周囲温度にて 1250 r p m で 5 分遠心分離した。細胞沈殿を 6 m l の培養培地に再懸濁させ、それらを 3 枚の 60 cm^2 プレートに分注した。新鮮培地 (この場合、ネオマイシンの類似体である選択抗生物質 G 4 1 8 を 600 $\mu\text{g} / \text{ml}$ で添加) を加えた。抗生物質耐性の単離クローンが現れるまで (2 ~ 3 週間)、2 日おきに培養培地を交換した。クローンを、トリプシンを用いて浮上させ、それらを選択培地の入った 0 . 3 cm^2 ウェルに移した。80 % の集密度に達するまでインキュベーションを続けた後、それらをより表面積の大きなウェルに移した。一連の工程の後、G 4 1 8 耐性クローンが単離され、これを p R c - 1 と呼んだ。クローンの安定性を証明するため、これらの細胞を 4 か月培養下で維持したところ、それらの形態または生存率に変化は見られなかった。

30

40

【0133】

単離されたクローンにおける p R c A d 2 プラスミドの組込みを確認するために、p R

50

c - 1 クローンのゲノム DNA を Q I A m p DNA ミニキット (Qiagen) 系で製造業者の推奨に従って抽出した。この DNA をネステッド P C R アッセイで用い、アデノウイルス遺伝子 I I I a、I V、プロテアーゼをコードする遺伝子およびウイルスポリメラーゼをコードする遺伝子の存在を検出した。この検出に用いたプライマーは次のものであった。

【 0 1 3 4 】

【 表 1 】

遺伝子	プライマー	配列	Tm PCR	配列番号	
IIIa	IIIa1	5'-AGAGCCAGCCGTCGCGCCTTA-3'	55 °C	19	10
	IIIa2	5'-CGCGGTCGCCTGTGGGAGCCC-3'		20	
	IIIa3	5'-GGTTGCACTAAACGCCTTCC-3'	54 °C	21	
	IIIa4	5'-AGCCCCTGCAAGTTTTTGAA-3'		22	
IV	IV1	5'-CCTCTAGTTACCTCCAATGGC-3'	45 °C	23	
	IV2	5'-AGTAACTTTAGTTTGCAAGGA-3'		24	
	IV3	5'-GGGCAACACACTCACCATGC-3'	55 °C	25	
	IV4	5'-ACATGCAAAGGAGCCCCGTA-3'		26	
プロテアーゼ	Pr1	5'-ACAGCTGCCGCCATGGGCTCC-3'	55 °C	27	20
	Pr2	5'-GGGCGAGTGGCGCTCCAGGAA-3'		28	
	Pr3	5'-GCTTTTCTGACCAGCGACT-3'	51 °C	29	
	Pr4	5'-CACTGTGGCTGCGGAAGTAG-3'		30	
ポリメラーゼ	POL1	5'-CTGGCCTGGACGCGAGCCTTT-3'	55 °C	31	
	POL2	5'-CAGGGTCCTCGTCAGCGTAGT-3'		32	
	POL3	5'-TACGGGGACACGGACAGCCTT-3'	60 °C	33	
	POL4	5'-CTTGCGCGCAGCTTGCCCTT-3'		34	

【 0 1 3 5 】

ネステッド P C R の外部プライマー（プライマー 1 および 2）を用いた P C R 反応は、1 U の酵素 T a q ポリメラーゼ (BioTaq, Bioline)、P C R バッファー (Bioline)、1 . 5 m M M g C l ₂、0 . 4 m M の各 d N T P、1 0 p m o l の各プライマー、DNA および最終量 5 0 μ l までの無菌脱イオン水の存在下で行った。増幅条件は次の通りとした：9 4 °C で 2 分、9 4 °C で 5 0 秒の変性、5 0 秒のプライマーとのハイブリダイゼーション（Tm は増幅する遺伝子に応じる、表参照）および 7 2 °C で 5 0 秒の伸長を 1 回；9 4 °C で 5 0 秒の変性、5 0 秒のプライマーとのハイブリダイゼーション（Tm は増幅する遺伝子に応じる、表参照）および 7 2 °C で 5 0 秒の伸長を 3 5 回；7 2 °C で 7 分の最終伸長 1 回。ネステッド P C R の内部プライマー（プライマー 3 および 4）を用いた増幅反応は、2 μ l 前 P C R 反応物から、1 U の酵素 T a q ポリメラーゼ (BioTaq, Bioline)、P C R バッファー (Bioline)、M g C l ₂ 2 . 5 m M、0 . 4 m M の各 d N T P、1 0 p m o l の各プライマー、DNA および最終量 5 0 μ l までの無菌脱イオン水の存在下で行った。この場合の増幅条件は、9 4 °C で 5 0 秒の変性、5 0 秒のプライマーとのハイブリダイゼーション（Tm は増幅する遺伝子に応じる、表参照）および 7 2 °C で 5 0 秒の伸長を 3 5 回；7 2 °C で 7 分の最終伸長 1 回。

【 0 1 3 6 】

また、a t t B 領域の欠損も、プライマー a t t B - P 1、a t t B - P 2 を用いた P C R 反応により確認した（実施例 2）。P C R 反応は、1 U の酵素 T a q ポリメラーゼ (BioTaq, Bioline)、P C R バッファー (Bioline)、4 m M M g C l ₂、0 . 4 m M の各 d N T P、1 0 p m o l の各プライマー、DNA および最終量 5 0 μ l までの無菌脱イオン

30

40

50

水の存在下で行った。増幅条件は次の通りとした：95 で4分の変性1回；94 で50秒の変性、50 で40秒の第一鎖とのハイブリダイゼーションおよび72 で40秒の伸長を29回；72 で5分の最終伸長1回。

【0137】

増幅産物を分析するために、これらのサンプルを1.5 μ lのローディング溶液（蒸留水中0.25%のプロモフェノールブルー；40%グリセロール；100 mM EDTA）と混合し、それらを、TAE 1倍バッファー（40 mM Tris Base；20 mM 氷酢酸；EDTA 1 mM、pH 8.0）を用いたアガロースゲル（1%）での電気泳動により分析し、臭化エチジウム（0.5 μ g/ml）染色によりDNAを表した。

【0138】

得られた結果（図6B）により、真核細胞A549のゲノムにBポリヌクレオチドが適切に組み込まれていることが確認される。さらに、attB領域の欠損から、この組み込みがPhiC31インテグラーゼにより特異的かつ一方方向で媒介されたことが確認される。

【0139】

次に、アデノウイルス遺伝子の発現を調べるために、pRc-1クローンを20 cm^2 プレートにて37、5%CO₂で80%の集密度に達するまでインキュベートした。この時、これらの細胞を、前述の手順に従い、構築物pGal4-2RU-SceI-E1の希釈液5 μ g、Plus Reagent（1：0.75）および12 μ lのリポフェクタミンLTXでトランスフェクトした。トランスフェクションは、10⁻⁸ M濃度のRU486インデューサーの存在下でプレートの1つを2回インキュベートすることにより行った。インキュベーション48時間、1 mlのTRIzol (Invitrogen)を用い、総て製造業者の推奨に従って細胞を溶解させ、全RNAの抽出を行った。このRNAをアデノウイルス遺伝子に対して特異的なプライマーを用いた逆転写アッセイ（RT）-PCRに用いた。

【0140】

【表2】

遺伝子	プライマー	配列	配列番号
IVa2	PRC1	5'-TGATCCAGTCGTAGCAGGAG-3'	35
	PRC4	5'-ACGATCTCATCCTGGAACAC-3'	36
III	III1	5'-GCCAGTGGCGGCGGCGCTGGG-3'	37
	III2	5'-CCGATGTCGCTTTCCAGAACC-3'	38
E4	E4-1	5'-CGTGCGAGGTCTTCCCTGCAG-3'	39
	E4-2	5'-CTACATGGGGGTAGAGTCATA-3'	40

【0141】

これらのアッセイでは、1 μ gのRNAを予め、反応バッファー（20 mM Tris-HCl、pH 8.4；2 mM MgCl₂；50 mM KCl）中、最終量10 μ lで、1ユニットのDNアーゼ（DNaseI amplification grade；Invitrogen）で処理した。この反応物を周囲温度で15分インキュベートし、1 μ lの25 mM EDTA溶液を加え、65 で10分インキュベートすることによりDNアーゼを不活性化した。cDNA合成反応では、このDNA不含RNA 625 ngを用いた。逆転写反応は、サンプルを10 pmolの特異的プライマー、1 μ lのdNTP（10 mM）および最終量13 μ lまでの水と混合して開始した。65 で5分インキュベートした後、この混合物を氷中で冷却し、2 μ lの0.1 M DTTおよび4 μ lの反応バッファー（250 mM Tris-HCl、pH 8.3；375 mM KCl；15 mM MgCl₂）を用いた。最後に、37 で2分新たにインキュベートした後、200 UのM-MLV逆転写酵素（Invitrogen）を加え、インキュベーションを37 で50分続けた。次に、得られたcDNAをPCR反応の鋳型として用いて検討下の遺伝子の転写産物を増幅した。陰性対照として、また、

ゲノムDNAの混入が無いことを確認するために、いずれの場合にも、DNAアーゼで処理したRNAを鋳型として用いる増幅反応を含めた。得られた逆転写反応のcDNAを用いたPCR反応に用いた増幅条件は、ゲノムDNAの増幅反応で用いたものと同じであった。

【0142】

図7に示すこれらのアッセイの結果から、真核細胞の染色体に安定に組み込まれたアデノウイルス遺伝子の転写能力が確認される。

【0143】

最後に、ウイルスmRNAからウイルスタンパク質を産生する細胞の能力を確認するために、ウイルスクャプシドのタンパク質検出を免疫組織化学アッセイによりアッセイした。タンパク質合成を誘導するために、pRc-1クローンを予め構築物pGal4-2RU-SceI-E1でトランスフェクトした。トランスフェクションは2回行った。これらの細胞をRU486インデューサーの存在下および不在下でインキュベートした。インキュベーション24時間後、細胞をトリプシンで剥離し、 8×10^4 細胞を4セルカルチャーライド(four-cell cultureslide)(BD Falcon Cultureslide; BD Biosciences, Erembodegem 9320, Belgium)に移し、インデューサーRU486を含む、および含まない培養培地を加えた。翌日、培地を除去し、細胞をPBSで洗浄した。次に、それらを予め-20℃に冷却したアセトン：メタノール(1：1)溶液で固定した。固定液を周囲温度で蒸発させ(30分)、これらのスライドを1倍PBSに浸漬した。3分間PBSで3回洗浄した後、予めPBSで希釈した(1：75)一次抗体(マウス抗アデノウイルスモノクローナル抗体ブレンド; Millipore Iberica, 28050 Madrid, Spain)とハイブリダイズさせた。このハイブリダイゼーションは、暗所、加湿チャンバーにて、4℃で一晩行った。

【0144】

翌日、余分な抗体をPBSで洗浄し(3分で3回洗浄)、これを、この場合にもPBSで希釈した(1：400)二次抗体(イムノピュアヤギ抗マウスIgG-ペルオキシダーゼ; Pierce Biotechnology, Rockford IL61105, USA)とハイブリダイズさせた。このハイブリダイゼーションを周囲温度、暗所で45分インキュベートした。これらのサンプルを再び1倍PBSで3回洗浄し、それらを、DAB色素原(DakoCytomation Liquid DAB Substrate Chromogen System; Dako Diagnostics, Sant Just Desvern E-08960, Barcelona, Spain)を用い、製造業者の推奨に従って現像した。核を特異的に染色するためにこれらのサンプルをマイヤーのヘマトキシリンで対比染色し(5秒)、15分後に水洗し、サンプルを70%、96%および100%アルコールに1分、そしてキシレンに10分浸漬することで脱水した。

【0145】

サンプルにおいて検出された茶色により、ウイルスクャプシドのタンパク質合成が確認される。インデューサー無しではこれらのタンパク質のわずかな基底生産が検出されるに過ぎないが、免疫細胞化学の結果はRU486インデューサーの存在下でのウイルスタンパク質の発現レベルに対して明瞭な差を明らかにし、クローンpRc-1のゲノムに組み込まれたウイルス遺伝子発現の制御においてミフェリプリストン調節系が機能していることが確認される。

【0146】

実施例3.2：E1領域とI-SceI遺伝子を双方ともミフェリプリストンにより誘導可能な転写調節の制御下で組み込んだ安定な細胞系統を作出するための、pGal4-2RU-SceI-E1プラスミド(ポリヌクレオチドA)によるA549細胞のトランスフェクション

第2の実施形態では、本発明で定義されるようにA2ポリヌクレオチドが組み込まれた安定な細胞系統を設計した(図1A)。よって、このようにして得られた細胞系統は、Bポリヌクレオチドに含まれるアデノウイルス遺伝子の発現の開始および制御に必要な遺伝子を有する。従って、これらの遺伝子、例えば、I-SceI制限エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子とE1AおよびE1Bタンパク質をコードするE1アデノウイルス領域

10

20

30

40

50

は、ミフェリプリストンにより調節されるプロモーターの制御下にある。調節因子 G A L 4 - h P R - p 6 5 は A 2 ポリヌクレオチドに含まれ、従って、それは細胞ゲノムに同時に組み込まれる。該トランスアクチベーターは改変された細胞により構成的に発現されることになる。

【 0 1 4 7 】

この細胞系統を得るために、A 5 4 9 細胞を 10 cm^2 プレートにて、37℃、5% CO_2 で 80% の集密度に達するまでインキュベートした。これらの細胞を、リポフェクタミン法により、第 3 . 1 節に記載されている手順に従い、p G a l 4 - 2 R U S c e I - E 1 構築物 (ゼオマイシン耐性遺伝子 (z e o^r)) でトランスフェクトし、p R c - 1 クローンを得た。これらの細胞を、10% ウシ胎児血清、1% L - G l u および 1% P / S および $400\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$ 濃度の抗生物質ゼオマイシンを添加した D M E M 培地でインキュベートした。一連の増幅を行った後、抗生物質耐性クローンが単離され、これを G a l - 1 3 と呼んだ。p R c - 1 クローンの場合と同様に、G a l - 1 3 クローンの安定性を、4 か月を超える期間、連続 3 5 回を超えて培養維持できるかどうかを試験した。

【 0 1 4 8 】

細胞のゲノム DNA からの P C R アッセイにより、アデノウイルス遺伝子 E 1 a および E 1 b の存在、I - S c e I エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子の存在および転写を調節し、ミフェリプリストンにより誘導可能な G A L 4 タンパク質 - h P R - p 6 5 融合物をコードする遺伝子の存在が確認された。用いたプライマーは、

【 0 1 4 9 】

【 表 3 】

遺伝子	プライマー	配列	配列番号
E1a	RT-EA1	5'-TATCTGCCACGGAGGTGTTAT-3'	41
	RT-EA2	5'-TAGACAAACATGCCACAGGTC-3'	42
E1b	RT-EB3	5'-GCTTGGGAGTGTTTGGAAGAT-3'	43
	RT-EB4	5'-CTGCTCCTCCGTCGGTATTAT-3'	44
SceI	SceI-3	5'-CCATACGATGTTTCCTGACTA-3'	45
	SceI-4	5'-CCCTTAACCAGGTATTCTACT-3'	46
GAL4- hPR- p65	Gal-1	5'-CTGACTAGGGCACATCTGACA-3'	47
	Gal-2	5'-TTGATGAGCTCTCTAATGTAG-3'	48

【 0 1 5 0 】

細胞のゲノム DNA を、Q I A m p DNA ミニキット系 (Qiagen) を用い、製造業者の推奨に従って抽出し、P C R 反応は、1 U の酵素 T a q ポリメラーゼ (BioTaq, Bioline)、P C R バッファー (Bioline)、4 m M M g C l₂、0 . 4 m M の各 d N T P、1 0 p m o l の各プライマー、DNA および最終量 5 0 μl までの無菌脱イオン水の存在下で行った。増幅は次の通りとした：95℃で4分の変性1回；94℃で50秒の変性、50℃で40秒の第一鎖とのハイブリダイゼーションおよび72℃で40秒の伸長を29回；72℃で5分の最終伸長1回。増幅産物の分析のため、これらのサンプルを1 . 5 μl のローディング溶液 (蒸留水中 0 . 2 5 % プロモフェノールブルー；40% グリセロール；100 m M E D T A) と混合し、それらを T A E 1 倍バッファー (40 m M T r i s B a s e ; 20 m M 氷酢酸；1 m M E D T A、p H 8 . 0) を用い、アガロースゲル (1%) での電気泳動により分析し、臭化エチジウム (0 . 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 染色により DNA を表した。増幅結果により、A 5 4 9 系統のゲノム内に A 2 ポリヌクレオチドに含まれる遺伝子が適切に組み込まれていることが確認された (図 8)。

【0151】

次に、ミフェリプリストンにより誘導可能な系の遺伝子発現の調節能を確認するために、ウエスタンブロットを行い、 10^{-8} M濃度のRU486インデューサーの存在下および不在下でインキュベートした培養物から得られたタンパク質サンプルに由来するE1AおよびI-SceIタンパク質の合成を分析した。これらのタンパク質抽出液を500 μ lのPassive Lysisバッファー1倍(Promega)で精製し、総タンパク質レベルをタンパク質定量のためのブラッドフォード法(Bradford, 1976, Anal. Biochem., 72: 248-254)を用いて測定した。これらのサンプルを不連続ポリアクリルアミド-SDSゲルおよびLaemmli電気泳動バッファー(25 mM Tris HCl; 192 mMグリシン; 0.1% w/v SDS)での電気泳動により分析した。分解ゲルは0.1% SDSとともに、0.39 M Tris-HClバッファー(pH 8.8)中12%のポリアクリルアミドからなった。触媒として0.1% PSAおよび0.94% TEMEDを用いた。その一部として、スタッキングゲルは0.1% SDS、0.1% PSAおよび0.01% TEMEDとともに、0.125 M Tris-HCl(pH 6.8)中5%のポリアクリルアミドからなった。これらのサンプルを4で2時間、トランスファーバッファー(0.3% Tris-Base; 186 mMグリシン; 20% メタノール)中のHybond-Fメンブラン(GE Healthcare Europe)に移した。次に、このメンブランを4で一晩、PBS + Tween(0.05%)中、5%ミルク溶液でブロッキングした。一次抗体とのハイブリダイゼーションは、周囲温度で1.5時間、1%ミルク + PBS-Tween溶液で行った。PBS-Tweenで10分間3回洗浄して余分な抗体を除去した。二次抗体とのハイブリダイゼーションは、周囲温度で30分、1%ミルク + PBS-Tweenで行った。E1Aタンパク質の検出において、抗アデノウイルス2 E1A抗体(マウス)(1:500)(Calbiochem(登録商標): EMD, La Jolla CA92039-2087, USA)を、そして、二次抗体としてイムノピュアヤギ抗マウスIgGペルオキシダーゼ(1:5000)(Pierce Biotechnology)を用いた。I-SceIタンパク質の場合には、ただ1つの抗体、抗HA-ペルオキシダーゼ高親和性(1:500)(Roche Diagnostics, 08174 Barcelona, Spain)を用いた。このメンブランをPBS-Tweenで10分間3回洗浄した後、それを現像した。これを行うため、Western lightning化学発光試薬系(Perkin-Elmer, 28760 Madrid, Spain)を製造業者の推奨に従って用いた。得られた結果を図9に示し、これらは分析したタンパク質の適正な生産ならびにインデューサーの存在下でのこれらのタンパク質の発現レベルの増大を実証する。しかしながら、インデューサーの不在下でも、調節を受けたタンパク質の基底発現が存在することを考慮する必要がある。

【0152】

実施例3.3: Gal4-2RUSceI-E1(ポリヌクレオチドA)およびpRCAd2(Bポリヌクレオチド)プラスミドでのA549細胞の二重トランスフェクションによる安定な細胞系統の作出

ウイルス粒子の生産に必要な遺伝子を総て備えたユニークな細胞系統を得るために、ゼオマイシン耐性クローンGal-13(実施例3.2)を、残りのアデノウイルス遺伝子を含んだpRCAd2(neo^r)構築物およびPhiC31インテグラーゼをコードするpCMV-Intプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクション条件はGal-13クローンを得るのに用いたものと同じであり、選択は抗生物質G418(600 μ g/ml)およびゼオマイシン(400 μ g/ml)の存在下で行った。この選択により、2つの二重耐性クローン(zeo^r + neo^r)が得られ、これらをそれぞれGAd-1およびGAd-6と呼んだ。両クローンの形態的特徴は親系統(parenteral line)A549およびその誘導體Gal-13と大きく異なる。これらの新規なトランスフェクトクローンは球形で、小さい傾向がある。この形態変化はおそらくGal-13クローンで事前に検出されたE1遺伝子の基底転写のためであり、pRCAd2プラスミドにクローニングされ、細胞ゲノムに挿入されたアデノウイルス遺伝子の残りの部分の転写を必然的に伴う。しかしながら、ウイルスタンパク質レベルは、それらを4か月を超える期間培

養維持した後に確認されたように、細胞の安定性および生存力に有意な影響を及ぼさない。

【0153】

G A d - 1 および G A d - 6 クローンに p R c A d 2 プラスミドが組み込まれていることを確認するため、Q I A m p D N A ミニキット系(Qiagen)を用い、製造業者の推奨に従ってゲノム D N A を抽出した。この D N A をネステッド P C R アッセイに用い、アデノウイルス遺伝子 I I I a、I V、プロテアーゼをコードする遺伝子およびウイルスポリメラーゼをコードする遺伝子の存在を検出した。この検出の用いたプライマーは第 3 . 1 節で用いたものと同じであった。同様に、増幅反応も第 3 . 1 節の記載と同様に行った。

【0154】

増幅産物は、T A E 1 倍バッファー (4 0 m M T r i s B a s e ; 2 0 m M 氷酢酸 ; 1 m M E D T A、p H 8 . 0) 用いたアガロースゲル (1 %) での電気泳動により分析し、臭化エチジウム (0 . 5 μ g / m l) 染色により D N A を可視化した (図 1 0) 。

【0155】

ウイルスタンパク質の合成を確認するために、ウイルスクャプシドに対する免疫組織化学アッセイを設計した。この場合、G A d 1 および G A d 6 クローンを 10^{-8} M 濃度の R U 4 8 6 インデューサーの存在下および不在下の双方で 4 8 時間インキュベートした。次に、 6×10^4 細胞を 4 ウェル培養プレート (BD Falcon Cultureslide; BD) に移し、p R C - 1 クローン (pRc-1 cline) の場合 (実施例 3 . 1) と同様に行った。一次抗体として、P B S で希釈した (1 : 7 5) マウス抗アデノウイルスモノクローナル抗体ブレンド (Millipore) 抗体を用い、二次抗体として、これもまた P B S で希釈した (1 : 4 0 0) 抗体イムノピュアヤギ抗マウス I g G - ペルオキシダーゼ (Pierce Biotechnology) を用いた。

【0156】

このサンプルにおいて検出される茶色によりウイルスクャプシドのタンパク質合成が確認される。しかしながら、R U 4 8 6 インデューサーの存在下でインキュベートしたサンプルとその不在下でインキュベートしたサンプルの間に明らかな違いは検出されなかった。よって、細胞ゲノムに組み込まれたアデノウイルス遺伝子の残りの部分の発現を開始させるには、転写レギュレーター G A L 4 - h P R - p 6 5 の制御を逃れた E 1 タンパク質の基本発現で十分である。

【0157】

実施例 4 : K C Z ガットレスウイルスの感染性粒子の生産およびパッケージング

実施例 4 . 1 : 2 つのプラスミドでのコトランスフェクション系による p R c - 1 パッケージシステムにおける K C Z ウイルスの生産およびパッケージング

本実施例では、実施例 3 . 1 で作出された細胞系統から選択されたクローンを、高容量アデノウイルスまたはガットレスアデノウイルスの生産およびパッケージングに用いた。この生産系により、p R c A d 2 プラスミドに欠失している遺伝子の補足としてのヘルパーウイルスを使用する必要なく、真核細胞の染色体に安定に組み込まれる高容量アデノウイルスの抽出液を得ることができる。

【0158】

E 1 領域の欠損を補うために、この系は、生産工程のそれぞれで細胞系統を p G a l 4 - 2 R U - S c e I - E 1 プラスミドでトランスフェクトすることを必要とする。この補足プラスミドは、ミフェリプリストンにより調節される誘導プロモーターから遺伝子 E 1 a および E 1 b を発現し (図 1 A)、これにより残りのアデノウイルス遺伝子の発現が始まる。さらに、組み込まれたウイルスゲノムの複製は、p G a l 4 - 2 R U - S c e I - E 1 プラスミドに含まれ、また、G A L 4 - h P R - p 6 5 レギュレーターにより転写レベルで制御される I - S c e I エンドヌクレアーゼの発現時にのみ可能である。ウイルスゲノムの放出およびその複製の開始によってその複数のコピー、従って、高容量アデノウイルスのキャプシド封入およびその高力価での精製に十分なレベルのウイルスタンパク質が取得可能となる。

10

20

30

40

50

【0159】

この系が感染性粒子を生産することができるかどうかを調べるために、 8×10^5 細胞の pRc - 1 クローンを 20 cm^2 のディッシュにて 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で、 80% の集密度に達するまでインキュベートした。次に、これらの細胞を、 $5 \mu\text{g}$ の pGal4 - 2RU - SceI - E1 プラスミド、および制限酵素 Pme1 で消化して複製開始点、アンピシリン耐性遺伝子を除去し、ベクターの ITR 末端をフリーとした $12 \mu\text{g}$ の KCZ ガットレスベクターでコトランスフェクトした。リポーター遺伝子として、KCZ ベクターは細菌 β - ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) を有する。

【0160】

このコトランスフェクションでは、真核細胞での DNA インターナリゼーションのための系としてリポフェクタミンを用いた。よって、両プラスミドの DNA を予め、OPTI-MEM (Gibco (登録商標)) 血清を含まない 1 ml の培地で希釈した。DNA と陽イオン脂質の間の複合体の形成を促進するために、Plus Reagent (Invitrogen) 試薬を $1:0.75$ 比で加えた。周囲温度で 5 分インキュベートした後、 $12 \mu\text{l}$ のリポフェクタミン LTX (Invitrogen) を加え、この混合物を再び周囲温度で 25 分インキュベートした。次に、この希釈液を細胞培養培地 (10% ウシ胎児血清を添加した DMEM) に滴下した。

37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で 4 時間インキュベートした後、培地を 2% ウシ胎児血清および 10^{-8} M 濃度の RU486 インデューサーを添加した新鮮な DMEM 培地に置き換えた。

【0161】

明瞭な細胞変性作用が見られなかったので、これらの細胞を $48 \sim 120$ 時間の間でインキュベートし、その後、種々の時点でそれらの固有の培地に採取した。 1250 rpm で 5 分遠心分離を行った後、沈殿を $200 \mu\text{l}$ の 0.1 M Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$) に再懸濁させ、これらの細胞を冷凍/解凍を 3 回繰り返すことにより溶解させた。

【0162】

細胞残渣を遠心分離し、上清の力価を、KCZ ベクターの調製物に感染させた 293 S 細胞の X-gal 染色により測定した。これを行うため、 293 S 細胞を 2 cm ウェルにて 2% ウシ胎児血清および 1% ビルビン酸 Na を添加した DMEM 培地で 80% の集密度に達するまで増殖させた。次に、培養培地を除去し、細胞を $2\% \text{ DMEM} + \text{FBS} + 1\%$ ビルビン酸 Na 中、ウイルス抽出液の連続希釈液で感染させた。 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で 4 時間インキュベートした後、新鮮培地を加え、さらに 48 時間インキュベーションを続けた。最後に、細胞を PBS 中 0.5% のグルタルアルデヒド溶液中、周囲温度で 10 分固定し、PBS で 3 回洗浄し、 37°C にて 4 時間、 20 mM MgCl_2 、 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN}_6)$ および 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN}_6)$ を添加した PBS 中、 1 mg/ml の X-gal (5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド) で染色した。

【0163】

得られた結果によれば、pRc - 1 クローンを生産およびパッケージングシステムとして用いた場合、継代 0 代までの生産は $48 \sim 72$ 時間後にその最大レベルに達し、 7×10^5 感染単位 (u.i.) / ml 前後である (図 11)。連続的増幅の実施では、これらの抽出液を、予め pGal4 - 2RU - SceI - E1 プラスミドでトランスフェクトした新たな pRc - 1 細胞の感染に用いた。従って、記載の系は、ヘルパーウイルスに由来する感染性粒子を含まない高容量アデノウイルスの抽出液の回収ならびに高い生産レベルでのそれらの取得を可能とする。

【0164】

実施例 4.2: GAd - 1 および GAd - 6 クローンの細胞における KCZ ウイルスの生産およびパッケージング。高容量ベクターを用いたユニークなトランスフェクション系

下記の生産系は、本発明で記載した A2 および B ポリヌクレオチドが安定に組み込まれている改良システムをパッケージング細胞として用いる (図 1A、1B)。高容量アデノウイルスベクターに相当するポリヌクレオチドを除き、この細胞システムは感染力を有するウイル

10

20

30

40

50

ス粒子の生産のために付加的な要素（プラスミドまたはウイルスヘルパー）を何も必要としない。

【0165】

この系は、キャプシド封入および高容量アデノウイルスの複製に必要なアデノウイルス遺伝子（Bポリヌクレオチド）ならびに従来のウイルスタンパク質の高レベルでの制御発現に必要なE1領域およびI-SceI制限エンドヌクレアーゼの遺伝子（A2ポリヌクレオチド）を単一の細胞に組み込む。最後に、この生産プロセスの開始は、その対応する誘導プロモーターおよび転写アクチベーターGAL4-hPR-p65からのE1領域および制限エンドヌクレアーゼの遺伝子の発現により調節される。

【0166】

この感染性粒子生産の例では、GAd-6およびGAd-1パッケージング系統を、実施例4.1に示されるように、 β -ガラクトシダーゼのリポーター遺伝子をコードし、予めPmeI制限酵素で線状化した12 μ gのKCZガットレスベクターでトランスフェクトした。高容量ベクターでのトランスフェクションは、pRc-1パッケージング系統を用いた生産系に記載されている手順（実施例4.1）に従って行った。

【0167】

これらの細胞を、2%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地中、 10^{-8} M濃度のRU486インデューサーの存在下で48~120時間の間インキュベートした。種々の時点で細胞を採取し、1250rpmで5分遠心分離し、最後に、200 μ lの0.1M Tris-HClに再懸濁させた。冷凍/解凍を3回繰り返すことでそれを溶解させた後、細胞残渣を遠心分離し、上清を293S細胞系統にて、従前の実施例に記載されているプロトコールに従って滴定した。

GAd-1クローンを生産およびパッケージング系統として用いた場合、継代0代の生産レベルは最大 1.7×10^6 感染単位(ui/ml)であったが、GAd-6クローンでは滴定値 3×10^6 ui/ml（図12）が得られた。

【0168】

従前の実施例と同様に、これらの抽出液を、連続増幅実施中の新たなパッケージング細胞の感染に用いた。本実施形態に記載されている系は、2つのプラスミドでコトランスフェクトするこれまでの系（実施例4.1）またはウイルス増幅実施中の各段階でパッケージング細胞のトランスフェクション/感染プロセスを排除することによる他のヘルパー依存系とは異なる。この特徴は生産時間を十分短縮し、その収量を増大する。他の大きな利点は、ヘルパーウイルスの混入が無いことであり、これにより、ウイルス精製プロセスが簡単になり、ヒトにおける遺伝子療法手順に用いるのに十分な量の生産が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0169】

【図1】A. 本発明によるA2ポリヌクレオチドを含んでなるpGal4-2RU-E1-SceIプラスミドの模式図。A_I：転写レギュレーター（この場合、GAL4-hPR-p65）をコードするヌクレオチド配列。A_{II}：アデノウイルスE1A/E1Bタンパク質をコードするヌクレオチド配列。A_{III}：制限エンドヌクレアーゼ（この場合、サッカロミセス・セレビシエ(Sacharomyces cerevisiae)のI-SceI）をコードするヌクレオチド配列。rP_{II}およびrP_{III}：転写レギュレーターGAL4-hPR-p65により調節することができ、それぞれE1A/E1Bタンパク質およびI-SceIエンドヌクレアーゼの転写および発現を命令するプロモーター。この実施形態では、各プロモーター領域は、GAL4のUAS（上流活性化配列）配列と連結されているアデノウイルスE1b（P_{E1b}）遺伝子のTATAボックスの配列を含んでなり、ここで、両プロモーターは同じUAS結合配列を共有する。この場合、転写レギュレーターGAL4-hPR-p65の転写および発現を命令するプロモーター領域は、これもまたGAL4のUAS（上流活性化配列）に連結されているチミジンキナーゼの最小プロモーター（P_{tk}）を含んでなる。3つの転写ユニット（GAL4-hPR-p65、E1A/E1BおよびI-SceI）はそれぞれポリアデニル化シグナル（pA）を完備している。p

10

20

30

40

50

U C o r i : p G a l 4 - 2 R U - E 1 - S c e I プラスミドの構築の基礎として用いる p G e n e V 5 - H i s A プラスミドの複製起点。A m p : Z e o 耐性細菌の選択のためのアンピシリン耐性遺伝子。Z e o : 真核細胞において耐性クローンを選択するためのゼオシン (Zeocyn) 抗生物質耐性遺伝子。S V 4 0 : Z e o^r 耐性遺伝子の発現を命令する S V 4 0 プロモーター。B . 本発明による B ポリヌクレオチドを含んでなる p R c / A d 2 プラスミドの模式図。B_I : E 1 A / E 1 B タンパク質およびパッケージングシグナル Ψ をコードする領域を除く、アデノウイルス (この場合、血清型 5) のゲノムをコードするヌクレオチド配列。このヌクレオチド配列は I T R (逆方向末端反復) 配列を境界としている。B_{I I} : 制限エンドヌクレアーゼ (この場合、I - S c e I) の特異的標的配列。B_{I I I} : 真核細胞のゲノムへのプラスミドの組込みを助けるヌクレオチド配列 a t t B。このプロセスは特異的、かつ、一方向性の P h i C 3 1 レコンビナーゼにより媒介される。c o l E 1 : p R c A d 2 プラスミドの構築の基礎として用いる P R C / R S V プラスミドの複製起点。A m p : 細菌耐性クローンを選択のためのアンピシリン耐性遺伝子。N e o : 真核細胞における耐性クローンを選択のためのネオマイシン抗生物質耐性遺伝子。S V 4 0 : N e o^r 耐性遺伝子の発現を命令する S V 4 0 プロモーター。p A : ポリアデニル化シグナル。

【図 2】ミフェプリストンにより誘導される遺伝子発現の転写制御のための市販の系 G e n e S w i t c h (商標) (Invitrogen)。A . 酵母 G A L 4 タンパク質の DNA 結合ドメイン (G A L 4 - D B D)、ヒトプロゲステロン受容体 (h P R - L B D) のリガンド結合ドメインおよびヒト N F - κ B タンパク質の活性化ドメイン (p 6 5 - A D からなる融合タンパク質の発現のための p S w i t c h プラスミド。転写アクチベーター G A L 4 - h P R - p 6 5 の発現はチミジンキナーゼの最小プロモーター (P_{t_k}) の制御下にある。活性型タンパク質がこのプロモーターに連結されている G A L 4 - U A S 配列に結合することで、その固有の発現が調節される。B . 目的遺伝子のクローニングのために結成された p G e n e V 5 - H i s A プラスミド。クローニングされた遺伝子の発現は、E 1 b の T A T A ボックスと転写アクチベーターに対する結合配列 (G A L 4 - U A S) により構成されるプロモーター (P_{E 1 b}) の制御下にある。C . G e n e S w i t c h (商標) 系活性化のメカニズム。インデューサーが存在すると、転写アクチベーターとして働き、かつ、p S w i t c h プラスミドにより構成的に発現される融合タンパク質の構造変化をもたらされる。このコンフォメーション変化は、不活性な状態からその活性な状態になる分子の二量体化からなる。このホモ二量体は、その発現を活性化する目的遺伝子のプロモーター領域 (プラスミド p G e n e V 5 - H i s A) およびこの場合、正のフィードバック反応を開始する転写レギュレーターの発現を制御するプロモーター領域 (p S w i t c h プラスミド) に存在する特異的配列 (G A L 4 - U A S) と結合する能力を有する。

【図 3】G e n e S w i t c h (商標) 系由来の E 1 a、E 1 b および I - S c e I の転写制御のために設計された調節系のスキーム。p G e n e - E 1 - S c e I および p 2 R U - E 1 - S c e I 構築物は転写レギュレーター G A L 4 - h P R - p 6 5 の発現のための p S w i t c h プラスミドの存在を必要とする。他方、構築物 P R U - E 1 - S c e I および p G a l 4 - 2 R U - S c e I - E 1 は、単一の構築物中に、E 1 領域の遺伝子 (E 1 a、E 1 b)、I - S c e I 遺伝子、およびその特異的プロモーター領域とともにレギュレーター融合タンパク質をコードする遺伝子を含む。これらの遺伝子は総て、転写アクチベーター結合配列 (U A S) を有するプロモーター (白い矢印) の制御下にある。転写ユニットはそれぞれポリアデニル化シグナル (P A) を完備している。

【図 4】放線菌 (streptomyces) ファージの P h i C 3 1 インテグラーゼにより媒介される外因性 DNA の特異的組込み。哺乳類細胞では、このインテグラーゼは、目的遺伝子とともにベクターに挿入された a t t B 配列と細胞の染色体に存在する p s e u d o - a t t P 配列の間の組換えを促進するために用いられる。結果として、元の組換え配列は失われ、この組み込まれたベクターは a t t R 領域と a t t L 領域に隣接される。

【図 5】P a c I (P) での消化により p T G 3 6 0 2 プラスミドから精製された血清型

10

20

30

40

50

5 アデノウイルスのゲノムの相同配列と、XbaI (X) で線状化された pRC/A6 - A7 構築物の間の組換えプロセス。数字は各相同領域のアデノウイルスゲノム内の位置を示す。pRC/A6 - A7 プラスミド内で、アデノウイルス配列は I - SceI 制限エンドヌクレアーゼの標的配列 (S) により隣接され、5' 末端では、哺乳類細胞ゲノムへのプラスミドの組み込みのために attB 配列が挿入されている。組換えプロセスから生じた pRCAd2 プラスミドは、190 と 3528 の間 (E1a および E1b のコード配列に相当する領域) が欠失したアデノウイルスゲノムを含む。ITR: 逆方向末端反復配列。colE1: pRCAd2 プラスミドの構築の基礎として用いる pRC/RSV プラスミドの複製起点。Amp: 細菌耐性クロンの選択のためのアンピシリン耐性遺伝子。Neo: 真核細胞における耐性クロンの選択のためのネオマイシン抗生物質耐性遺伝子。SV40: SV40 プロモーター。pA: ポリアデニル化シグナル。

【図6】A. Phi31 レコンビナーゼにより媒介される真核細胞系統における pRCAd2 プラスミドの安定な組み込み。この挿入部は配列 attL と attR に隣接されており、プラスミドの attB 領域と細胞ゲノムの pseudo-affP 配列の間の組換えの産物である。S: I - SceI エンドヌクレアーゼの標的。Zeo: ゼオマイシン耐性遺伝子。B. アデノウイルス遺伝子 IIIa、IV、プロテアーゼ (Pr) および安定なクローン pRC-1 の精製ゲノム DNA に由来するウイルスポリメラーゼ (Pol) をコードする遺伝子のネステッド PCR による検出。電気泳動の結果は、各遺伝子に関して第 1 の内部に特異的に設計された増幅反応の分析に相当する。この pRC-1 クローンを attB 配列の検出に関しても試験した。この増幅の陰性結果により、Phi31 レコンビナーゼにより媒介される特異的組み込みが確認される。(-): PCR の陰性対照。(+): PCR の陽性対照。M: 分子量マーカー (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen)。

【図7】アデノウイルス遺伝子 IVa2、IIIa および E4 領域の 3.4 Kd の ORF の RT-PCR。この cDNA は、RU486 インデューサーの不在下 (1) および存在下 (2) でインキュベートした細胞から抽出した全 RNA のサンプルから得られたものである。(+): PCR の陽性対照。M: 分子量マーカー (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen)。

【図8】転写レギュレーター GAL4、I - SceI 制限エンドヌクレアーゼおよびアデノウイルスの E1 領域の遺伝子 (E1a および E1b) をコードする遺伝子の、安定なクローン Gal-13 のゲノム DNA からの PCR 増幅による検出。(-): PCR の陰性対照。(+): PCR の陽性対照。M: 分子量マーカー (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen)。

【図9】E1A タンパク質 (A) および I - SceI エンドヌクレアーゼ (B) を検出するためのウエスタンブロットアッセイ。RU486 インデューサー不在下 (1) および存在下 (2) でインキュベートした細胞からタンパク質抽出液を回収した。E1A タンパク質 GAPDH の陽性対照、すなわち、ウエスタンブロット試験の陽性対照として 293S 細胞系統を試験した。

【図10】アデノウイルス IIIa、IV、プロテアーゼ (Pr) 遺伝子ならびに安定なクローン Gad-1 および Gad-6 の精製ゲノム DNA に由来するウイルスポリメラーゼ (Pol) をコードする遺伝子のネステッド PCR による検出。電気泳動の結果は、各遺伝子に関して特異的に設計された内部プライマーを用いた増幅反応の分析に相当する。(-): PCR の陰性対照。(+): PCR の陽性対照。M: 分子量マーカー (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen)。

【図11】パッケージング系統として安定なクローン pRC-1 を用いた場合の、0 代目における KCZ ガットレスアデノウイルスの生産。トランスフェクションから 48 時間、72 時間、96 時間および 120 時間後にウイルス抽出液を回収し、それらを 293S 細胞系統で滴定した。得られたウイルスのレベルは 3 回の独立した実験の平均であり、感染単位 (IU) / ml で表す。

【図12】パッケージング系統として安定なクローン Gad-1 および Gad-6 を用いた場合の、継代 0 代目における KCZ ガットレスアデノウイルスの生産。トランスフェク

10

20

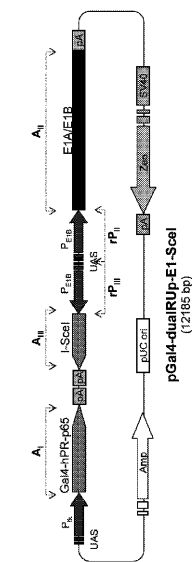
30

40

50

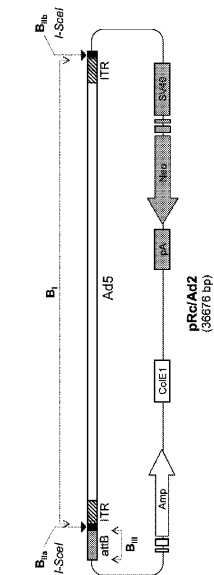
ションから４８時間、７２時間、９６時間および１２０時間後にウイルス抽出液を回収し、それらを２９３Ｓ細胞系統で滴定した。得られたウイルスのレベルは３回の独立した実験の平均であり、感染単位（ＩＵ）／ｍｌで表す。

【図 １ Ａ】



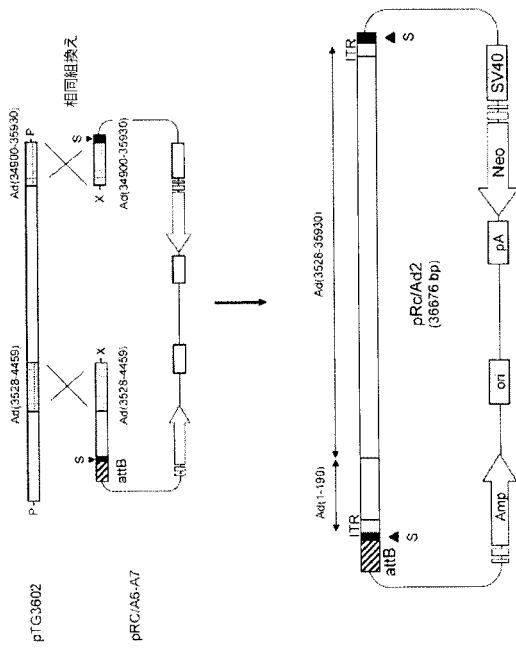
A

【図 １ Ｂ】

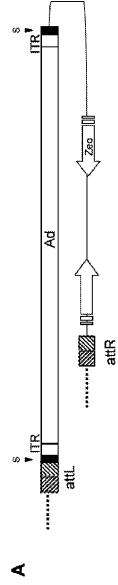


B

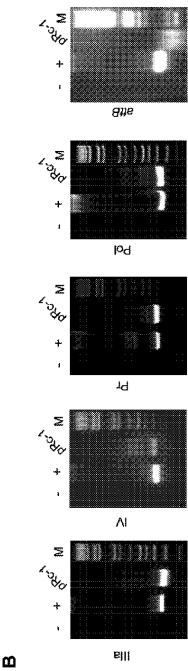
【図 5】



【図 6 A】



【図 6 B】



【図 7】

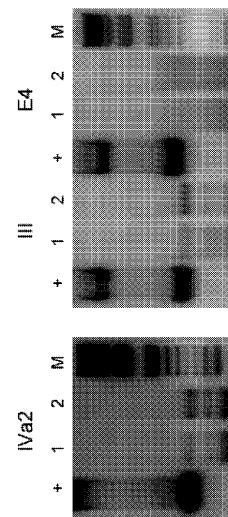


Figura 7

【 図 8 】

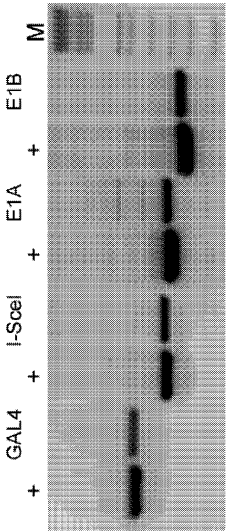


Figura 8

【 図 9 】

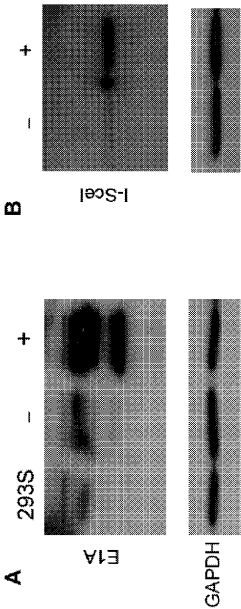


Figura 9

【 図 10 】

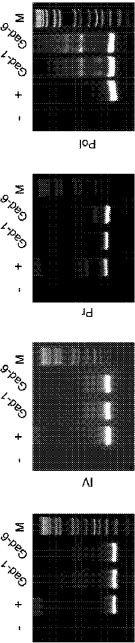


Figura 10

【 図 11 】

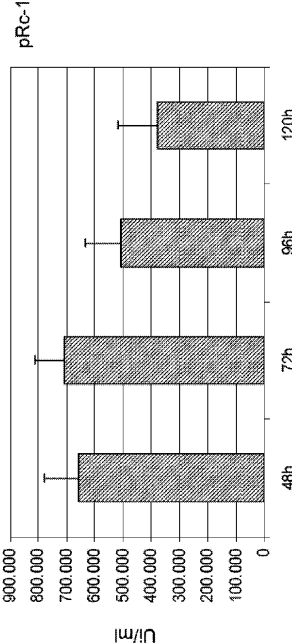


Figura 11

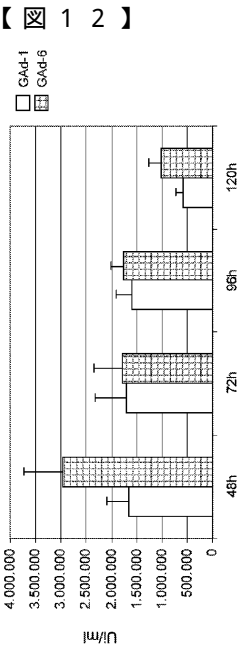


Figura 12

【 配 列 表 】

2011521663000001 . app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2009/070194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/861		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NICOLAS A L ET AL: "Creation and Repair of Specific DNA Double-Strand Breaks in Vivo Following Infection with Adenovirus Vectors Expressing Saccharomyces cerevisiae H0 Endonuclease" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 266, no. 1, 5 January 2000 (2000-01-05), pages 211-224, XP004436199 ISSN: 0042-6822 figure 1 ----- -/-	1-10, 15-19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 February 2010		Date of mailing of the international search report 18/02/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Aslund, Fredrik

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2009/070194

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BURCIN ET AL: "Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 96, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 355-360, XP002130326 ISSN: 0027-8424 figure 2	1-10, 15-19
A	MILLS KEVIN D ET AL: "MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 97, no. 5, 28 May 1999 (1999-05-28), pages 609-620, XP002312631 ISSN: 0092-8674 page 618, column 2, paragraph 2	1
A	BEERLI ROGER R ET AL: "Chemically regulated zinc finger transcription factors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 275, no. 42, 20 October 2000 (2000-10-20), pages 32617-32627, XP002199787 ISSN: 0021-9258	3
A	HILLGENBERG M ET AL: "SYSTEM FOR EFFICIENT HELPER-DEPENDENT MINIMAL ADENOVIRUS CONSTRUCTION AND RESCUE" HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 6, 10 April 2001 (2001-04-10), pages 643-657, XP009002050 ISSN: 1043-0342	1
Y	GAO G ET AL: "High throughput creation of recombinant adenovirus vectors by direct cloning, green-white selection and I-Sce I-mediated rescue of circular adenovirus plasmids in 293 cells" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 10, no. 22, 1 October 2003 (2003-10-01), pages 1926-1930, XP002405401 ISSN: 0969-7128 figure 1	11,13

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2009/070194

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/092786 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; EHRHARDT ANJA [US]; KAY MARK [US]) 21 November 2002 (2002-11-21) figure 3	11,13
A	----- ANGLANA MAURO ET AL: "Construction of a recombinant adenovirus for efficient delivery of the I-SceI yeast endonuclease to human cells and its application in the in vivo cleavage of chromosomes to expose new potential telomeres" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 27, no. 21, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 4276-4281, XP002155138 ISSN: 0305-1048	11
A	----- GOUBLE AGNÈS ET AL: "Efficient in toto targeted recombination in mouse liver by meganuclease-induced double-strand break" JOURNAL OF GENE MEDICINE, WILEY, US, vol. 8, no. 5, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 616-622, XP002427714 ISSN: 1099-498X -----	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2009/070194**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ES2009 /070194

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10, 15-17(completely); 18-28(partially)

A polynucleotide or an expression vector which comprises:
(a) a first expression cassette which comprises a nucleotidic sequence which encodes a transcriptional regulator;
(b) a second expression cassette which comprises a nucleotidic sequence which encodes a restriction endonuclease, and which is under the operational control of a transcriptional regulatory sequence activatable by the transcriptional regulator encoded by the polynucleotide defined in (a).
Furthermore, idem comprising an expression cassette encoding adenoviral E1A protein. Furthermore host cells comprising said polynucleotides and methods of producing said host cells and methods of producing high-capacity adenoviral vectors using said host cells.

2. claims: 11-14(completely); 18-28(partially)

A polynucleotide or expression vector which comprises a nucleotidic sequence which comprises the genome of a recombinant adenovirus which lacks, at least, the N? packaging sequence and the sequence which encodes the E1A protein or E1A[E1B protein, wherein said sequence which comprises the genome of a recombinant adenovirus is flanked by recognition sequences specific for a restriction endonuclease.
Furthermore host cells comprising said polynucleotides and methods of producing said host cells and methods of producing high-capacity adenoviral vectors using said host cells.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2009/070194

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02092786	A	21-11-2002	CA 2442144 A1	21-11-2002
			EP 1379281 A2	14-01-2004
			JP 2004532039 T	21-10-2004

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2009/070194

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
INV. C12N15/861		
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)		
C12N		
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	NICOLAS A L ET AL: "Creation and Repair of Specific DNA Double-Strand Breaks in Vivo Following Infection with Adenovirus Vectors Expressing Saccharomyces cerevisiae HO Endonuclease" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 266, no. 1, 5 enero 2000 (2000-01-05), paginas 211-224, XP004436199 ISSN: 0042-6822 figura 1 ----- -/-	1-10, 15-19
☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.	
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 18/02/2010
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Aslund, Fredrik
N° de fax	N° de teléfono	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES2009/070194

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	BURCIN ET AL: "Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 96, 1 enero 1999 (1999-01-01), pages 355-360, XP002130326 ISSN: 0027-8424 figura 2	1-10, 15-19
A	MILLS KEVIN D ET AL: "MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 97, no. 5, 28 May 1999 (1999-05-28), pages 609-620, XP002312631 ISSN: 0092-8674 pagina 618, columna 2, paragrafo 2	1
A	BEERLI ROGER R ET AL: "Chemically regulated zinc finger transcription factors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 275, no. 42, 20 October 2000 (2000-10-20), pages 32617-32627, XP002199787 ISSN: 0021-9258	3
A	HILLGENBERG M ET AL: "SYSTEM FOR EFFICIENT HELPER-DEPENDENT MINIMAL ADENOVIRUS CONSTRUCTION AND RESCUE" HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 6, 10 April 2001 (2001-04-10), pages 643-657, XP009002050 ISSN: 1043-0342	1
Y	GAO G ET AL: "High throughput creation of recombinant adenovirus vectors by direct cloning, green-white selection and I-Sce I-mediated rescue of circular adenovirus plasmids in 293 cells" GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 10, no. 22, 1 October 2003 (2003-10-01), pagina 1926-1930, XP002405401 ISSN: 0969-7128 figura 1	11,13

-/--

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES2009/070194

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	WO 02/092786 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; EHRHARDT ANJA [US]; KAY MARK [US]) 21 Noviembre 2002 (2002-11-21) figura 3	11,13
A	----- ANGLANA MAURO ET AL: "Construction of a recombinant adenovirus for efficient delivery of the I-SceI yeast endonuclease to human cells and its application in the in vivo cleavage of chromosomes to expose new potential telomeres" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 27, no. 21, 1 Noviembre 1999 (1999-11-01), pagina 4276-4281, XP002155138 ISSN: 0305-1048	11
A	----- GOUBLE AGNÈS ET AL: "Efficient in toto targeted recombination in mouse liver by meganuclease-induced double-strand break" JOURNAL OF GENE MEDICINE, WILEY, US, vol. 8, no. 5, 1 Mayo2006 (2006-05-01), pages 616-622, XP002427714 ISSN: 1099-498X -----	11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2009/070194

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17(2)(a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver hoja adicional

1. ☒ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una protesta por parte del solicitante.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2009/070194

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA
continuación del informe PCT/ISA/210

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Las reivindicaciones: 1-10, 15-17 (de manera total); y las reivindicaciones 18-28 (de manera parcial)

Un polinucleótido o un vector de expresión que comprende:

- (a) un primer casete de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un regulador transcripcional;
- (b) un segundo casete de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una endonucleasa de restricción, y que se encuentra bajo control operativo de una secuencia reguladora de la transcripción activable por el regulador transcripcional codificado por el polinucleótido definido en (a).

Además, ídem que comprende un casete de expresión que codifica la proteína adenoviral E1A. Además, las células huésped que comprenden dichos polinucleótidos y los métodos para producir tales células huésped y los métodos para producir vectores adenovirales de alta capacidad utilizando dichas células huésped.

2. Las reivindicaciones: 11-14 (de manera total); y las 18-28 (de manera parcial)

Un polinucleótido o vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que comprende el genoma de un adenovirus recombinante que carece de, al menos, la secuencia ψ de empaquetamiento y la secuencia que codifica la proteína E1A o E1A/E1B, en donde dicha secuencia que comprende el genoma de un adenovirus recombinante se encuentra flanqueada por secuencias de reconocimiento específico para una endonucleasa de restricción.

Además las células huésped que comprenden dichos polinucleótidos y los métodos para producir tales células huésped y métodos para producir vectores adenovirales de alta capacidad utilizando dichas células huésped.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2009/070194

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 02092786	A	21-11-2002	CA
		2442144 A1	21-11-2002
		EP	1379281 A2
		14-01-2004	21-10-2004
		JP	2004532039 T

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 7/06 (2006.01) C 1 2 N 7/06

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

(74)代理人 100111730
 弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100137497
 弁理士 大森 未知子

(72)発明者 キアン、チェン
 スペイン国ナバーラ、パンプローナ、アベニダ、ピオ、ドセ、5 3、イセテ(デ・ペ・イ。)

(72)発明者 スサーナ、モウリニョ、ロペス
 スペイン国ナバーラ、パンプローナ、アベニダ、ピオ、ドセ、5 3、イセテ(デ・ペ・イ。)

(72)発明者 ヘスス、マリア、プリエト、バルトゥエニャ
 スペイン国ナバーラ、パンプローナ、アベニダ、ピオ、ドセ、5 3、イセテ(デ・ペ・イ。)

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA32 CA02 DA03 DA06 EA02 EA04 FA20
 4B065 AA01Y AA26X AA93X AA95X AA95Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24
 CA45 CA60