(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5468780号
(P5468780)

(45)発行日　平成26年4月9日(2014.4.9)　(24)登録日　平成26年2月7日(2014.2.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 7/02	(2006.01)	C12N	7/02	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102
C07K 14/075	(2006.01)	C07K	14/075	

請求項の数 24　(全 41 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2008-539429 (P2008-539429)
(86)(22)出願日	平成18年11月8日 (2006.11.8)
(65)公表番号	特表2009-514544 (P2009-514544A)
(43)公表日	平成21年4月9日 (2009.4.9)
(86)国際出願番号	PCT/EP2006/068234
(87)国際公開番号	WO2007/054516
(87)国際公開日	平成19年5月18日 (2007.5.18)
審査請求日	平成21年11月6日 (2009.11.6)
(31)優先権主張番号	05110453.7
(32)優先日	平成17年11月8日 (2005.11.8)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号	60/750,156
(32)優先日	平成17年12月14日 (2005.12.14)
(33)優先権主張国	米国 (US)
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC2744

(73)特許権者　505123882
プロバイオゲン　アーゲー
ドイツ連邦共和国，１３０８６　ベルリン，ゴエセシュトラーセ　５４
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山　英二
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁
(72)発明者　サンディグ，フォルカー
ドイツ連邦共和国，ベルリン　１３１８５，ブッホルスター　シュトラーセ　５
最終頁に続く

(54)【発明の名称】産生能を増大させるタンパク質因子、新規な細胞株及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

アデノウイルス以外の標的ウイルスあるいはアデノウイルスに関連しない１又はそれ以上の標的タンパク質を調製する方法であって、

（ａ）前記ウイルス、前記ウイルスをコードする核酸配列を有するベクター、あるいは前記１又はそれ以上の標的タンパク質をコードする核酸配列を有するベクターを脊椎動物宿主細胞に感染させるか又はトランスフェクションすることによって得ることができる脊椎動物発現細胞であって、アデノウイルスＰＩＸ又はその融合タンパク質をコードする遺伝子をそのゲノムに安定的に組み込まれて有し、かつアデノウイルスＰＩＸ又はその融合タンパク質を安定的に発現する脊椎動物発現細胞を培養すること、及び

（ｂ）標的ウイルス又は標的タンパク質を単離すること

を含む、前記方法。

【請求項２】

（ｉ）前記融合タンパク質は、アデノウイルスＰＩＸを含む少なくとも１つの第１のドメインと、転写調節因子として作用する少なくとも１つの第２のドメインとを含む；及び／又は

（ｉｉ）上記（ｉ）における前記第１及び第２のドメインが直接又はペプチドリンカーを介して互いに共有結合により結合する；及び／又は

（ｉｉｉ）アデノウイルスＰＩＸ又はその融合タンパク質が、少なくとも１ｐｇ／μｇ細胞タンパク質の量で前記宿主細胞及び前記発現細胞において発現する；及び／又は

（ｉｖ）アデノウイルスＰＩＸ又はその融合タンパク質をコードする遺伝子が安定な同種プロモーター又は異種プロモーターの制御下にある、
請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記転写調節因子が、転写因子、蛍光マーカータンパク質、酵素及び輸送ペプチドからなる群から選ばれるものである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記転写因子がレチノイン酸受容体α（ＲＡＲＡ）であるか、蛍光マーカータンパク質がＧＦＰ又はＤｓＲｅｄであるか、酵素がＬａｃＺであるか、又は輸送ペプチドがＮＬＳである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
（ｉ）アデノウイルスＰＩＸが、配列番号２に示される配列を有する；
（ｉｉ）前記融合タンパク質が、アデノウイルスＰＩＸとレチノイン酸受容体α（ＲＡＲＡ）との融合タンパク質である；
（ｉｉｉ）前記融合タンパク質が、アデノウイルスＰＩＸとＧＦＰとＮＬＳ配列との融合タンパク質である；又は
（ｉｖ）前記融合タンパク質が、アデノウイルスＰＩＸとＧＦＰとの融合タンパク質である、又は
（ｖ）前記融合タンパク質が、アデノウイルスＰＩＸと単離されたＮＬＳ配列との融合タンパク質である、
請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
（ｉ）アデノウイルスＰＩＸとレチノイン酸受容体α（ＲＡＲＡ）との融合タンパク質が、配列番号４に示される配列を有する；又は
（ｉｉ）アデノウイルスＰＩＸとＧＦＰとＮＬＳ配列との融合タンパク質が、配列番号２３に示される配列を有する、
請求項５に記載の方法。
【請求項７】
（ｉ）前記宿主細胞及び発現細胞が初代細胞又は以前に不死化された細胞に由来する；及び／又は
（ｉｉ）前記宿主細胞及び発現細胞が、アデノウイルスのＥ１タンパク質を含むさらなる不死化ウイルス遺伝子を有する；及び／又は
（ｉｉｉ）前記細胞が、選択マーカー配列、スプライスドナー／アクセプター部位、及び、細胞において発現する標的核酸配列の組み込みを可能にするリコンビナーゼ認識配列からなる群から選択される機能的な配列をさらに有する、
請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
（ｉ）前記標的ウイルスが、野生型、変異ウイルス又は欠失ウイルス、低温適合ウイルス又は弱毒化ウイルス、ワクチン株、及びウイルスベクターから選択される；又は
（ｉｉ）前記１又はそれ以上の標的タンパク質が、抗体、組換えタンパク質、ウイルス抗原、及びペプチドホルモンから選択される、
請求項１から７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
ウイルスベクターが、レンチウイルス、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス（ａａｖ）、ヘルペスウイルス及びフラビウイルスから選択される、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
ポックスウイルスが、牛痘ウイルス、鶏痘ウイルス及びカナリア痘ウイルスから選択されるものである、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
牛痘ウイルスが、改変ワクシニアＡｎｋａｒａ（ＭＶＡ）ウイルスである、請求項１０

に記載の方法。
【請求項１２】
（ｉ）組換えタンパク質が、エリスロポイエチン、α－１－アンチトリプシン、血液凝固因子ＶＩＩＩ、血液凝固因子ＩＸ及びインターフェロンから選択される；又は
（ｉｉ）ウイルス抗原が、インフルエンザＨＡ、インフルエンザＮＡ、ＨＢＶ－Ｓ、ヘルペスＧタンパク質及び狂犬病Ｇタンパク質から選択される、
請求項８に記載の方法。
【請求項１３】
前記宿主細胞及び発現細胞がヒト脳に由来するものである、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記宿主細胞及び発現細胞がヒト胎児脳に由来するものである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記宿主細胞がＮＣ５Ｔ１１＃３４細胞であり、前記発現細胞がＮＣ５Ｔ１１＃３４細胞に由来し、ただし、前記ＮＣ５Ｔ１１＃３４細胞はＤＳＭＺにアクセション番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２７４４で寄託される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記宿主細胞及び発現細胞がトリ細胞である、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記宿主細胞及び発現細胞が、アヒルの網膜又はアヒルの体節に由来するトリ細胞である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記宿主細胞がＣＲ．ＰＩＸ（１７ａ１１ｂ）細胞であり、前記発現細胞がＣＲ．ＰＩＸ（１７ａ１１ｂ）細胞に由来し、ただし、前記ＣＲ．ＰＩＸ（１７ａ１１ｂ）細胞はＤＳＭＺにアクセション番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２７４９で寄託される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
請求項１から１８のいずれか一項に記載のアデノウイルス以外の標的ウイルスあるいはアデノウイルスに関連しない１又はそれ以上の標的タンパク質を生産するための脊椎動物発現細胞であって、
（ｉ）アデノウイルスＰＩＸ又はその融合タンパク質を安定的に発現し、かつ
（ｉｉ）アデノウイルス以外の標的ウイルス、前記ウイルスをコードする核酸配列を有するベクター、又は前記１又はそれ以上の標的タンパク質をコードする核酸配列を有するベクターが感染した又はトランスフェクションされた、前記細胞。
【請求項２０】
請求項１３から１８において定義される細胞である、請求項１９に記載の脊椎動物発現細胞。
【請求項２１】
請求項１から１８のいずれか一項に記載の脊椎動物宿主細胞に、アデノウイルス以外のウイルス、前記ウイルスをコードする核酸配列を有するベクター、あるいは前記アデノウイルスに関連しない１又はそれ以上の標的タンパク質をコードする核酸配列を有するベクターを感染又はトランスフェクションすることを含む、請求項１９又は２０に記載の脊椎動物発現細胞を調製する方法。
【請求項２２】
アデノウイルスＰＩＸ又はその融合タンパク質をコードする遺伝子をそのゲノムに安定的に組み込まれて有し、かつ前記アデノウイルスＰＩＸ又はその融合タンパク質を安定的に発現する、トリ宿主細胞又はヒト脳由来宿主細胞。
【請求項２３】

適切なトリ出発細胞又はヒト脳由来出発細胞に、アデノウイルスＰＩＸ又はその融合タンパク質をコードする核酸配列を有するベクターをトランスフェクションすることを含む、請求項２２に記載のトリ宿主細胞又はヒト脳由来宿主細胞を調製する方法。
【請求項２４】
アデノウイルス以外の標的ウイルスあるいはアデノウイルスに関連しない１又はそれ以上の標的タンパク質を調製するための、請求項１９又は２０に記載の脊椎動物発現細胞の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、アデノウイルス以外の標的ウイルス又は標的タンパク質を、特定の異種調節タンパク質をコードする遺伝子がそのゲノムに安定的に組み込まれた強力な発現細胞株を利用して調製する方法を提供する。
【背景技術】
【０００２】
真核生物細胞から得られるバイオ医薬製品は現代医療の欠くことのできない一部である。しかしながら、増大した産生能及び増大した安全性は、相当な最適化を依然として必要とする重要なパラメーターである。最適化に向けた努力における最も大きな障害は細胞実体そのものである。バイオ医薬プロセスにおける使用のために既に公表されている細胞株に、そのような操作された細胞からの製品収量を増大させるために導入することができる安全な導入遺伝子は、極めて有益である。
【０００３】
アデノウイルスは、広範囲の動物に感染する、エンベロープを有さない（裸の）二本鎖ＤＮＡウイルスである。最もよく特徴づけされているメンバーの１つがヒトアデノウイルス血清型５（Ａｄ５）である。このウイルスは感冒症状の原因となることが多く、感染が多くの場合には小児において生じる。
【０００４】
アデノウイルスは遺伝子操作が容易であり、Ａｄ５（配列についてのＧｅｎＢａｎｋアクセション番号：ＡＣ　０００００８）を含む、様々な複製不能なアデノウイルスが、遺伝子治療におけるベクターとして使用され、また、治療的ワクチン接種のために使用される。複製不能なウイルスを得るために、ゲノムＤＮＡのいくつかの大きな領域が非ウイルス性の配列により置換される。失われたウイルス機能が、ベクターにおいて欠失される遺伝子により安定的にトランスフェクションされている宿主細胞株によってトランス作用で提供される。開発されたより初期のシステムの１つは、対応するＥ１タンパク質を提供する細胞株で産生される、調節Ｅ１領域が欠失されたアデノウイルスベクターからなる。
【０００５】
本目的のための最も一般的な細胞株が２９３細胞株である。この細胞株は、フラグメント化されたアデノウイルスゲノムＤＮＡを初代ヒト細胞にトランスフェクションすることによって１９７７年に作製された（Graham et al., J. Gen. Virol., 36, 59-74 (1977)）。これは、アデノウイルスが遺伝子治療ベクターとして役立ち得ることが認識されたよりもかなり前であった。得られた細胞株は、その後、Ｅ１領域を含むゲノムＤＮＡのヌクレオチド１～４３４４を含有することが示された（Louis et al., Virology, 233, 423-429 (1997)）。この特徴づけにより、Ｅ１領域が初代細胞の不死化及び形質転換のために使用できることが明らかにされた。
【０００６】
Ｅ１領域の隣には、ｐＩＸ（「タンパク質９」；ゲノムＤＮＡでのヌクレオチド３６０９～４０３１）に対する遺伝子が続く。ｐＩＸに対するプロモーターがＥ１領域のＥ１Ｂ成分の内部に埋め込まれている。プロモーター閉塞と呼ばれる機構は、ウイルスのＤＮＡ複製が始まるとき、ウイルス感染サイクルにおける遅れた初期時間でのｐＩＸの発現を可能にし、ウイルスＤＮＡのコピー数を増大させる（Fessler and Young, J. Virol., 72,

4049-4056 (1998))。その遺伝子は、２９３細胞に組み込まれた４３４４個のヌクレオチドの中に存在するが、ｐＩＸの発現は、高感度な放射能標識化方法を用いた場合でさえ、検出することができない（Spectoret al., J. Virol., 36, 860-871 (1980))。

【０００７】

上記のように、複製欠陥アデノウイルスベクターは、ウイルスゲノムからのＥ１領域の欠失によって作製されている。Ｅ１産物はウイルスの複製及びＥ１領域の機能のために不可欠であり、従って、アデノウイルスパッケージング細胞（例えば、２９３細胞株など）における安定なＥ１導入遺伝子を介してトランス作用で提供されなければならなかった。Ｅ１領域に近いために、ｐＩＸ遺伝子は、欠失型アデノウイルスベクターと、宿主ゲノムにおけるＥ１との間での頻繁な組換えを引き起こした。この組換え事象は、複製能を有するアデノウイルス（ＲＣＡ）を生じさせた（これは、ベクター調製における重大な混入である）。この組換え事象を抑制するために、ｐＩＸがアデノウイルスのゲノムから欠失された。これらの実験の途中で、ｐＩＸは、アデノウイルスのカプシドを、主要な組み立てブロック（ヘキソン）の相互作用を増大させることによって熱的ストレス及び立体的ストレスに対して安定化することが認識された（Colby and Shenk, J. Virol., 39, 977-980 (1981); Ghosh-Choudhury et al., EMBO J., 6, 1733-1739 (1987))。ｐＩＸの不在下での形態形成では、野生型の３５９３８塩基対の１０５％を越えるゲノムＤＮＡ分子を送達することができない温度感受性ウイルスが生じる。正常なパッケージング能力及び熱安定性を依然として可能にするために、ｐＩＸタンパク質は、アデノウイルスベクターのためのパッケージング細胞として意図される細胞株に安定的に導入された（Krougliak and Graham, Hum. Gene Ther., 6, 1575-1586 (1995)；ＷＯ９９／５７２９６；及び、Imler et al., Gene Therapy, 3, 75-84 (1996))。

【０００８】

また、ｐＩＸがビリオンの表面を装飾するという認識により、ｐＩＸ融合タンパク質は、アデノウイルスベクターの宿主範囲を拡大する目的で、又はウイルス粒子の形態形成及び細胞内移動を追跡する目的で作製されている（これは、Parks, Mol. Ther., 11, 19-25 (2005)によって総説される）。

【０００９】

ｐＩＸは、構造タンパク質として明らかではあるが、アデノウイルスが複製するための調節タンパク質としても関与する。ＰＩＸは、Ｅ１Ａの発現を増大させるための転写のトランス活性化因子として機能することが仮定される（この機能は、場合により感染段階においてカプシドから生じるＰＩＸタンパク質によりウイロカイン（virokine）としても発揮される）（これは、Parks, Mol. Ther., 11, 19-25 (2005)によって総説される）。ＰＩＸは、初期タンパク質のＥ４　Ｏｒｆ３と一緒になった場合、ＰＭＬ体と呼ばれる核内封入体と相互作用することもまた記載される（Puvion-Dutilleul et al., Exp. Cell. Res., 218、9-16 (1995); Leppard and Everett, J. Gen. Virol., 80、997-1008 (1999))。これらは、サイズが２５０ｎｍ～５００ｎｍの動的な凝集物であり、細胞分化の調節（Wang et al., Science, 279, 1547-1551 (1998))、アポトーシスの制御（Quignon et al., Nature Gen., 20, 259-265 (1998))、及びウイルス感染に対する応答（Moeller and Schmitz, Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 51, 295-300 (2003))に関与することが提案される。

【００１０】

その多形質発現的作用のために、本発明者らは、ＰＩＸが、アデノウイルス又はアデノウイルスベクターに関連しないバイオ医薬製品に関し、細胞増殖又は産生能を増大させるかを調べるために、ＰＩＸタンパク質を細胞株に導入した。樹立した細胞株においてこれらの能力を調節する因子が一般に求められている。

【００１１】

例えば、弱毒化（弱化）ウイルスは有望なワクチン候補物である。接種されたとき、弱毒化（弱化）ウイルスは天然の感染を模倣するが、ワクチン被接種者により所望される保護的免疫応答が確立されるためにはより多くの時間がかかる。免疫低下患者（例えば、H

ＩＶ感染による免疫低下患者）の数が増大しつつあることにより、非常に弱毒化された株が望ましい。弱毒化株は依然として（通常の場合には良性の）感染に向かって進行するのに対して、非常に弱毒化された株は、機能的な免疫システムの不在下でさえ、細胞レベルで阻止される。弱毒化を確立及び維持するための頻繁に使用される方法は、ウイルスを異なる宿主組織で継代培養することである。例えば、ヒトへのワクチン接種のために意図された麻疹・おたふく風邪ウイルスは、孵化した鶏卵又はその由来培養物のいずれかにおいてであっても、初代細胞において継代培養される。新しい世代のワクチンは、産生のために初代ニワトリ細胞に同様に依存する非常に弱毒化されたポックスウイルスに基づく。従って、初代ニワトリ細胞に取って代わることができ、同時にまた、二次的操作（例えば、ＰＩＸ導入遺伝子の導入など）に起因するウイルス感染から自身をあまり効率よく守ることができない細胞株は、非常に望ましい実体（substrate）を提供する。

【００１２】

他の目的のために、（トリではなく）哺乳動物の細胞株が好ましい場合がある。そのような好ましい細胞株は既に存在し、安全性、及び得られるバイオ医薬製品によって引き起こされる危険性に関して保健当局による審査に合格している。この場合でもまた、利用可能な適用の範囲又は産生効率を、安全性の特徴を損なうことなく増大させるための二次的操作（例えば、ＰＩＸ導入遺伝子の導入など）が非常に望ましい。

【発明の開示】

【００１３】

アデノウイルス遺伝子ｐＩＸ（又はそのキメラな融合アナログ）により安定的にトランスフェクションされている細胞株を調製するとき、本発明者らは、ｐＩＸがトリ細胞及びヒト細胞において表現型作用を発揮することを予想外にも発見した。トリ細胞について、このことは特に驚くべきことである。これは、トリ細胞には、ヒトアデノウイルスが感染することができず、また、トリアデノウイルス（例えば、ＣＥＬＯ又は家禽アデノウイルス８型など）はＰＩＸホモログをコードしないからである（Ojkic and Nagy, J. Gen. Virol., 81, 1833-1837 (2000)）。その上、本発明者らは、ＰＩＸの安定な存在が、おそらくはｔｏｌｌ様受容体３を介して、二本鎖ＲＮＡアナログによる誘導に対する細胞の感受性を増大させることを観察した。おそらくはこの関連であるかもしれないが、本発明者らはまた、ＰＩＸタンパク質の存在が、非常に弱毒化されたポックスウイルスの収量をトリ宿主細胞において増大させることを予想外にも観察した。ポックスウイルス感染細胞は二本鎖ＲＮＡアナログによる誘導をあまり受けなかったので、本発明者らは、ＰＩＸタンパク質と、ポックスウイルスの抗インターフェロン遺伝子との間における、以前には記載されていない相互作用を見出した可能性がある。本発明者らはまた、安定的にトランスフェクションされた細胞株によって放出される（ウイルスだけではない）タンパク質性産物の収量において驚くほどの増大を観察した。

【００１４】

従って、本発明は、

（１）アデノウイルス以外の標的ウイルスあるいは１又はそれ以上の標的タンパク質を調製する方法であって、

（ａ）前記標的ウイルス、前記標的ウイルスをコードする核酸配列を有するベクター、あるいは前記１又はそれ以上の標的タンパク質をコードする核酸配列を有するベクターを宿主細胞に感染させるか又はトランスフェクションすることによって得ることができる発現細胞であって、異種調節タンパク質としてのアデノウイルスＰＩＸ又はその機能的改変体をコードする遺伝子をそのゲノムに安定的に組み込まれて有し、かつ前記調節タンパク質又はその機能的改変体を安定的に発現する発現細胞を培養すること（この場合、アデノウイルス以外の標的ウイルスは前記調節タンパク質を含有せず、かつ標的タンパク質は前記調節タンパク質又はその機能的改変体とは異なる）、及び

（ｂ）標的ウイルス又は標的タンパク質を単離すること

を含む方法；

（２）前記ＰＩＸタンパク質又はその機能的改変体が非同族のウイルス因子と協同し、

前記タンパク質以外の因子の細胞内分布を調節し、転写及び／又は細胞増殖を調節し、かつ、前記調節タンパク質を含有しないウイルスの産生において、及び前記調節タンパク質又はその機能的改変体とは異なるタンパク質の産生において細胞の産生能を高める、上記（１）の好ましい実施形態；

（３）アデノウイルスｐＩＸが、アデノウイルスｐＩＸの活性又は細胞内分布を調節又は拡大する別のタンパク質との融合タンパク質として提供され、例えば、レチノイン酸受容体αに融合され、好ましくは、配列番号４に示される配列を有する融合タンパク質であるか、又はＧＦＰに融合され、ＮＬＳを含有し、好ましくは、配列番号２３に示される配列を有する融合タンパク質である、上記（１）及び（２）の好ましい実施形態；

（４）宿主細胞及び発現細胞が、哺乳動物細胞及びトリ細胞を含む脊椎動物細胞であり、好ましくは、哺乳動物細胞がヒト脳由来細胞であり、トリ細胞がアヒル網膜由来細胞又はアヒル体節由来細胞である、上記（１）～（３）の好ましい実施形態；

（５）宿主細胞及び発現細胞がヒト脳に由来し、好ましくはヒト胎児脳に由来し、最も好ましくはＮＣ５Ｔ１１細胞であり、かつ前記細胞が、アデノウイルスＰＩＸ又はその機能的改変体をコードする核酸配列を異種調節タンパク質として有し、好ましくは、前記異種調節タンパク質が、配列番号１、配列番号３又は配列番号２２に示される核酸によってコードされる、上記（１）～（４）の好ましい実施形態；

（６）宿主細胞がＮＣ５Ｔ１１＃３４細胞であり、発現細胞がＮＣ５Ｔ１１＃３４細胞に由来し、ただし、前記ＮＣ５Ｔ１１＃３４細胞はＤＳＭＺにアクセション番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２７４４で寄託される、上記（５）の好ましい実施形態；

（７）宿主細胞及び発現細胞がトリ細胞であり、好ましくはアヒルの網膜又はアヒルの体節に由来し、かつ前記細胞が、アデノウイルスＰＩＸ又はその機能的改変体をコードする核酸配列を異種調節タンパク質として有し、好ましくは、前記異種調節タンパク質が、配列番号１、配列番号３又は配列番号２２に示される核酸によってコードされる、上記（１）～（４）の好ましい実施形態；

（８）宿主細胞がＣＲ．ＰＩＸ（１７ａ１１ｂ）細胞であり、発現細胞がＣＲ．ＰＩＸ（１７ａ１１ｂ）細胞に由来し、ただし、前記ＣＲ．ＰＩＸ（１７ａ１１ｂ）細胞はＤＳＭＺにアクセション番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２７４９で寄託される、上記（７）の好ましい実施形態；

（９）上記（１）～（８）において定義される、標的ウイルスあるいは１又はそれ以上の標的タンパク質を生産するための発現細胞、好ましくは、発現が、上記（５）～（８）において定義される通りである；

（１０）上記（１）～（８）において定義される宿主細胞株に、ウイルス、前記ウイルスをコードする核酸配列を有するベクター、あるいは前記１又はそれ以上の標的タンパク質をコードする核酸配列を有するベクターを感染又はトランスフェクションをすることを含む、上記（９）において定義される発現細胞を調製する方法；

（１１）上記（５）～（８）において定義される宿主細胞；

（１２）適切な出発細胞に、前記調節タンパク質又はその機能的改変体を有するベクターをトランスフェクションすることを含む、上記（１１）の宿主細胞を調製する方法；

（１３）標的ウイルスあるいは１又はそれ以上の標的タンパク質を調製するための、上記（７）において定義される発現細胞の使用；

（１４）調節タンパク質を含む少なくとも１つの第１のドメインと、転写調節因子として、及び／又は上記（２）若しくは（３）において定義される細胞内標的化のためのシグナルとして作用するタンパク質又はペプチドを含む少なくとも１つの第２のドメインとを含む融合タンパク質；及び

（１５）上記（１４）において定義される融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列

を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１５】

本発明の実施形態（１）の方法では、異種調節タンパク質、すなわち、ｐＩＸ、又はその機能的改変体をコードする遺伝子をそのゲノムに組み込んでいる発現細胞が利用される。前記調節タンパク質は下記の性質を有する。

１．前記調節タンパク質は転写を調節し、また、特に適切な調節因子又はレギュレーターに連結されるならば、細胞増殖にも影響を及ぼす。

【００１６】

２．前記調節タンパク質は、細胞株の産生能を、前記調節タンパク質を含有しないウイルスの産生に関して高め（すなわち、前記調節タンパク質は、ウイルスから欠失されたタンパク質の代替物ではない）、及び／あるいは、前記調節タンパク質又はその機能的改変体とは異なるタンパク質の産生に関して高める。

【００１７】

本発明によれば、異種調節タンパク質は、アデノウイルス血清型５のタンパク質ｐＩＸ（例えば、配列番号２に示されるａａ配列を有するタンパク質）、その変異体（これには、付加変異体、置換変異体及び／又は欠失変異体が含まれる）、及びその改変体（例えば、異なる血清型のアデノウイルスから得られる改変体）などである。

【００１８】

本発明による「異種調節タンパク質の機能的改変体」には、血清型５以外のアデノウイルスに由来するホモログ、それぞれの野生型調節タンパク質の特定のアミノ酸残基の変異のすべてのタイプ（付加、置換及び／又は欠失）、さらなる活性タンパク質配列又はペプチド配列の融合による修飾などが含まれる。特に好ましいものは、融合タンパク質、すなわち、本明細書中で定義される調節タンパク質を含む少なくとも１つの第１のドメインと、転写調節因子として作用するタンパク質又はペプチドを含む少なくとも１つの第２のドメインとを含む融合タンパク質である。本発明の好ましい実施形態において、前記転写調節因子は、レチノイン酸受容体αを含む転写因子であり、これは完全な形態又は不完全な形態（すなわち、短縮化形態）で存在してもよい。調節因子はまた、ＮＬＦ配列（例えば、配列番号２１に示されるＮＬＦ配列）を含む輸送ペプチドであってもよい。本発明によれば、第１及び第２のドメインは直接又はペプチドリンカーを介して互いに共有結合により結合する。好適なペプチドリンカーには、柔軟な親水性構造体（例えば、ポリｇｌｙ－ｓｅｒなど）が含まれる。

【００１９】

下記の詳細な説明において使用される用語「細胞」及び用語「細胞株」は、発現細胞／発現細胞株及び宿主細胞／宿主細胞株を示す。

【００２０】

本発明によれば、異種調節タンパク質又はその機能的改変体が、少なくとも１ｐｇ／μｇ細胞タンパク質の量で、好ましくは、少なくとも１０ｐｇ／μｇ細胞タンパク質の量で細胞において発現し、その結果、その発現がウエスタンブロッティングによって決定され得ることが好ましい。

【００２１】

本発明の細胞において、異種調節タンパク質又はその機能的改変体は、好ましくは、安定な同種プロモーター又は異種プロモーターの制御下にある。好適なプロモーターは構成的な細胞プロモーター又はその改変体であり、例えば、ヒトのトランスロケーション伸長因子２プロモーターなどである。本発明において利用されるヒトのトランスロケーション伸長因子２プロモーターの具体的な改変体は、配列番号１２に示される配列を有する。示された配列は、ヒトの第１９染色体：３，９３５，３２５～３，９３６，６３８（ヒトゲノムアセンブリー、２００４年５月）に位置するプロモーターの「短い」形を表し、安定な中程度のレベルの発現をもたらす。より強い発現のために、ｃｈｒ１９：３，９３５，３４９～３，９３８，９５７（ヒトゲノムアセンブリー、２００４年５月）に位置するプロモーターの「より長い」形を使用することができる。

【００２２】

本発明によれば、細胞は、哺乳動物細胞及びトリ細胞などを含む脊椎動物細胞である。

好適な哺乳動物細胞は、ヒト細胞、及びマウス、ラット、ハムスターを含む齧歯類細胞などである。本発明による特に好ましい哺乳動物細胞は、ヒト脳に由来する細胞（具体的には、ヒト胎児脳に由来する細胞）、マウスのＮＳＯ細胞又はＳｐ２／０細胞、ＢＨＫ細胞又はＣＨＯ細胞である。好適なトリ細胞は、アヒル、ニワトリ、ウズラ又はガチョウの細胞である。本発明による特に好ましいトリ細胞は、アヒルの網膜由来細胞又は体節由来細胞に由来する細胞である。

【００２３】

他方で、本発明の細胞は初代細胞に由来し得るか、又は以前に不死化された細胞に由来し得る。その上、細胞は、アデノウイルスのＥ１タンパク質（例えば、マストアデノウイルスＣ群５型のＥ１タンパク質など）を含むさらなる不死化（ウイルス）遺伝子を有することができる。本発明によれば、細胞が配列番号５に示されるアデノウイルスのＥ１Ａ遺伝子及び／又はＥ１Ｂ遺伝子をさらに有することは、特に好ましい。

【００２４】

本発明の実施形態（１）の方法で利用される細胞は、機能的な配列、例えば、発現細胞としてのその適用のために要求される配列、例えば、選択マーカー配列、スプライスドナー／アクセプター部位、及び／又は、細胞において発現される標的核酸配列の組み込みを可能にするリコンビナーゼ認識配列などをさらに有することができる。

【００２５】

本発明の実施形態（１）、実施形態（１０）及び実施形態（１２）の方法で行われる「感染させる」、「トランスフェクションする」及び「形質転換する」は、当業者には公知である標準的な手順に従って行うことができる。前記方法はさらに、必要に応じて、選択、単離及び拡大の好適な工程をさらに包含することができる。

【００２６】

実施形態（１）の方法において、標的ウイルスには、野生型ウイルス、変異ウイルス又は欠失ウイルス、低温適合ウイルス又は弱毒化ウイルス、ワクチン株、異種の遺伝子を有するウイルスベクター、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルス、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス（ａａｖ）、ヘルペスウイルス及びフラビウイルスなど）が含まれる。

【００２７】

さらに、実施形態（１）の方法において、１又はそれ以上の標的タンパク質には、抗体、組換えタンパク質（例えば、エリスロポイエチン、α－１－アンチトリプシン、血液凝固因子ＶＩＩＩ、血液凝固因子ＩＸ及びインターフェロンなど）、ウイルス抗原（例えば、インフルエンザＨＡ、インフルエンザＮＡ、インフルエンザＭ、ＨＢＶ－Ｓ、ヘルペスＧタンパク質及び狂犬病Ｇタンパク質など）、及びペプチドホルモンなどが含まれる。本方法は、２つ以上の標的タンパク質の同時発現が可能である細胞の作製を可能にするが、この方法では、１つだけの標的タンパク質がコードされることが特に好ましい。

【００２８】

本発明の実施形態（１）の方法の培養及び単離は、当業者が容易に利用することができる標準的な手順に従って行うことができる。前記方法はさらに、標準的な精製工程、ならびに標的ウイルス又は標的タンパク質のその後の修飾工程を含むことができる。

【００２９】

実施形態（９）及び実施形態（１１）の発現細胞株及び宿主細胞株のそれぞれ好ましい実施形態、ならびに、実施形態（１０）及び実施形態（１２）の前記細胞株についての製造方法に関して、実施形態（１）に関連して本明細書中で提供された詳しい議論が参照される。

【００３０】

実施形態（１４）及び実施形態（１５）によれば、本発明は、調節タンパク質を含む少なくとも１つの第１のドメインと、本明細書中で定義される転写調節因子として作用するタンパク質又はペプチドを含む少なくとも１つの第２のドメインとを含む融合タンパク質、及び前記融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ提供する。本発明は

また、例えば、すべてのタイプのベクター構築物、細胞株、組織培養、トランスジェニック動物などにおいて、実施形態（１４）及び実施形態（１５）の、前記融合タンパク質の（例えば、診断適用及び医薬適用などにおける）使用、及び前記融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の使用にそれぞれ関連する。

【００３１】

細胞株ＮＣ５Ｔ１１＃３４が、２００５年１１月４日に、ＤＳＭＺ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、Mascheroder Weg 1b、38124 Braunschweig、ドイツ）にアクセション番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２７４４で寄託された。細胞株ＣＲ．ＰＩＸ（１７ａ１１ｂ）が、２００５年１１月２４日に、ＤＳＭＺ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、Mascheroder Weg 1b、38124 Braunschweig、ドイツ）にアクセション番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２７４９で寄託された。

【００３２】

本発明は下記の実施例によってより詳細に説明される。しかしながら、下記の実施例は、本発明を限定するように解釈してはならない。

【実施例】

【００３３】

実施例１：細胞株ＮＣ５Ｔ１１の開発

この細胞株を、非ウイルス性トランスフェクションによるアデノウイルス５のＥ１Ａ遺伝子及びＥ１Ｂ遺伝子での不死化によって、胎児脳から得られた細胞の混合物から開発した。

【００３４】

組織サンプルを誘発性流産後の胎児の脳の脳室周囲域から採取した。組織サンプルは、２０ｎｇ／ｍｌのｈＦＧＦ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ　９２００８、米国）、２０ｎｇ／ｍｌのｈＥＧＦ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１ｘ　Ｎ２補充物（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び８μｇ／ｍｌのヘパリン（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、米国）を含有するＤＥＭＥＭ／Ｆ１２をベースとしたニューロン培養培地において、ハサミで切り刻み、組織培養ピペットによる吸引によってホモジナイズした。細胞を２００ｇで３分間沈降させた。細胞の生存率は、トリパンブルーを使用して評価し、また、フローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｊｏｓｅ、ＣＡ　９５１３１、米国）を使用するときにはプロピジウムヨードを使用して評価した。生存率は７５％であった。０．５×10^6個の細胞をＴ２５フラスコに播種した。細胞を３７℃及び５％CO_2でインキュベーションした。細胞は培養の５日目までにニューロスフェアを形成した。ニューロスフェアを図１Ａに示す。８日目に、細胞を接着させるために、また、増殖を刺激するために、５％のＦＣＳが補充されたＤＭＥＭ／Ｆ１２に移した。細胞は、図１Ｂに示されるような均質な単層を形成し、これを、１週間に１回、１：５で継代培養した。この初代神経細胞培養物はＮＣ５と名付けた。

【００３５】

血清含有培地で２週間後、トランスフェクション試薬としてのＥｆｆｅｃｔｅｎｅ（Ｑｉａｇｅｎ、４０７２４　Ｈｉｌｄｅｎ、ドイツ）を製造者の説明書に従って使用して、サブコンフルエントの６ウエルプレートにおいて細胞にベクターｐ７９をトランスフェクションした。プラスミドｐ７９は下記の構成要素を含有する。ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、米国）はプラスミド骨格として役立ち、この場合、アンピシリン抵抗性マーカーは、大腸菌における増殖及び選択を可能にする、細菌プロモーターにより駆動されるカナマイシン抵抗性遺伝子に置換した。ベクターは、Ｅ１Ａの上流側の配列だけでなく、Ｅ１Ａ（ＣＲ３ドメインを含むスプライス改変体１３Ｓ、及びＣＲ３ドメインを含まないスプライス改変体１２Ｓ）ならびにＥ１Ｂの５５ｋ及び１９ｋについてのオープンリーディングフレームを含有する野生型アデノウイルス５型に由来するフラグメント（配列番号５）を有する。Ｅ１Ａ遺伝子の前には、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター（マウス）が置かれる。アデノウイルスの配列の後には、単純ヘルペスのチミジンキナーゼ遺伝子に由来するポリアデニル化シグナルが続き、これはＥ１Ｂのポリアデニル化

シグナルの代用として役立つ。様々なエレメントが、ＰＣＲによって、それぞれの生物から、又はドナープラスミドから得られ、従来の組換えＤＮＡ技術を使用してクローン化され、配列決定によって確認された。トランスフェクション後２日で、細胞をトリプシン処理し、１０ｃｍディッシュに移した。２週間後、高い核／細胞質比及び明瞭に識別可能な境界を伴う小さい細胞の増殖巣が、モック処理の細胞ではなく、トランスフェクションされた細胞において形成された（図１Ｃ）。１１番目のトランスフェクションから、８個の独立した増殖巣を、クローニングシリンダー（Ｃｏｒｎｉｎｇ、米国）を使用してトリプシンにより単離し、２４ウエルプレートのウエルに播種し、１２ウエルプレート、６ウエルプレートを介して、Ｔ２５フラスコに拡大した。すべての単離された増殖巣は２つのタイプの細胞を含有した。境界が鮮明である小さい細胞、及び広がった線維芽細胞様細胞。

【００３６】

トランスフェクション後３週間で、１５個のさらなるクローンがトランスフェクションＴ１１において認められ、そのうちのいくつかは、既に単離された初代クローンの残存する細胞に由来するかもしれない。

【００３７】

クローンＴ１１ａ．１及びクローンＴ１１ａ．６は最も速い増殖を示し、トランスフェクション後８週間で、ＤＭＥＭ／Ｆ１２、１０％ＤＭＳＯ、２５％血清において凍結保存された。この時点で、すべてのクローンが依然として、初代の表現型に類似する拡大した細胞質を有する少数の細胞を含有した。しかしながら、スプリット比がＴ１１ａ．１及びＴ１１ａ．６について１：５の場合、それらは過度に増殖し、トランスフェクション後のおよそ３ヶ月で除かれた。免疫蛍光実験は、変化した形態とＥ１Ａ及びＥ１Ｂの発現とを関連させるために行った。メタノールによる固定処理の後、細胞を、Ｅ１Ａ及びＥ１Ｂ５５ｋそれぞれに対するラット抗体で処理し、その後、テキサスレッドコンジュゲート化抗ラット抗体で処理した。図２に示されるように、サンプルにおけるすべての細胞は、Ｅ１Ａについて典型的な核染色、及びＥ１Ｂについての細胞質染色を示した。

【００３８】

トランスフェクション後３ヶ月で、クローンＴ１１ａ．１及びクローンＴ１１ａ．６は、トリプシン処理後の１．６×10^6個の細胞を播種することによって無血清培地ＰｒｏＰＥＲ（Ｃａｍｂｒｅｘ、ベルギー）に移した。細胞は、１週間に一度、遠心分離によって集め、培地を遠心分離によって交換した。細胞集団は生存するが、トランスフェクション後６ヶ月でさえ、細胞は低い生存率を依然として示し、６０時間～８０時間の高い倍加時間で増殖した。

【００３９】

細胞は、ＰｒｏＰＥＲ培地で３ヶ月後、５％のＦＣＳを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２に戻されたとき、４０時間の倍加時間を有する均質な、高生存率の培養物は両方のクローンについて形成している。Ｔ１１ａ．１をさらなる実験のための最も頑強な細胞クローンとして選び、ＮＣ５Ｔ１１と名付けた（図１Ｄ）。

【００４０】

実施例２：ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏクローン＃８の確立

細胞株におけるタンパク質産生は効率的なトランスフェクション方法及び選択方法に依存する。ＮＣ５Ｔ１１についての一般に使用される選択マーカー（Ｇ４１８、ピューロマイシン、ヒグロマイシン、ブラスチシジン、ＭＴＸ、ヒスチジノール）の適合性は不明である。第１の評価段階において、種々の市販されているトランスフェクション試薬（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎｅ）、Ｆｕｇｅｎｅ（Ｒｏｃｈｅ、ドイツ）、Ｐｏｌｙｆｅｃｔ（Ｑｉａｇｅｎ）及びＥｆｆｅｃｔｅｎｅ）を製造者のプロトコルに従って試験した。ｇｆｐをヒトＣＭＶプロモーターから発現するプラスミドｐＥＧＦＰ－Ｎ１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、米国）を、一過性トランスフェクション効率を測定するために使用した。最大の効率がＥｆｆｅｃｔｅｎｅ（Ｑｉａｇｅｎ）により得られ、ＤＭＥＭ／Ｆ１２／１０％ＦＣＳにおいて増殖する接着細胞に適用されたとき、細胞密度に依存して２０％～５０％に達した。

【００４１】
選択マーカー遺伝子を調べるために、ヒトＣＭＶプロモーターの制御下にあり、ウシ成長ホルモンのポリＡシグナルが続くヒトα－１－アンチトリプシン（ａａｔ）遺伝子と、弱いプロモーターによって制御されるそれぞれの選択マーカーとを含有する発現ベクターを構築した。より具体的には、ピューロマイシン選択について調べるために、ヒトＰＧＫプロモーターによって駆動され、ＳＶ４０初期ポリアデニル化シグナルが続くピューロマイシン抵抗性遺伝子を含有するベクターＣ５５を使用した。
【００４２】
トランスフェクション後、細胞を、０．７５μｇ／ｍｌのピューロマイシンを含有するＤＭＥＭ／Ｆ１２／５％ＦＣＳに播種し、毎週の培地交換を行いながら３週間にわたって選択した。クローンプールを作製し、発現を、ヤギポリクローナル抗α－１－アンチトリプシン抗体（Ｉｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、米国）、その後、ビオチン標識された二次のウサギ抗ヤギ抗体と、ストレプトアビジン－テキサスレッドコンジュゲートとを使用する免疫蛍光によって確認した。
【００４３】
個々の細胞クローンを単離するために、クローンプールの１００００個の細胞を１５ｃｍディッシュに播種した。４週間後、クローンを、クローンシリンダー（Ｃｏｒｎｉｎｇ）を使用して単離し、クローン＃１、クローン＃２、クローン＃７、クローン＃８、クローン＃９、クローン＃１０をａａｔ発現について分析した。より具体的には、細胞を１２ウエルプレートに7×10^{4}個の細胞で播種し、細胞数及びａａｔ発現を測定した。計算された細胞の比産生能速度を図３に示す。クローンＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８が、１００ｐｇ／細胞・日を越える比産生能を示し、これをさらなる開発のために使用した。
【００４４】
実施例３：産生培地へのＮＣ５Ｔ１１及びＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８の移行ならびに振とう機回分培養における発現分析
ＰｒｏＰＥＲ培地（Ｃａｍｂｒｅｘ）におけるＮＣ５Ｔ１１及びＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８の両方の増殖速度は、血清含有培地と比較して、およそ２倍低下した。従って、Ｘｃｅｌｌ　ＶＰＲＯ（ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を代替物として調べた。適合化は、4.5×10^{6}個の細胞をＴ２５フラスコにおいて５ｍｌのＥＸＣＥＬＬ　ＶＰＲＯに直接に播種することによって行った。２週間後、細胞増殖が再び始まり、１：３の毎週のスプリット比が確立した。次の段階として、両方のクローンを剪断ストレスの存在下での増殖に適合させた。細胞を５０ｍｌのポリプロピレンシェーカーチューブ（ＴＰＰ、スイス）において１２ｍｌのＥＸＣＥＬＬ　ＶＰＲＯに6×10^{4}細胞／ｍｌで播種し、１ｃｍの半径及び１６０ｒｐｍの速度による回転に供した。反復した継代培養の後、回分物のアッセイを、指数増殖期及び定常増殖期の期間中における最大細胞密度及び生成物の蓄積を測定するために行った。下記の観測結果が得られた。クローンＮＣ５１１ｐｕｒｏは、１８日目まで７０％を越えて維持された高い生存率を示した。最大細胞密度は1×10^{6}を越えなかった。生成物の蓄積は定常期の期間中も継続した（図５）。特定の培地開発又はさらなる細胞改良が、ＣＨＯ細胞により得られる細胞密度に匹敵し得る高い細胞密度を達成するためには必要であると結論づけられた。これにより、相当の増大した生成物力価がもたらされる可能性がある。
【００４５】
実施例４：融合タンパク質ｐＩＸ－ＲＡＲＡならびにｐＩＸ－ＲＡＲＡ及びｐＩＸの両方のための組み込みベクターの構築
アデノウイルスＰＩＸ及びレチノイン酸受容体α（ＲＡＲＡ）についての配列を、下記のプライマーを使用してアデノウイルス５型及びヒトゲノムＤＮＡからそれぞれＰＣＲによって得た。
ＰＩＸについては、
１．ＡＡＣＣＡＧＣＧＣＴＡＣＣＡＴＧＡＧＣＡＣＣＡＡＣＴＣＧＴ（配列番号６）
２．ＡＡＴＧＧＴＧＧＣＡＡＣＣＧＣＡＴＴＧＧＧＡＧＧＧＧＡＧＧ（配列番号７）

及び
ＲＡＲＡについては、
３．ＣＣＡＡＴＧＣＧＧＴＴＧＣＣＡＣＣＡＴＴＧＡＧＡＣＣＣＡＧＡ（配列番号８）
４．ＡＡＧＧＡＧＣＧＣＴＧＧＣＧＡＧＧＧＣＴＧＴＧＴＣＣＡＴ（配列番号９）。
【００４６】
両方のフラグメントを別々に増幅した。プライマー２とプライマー３との重複部は、両方のフラグメントを、プライマー３及びプライマー４を使用してＰＣＲによってつなげることを可能にした。融合遺伝子はベクターｐＥＦｐｒｏｍｈｙｇにクローン化し、これによりｐＥＦｐＩＸＲＡＲＡを得た。このベクターは、ｃｈｒ１９：３，９３５，３２５～３，９３６，６３８（ヒトゲノムアセンブリー、２００４年５月）に位置するヒト伸長因子２プロモーター（配列番号１２）を含有する。このプロモーターはＥＦ２遺伝子の上流エレメント及び第１イントロンを含有する。ＥＦ２の天然の開始コドン（これは第１イントロンの５’に位置する）を変異誘発によって除いた。ベクターｐＥＦｐｒｏｍｈｙｇにおいて、ＥＦ２配列の後には、ｐＩＸ－ＲＡＲＡを挿入するために使用される特異な制限部位（ＡｆｅＩ）が続く。ＡＦ１部位に続く内部リボソーム結合部位は、ｐＩＸ－ＲＡＲＡを伴う結合されたＲＮＡにおける第２のオープンリーディングフレームとしてのヒグロマイシン抵抗性遺伝子の発現を可能にする。この形態により、すべてのヒグロマイシン耐性細胞におけるｐＩＸ－ＲＡＲＡの発現が維持される。
【００４７】
ｗｔ型ｐＩＸについての遺伝子は、ＡＡＣＣＡＧＣＧＣＴＡＣＣＡＴＧＡＧＣＡＣＣＡＡＣＴＣＧＴ（配列番号１０）及びＡＣＣＧＡＧＣＧＣＴＴＧＴＴＴＴＡＡＡＣＣＧＣＡＴＴＧＧ（配列番号１１）のプライマーを使用して増幅し、ｐＩＸ－ＲＡＲＡの代わりにｐＥＦｐｒｏｍｈｙｇのＡｆｅ部位に組み込んで、ｐＥＦｐＩＸを得た。
【００４８】
実施例５：ＰＩＸ遺伝子及びＰＩＸ－レチノイン酸受容体融合タンパク質による細胞株ＮＣ５Ｔ１１及び細胞株ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８の改変
細胞クローンＮＣ５Ｔ１１及び細胞クローンＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８は、１．３×10^6細胞／ウエルでＤＭＥＭ／Ｆ１２／５％ＦＣＳに播種することによって６ウエルプレートにおいてトランスフェクションするために調製した。プラスミドＦ６７（ｐＥＦｐＩＸＲＡＲＡ）及びプラスミドＦ７６（ｐＥＦｐＩＸ）は制限酵素Ａｓｐ７００（Ｒｏｃｈｅ）で線状化し、エタノール沈殿後、Ｅｆｆｅｃｔｅｎｅ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してトランスフェクションした。ＤＮＡは１６μｌのＥｎｈａｎｃｅｒ及び２００μｌのＥＣ緩衝液と混合した。室温で２分後、１８μｌのＥｆｆｅｃｔｅｎｅを加え、リポソーム形成を室温で１０分間行わせた。トランスフェクションミックスを、前日に６ウエルプレートにおいて８０％のコンフルエンシーに播種された細胞の上の１ｍｌの培養液に加えた。高いトランスフェクション効率がｐＥＧＦＰ－Ｎ１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ ９４３０３－４２３０、米国）の並行したトランスフェクションにより確認された。トランスフェクション後１日で、培地は、１０％のＦＣＳを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２に交換し、７５μｇ／ｍｌ又は１００μｇ／ｍｌのヒグロマイシン（ＮＣ５Ｔ１１）及び５０μｇ／ｍｌのヒグロマイシン（ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８）を加えた。選択培地は１週間に２回取り替えた。１８日後、１５個～２０個の明瞭なクローンがウエルのそれぞれにおいて視認された。クローンプールはトリプシンで処理し、選択をさらに２週間続けた。クローンプールをＲＴＰＣＲによってＰＩＸＲＡＲＡの発現について調べた。クローンプールのほとんどにおいて、強いシグナルがプライマー１及びプライマー２により検出され、より弱いシグナルがプライマー１及びプライマー４により検出された。個々の細胞クローンを単離するために、クローンプールの１００００個及び１０００個の細胞を１５ｃｍディッシュに播種した。４週間後、クローンを、クローンシリンダー（Ｃｏｒｎｉｎｇ）を使用して単離した。Ｆ７６のトランスフェクションから生じたクローンについては、異なる方針を適用した。クローンプールはトリプシンで処理し、７５μｇ／ｍｌのヒグロマイシンを含有するＥＸＣＥＬＬ ＶＰＲＯにおいて５０ｍｌのシェーカーチューブに移

し、２週間の浮遊培養の後、２０００個の生細胞を１２ｍｌのクローンマトリックス（Ｇｅｎｅｔｉｘ、英国）と混合し、６ウエルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に播種し（２ｍｌ／ウエル）、自動化されたコロニー選択（ｃｌｏｎｅｐｉｘＦＬ、Ｇｅｎｅｔｉｘ、英国）に供した。ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８から生じるクローンには、＃１０～＃２１の番号を与えた。ＮＣ５Ｔ１１から生じるクローンには、＃３４～＃４５を与えた。ｐＥＦ２ＰＩＸをトランスフェクションしたクローンはＮＣ５Ｔ１１ＰＩＸＡ～ＮＣ５Ｔ１１ＰＩＸＥと名付けた。クローンをＰＣＲによってそれぞれのベクターの存在について調べた。プライマー１及びプライマー２を使用する最初の試験を図６に示す。陽性シグナルを示すすべてのクローンはＥｘＣｅｌｌ　ＶＰＲＯにおける増殖にシフトした。再度の適合化は、４．５×10^6個の細胞をＴ２５フラスコにおいて５ｍｌのＥＸＣＥＬ　ＶＰＲＯに直接播種することによって行った。静置培養で６週間後、細胞は、１２ｍｌの総量でＥＸＣＥＬＬ　ＶＰＲＯにおいて６×10^4細胞／ｍｌの播種密度で５０ｍｌのポリプロピレンシェーカーチューブ（ＴＰＰ、スイス）に移し、１ｃｍの半径及び１６０ｒｐｍの速度による回転に供した。クローン＃１０、クローン＃１２、クローン＃１４（ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８ｐＩＸＲＡＲＡ）、ならびに、クローン＃３４、クローン＃４３（ＮＣ５Ｔ１１ｐＩＸＲＡＲＡ）、ならびに、クローンＮＣ５Ｔ１１ＰＩＸＢ、クローンＮＣ５Ｔ１１ＰＩＸＣは、剪断ストレス下でのそれらの非常に高い生存率のために選んだ。クローン＃３４、クローン＃４３及びクローンＮＣ５Ｔ１１ＰＩＸＣは再度クローン化し、組み込まれたＤＮＡの安定性について分析した。安定性は、ＰＩＸとＥ１Ｂとの遺伝子比率を測定して評価した。これは、Ｅ１Ａ＋Ｅ１Ｂ及びｐＩＸＲＡＲＡが別個のトランスフェクションで導入されたが、Ｅ１遺伝子が導入されて、２年以上の選択の不在下で維持されることから、安定的に組み込まれていると見なされるからである。ゲノムＤＮＡは、２つの時点、すなわち、ｈｙｇ選択を止めた直後（初期）、選択圧の不在下で２ヶ月後（後期）で、選択された細胞クローンから単離した。ＰＩＸ及びＥ１ＢのＤＮＡレベルは２つのＤＮＡ濃度でのリアルタイムＰＣＲ（ＡＢＩ　７０００、ＣＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ）によって測定した。この評価の例を図７に示す。ベクターｐＥＦ２ＰＩＸＲＡＲＡは、Ｅ１Ｂに対して約０．４コピー～０．６コピーのＰＩＸＲＡＲＡで、＃３４及び＃４３のサブクローンにおいて安定的に維持される。クローンＮＣ５Ｔ１１ＰＩＸＣは元々、Ｅ１Ｂに対して４コピーのｐＩＸを含有する。この数字は実験の経過期間中に２倍低下する。

【００４９】

実施例６：ＮＣ５Ｔ１１ｐＩＸ－ＲＡＲＡのレチノイン酸依存的増殖

レチノイン酸（ＲＡ）は細胞分化の誘導因子である。分化には典型的には、低下した細胞増殖が伴う。ＲＡに対する応答はレチノイン酸受容体α（ＲＡによって活性化された転写因子）の発現に依存する。ＲＡは、形質転換された表現型を増殖停止によって逆戻りさせる、ＰＭＬ（前骨髄球性白血病）に対する顕著な作用を有する。

【００５０】

図８に示されるように、６μｇ／ｍｌの濃度でのＲＡ処理は、ＮＣ５Ｔ１１又はα－１－アンチトリプシン発現クローン（ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８）のいずれかの増殖に対する効果を何ら有しなかった。しかしながら、クローン＃１４（ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８ｐＩＸＲＡＲＡ）及びクローン＃３４（ＮＣ５Ｔ１１ｐＩＸＲＡＲＡ）の増殖は、５％のＦＣＳを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２における接着培養での５日間の６μｇ／ｍｌによる処理によって停止した。

【００５１】

実施例７：ＰＩＸＲＡＲＡはインターフェロンによるウイルス複製の阻害を妨げる

ＮＣ５Ｔ１１細胞及びＮＣ５Ｔ１１＃３４細胞は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２／５％ＦＣＳにおいて８．０×10^5細胞／ウエルで６ウエルプレートに播種した。１２時間後、インターフェロンβ（Ｓｅｒｏｎｏのｒｅｂｉｆ４４）を１ＩＵ／ｍｌ及び８ＩＵ／ｍｌの濃度でウエルに加えた。３０分後、ＮＣ５Ｔ１１及びＮＣ５Ｔ１１＃３４の両方のインターフェロン処理細胞及び対照細胞に脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）を０．００４の感染多重度（ＭＯＩ）で感染させた。２４時間後、培養物を集め、細胞を破砕するために－８０℃で凍

結した。この懸濁物を解凍し、８００ｘｇによる１０分間の遠心分離によって清澄化した。溶解物をＡ５４９細胞でのプラークアッセイによるウイルス力価測定に供した。簡単に記載すると、Ａ５４９細胞を２４ウエルプレートに播種し、増殖させてコンフルエンシーに到達させ、１０倍～2×10^{8}倍まで希釈された清澄化溶解物と３０分間インキュベーションし、ＲＰＭＩ／１０％ＦＣＳにおける０．２％の低ゲル化アガロースタイプＶＩＩにより覆い、３７℃で２４時間インキュベーションした。アガロース層を吸引し、細胞をＰＢＳにおける２％グルタルアルデヒドにより２０分間、２０℃で固定処理し、水により洗浄し、５０％エタノールにおける１％クリスタルバイオレット溶液と室温で３０分間インキュベーションして、ウイルスプラークを計数した。図９に示される結果は、ＥＭＣＶの複製がＮＣ５Ｔ１１細胞ではかなり有効でないこと、及びＥＭＣＶの複製は感染前のインターフェロン処理に対して非常に感受性であることを明らかにする。８ＩＵ／ｍｌでは、生存ウイルスを培養物から回収することができない。対照的に、ＮＣ５Ｔ１１＃３４におけるウイルス複製はインターフェロン処理によってほんのわずかに影響されるだけである。その上、外因性ＩＦＮの不在下でさえ、より高い力価がＮＣ５Ｔ１１＃３４については認められる。多くのワクチン株が、無傷のＩＦＮ経路を有する産生細胞においてＩＦＮ応答を誘導するので、示された現象は典型的なワクチンプロセスをたどり、産生プロセスにおいて好ましい低い感染多重度（ＭＯＩ）での感染は、初めに感染しなかった細胞のウイルス複製の阻止をもたらすＩＦＮ分泌を引き起こし得る。従って、ＰＩＸの発現は、低いＭＯＩにより出発する高力価ウイルス産生を可能にする。

【００５２】

実施例８：ｐＩＸ－ＲＡＲＡによるタンパク質産生の刺激

α－１－アンチトリプシンだけでなく、ベクターＦ６７を有するＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８ｐＩＸＲＡＲＡを、振とう機回分アッセイで、α－１－アンチトリプシンを産生するその能力をスターターであるクローンＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８と比較した。細胞は１２ｍｌの総量で５０ｍｌのポリプロピレンシェーカーチューブ（ＴＰＰ、スイス）においてＥＸＣＥＬＬ ＶＰＲＯ（ＪＲＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）に6×10^{4}細胞／ｍｌで播種し、１ｃｍの半径及び１６０ｒｐｍの速度による回転に供した。培養は２２日目まで続けた。浮遊細胞のほかに、チューブ壁に接着している細胞クラスターのリングが形成された。このようなクラスターにおける細胞は、プロセス期間中を通して７０％を越える生存率を保持していた。トリプシン又はアクターゼ（Acutase）（ＰＡＡ）によるこのようなクラスターの解離は成功しなかったので、増殖キネティクス及び最大細胞密度は測定されなかった。サンプルは、９日目、１３日目及び２２日目で採取し、力価は、α－１－アンチトリプシンのＥＬＩＳＡを使用して測定した。結果を図１０に示す。

【００５３】

実施例９：ｐＩＸを発現するアヒル網膜細胞の作製

初代アヒル網膜細胞に由来し、規定された危険性ガイドラインに従って不死化された細胞株ＣＲは他に記載されている（特許出願ＷＯ０５０４２７２８、プラスミド６０Ｅをトランスフェクションした網膜細胞）。この細胞は、５％のウシ胎児血清（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ、１２２１３ Ｂｅｒｌｉｎ、ドイツ）に補充されたＤＭＥＭ：Ｆ１２培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ ９２００８、米国）において３９℃及び７．５％CO_2で培養した。継代培養のために、細胞を短時間、ＴｒｙｐＬＥ Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で処理した。プラスミド７６Ｆ（ｐＥＦＰＩＸ１）は、制限酵素ＳｓｐＩ及びＸｍｎＩ（両方ともＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ ０１９１５－５５９９、米国）から得られる）で線状化し、アフィニティークロマトグラフィー（Ｑｉａｇｅｎ（４０７２４、Ｈｉｌｄｅｎ、ドイツ）から得られるゲル抽出キット）によって４００ｎｇ／μｌに精製した。精製されたＤＮＡの５μｌ（２μｇ）をＥｆｆｅｃｔｅｎｅ試薬（Ｑｉａｇｅｎ）とともにＣＲ細胞にトランスフェクションした。ＤＮＡは１６μｌのＥｎｈａｎｃｅｒ及び２００μｌのＥＣ緩衝液と混合した。室温で２分後、１８μｌのＥｆｆｅｃｔｅｎｅを加え、リポソーム形成を室温で１０分間行わせた。トランスフェクションミックスを、前日に６ウエルプレートにおい

て８０％のコンフルエンシーで播種された細胞の上の１ｍｌの培養液に加えた。高いトランスフェクション効率はｐＥＧＦＰ－Ｎ１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ ９４３０３－４２３０、米国）の並行したトランスフェクションにより確認された。

【００５４】

ｐＩＸをトランスフェクションした培養物をトランスフェクション後３日でＴ７５フラスコに拡大し、選択を２５μｇ／ｍｌのヒグロマイシンＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で開始した。培地を１週間に１回取り替え、ヒグロマイシンＢを５０μｇ／ｍｌに上げた。３週間後、合計で４つの大きな増殖巣が生存し、これらをＴ２５フラスコに再度播種した。細胞をＴｒｙｐＬＥにより剥離させ、１０分間の１００×ｇにより集め、新鮮な培地に再懸濁し、Ｔ２５フラスコに入れた。

【００５５】

トランスフェクション後４週間で、Ｔ２５フラスコにおける健全なサブコンフルエント培養物に由来する細胞を、ＴｒｙｐＬＥを用いて５ｍｌのＤＭＥＭ：Ｆ１２／５％ＦＣＳの中に剥離させた。その２ｍｌを培地＃６３０３２－１０００Ｍ（ＪＲＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＫＳ ６６２１５、米国）（浮遊培養物の維持のために意図された、動物由来成分を含まない培地）と混合した。ヒグロマイシンＢを５０μｇ／ｍｌに加えた。ゲノムＤＮＡを２ｍｌの培養物から単離し、Ｖ２９３及びＶ２９４のプライマーを用いたｐＩＸ導入遺伝子に対するＰＣＲに供した。陰性対照は、ＤＮＡを伴わない並行反応によって提供し、陽性対照は、プラスミド７６Ｆを伴う並行反応によって提供した。図１１（左パネル）における予想されるＰＣＲ産物は、ｐＩＸ導入遺伝子がＣＲ細胞に安定的に挿入されていることを明らかにする（この細胞は今後、「ＣＲｐＩＸ」と呼ぶ）。

【００５６】

ＰＩＸタンパク質の発現をウエスタンブロッティングによって確認した。6×10^5個の細胞を（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）、３００ｍＭ ＮａＣｌ、１％ デスオキシコール酸Ｎａ、１％ Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００、０．１％ ＳＤＳ）において煮沸することによって破砕し、タンパク質をゲル電気泳動によって分離し、その後、ナイロンメンブランに転写した。ＰＩＸは一次抗体ｐＩＸ（Ｗ．Ｓｅｉｄｅｌ博士（Ｅｒｎｓｔ－Ｍｏｒｉｔｚ－Ａｒｎｄｔ－Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔａｅｔ、Ｇｒｅｉｆｓｗａｌｄ、ドイツ）からの譲渡物）により検出し、その後、一次抗体に対する、アルカリホスファターゼにより標識された二次抗体と反応させた。

【００５７】

図１１（右パネル）における予想サイズのシグナルにより、ＣＲｐＩＸ細胞におけるｐＩＸの発現が確認される。並行した反応で調製された２９３細胞に由来する陰性対照にはシグナルが存在しなかった。

【００５８】

細胞をさらに２回の継代培養のために培地＃６３０３２－１０００Ｍにおいて培養し、その後、さらに２回の継代培養のために培地＃１４５６１－１０００Ｍ（これもまた、ＪＲＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから得られる）に移した。すべてのＪＲＨ培地には、１×Ｇｌｕｔａｍａｘ Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び１００μｇ／ｍｌのヒグロマイシンＢが補充された。

【００５９】

培地＃１４５６１－１０００Ｍにおける２回目の継代培養の場合、少量（５ｍｌの浮遊培養物のおよそ２％）をＤＭＥＭ：Ｆ１２／ＦＣＳ培地に完全に再懸濁し、直径１５ｃｍのペトリディッシュに入れた。６日後、１１個の増殖巣を１２ウエルプレートの個々の穴に取り出し、ＤＭＥＭ：Ｆ１２／ＦＣＳ培地で維持した。クローン移送のために、培地を吸引し、クローニング用ディスク（Ｓｉｇｍａ、ＭＯ、米国）をＴｒｙｐＬＥに浸け、少しの間、直接クローンにアプライし、その後、培地で満たされた穴に移した。個々のクローンはさらなる実験及び増殖能の測定のために拡大した。

【００６０】

安定的にトランスフェクションされた細胞におけるＰＩＸの維持を分析するために、ゲ

ノムＤＮＡを、ＱＩＡｍｐ　ＤＮＡ血液キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて１×１０^{6}個の細胞から単離し、Ｅ１Ｂ分子及びＰＩＸ分子の数を、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（ＡＢＩ）検出化学反応によるＡＢＩ　７０００　ＴａｑＭａｎ反応で２５ｎｇ及び５０ｎｇのゲノムＤＮＡにおいて測定した。定量のために使用したプライマーは、Ｅ１ＢについてはｇＴｇｇＴＴｇＣＴＴＣＡＴｇＣＴＡｇＴｇ（配列番号１３）及びＴＣＴＴＣＡｇＣＡｇｇＴｇＡＣＡｇＴＴｇ（配列番号１４）であり、ＰＩＸについてはＡＣＣＴＡＣｇＡｇＡＣＣｇＴｇＴＣＴｇ（配列番号１５）及びｇＡｇＣＣｇＴＣＡＡＣＴＴｇＴＣＡＴＣ（配列番号１６）であった。Ｅ１Ｂは独立的に導入され、細胞が生存するために維持されなければならないので、この遺伝子は、ＰＩＸのコピー数及び遺伝子発現の強さを規格化するための内部マーカーとして役立つ。

【００６１】

図１２は、ＰＩＸ導入遺伝子が、選択圧の不在下でさえ、ＣＲ浮遊細胞において安定的に維持されることを明らかにする。図１２はまた、ＰＩＸ陽性細胞が増殖速度の低下を受けることを明らかにする。本発明者らは、ＰＩＸ発現プラスミドを安定的にトランスフェクションされた本発明者らの細胞（トリ細胞及びヒト細胞）のすべての細胞の増殖が、低下することを一貫して認めた。このことは、宿主細胞の生化学に対するＰＩＸの影響を明らかにする。さらに、本発明者らは、コンフルエントな層への増殖を避けるための、ＰＩＸ陽性の接着性ＣＲ細胞における傾向（増大した接触阻害）を認めた。

【００６２】

実施例１０：ｐＩＸを発現するアヒル体節細胞の作製

細胞株ＣＳは胚の体節に由来し、特許出願ＷＯ０５０４２７２８にもまた記載される。ＰＩＸ陽性ＣＳ細胞の作製をＣＲ系統についての上記手順と並行して行った。ＣＲｐＩＸに反して、浮遊培養物がＣＳｐＩＸについては樹立されなかった。厳しい足場依存性がＣＳ細胞の特徴である。浮遊状態で増殖しない細胞は、転移する能力がひどく損なわれているので、腫瘍形成性がほとんどないと見なすことができる。ＰＩＸタンパク質はＣＳ細胞においてこの性質を変化させない。従って、このタンパク質は、多形質発現性ではあるが、形質転換表現型に影響を及ぼさないようである。この観察結果は、ＰＩＸがバイオ医薬プロセスにおいて安全に適用され得るという本発明者らの仮定を裏付けている。

【００６３】

実施例１１：ＣＳ細胞におけるＭＶＡ複製に対するＰＩＸの影響

ＰＩＸ発現のために安定的にトランスフェクションされたＣＳ細胞、及び基準としての親のＣＳ細胞を２×１０^{6}細胞／穴で６ウエルプレートに播種し、翌日、ＭＶＡを０．１のｍ．ｏ．ｉ．で感染させた。ＣＰＥの進行における違いを記録するための写真を感染後４８時間及び７２時間で撮影した。感染後４８時間での上清におけるウイルス収量、及び感染後７２時間での全収量（溶解された細胞ペレットと合わせた上清）をミクロフォーカスアッセイで測定した。結果を図１３に示す。ＣＳ細胞におけるＰＩＸの存在は、親の基準細胞と比較したとき、感染後４８時間ではＣＰＥの開始を遅らせるようである。感染後７２時間で、両方の培養物は完全に溶解される。このことは、ＣＰＥの程度における違いがＣＳ．ＰＩＸ集団におけるＭＶＡ不応性細胞及びＭＶＡ感受性細胞の混合物によるものでないことを示唆する。

【００６４】

本発明者らが知る限り、ＰＩＸ陽性細胞はどれも、同族のアデノウイルスとは異なるウイルスに対してはこれまで一度も調べられていない。

【００６５】

実施例１２：ＣＲ細胞におけるＭＶＡ複製に対するＰＩＸの影響

ＰＩＸタンパク質の正の影響はまた、ＣＲ細胞についても定量された。ＣＳ細胞に反して、ＣＲ細胞は浮遊状態に適合化される。浮遊培養物は多くの工業的適用のために好ましい。従って、本発明者らは、接着培養とは対照的に、そのようなシステムにおけるＰＩＸの影響を明らかにした。

【００６６】

ＣＲ細胞については、ＰＩＸ支持的な影響がＣＳ細胞の場合ほど顕著でなく、しかし、本発明者らはＭＶＡについてのより大きい力価を一貫して認めている。ＭＶＡの収量が一連の実験で最適化され、中位の細胞密度において感染後４８時間で最大になることが見出された。図１４は、浮遊クローンＣＲ．ＨＳ（これは、非常に大きいＭＶＡ収量を有する細胞株として数個のクローンから選択された）、及びＰＩＸ（＋）細胞株ＣＲ．ＭＣＸの比較を示す。横座標はｍ．ｏ．ｉ．（それぞれ、０．０１、０．０５又は０．１）を示し、縦座標はバーストを示し、バブルのサイズが細胞密度（それぞれ、8×10^{6}細胞／ｍｌ、2×10^{6}細胞／ｍｌ又は0.8×10^{6}細胞／ｍｌ）を示す。バーストは産出ウイルス（又は収量）対投入ウイルス（細胞数及びｍ．ｏ．ｉ．に依存する接種量）の比率であり、従って、増幅効率の大きさである。すべての形態において、ＰＩＸ（＋）細胞株は成績においてＰＩＸ（－）系統を上回っている。

【００６７】

実施例１３：ＰＩＸの核排除

ＰＩＸ－ＧＦＰ融合遺伝子は、生細胞におけるＰＩＸタンパク質の分布を視覚化するために、また、利用可能な抗体の弱い結合活性を克服するために作製した。プラスミド７６Ｆ（ｐＥＦＰＩＸ１）はＡｃｃＩ及びＤｒａＩの制限酵素で処理し、末端をＫｌｅｎｏｗポリメラーゼで平滑化した（すべてがＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ　０１９１５－５５９９、米国）から得られる）。完全なバンド形成パターンの中から、ＰＩＸのコード配列を含有する４４７ｂｐの所望されるフラグメントをアガロースゲル抽出によって単離した（Ｑｉａｇｅｎ（４０７２４　Ｈｉｌｄｅｎ、ドイツ）から得られるゲル抽出キット）。ＤｒａＩ制限酵素は配列「ｔｔＴＡＡａ」を認識して、最後のチミジン残基の後を切断する（この場合、中央の「ＴＡＡ」トリプレットはＰＩＸオープンリーディングフレームの停止コドンである）。従って、この４４７ｂｐフラグメントは停止コドンを有さない。このフラグメントを、ＳｍａＩ（これもまた、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓから得られる）により開環したプラスミドｐＥＧＦＰ－Ｎ１におけるＥＧＦＰ遺伝子に融合することにより、ＰＩＸの後にＥＧＦＰが続く連続する融合遺伝子を作製する。得られたプラスミドをｐ９ＧＦＰと名付けた。発現した融合タンパク質は本書ではＰＩＸ－ＧＦＰと名付けられる。

【００６８】

ＣＳ細胞及びＣＲ細胞にｐ９ＧＦＰをトランスフェクションし、安定的なＰＩＸ－ＧＦＰ発現のために３００μｇ／ｍＬのジェネテシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）により選択した。異なるＰＩＸ－ＧＦＰ発現の２つの集団が２週間以内に認められた。一方の集団は、通常、ＰＩＸ－ＧＦＰの２個～５個の明るいスポットを細胞質に有し、もう一方の集団は、細胞質におけるＰＩＸ－ＧＦＰのより均一な発現、及び核に近い領域におけるＧＦＰシグナルのより散らばった蓄積を有した。両方の場合において、細胞の核は暗い領域として現れた。このことは、キメラタンパク質が核に進入しないか、又は進入しても、非常に少ないことを示唆する。ＣＲｐＩＸＧＦＰにおける両タイプのクローンについての代表的な例を図１５に示す。

【００６９】

この結果と一致して、本発明者らは、検索アルゴリズムＮｅｔＮＥＳ（Cour et al., Protein Eng. Des. Sel., 17、527-536 (2004)）をＰＩＸの一次配列に適用することによって、ＰＩＸのオープンリーディングフレームにおける核外移行配列を見出した。このプログラムによって同定されたＮＥＳは３１３－ＧＣＡＣＡＡＴＴＧＧＡＴＴＣＴＴＴＧＡＣＣＣＧＧＧＡＡＣＴＴ－３４２（配列番号１７）（翻訳されたとき、ＡＱＬＤＳＬＴＲＥＬ；配列番号１８）である。本発明者らが知る限り、そのようなシグナルがＰＩＸタンパク質において記載されていることは初めてである。逆に、核局在化配列（ＮＬＳ）はＰＩＸについては文献に記載されず、また、本発明者らはそのようなシグナルを（例えば、コロンビア大学によってｈｔｔｐ：／／ｃｕｂｉｃ．ｂｉｏｃ．ｃｏｌｕｍｂｉａ．ｅｄｕ／ｃｇｉ／ｖａｒ／ｎａｉｒ／ｒｅｓｏｎｌｉｎｅ．ｐｌにおいて提供されるアルゴリズムを使用して）検出することができない。

【００７０】
従って、本発明者らのアヒル細胞におけるＰＩＸ－ＧＦＰの細胞質局在化はＰＩＸの一次配列と一致している。
【００７１】
実施例１４：ＰＩＸのＧＦＰ融合改変体
ＰＩＸ　ＧＦＰの驚くべき核排除をさらなるＰＩＸ融合構築物により調べた。ＰＩＸ－ＧＦＰ－ＮＬＳ発現プラスミドは、合成オリゴヌクレオチドのｉ１８５及びｉ１８６を挿入することにより上記のｐ９ＧＦＰ構築物に由来した。これらのオリゴは８０℃で５分間変性させ、室温に徐々に冷却することによって１０ｍＭ $MgCl_2$中でアニーリングさせて、
５’－ＧＡＴＧＴＡＣＡＡＡＧＡＴＣＣＧＡＡＧＡＡＧＡＡＣＣＧＣＡＡＡＧＧＴＴＡＡＣＧＣＧＧＣＣＧＣＡＣ－３’（配列番号１９）
３’－ＣＴＡＣＡＴＧＴＴＴＣＴＡＧＧＣＴＴＣＴＴＣＴＴＧＧＣＧＴＴＴＣＣＡＡＴＴＧＣＧＣＣＧＧＣＧＴＧ－５’（配列番号２０）
を得た。この二本鎖オリゴヌクレオチドをＢｓｒＧＩ及びＮｏｔＩで消化し、ｐ９ＧＦＰの同じ部位に挿入した。翻訳されたとき、挿入は、シミアンウイルス４０のＮＬＳに類似するＮＬＳ配列（ＰＫＫＮＲＫ；配列番号２１）をＰＩＸ－ＧＦＰ融合タンパク質に付加する。この挿入物とともに導入された新しいＨｐａＩ部位が、成功したクローニングを確認するための診断マーカーとして役立つ。得られたプラスミドはｐ９ＧＦＰ ＮＬＳと呼ばれ、発現したタンパク質ＰＩＸ－ＧＦＰ－ＮＬＳ及びタンパク質ＰＩＸ－ＧＦＰ－ＮＬＳをコードするオープンリーディングフレームは配列番号２３及び配列番号２２にそれぞれ示される。
【００７２】
ＧＦＰタグ化ＰＩＸ－ＲＡＲＡ融合タンパク質は、プライマーＥＢＲ４４Ａ（５’－ＧＧＡＴＣＣＴＴＣＣＴＣＣＴＣＧＧＧＣＧＧＧＴＧＴ－３’；配列番号２４）及びＶ２９３（５’－ＡＡＣＣＡＧＣＧＣＴＡＣＣＡＴＧＡＧＣＡＣＣＡＡＣＴＣＧＴ－３’；配列番号２５）、ならびにテンプレートしてのプラスミド＃６７Ｆ（ｐＥＦ ＰＩＸ ＲＡＲＡ ＮＥＯ）を用いた、ＰＩＸ－ＲＡＲＡを含有するフラグメントのＰＣＲ増幅によって作製した。１９２６ｂｐのアンプリコンをポリヌクレオチドキナーゼで処理し、ＥｃｏＲＩで線状化され、かつＫｌｅｎｏｗ酵素で平滑化されたｐＥＧＦＰ－Ｃ２（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）に挿入した（すべての酵素が、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓから得られる）。得られたプラスミドをｐ９ ＧＦＰ ＲＡＲＡと名付け、発現したタンパク質をＰＩＸ ＧＦＰ ＲＡＲＡと名付ける。
【００７３】
図１６は、一過性でトランスフェクションされたＣＨＯ細胞における様々なＧＦＰタグ化タンパク質の細胞内分布を示す。
【００７４】
実施例１５：ＰＩＸ及びインターフェロン
多くのウイルスが、ＴＬＲ－３（ｔｏｌｌ様受容体３）を介して生得的な細胞性免疫応答を誘導する。ＴＬＲ－３は二本鎖ＲＮＡ（ウイルス複製の顕著な特徴的パターン）を認識する。ＴＬＲ－３の機能には、ＮＦｋＢ及びＩ型インターフェロンの活性化がある（Alexopoulou et al., Nature、413、732-738 (2001)）。インターフェロンは宿主細胞における抗ウイルス状態を媒介する。人工的な二本鎖ＲＮＡであるポリＩ：ポリＣ（ポリイノシン酸－ポリシチジル酸、Ｓｉｇｍａ）を介したインターフェロン誘導の影響を調べた。驚くべきことに、ＣＲ細胞及びＣＲｐＩＸ細胞はポリＩ：ポリＣ感受性をほとんど示さなかったが、ＣＳ細胞はこの誘導因子に対して明らかに応答した。予想外ではあったが、ＰＩＸ陽性のＣＳ細胞が、親のＣＳ細胞よりも速く、また、親のＣＳ細胞よりも低い濃度で応答した（図１７）。本発明者らが知る限り、ＰＩＸとインターフェロンとの関係は、現在の文献には記載されていない。
【００７５】

ＭＶＡについてのＰＩＸ支持的な効果は、ＣＳ細胞の方がＣＲ細胞よりも強く、また、ＣＳ細胞が、ＣＲ細胞よりも良好に二本鎖ＲＮＡ代用物に対して応答した。ＭＶＡがインターフェロンを誘導すること、及びこのウイルスにはまた、インターフェロンの応答を緩和するタンパク質が備わることは公知である。従って、ＣＲｐ９ＧＦＰ細胞及びＣＳｐ９ＧＦＰ細胞におけるＭＶＡに対するポリＩ：ポリＣ誘導因子の効果が明らかにされる。図１８は、ＭＶＡ感染細胞が、非感染の対照よりもポリＩ：ポリＣによる損傷を受けることが少ないことを示唆する。この観測結果は、ＭＶＡが細胞性の生得的な免疫応答の誘導及び妨害の両方を行うという事実と一致し、また、トリ細胞におけるヒトアデノウイルス由来のＰＩＸが、非常に弱毒化されたポックスウイルスの抗ウイルスタンパク質と共同して、後者ウイルスの収量を増大させるという本発明者らの予想外の観測結果と関連する。

【図面の簡単な説明】

【００７６】

【図１】細胞株ＮＣ５Ｔ１１の過程（history）。Ａ：無血清条件下で増殖させた初代細胞のニューロスフェア。Ｂ：５％のＦＣＳを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２で増殖させた初代細胞の単層。Ｃ：ｐ７９をトランスフェクションした後２週間での初代増殖巣。矢印は、初代細胞と不死性（immortal）細胞との境界を示す。Ｄ：５％のＦＣＳを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２における不死化(immortalized)細胞の均質な接着培養物。Ｅ：ＥＸｃｅｌｌ　ＶＰＲＯでのシェーカーチューブにおけるＮＣ５Ｔ１１の浮遊培養物。

【図２】ＮＣ５Ｔ１１においてＥ１Ａ及びＥ１Ｂを検出する免疫蛍光。メタノールによる固定処理の後、細胞を、Ｅ１Ａ及びＥ１Ｂ　５５ｋそれぞれに対するラット抗体で処理し、その後、テキサスレッドコンジュゲート化抗ラット抗体で処理した。図２に示されるように、サンプルにおけるすべての細胞が、Ｅ１Ａについて典型的な核染色、及びＥ１Ｂについての細胞質染色を示した。メタノールによる固定処理の後、細胞を、Ｅ１Ａ及びＥ１Ｂ　５５ｋそれぞれに対するラット抗体で処理し、その後、テキサスレッドコンジュゲート化抗ラット抗体で処理した。ここで示されるように、サンプルにおけるすべての細胞が、Ｅ１Ａについて典型的な核染色、及びＥ１Ｂについての細胞質染色を示した。

【図３】選択されたａａｔクローンの比産生能。Ｃ５５をトランスフェクションし、ピューロマイシンにより選択したＮＣ５Ｔ１１の細胞クローンを7×10^4個の細胞で１２ウエルプレートに播種し、細胞数及びａａｔ力価を、播種後１日目、２日目及び３日目で測定し、１日あたりの最大細胞比産生能を計算した。

【図４】振とう機での回分培養におけるＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８の発現分析。細胞を５０ｍｌのポリプロピレンシェーカーチューブ（ＴＰＰ、スイス）において6×10^4細胞／ｍｌで１２ｍｌのＥＸＣＥＬＬ　ＶＰＲＯに播種し、１ｃｍの半径及び１６０ｒｐｍの速度による回転に供した。２００μｌのサンプルを、４日目、７日目、９日目、１１日目、１５日目、１８日目及び２１日目で採取した。細胞密度及び生存率を、血球計を使用して、トリパンブルーによる染色の後で測定した。

【図５】クローンプールにおけるＰＣＲによるｐＩＸ－ＲＡＲＡ　ｃＤＮＡの検出。ｐＩＸＲＡＲＡ遺伝子を有するクローンプールを、Ｆ６７のトランスフェクション及びヒグロマイシン選択によってＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８から作製した。ＲＮＡをＲＮＡ抽出キット（Ｍａｃｈｅｒｙ　Ｎａｇｅｌ、ドイツ）を使用して抽出し、ｃＤＮＡをＡＭＶ逆転写酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して合成した。ｐＩＸフラグメントだけ又は完全なｐＩＸＲＡＲＡ遺伝子についてのｃＤＮＡをプライマー１及びプライマー１及びプライマー１６４によりそれぞれ増幅した。

【図６】ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８及びＮＣ５Ｔ１１（＃３４、＃３５、＃３６、＃３７、＃３８）のヒグロマイシン抵抗性サブクローンにおける融合タンパク質の一部としてのｐＩＸ配列の、ＰＣＲによる検出。ＤＮＡは、６つのウエルで増殖させた細胞クローンから、ＳＤＳ中での溶解と、それに続くフェノール抽出及び沈殿化によって、単離した。ＤＮＡは、プライマー１及びプライマー２により２８サイクルで増幅した。

【図７】安定的にトランスフェクションされたＮＣ５Ｔ１１におけるｐＩＸＲＡＲＡ遺伝子及びｐＩＸ遺伝子の安定性をＥ１Ｂについて測定した。Ｅ１Ａ＋Ｅ１Ｂ及びｐＩＸＲＡ

ＲＡを別個のトランスフェクションで導入した。Ｅ１遺伝子は２年以上選択の不在下で維持されたので、安定的に組み込まれていると見なされる。ゲノムＤＮＡを、２つの時点、すなわち、ｈｙｇ選択を止めた直後（初期）、選択圧の不在下で２ヶ月の後（後期）で、選択された細胞クローンから単離した。ＰＩＸ及びＥ１ＢのＤＮＡレベルをリアルタイムＰＣＲによって測定した。

【図８】ＮＣ５Ｔ１１及びＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８のｐＩＸＲＡＲＡ組換えクローンにおけるＲＡ処理によって誘導される増殖遅延。細胞は、６μｇ／ｍｌのレチノイン酸の存在下又は不在下、２×１０^{5}個で６ウエルプレートに播種した。増殖遅延を、ＮＣ５Ｔ１１においてではなく、ＲＡ処理されたクローン＃１２及びクローン＃３４において示す写真を、４倍の倍率での位相差画像化を使用して、播種後４日で撮影した。

【図９】ＰＩＸＲＡＲＡはインターフェロンによるウイルス複製の阻害を妨げる。ＮＣ５Ｔ１１細胞及びＮＣ５Ｔ１１＃３４細胞のうち、インターフェロンβにより処理された細胞に対し、ＥＭＣＶ（インターフェロン感受性ウイルス）を０．００４のＭＯＩで感染させた。細胞溶解物をＡ５４９細胞でのプラーク形成による力価測定に供した。

【図１０】ベクターＣ５５からα－１－アンチトリプシンを発現する細胞株ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８、及びベクターＦ６７（ｐＥＦｐＩＸ－ＲＡＲＡ）をＣ５５に加えて有する細胞株ＮＣ５Ｔ１１ｐｕｒｏ＃８のサブクローン（＃１０、＃１２、＃１４）の発現分析。細胞を、１２ｍｌの総量で、５０ｍｌのポリプロピレンシェーカーチューブ（ＴＰＰ、スイス）において６×１０^{4}細胞／ｍｌでＥＸＣＥＬＬ　ＶＰＲＯ（ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）に播種し、１ｃｍの半径及び１６０ｒｐｍの速度による回転に供した。

【図１１】アヒルの網膜ＣＲ細胞におけるＰＩＸの発現。左パネル：ｐＩＸ細胞のゲノムＤＮＡにおけるＰＩＸ遺伝子に対するＰＣＲ反応。ゲルローディング（左から右に）：１ｋｂマーカー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）；ＣＲｐＩＸからのゲノムＤＮＡに対するＰＣＲ；テンプレート非含有対照；ＣＲｐＩＸのトランスフェクションで使用されたプラスミドを用いた陽性対照。右パネル：ＣＲｐＩＸ細胞におけるｐＩＸタンパク質を検出するためのウエスタンブロット。レーン１：２９３細胞；レーン２：ＣＲｐＩＸ細胞におけるｐＩＸタンパク質。

【図１２】アヒルの網膜細胞におけるＰＩＸ導入遺伝子の安定な維持。上段左パネル：ＭＣＸ及びＤＸＳは、並行して、また、選択を伴うことなく、３ヶ月以上培養されたＣＲｐＩＸクローンの独立したアリコートである。３ヶ月後、ＴａｑＭａｎ　ＰＣＲを使用して、ＭＣＸ及びＤＸＳにおけるＥ１Ｂ導入遺伝子及びＰＩＸ導入遺伝子のコピー数を計数した。Ｅ１Ｂ導入遺伝子は、ＰＩＸに関係なく維持されるので、これら２つの遺伝子の比率は、ＰＩＸ導入遺伝子の維持を示すものである。この比率は、ＭＣＸとＤＸＳとの間において変化しなかった。その上、Ｅ１Ｂ　ｍＲＮＡに対するＰＩＸ　ｍＲＮＡの比率もまた変化せず、ＰＩＸ　ｍＲＮＡは、Ｅ１Ｂ　ｍＲＮＡを上回っていた。このことはＰＩＸの発現を示している。右パネル：ＭＣＸ細胞及び親の（ＰＩＸ陰性）ＣＲ．ＨＳ細胞を、２週間にわたってヒグロマイシン選択圧の存在下又は不在下で培養した（ｘ軸上の黒線によって示される）。様々な時点でゲノムＤＮＡを単離し（「Ａ」、「Ｂ」及び「Ｃ」によって示される）、ＴａｑＭａｎ定量に供した（下段左）。親の細胞はヒグロマイシンによって死んだが、ＭＣＸ細胞は生存した。導入遺伝子の比率は一定のままであった。このことは、ＰＩＸ導入遺伝子が、選択圧の存在下でもまた、安定に維持されることをさらに示している。親の細胞についての倍加時間は約３２時間であるが、ＭＣＸ細胞については４１時間にすぎない。

【図１３】ＣＳ細胞におけるＭＶＡ複製に対するＰＩＸの効果。ＣＳ細胞及びＣＳｐＩＸ細胞にＭＶＡを感染させ、ＣＳ細胞及びＣＳｐＩＸ細胞を、感染後４８時間及び７２時間でＭＶＡ複製についてアッセイした。ＭＶＡの収量は、ＰＩＸ陽性のＣＳ細胞の方が著しく高かった。また、位相差顕微鏡像において明白であるように、細胞変性作用が、４８時間において、ＣＳｐＩＸ細胞については遅れているようであった。しかしながら、両方の培養物は、感染後７２時間で完全に溶解されることが明らかであるように、類似する程度にウイルスに対して感受性である。

【図１４】ＣＲ細胞におけるＭＶＡ複製に対するＰＩＸの効果。浮遊状態でのＣＲ細胞及びＣＲｐＩＸ細胞を、様々な多重度による、様々なシード細胞密度での感染に供した。ＭＶＡの収量を感染後４８時間でアッセイした。ＭＶＡの収量がｙ軸に示される。バブルのサイズはシード細胞密度を示す。中塗りのバブルはＣＲｐＩＸ細胞についての値を示し、白抜きのバブルは親細胞についての値を示す。すべての形態において、ＰＩＸはＭＶＡの増幅速度において明らかな増大をもたらす。

【図１５】アヒル細胞におけるＰＩＸ－ＧＦＰの細胞内分布。ＧＦＰタグ化ＰＩＸが、細胞質での少数の明るいスポット、及び大部分が核を除いて散らばった細胞質染色で現れる。他のクローンは、よりはっきりした散らばった細胞質染色、及び核のすぐ外側でのより強い蓄積を示す。

【図１６】ＣＨＯ細胞におけるＰＩＸ－ＧＦＰ改変体の細胞内分布。細胞内におけるＰＩＸ分布の誘導された変化を調べるために、核局在化部位（ＮＬＳ）の挿入、及びレチノイン酸受容体α（ＮＬＳを既に含有する細胞タンパク質）への融合を含む、様々な融合改変体を作製した。ＰＩＸ－ＧＦＰ改変体のための発現プラスミドを一過性でトランスフェクションしたＣＨＯ細胞を示す。

【図１７】ＰＩＸの存在下でのインターフェロン誘導の影響。ＣＳｐＩＸ細胞及びＣＲｐＩＸ細胞をポリＩ：ポリＣ（Ｉ型インターフェロン応答の公知の誘導因子）で処理し、親の細胞と比較した。ＣＳｐＩＸ細胞は、ポリＩ：ポリＣに対し、ＣＳ細胞よりも大きい感受性で反応した。ＣＲｐＩＸ細胞及びＣＲ細胞は、同程度で、かつＣＳ細胞よりも低い程度に反応した。

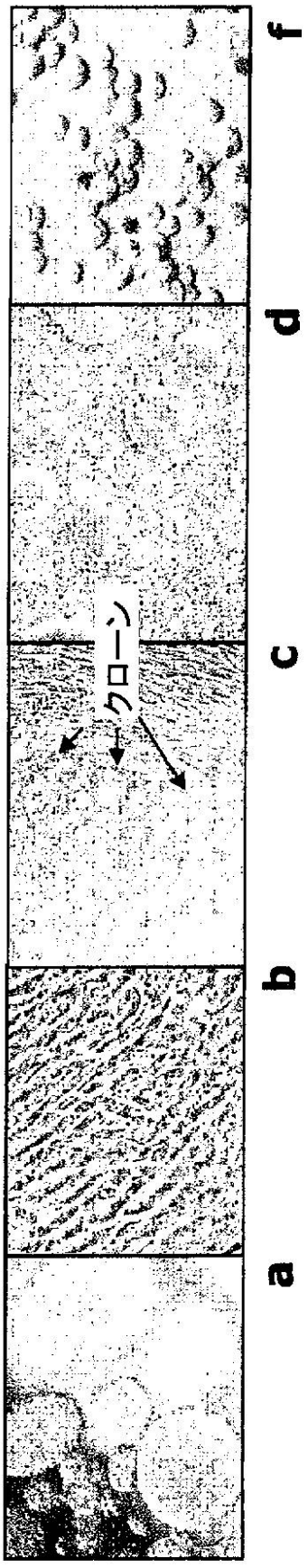
【図１８】ＰＩＸ－ＧＦＰの存在下でのＭＶＡ感染及びインターフェロン誘導の効果。図に示されるように、ＣＳｐ９ＧＦＰ細胞及びＣＲｐ９ＧＦＰ細胞をポリＩ：ポリＣで処理し、これらの細胞にＭＶＡを０．１のＭ．Ｏ．Ｉ．で感染させた。ＣＳ由来の細胞がインターフェロン誘導に対してより強く反応した。驚くべきことに、明るいＰＩＸ体は、両方の細胞株において誘導又は感染のとき、数が低下するようであり、これに対して、ＰＩＸ－ＧＦＰの全体的なシグナル強度が増大する。その上、ポリＩ：ポリＣによる誘導の効果が、処理後２２時間で依然として接着しているＣＳ細胞がより多数であることによって示されるように、ＭＶＡによる並行感染のときには改善される。

【配列表フリーテキスト】

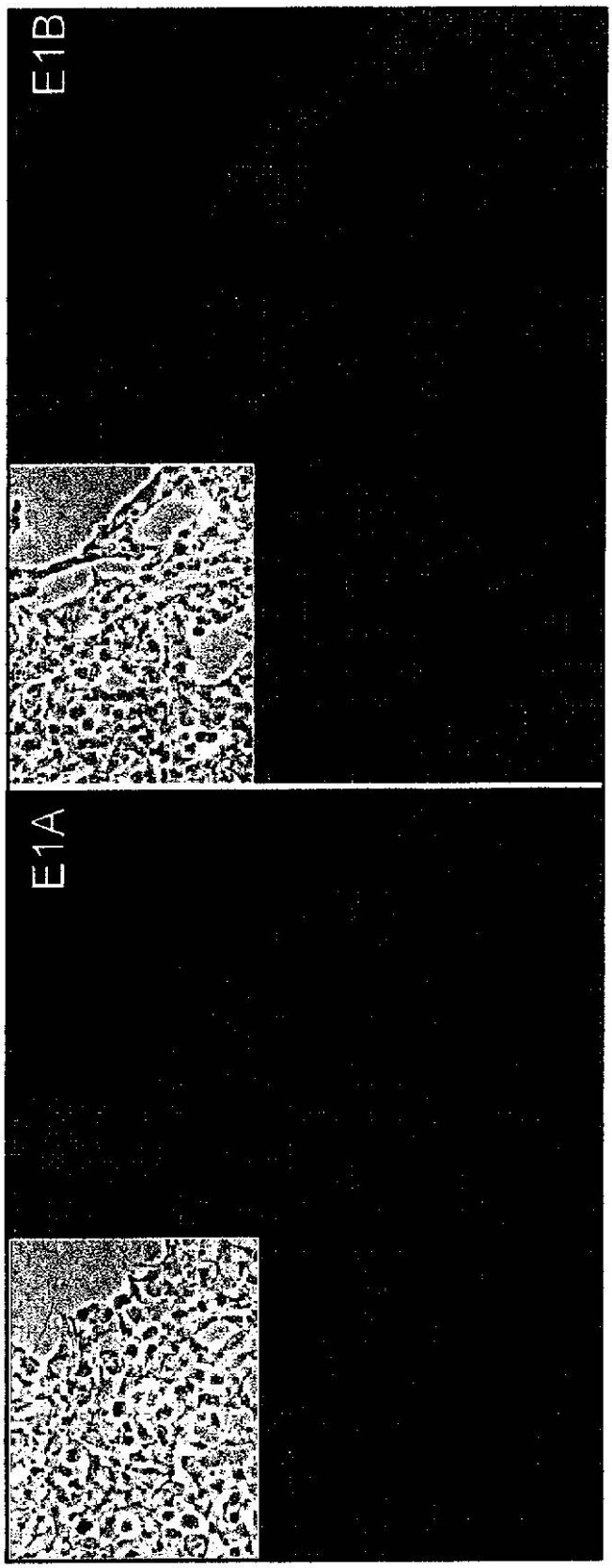
【００７７】

配列番号１～２：アデノウイルスのｐＩＸタンパク質
配列番号３～４：融合タンパク質ｐＩＸ－ＲＡＲＡ
配列番号４：融合タンパク質ｐＩＸ－ＲＡＲＡ
配列番号５：Ａｄ５　Ｅ１Ａ＋Ｅ１Ｂ
配列番号６～１１：プライマー
配列番号１２：「短い」ヒト翻訳伸長因子２プロモーター
配列番号１３～１６：プライマー
配列番号１７～１８：ＮＥＳ
配列番号１９～２０：ＮＬＳをコードする合成オリゴヌクレオチド
配列番号２１：ＮＬＳ
配列番号２２～２３：融合タンパク質ｐＩＸ－ＧＦＰ－ＮＬＳ
配列番号２４～２５：プライマー

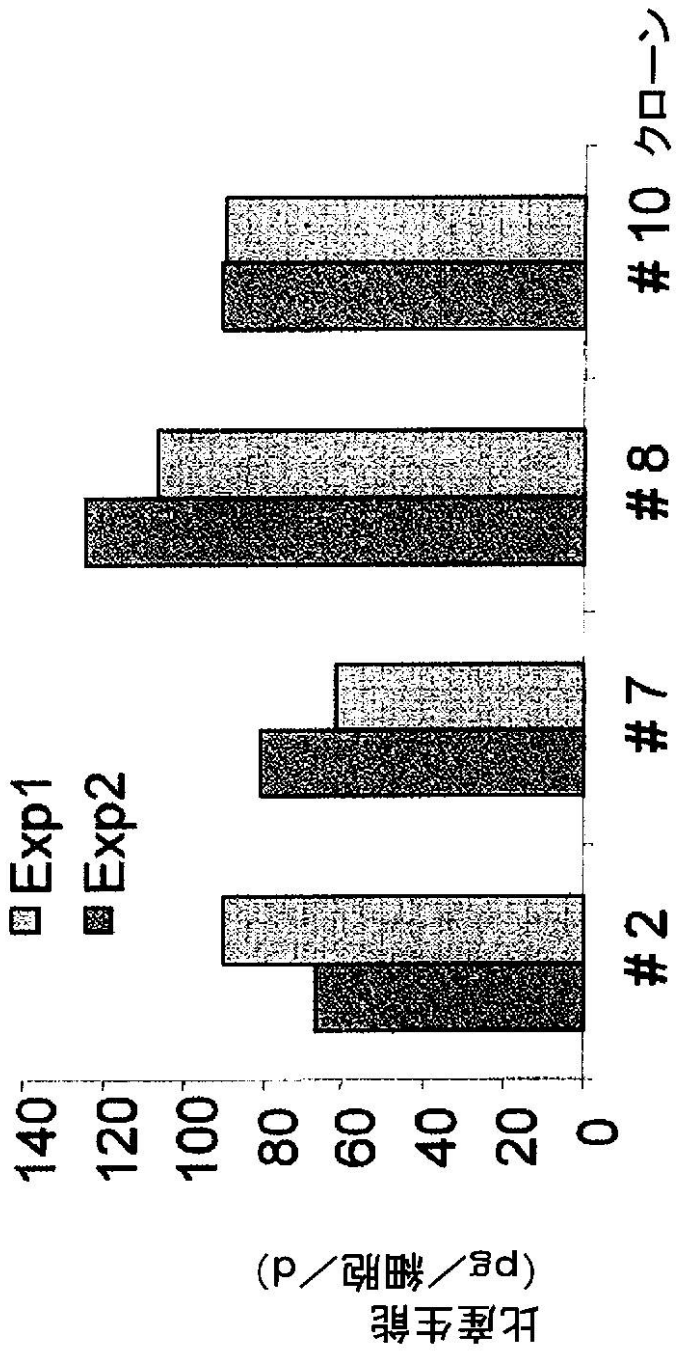
【図１】



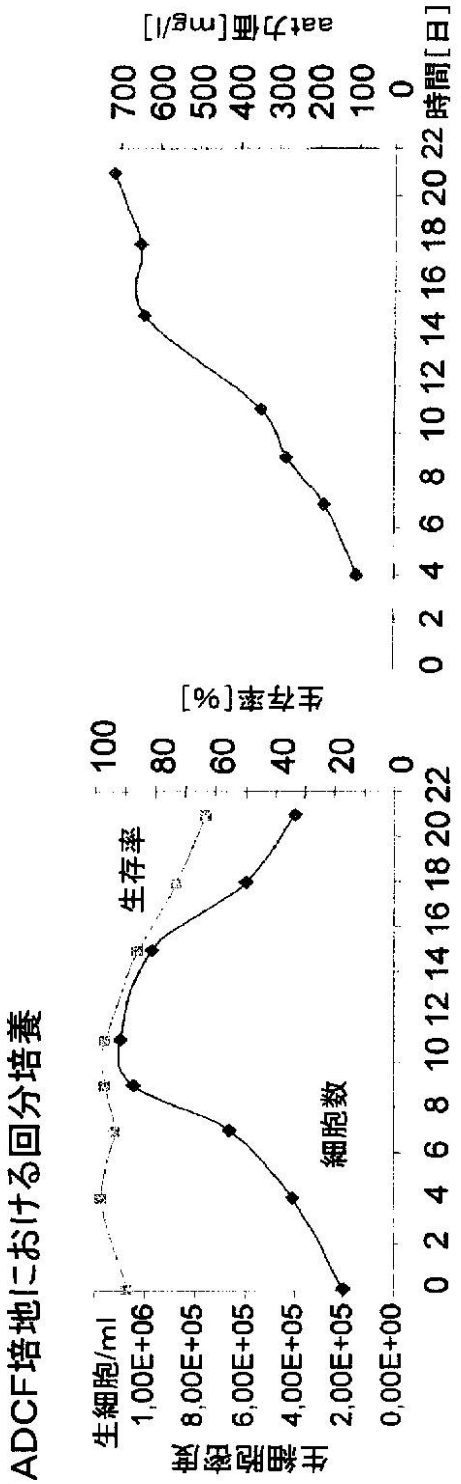
【図２】



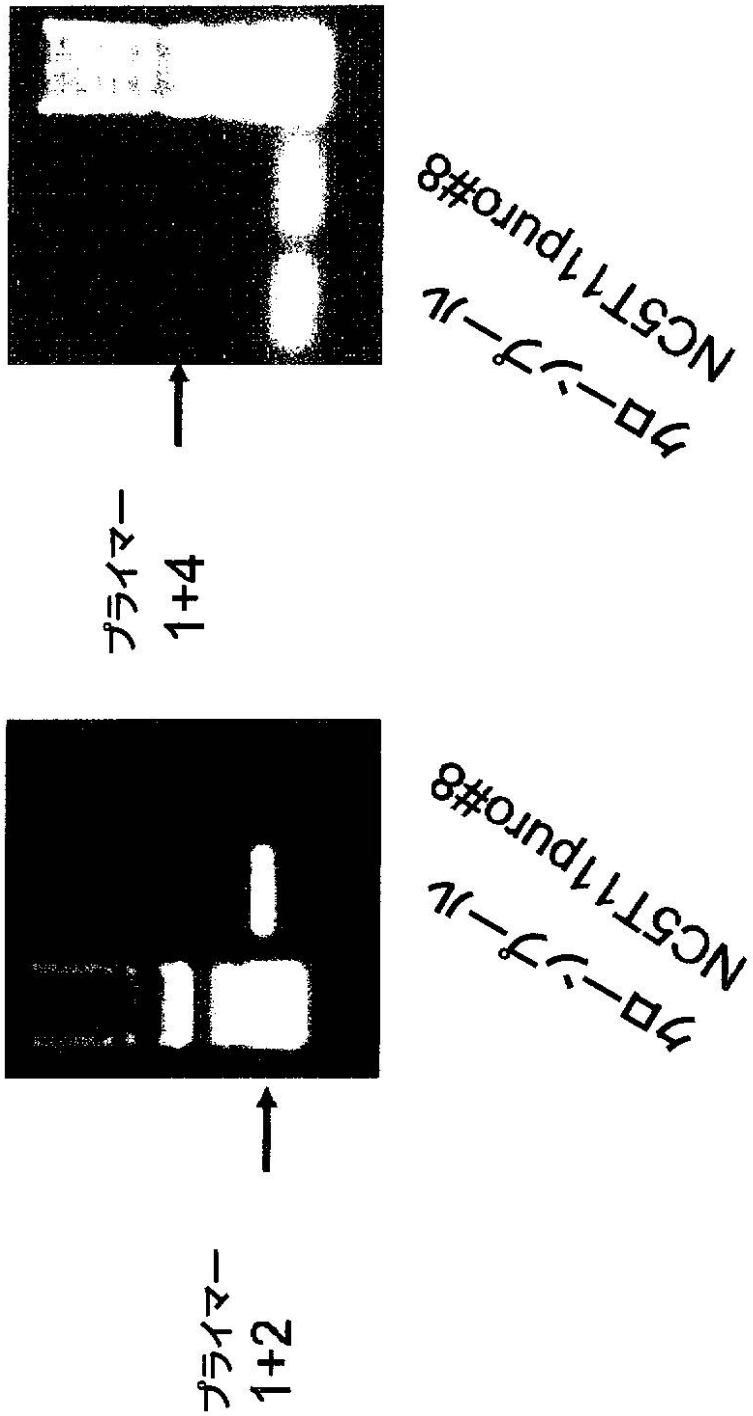
【図３】



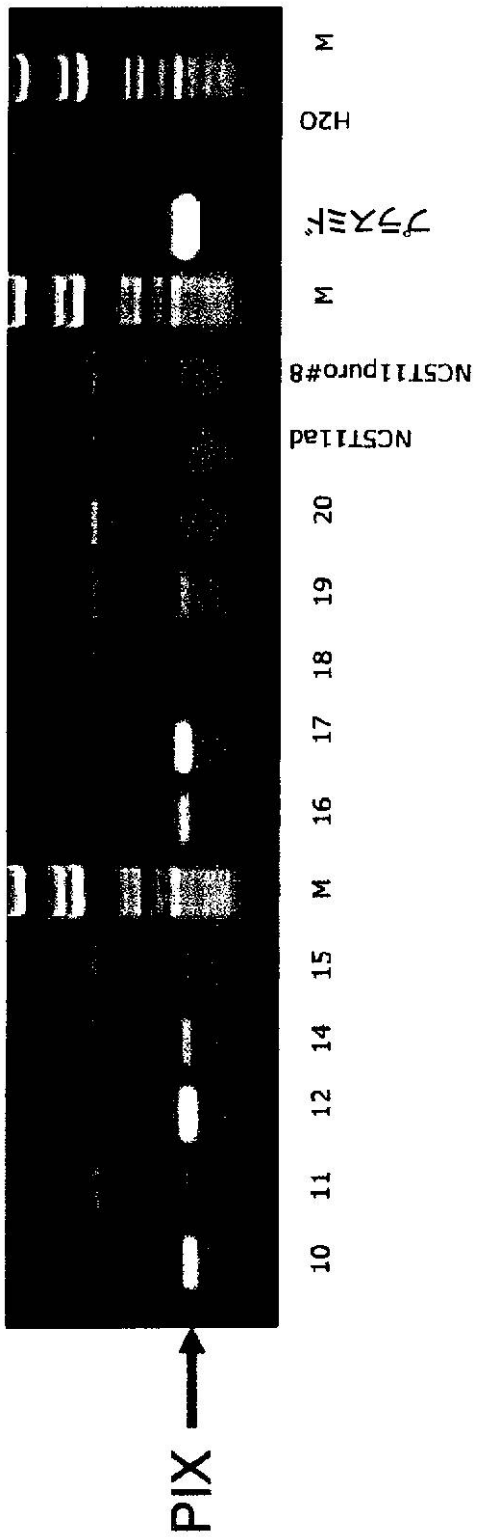
【図４】


ADCF培地における回分培養
生細胞/ml
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
生細胞密度
細胞数
生存率
生存率[%]
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
aat力価[mg/l]
700
600
500
400
300
200
100
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 時間[日]

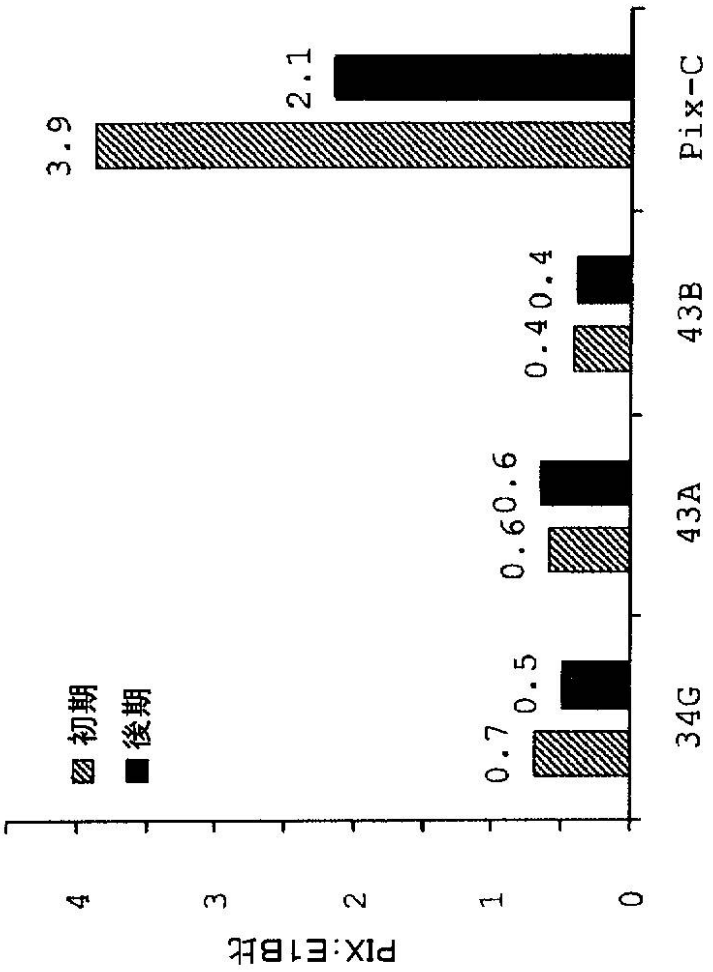
【図５】



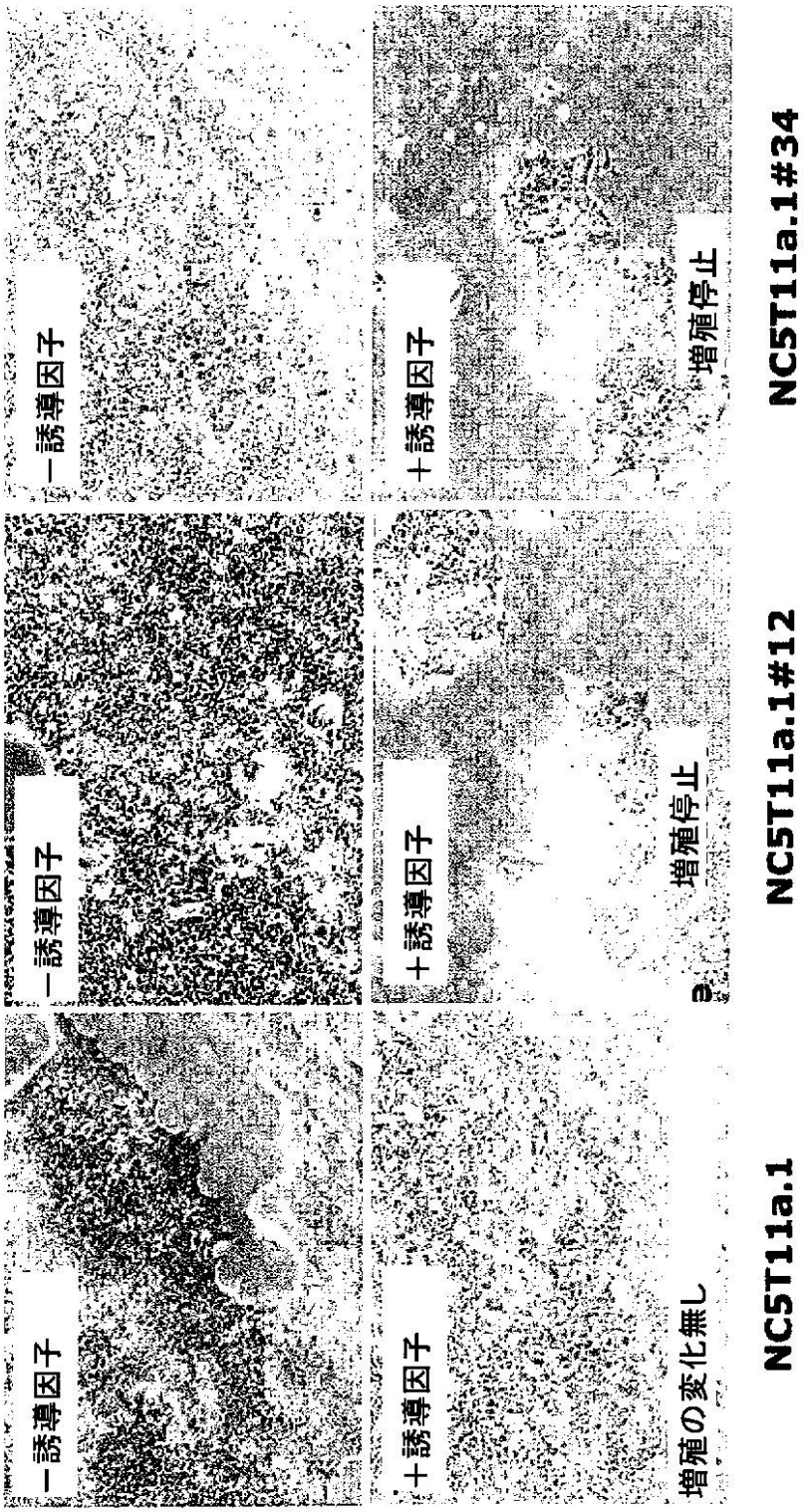
【図６】


M
H2O
プラスミド
M
NCST11puro#8
NCST11ad
20
19
18
17
16
M
15
14
12
11
10
PIX

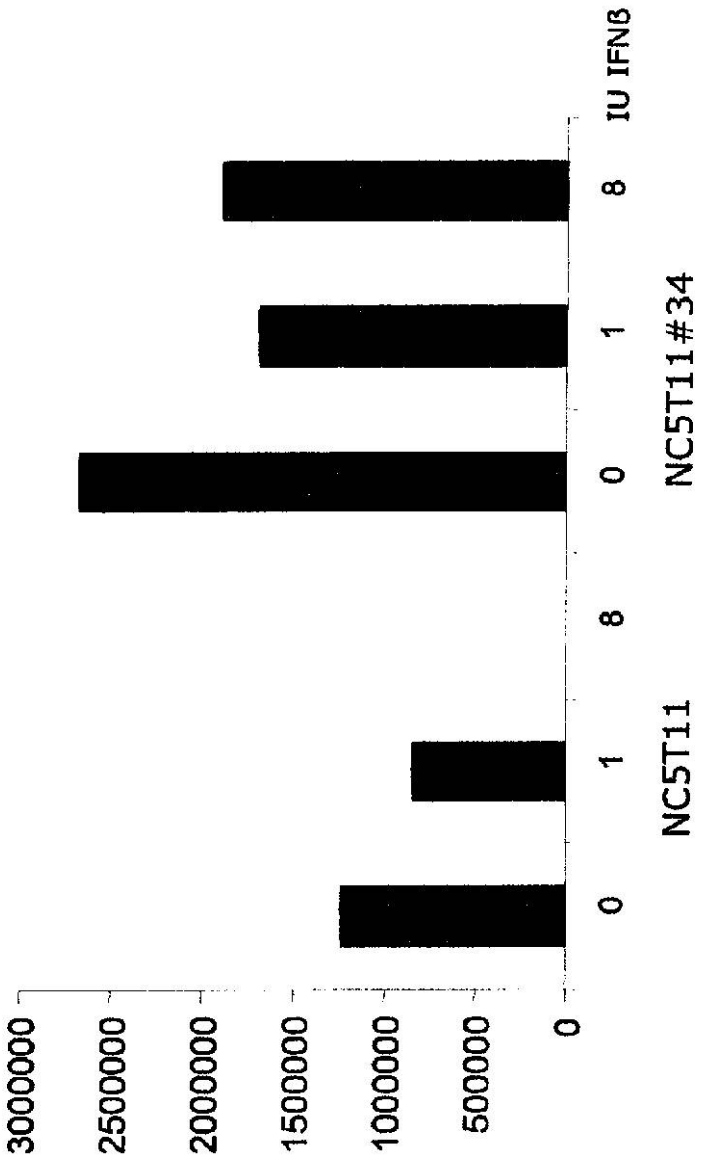
【図７】



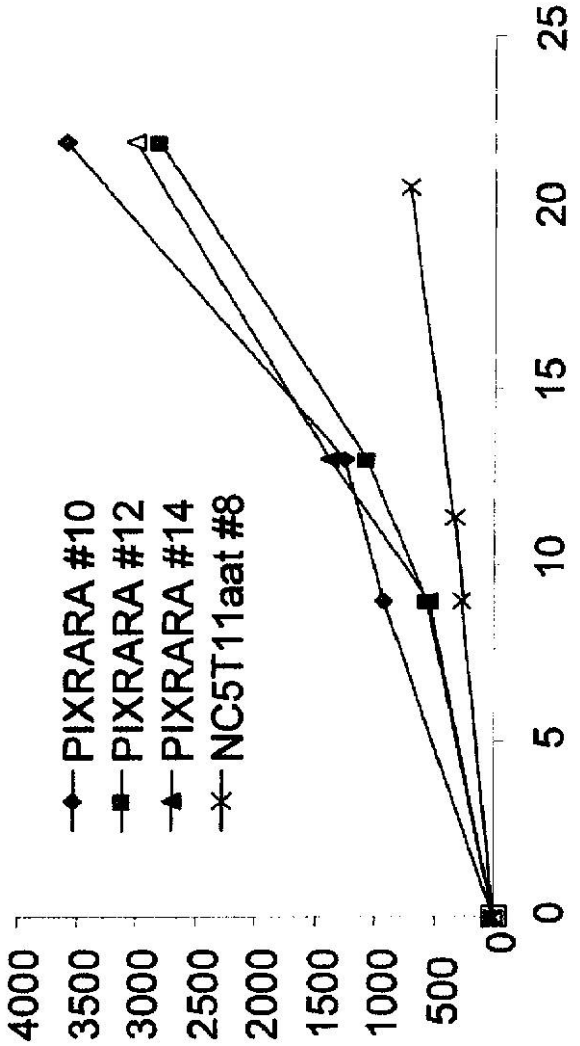
【図８】


－誘導因子
＋誘導因子
増殖の変化無し
－誘導因子
＋誘導因子
増殖停止
－誘導因子
＋誘導因子
増殖停止
NC5T11a.1
NC5T11a.1#12
NC5T11a.1#34

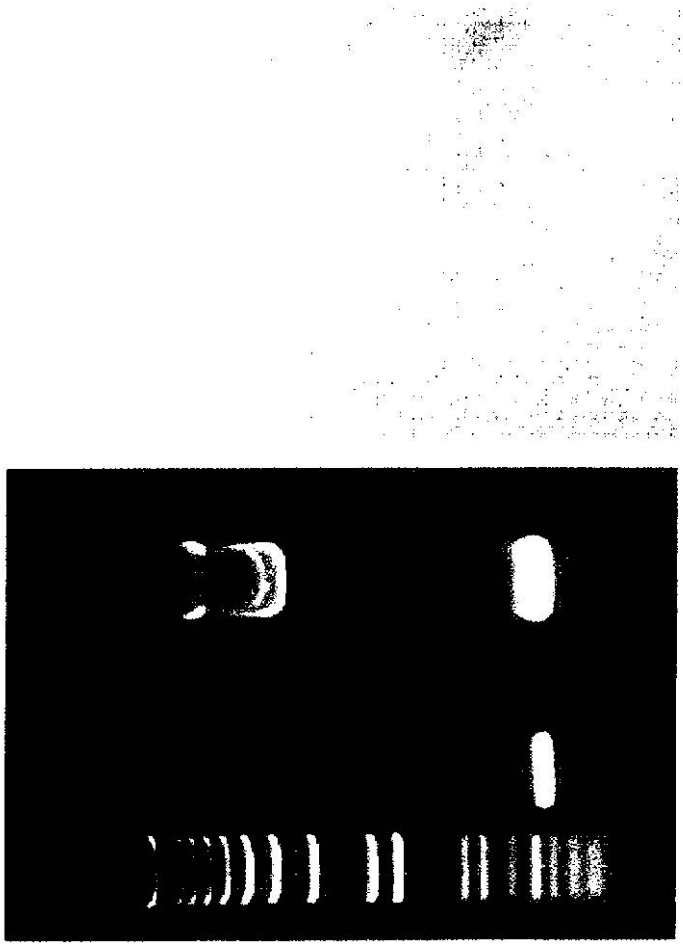
【図９】


3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
1
8
0
1
8
NC5T11
NC5T11#34
IU IFNβ

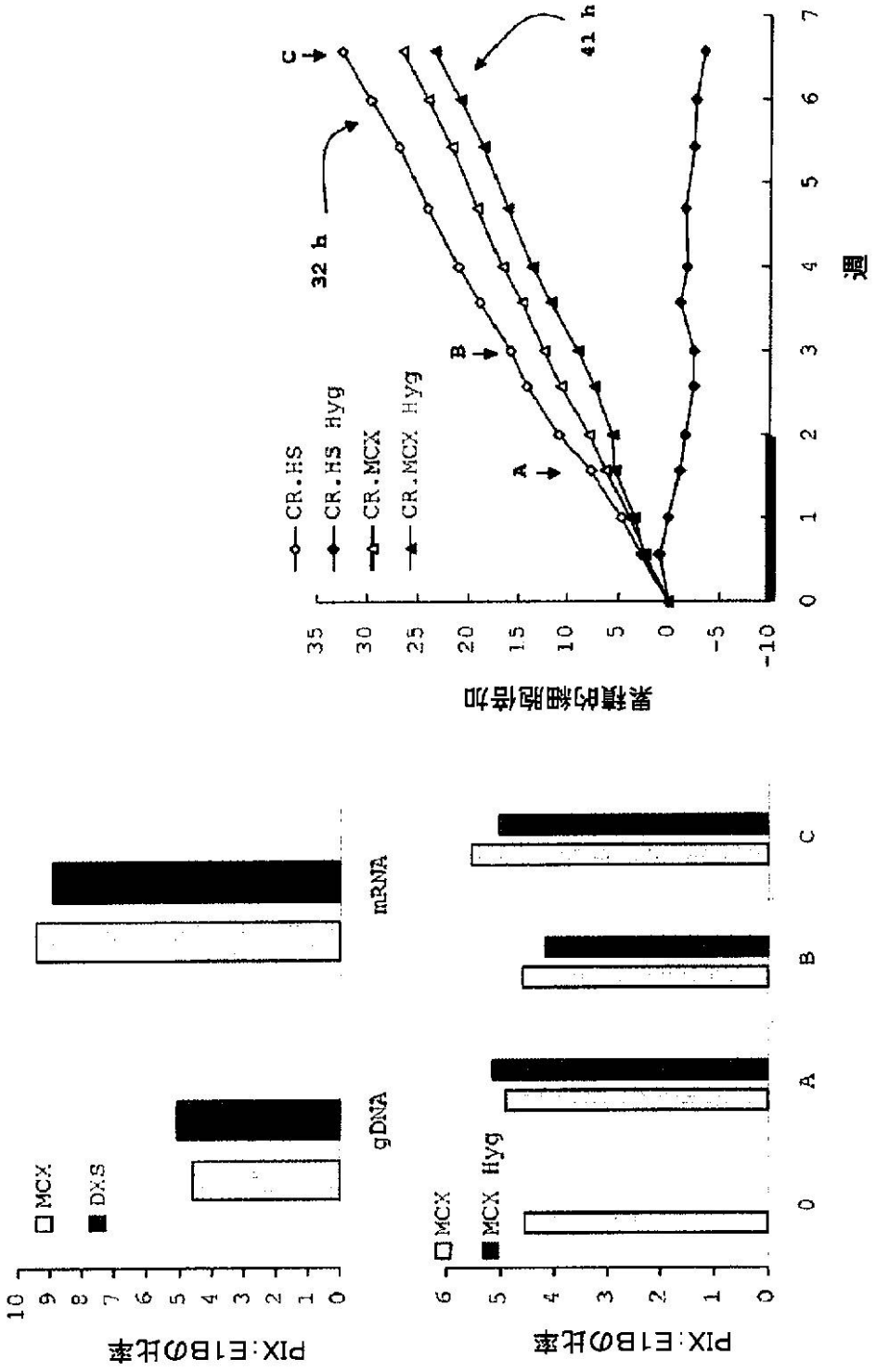
【図１０】


PIXRARA #10
PIXRARA #12
PIXRARA #14
NC5T11aat #8
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25

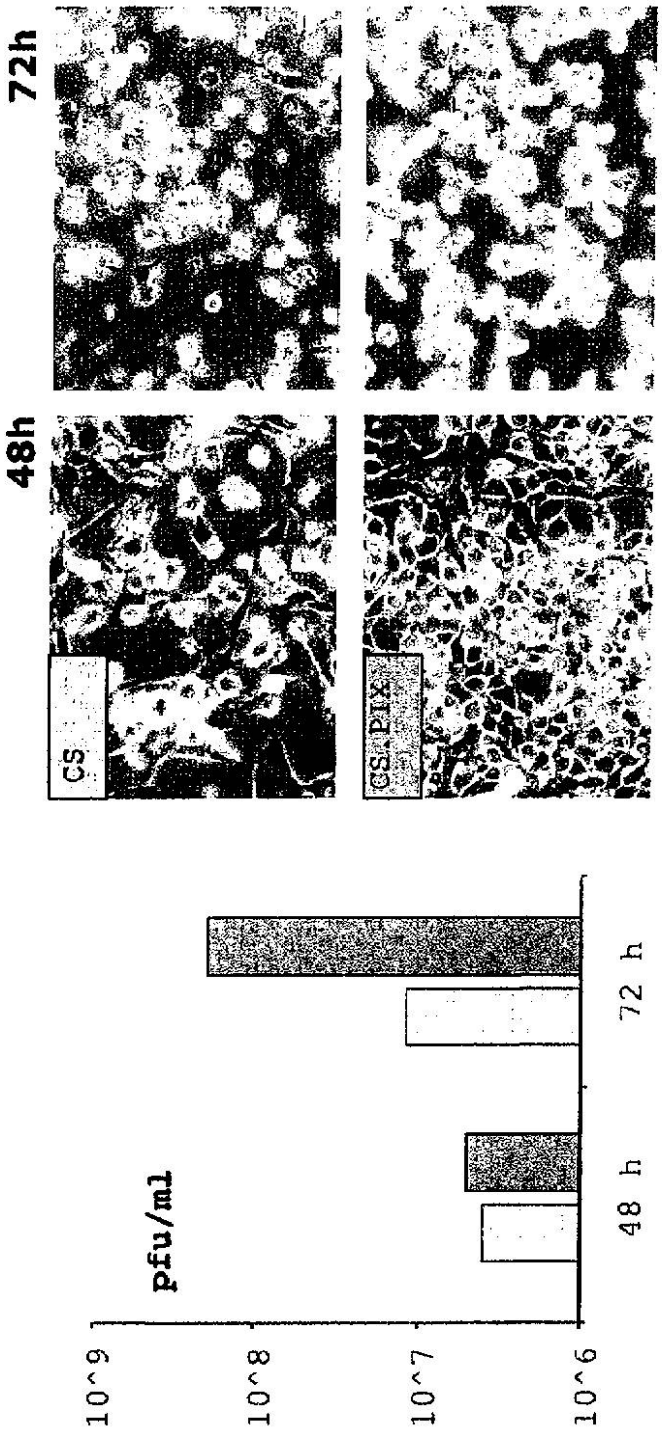
【図１１】



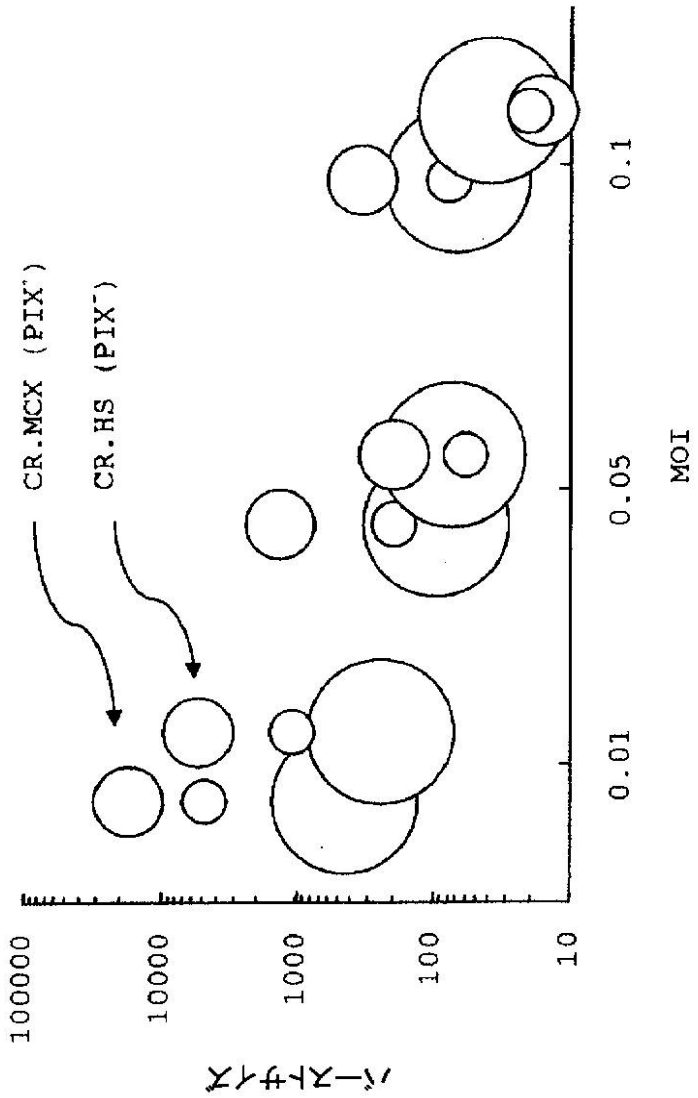
【図１２】


累積的細胞倍加
週
CR.HS
CR.HS Hyg
CR.MCX
CR.MCX Hyg
32 h
41 h
A
B
C
PIX:E1Bの比率
MCX
MCX Hyg
mRNA
gDNA
DXS

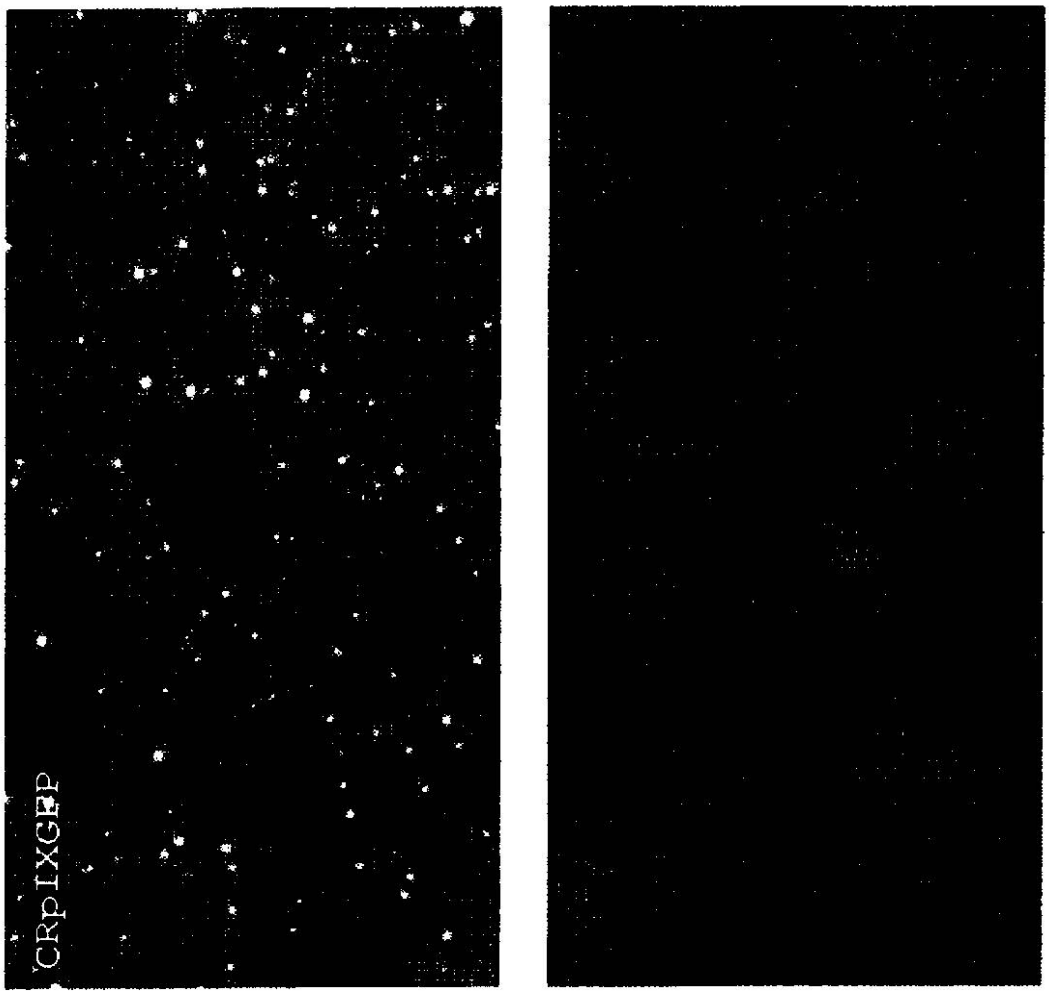
【図１３】



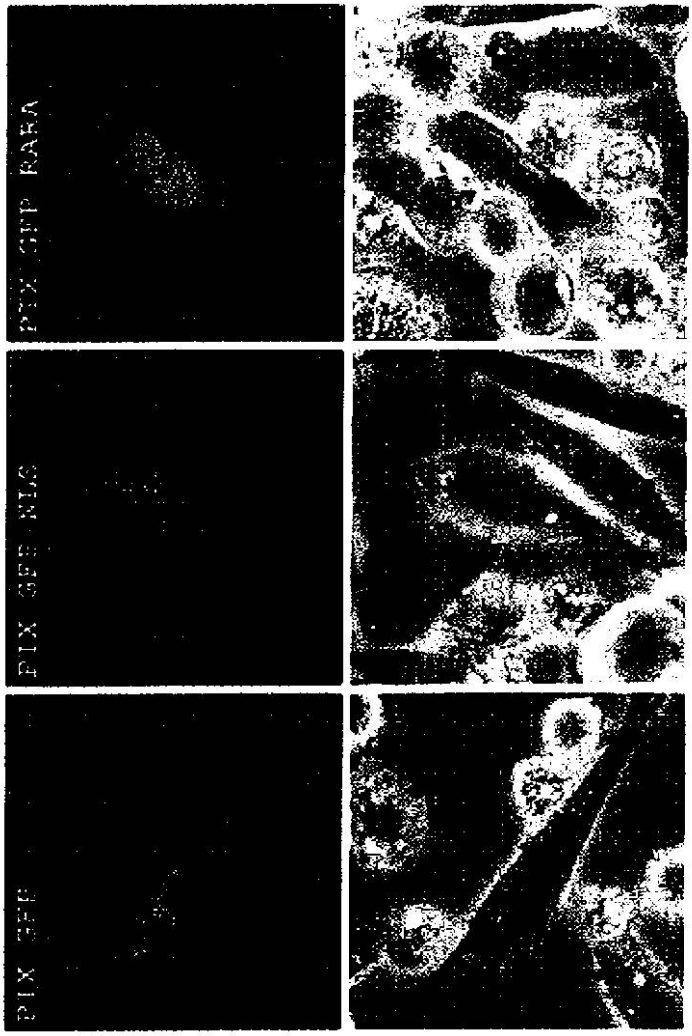
【図１４】


CR.MCX (PIX+)
CR.HS (PIX-)
0.1
0.05
0.01
MOI
100000
10000
1000
100
10
パーフリンゴス

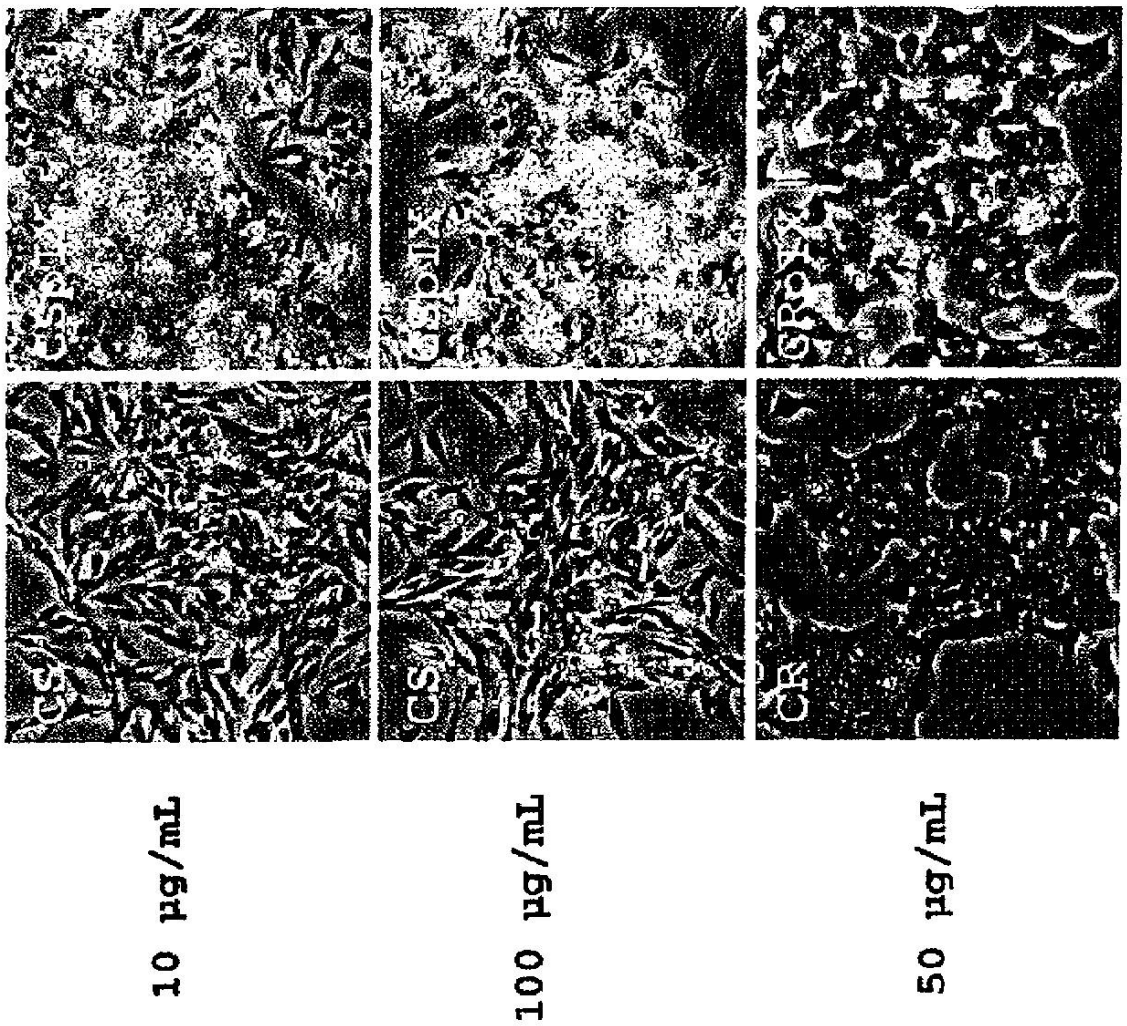
【図１５】



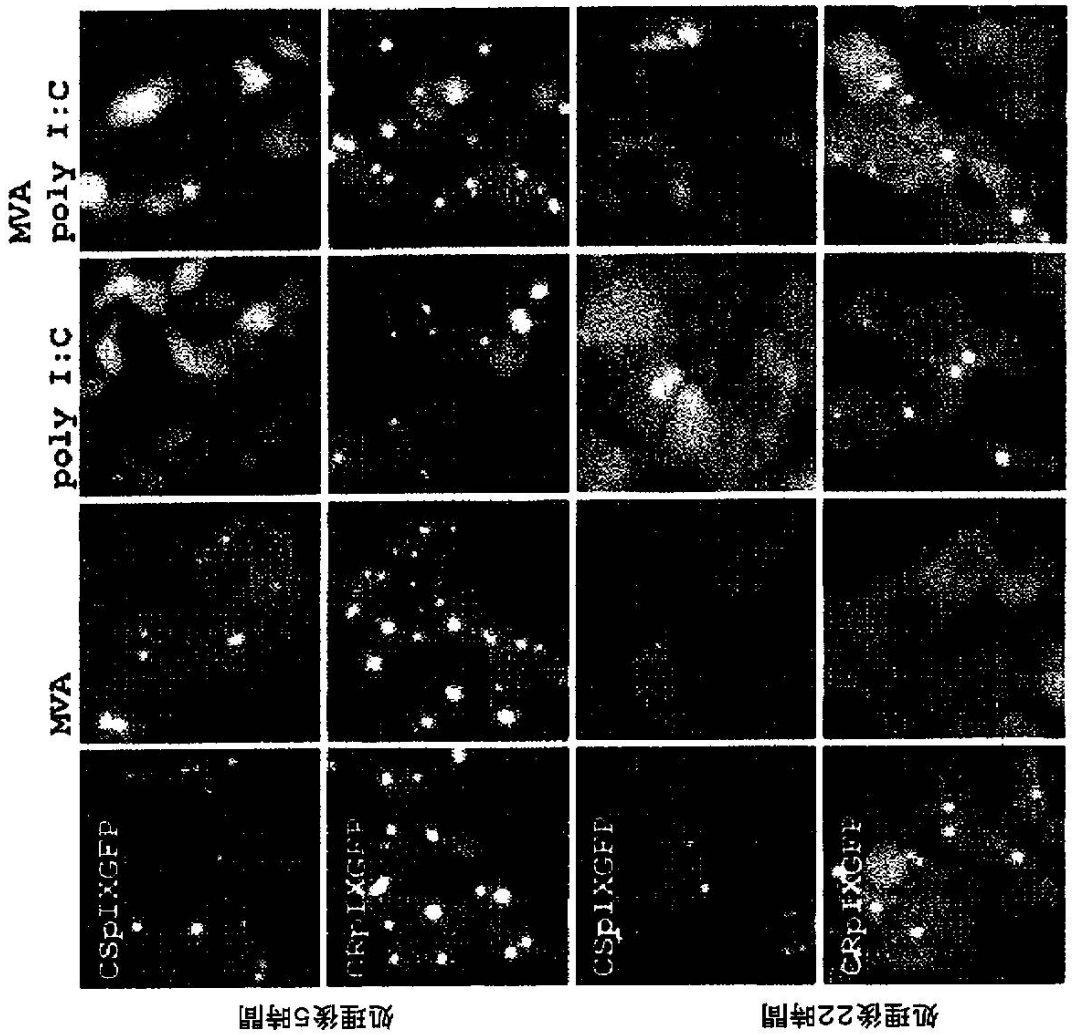
【図１６】



【図１７】



【図１８】


MVA
poly I:C
MVA
poly I:C
CSpIXGFP
CRpIXGFP
CSpIXGFP
CRpIXGFP
処理後5時間
処理後22時間

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
Ｃ０７Ｋ 19/00 (2006.01) Ｃ０７Ｋ 19/00

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2749

(72)発明者 ジョーダン，インゴ
ドイツ連邦共和国，ベルリン １３１５６，シュティレ シュトラーセ ４
(72)発明者 ブランドク，エリザベス
ドイツ連邦共和国，メッツィンゲン ７２５５５，ブリューフルシュトラーセ ２１

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第２００５／０４２７２８（WO，Ａ１）
特表２００２－５１３５８２（ＪＰ，Ａ）
Proc. Natl. Acad. Sci. USA，２０００年，Vol.97，No.26，P.14720-14725
HUMAN GENE THERAPY，１９９５年，Vol.6，No.12，P.1575-1586
GENE THERAPY，１９９６年，Vol.3，No.1，P.75-84
JOURNAL OF VIROLOGY，１９９５年，Vol.69，No.11，P.6627-6633
HUMAN GENE THERAPY，２０００年，Vol.11，P.213-219
MOLECULAR THERAPY，２００５年 1月，Vol.11，No.1，P.19-25

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ ５／００－ ５／２８
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
Ｃ１２Ｐ ２１／０２
ＰｕｂＭｅｄ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）