

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4843145号  
(P4843145)

(45) 発行日 平成23年12月21日(2011.12.21)

(24) 登録日 平成23年10月14日(2011.10.14)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**A 6 1 K 48/00 (2006.01)** A 6 1 K 48/00  
**C 1 2 N 5/10 (2006.01)** C 1 2 N 5/00 B

請求項の数 7 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願2000-618477 (P2000-618477)	(73) 特許権者	301055549
(86) (22) 出願日	平成12年5月16日 (2000. 5. 16)		クルセル ホランド ベー ヴェー
(65) 公表番号	特表2002-543846 (P2002-543846A)		オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデ
(43) 公表日	平成14年12月24日 (2002. 12. 24)		ン アルキメデスウェツハ 4
(86) 国際出願番号	PCT/NL2000/000325	(74) 代理人	100147485
(87) 国際公開番号	W02000/070071		弁理士 杉村 憲司
(87) 国際公開日	平成12年11月23日 (2000. 11. 23)	(74) 代理人	100119530
審査請求日	平成16年8月19日 (2004. 8. 19)		弁理士 富田 和幸
審査番号	不服2008-13803 (P2008-13803/J1)	(74) 代理人	100135172
審査請求日	平成20年6月2日 (2008. 6. 2)		弁理士 野田 裕子
(31) 優先権主張番号	99201545. 3	(74) 代理人	100144266
(32) 優先日	平成11年5月17日 (1999. 5. 17)		弁理士 鈴木 一寿
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	アブラハム バウト
			オランダ国 2 7 5 1 アーエル ムール
			カッペレ コイマンストラート 24
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アデノウイルス型35の少なくとも1つの因子を含有するアデノウイルス由来遺伝子運搬担体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

興味ある遺伝子を備えるアデノウイルスであって、アデノウイルスのE1領域における欠失を備え、前記欠失は組換えアデノウイルスを複製欠損にさせ、及び前記アデノウイルスは、アデノウイルス血清型11、34、及び35からなる群より選ばれる、組換えアデノウイルス。

【請求項2】

興味ある遺伝子は前記アデノウイルスの核酸のE1領域に挿入されている、請求項1記載の組換えアデノウイルス。

【請求項3】

薬剤配合物であって、請求項1又は2記載の組換えアデノウイルス及び適切な賦形剤を備える、薬剤配合物。

【請求項4】

興味ある遺伝子を備える組換えアデノウイルス核酸であって、アデノウイルスのE1領域における欠失を備え、前記欠失は組換えアデノウイルスに複製欠損を与えるものであり、前記アデノウイルスは、アデノウイルス血清型11、34、及び35からなる群より選ばれる、組換えアデノウイルス核酸。

【請求項5】

興味ある遺伝子は前記アデノウイルス核酸のE1領域に挿入されている、請求項4記載のアデノウイルス核酸。

## 【請求項6】

請求項4又は5記載のアデノウイルス核酸を含む、細胞。

## 【請求項7】

請求項1又は2記載の組換えアデノウイルスを生産するための方法であって、請求項6記載の細胞を適切な培地中で培養すること、及び得られる組換えアデノウイルスを収集することを含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子治療、特に、ウイルス、とりわけアデノウイルスの因子由来の因子を含む遺伝子治療の分野に関する。アデノウイルスは、遺伝子を宿主へ運搬するための適切な担体として提案されている。ヒト遺伝子治療用の遺伝子運搬ベクターの開発に対して特に役立たせるアデノウイルスの多くの特徴がある。

10

## 【0002】

すなわち、アデノウイルスゲノムは、かなり特徴的である。それは、約36000塩基対の直線2本鎖DNA分子からなる。アデノウイルスDNAは、血清型に依存する正確な長さを持つ約90~140塩基対の理想的な逆方向末端反復(ITR)を含む。複製のウイルスの起源は、ゲノム末端で正確にITR内である。

## 【0003】

## 【従来の技術】

アデノウイルスの生物学は、詳細に特徴付けられており、アデノウイルスは、免疫適応可能な個体における厳格なヒト病理学に関係がない。

20

## 【0004】

ウイルスは、そのDNAを宿主細胞内へ引き合わせるのに極めて有効である。すなわち、ウイルスは、広範な種類の細胞に感染することができ、広範な宿主範囲を有する。ウイルスは、高いウイルス力価で大量に生産することができる。ウイルスは、ウイルスのゲノムの初期領域(E1)の削除により複製欠陥を与えることができる(Brody et al、1994)。遺伝子治療に現在使用されている大部分のアデノウイルスベクターは、所望の遺伝子の情報を導入することが可能なE1領域を削除されている。

## 【0005】

これらの特徴に基づき、ヒト目的細胞内への生体内遺伝子運搬用の好ましい方法は、アデノウイルスベクターを遺伝子運搬担体として応用することである。

30

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、アデノウイルスのヒトにおける治療の使用に関してなお欠点を有する。主な欠点は、アデノウイルスに対して個体間に広範に予め存在する免疫の存在である。野生型アデノウイルスへさらされることは、広範に提供されているように(Wadell、1984参照)、ヒトに非常に一般的なことである。このさらされることは、大部分のアデノウイルス型、個体が実際にさらされたアデノウイルスに対するもののみならず、同様の(中和)エピトープを有するアデノウイルスに対しても免疫反応を生ずる。ヒトに予め存在する抗体のこの現象と、ウイルスに対する強い二次的体液性及び細胞性免疫反応との組み合わせは、組み換えアデノウイルスベクターを使用する遺伝子運搬に深刻な影響を与える可能性がある。

40

## 【0007】

現在まで、合計で51の明確なアデノウイルス血清型を含むヒトアデノウイルスの6つの異なるサブグループが、提案されている(表1)。血清型は、動物(ウマ、ウサギ)の抗血清に対する質的な中和によって決定されるときその免疫学的示差性に基づき特徴付けられる。もし中和が、2つのウイルス間の交差反応をある程度示すなら、血清型の示差性は、A)赤血球凝集素-阻害の交差反応を欠くことによって示されるように、赤血球凝集素が無関係であるか、又はB)DNAにおける実質的な制物理学的/生物化学的な違いが存在するかと仮

50

定される。最後に明らかにされた9つの血清型(42 - 51)は、最初にHIV感染患者から単離された(Hierholzer et al 1988、 Schnerr et al 1993)。十分に理解されていない理由として、大部分の免疫能のない患者は、免疫能のある個体からはほとんどないか一度も単離されていないアデノウイルスを減少させる(Hierholzer et al 1988、1992、Khoo et al、1995、De Jong et al、1998)。

#### 【0008】

大量の個体は、以前にアデノウイルス、とくに十分に調査されたアデノウイルス血清型5及び型2(Ad5及びAd2)又は免疫学的に関連する血清型にさらされている。重要なことには、これらの2つの血清型はヒト遺伝子治療において使用するために大部分広範に研究もされている。

前に述べたように、遺伝子運搬担体を与えられた個体は、やがて、そのような担体へ中和する反応を増加させるので、遺伝子運搬担体を調製するためのこれらのアデノウイルス又は交差免疫アデノウイルスの有用性は、深刻に障害を受ける可能性がある。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

それゆえ、好ましくは、アデノウイルスに基づくものであり、予め存在する免疫に衝突せず、中和する抗体反応を回避又は消滅する能力を有する遺伝子運搬担体を調製するために、遺伝子治療の分野における必要性がある。それゆえ、本発明は、アデノウイルス因子に対して遺伝子が運搬されるべき宿主による中和活性を回避するか、あるいは消滅させる能力を有する、アデノウイルス血清型35因子又はその機能的同等物の少なくとも1つと、興味ある遺伝子とを含有する遺伝子運搬担体を提供する。本発明の目的のためのアデノウイルス35(因子)の機能的同等物/相同物は、最初に投与した宿主の約10%未満で予め存在する免疫に遭遇するアデノウイルス35のようなアデノウイルス(因子)か、あるいは免疫反応を回避又は消滅するために投与した宿主の約90%を超えて能力を有するものである。このようなアデノウイルスの典型的な例は、アデノウイルス血清型34、26及び48である。遺伝子運搬担体は、アデノウイルス35又はその機能的相同物に基づくが、それが、アデノウイルス35又はその機能的同等物由来の因子の少なくとも1つを含有する限り、遺伝子運搬担体に基づくアデノウイルス2又はアデノウイルス5などに対する免疫反応の消滅を導く。もちろん、遺伝子運搬担体は、それが、このような欠点が少なく、好ましくはこのような欠点を回避する、アデノウイルス35又はその機能的相同物の因子によってそのような遺伝子運搬担体に対する免疫を導く因子を置き換える限り、他の(アデノ)ウイルス由来の因子を含むことができる。本発明において、遺伝子運搬担体は、宿主細胞に興味ある核酸を運搬する能力を有するいずれかの担体である。本発明によれば、それは、そのような担体に対する免疫反応に関して有益な効果を有していなければならないアデノウイルス35因子又はそのような因子の機能的同等物を含まなければならない。それらが共に興味ある前記核酸を運搬する能力を有する限り、基本的に、担体を造る他の因子は、当業界で既知か、当業界で開発されたいずれの因子とすることができる。原則的に、当業者は、アデノウイルス分野において適用することができるか適用されたいずれかのウイルス産物又は生産系を使用及び/又は生産することができる。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

典型的に、本発明の生産物は、例えばアデノウイルス5、典型的にはアデノウイルス35に基づくベクターに使用可能なパッケージング細胞において製造することができ、他のアデノウイルス、例えば、アデノウイルス2及び/又は5のものと同様の方法で生産及び/又は使用する事ができる。最小のベクター、パッケージング系、細胞内増幅、ベクター及びプラスミドベース系の可能性の良好な概要は、ここで参照として組み込む出願人の同時係属出願(PCT/NL99/00235及びPCT/NL96/00244)において見出すことができる。どのウイルス運搬系もウイルス運搬できるような本発明による因子を与えていない。

#### 【0011】

両方の種類の系は、多くの異なるセットアップにおいて当業界において周知であり、それ

10

20

30

40

50

ゆえ、ここでさらなる説明は必要としない。多くの異なる系及びそれらの特性に関する概要は、ここで参照により組み込むRobbins, Ghivizzani (1998)及びPrince(1998)において見出すことができる。

【0012】

典型的に遺伝子運搬担体は、興味ある核酸を含む。興味ある核酸は、遺伝子、又は(遺伝子が発現可能ないずれかの核酸である)遺伝子の機能的部分、遺伝子の前駆体、又はいずれかの核酸レベル(DNA及び/又はRNA、すなわち2本鎖又は1本鎖)において転写された遺伝子とすることができる。興味ある遺伝子は、当業界において既知であり、治療タンパク質をコードするもの、例えば、TPA、EPO、サイトカイン、抗体、又はその誘導体などを典型的に含む。遺伝子治療において適用される治療タンパク質の概要を以下にリストする。

10

【0013】

腫瘍特異的抗原、サイトカインなどの免疫刺激因子、抗血管因子、限定する例ではないが、エンドスタチン、アンジオスタチン、ATF-BPTI CDT-6、優勢なマイナスVEGF突然変異体など。血管因子、限定する例ではないが、VEGF、線維芽細胞増殖因子、一酸化窒素シンターゼ、C型ナトリウム排泄増加ペプチド、など。

【0014】

さらに、炎症促進サイトカインのアンタゴニスト、例えば、IL-1RA(受容体アンタゴニスト)、及びsIL-1RI、sIL-1RII、sTNFRI及びsTNFRIIなどの可溶性受容体を使用することができる。

20

【0015】

可溶性CD40、FasL、IL-12、IL-10、IL-4、IL-13等の炎症阻害タンパク質、CD4、CD5、CD7、CD52、IL-2、IL-1、IL-6、TNF、などの分泌された単一鎖抗体又は、自動反応T細胞上のT細胞受容体への分泌した単一鎖抗体。PMLの優勢マイナス突然変異体を免疫反応を阻害するのに使用することができる。

【0016】

さらに、たとえば、IL-1RA(受容体アンタゴニスト)、及びsIL-1RI、sIL-1RII、sTNFRI及びsTNFRIIのような可溶性受容体等の炎症促進サイトカインのアンタゴニストを使用することができる。

【0017】

ceNOSm, Bc13, カクタス、及びI B、又は等の成長及び/又は免疫反応阻害遺伝子、鳥貧血ウイルスのVP3タンパク質などのアポトーシス誘導タンパク質も使用することができる。さらに、HSV-TKなどの自殺遺伝子、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、及びレナメラゼを使用することができる。

30

【0018】

興味ある核酸は、宿主細胞に存在する核酸配列とハイブリダイズすることが可能な核酸とすることができる、それによって、前記核酸の発現、転写、又は翻訳を抑制する。協調した抑制を通してブロックすることができる。つまり、興味ある核酸は、それが、その細胞による反応を誘導するために、細胞を生産したいと欲するいずれかの核酸であり、そのような反応は、タンパク質の生産、そのようなタンパク質の阻害、アポトーシス、壊死、増殖、違いなどかもしれない。

40

【0019】

本発明は、治療用途用のアデノウイルス35又はその機能的相同物を開示するための最初のものであり、したがって、本発明は、薬剤として使用するためのアデノウイルス血清型35、又はその機能的相同物、又はそれら由来のキメラウイルス、又は前記ウイルス、その相同物、又はそのキメラに基づく遺伝子運搬担体を提供する。本発明の血清型は、アデノウイルス35であり、それ自体は当業界において既知である。後天性免疫不全症候群及び他の免疫不全障害を持つ患者から単離するアデノウイルスは、一般的でないグループBである(Flomenberg et al, 1987, De Jong et al, 1983)。Ad35は、病原特性に関してより完全に特徴付けられたサブグルー

50

プC(Ad2及びAd5を含む)から異なることが示された(Basler et al. この違いは、Ad35のE3領域における違いと相互に関連する可能性があることが示唆された(Basler et al, 1996)。Ad35のDNAは、一部クローン化され、マップ化された(Kang et al, 1989a and b, Valderama - Leon et al, 1985)。

【0020】

34及び35などのB型アデノウイルス血清型は、他の血清型と異なるE3領域を有する。典型的にこの領域は、アデノウイルス産物への免疫反応を抑制することと関係する。したがって、本発明は、本発明による遺伝子運搬担体を提供し、それによって、前記因子は、免疫反応回避又は消滅することに関連して、アデノウイルス35 E3 発現産物又はそれらをコードする遺伝子又はいずれか若しくは両方の機能的同等物を含有する。

10

【0021】

免疫反応に関連するアデノウイルスの別の部分は、キャプシド、特にタンパク質及び/又はヘキソタンパク質である。したがって、本発明は、本発明による遺伝子運搬担体を提供し、そのために、因子は、少なくとも1つのアデノウイルス35キャプシドタンパク質又はその機能的部分、例えば、繊維、ペントン、及び/又はヘキソタンパク質、又はそれらの少なくとも1つをコードする遺伝子を含有する。免疫反応に対して関連する全てタンパク質が、アデノウイルス35(又はその機能的相同物)起源である必要はない。アデノウイルス繊維、ペントン又はヘキソタンパク質の一部を別の繊維、ペントン、又はヘキソンの中に挿入することも明白に可能である。したがって、キメラタンパク質が得られる。

【0022】

あるアデノウイルスのペントン、別のものからのヘキソン、さらに別のアデノウイルスからの繊維、又はE3領域を有することも可能である。本発明によれば、それらをコードするタンパク質又は遺伝子の少なくとも1つは、アデノウイルス35又はその機能的相同物由来の因子からなり、そのために前記因子は、宿主の免疫反応に効果を有する。したがって、本発明は、少なくとも1つの他のアデノウイルスを有するアデノウイルス35のキメラである本発明による遺伝子運搬担体を提供する。この方法において、生じたウイルスを他の側面において免疫反応のみを変更することもできる。その代わりに有益な因子で感染の効率を高めることができる。パッケージング細胞での複製を高めたり、そのトロピズムを変えることができる。

20

【0023】

したがって、本発明は、例えば、アデノウイルス35と異なるトロピズムを有する遺伝子運搬担体を提供する。もちろん、トロピズムは、遺伝子運搬担体が、宿主細胞、すなわち、標的細胞の下位集団へ優先的に運搬されるように好ましく変化させるべきである。本発明においてアデノウイルス又は他の遺伝子運搬担体を適用することもできるトロピズムの変更及び他の変更は、ここで参照として組み込む出願の同時係属出願に開示されている(Nos. 98204482.8、99200624.7、及び98202297.2)。もちろん、本出願は、例えば、本発明の遺伝子運搬担体及び/又はキメラになるために必要な及び/又は役立ついかなる全ての基礎的要素も提供する。これは、Ad35又はその機能的相同物に適合されないが、PER.C6(ECA CC寄託番号96022940)などの細胞、又はそれを基礎とした細胞などのパッケージング細胞を含む。それは、アデノウイルス35又はその機能的相同物の機能的部分、例えば、ITRなどの興味ある遺伝子を含有するベクターはもちろん、ヘルパー構築物、及びパッケージ構築物などをコードするいずれの核酸も含まれる。

30

【0024】

典型的には、ここで参照として組み込む出願人の出願(PCT/NL96/00244)は、創作された遺伝子運搬担体を達成するのに必要で有益な因子を開示する。したがって、本発明は、本発明による遺伝子運搬担体、又は本発明によるウイルス、相同物、そのキメラの少なくとも機能的部分をコードする核酸も提供する。

40

【0025】

本発明によれば、生じた遺伝子運搬担体となるであろう機能をコードする当該因子は、遺伝子が運搬されるべき宿主によるアデノウイルス因子に対する中和活性を回避又は消滅す

50

ることを担う、アデノウイルス血清型35又はその機能的同等物の少なくとも1つをコードする核酸を含有するか、又は当該核酸によってコードされなければならない。

【0026】

典型的には、興味ある遺伝子は、同様の核酸に存在し、それは、当該核酸がそのような遺伝子を有するか、その中に興味ある遺伝子を導入する部位を有することを意味する。

【0027】

典型的には、当該核酸は、少なくとも1つのITR及びもしそれがパッケージングすべき核酸ならパッケージングシグナルも含有する。しかしながら、以前に述べたように、本発明のための全ての必要で役立つ因子及び/又は基礎的要素は、出願人の出願(PCT/NL96/00244)に見出すことができる。アデノウイルス遺伝子運搬担体の分野における更なる改善の一組は、以前にここで述べたPCT/NL99/00235に開示された出願人のプラスミド系である。この系は、1つの実施態様において、共に遺伝子運搬担体に組み込まれた核酸の全ての因子を含有するアダプタープラスミド及びより長いプラスミドの相同組み換えとして機能する。これらの方法は、本創作遺伝子運搬担体及びそれらの基礎的要素に適用することもできる。

10

【0028】

したがって、本発明は、好ましくは、本発明による核酸を含有する2つの核酸の少なくとも1組の部分として、さらに相同組み換え用に設計し使用するヌクレオチドの領域を含有する本発明による核酸を提供し、そのために、前記核酸の1組は、互いに単一相同組み換え可能であり、機能的遺伝子運搬担体をコードする核酸となる。

20

【0029】

パッケージされるべき本発明によるベクターを含む細胞はもちろん、(本発明による遺伝子運搬担体を生産するためのパッケージされるべきベクターを、なお導入され生産されなければならない)両方のからのパッケージング細胞を提供する。それゆえ、本発明は、本発明による核酸又は本発明による核酸の1組を含む細胞も包含し、好ましくは、パッケージされるべき核酸、又は本発明による核酸の1組から欠くアデノウイルス複製に必要な因子を補足する細胞である。本発明において、翻訳において、アデノウイルス5タンパク質を与える細胞の複製能を欠く、E1欠如したアデノウイルス35ベクターを見出した。したがって、本発明は、翻訳においてアデノウイルス35E1タンパク質を提供する能力を有する細胞を更に提供する。当該細胞は、典型的には、網膜又は腎臓から引き出したヒト細胞である。羊水細胞(amniocyte)などの胚細胞は、E1補足細胞カブの発生に特に適することが示された。そのため当該細胞は、本発明において好ましい。E1タンパク質による血清型特異的相補性は、E1領域によってコードされる1又はそれ以上のタンパク質のためであるといえることができる。そのため、少なくとも血清型特異的タンパク質を翻訳の際に相補性細胞株を与えることは本質的なことである。E1欠如アデノウイルスの効果的な相補性のために本質的な非血清型特異的E1タンパク質を他のアデノウイルス血清型から引き出すことができる。好ましくは、アデノウイルス35のE1B領域由来の少なくともE1タンパク質を翻訳においてE1欠如アデノウイルス35系ベクターを補足するために提供する。1つの実施態様において、1又はそれ以上の血清型特異的E1タンパク質をコードする核酸を、PER.C6細胞又はPER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)由来の細胞、又はAd35又はその機能的相同物由来の因子を補足する同様のパッケージング細胞の中へ導入する。本既に言及したように、本発明は、本発明による細胞において本発明の核酸を発現し、生じた遺伝子運搬担体を収穫することからなる本発明による遺伝子運搬担体を生産するための方法を含む。上記は、からのパッケージング細胞を関連核酸で充填することに関する。充填した細胞の構成は、もちろん本発明の一部であり、本発明による充填したパッケージ細胞(生産細胞)を適当な培地で培養し、生じた遺伝子運搬担体を収穫することからなる、本発明による遺伝子運搬担体の製造方法を提供する。

30

40

【0030】

本発明によるいかなる方法によって得られた生成遺伝子運搬担体、特に、アデノウイルス及び組込みウイルスのキメラ由来の本発明による遺伝子運搬担体も、もちろん本発明の一

50

部である。アデノウイルス遺伝子運搬担体は、通常宿主ゲノムに組み込まれないのは周知である。長期間の宿主細胞内での遺伝子の発現について、そのような能力を有するキメラを調製することは好ましい。当該キメラは、ここで参照として組み込む、出願人の同時係属出願PCT/NL98/00731に開示されている。アデノウイルスと組み込みウイルスの当該キメラの好適な例としては、前記組み込みウイルスが、アデノ随伴ウイルスである。ここで以前に述べたように、上記と組み合わせることもできる他の役立つキメラは、変更したトロピズムを有する(全タンパク質又はその一部又は両方を交換している)キメラである。その好適な例は、おそらく、例えばAd2又はAd5由来の因子を持つAd35及びAd16のキメラであり、Ad16又はその機能的同等物の部分を決定するトロピズムを、遺伝子運搬担体をここで参照として組み込むシノビオサイト(synoviocyte)及び/又は平滑筋細胞(出願人の同時係属出願nos.98204482.8及び99200624.7)へ誘導するのに使用することができる。樹状細胞(DC)、造血幹細胞(HSC)遺伝子運搬担体由来のAd2又はAd5と容易に形質導入しない。本発明は、DC細胞及びHSC細胞の向上した形質導入能力を持つ遺伝子運搬担体を提供する。このような遺伝子運搬担体は、Ad35アデノウイルスの部分を決定する組織トロピズムを含む。それゆえ、本発明は、樹状細胞及び/又は造血幹細胞を形質導入するためのアデノウイルス35キャプシドの部分を決定する組織トロピズムの使用を提供する。他のB型アデノウイルスも適する。組織トロピズム決定部分は、少なくとも繊維タンパク質のノブ及び/又はシャフトを含む。もちろん当業者にとって繊維タンパク質中の組織トロピズムを担うアミノ酸配列を決定することは、明白に可能である。当該知識は、このようなアミノ酸配列を含むキメラタンパク質を構築するのに使用することができる。そのために、このようなキメラタンパク質も本発明の一部である。DC細胞は、細胞を与える非常に有効な抗原である。遺伝子運搬担体を当該細胞に導入することによって、宿主の免疫系を特異的な抗原へ誘発することができる。このような抗原は、DCへ運搬された核酸又はそれ自身で遺伝子運搬担体のタンパク質によってコードすることができる。

#### 【0031】

したがって、本発明は、ワクチンとして宿主免疫系へ上手く達成し得る能力を有する遺伝子運搬担体も提供する。ベクターは、それが標的細胞を効率的に見つけるために十分長い間、免疫系を回避する能力を有し、同時に、特異的な抗原を抗原存在細胞へ運搬する能力を有し、それによって、特異的な抗原に対する効率的な免疫反応の誘導及び/又は刺激を可能とする。免疫反応を効率よく調節するために、遺伝子運搬担体は、免疫反応を調節する能力を有する当該タンパク質をコードするタンパク質及び/又は核酸を含有する。当該タンパク質の限定されない例は、インターロイキン、粘着分子、同時刺激タンパク質、インターフェロンなどのなかに見られる。したがって、本発明は、さらに本発明の遺伝子運搬担体を含有するワクチンを提供する。さらに、本発明は、DC及び/又はHSC、少なくともアデノウイルス血清型35の部分を決定する組織トロピズムを含有する担体を効率的に形質導入する能力を持つアデノウイルスベクターを提供する。さらに、本発明はHSC及び/又はDC細胞の形質導入用の遺伝子運搬担体の使用を提供する。同様の組織トロピズムは、他のアデノウイルス血清型B、特に血清型11にも見られ、これもまた本発明の部分である。もちろん、組織トロピズム決定部分を有する他の遺伝子運搬担体を提供することも可能であり、それによって、向上したDC及び/又はHSC形質導入能力を有する当該運搬担体を生産する。そのため、そのような遺伝子運搬担体も本発明の一部である。

#### 【0032】

本発明による遺伝子運搬担体は、関心ある遺伝子又は核酸を宿主細胞へ運搬するのに使用することができる。これは典型的に、薬剤的使用であろう。そのような使用も本発明に含まれる。そのような使用に適切な組成物も本発明の一部である。投与当たり又は感染当りに存在すべき必要な遺伝子運搬担体の量(m.o.i)は、治療すべき状況、投与経路(典型的に非経口)、被験者、感染の効率など、に依存する。適量決定研究は、当業界において周知であり、他の(アデノウイルス)遺伝子運搬担体で既に行なわれているものを、本発明の遺伝子運搬担体の適当な投与量を見つけるための案内として典型的に使用する事ができる

10

20

30

40

50

。典型的には、これは、ある人が適当な賦形剤、適当な投与手段、所望しない担体の感染を防ぐ適当な手段などを見出すことができるということである。したがって、本発明は、本発明によるアデノウイルス、そのキメラ、又はその機能的相同物と、賦形剤とを含有する薬剤配合物はもちろん、本発明による遺伝子運搬担体と、適当な賦形剤とを含有する薬剤配合物も提供する。

【0033】

上述したように、大部分の広範に研究されたアデノウイルスの血清型は、追加の遺伝物質を宿主に運搬するのに理想的に適していない。これは、部分的には、これらの血清型に対する集団の間に予め存在する免疫のためである。ヒトにおいて予め存在する抗体のこのような存在と、ウイルスに対する強い二次的体液性及び細胞性免疫反応との組み合わせは、アデノウイルス遺伝子治療に影響を与えるであろう。

10

【0034】

本発明は、遺伝子治療ベクターとして非常に適するアデノウイルスの血清型及びその機能ある相同物の少なくとも因子の使用を提供する。本発明は、多くの個体由来の血清に対して自動化高スループットスクリーニングも開示する。驚くべきことに、中和能力は、ある特定の血清型、アデノウイルス35(Ad)に対して評価されたいずれの血清においても見出されない。これは、ヒトにおける遺伝子治療用ベクター系として極めて有益な本発明の血清型を作る。当該ベクター系は、予め存在する免疫の本来の問題なしに、遺伝物質を効率的にヒト細胞へ運搬する能力がある。

【0035】

典型的には、ウイルスは、アデノウイルスベクター(典型的には、プラスミド、コスミド、バキュロウイルス)を使用して生産される。もちろん当該ベクターも、本発明の一部である。本発明は、E1領域を削除するか、不活性化することによって複製欠陥を与えられたアデノウイルス由来ベクターも提供する。もちろん、興味ある遺伝子を例えばベクターが引き出されたオリジナルのアデノウイルスのE1領域の部位で挿入する事もできる。

20

【0036】

本発明の全ての側面において、アデノウイルスは、E1領域の欠損、及びプロモータにどちらか、あるいはどちらも結合しない異質遺伝子の挿入を含むことができる。さらに、アデノウイルスは、E2、E3、又はE4領域の欠損しているもの。プロモーターに結合した異質遺伝子を挿入しているものも含まれる。この場合において、E2及び/又はE4補足細胞株も組み換えアデノウイルスを生成するために要求される。

30

【0037】

ある者は、遺伝子治療に使用すべき組み換えアデノウイルスの調製用にAd35 血清型それ自体を使用して選択することができる。あるいは、ある者は、当該組み換えアデノウイルスにおいて本発明の血清型由来の因子を使用するのに選択する事ができる。ある者は、例えば、異なる血清型から所望の特性を組み合わせたキメラアデノウイルスを開発する事ができる。いくつかの血清型は、幾分宿主の範囲に限定されるが、より少ない免疫源の利益を有し、いくつかはその他の回避法である。いくつかは、限られた病毒性の問題を有するが、広範な宿主範囲及び/又は減少した免疫原性を有する。当該キメラアデノウイルスは、当業界において既知であり、それらは本発明の範囲内にあることを意味する。したがって、1つの実施態様において、本発明は、予め存在する免疫を無くす、少なくとも本発明の血清型のアデノウイルスの一部、及び少なくとも別のアデノウイルス血清型由来のアデノウイルスゲノムを含有するキメラアデノウイルスを提供する。この方法において生産されたキメラアデノウイルスは、本発明の血清型の予め存在する免疫を欠如したものを別の血清型の他の特性へ組み合わせたようなものである。このような特性は、温度安定性、組み立て性、固着性、変更した感染、生産収率、変更又は改善した感染、標的細胞中のDNAの安定性などかもしれない。

40

【0038】

一般に、パッケージング細胞は、十分な量のアデノウイルスを生産するために必要とされるであろう。遺伝子治療目的の組み換えアデノウイルスの生産のために、いくつかの細胞

50

株を利用することができる。これらは限定されないが、既知の細胞株PER.C6(ECACC 寄託番号96022940)、911,293、及びE1 A549を含む。

【0039】

本発明の重要な特徴は、アデノウイルスを生産する手段である。典型的には、複製コンピタントアデノウイルスを含むために臨床的用途用にアデノウイルス バッチを欲しない。それゆえ、一般的には、アデノウイルスベクターにおいてアデノウイルスゲノムから多量の遺伝子(少なくとも1つ)を省略すること、及びベクターがキメラアデノウイルスを生産するのに持ってきた細胞のゲノム中にこれらの遺伝子を供給することが望ましい。当該細胞は通常パッケージング細胞と呼ばれる。したがって、本発明によるアデノウイルスベクターに存在しないアデノウイルス生産用に必要な全ての因子を翻訳において含む、本発明によるアデノウイルス(遺伝子運搬担体)を生産するためのパッケージング細胞も提供する。典型的には、ベクター及びパッケージング細胞は、それらが全ての必要な因子を有する点で互いに適合されなければならないが、それらは重複因子を有さず、組み換えによって複製コンピタントウイルスを誘導する。それゆえ、本発明によるパッケージング細胞及び本発明による組み換えベクターを含有する部分のキットを提供し、そのため組み換えを導入する配列重複がないことが本質的であり、前記細胞と前記ベクターとの間の複製コンピタントアデノウイルスの生産を生じる。

10

【0040】

それゆえ、本発明は、適用上で予め存在するヒト免疫を回避するであろうアデノウイルスの製造方法であって、事実上天然の免疫が存在しないアデノウイルス血清型由来の因子を持つベクターを提供し、前記ベクターを本発明によるパッケージング細胞へ移入し、ウイルスの粒子を生産することを可能とする方法を提供する。

20

【0041】

1つの側面において本発明は、治療用途用に生体内で投与したアデノウイルスに対して、自然に存在するか又は誘導された、中和宿主活性を克服するための本発明のアデノウイルス血清型の使用を記載する。新規血清型への必要性は、1)組み換えアデノウイルス血清型5の繰り返しの組織の運搬は、組み換えアデノウイルス血清型5に対する中和抗体の高い力価の形成のために成功しない(Schulick et al、1997)こと、2)予め存在するヒト免疫は個体間に広がっていること、という観察によって抑制される。

【0042】

別の側面において、本発明はワクチン注射目的用の本発明の遺伝子運搬担体の使用又はアデノウイルス血清型35の使用を提供する。このような使用は、少なくともある程度宿主の望ましくない免疫反応を妨げる。

30

所望しない免疫反応の限定しない例は、遺伝子運搬担体又はアデノウイルス血清型に対する免疫反応を呼び起こすこと、及びノ又は遺伝子運搬担体又はアデノウイルス血清型35に対する免疫反応の向上である。本発明の別の側面において、別の使用は、異なるサブグループに属するAdベクターからなる。したがって、本発明のこの側面は、遺伝子治療目的用のアデノウイルス投与を繰り返さないようにすることに取り組んでいる。

【0043】

実施例1

ヒト血清における中和活性の検出用高スループット測定

全てのウイルス血清型に対する、中和抗体の存在のために多量のヒト血清をスクリーニングするために、自動化96ウエル測定を開発した。

40

【0044】

ヒト血清

100個体のパネルを選択した。被験者(50%男性、50%女性)は、人種に制限されない20~60の間の健康的な個体であった。全ての被験者は同意書にサインをした。アデノウイルス研究に専門的に従事する人々は除外された。

【0045】

約60mlの血液を乾燥チューブ中に引き込んだ。サンプリング後2時間以内に、血液を2500r

50

pmで10分間遠心分離した。約30ml血清をポリプロピレンチューブに移し、さらに使用するまで - 20 で冷凍保存した。

【 0 0 4 6 】

血清を解凍し、56 で10分間熱不活性化し、その後、繰り返しの冷凍/解凍サイクルを避けるために部分標本とした。部分標本は、約70個の96ウエルプレートを調合するのに十分な量で、培地(DMEM、Gibco BRL)において2倍希釈の5段階工程を作るのに使用した。希釈していない血清及び希釈した血清の部分標本を深いウエルプレート(96-ウエルフォーマット)の中へ滴下し、プログラムされたプレートメートを使用して100  $\mu$ l部分標本を96-ウエルプレートの中に分配した。この方法でプレートを、以下のスキームに従いデュプロ(duplo)(100  $\mu$ l/well)で8つの異なる血清を満たした。

10

【 0 0 4 7 】

カラム1及び6中のS1/2~S8/2は、1x希釈した血清を示し、Sx/4、Sx/8、Sx/16及びSx/32は2倍希釈を示す。最後のプレートは、マイナスの対照例として100  $\mu$ l子牛血清を満たした4つのウエルも含む。プレートをさらに使用するまで - 20 に保持した。

【 0 0 4 8 】

ヒトアデノウイルスストックの調製

全ての既知ヒトアデノウイルスのプロトタイプを、PER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)(Fallauz et al., 1998)で播種したT25フラスコでインキュベーションして、完全なCPEを収穫した。冷凍/解凍後、1-2mlの粗い溶解物をPER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)をT80フラスコに播種するのに使用し、ウイルスを完全なCPEで収穫した。CPEの接種と出現との間の時間枠、ウイルスの量は、異なる血清型間の新しい培地に再感染するために必要とした。アデノウイルスストックを冷凍/解凍によって調製し、3-4T175cm<sup>2</sup> 3層フラスコにPER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)を播種するために使用した。CPEが発生した際に、細胞をフラスコを軽く叩いて収穫し、滴下し、ウイルスを、2段階CsCl勾配によって以下のように単離、精製した。

20

【 0 0 4 9 】

細胞ペレットを50ml 10mMNaPO<sub>4</sub>緩衝液(pH7.2)に溶解し、-20 で冷凍した。37 で解凍後、5.6mlデオキシコール酸ナトリウム(5%w/v)を加えた。溶液を穏やかに混合し、5-15分間37 でインキュベートし完全に細胞を溶解した。溶液を均質化した後、1875  $\mu$ l 1MMgCl<sub>2</sub>を加えた。375  $\mu$ l DNアーゼ(10mg/ml)の添加後、溶液を30分間37 でインキュベーションした。細胞残骸を1880xgで30分間RTで停止することなく遠心分離して取り除いた。次に、上清をタンパク質からフレオンを抽出して清浄にした(3x)。清浄にした上清を1Mトリス/塩酸緩衝セシウムクロライド ブロック勾配(範囲1.2/1.4 gr/ml)にのせ、21000rpmで2.5時間10 で遠心分離した。1.33gr/mlのセシウムクロライドの1Mトリス/塩酸緩衝連続勾配を使用して、第2の精製を行なった後、ウイルスバンドを単離した。その後、ウイルスを17時間55000rpmで10 で遠心分離した。ウイルスバンドを単離し、スクロース(50%w/v)を1%の最終濃度へ加えた。過剰なセシウムクロライドを、CaCl<sub>2</sub>(0.9mM)、MgCl<sub>2</sub>(0.5mM)及び増加させた濃度のサッカロース(1、2、5%)を補った1.5 ltr PBSに対して透析スライド(Slide-a-lizer、カットオフ10000kDa、Pierce、USA)中で透析によって除去した。透析後、ウイルスを-85 で貯蔵して25と100  $\mu$ lの部分に部分標本した後、ウイルスをスライドアライザー(Slide a lizer)から除去した。

30

40

【 0 0 5 0 】

1ミリリットル当たりのウイルス粒子の数を決定するために、50  $\mu$ lのウイルスバッチを、shabram et al(1997)に記載されたように、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかける。0~600mMの範囲のNaCl勾配を使用してウイルスを溶出した。表1に述べたように、ウイルスは、NaCl濃度で血清型間でかなり異なって溶出した。

【 0 0 5 1 】

大部分のヒトアデノウイルスは、2、3の例外を除き、PER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)によく複製した。アデノウイルス型8及び40を911-E4細胞上で成長させた(He et al., 1998)。精製したストックは、 $5 \times 10^{10}$ と $5 \times 10^{12}$ ウイルス粒子/ml(VP/ml表1参照)の間で

50

含んでいた。

【0052】

精製したヒトアデノウイルスストックの滴定

アデノウイルスをPER.C6(ECACC寄託番号 96022940)細胞上で滴定し、5日間の中和測定期間で完全なCPEを得るのに必要なウイルスの量を決定した。これに関して、100  $\mu$ l培地を96ウエルプレートの各ウエルの中へ分配した。10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>倍に予め希釈した25  $\mu$ lのアデノウイルスストックを96ウエルプレートのカラム2に加え、10回のピペット上げ下げによって混合した。その後、25  $\mu$ lをカラム2からカラム3へ持っていき、再び混合した。これをカラム1から25  $\mu$ lを処分した後、カラム11まで繰り返した。このように5工程でいくつか希釈したものを予め希釈したストックから得られ始めた。その後、3  $\times$  10<sup>4</sup> PER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)を、100  $\mu$ l体積に加え、プレートを37  $^{\circ}$ Cで、5%CO<sub>2</sub>で5又は6日間インキュベートした。CPEを顕微鏡でモニターした。RoadとMuenschの方法を使用して細胞培養阻害量50%(CCID50)を計算した。

10

【0053】

並行して同一のプレートをセットアップしMTT測定(Promega)を使用して分析した。この測定において生存する細胞を、比色分析染色によって定量した。ここに、20  $\mu$ l MTT(PBS中の7.5mg/ml)をウエルに加え、37  $^{\circ}$ Cで、5%CO<sub>2</sub>下2時間インキュベートした。上清を取り除き、100  $\mu$ lの20:1イソプロパノール/トリトン-X100溶液をウエルに加えた。促進させた染色を溶解するのに、プレートを3~5分間96-ウエルシェイカー上に置いた。吸光度を540nmと690nm(バックグランド)で測定した。この測定によって進行中のCPE又は完全なCPEを有するウエルを区別することができる。

20

【0054】

中和測定

希釈したヒト血清サンプルを有する96ウエルプレートを37  $^{\circ}$ Cで、5%CO<sub>2</sub>下で解凍した。50  $\mu$ l当たり200CCID50へ希釈したアデノウイルスストックを調製し、50  $\mu$ l部分標本を血清を有するプレートのカラム1~11へ加えた。プレートを1時間37  $^{\circ}$ Cで5%CO<sub>2</sub>下でインキュベートした。

その後、6  $\times$  10<sup>5</sup>/mlの50  $\mu$ l PER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)を全てのウエルに調剤して、1日37  $^{\circ}$ Cで5%CO<sub>2</sub>下でインキュベートした。各列に対して清潔なピペットチップを用いて上清を除去し、血清の毒性影響を避けるために200  $\mu$ lの新鮮な培地をすべてのウエルに加えた。プレートを別に4日間37  $^{\circ}$ Cで5%CO<sub>2</sub>下でインキュベートした。加えて、類似の対照例プレートをデュプロ(duplo)において、列A及びBにおいて試験した各血清型に特異的なウサギに発生し希釈したプラスの対照例血清、及び列C及びDにおいてマイナスの対照例血清(FCS)を用いて、

30

セットアップした。列E-Hのそれぞれにおいて滴定を、上で述べたように試験すべき各ウイルスの200CCID50で始まる5倍希釈工程で行った。

5日目に対照例プレートの1つを顕微鏡とMTT測定で分析した。試験的な力価を顕微鏡観察した対照例滴定プレートから計算した。

【0055】

もしCPEが完全に検出されれば、すなわち、MTTによって分析された対照例力価実験での最初の希釈は、明白な細胞死を示すなら、すべての測定プレートは処理されている。もし違うなら、全てのプレートを進行させた後完全なCPEが明白になるまで1日又はそれ以上の日数処理させた。殆どの場合測定を5日間で終了した。Ad 1、5、33、39、42及び43に対して、測定を6日間行い、d2に対して8日間であった。

40

【0056】

最も高い血清濃度で、血清なしの対照例に比較して40%見られたとき、血清サンプルを中和性なしと見なす。100健康被験者からの血清に対して44プロトタイプアデノウイルスの分析結果を図1に示す。予想したように、Ad 2及びAd5への中和抗体を含む血清サンプルの割合は非常に高かった。これは、大部分のより低い数のアデノウイルスに対して本当である。驚くべきことに、どの血清サンプルもアデノウイルス血清型35への中和抗体を含まな

50

かった。血清型26, 34、及び48への中和抗体力価を持つ個体の数は、非常に低かった。

【0057】

そのため、Ad35又は他の上述した血清型に基づく組み換えE1欠如アデノウイルスは、中和抗体によるウイルスの一掃に関してAd5に基づく組み換えベクターに比較して重要な利点を有する。

【0058】

Ad35又は他の血清型の1つの相当するキャプシドタンパク質(の部分)によって置換した宿主の免疫源反応を伴うキャプシドタンパク質(の部分)を有するAd5系ベクターは、膨大なヒト血清によって中和され、少ないか等しくはないであろう。

【0059】

表1に見られるように、ml当たりのウイルス粒子から計算したVP/CCID50の割合と、実験において各ウイルスに対して得られたCCUD50は、かなり多様であり、0.4~5logの範囲であった。これは、PER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)の異なる感染効率及びウイルスの複製効率における違いによっておそらく引き起こされる。さらにバッチの特性も重要な役割を演じるかもしれない。高いVP/CCID50率は、多くのウイルスが5日間CPEを得るためにウエル上に置かれたことを意味する。結果として、より多くの(不活性)ウイルス粒子が抗体を防御したので、中和試験の結果は偏るかもしれない。この現象が生じるかどうかをチェックするために、VP/CCID50割合を、測定においてプラスに見られた血清サンプルの割合に対してプロットした(図2)。図は、測定におけるウイルスの量と血清中の中和との間に否定的な相関関係がないことを明白に示す。

【0060】

実施例2

組み換えウイルスの生産用のAd5プラスミドベクターの発生と、アデノウイルス遺伝子の容易な操作

pBr/Ad.Bam-rITR(ECACC寄託番号p97082122)

ITR配列の平滑末端クローニングを容易にするために、野生型ヒトアデノウイルス型5(Ad5)DNAをクレノウ酵素で過剰のdNTPの存在下で処理した。クレノウ酵素による不活性、フェノール/クロロホルム抽出による精製、次いでエタノール調製の後、DNAをBamHIで消化した。このDNA調製物を、以下のように調製したpBr322由来ベクターDNAとのくくり反応においてさらに精製することなしに使用した。すなわち、pBr322 DNAをEcoRV及びBamHIで消化し、TSAP酵素(Life Technologies)で処理することによって脱リン酸化し、LMPアガロースゲル上で精製した(SeaPlaque)。コンピタントE.coli DH5 (Life Techn.)の中へ形質転換し、アンピシリン耐性コロニーの分析の後、Ad5のBamHI部位から右のITRへ広がる挿入物に対して予期されたような消化パターンを示す1つのクローンを選別した。

【0061】

右のITRのクローニング境界の配列分析は、ITRの大部分の3' G残基が間違っていて、ITRの残りは、正しいと判明した。前記間違いのG残基は、他のITRによって複製中に補う。

【0062】

pBr/Ad.Sal-rITR (ECACC寄託番号p97082119)

pBR/Ad.Bam-rITRをBamHI及びSalIで消化した。アデノウイルス挿入物を含むベクター断片をLMPアガロース(SeaPlaque GTG)で単離し、wt Ad5 DNA由来の4.8kb SalI BamHI断片へくくり、Geneclean IIキットを精製した(Bio 101, Inc.)。1つのクローンを選択し、完全なAd5配列を制限酵素分析によって決定した。クローンpBr/Ad.Sal-rITRは、bp16746でSalI部位からアデノ型5配列を含み、(大部分の3' G残基を欠く) rITRを含む。

【0063】

pBr/Ad.Cla-Bam(ECACC寄託番号P97082117)

wtアデノ型5 DNAを、ClaI及びBamHIで消化し、20.6kb断片を電気溶出によってゲルから単離した。pBr322を同じ酵素で消化し、アガロースゲルからGenecleanによって精製した。両方の断片をコンピタントDH5の中へくくり形質転換した。生じたクローンpBr/Ad.Cla Bamを制限酵素消化によって分析し、bp919から21566までのアデノウイルス配列を持つ

10

20

30

40

50

挿入物を含むように示した。

【 0 0 6 4 】

pBr/Ad.AfIII-Bam(ECACC寄託番号P97082114)

pBr/Ad.AfIII-BamをEcoRI(pBrにおいて)で直線状にし、AfIIIで一部消化した。AfIIIを20分間65℃で加熱不活性化後、断片末端をクレノウ酵素で満たした。その後、DNAを、PacI部位を含む平滑二本鎖オリゴリンカー(5'-AATTGTCTTAATTAACCGCTTAA-3')にくくった。このリンカーは、以下の2つのオリゴヌクレオチド、すなわち、5'-AATTGTCTTAATTAACCGC-3'及び5'-AATTGCGGTTAATTAAGAC-3'をアニーリングすることによって作り、次いでクレノウ酵素で平滑化した。緩衝液を変えるのにくくったDNAが析出した後、くくったものを過剰のPacI酵素で消化し、オリゴの結合を除去した。bp 3534から21566までのAd5配列及びベクター配列を含有する22016bp部分的断片をLMPアガロース(Seaplaque GTG)において単離し、コンピタントDH5の中へ再びくくり、形質転換した。PacI部位を含むことが見出されて、大きいアデノ断片を有する1つのクローンを選択し、5'末端で配列化し、PacIリンカーの(最後の)AfIII部位における正確な挿入を確かめた。

10

【 0 0 6 5 】

pBr/Ad.Bam-rITRpac<sub>2</sub>(ECACC寄託番号p97082120)及びpBr/Ad.Bam-rITRpac<sub>8</sub>(ECACC寄託番号p97082121)

クローンpBr/Ad.Bam-rITRにAd5のITR近くのPacI部位の挿入を可能とするために、約190ヌクレオチドをpBr322骨格のClaI部位と、ITR配列の開始との間で除去した。これを以下のようにした。すなわち、pBr/Ad.Bam-rITRをClaIで消化し、変更した長さの時間(2分、5分、10分、及び15分)ヌクレアーゼBaI31で処理した。ヌクレオチド除去の程度は、同一の緩衝液と状態を用いて、(ClaI部位でも消化されている)pBr322DNAでの分離反応によって従われる。BaI31酵素を75℃で10分間インキュベーションすることによって不活性化し、より小さい容積のTE緩衝液で沈殿させ、再懸濁した。

20

【 0 0 6 6 】

平滑末端を確実にするために、さらにDNAをT4DNAポリメラーゼで過剰なdNTPの存在下で処理した。(対照)pBr322DNAのSalIでの消化後、十分な分解(150bp)を10分、15分間処理したサンプルにおいて観察した。その後、10分、又は15分処理したpBr/Ad.Bam-rITRサンプルを上述した平滑PacIリンカー(pBr/Ad.AfIII-Bam)にくくった。過剰のPacIで消化したくくったものを沈殿によって精製し、リンカーからLMPアガロースゲル上で分離した。くくった後、DNAをコンピタント5の中へ挿入し、クローンを分析した。およそ所望の長さを欠く10個のクローンを選別し、さらにそれらをTトラックシーケンシング(T7シーケンシングキット、Pharmacia Biotech)によって分析した。2つのクローンをrITRの丁度下流で挿入したPacIリンカーで見出す事ができる。PacIで消化後、クローン<sub>2</sub>は28bpを有し、クローン<sub>8</sub>はITRに付着した27bpを有する。

30

【 0 0 6 7 】

pWE/Ad.AfIII-rITR(ECACC寄託番号P97082116)

コスミドベクターpWE15(Clontech)をより大きいAd5挿入物をクローン化するのに使用した。最初に、特有のPacI部位を含むリンカーを、pWE.pacを作製するpWE15のEcoRI部位に挿入した。この末端で、pBr/Ad.AfIII-BamHIに対して述べたような二本鎖PacIオリゴを使用したが、なお、そのEcoRI突出末端を有していた。その後、以下の断片、すなわち、PacIで消化したpWE.pac、PacIとBamHIで消化したpBr/AfIII-Bam、及びBamHIとPacIで消化したpBr/AfIII-Bamを電気溶出によって、アガロースゲルから単離した。これらの断片を、製造者のプロトコールによるファージパッケージング抽出物(Stratagene)を使用して共にくくった。宿主バクテリアに感染させた後、コロニーをプレート上で成長させて、完全な挿入物の存在を分析した。pWE/Ad.AfIII-rITRは、右ITR(大部分の3'G残基を欠く)を含めbp 3534(AfIII部位)からアデノウイルス型5配列を全て含んでいる。

40

【 0 0 6 8 】

pBr/Ad.IITR-Sal(9.4)(ECACC寄託番号p97082115)

アデノ5 wt DNAをクレノウ酵素で過剰なdNTPの存在下で処理し、次いでSalIで消化した。

50

それぞれ、左 ITR-Sal(9.4)及びSal(16.7)-右 ITR設計した生じた断片2つを、LMPアガロース(Seaplaque GTG)で単離した。PBr322DNAをEcoRV及びSalIで消化しファスファターゼ(Life Technologies)で処理した。Geneclean 法(BIO 101, Inc.)を使用して、ベクター断片を単離し、Ad5SalI断片へくくった。9.4kb断片を有するくくったものだけが、挿入物を持つコロニーを与えた。クローニングの境界を分析し、シーケンシングした後、完全な ITR配列を含み、bP9462でSalI部位へ拡張したクローンを選択した。

## 【0069】

pBr/Ad. 1 ITR - Sal(16.7) ( ECACC寄託番号P97082118 )

pBr/Ad. 1 ITR - Sal(9.4)をSalIで消化して、脱リン酸化した(TSAP、Life Technologies)。このクローンをAd5において3番目のSal部位まで延長するために、pBr/Ad.Cla - BamをBamHIで直線状にしてSalIで一部消化した。9462-16746からのアデノウイルス配列を含む7.3kb SalI断片を、LMPアガロースゲル中で単離し、SalI消化したpBr/Ad. 1 ITR-Sal(9.4)ベクター断片にくくった。

10

## 【0070】

pWE / Ad . A f l I I I - E c o R I

pWE . pacをClaIで消化し、5'突出末端をクレノウ酵素を使用して満たした。その後、このDNAをPacIで消化し、アガロースゲルから単離した。pWE / A f l I I I - r I T RをEcoRIで消化し、クレノウ酵素で処理後、PacIで消化した。アデノウイルス配列含有の大きな24kbフラグメントをアガロースゲルから単離し、ClaIで消化および平滑化したpWE . pacベクターにクローンテック社(Clontech)からのリゲーションエクスプレス(Ligation Express™)キットを使用して結合した。Stratageneからの超受容能XL10 - Gold細胞の形質転換の後、期待される挿入断片を含むクローンを確認した。pWE / A f l I I I - E c o R Iは、bp3534 - 27336からのAd5配列を含む。

20

## 【0071】

pWE / Ad . A f l I I I - r I T R s pの生成

ベクターpWE / Ad . A f l I I I - r I T Rの3' ITRは末端G - ヌクレオチドを含まない。さらに、PacI部位は右ITRからほぼ30bpに位置している。これらの両特性は、3' ITRにおける複製の開始が非効率なため、ウイルス生成の効率が減少し得る。ウイルス生成の間、アダプタープラスミドにおける左のITRは完全であり、均一な組み換えの後、ウイルスDNAの複製が可能であることに注意を要する。

30

## 【0072】

3' ITRにおける複製の開始の効率を改良するために、pWE / Ad . A f l I I I - r I T Rを以下のように改変した。つまり、まず、構成pBr / Ad . Bam - r I T R pac # 2をPacIで消化し、その後、部分的にAvrIIで消化し、17.8kbのベクター含有フラグメントを単離し、SAP酵素を使用して脱リン酸化した。このフラグメントはヌクレオチド35464から3' ITRまでのアデノ配列が欠けている。pWE / Ad . A f l I I I - r I T RからのDNAを鋳型として、さらにプライマーITR - EPH:

5' - C G G A A T T C T T A A T T A A G T T A A C A T C A T C  
A A T A A T A T A C C - 3'

40

およびAd101: 5' - T G A T T C A C A T C G G T C A G T G C - 3'

を使用して、630bp PCRフラグメントを3' Ad5配列に対応して生成した。続いて、このPCRフラグメントをベクターpCR2.1(Invitrogen)においてクローン化し、PCRフラグメント含有クローンを単離し、配列化してDNAの正しい増幅を検査した。その後、PCRクローンをPacIおよびAvrIIで消化し、0.5kbアデノ挿入断片をPacI/部分的にAvrIIで消化したpBr / Ad . Bam - r I T R pac # 2フラグメント生成pBr / Ad . Bam - r I T R s p . に結合した。次に、この構成を使用して、コスミドクローン(上記のように)を生成した。これは、

50

アデノ配列 3 5 3 4 から 3 5 9 3 8 に対応する挿入断片を有する。このクローンを pWE / A f l I I - r I T R s p と名付ける。

【 0 0 7 3 】

pWE / A d . A f l I I - r I T R E 2 A の生成

pWE / A d . A f l I I - r I T R ( E C A C C 寄託 P 9 7 0 8 2 1 1 6 ) から E 2 A コード配列の除去を、以下のようにして達成した。左および右部位における E 2 A コード領域をフランキングするアデノウイルス配列をプラスミド p B r / A d . S a l . r I T R ( E C A C C 寄託 P 9 7 0 8 2 1 1 9 ) から製造者のプロトコルに準拠して E x p a n d P C R 装置を使用して P C R 反応で増幅した。以下のプライマーを使用した。右フランキング配列 ( A d 5 ヌクレオチド 2 4 0 3 3 から 2 5 1 8 0 に対応) :

E 2 A . S n a B I : 5 - G G C G T A C G T A G C C C T G T C G A A A G - 3

E 2 A . D B P - 開始 : 5 - C C A A T G C A T T C G A A G T A C T T C C T T C T C C T A T A G G C - 3

増幅 DNA フラグメントを S n a B I および N s i I で消化した ( N s i I 部位を、下線を付したプライマー E 2 A . D B P - 開始において生成する)。

【 0 0 7 4 】

左フランキング配列 ( A d 5 ヌクレオチド 2 1 5 5 7 から 2 2 4 4 2 に対応) :

E 2 A . D B P - 停止 : 5 - C C A A T G C A T A C G G C G C A G G - 3

E 2 A . B a m H I : 5 - G A G G T G G A T C C C A T G G A C G A G - 3

増幅 DNA を B a m H I および N s i I で消化した ( N s i I 部位を、下線を付したプライマー E 2 A . D B P - 停止において生成する)。次に、消化した DNA フラグメントを S n a B I / B a m H I で消化した p B r / A d . S a l - r I T R に結合した。配列は、プラスミド p B r / A d . S a l . r I T R E 2 A におけるユニーク N s i I 部位を使用して D B P コード領域の正確な置換を確認した。ユニーク N s i I 部位を使用して、組み換えベクターにより導入されるべき遺伝子に対して発現カセットを導入できる。

【 0 0 7 5 】

E 2 A コード配列の除去を、トップストランドの位置 2 4 0 4 8 における 1 0 0 K エンコード L 4 - 遺伝子のスプライスアクセプター部位が完全に残されるように行った。さらに、E 2 A コード配列の左側部位のオリジナル E 2 A - R N A および L 3 - R N A のポリアデニル化シグナルは完全に残った。これにより、アデノウイルスライフサイクルの間における L 3 - 遺伝子および 1 0 0 K L 4 - 蛋白質エンコード遺伝子の適正な発現が確実になる。

【 0 0 7 6 】

次に、プラスミド pWE / A d . A f l I I - r I T R E 2 A を生成した。プラスミド p B r / A d . S a l - r I T R E 2 A を B a m H I および S p e I で消化した。E 2 A コード領域がユニーク N s i I 部位により繰り返される 3 . 9 K b フラグメントを単離した。pWE / A d . A f l I I - r I T R を B a m H I および S p e I で消化した。E 2 A コード配列含有 B a m H I / S p e I フラグメントを除去する 3 5 K b DNA フラグメントを単離した。このフラグメントを、製造者のプロトコル ( stratagene ) にしたがって、ファージ - パッケージング抽出物を使用して、結合しパッケージして、プラスミド pWE / A d . A f l I I - r I T R E 2 A を得た。

【 0 0 7 7 】

このコスミドクローンは、P a c I 消化 DNA および消化アダプタープラスミドの、機能的 E 2 A 遺伝子生成物を発現するパッケージング細胞に対するコトランスフェクションにより、E 2 A について欠失されるアデノウイルスベクターを生成するのに使用できる。

【 0 0 7 8 】

アダプタープラスミドの構築

パッケージング細胞ラインにおける組み換えアデノウイルスおよび E 1 配列間の配列重複

10

20

30

40

50

がないことは、安全な、新規な組み換え体のRCAのない生成および増殖について重要である。アダプタープラスミドpMLPI.TK(PCT/NL96/00244に記載)は、前記発明の改良パッケージング細胞ラインと共に前記発明に従う使用のために設計されたアダプタープラスミドの例である。このプラスミドを出発物質として使用して、特異的なプロモーターを含む核酸分子および遺伝子配列を容易に交換できる新規なベクターを作った。

#### 【0079】

先ず、PCRフラグメントを以下のプライマーを使用してpZip Mo+PyF101(N<sup>-</sup>)テンプレートDNA(PCT/NL96/00195に記載)から生成した：L  
TR-1:5 -CTG TAC GTA CCA GTG CAC TGG CCT 10  
AGG CAT GGA AAA ATA CAT AAC TG-3 およびLTR-  
2:5 -GCG GAT CCT TCG AAC CAT GGT AAG CTT  
GGT ACC GCT AGC GTT AAC CGG GCG ACT CAG  
TCA ATC G-3 PwoDNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)を以下の  
温度サイクルで製造者プロトコルに従って使用した：95 にて5' ; 55 にて3'  
; 72 にて1' を1回、および95 にて1'、60 にて1'、72 にて1' を3  
0サイクル、72 にて10' を1回。その後、PCR生成物をBamHIで消化し、P  
vuIIおよびBamHIで消化したpMLP10(Levreraら、1991)ベクターに結合  
した。このベクターはbp1からbp454までのアデノウイルス配列、およびそれに続  
く突然変異体ポリオーマウイルス(PyF101)からエンハンサーにより置換された野  
生型エンハンサー配列を有するMo-MuLV LTRの一部からなるプロモーターを含  
む。このプロモーターフラグメントを設計した、L420。次に、マウスHSA遺伝子の  
コード領域を挿入した。pLTR10をBstBIを用いて設計し、クレノウ処理し、N  
coIで消化した。HSA遺伝子を以下のプライマーを使用してpUC18-HSA(Ka  
yら、1990年)でPCR増幅により得た：HSA1、5'-GCG CCA CCA  
TGG GCA GAG CGA TGG TGG C-3 およびHSA2、5'-  
GTT AGA TCT AAG CTT GTC GAC ATC GAT CTA  
CTA ACA GTA GAG ATG TAG AA-3。269bp増幅フラグ  
メントを、NcoIおよびBglII部位を使用してシャトルベクターにおいてサブク  
ローン化した。TAG停止コドンの直後のエキストラTAG挿入を有するが、HSA遺  
伝子の正しいコード配列の確実な取り込みの配列化。その後、TAG重複を含むHSA遺  
伝子のコード領域を、NcoI(スティッキー)-SalI(平滑)フラグメントとして除去  
し、pLTR10からの3.5kbNcoI(スティッキー)/BstBI(平滑)フラ  
グメントにクローン化し、pLTR-HSA10を得た。

#### 【0080】

最後に、pLTR-HSA10をEcoRIおよびBamHIで消化し、その後、左のI  
TR、パッケージングシグナル、L420プロモーターおよびHSA遺伝子含有フラグ  
メントを、同じ酵素で消化したベクターpMLPI.TKに挿入し、これにより、プロモ  
ーターと遺伝子配列を置換した。これにより、プロモーターおよび遺伝子配列付近の種々の  
制限酵素に対する便利な認識部位を含む新規なアダプタープラスミドpAd/L420-  
HSAを得た。SnaBIおよびAvrIIは、プロモーター配列を交換するために、H  
paI, NheI, KpnI, HindIIIと組み合わせることができる。しかし、後  
者の部位は、この構成において遺伝子を置換するために、HSAコード領域からClaI  
またはBamHI部位3'と組み合わせることができる。

#### 【0081】

核酸分子を容易に交換可能にするように設計された別のアダプタープラスミドを、pAd  
/L420-HSAにおけるプロモーター、遺伝子、ポリA配列とCMVプロモーター、  
多重クローニング部位、イントロン、ポリAシグナルを置換することにより作  
った。この目的のために、pAd/L420-HSAをAvrIIおよびBglIIで消化し、クレ  
ノウで処理し、平滑末端を得た。pBr322ベクターおよびアデノウイルス配列を有す  
50

る5.1 kbフラグメントを単離して、HhaIおよびAvrIIで消化しT4 DNAポリメラーゼで処理することにより得たp cDNA / amp (Invitrogen)からの平滑1570 bpフラグメントに結合した。このアダプタープラスミドをpAd5 / CLIPと呼んだ。pAd5 / Clipにおける左のITRからベクター配列の除去を可能にするために、このプラスミドを部分的にEcoRIで消化し、リニアフラグメントを単離した。配列5' TTAAGTCGAC - 3'のオリゴをそれ自体アニールし、SalI部位およびEcoRIオーバーハングを有するリンカーを得た。このリンカーを部分的に消化したpAd5 / Clipベクターに結合し、pAd5 / Clipにおける左のアデノウイルスITRの23 bp上流のEcoRI部位に挿入されたリンカーを有するクローンを選択し、pAd5 / Clipsalを得た。同様に、pAd5 / ClipにおけるEcoRI部位を配列5' - AATTGCTTAAATTAACCGCAATT - 3'のリンカーの挿入によりPacI部位に変えた。pAd5 / Clipベクターを部分的にEcoRIで消化し、脱リン酸化し、EcoRIオーバーハングを有するPacIリンカーに結合した。結合混合物をPacIで消化し、コンカテマーを除去し、アガロースゲルから単離し、再結合した。得られたベクターをpAd5 / Clippacと呼んだ。これらの変化により、プラスミドベクター配列から左のITRを遊離する融通性がより高くできる。

10

## 【0082】

また、ベクターpAd5 / L420 - HSAを改変し、左のITRの上流にSalIまたはPacI部位を作った。これについて、pAd5 / L420 - HSAをEcoRIで消化し、上記のPacIリンカーに結合した。この結合混合物をPacIで消化し、アガロースゲルからリニアDNAの単離後、再結合し、コンカテマー化リンカーを除去した。これにより、アダプタープラスミドpAd5 / L420 - HSApacを得た。この構成を使用して、pAd5 / L420 - HSAsalを以下のように、生成した：pAd5 / L420 - HSApacをScaIおよびBsrGIで消化し、ベクターフラグメントを、同じ酵素でpAd5 / Clipsalを消化した後単離した0.3 kbフラグメントに結合した。

20

## 【0083】

アダプタープラスミドpAdMireおよびpAdAptの生成

ポリリンカー配列のみ含み、プロモーターまたはポリA配列を含まないアダプタープラスミドを作るために、pAd5 / L420 - HSApacをAvrIIおよびBglIIで消化した。ベクターフラグメントを同じ制限酵素で消化したインカーオリゴヌクレオチドに結合した。リンカーを以下の配列のオリゴをアニールすることにより作った：

30

PLL - 1 : 5' - GCC ATC CCT AGG AAG CTT GGT ACC  
GGT GAA TTC GCT AGC GTT AAC GGA TCC TCT  
AGA CGA GAT CTG G - 3'

および

PLL - 2 : 5' - CCA GAT CTC GTC TAG AGG ATC CGT  
TAA CGC TAG CGA ATT CAC CGG TAC CAA GCT  
TCC TAG GGA TGG C - 3'

このアニールしたリンカーをAvrIIおよびBglIIで消化し、カラム精製 (Qiaquickヌクレオチド除去キット) により小さい末端から製造者推薦にしたがって分離した。

40

その後、リンカーをAvrIIおよびBglIIで消化したpAd5 / L420 - HSApacフラグメントに結合した。組み込まれたリンカーを有し、挿入の完全性をチェックするために配列されたAdMireと呼ぶクローンを選択した。アダプタープラスミドpAdMireは完全な発現カセットの容易な挿入を可能にする。

## 【0084】

ヒト細胞中で高い発現レベルを仲介するヒトCMVプロモーターを含むアダプタープラスミドを以下のように構築した：pAd5 / L420 - HSApacをAvrIIで消化し、5'突出末端をクレノウ酵素を使用して満たした。HindIIIでの第2の消化により、L420プロモーター配列を除去した。ベクターフラグメントを単離してCMVプロ

50

モーター配列を含むPCRフラグメントに結合した。このPCRフラグメントを、以下のプライマーでpCMVlacI (Stratagene)からのCMV配列の増幅後に得た：

CMV plus : 5' - GATCGGTACCA CTGCAGTGGTCAATATTG  
GCCATTAGCC - 3'

および

CMV minA : 5' - GATCA AAGCTTCCAAATGCACCGTTCCCGGC  
- 3'

PCRフラグメントを先ずPST1 (CMV plusにおいて下線を付す)で消化し、その後、3' - 突出末端をT4DNAポリメラーゼで処理することにより除去した。その後、DNAをHindIII (CMV minAにおいて下線を付す)で消化し、上記のAvrIIおよびHindIIIで消化したpAd5/L420-HSApacベクターフラグメントに結合した。得られたプラスミドをpAd5/CMV-HSApacと呼んだ。その後、このプラスミドをHindIIIおよびBamHIで消化し、ベクターフラグメントを単離し、HindIIIおよびBglIIでAdMirerを消化した後に得られたポリリンカー配列に結合する。得られたプラスミドをpAdAptと呼んだ。アダプタープラスミドpAdAptはヒトCMVプロモーター (Boshartら、1985年)のヌクレオチド - 735から+95を含む。

#### 【0085】

左のITRの上流のPacI部位の代わりにSalI部位を含むこのアダプタープラスミドの第2のバージョンを、pAd5/Clipsalからの0.7kbScal-BsrGIフラグメントをScalで消化しかつBsrGIで部分的に消化したpAdAptに挿入することにより作った。このクローンをpAdAptと呼んだ。

#### 【0086】

Ad5に基づく組み換え体アデノウイルスの生成

RCAのない組み換え体アデノウイルスを非常に効率的に上記アダプタープラスミドおよびpWE/Ad.AflII-rITRまたはpWE/Ad.AflII-rITRsp構造を使用して生成できる。一般に、所望の発現カセットにおける所望のトランスジーンを含むアダプタープラスミドは適当な酵素で消化され、3'および/または5'末端のベクター配列から挿入断片を遊離する。アデノウイルス相補性プラスミドpWE/Ad.AflII-rITRまたはpWE/Ad.AflII-rITRspはPacIで消化され、アデノ配列をベクタープラスミドから遊離する。非制限的な例として、AdApt-LacZの生成を説明する。E.coli LacZ遺伝子をプラスミドpMLP.nlsLacZ (EP95-202213)からプライマー5' - GGGGTGGCCAGGGTACCTCTAGGCTTTTGCAA - 3' および5' - GGGGGGATCCATAAACAAGTTCAGAATCC - 3' を用いてPCRより増幅した。PCR反応を以下の増幅プログラムにて供給者プロトコルに従ってExtag (Takara)を用いて行った：5分94、1サイクル；45秒94 および30サイクル60 および2分72、5サイクル；45秒94 および30秒65 および2分72、25サイクル；10分72；45秒94 および30秒60 および2分72、5サイクル、1サイクル。次に、PCR生成物をKpnIおよびBamHIで消化し、消化されたDNAフラグメントをKpnI/BamHI消化pcDNA3 (Invitrogen)に結合し、pcDNA3.nlsLacZを増加させた。その後、構成pcDNA3.nlsLacZをKpnIおよびBamHIで消化し、3kb LacZフラグメントをジーンクリーンスピンキット (Bio101社)を使用してゲルから単離した。

#### 【0087】

また、pAdAptをKpnIおよびBamHIで消化し、リニアベクターフラグメントを上記のようなゲルから単離した。両単離フラグメントを結合し、LacZ挿入断片含有の1方のクローンを選択した。構成pAdApt-LacZをSalIで消化し、ジーンクリーンスピンキットで精製し、続いて、PacIで消化した。pWE/Ad.AflII-rITRspをPacIで消化した。両消化混合物を65℃だけで30'間処理し、

10

20

30

40

50

酵素を不活性化した。試料をゲル上におき、その濃度を見積もった。2.5 × 10<sup>6</sup> PER.C6細胞( E C A C C 寄託番号 9 6 0 2 2 9 4 0 )を10% FCSおよび10 mM MgClのDMEMのT25フラスコにまいた。次の日、各プラスミドの4マイクログラムをPER.C6細胞( E C A C C 寄託番号 9 6 0 2 2 9 4 0 )に、リポフェクトアミントランスフェクションリエイジェンス(Life Technoloies Inc.)を使用して、製造者の指示にしたがってトランスフェクトした。次の日、培地を新たな培養培地で置換し、さらに細胞を37、10%CO<sub>2</sub>で培養した。再び、24時間後の細胞をトリプシンで処理し、T80フラスコにまき、37、10%CO<sub>2</sub>で培養した。T80フラスコにまいた後6日で十分なCPEを得た。細胞を培地中でハーベストし、1回冷凍/解凍サイクルに付した。粗ライゼート取得本方法を使用してウイルス混合物のブランク精製を行った。100のブランクを拾い、24ウェルプレートに拡げ、A549細胞感染の後LacZ発現について試験した。全て10ブランクからのウイルスがLacZを発現した。

10

## 【0088】

## 参考例3

キメラ組み換え体アデノウイルスの生成ヒト血清中で抗体を中和するヘキソンキメラAd5基アデノウイルスの生成は主にヘキソン蛋白質を指向し、ペントン蛋白質にあまり拡張しない。異なる血清型からのヘキソン蛋白質は、ウイルスの外側でさらされるべきことを予定されるループ中に存在する高可変領域を示す(Athappillyら、1994、J. Mol. Biol. 242, 430-455)。殆どの型の特異的なエピトープはこれらの高可変領域にマップされている(Toogoodら、1989; J. Gen Virol. 70, 3203-3214)。こうして、異なる血清型からの相当する配列と(一部の)ヘキソン配列との置換は、Ad5に対する抗体の(先在)中和を回避する効果的な方法である。アデノウイルス血清型5のヘキソンコード配列はヌクレオチド18841と21697間に位置する。

20

## 【0089】

アデノウイルス血清型5バックボーンへの二者択一のアデノウイルスからのヘキソンコード配列の容易な交換を促進するために、先ずシャトルベクターを生成した。このサブクローン、コード化pBr/Ad.Eco-PmeIを、先ずプラスミドpBr322をEcoRIおよびEcoRVで消化することにより、かつpWE/Ad.AflII-Ecoからの14kbPmeI-EcoRIフラグメントを挿入することにより生成した。このシャトルベクターでは、1430bp SandIフラグメントの除去は、SandIでの消化によりなされ、再結合してpBr/Ad.Eco-PmeI SandIを得た。除去されたフラグメントはユニークSpeIおよびMunI部位を含む。pBr/Ad.Eco-PmeI SandIからアデノウイルス血清型5DNAエンコードヘキソンを除去した。ヘキソンフランキング配列をPCR増幅し、一緒に結合し、これにより、ユニーク制限部位を生成し、ヘキソンコード領域を置換した。これらのPCR反応について、4つの異なるオリゴヌクレオチドが必要である: hex1 - hex4。

30

hex1: 5' - CCT GGT GCT GCC AAC AGC - 3'

hex2: 5' - CC(G GAT CC) A CTA GTG GAA AGC GG CGC GCG - 3'

hex3: 5' - CC(G GAT CC) A ATT GAG AAG CAA GCA ACA TCA ACA AC - 3'

40

hex4: 5' - GAG AAG GGC ATG GAG GCT - 3'

## 【0090】

オリゴヌクレオチド hex1および hex2を使用して得られた±1100bpの増幅DNA生成物をBamHIおよびFseIで消化した。オリゴヌクレオチド hex3および hex4を使用して得られた±1600bpの増幅DNA生成物をBamHIおよびSbfIで消化した。次に、これらの消化PCRフラグメントをアガロースゲルから精製し、トリ-パートリゲイション反応を、FsaIおよびSbfIで消化したpBr/Ad.Eco-PmeI SandIに結合したT4リガーゼ酵素を使用して行った。得られた構造はコード化pBr/Ad.Eco-PmeI Hexonであった。この構成

50

は部分的に配列され、正しいヌクレオチド配列およびユニーク制限部位MunIおよびSpeIの存在を確認した。

【0091】

pBr / Ad . Eco - Pme I Hex onは、それぞれヘキソン配列の5'および3'末端におけるユニーク制限部位MunIおよびSpeIを導入するプライマーを使用して、異なる血清型からのウイルスDNAから増幅された異種ヘキソン配列を導入するシャトルベクターとして役立つ。健康な個人が全くないかまたは非常に低い力価のNABを有する血清型からのヘキソン配列を含むAd5基ベクターを生成するために、Ad35、Ad34、Ad26、およびAd48のヘキソン配列を以下のプライマーを使用して増幅した：

Hex - up 2 : 5 - G A C T A G T C A A G A T G G C Y A C C C C H T C G A T G  
A T G - 3 および

Hex - do 2 : 5 - G C T G G C C A A T T G T T A T G T K G T K G C G T T R C  
C G G C - 3

【0092】

これらのプライマーを、公開されたヘキソンコード領域（例えば、Ad2、Ad3、Ad4、Ad5、Ad7、Ad16、Ad40、Ad41のヘキソン配列は、Genbankにより得ることができる）の配列を使用して消化した。生成したヌクレオチドを、血清型間の変化を示す位置にて結合した。

【0093】

PCR生成物をSpeIおよびMunIで消化し、同じ酵素で消化したpBr / Ad . Eco - Pme I Hex on構成にクローン化した。

次に、ヘキソン改変配列を、pWE / Ad . A f l I I - r I T R H e x X X（ここで、XXはヘキソン配列を増幅するのに使用した血清型を表す）を生成するAscIフラグメントの交換により、構成pWE / Ad . A f l I I - r I T Rに導入した。

その後、pWE / Ad . A f l I I - r I T R H e x X X構成を使用して、Ad5組み換え体ウイルスについての上記と同じ方法でウイルスを作った。

【0094】

ペントンキメラAd5基組み換え体ウイルスの生成

アデノウイルス型5ペントン遺伝子は、配列14156および15869間に位置する。ペントンベースは、目標細胞へのウイルスのインターナリゼーションを媒介するアデノウイルスキャプシド蛋白質である。少なくとも幾つかの血清型（C型およびB型）は、ペントン中のRGD配列と細胞表面上のインテグリンとの相互作用によりこのことを達成することが示された。しかし、F型アデノウイルスはRGD配列を持たず、AおよびDグループの殆どのウイルスに対してペントン配列は未知である。このため、ペントンは目標細胞特異性に含まれ得る。さらに、キャプシド蛋白質として、ペントン蛋白質はアデノウイルスの免疫原性に含まれる（Gahery-Segardら、1998）。このため、Ad5ペントン配列と無か低い力価のNABある血清型からのペントン配列と置換およびヘキソン配列の置換は、ヘキソン単独の置換よりも効果的にアデノウイルスベクターのクリアランスを防止する。ペントン配列の置換は感染特異性に影響する。

【0095】

Ad5中に異種のペントン配列を導入可能にするために、我々は上記のプラスミド基システムを使用した。まず、ペントン配列に対するシャトルベクターを、構成pWE / Ad . A f l I I - E c o R Iからの7.2kb NheI - EcoRVフラグメントを同じ酵素で消化したpBr322に挿入することにより作った。得られたベクターをpBr / XNと呼ぶ。これより、プラスミドAd5ペントン配列を除去し、他の血清型からの新規なペントン配列を導入するのに使用されるユニーク制限部位により置換した。pBr / XNのペントンの左のフランキング配列は以下のプライマーを使用してPCR増幅された：

DP5 - F : 5 - C T G T T G C T G C T G C T A A T A G C - 3

および

10

20

30

40

50

DP5 - R : 5 - CGC GGA TCC (TGT ACA) ACT AAG G  
GG AAT ACA AG - 3

DP5 - Rは右フランキンク配列に結合するためのBamHI部位(下線)を有し、前者Ad5ペントン領域の5'末端におけるユニークBsrGI部位(括弧)を導入する。

【0096】

右フランキンク配列を、DP3 - F : 5 - CGC GGA TCC (CTT AAG)  
GCA AGC ATG TCC ATC CTT - 3

およびDP3 - 3R : 5 - AAA ACA CGT TTT ACG CGT CGA  
CCT TTC - 3 を使用して増幅した。

DP3 - Fは、左のフランキンク配列に結合するためのBamHI部位(下線)を有し、前者Ad5ペントン領域の3'末端におけるユニークAflII部位(括弧)を導入する。

【0097】

得られた2つのPCRフラグメントをBamHIで消化し、一緒に結合した。この結合混合物をAvrIIおよびBglIIで消化した。pBr/XNをAvrIIおよびBglIIで消化し、ベクターフラグメントを消化結合PCRフラグメントに結合した。得られたクローンをpBr/Ad.pentonと呼ぶ。Ad35、Ad34、Ad26、およびAd48からのペントンコード配列を、5'および3'末端がそれぞれBsrGIおよびAflII部位を含むように、PCR増幅した。これに対して、以下のプライマーを使用した：

Ad34およびAd35に対して：

P3 - for : 5 - GCT CGA TGT ACA ATG AGG AGA CG  
A GCC GTG CTA - 3

P3 - rev : 5 - GCT CGA CTT AAG TTA GAA AGT GC  
G GCT TGA AAG - 3

Ad26およびAd48に対して：

P17F : 5 - GCT CGA TGT ACA ATG AGG CGT GCG  
GTG GTG TCT TC - 3

P17R : 5 - GCT CGA CTT AAG TTA GAA GGT GCG  
ACT GGA AAG C - 3

【0098】

増幅PCR生成物をBfrIおよびBsrGIで消化し、同じ酵素で消化したpBr/Ad.pentonにクローン化した。pBr/Ad.penton中のこれら異種ペントン配列はpBr/Ad.pentonXX(XXは挿入されたペントン配列を増幅するのに使用する血清型に相当する血清型の数を表す)と呼ぶ構成を生成した。次に、新規なペントン配列を改変ヘキソンを有するpWE/Ad.AflII-rITRベクターに導入した。例えば、Ad35からのペントン配列を構成pWE/Ad.AflII-rITRHex35に普通のFseIフラグメントの交換により導入した。ペントンおよびヘキソン配列の他の組み合わせも作った。改変ペントンおよびヘキソン配列を有するウイルスをPER.C6細胞(ECACC寄託番号96022940)のアダプタープラスミドを用いたコトランスフェクションを使用して上記のようにして作った。さらに、ペントン配列をpWE/Ad.AflII-rITR構成に導入した。後者の構成は、改変ペントンのみを含み、これらの構成から生成したウイルスはペントン配列のアデノウイルスの中和への寄与および感染効率および特異性の可能な変化の解析を研究するのに使用した。

【0099】

繊維キメラAd5基ウイルスの生成

アデノウイルス感染を2つのキャプシド蛋白質繊維およびペントンにより媒介される。細胞に対するウイルスの結合は、突出繊維蛋白質と細胞表面上のリセプターとの相互作用により達成される。インターナリゼーションをペントン蛋白質と細胞表面上のインテグリン

10

20

30

40

50

との相互作用後に行う。CおよびBサブグループからの少なくとも幾つかのアデノウイルスは、細胞結合に対する異なるリセプターを使用することを示され、このため、異なる細胞型で異なる感染効率を有する。したがって、キャプシドの繊維を変えることによりアデノウイルスの感染スペクトルを変えることが可能である。アデノウイルス血清型5の繊維コード配列はヌクレオチド31042および32787間に位置する。アデノウイルス血清型5 DNAエンコード繊維を除去するため、我々は、構成pBr/Ad.Bam-rITRについて開始した。まず、NdeI部位をこの構成から除去した。この目的のため、pBr322プラスミドDNAをNdeIで消化し、その後、突出末端をクレノウ酵素を使用して満たした。このpBr322プラスミドを再結合し、NdeIで消化し、E.coli DH5 に形質転換した。得られたpBr/NdeIプラスミドをScaIおよびSalIで消化し、得られた3198bpベクターフラグメントをpBr/Ad.BamrITR由来の15349bp ScaI-SalIフラグメントに結合し、プラスミドpBr/Ad.Bam-rITR NdeIを得た。これは、ユニークNdeI部位を含む。次に、PCRをオリゴヌクレオチドNY-up:

5 - CGA (CAT ATG) TAG ATG CAT TAG TTT GTG TTA TGT TTC AAC GTG - 3

および

NY-down:

5 - GGA GAC CAC TGC CAT GTT - 3 で行った。

【0100】

増幅の間、NdeI (括弧) およびNsiI制限部位 (下線) の両方を導入して増幅繊維DNAのクローン化を促進した。増幅は、94 で各45秒25サイクル、60 で1分、および72 で45秒からなった。PCR反応は25pmolのオリゴヌクレオチドNY-upまたはNY-down、2mM dNTR, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>を含むPCR緩衝液、および1ユニットのエロンガーゼ (Elongase) 熱安定性ポリメラーゼ (Gibco、オランダ) を含んだ。1/10の生成物をアガロースゲルに適用し、±2200bpの予期したDNAフラグメントを増幅したことを示した。次に、このPCRフラグメントをジーンクリーンキットシステム (Bio101 Inc.) を使用して精製した。その後、構成pBr/Ad.Bam-rITR NdeIおよびPCR生成物の両方を制限酵素NdeIおよびSbfIで消化した。次にPCRフラグメントをT4リガーゼ酵素を使用してNdeIおよびSbfIで消化したpBr/Ad.Bam-rITR NdeIにクローン化し、pBr/Ad.BamR Fibを得た。

【0101】

このプラスミドにより、除去された繊維配列の代わりに挿入されたユニークNdeIおよびNsiI部位を介してPCR増幅繊維配列の挿入が可能になる。ウイルスは、特許PCT/NL96/00244に記載されたパッケージング細胞において、アダプタープラスミド、PacIおよびEcoRIで消化した構成pBr/Ad.AflII-EcoRI、および異種繊維配列が挿入されたpBr/Ad.BamR Fib構成を使用して、2つの同種の組み換え体により生成できる。ウイルス生成効率を上げるために、構成pBr/Ad.BamR Fibを改変して右ITRをフラッキングするPacI部位を生成した。pBr/Ad.BamR FibをAvrIIで消化し、5kbアデノフラグメントを単離し、相当するAvrIIフラグメントを置換して上記ベクターpBr/Ad.Bam-rITR.pac#8に導入した。得られた構成をpBr/Ad.BamR Fib.pacと呼ぶ。

【0102】

一旦、異種繊維に配列をpBr/Ad.BamR Fib.pacに導入し、繊維改変右側アデノウイルスクローンをpBr/Ad.AflII-rITRに対して上記した大きいコスミドクローンに導入する。このような大きいコスミドクローンにより、たった1つの同種の組み換え体によりアデノウイルスの生成が可能になる。改変繊維を有するAd5基ウイルスを作り、説明した (No. 98204482.8 および 99200624.7

10

20

30

40

50

)。さらに、本発明からの血清型からのヘキソンおよびペントン配列を、所望の繊維配列と組み合わせ、効率的に選択して目標細胞を感染するウイルスを生成する。例えば、平滑な筋肉細胞、内皮細胞または滑膜細胞等ヒト起源の細胞は、Bサブグループウイルス、特にアデノウイルス16型からの繊維を有するAd5基ウイルスで非常によく感染される。

#### 【0103】

特異的な配列がプラスミドのAd5バックボーンから除去でき、他の血清型からの相当する配列により置換されうる上記の例は、システムの融通性を示す。上記方法により、異なる血清型からのキャプシド遺伝子のいかなる組み合わせをも作ることができることは明らかである。したがって、中和に対して感受性の低いウイルスを作る所望のヘキソンおよびペントンを有し、特異的な目標組織に効率的に感染できる所望の繊維配列を有するキメラ組み換え体Ad5基アデノウイルスを設計する。

#### 【0104】

##### 実施例4

Ad35組み換え体ウイルスを生成するプラスミド基システムの構築

Ad35の部分的な制限マップは、以前に公表された(Valderrama-Leonら、1985; Kangら、1989; Liら、1991)。Ad35に基づく組み換え体アデノウイルスを生成する機能的なプラスミド基システムの例は、以下の要素からなる:

1. 左のITRおよびAd35由来パッケージング配列および異種発現カセットの挿入断片に対する少なくとも1つの制限部位からなりE1配列がないアダプタープラスミド。さらに、このアダプタープラスミドは、pIXプロモーターを含む領域をコードし、第2のヌクレオチドを有するアダプタープラスミドの同種組み換え体を媒介するのに十分な配列をコードするE1BからのAd35配列3'を含む。
2. アダプタープラスミドに同種の配列、複製、およびパッケージング細胞中には存在せず速い、中間の、遅い遺伝子である、組み換え体ウイルスのパッケージングに必要なAd35配列を含む第2のヌクレオチド。
3. Ad35のE1機能を補うことができる少なくとも機能的E1蛋白質を提供するパッケージング細胞。

#### 【0105】

Ad35 DNAを精製ウイルスバッチから以下のように単離した。100  $\mu$ lのウイルスストック(Ad35:  $3.26 \times 10^{12}$  VP/ml)に10  $\mu$ lの10x DNAアーゼ緩衝液(130 mM トリス-HCl, pH 7.5; 1, 2 M CaCl<sub>2</sub>; 50 mM MgCl<sub>2</sub>)を添加した。10  $\mu$ lの10 mg/mlのDNAアーゼI (Roche Diagnostics)の添加後、この混合物を1時間、37°Cでインキュベートした。2.5  $\mu$ lの0.5 M EDTAの添加の後、3.2  $\mu$ lの20% SDSおよび1.5  $\mu$ lのプロテイナーゼK (Roche Diagnostics; 20mg/ml) 試料を50°Cで1時間インキュベートした。次に、ウイルスDNAをジーンクリーンスピキット(Bio101 Inc.)を使用して、製造者の指示にしたがって単離した。DNAをスピンカラムから25  $\mu$ lの無菌MilliQ水で溶離した。

#### 【0106】

以下のDNAフラグメントのサイズにおいて、フラグメントナンバリングはKangら(1989)に従った。Ad35 DNAをEcoRIで消化し、3つのフラグメント(約22.3 (A)、7.3 (B)、6 kb (C))をゲルからジーンクリーンキット(Bio101 Inc.)を使用して単離した。pBr322をEcoRIで、またはEcoRIおよびEcoRVで消化し、消化したフラグメントをゲルから単離し、TsaP酵素(Gibco BRL)を使用して脱リン酸化した。次に、6 kb Ad35 CフラグメントをpBr322 x EcoRIフラグメントに結合し、ITR含有Ad35フラグメント(EcoRI-B)をpBr322 x EcoRI/EcoRVフラグメントに結合した。連結反応を16°Cで一晩インキュベートし、DH5  $\alpha$ 能力バクテリア(Life Techn.)に形質転換した。得られたクローンのミニプレブ(minipreps)をAd35フラグメントの正

しい挿入断片について制限分析により解析した。6 kbおよび7.3 kbのAd35フラグメントの両方がpBr322に正しく挿入されたことがわかった。6 kbフラグメントをpBr/Ad35-Eco6.0<sup>+</sup> およびpBr/Ad35-Eco6.0<sup>-</sup>の両配向において単離した。これにより、+はpBr322に対して5'から3'の配向を表す。pBr/Ad35-Eco7.3と呼ぶ7.3 kbのAd35 B挿入断片を有するクローンを部分的に配列化し、3' ITRの正しい結合をチェックした。ITRは低ストランド中配列5'-CATCATCAAT...-3'を有する。その後、pBr/Ad35-Eco7.3を5'末端に6 kb Ad35フラグメントの挿入断片により拡張した。pBr/Ad35-Eco7.3をEcoRIで消化し、脱リン酸化した。フラグメントをゲルから単離し、6 kb Ad35 EcoRIフラグメントに結合した。形質転換後、クローンを挿入断片の正しい配向について試験し、1つのクローンを選択し、pBr/Ad35-Eco13.3と呼んだ。

10

## 【0107】

その後、このクローンを、SalIでwt Ad35の消化の後に得られた~5.4 kb SalI-Dフラグメントを用いて拡張する。pBr322バックボーンのsalI部位を、SalIを用いたpBr/Ad35-Eco13.3の部分的な消化により除去し、クレノウ処理および再結合によりスティッキー末端を満たす。アデノウイルス挿入断片のシグナルSalI部位を含む1つのクローンを選択する。その後、pBr-sal/Ad35-Eco13.3と呼ぶこのクローンをpBr322バックボーンに存在するAatIIでリニア化し、AatII相補末端でSakIリンカーに結合する。その後、DNAを過剰のSakIで消化し、このリニアフラグメントを単離し、Ad35からの5.4 kb SalI-Dフラグメントに結合する。pBr/Ad35-Eco13.3に正しい配向に挿入されたSalIフラグメントを含む1つのクローンを選択する。得られたクローン、pBr/Ad35-Sal2-rITRは、右ITRを含む3'~17 kbのAd35を含む。ウイルス精製の際にベクター配列から右ITRの遊離を可能にするために、右ITRをフランキングNotI部位をPCRにより導入する。

20

## 【0108】

また、22.3 kbのAd35-EcoRI-AフラグメントをpBr322xEcoRI/EcoRVでクローン化した。5'末端の約7 kbが明らかに除去されたpBr/Ad35-EcoA3'と呼ぶ1つのクローンを選択した。それは、Ad35 wt DNAの9.4 kbおよび配列上流の約1.5 kbにおいてSalI部位を含む。pBr322バックボーンのユニークNdeI部位およびこのSalI部位を使用して、このクローンを、NotI制限部位をリンカーの挿入断片によりAd35の5'末端において作る方法で、Ad35の第1SalIからの約5 kbのAd35フラグメント5'の挿入断片により5'末端に拡張する。pBr/Ad35-pIX-EcoAと呼ぶこのクローンは左の末端配列(ITR, パッケージング配列およびE1)を含まず、3'末端にてクローンpBr/Ad35-Sal2-rITRを伴う約3.5 kbのオーバーラップを有する。

30

## 【0109】

アダプタープラスミドを作るために、Ad35をSalIで消化し、~9.4 kbの左の末端Bフラグメントを単離した。pBr322をEcoRVおよびSalIで消化し、ゲルから単離し、TsaP酵素で脱リン酸化した。両フラグメントを結合し、正しい挿入断片を有するクローンおよび左ITRの正しい配列を選択する。ウイルス生成の際にベクター配列からの左のITRの遊離を可能にするために、左のITRをフランキングするNotI部位をPCRにより導入する。このクローンから、E1配列を除去しPCRを使用してポリリンカーにより置換する。ポリリンカー配列を使用して発現カセットを選択遺伝子に対して導入する。

40

## 【0110】

組み換え体Ad35クローンを、図3に示すように、アダプタープラスミド、pBr/Ad35-pIX-EcoAおよびpBr/Ad35-Sal2-rITRを用いたPER.C6細胞のトランスフェクションにより生成する。同種の組み換えにより組み換え体ウ

50

イルスが増加する。

【 0 1 1 1 】

実施例 5

A d 3 5 に対する中和活性 ( N A ) の優勢が異なる地理的位置からのヒト血清において低い。

実施例 1 において、我々は、ベルギーの一位置からヒト血清の中和活性 ( N A ) の分析を説明した。試験した 4 4 アデノウイルス血清型のパネルのうち、一血清型 A d 3 5 はアッセイした 1 0 0 の血清のいずれかにおいて中和されなかった。さらに、幾つかの血清型 A d 2 6、A d 3 4、A d 4 8 が試験された血清のうち 8 % 以下において中和されることがわかった。この分析は、さらに以前には試験されていないアデノウイルスの他の血清型に  
10

【 0 1 1 2 】

アデノウイルスを増殖し、精製し、実施例 1 で説明したように C P E インヒビションアッセイにおいて中和について試験した。実施例 1 と同じバッチからの血清を使用して、アデノウイルス血清型 7 B、1 1、1 4、1 8、4 4 / 1 8 7 6 を中和に対して試験した。これらのウイルスは、それぞれ 5 9、1 3、3 0、9 8 および 5 4 % の血清で中和されることがわかった。こうして、このシリーズのうち、A d 1 1 は比較的低い頻度で中和される  
。

【 0 1 1 3 】

ヒト組織からのアデノウイルス血清型単離の頻度およびアデノウイルス血清型に対する N A の優勢は、異なる地理的位置で異なり得ることがわかるので、我々は、さらに、異なる場所からの血清に対するアデノウイルス血清型の選択を試験した。ヒト血清をヨーロッパの 2 つの付加的な場所 ( 英国のブリストル、およびオランダのライデン ) およびアメリカ合衆国の 2 つの場所 ( カリフォルニアのスタンフォードおよびニューヨークのグレートネック ) から得た。第 1 スクリーンの 2 0 % 以下の血清で中和されることがわかったアデノウイルスおよび A d 2、A d 5、A d 2 7、A d 3 0、A d 3 8、A d 4 3 を、英国からの血清における中和について試験した。これらの実験の結果を図 4 に示す。  
20

【 0 1 1 4 】

アデノウイルス血清型 2 および 5 を再び高い百分率のヒト血清で中和した。さらに、第 1 スクリーンの低い百分率の血清で中和した血清型の幾つかを高い百分率の英国からの血清で中和する ( 例示 : A d 2 6 ( 7 % 対 3 0 % )、A d 2 8 ( 1 3 % 対 5 0 % )、A d 3 4 ( 5 % 対 2 7 % )、A d 4 8 ( 8 % 対 3 2 % ) )。第 1 スクリーンの比較的低い百分率の血清で見出された A d 1 1 および A d 4 9 に対する中和活性は、この第 2 スクリーンの低い百分率の血清で見出される ( それぞれ 1 3 % 対 5 %、および 2 0 % 対 1 1 % )。第 1 スクリーンの血清のいずれかで中和された血清型 A d 3 5 は、英国からの低い百分率 ( 8 % ) の血清で中和されることがわかる。英国からのヒト血清の N A の優勢は、血清型 A d 1 1 および A d 3 5 に対して最も低い。  
30

【 0 1 1 5 】

さらなる分析に対して、血清をアメリカ合衆国の 2 つの場所 ( カリフォルニアのスタンフォードおよびニューヨークのグレートネック ) およびオランダ ( ライデン ) から得た。図 5 はこれらの血清について得られたデータおよび以前のデータの概観を表す。全てではないウイルスを A d 5、A d 1 1、A d 3 5 を除く全ての血清において試験した。ヒト血清の総合的なスクリーンからの全体的な結論は、A d 3 5 に対する中和活性の優勢が、西部の国々において最も低い全血清型であるということである : 平均 7 % のヒト血清が中和活性を含む ( 5 つ異なる場所 )。  
40

【 0 1 1 6 】

また、別の B グループアデノウイルス、A d 1 1 を、低い百分率のヒト血清で中和する ( 5 つの異なる位置からの血清で平均 1 1 % )。アデノウイルス型 5 を 5 つの異なる位置から得た 5 6 % のヒト血清で中和する。全ての血清を試験したわけではないが、D グループ  
50

血清型 49 をアメリカ合衆国の一位置からおよびヨーロッパからの試料において比較的低い頻度で中和する（平均 14 %）。

【 0 1 1 7 】

上記の中和実験で、最も高い血清濃度のウェルにおいて C P E の最大保護が血清なしでコントロールに対して 40 % であるとき、血清を非中和と判定する。保護を以下のようにして計算する：

$$\text{保護(\%)} = \frac{\text{対応ウェルのOD} - \text{ウイルスコントロールのOD}}{\text{非感染コントロールのOD} - \text{ウイルスコントロールのOD}} \times 100\%$$

【 0 1 1 8 】

実施例 1 で説明したように、血清を、4 × から 64 × までの希釈範囲で、5 つの異なる希釈中にプレートする。したがって、低い力価（すなわち、最も高い血清濃度のみにおける中和）と高い力価（すなわち、最も低い血清濃度のウェルでも中和）間を区別可能である。Ad5 に対する中和活性を含むことがわかった我々のスクリーンで使用されたヒト血清のうち、70 % が高い力価を有することがわかったが、Ad35 に対する NA を含む血清のうち、15 % のみが高い活性を有した。Ad11 に対する NA について陽性であった血清のうち、8 % のみが高い力価を有した。Ad49 に対してこれは 5 % であった。

【 0 1 1 9 】

したがって、Ad35、Ad11、Ad49 に対する NA の頻度が、Ad5 に対するようにずっと低いのみならず、これらのウイルスに対する NA を含む血清のうち、多くが低い力価を有する。Ad11、Ad35、または Ad49 に基づくアデノウイルスベクターは、感染効率が中和活性により妨げられる適用で、またはインピボで予防接種ベクターまたは遺伝子治療伝達体として使用される場合、Ad5 基ベクターに対して明らかな利点を有する。

【 0 1 2 0 】

以下の例で、安全で、RCA フリーな Ad35 基ベクターの生成に対するベクターシステムの構成を説明する。

【 0 1 2 1 】

実施例 6

ヒトアデノウイルス型 35 の配列

Ad35 ウイルスを PER . C6 細胞で増殖し、DNA を実施例 4 に記載したように単離した。全配列を Qiagen Sequence Service (Qiagen GmbH, Germany) により生成した。全ウイルス DNA を超音波処理で切断し、DNA 末端を T4 DNA ポリメラーゼで平滑化した。

【 0 1 2 2 】

切断平滑化フラグメントは、アガロースゲル上でサイズ分画され、1.8 から 2.2 kb の DNA フラグメントに対応するゲルスライスを得た。DNA を QIAquick ゲル抽出プロトコルによりゲルスライスから精製し、pUC19 プラスミドクローニングベクターのショットガンライブラリーにサブクローン化した。目標 DNA 8 (+/- 2) 倍をカバーする 96 ウェルプレートのクローンのアレイを使用して、全配列を生成した。配列化を、Perkin-Elmer 9700 thermo cyclers で、BigDye Terminator chemistry nd AmpliTag FS DNA ポリメラーゼを使用して行い、その後、QIAGEN DyeEx 96 technology を使用して配列化反応の精製を行った。その後、配列化反応生成物を ABI377XL96 lane sequencers でフラグメントの自動分離および検出に付した。イニシャル配列コンティグ (contig) 配列およびギャップを、目標 DNA 上のプライマーウォーキングリードにより、または PCR 生成物の直接配列化により満たした。ウイルス末端は、ショットガン中にないことがわかった。おそらくウイルス DNA のプロテイナーゼ K 消化後に ITR 配列に結合している pTP のアミノ酸から得られたクローニングが困難なためである。

【 0 1 2 3 】

付加的な配列は、これらの領域における配列の殆どを解決するウイルス DNA 上をランするが、殆どのターミナルヌクレオチドの明確な配列を得ることは困難であった。5' 末端

10

20

30

40

50

で得られた配列は、5' - C C A A T A A T A T A C C T . . - 3' であった。しかし、3' 末端で得られた配列は、5' - A G G T A T A T T A T T G A T G A T G G G - 3' であった。殆どのヒトアデノウイルスは、末端配列 5' - C A T C A T C A A T A A T A T A C C - 3' を有する。さらに、p B r 3 2 2 へのターミナル 7 k b A d 3 5 E c o R I フラグメントのクローニング後に得た A d 3 5 D N A の 3' 末端を表すクローン（参照：実施例 4）は、典型的な C A T C A T C A A T A A T . . . 配列を有することがわかった。しかし、A d 3 5 は典型的な末端配列を有し、ウイルス D N A 上に直接配列化の際に得た相違は、ラン - オフ配列ランに関連するアーチファクトおよび p T P の残りのアミノ酸の存在のためである。

#### 【 0 1 2 4 】

訂正したターミナル配列を有する A d 3 5 の全配列を、図 6 に示す。基礎になる A d 5 (genbank # M72360) および A d 7 (部分的配列 genbank # X03000) を有する配列ホモロジーおよびオープンリーディングフレームの位置に、ウイルスの体制は殆どのヒトアデノウイルス、特にサブグループ B ウイルスの一般的な体制に一致する。ゲノムの全長は 3 4 7 9 4 塩基対である。

#### 【 0 1 2 5 】

##### 実施例 7

組み換え体 A d 3 5 基ウイルスを生成するプラスミド基ベクターシステムの構成  
組み換え体アデノウイルスベクターを生成する機能的プラスミド基ベクターシステムは以下の成分からなる：

1 . 左の I T R および A d 3 5 由来パッケージング配列および異種発現カセットの挿入断片に対する少なくとも 1 つの制限部位からなり E 1 配列がないアダプタープラスミド。さらに、このアダプタープラスミドは、p I X プロモーターを含む領域をコードし、第 2 の核酸分子を有するアダプタープラスミドの同種組み換え体を媒介するのに十分な配列をコードする E 1 B からの A d 3 5 配列 3' を含む。

#### 【 0 1 2 6 】

2 . アダプタープラスミドに同種の配列、複製、およびパッケージング細胞中には存在せず速い、中間の、遅い遺伝子である、組み換え体ウイルスのパッケージングに必要な A d 3 5 配列を含む第 2 の核酸分子。

3 . A d 3 5 の E 1 機能を補うことができる少なくとも機能的 E 1 蛋白質を提供するパッケージング細胞。

#### 【 0 1 2 7 】

相補パッケージング細胞での組み換え体アデノウイルスの生成に対する他の方法は、当業界で知られており、発明から解離することなく A d 3 5 ウイルスに適用可能である。例として、先に概略を示したプラスミド基システムの構成を以下に詳述する。

#### 【 0 1 2 8 】

1 ) A d 3 5 アダプタープラスミドの構成

アダプタープラスミド p A d A p t (図 7、実施例 2 に記載) を、先ず改変して、拡張されたポリリンカーを含み、左の I T R をフランキングする便利なユニーク制限部位を有するアダプタープラスミドおよび 3' 末端におけるアデノウイルス配列を得て、プラスミドベクター配列からのアデノウイルス挿入断片の遊離を可能にした。これらのプラスミドの構成を以下に詳細に説明する：アダプタープラスミド p A d A p t (実施例 2) を S a l I で消化し、シュリンプアルカリフォスファターゼで処理し、再結合を減少させた。以下の 2 つのリン酸化およびアニール化オリゴからなるリンカー：E x S a l P a c F 5' - T C G A T G G C A A A C A G C T A T T A T G G G T A T T A T G G G T T C G A A T T A A T T A A - 3' および E x S a l P a c R 5' - T C G A T T A A T T A A T T C G A A C C C A T A A T A C C C A T A A T A G C T G T T T G C C A - 3' ; を、消化した構成に直接結合し、これにより、P i - P s p I , S w a I および P a c I により S a l I 制限部位を置換した。この構成を p A D A P T + E x S a l P a c リンカーと呼ぶ。さらに、p A d

10

20

30

40

50

A p tの左I T Rの一部を以下のプライマーを使用して、P C Rにより増幅した：P C L I P M S F 5 - C C C C A A T T G G T C G A C C A T C A T C A A T A A T A T A C C T T A T T T T G G : およびp C L I P B S R G I : 5 - G C G A A A A T T G T C A C T T C C T G T G - 3 。増幅したフラグメントをM u n IおよびB s r G Iで消化し、p A d 5 / C l i p (参照：実施例2)にクローン化し、E c o R Iで部分的に消化し、精製後、B s r G Iで消化した。これにより、左のI T Rおよびパッケージングシグナルを再挿入した。制限酵素分析の後、この構成をS c a IおよびS g r A Iで消化し、800bpフラグメントをゲルから単離し、S c a I / S g r A I消化p A D A P T + E x S a l P a c リンカーに結合した。p I P s p S a l A d a p tと呼ぶ得られた構成をS a l Iで消化し、脱リン酸化し、上記のリン酸化E x S a l P a c F / E x S a l P a c Rダブルストランドリンカーに結合した。P a c I部位がI T Rに最も近いクローンを、制限分析により同定し、配列を配列分析により確認した。p I P s p A d a p t (図8)と呼ぶこの新規なp A d A p t構成は、P a c I、P I - P s p IおよびB s t B Iに対する認識配列を含む2つのE x S a l P a c リンカーを有し、アデノウイルスアダプター構成のアデノウイルス部分を囲み、プラスミドDNAをリニア化するに使用でき、その後アデノウイルスヘルパーフラグメントを用いたコトランスフェクションが可能である。

#### 【0129】

トランスジーンクローニング順序をさらに増加するために、多くのポリリンカー変異型をp I P s p A d a p tに基づいて構成した。この目的のために、p I P s p A d a p tを先ずE c o R Iで消化し、脱リン酸化した。以下の2つのリン酸化およびアニール化オリゴからなるリンカー：E c o l i n k e r + : 5 - A A T T C G G C G C C G T C G A C G A T A T C G A T A G C G C C C G C - 3 およびE c o l i n k e r - : 5 - A A T T G C G G C C G C T A T C G A T A T C G T C G A C G G C G C G C C G - 3 ; を、この構成に結合し、これによりA s c I, S a l I, E c o R V, C l a IおよびN o t Iに対する制限部位を作った。このリンカーの両配向を得て、配列を制限分析および配列分析により確認した。オーダー5' H i n d I I I, K p n I, A g e I, E c o R I, A s c I, S a l I, E c o R V, C l a I, N o t I, N h e I, H p a I, B a m H IおよびX b a Iにおけるリンカーを含むプラスミドをp I P s p A d a p t 1 (図9)と呼び、オーダー5' H i n d I I I, K p n I, A g e I, N o t I, C l a I, E c o R I, S a l I, A s c I, E c o R I, N h e I, H p a I, B a m H IおよびX b a Iにおけるリンカーを含むプラスミドをp I P s p A d a p t 2と呼ぶ。

#### 【0130】

他のセンスまたはアンチセンス構成のクローニングを促進するために、以下の2つのオリゴヌクレオチドからなるリンカーを設計し、p I P s p A d a p tのポリリンカーを逆にした：H i n d X b a + 5 - A G C T C T A G A G G A T C C G T T A A C G C T A G C G A A T T C A C C G G T A C C A A G C T T A - 3 ; H i n d X b a - 5 - C T A G T A A G C T T G G T A C C G G T G A A T T C G C T A G C G T T A A C G G A T C C T C T A G - 3 。このリンカーをH i n d I I I / X b a I消化p I P s p A d a p tに結合し、正しい構成を単離した。

#### 【0131】

制限酵素分析および配列化により確認した。この新規な構成p I P s p A d a p t AをE c o R Iで消化し、上記エコリンカーをこの構成に結合した。このリンカーの両配向を得て、p I P s p A d a p t 3 (図10)を得た。これは、オーダーX b a I、B a m H I、H p a I、N h e I、E c o R I、A s c I、S a l I、E c o R V、C l a I、N o t I、A g e I、K p n I、およびH i n d I I Iポリリンカーを含む。全配列を制限酵素分析および配列化により確認した。

#### 【0132】

10

20

30

40

50

Ad35基アダプタープラスミドを以下のように構成した：

左のITRおよびAd35wt配列ヌクレオチド1～464(図6)に対応するパッケージ配列をPCRにより、以下のプライマーを使用してwtAd35DNAについてのPCRにより増幅した：

プライマー35F1：

5 - CGG AAT TCT TAA TTA ATC GAC ATC ATC A  
AT AAT ATA CCT TAT AG - 3

プライマー35R2：

5 - GGT GGT CCT AGG CTG ACA CCT ACG TAA A  
AA GAG - 3

増幅により、配列の5'末端のPacI部位および3'末端のAvrII部位を導入した。

#### 【0133】

増幅のために、白金PfxDNAポリメラーゼ酵素(LTI)を製造者の指示にしたがって使用したが、3%の最終濃度に0.6μMのプライマーおよびDMSOを添加した。増幅プログラムは以下のものである：つまり、30サイクルに対して94で2分(94で30秒、56で30秒、68で1分)、次に68で10分。

#### 【0134】

PCR生成物を、製造者の指示にしたがってpcr精製キット(LTI)を使用して精製し、PacIおよびAvrIIで消化した。その後、消化したフラグメントをジーンクリーンキット(Bio101)を使用してゲルから精製した。Ad5基アダプタープラスミドpIPspAdApt-3(図10)をAvrIIで消化し、その後、PacIで部分的に消化し、5762bpフラグメントをLMPアガロースゲルスライスで単離し、同じ酵素で消化した上記PCRフラグメントで結合し、電子受容能(electrocompetent)DH10B細胞(LTI)に形質転換した。得られたクローンをpIPspAdApt3-Ad351ITRと呼ぶ。

#### 【0135】

並行的に、Ad35DNAの第2のピースを以下のプライマーを使用して増幅した：

35F3：5 - TGG TGG AGA TCT GGT GAG TAT TGG  
GAA AAC - 3

35R4：5 - CGG AAT TCT TAA TTA AGG GAA ATG  
CAA ATC TGT GAG G - 3

このフラグメントの配列は、wtAd35(図6)のnuc1.3401から4669に対応し、E1B55kコード配列から直接3'から開始する1.3kbの配列を含む。増幅および精製を、左のITRおよびパッケージ配列含有フラグメントに対して上記のようにして行った。その後、PCRフラグメントをPacIで消化し、SamIおよびPacIで消化したpNEB193ベクター(New England Biokabs)にサブクローン化した。得られたクローンの配列の完全性を配列分析により確認した。

そしてpNEB/Ad35pF3R4をBglIIとPacIによって消化し、QIAExIIキット(Qiagen)を用いてAd35挿入物をゲルから単離した。pIPspAdApt3-Ad351ITRはBglIIにより、そしてPacIにより部分的に消化された。3624bpの断片(ベクター配列、ad35ITR及びパッケージ配列のみならずCMVプロモーター、複合的なクローニング領域及びポリAシグナルを含んでいる)もまた、QIAExIIキット(Qiagen)を用いて単離された。両断片はライゲートされて、コンピテントなDH10B細胞(LTI)の中へ形質転換された。得られたクローンであるpAdApt35IP3(図11)は、pIPspAdApt3に由来する発現カセットを有しているが、Ad35レフトITR及びパッケージ配列及びAd35に由来する塩基3401から4669に対応する第二の断片を含んでいる。複合的なクローニング部位を反対の方向性で有しているAd35アダプタープラスミドの第二のバージョンは、下記の様にして作られた。

10

20

30

40

50

## 【0136】

pIPspAdApt1 (図9) はNdeIとBglIIによって消化され、CMVプロモーターの一部分を含んでいる0.7kbpのバンド、MCSとSV40ポリAは単離され、pAdApt35IP3の対応する部位に挿入されて、pAdApt35IP1を生成する(図12)。

## 【0137】

そしてpAdApt35.LacZ及びpAdApt35.Lucアダプタープラスミドを、pcDNA.LacZ(KpnI及びBamHIにより消化された)とpAdApt35.Luc(HindIII及びBamHIにより消化された)に由来するトランス遺伝子を、pAdApt35IP1中の対応部位へ挿入することにより生成した。pcDNA.LacZ及びpAdApt35.Lucの生成は、WO99/55132に述べられている。

10

## 【0138】

2) pWE.Ad35.pXI-rITRコスミドの構築

図13は、Ad35配列の3401bpから34794(ライトITRの末端)を含んでいるコスミドクローンの構築を保証する種々の工程を表し、それを下記に詳しく述べる。

## 【0139】

第一のPCR断片(pIX-NdeI)を下記のプライマーセットを用いて生成した。

35F5: 5' - CGG AAT TCG CGG CCG CGG TGA  
GTA TTG GGA AAA C - 3'  
35R6: 5' - CGC CAG ATC GTC TAC AGA ACA  
G - 3'

20

## 【0140】

DNAポリメラーゼPwo(ロシュ)を、製造者の指示に従って使用したが、両プライマーの終濃度は0.6µMとし、50ナノグラムのwtAd35のDNAを鋳型として使用した。下記のようにして増幅を行った。即ち、94で2分、94で30秒、65で30秒、そして72で1分45秒を30サイクル、続いて68で8分である。TAクローニングベクターPCR2.1でのクローニングを可能とするために、1ユニットのsuperTaqポリメラーゼ(HT Biotechnology LTD)による最後のインキュベーションを、72で10分間行った。

30

## 【0141】

3370bpの増幅された断片は、5'末端に付加されたNotI部位を有する、3401から6772bpまでのAd35配列を含む。PCR精製キット(LT1)を用いて断片を精製した。

## 【0142】

第二のPCR断片(NdeI-rITR)を下記のプライマーを用いて作製した。

35F7: 5' - GAA TGC TGG CTT CAG TTG TAA  
TC - 3'  
35R8: 5' - CGG AAT TCG CGG CCG CAT TTA  
AAT CAT CAT CAA TAA TAT ACC - 3'

40

## 【0143】

pfxDNAポリメラーゼ(LTI)を用いて、製造者の指示に従って、鋳型として10ナノグラムのwtAd35のDNAを使用して増幅を行ったが、0.6µMの両プライマーと3%のDMSOを用いた。プログラムは下記の通りである。即ち、94で3分、94で30秒、40で45秒、68で2分45秒を5サイクル、続いて94で30秒、60で30秒、68で2分45秒を25サイクルである。TAクローニングベクターPCR2.1におけるクローニングを可能とするために、1ユニットのsuperTaqポリメラーゼを用いて72で10分間、最後のインキュベーションを行った。Ad35の塩基33178からライトITRの末端までの範囲である、1.6kbの増幅された断片を、PCR精製キット(LT1)を用いて精製した。

50

## 【0144】

両方の精製されたPCR断片を、TA-クローニングキット(Invitrogen)のPCR2.1ベクターライゲートし、STBL-2コンピテント細胞(LT1)へ形質導入した。予期された挿入を含むクローンの配列を決定して増幅が正しいことを確認した。次に、NotIとNdeIを用いた消化により両断片をベクターから切り出し、ジェネクリーンキット(BIO 101, Inc.)を用いてゲルから精製した。コスミドベクターpWE15(クローンテック)をNotIにより消化し、脱リン酸化し、やはりゲルから精製した。これらの3つの断片をライゲートし、STBL2コンピテント細胞(LT1)中へ形質導入した。両方のPCR断片を含んでいる正しいクローンの一つを、その後NdeIによって消化し、そして平滑断片をジェネクリーンキットを用いてゲルから精製した。Ad35のwtDNAをNdeIを用いて消化し、製造者の指示に従って、26.6bpの断片をアガロースエンザイム(ロシュ)を用いてLMPゲルから精製した。これらの断片を共にライゲートし、製造者のプロトコールに従って、ファージパッケージングエクストラクト(ストラタジーン)を用いてパッケージした。STBL-2細胞へ感染させた後、コロニーをプレート上で生育して完全な挿入物の存在を解析した。正しい方向性で挿入された大きな断片を持ち、また3つの酵素(NcoI, PvuIIとScaI)を用いたイナエペナエント(inaepenaent)な消化の後に正しい制限パターンを有している、一つのクローンが選抜された。このクローンはpWE.Ad35.pIX-rITRと名付けられた。それはAs35配列をbp3401から末端まで含み、NotI部位によってフランキングされている(図14)。

10

20

## 【0145】

3)PER.C6におけるAd35に基づく組み換えウイルスの産生野生型Ad35ウイルスは、非常に高いタイターまでPER.C6パッキング細胞において生育することができる。しかし、PER.C6に存在しているAd5-E1領域が、E1が欠損したAd35組み換えウイルスを補うことが可能であるかどうかについては知られていない。これを試験するために、PER.C6細胞を、上記のアダプタープラスミドpAdApt35.LacZと大きな骨格(backbone)断片pWE.Ad35.pIX-rITRにより、共トランスフェクションを行った。最初に、pAdApt35.LacZをPacIによって消化し、そしてpWE.Ad35.pIX-rITRをNotIによって消化した。それ以上の精製は行わずに、各構築物の4マイクログラムをDMEM(LT1)と混合し、PER.C6細胞へトランスフェクトし、製造者の指示に従ってリポフェクタミン(LT1)を使用しながら、T25フラスコ中へ $5 \times 10^6$ 細胞個の密度で前日に播種を行った。陽性コントロールとして、PacIにより消化された6マイクログラムのpWE.Ad35.pIX-rITRのDNAを6.7kbのNheI断片と共トランスフェクトし、その断片はE1領域を含むウイルスゲノムの左末端を含んでいるAd35wtのDNAから単離された。

30

## 【0146】

次の日に培地(10%FBSと10mMのMgCl<sub>2</sub>を含むDMEM)を新たにし、更に細胞を培養した。トランスフェクションに続いた2日目に、細胞をトリプシン処理してT80フラスコに移した。陽性コントロールフラスコは、トランスフェクションに続く5日目でCPEを示し、それはpWE.Ad35.pIX-rITR構築物は、少なくともAd35-E1蛋白質の存在下で機能していることを示している。Ad35.LacZアダプタープラスミドとpWE.Ad35.pIX-rITRによるトランスフェクションは、CPEを引き起こさなかった。これらの細胞は10日目に培地中で回収され、細胞からウイルスを放出させるために一度凍結/解凍を行った。回収された材料の4mlを、PER.C6細胞(80%コンフルエント)と共にT80フラスコへ添加し、更に5日間培養した。この回収/再感染は2回繰り返されたが、ウイルスに関連したCPEについての証拠は何もなかった。この実験から、Ad5-E1蛋白質はAd35組み換えウイルスを補うことができないか、あるいは不十分であるようだが、しかし、アダプタープラスミドとpWE.Ad35.pIX-rITR骨格プラスミドの配列の重複が、効率的に組み換

40

50

えて組み換えウイルスゲノムを生じさせるには不十分であるということかもしれない。陽性コントロールのトランスフェクションが6.7 kbの左末端断片を用いて行われ、そのために配列重複は約3.5 kbであった。アダプタープラスミド及びpWE.Ad35.pIX-rITR断片は1.3 kbの重複配列を有していた。

#### 【0147】

1.3 kbの重複が効率的な相同性組み換えに小さ過ぎるかどうかをチェックするために、PacIで消化されたpWE.Ad35.pIX-rITRと、上記の35F1と36R4によって生成したAd35wtのDNAのPCR断片と共に、前に述べたのと同様の方法を用いて共トランスフェクトが行われた。そこでPCR断片はbp4669までの左配列を含み、そしてそのためにアダプタープラスミドpAdApt35.LacZと同様の、pWE.Ad35.pIX-rITRとの重複配列を有しているが、Ad35E1配列を有している。PCRカラム精製に続いて、無傷であるかもしれない鑄型配列を除去するために、DNAをSalIで消化した。消化されたPCR産物単独とのトランスフェクションは、陰性コントロールとして役立った。トランスフェクションの4日後に、PCR産物及びAd35.pIX-rITR断片によってトランスフェクトされた細胞でCPEが起こったが、陰性コントロールにおいては起こらなかった。これは、1.3 kbの重複配列は、Ad35E1蛋白質があるところでウイルスを生成するのに十分であることを示している。これらの実験より、少なくとも一つのAd35.E1配列蛋白質の存在が、Ad35を相補する細胞系列で、組み換えAd35に基づくベクターをプラスミドDNAから生成するのに必要である、と我々は結論した。

#### 【0148】

##### 実施例8

##### 1) Ad35.E1発現プラスミドの構築

PER.C6中でAd5.E1蛋白質は効率的にAd35組み換えウイルスを相補することができなかつたので、Ad35E1蛋白質はAd5を相補をしている細胞において発現されなければならない(例えば、PER.C6)、あるいは2倍体初代ヒト細胞又はアデノウイルスE1蛋白質を発現していない確立された細胞系列から始めて、Ad35E1蛋白質を発現している新たなパッケージ細胞系列を作らなければならない。最初の可能性に取り組むために、下記に示す様にAd35E1領域を発現プラスミド中でクローン化した。

#### 【0149】

最初に、bp468からbp3400までのAd35E1領域を、下記のプライマーセットを用いてwtAd35DNAから増幅した。

35F11: 5' - GGG GTA CCG AAT TCT CGC TAG GGT  
ATT TAT ACC - 3'

35F10: 5' - GCT CTA GAC CTG CAG GTT AGT CAG  
TTT CTT CTC CAC TG - 3'

このPCRは、5'末端にKpnIとEcoRI部位を導入し、更に3'末端にSbfIとXbaI部位を導入する。

#### 【0150】

製造者の指示を用いてPwoDNAポリメラーゼ(ロシュ)により、5ナノグラムの鑄型DNAにおける増幅を行ったが、しかし、両プライマーは最終濃度0.6 μMを用いた。プログラムは下記の通りである。即ち、94 で2分、94 で30秒、56 で30秒及び72 で2分を5サイクル、続いて94 で30秒、60 で30秒、72 で2分を25サイクル、続いて72 で10分である。PCR生成物をPCR精製キット(LTI)によって精製し、KpnIとXbaIによって消化した。そして消化されたPCR断片を、発現ベクターpRSVhbvNeo(下記を見よ)へライゲーションし、またKpnIとXbaIによって消化した。ライゲーションされた物は製造者のマニュアルに従ってコンピテントなSTBL-2細胞(LTI)へ形質導入され、コロニーについて、Ad35E1配列がRSVプロモーターとHBVポリAの間のポリリンカーへ正しく挿入されているか解析した。得られたクローンをpRSV.Ad35-E1と名づけた(図15

)。RSV・Ad35-E1中のAd35配列を、配列解析によってチェックした。

#### 【0151】

pRSVhbvNeoを以下の様に生成した。pRc-RSV(インビトロゲン)をPvuIIで消化し、RSAP酵素(LTI)によって脱リン酸化し、3bpベクター断片を低融点アガロース(LMP)中で単離した。WO96/35798において述べられたプラスミドpPGKneoPA(図16)をSspIで完全に消化してそのプラスミドを平滑化し、PvuIIによる部分消化を促進した。PvuIIによる部分消化に続き、得られた断片をLMPアガロースゲルで分離し、PGKプロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子及びHBVpolyAを含む2245bpのPvuII断片を単離した。両者の単離された断片はライゲートされて発現ベクターpRSV-pNeoを与え、それは今はPGK 10  
prom-neo-HBV-polyAカセットによって置換された、元来のSV40prom-neo-HBV-polyA発現カセットを有している(図17)。このプラスミドは更に改変され、下記の様にBGHPAがHBVpAで置換されている。即ち、pRSVpNeoはScaIによって平滑化され、XbaIによって更に消化された。Amp 20  
遺伝子の一部とRSVプロモーター配列とポリリンカー配列を含んでいる1145bp断片は、ジェネクリーンキット(Bio Inc. 101)を用いてゲルから単離された。次にpRSVpNeoはScaIによって平滑化され、更にEcoRIによって部分的に消化され、PGKneoカセット及びベクター配列を含んでいる3704bp断片は、上記の様にゲルから単離された。XbaIとEcoRIによって5'と3'末端においてそれぞれフランキングされたHBVpolyA配列を含む第三の断片は、下記のプライマー 20  
セットを用いてpRSVpNeoでのPCR増幅によって生成された。

HBV-F; 5' - GGC TCT AGA GAT CCT TCG CGG GAC  
GTC - 3' 及び

HBV-R; 5' - GGC GAA TTC ACT GCC TTC CAC CAA  
GC - 3'

#### 【0152】

増幅は、エロゲナーゼ酵素(LTI)によって製造者の指示に従って、下記の条件で行われた。即ち、94 で2分、そして94 で45秒、42 で1分、68 で1分を5サイクル、続いて94 で45秒、65 で1分、及び68 で1分を30サイクル、続いて68 で10分である。そして625bpのPCR断片をQiaquick PCR精 30  
製キットを用いて精製し、EcoRIとXbaIで消化し、ジェネクリーンキットを用いてゲルから精製した。3つの精製された断片はライゲートされ、pRSVhbvNeo構築物を与えるために、DH5 コンピテント細胞(LTI)中へ形質導入された(図18)。この構築物において、RSV発現カセットの転写制御領域及びネオマイシン選抜マーカーは改変され、CMVとSV40転写制御配列をしばしば含む、アデノウイルスベクターとの重複が減少した。

#### 【0153】

2) Ad35-E1発現構築物と共トランスフェクトされたPER.C6細胞でのAd35組み換えウイルスの生成

PER.C6細胞は $5 \times 10^6$ 細胞の密度でT25フラスコ中に播種され、次の日に以下 40  
を含むDNA混合物によりトランスフェクトされた。

- PacIによって消化されたpAdApt35.LacZ 1 $\mu$ g
- 消化されていないpRSV.Ad35E1 5 $\mu$ g
- NotIによって消化されたpWE.Ad35.pIX-rITR 2 $\mu$ g

#### 【0154】

トランスフェクションは、製造者の指示に従ってリポフェクタミンを用いて行った。トランスフェクション混合物を細胞に添加して5時間後、培地を取り除いて新鮮な培地に置き換えた。2日後に細胞をT80フラスコへ移して、更に培養した。トランスフェクションの1週間後、1mlの培地をA549細胞に加え、次の日に細胞を染色してLacZ発現をみた。染色して2時間後に青い細胞が明らかに見えるようになり、それは組み換えLa 50

c Zを発現しているウイルスが作製されたことを示している。細胞は更に培養されたが、明らかなCPEの出現は見られなかった。しかし12日後に細胞の塊が単層で現れ、続く18日後にトランスフェクション細胞は剥がされた。そして細胞と培地を回収し、一度凍結融解し、1mlの粗ライゼイトを用いて6穴プレートでPER.C6細胞を感染させた。感染して2日後に、LacZ活性をみるために細胞を染色した。2時間後に15%の細胞が青く染色された。wt及びノ又は複製しているコンピテントなウイルスの存在を試験するために、A549細胞をこれらのウイルスで感染し、更に培養した。CPEの兆候は見られず、それは複製能力のあるウイルスが存在しないことを示している。これらの実験は、組み換えAdApt35.LacZウイルスが、Ad35-E1発現構築物と共にトランスフェクトされたPER.C6細胞で作られたことを示している。

10

## 【0155】

3) Ad5ウイルスの中和活性を含むヒト血清の中でAd35組み換えウイルスは中和を逃れる

そしてAd5ウイルスの中和活性を含むヒト血清の存在下での感染を検討するために、AdApt35.LacZウイルスを使用した。精製したAd5に基づくLacZウイルスを、NAの陽性コントロールとして使用した。ここで、PER.C6細胞を $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度で、24穴のプレートに播種した。次の日に、Ad5を中和する高い活性を有するヒト血清サンプルを、培養培地中で5段階で5倍希釈した。そして0.5mlの希釈された血清を、0.5mlの培地に入ったAdApt5.LacZウイルスの $4 \times 10^6$ のウイルス微粒子と混合し、そして37°Cで30分間インキュベーションした後、0.5mlの混合物を2重の系列でPER.C6細胞に添加した。AdApt5.LacZウイルスについて、0.5mlの希釈された血清サンプルをAdApt5.LacZウイルスを含んでいる0.5mlの粗ライゼイトと混合し、そしてインキュベーションの後にこの混合物の0.5mlを、2重の系列でPER.C6細胞に添加した。血清がない培地中でインキュベートされたウイルスサンプルを、感染の陽性コントロールとして使用した。37°Cで2時間感染した後、培地を添加して最終容量を1mlとし、細胞を更にインキュベートした。感染の2日後、細胞を染色してLacZ活性を見た。結果を表IIに示す。これらの結果から、AdApt5.LacZウイルスは効果的に中和されたが、ヒト血清が存在しているにも関わらずAdApt35.LacZウイルスが感染性を残していることは、明らかである。これは、組み換えAd35に基づくウイルスは、Ad5に基づくウイルスへのNAを含むヒト血清中で中和を逃れることを証明するものである。

20

30

## 【0156】

## 参考例9

ネモポエティック(nemopoietic)なCD34Lin幹細胞に対する細胞型特異性を有するAd5/ファイバー35キメラベクター 参考例3において、我々は他の血清型の繊維蛋白質を有するアデノウイルスに基づくAd5のライブラリーの生成について述べた。このライブラリーの使用方法のための限定的ではない参考例として我々はここで、血液幹細胞の感染が改善されたことを示す、繊維組織で改変されたアデノウイルスの同定について述べる。

## 【0157】

CD34抗原が陽性であって、早期の分化マーカーであるCD33、CD38そしてCD71(Lin<sup>-</sup>)が陰性であるというフローサイトメーター上における表現型を有する、ヒト骨髓、臍帯血、又は動員された末梢血から単離された細胞は、一般的に血球幹細胞(HSC)と呼ばれている。全ての造血性系統はこれらの細胞から得られるためにこれらの細胞の遺伝的改変は非常に興味深く、そしてそのためにHSCは、多くの後天的又は先天的なヒト血液疾患の治療の標的細胞である。HSCの遺伝的な改変で治療可能な病気の種類としては、これらに限られるものではないが、ハーラー病、ハンター病、サンフィリポ病、モルキオ病、ゴーシュ病、ファーバー病、ニーマンピック病、クラッペ病、異染性白質萎縮症、I-細胞病、重症免疫不全症候群、Jak-3欠損症、フコシダーゼ欠損症、サラセミア、及び赤血球産生ポリフィリン症が含まれる。これらの造血疾患の患者の他に、

40

50

後天性免疫不全症候群（AIDS）及び血液癌を予防又は治療しようとする戦略もまた、HSC又はAIDSの場合のCD4陽性Tリンパ球の様なHSCから得られた細胞の遺伝的改変に基づいている。上記で挙げられた例は、よって、欠損している遺伝子と蛋白質の遺伝的レベルを補うために、HSCへDNAを導入することを目的としている。AIDS又は癌のための戦略の場合、HSCに導入すべきDNAは、抗ウイルス遺伝子又は自殺遺伝子であることができる。

#### 【0158】

上記で挙げた例に加えて、アデノウイルスのベクターを用いたHSCの効率的な形質導入が重要な役割を果たす、いくつかの他の分野がある。例えば組織工学の分野がある。この分野において、HSCを特異的な系統へと分化させることは重要である。いくつかの例は、限定するものではないが、T細胞前駆体又は内皮細胞前駆体の生成のみならず、エクスピボでの骨生成、軟骨生成、皮膚生成である。バイオリアクターにおける骨、軟骨、又は皮膚の生成は、骨折、又は骨髄損傷、又は重症な火傷の後の移植のために用いることができる。自然に、形質転換された細胞を患者に直接的にも再注入されることもできる。HSCから多数の内皮細胞前駆体を生成することは興味深い、それはこれらのHSCは、再注入の後に、虚血の様な心血管系障害の部位に回帰できるからである。同様に、HSCから多数のT細胞を生成することは興味深い、それはこれらのT細胞前駆体はエクスピボでプライム化され、プライム化されたT細胞を再注入した後にヒト体内で特定の標的を根絶することができるからである。ヒト体内における好ましい標的は、癌又はウイルスに感染した細胞であることができる。

#### 【0159】

上記で述べた例から、HSCへの効率的な遺伝子送達、遺伝子治療の分野における主要な興味であると結論できる。そこで、アデノウイルス血清型5宿主細胞が、インビトロのみならずインビボにおいてもHSCを標的とできるように及ぶように改変することは、本発明の主要な目的である。ヒトHSCにとって好ましい感染特性を有するキメラアデノウイルスを同定するために、我々は代替りの血清型（血清型8、9、13、16、17、32、35、45、40-L、51）に由来する繊維分子を運搬する、Ad5に基づくウイルスのライブラリーを作製した。繊維により改変されたこのライブラリーの生成は、参考例3において述べられている。Ad5は対照として用いられた。ヒトTF-1（赤白血病、ATCC CRL-2003）に関してこのライブラリーの小さなパネルを試験し、一方ヒト初代間質細胞とヒトHSCに関して、生成した全てのキメラウイルスを試験した。

#### 【0160】

10% FCSと50 ng/mlのIL-3（サンドス、バーセル、スイス）を添加したDMEM中で、ヒトTF-1細胞を日常的に維持した。骨髓吸入物から単離されたヒト初代繊維芽細胞様の間質を、DMEM/10% FCS中で日常的に維持した。24穴プレートのウェルあたり $1 \times 10^5$ 細胞の濃度で間質を播種した。播種して24時間後に、全てマーカーとして緑色蛍光蛋白質（GFP）を有している、Ad5、Ad5.Fib16、Ad5.Fib17、Ad5.Fib35、Ad5.Fib40-L、又はAd5.Fib51の細胞あたり1000個のウイルス微粒子に細胞を2時間曝した。2時間後に細胞をPBSで洗浄し、ウイルスを加えない培地に再播種を行った。TF-1細胞を24穴プレートのウェルあたり $2 \times 10^5$ 細胞の濃度で播種し、そしてまた異なったキメラアデノウイルスの1000ウイルス微粒子に2時間曝した。2時間曝した後に細胞を洗浄することにより、ウイルスを除去した。

#### 【0161】

ウイルスに曝した48時間後に両細胞型を回収し、フローサイトメーターを用いてGFPの発現を解析した。図19に示されるTF-1の結果は、血清型16、35又は51（全てアデノウイルスサブタイプBに由来する）に由来する繊維組織を運んでいるキメラアデノウイルスは、Ad5（サブタイプC）、Ad5.Fib17（サブタイプD）又はAd5.Fib40-L（サブタイプF）と比較して好ましい感染特性を有することを示す。初

10

20

30

40

50

代ヒト間質について試験したが、それはこれらの細胞はエクスピボの培養条件下でHSCの増殖及び維持を可能とする「フィーダー」細胞として一般的に使用されているからである。TF-1細胞への形質導入と比較して、繊維キメラアデノウイルスはいずれも、ヒト初代間質へ効率的な形質導入を行うことができなかつた(図20)。ヒト繊維芽細胞様初代間質の適度な感染はAd5においてのみ観察されたが、一方既知のレセプター分子のいずれもこれらの細胞において発現していないと観察されている(表IIIを見よ)。キメラウイルスを用いてヒト間質が感染しないことは有利であるが、それは共培養の設定においては、キメラアデノウイルスは間質の「フィーダー」細胞によって本来吸収されないと思われるからである。

#### 【0162】

フィーダーキメラウイルスの形質導入能力を試験するために、臍帯血(3個体)のプールを幹細胞の単離に用いた。MACSラボラトリー分離システム(Miltenyi Biotech)により、製造者によって提供されたプロトコルを用いて、単核細胞調製物からCD34<sup>+</sup>細胞を単離した。CD34<sup>+</sup>細胞の2×10<sup>5</sup>個を150μlの容量のDMEM(血清なし; Gibco, Gaithersburg, MD)の中に播種し、10μlのキメラアデノウイルス(最終的なウイルス微粒子/細胞比が1000となるように)を添加した。試験したキメラアデノウイルスは、Ad5、Ad5.Fib16、Ad5.Fib35、Ad5.Fib17、Ad5.Fib51であり、全てマーカーとして緑色蛍光蛋白質(GFP)を含んでいる。10%CO<sub>2</sub>の湿度の高い雰囲気下で、37で2時間細胞をインキュベートした。その後、500μlのDMEMによって細胞を一回洗浄し、500μlのStemPro-34 SF培地(Life Technologies, Grand Island, NY)中に再懸濁した。

#### 【0163】

そして細胞を、24穴のプレート(Greiner, Frickenhausen, Germany)中で5日間、照射(20Gy)して予め確立しておいたヒト骨髄間質(文献1)上で、10%CO<sub>2</sub>の湿度の高い雰囲気中で37で培養した。5日後に全細胞集団を、0.25%トリプシン-EDTA(ギブコ)100μlを用いたトリプシン処理によって回収した。5日間の培養前後の細胞数を、ヘモサイトメーターを用いて測定した。各サンプル中のCD34<sup>+</sup>及びCD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>、38<sup>+</sup>、71<sup>+</sup>細胞の数を回収した全細胞数から計算し、全集団中におけるCD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>、38<sup>+</sup>、71<sup>+</sup>細胞の頻度をFACS解析によって測定した。別個のサブ集団において、GFPを発現している細胞の頻度のみならず、個々の細胞あたりのGFPの強度を観察している間に、FACS解析によって形質導入効率を測定した。図21に示されているこの実験の結果は、アデノウイルス血清型5又はキメラアデノウイルスAd5.Fib17はCD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞に感染しないことを示しており、それはGFPが発現しないことによって見られたとおりである。対照的に、血清型16、51又は35の繊維組織分子を有しているキメラウイルスにつき、この細胞集団において高いパーセンテージのGFP陽性細胞が記録された。CD33<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>及びCD71<sup>+</sup>もまた発現しているCD34<sup>+</sup>細胞においてはGFPの発現はほとんど見られなかつたため、CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>について特異性が示された。細胞の早期分化マーカーCD33(骨髄)、CD71(赤血球)及びCD38(共通した早期分化マーカー)について陽性の割合が高くなる時に、Ad5.Fib16、Ad5.Fib35又はAd5.Fib51を用いて、CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞のサブ分画(図22)により、GFPが陽性である細胞のパーセンテージが減少することが示された。そこでこれらの結果は、キメラアデノウイルスAd5.Fib16、Ad5.Fib35及びAd5.Fib51の、HSCに対する特異性を示している。図23はAd5繊維組織と、Ad16、35及び51に由来するキメラBグループ繊維蛋白質との配列の一致を示している。形質導入処理の後に回収された細胞の数を測定することにより、アデノウイルスの毒性を決定することができる。CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>の数のみならず、CD34<sup>+</sup>細胞が回収された数は(図24)、1000個のアデノウイルス微粒子に2時間曝すことは、回収された細胞の数に影響しないことを示している。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 4 】

## 参考例 1 0

樹状細胞のための細胞型特異性を有する A d 3 5 / ファイバー 3 5 キメラベクター 樹状細胞は抗原提示細胞 ( A P C ) であり、初期免疫反応を開始する様に特殊化されていて記憶型の免疫反応を促進することが可能である。それらの発達の段階に依存して、D C は異なった機能を果たし、未成熟な D C は、主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I 及びクラス II 分子による提示のための、抗原の取り込みとプロセッシングにおいて非常に有効であり、それに対して成熟 D C は、抗原獲得とプロセッシングにおける有効性は低い、細胞表面における M H C 分子と共刺激分子の発現が高いために、記憶していない ( n a i v e ) 及び記憶した C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞をより良く刺激する。未成熟な D C は抗原を取り込んだ後にインビボで成熟し、リンパ系器官の T 細胞区域へ移動し、そして T 細胞活性化をプライムする。

10

## 【 0 1 6 5 】

D C は免疫反応の惹起を担っている細胞なので、D C を免疫刺激性蛋白質、ペプチドまたはこれらをコードする遺伝子にロードして免疫システムを引き起こすことについて、長い間興味を持たれてきた。この戦略の適用は、ワクチン接種の分野のみならず癌治療の分野でもある。これまで癌に対する戦略は主として、D C を抗原 ( 蛋白質又はペプチド ) と共にエクスピボでロードすることに焦点が置かれてきた。この方法は細胞障害性 T 細胞活性を誘導する結果となるということが、これらの研究により明らかとなってきた。細胞をロードするのに用いられる抗原は、一般的には癌特異的であるとして同定されている。この様な抗原のいくつかの例として、限定をするものではないが、G P 1 0 0、m a g e、メラノーマに対する M a r t - 1 がある。

20

## 【 0 1 6 6 】

癌の治療に加えて、ワクチン接種によって現在予防される可能性があるヒトの疾患が他に多くある。ワクチン接種の戦略において、「不活化された」病原体が、抗原提示細胞 ( 即ち未成熟 D C ) の活性を介して免疫システムへ提示される。ワクチン接種の戦略を介する疾患予防の良く知られた例には、肝炎 A、B 及び C、インフルエンザ、狂犬病、黄熱病、麻疹が含まれる。これらの良く知られたワクチン接種プログラムに加えて、マラリア、エボラ、リバーブラインドネス、H I V 及び他の多くの病気の治療のための研究プログラムが開発されてきた。上記の病原体の多くは、「不活化された」病原体の生成において危険であると考えられている。そこでこの後者は各病原体の蛋白質の単離及び特性解析を求めることとなり、それによって「完璧な」免疫反応を起こすことを可能とし、それによって野生型病原体の挑戦に対して完璧に防御するという結果となる。

30

## 【 0 1 6 7 】

この免疫刺激性蛋白質又はペプチドと共に D C をロードするという戦略を、治療的に実現可能とするために、少なくとも 2 つの別個の基準に合わなければならない。1) D C を多量に単離することであって、その D C は単離され、操作され、また方法を自己移植的とするために患者への再注入が可能である。今日までに、その様に多量の未成熟 D C を、任意に与えられたドナーに由来する、培養した末梢血単球から得ることが可能である。2) D C に効率的に形質導入できるベクターであって、免疫刺激性の蛋白質をコードする D N A を運搬できる様なもの。後者は非常に重要であり、なぜならば D C がリンパ系器官へと移動することが必要となる時には多くの蛋白質又はペプチドは既に D C から放出され、不完全な免疫プライミングが起こるといった結果となっていることが、明らかとなっているからである。D C は最終的に分化しておりそのために分裂しない細胞であるので、組み換えたアデノウイルスベクターは、抗原をコードしている D N A を D C へ運搬すると考えられている。理想的にはこのアデノウイルスベクターは樹状細胞への高い親和性を有するべきであるが、加えてインビボにおける D C の形質導入を達成する様な宿主の、中和抗体によって認識されるべきではない。この後により、D C のエクスピボ操作に対する必要性は除外されるが、現在主として行われているワクチン接種プログラムである、筋肉注射又は皮下注射と同等の医学的な手段を用いるという結果となるであろう。そこで、免疫原性の蛋

40

50

白質をコードしているアデノウイルスベクターにより形質導入されたDCは、免疫治療とワクチン接種のための天然アジュバントとして役立つことに適していることが理想的である。

【0168】

上記の例より、DCへの効率的な遺伝子送達は遺伝子治療の分野における主要な興味であると結論することができる。そこで、アデノウイルス血清型5宿主細胞の範囲をインビトロのみならずインビボで標的化できるように改変することは、本発明の主要な興味である。キメラアデノウイルスをヒトDCにとって好ましい感染特性で同定するために、代わりの血清型(血清型8、9、13、16、17、32、35、45、40-L、51)に由来する繊維組織分子を有している、Ad5に基づくウイルスのライブラリーを構築した。10  
対照としてAd5を用いた。我々は、未熟及び成熟DC由来のヒト単球の、異なる繊維組織が発現している組み換えキメラアデノウイルスへの感受性を評価した。

【0169】

健康なドナー由来のヒトPBMCを、フィコールハイパクー密度遠心分離によって単離した。FITCラベルした抗ヒト14モノクローナル抗体(Becton Dickinson)による染色、抗FITCマイクロビーズ及びMACS分離カラム(Miltenyi Biotec)を用いてCD14<sup>+</sup>細胞を増やすことにより、PBMCから単球を単離した。

【0170】

この操作は通常、FACSによって解析される様に、90%未満のCD14<sup>+</sup>細胞の細胞集団であるという結果となる。細胞を、10%ウシ胎児血清(ギブコ)、200ng/mlのrhGM-CSF(R&D/ITK diagnostics)、100ng/mlのrhIL-4(R&D/ITK diagnostics)を含んでいるRPMI1640培地(ギブコ)を用いた培養液中に置き、サイトカインを含んでいる新鮮な培地によって一日おきに培養液を給餌しながら7日間培養した。この方法によって7日後に得られる未成熟なDCは、FACS解析によって示される様に、CD83<sup>-</sup>、CD14<sup>low</sup>又はCD14<sup>-</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>の表現型を発現する。未成熟なDCを、100ng/mlのTNF-aを含んでいる培地中でその細胞を3日間培養することによって成させ、その後にはそれらは細胞表層にCD83を発現した。パイロット実験において、5 × 10<sup>5</sup>個の未成熟なDCを24穴プレートのウェルに播種し、各々の繊維組織組み換え10  
ウイルスの細胞あたり100から1000のウイルス微粒子に24時間曝した。試験されたウイルスはアデノウイルス血清型5(Ad5)、及びAd5に基づく繊維組織キメラウイルスである、Ad5.Fib12、Ad5.Fib16、Ad5.Fib28、Ad5.Fib32、Ad5.Fib40-L(血清型40の長い繊維)、Ad5.Fib49、及びAd5.Fib51(ここで、Fibxxは繊維組織分子が由来する血清型を表す)であり、これらのウイルスはそれぞれ、サブグループC、A、B、D、D、F、D及びBから得られた。24時間後に細胞を溶解し(1%トライトンX-100/PBS)、製造者によって提供されたプロトコルを用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した(Promega、Madison, WI, USA)。図25に示されるこの実験の結果は、Ad5は未成熟DCにあまり感染しないことを示しており、それは導入遺伝子の発現レベル10  
が低いことによって見られたとおりである。対照的に、Ad5.Fib16とAd5.Fib51(両者ともBグループの繊維組織キメラウイルスである)そしてAd5.Fib40-L(サブグループF)もまた、ルシフェラーゼ導入遺伝子発現に基づいた効率的な感染を示した。30

【0171】

第二の実験において、5 × 10<sup>5</sup>個の未成熟及び成熟DCを、全てマーカーとしてLacZ遺伝子を有している、Ad5、Ad5.Fib16、Ad5.Fib40-L、及びAd5.Fib51の細胞あたり、10000のウイルス微粒子によって感染させた。CM-FDGキットシステムと製造者によって提供された指示(Molecular probes, Leiden, オランダ)を用いて、フローサイトメトリー解析によりLac40

10

20

30

40

50

Zの発現を観察した。図26に示されているこの実験の結果は、Ad5.Fib16とAd5.Fib51は、成熟及び未成熟のヒトDCに形質導入することにおいてAd5より勝っている、という前の実験と一致している。またこの実験は、Ad5.Fib40-Lは、Ad5.Fib16とAd5.Fib51程には良くないが、Ad5よりは良いことを示している。これらの結果に基づき、Bグループウイルスの繊維組織を含んでいる他のキメラアデノウイルス、即ちAd5.Fib11とAd5.Fib35について、それらがDCに感染する能力を試験した。我々は未成熟なDCに焦点を絞ったが、なぜならば、これらは発現した導入遺伝子産物がMHCクラスIとIIが提示可能なペプチドとなる過程の細胞であるからである。

#### 【0172】

未成熟なDCを $5 \times 10^5$ 個/ウェルの細胞密度で24穴プレート(コースター)に播種し、細胞あたり1000及び5000ウイルス微粒子で感染させ、その後に、細胞を溶解してルシフェラーゼ活性を測定するまで、未成熟DCのための条件下で細胞を48時間培養した。図27に示されるこの実験の結果は、グループBウイルスの繊維組織を含んでいるAd5に基づくキメラウイルスは未成熟DCに効率的に感染する、ということを示している。第四の実験において、前で述べた実験と同様にして我々は再び未成熟DCを感染させたが、この時にはAd5、Ad5.Fib16、及びAd5.Fib35を用いて、マーカー遺伝子として緑色蛍光蛋白質(GFP)をのせた。ウイルス暴露の48時間後にフローサイトメーターを用いて測定したGFP発現の結果が図28に示され、これまでに得られたデータと相関している。そこで、これまでに得られた結果は、主として35、51、16及び11の繊維組織である、サブグループBから得られた代替のアデノウイルス由来の繊維組織を有しているAd5に基づくベクターは、ヒトDCに形質導入するにあたってAd5より優れている、という点で一致している。ここで開示されたアデノウイルスは動物のワクチン接種にも非常に適している。

#### 【0173】

これを明らかにするために、マウス及びチンパンジー由来のDCについて我々は試験を行い、これらのウイルスをこれらの動物モデルにおいて使用することが可能であるかを確認した。サブグループB由来のヒトアデノウイルスについてのレセプターは今日まで知られておらず、そのためにこの蛋白質は種の間で保存されているかどうか未知であるために、この後者については格別に検討した。両者の種について、24穴のプレートの1ウェルあたり $10^5$ 個の未成熟なDCを播種した。続いて、マウスDCの場合にはAd5、Ad5.Fib16及びAd5.Fib51、そしてチンパンジーDCの場合にはAd5及びAd5.Fib35の細胞あたり、1000ウイルス微粒子に48時間曝した(図29を見よ)。マウスの実験は、マーカーとしてルシフェラーゼを有するウイルスを用いて行われ、Ad5と比較しておよそ10-50倍のルシフェラーゼ活性の増加が示された。チンパンジーDCをGFPウイルスによって感染させて、フローサイトメーターを用いて解析を行った。図29にも示されているこれらの結果は、Ad5.Fib35(66.5%)と比較して、Ad5(3%)はチンパンジーDCへの形質導入が少ないことを示している。

#### 【0174】

##### 実施例11

Ad11に基づく組み換えウイルスと生成するためのプラスミドに基づくベクターシステムの構築

実施例5において述べた中和実験の結果は、Ad35と同様にAd11もまた、ヒト血清サンプルの大部分においては中和されないことを示している。そこで、Ad11に基づく組み換えアデノウイルスは、遺伝子治療処置及びワクチン接種のためのベクターとして、一般的に使用されるAd2及びAd5に基づくベクターよりも好ましい。Ad35とAd11の両者はBグループのウイルスであり、DNAホモロジークラスター2に属するウイルスとして分類されている(Wadell, 1984)。そこで、Ad35とAd11のゲノムは非常に似通っている。Ad11に基づく組み換えウイルスの作製ためプラスミドに基づくシステムを生成するために、実施例7において生成したアダプタープラスミドp

10

20

30

40

50

AdApt35IP1を下記の様に改変した。

【0175】

構築物pAdApt35IP1をAvrIIにより、そしてPacIにより部分的に消化した。消化混合物をゲル上で分離し、発現カセットとベクター骨格を含んでいる4.4kbの断片をジェネクリーンキット(BIO101, Inc.)を用いて単離した。そして、PwoDNAポリメラーゼを製造者の指示に従って使用しながら、プライマー35F1と35R2(実施例7を見よ)を用いて、wtAd11のDNAのPCR増幅を行った。PCR精製キット(LTI)を用いながら得られた0.5kbのPCR断片を精製し、上記で作製されたpAdApt35IP1の断片へライゲートした。これにより構築物pAdApt11-35IP1が与えられ、その中では5'アデノウイルス断片はAd11の対応する配列へと変換されている。

10

【0176】

次に、pAdApt11-35IP1はBglIIによって、そして部分的にPacIによって分解される。得られた断片をゲル上で分離し、ベクター配列、5'アデノウイルス断片及び発現カセットを含んでいる3.6kb断片を、上記のようにゲルから精製する。次に、プライマー35F3と35R4(実施例7を見よ)を用いて、wtAd11のDNAのPCR断片を生成する。増幅は上記と同様に行われ、得られた1.3kb断片を精製し、BglIIとPacIによって消化する。そして単離された断片をライゲートし、構築物pAdApt11IP1を与える。このアダプタープラスミドは今、Ad35配列の代わりにAd11配列を含む。PCRによって増幅されたAd11配列の増幅が正確であることは、このクローンの配列を、Ad11のDNAの対応する配列と比較することによって実証された。示されたPCRプライマーを用いて、Ad11のDNAの配列を直接決定することによって、後者は得られる。Ad11骨格を含んでいる大きなコスミドクローンは、以下の様にして生成される。

20

【0177】

最初に、実施例7でAd35のDNAについて述べた様に、PwoDNAポリメラーゼによりプライマー35F5と35R6を用いて、Ad11のDNAのPCR断片を増幅する。その後PCR精製キット(LTI)を用いて断片PCR断片を精製し、NotIとNdeIにより消化する。ジェネクリーンキット(Bio101, Inc)を用いて、得られた3.1kb断片をゲルから単離した。PwoDNAポリメラーゼと共に製造者のマニュアルに従って用いて、プライマー35F7と35R8(実施例7を見よ)を使用してAd11のDNAの第二のPCR断片を生成し、PCR精製キット(LTI)を用いて精製した。この増幅された断片もまたNdeIとNotIを用いて消化し、得られた1.6kbの断片を上記の様にしてゲルから精製した。2つの消化されたPCR断片を、その後共にコスミドベクターpWE15にライゲートし、pWE15は予めNotIで消化してTsaI酵素を用いて製造者のマニュアルに従って脱リン酸化しておいた。両断片が1コピー挿入された、一つのクローンが選抜された。正しいクローンを解析的なNotI消化によって選抜し、その消化は4.7kbの断片を与える。同じサイズの断片を与える35F5と35R8プライマーを用いたPCR反応により、確認を得た。正しいクローンをその後NdeIにより平滑化し、ゲルから単離した。

30

40

【0178】

次にwtAd11のDNAをNdeIにより消化し、製造者の指示に従いアガロース酵素(ロシュ)を用いながら、低融点アガロースゲルから大きな27kb断片を単離した。両者の断片をその後ライゲートして、製造者のプロトコールに従ってファージパッケージング抽出物(ストラタジーン)を用いてパッケージした。STBL-2細胞(LTI)へ感染させた後、コロニーをプレート上で生育して完全な挿入物の存在を解析した。選抜されたクローンの機能性を、その後にPER.C6での共感染によって試験した。これに関して、DNAをNotIで消化し、6マイクログラムを、プライマー35F1と35R4(実施例7を見よ)によってAd11のDNAにつき生成したPCR断片の2マイクログラムと共トランスフェクトした。トランスフェクションに続く一週間の内に、正しいクロ

50

ーンはCPEを与える。正しいクローンをpWE . A d 1 1 . p I X - r I T Rと名づけた。

【0179】

上記の方法を用いてプラスミドに基づくシステムが生成し、そのシステムは、外来遺伝子の挿入に適したアダプタープラスミド及びウイルス骨格を含んでいる大きなヘルパー断片からなる。組み換えA d 1 1に基づくウイルスは、A d 3 5に基づく組み換えウイルスにおいて述べた方法を用いて作製した。

【0180】

実施例12

患者から得られたサンプルの中のウイルスの中和

10

実施例1と5の中で述べた中和実験において、全てのサンプルは健康なボランティアから得た。非中和ベクターの適用の一つは遺伝子治療の分野であり、遺伝子治療の処置の候補者である患者群において、A d 3 5はやはり中和頻度が低く、力価も低いかどうかを検討することは興味深い。

【0181】

心血管疾患患者

26のペア血清と心嚢液(pericardial fluid:PF)のサンプルを、心不全を有する患者から得た。これらを、実施例1において述べた中和アッセイを用いて、A d 5とA d 3 5について試験した。この結果は、健康なボランティアに由来するサンプルについての先のデータを確認するものであった。血清サンプルの70%はA d 5のため 20  
のNAを含み、そして4%はA d 3 5のためNAを含んでいた。心嚢液サンプルでの力価はより低く、全体の40%がA d 5のためNAを有し、A d 3 5のためNAを有するものはなかった。PF中のNAと血清の間には良い相関があり、即ち、ペア血清サンプル中にNAを有さない陽性PFサンプルはなかった。これらの結果は、A d 3 5に基づく非中和ベクターは、心血管疾患の治療の目的において、A d 5ベクターより好ましいことを示している。この適応における全ての形態の非中和ベクターについて正しいことであるが、ベクターは非中和血清型のゲノムに基づくか、又はA d 5(又は他の血清型)に基づくことができるが、しかし、少なくとも非中和活性型の主要なカプシド蛋白質(ヘキソン、ペントン及び随意的に繊維組織)を提示している。

20

【0182】

リウマチ関節炎患者

関節炎のもとにある分子決定因子はまだ知られていないが、関節におけるT細胞機能不全と成長因子産生の不均衡が、滑膜組織の炎症と過形成を引き起こすことが知られている。滑膜細胞(cynoviocyte)の増殖が開始し、軟骨と骨に侵入し、これらの組織を破壊する結果となる。現在の治療は(初期段階の時は)抗炎症剤(抗TNF, IL1-R A, IL-10)及び/又は従来の薬物(例えばMTX、スルファサラジン)の投与から始まる。リウマチ関節炎の後期段階においては、外科手術に基づく滑膜切除術、放射線照射、又は化学的な治療が行われる。替わりの又は付加的な選択は遺伝子治療を介した処置であり、そこでアデノウイルスベクターは患者の関節に直接に運搬され、抗炎症剤又は自殺遺伝子が発現する。コラーゲンによって誘導された関節炎に罹っているアカゲザル 40  
で行われた前の研究は、マーカー遺伝子を有するA d 5に基づくベクターは、滑膜細胞(cynoviocyte)に形質導入することができることを示している。ヒトの場合において、アデノウイルスの運搬はNAの存在によって妨げられるかどうかは知られていない。

30

【0183】

リウマチ関節炎患者の心嚢液(SF)中にNAが存在しているかを調べるために、リウマチ関節炎(RA)に罹っている患者からランダムに選ばれた53人のパネルからSFサンプルを得た。実施例1で述べた中和アッセイを用いて、いくつかのwtアデノウイルスについてこれらを試験した。このスクリーニングの結果を表IIIに示す。72%のSFサンプルで、アデノウイルス5型は中和されることが見出された。これらのサンプルの大 50

50

部分は高い力価のNAを含み、そこで試験した最も高いSFサンプルの希釈率(64×)でもAd5ウイルスは中和された。これは、リウマチ関節炎患者の関節において滑膜細胞(cynoviocyte)へアデノウイルスベクターを運搬しても、非常に無効であることを示している。更に、SF中での力価は非常に高いために、ベクターの注入に先立っての洗浄はNAを十分に除去するかどうかは疑わしい。試験された他の血清型の中で、Ad35はサンプルの4%だけを中和することが示された。そのために、これらのデータは健康な患者由来の血清サンプルで得られた結果を確認するものであり、Ad35に由来するカプシド蛋白質の少なくともいくつかを提示しているAd35に基づくベクター又はキメラベクターは、リウマチ関節炎の治療において好ましいベクターであることを示している。

10

## 【0184】

## 実施例13

Ad35に基づくウイルスの骨格の修飾

1) pBr/Ad35.Pac-rITR及びpBr/Ad35.PRnの作製

実施例4は、Ad35サブクローンpBr/Ad35.Eco13.3の作製について述べている。このクローンはAd35の配列をbp21943からEcoRIへクローン化されたライトITRの末端まで、そしてpBr322のEcoRVを含む。これらの配列をAd35においてbp18137に位置しているPacI部位まで伸長するために、pBr/Ad35.Eco13.3(実施例4を見よ)をAatIIとSnaBIで消化し、そして断片を含んでいる大きなベクターをQIAEXIIゲル抽出キット(Qiagen)を用いてゲルから単離した。Ad35wtのDNAをPacIとSnaBIで消化し、上記のようにして4.6kb断片を単離した。そしてこの断片を、PacIとAatIIの突出を含んでいる二本鎖(ds)リンカーへライゲートした。下記のオリゴヌクレオチドをアニールした後にこのリンカーが得られた。

20

A-P1: 5' - CTG GTG GTT AAT - 3'

A-P2: 5' - TAA CCA CCA GAC GT - 3'

## 【0185】

dsリンカーとAd35のPacI-SnaBI断片を含んでいるライゲーション混合物を、ライゲートされていないリンカーから、LMPゲル上で分離した。4.6kbのバンドをゲルから切り出して65℃で融解し、そしてAatIIとSnaBIで消化した精製pBr/Ad35.Eco13.3ベクター断片とライゲートした。ライゲーションを電気コンピテントなDH10B細胞(Life Technologies Inc.)へ形質導入した。得られたクローンであるpBr/Ad35.Pac-rITRはAd35配列を、PacI部位のbp18137からライトITRまで含んでいた。

30

## 【0186】

次に、ベクター配列からITRを遊離させることを可能とするために、特異な制限部位をライトITRの3'末端に導入した。これにつき、Ad35配列のbp33165におけるNdeI部位からライトITRまでをカバーするPCR断片が用いられ、ライトITRは、rITRへ取り付けられたSwAI, NotI及びEcoRI制限部位を有している。プライマー35F7と35R8(実施例7で述べられている)を用いてPCR断片を作製した。精製の後、PCR断片をATクローニングベクター(インビトロゲン)へクローン化し、正しい増幅を証明するために配列を決定した。正しく増幅されたクローンをその後EcoRIで消化し、クレノフ(klenow)酵素で平滑化し、続いてNdeIで消化してPCR断片を単離した。平行して、pBr/Ad35.Pac-rITRでのpBrベクターにおけるNdeIを下記のようにして除去した。NdeIを用いた消化、クレノフ処理及び再ライゲーションによってNdeI部位を除去したpBr322ベクターを、AatIIとNheIによって消化した。ベクター断片をLMPゲルで単離し、やはりLMPゲルで単離したpBr/Ad35.Pac-rITR由来の16.7kbのAd35.AatII-NheI断片とライゲートした。これにより、pBr/Ad35.Pac-rITR.NdeIを作製した。次にpBr/Ad35.Pac-rITR.N

40

50

d e I を N d e I によって消化し、クレノフ酵素を用いて末端を充填し、そしてDNAを N d e I によって消化した。ベクターと A d 3 5 配列を含んでいる大きな断片を単離した。このベクター断片と P C R 断片のライゲーションの結果、p B r / A d 3 5 . P R n を得た。このクローンにおいて、繊維組織、E 2 A , E 3 , E 4 又はヘキソンをコードする特異的な配列を操作することができる。加えて、例えば E 4 蛋白質又は E 2 を駆動するプロモーターを、異種のプロモーターへと変異、欠損又は改変することができる。

【 0 1 8 7 】

2 ) 異なった血清型に由来する繊維組織蛋白質を有する A d 3 5 に基づくウイルスの産生 アデノウイルスはヒト細胞に異なった効率で感染する。感染は以下を含む2つの過程を伴っている。1 . ウイルスと細胞上の特異的なレセプターへの結合を仲介する繊維組織蛋白質、及び2 . 例えば R G D 配列と細胞表面に存在するインテグリンへの相互作用による、インターナリゼーションを仲介するペントン蛋白質。A d 3 5 がメンバーであるサブグループBのウイルスについては繊維蛋白質のための細胞間レセプターは知られていない。ヒト細胞の感染効率において、A d 5 の様なサブグループCのウイルスと比較して、サブグループBのウイルスには大きな差がある ( W O 0 0 / 0 3 0 2 9 と E P 9 9 2 0 0 6 2 4 . 7 を見よ ) 。一つのサブグループ内でさえも、特定のヒト細胞の感染効率は種々の血清型の間で異なることがある。例えば、A d 1 6 の繊維組織は、A d 5 に基づく組み換えウイルス上に存在するとき、ヒト及びアカゲザル由来の初代内皮細胞、平滑筋細胞及び滑膜細胞 ( c y n o v i o c y t e ) に、A d 3 5 又は A d 5 1 の繊維組織を有する A d 5 キメラウイルスよりも良く感染する。そこで、A d 3 5 に基づくウイルスの高い感染活性を得るために、繊維蛋白質を異なった血清型の繊維蛋白質に変えることが必要かもしれない。その様な繊維キメラの技術が、参考例3においてA d 5 に基づくウイルスについて述べられており、下記においてA d 3 5 ウイルスについて例示されている。

10

20

【 0 1 8 8 】

最初に、構築物 p B r / A d 3 5 . P R n において多くの繊維組織配列が A d 3 5 骨格より下記の様に除去されている。

左フランキン配列と、A d 3 5 の繊維蛋白質の一部分である特異な M l u I 部位の上流である b p 3 0 2 2 5 から繊維組織の尾部の b p 3 0 8 7 2 ( 図 6 に開示した w t A d 3 5 配列による番号 ) までの範囲を、以下のプライマーを用いて増幅した。

D F 3 5 - 1 : 5 ' - C A C T C A C C A C C T C C A A T T C C - 3 ' 及び

30

D F 3 5 - 2 : 5 - C G G G A T C C C G T A C G G G T A G A C A G G G T T G A A G G - 3 '

【 0 1 8 9 】

この P C R 増幅によって繊維組織遺伝子の尾部に特異な B s i W I 部位が導入される。繊維組織蛋白質の末端の b p 3 1 7 9 8 から、特異な N d e I 部位の 3 ' から得た b p 3 3 1 9 9 ( w t A d 3 5 配列による番号、図 6 ) までの範囲の右フランキン配列を、以下のプライマーを用いて増幅した。

D F 3 5 - 3 : 5 ' - C G G G A T C C G C T A G C T G A A A T A A A G T T T A A G T G T T T T A T T T A A A T C A C - 3 ' 及び

40

D F 3 5 - 4 : 5 ' - C C A G T T G C A T T G C T T G G T T G G - 3 '

【 0 1 9 0 】

この P C R は、繊維組織配列の代わりに特異な N d e I 部位を導入する。P C R 増幅は製造者の指示に従って、P w o DNA ポリメラーゼ ( ロシュ ) を用いて行われた。増幅の後、P C R 産物を P C R 精製キットを用いて精製し、断片を B a m H I で消化してライゲートした。2 k b のライゲートされた断片をゲルから精製し、P C R S c r i p t A m p ベクター ( S t r a t a g e n e ) へクローン化した。増幅の正確さを配列決定によってチェックした。そして P C R 断片を M l u I / N d e I 断片として切り出し、同じ酵素によって消化した p B r / A d 3 5 . P R n へクローン化した。これにより p B r / A

50

d35 . P R f i b が生成し、p B r / A d 3 5 . P R f i b は替わりの血清型の繊維組織配列を導入するのに適したシャトルベクターである。この戦略は、W O 0 0 / 0 3 0 2 9 に開示された、A d 5 に基づくウイルスのための繊維改変の戦略と類似している。その出願の表 I に挙げられたプライマーを、アデノウイルスの種々のサブグループの繊維組織配列を増幅するのに用いた。p B r / A d 3 5 . P R f i b においてクローン化された繊維組織の増幅のために、同じ(宿重した: d e g e n e r a t e )プライマー配列を使用することができるが、しかし、順方向プライマー(尾部オリゴヌクレオチド A から E )の N d e I 部位は B s i W I 部位へ変えられるべきであり、逆方向オリゴヌの N s i I 部位( k n o b オリゴヌクレオチド 1 から 8 )は N h e I 部位へ変えられるべきである。そこで、下記の宿重プライマーを用いて 16 の繊維組織配列を増幅した。

5' - C C K G T S T A C C C G T A C G A A G A T G A A A G C - 3'  
' 及び

5' - C C G G C T A G C T C A G T C A T C T T C T C T G A T A T A - 3'

#### 【0191】

そして増幅された配列は B s i W I と N h e I によって消化され、同じ酵素によって消化された p B r / A d 3 5 . P R f i b へクローン化され、p B r / A d 3 5 . P R f i b 16 を生成した。そして後者の構築物を P a c I と S w a I によって消化し、挿入物をゲルから単離した。改変された繊維組織を有する P a c I / S w a I A d 3 5 断片を、その後 p W E / A d 3 5 . p I X - r I T R の対応する部位へクローン化し、p W E / A d 3 5 . p I X - r I T R . f i b 16 を与えた。そしてこのコスミド骨格を A d 3 5 に基づくアダプタープラスミドと共に用いて、A d 16 の繊維組織を提示する A d 3 5 組み換えウイルスを生成した。他の繊維組織配列を上記で述べた(宿重した)プライマーによって増幅することができる。もし繊維組織配列の一つが内在性の B s i W I と N h e I 部位を有することが判ったら、P C R 断片はその酵素によって部分的に消化されなければならないであろう。

#### 【0192】

3) 誘導可能であって E 1 非依存性の E 4 発現を伴った A d 3 5 に基づくウイルスの生成アデノウイルス E 4 プロモーターは E 1 蛋白質の発現によって活性化される。A d 5 の E 1 蛋白質が、A d 3 5 の E 4 プロモーターの活性化を仲介することが可能であるかどうかは未知である。そこで、P C R . C 6 細胞において A d 3 5 組み換えウイルスの作製を可能とするために、E 1 に依存しない E 4 の発現を作製することは有利であろう。これは、A d 3 5 - E 4 プロモーターを異種のプロモーター、それに限定するものではないが例えば 7 x T e t O プロモーター、により、によって置き換えることにより達成できる。E 1 を欠損した A d 5 に基づく組み換えベクターは、E 1 が発現しないにも関わらず、標的細胞でベクター骨格に由来するウイルス遺伝子の発現が残ることを示している。ウイルス遺伝子の発現は毒性を増加し、感染された細胞に宿主免疫反応を引き起こすかもしれない。遺伝子治療とワクチン接種の分野における、多くのアデノウイルスベクター適用において、骨格に由来するウイルス遺伝子の発現を減少又は消滅させることが望まれている。これを達成する道の一つは、ウイルス骨格に由来する配列を全て、又はできるだけ多く除くことである。E 2 A、E 2 B 又は E 4 遺伝子及び/又は後期遺伝子の機能を除くことにより、作製する間にこれらの機能を補わなければならない。

#### 【0193】

ヘルパーウイルスの手段によって、又はこれらの機能を安定的に付加することのいずれかにより、誘導可能な転写調節を伴い又は伴わず、産生細胞へこの補足を行うことができる。これを達成するための方法は A d 5 について述べられていて本分野で知られている。一つの特異的な方法は、標的細胞においては活性を有さないプロモーター配列によって E 4 プロモーターを置換することである。E 4 蛋白質は、例えば E 2 プロモーターの活性化を介しアデノウイルスの複製において、またスプライシングの調節と後期遺伝子の転写産物の核輸送を介し後期遺伝子の発現において、役割を果たす。加えて、E 4 蛋白質の少なく

10

20

30

40

50

ともいくつかは細胞に毒性を有する。そこで、標的細胞においてE4の発現を減少させること又は除くことにより、Ad35に基づくベクターは更に改善されるであろう。これを達成する道の一つは、標的細胞においては不活性である異種プロモーターによってE4プロモーターを置換することである。標的細胞において不活性な異種プロモーター/アクチベーターシステムの一例は、テトラサイクリン誘導性TetOシステムである(Gossen及びBujard, 1992)。

#### 【0194】

他の原核又は合成プロモーター/アクチベーターシステムを使用することもできる。この例において、ウイルスベクターの骨格のE4プロモーターは、tetオペロン(7xTetO)由来のテトラサイクリン反応性因子の7回繰り返しを含んでいるDNA断片によって置換されている。このプロモーターに対する強いトランスアクチベーターは、tetリプレッサーのDNA結合領域及びVP16の活性化領域(Tetトランスアクチベーター蛋白質、Tta)を含んでいる融合蛋白質である。E1発現に依存しない強力なE4発現を、Ttaを発現しているPER.C6細胞において達成することができる。Ttaを発現しているPER.C6細胞は作製されて記載されている(実施例15を見よ)。7xTetOの制御下であるE4を有するAd5由来のE1欠損ウイルスを産生することは可能であり、これらの細胞において殖やされている。ヒト又は動物起源の細胞(Ttaトランスアクチベーターを発現しない)における感染に続いて、通常のE4プロモーターを有するE1欠損ウイルスと比較して、E4発現が大きく減少していることが見出された。

#### 【0195】

以下に、E4プロモーター置換を有するウイルスを産生するためのコスミドヘルパーベクターであるpWE/Ad35.pIX-rITR.TetO-E4の構築を説明する。

#### 【0196】

まず、pBr/Ad35.PRn DNAを次のプライマーを用いてPCR増幅することによりフラグメントを作製した。

355ITR: 5'-GAT CCG GAG CTC ACA ACG TCA TTT TCC CAC G-3'

および

353ITR: 5'-CGG AAT TCG CGG CCG CAT TTA AAT C-3'

である。このフラグメントは、bp34656 (wtAd35に従った番号)とpBr/Ad35.PRnの右ITRのNotI部位3'との間の配列を含み、かつ右ITR配列のSstI部位5'を導入する。

#### 【0197】

第2のPCRフラグメントを次のプライマーを用いてpBr/Ad35.PRn DNA上に作製した。

35DE4: 5'-CCC AAG CTT GCT TGT GTA TAT ATA TTG TGG-3'

および

35F7

である。実施例7を参照のこと。このPCRはbp33098と34500 (wtAd35に従った番号)との間のAd35配列を増幅し、かつE4 TATAボックスの上流にHindIII部位を導入する。これら2つのPCR反応により、E4プロモーターの右および左フランキング配列を増幅する。増幅には、製造元の説明書に従ってPwo DNAポリメラーゼを用いた。

#### 【0198】

SstIおよびHindIIIで消化して、7xTetOプロモーターを含む第3のフラグメントを構築物pAAO-E-TATA-7xTetOから単離した。pAAO-E-TATA-7xTetOの作製法を以下に説明する。第1のPCRフラグメント(355/353)をSstIおよびNotIで消化し、7xTetOフラグメントにライゲートした。次に、ライゲーション混合物をHindIIIおよびNotIで消化し、0.5 kbのフラグメントをゲルから単離する。第2のPCRフラグメント(35DE4/35F7)をNdeIおよびHindIIIで消化し、ゲルを精製した。次に、これら2つのフラグメントをNdeIおよびNotIで消化したpBr/Ad35.PRn中にライゲートしてpBr/Ad35.PR.TetOE4を得た。次いで、E4プロモーターの修飾をAd35ヘルパーコスミドクローンのPacI/SwaIフラグメントをpBr/Ad35.PR.TetOE4から得たPacI/SwaIフラグメントで交換することによりAd35ヘルパーコスミドクローンに転写して、pWE/Ad35.pIX-rITR.TetOE4を得る。

## 【 0 1 9 9 】

pAAO-E-TATA.7xTet0を次のようにして作製した。2つのオリゴヌクレオチド

TATAplus: 5'-AGC TTT CTT ATA AAT TTT CAG TGT TAG ACT AGT AAA TTG CTT AAG-3'  
 および

TATAmin: 5'-AGC TCT TAA GCA ATT TAC TAG TCT AAC ACT GAA AAT TTA TAA GAA-3' (下線部の配列は修飾TATAボックスを形成する)

を合成した。このオリゴヌクレオチドをアニールして、HindIIIで消化したDNAと適合する5'オーバーハングを有する2本鎖DNAフラグメントを得た。アリーリング反応の生成物を、HindIIIで消化したpGL3エンハンサーベクター (Promega) にライゲートして、pAAO-E-TATAを得た。さらにクローニングするために、修復した挿入フラグメントの5'末端にHindIII部位を有するクローンを選択した。

10

## 【 0 2 0 0 】

次に、7量体化tetオペレーター配列を、拡張PCRシステム (Roche) を用い、製造元の手順に従い、PRC反応内でプラスミドpUHC-13-3(GossenおよびBujard, 1992年)から増幅した。次のプライマーを用いた。

tet3: 5'-CCG GAG CTC CAT GGC CTA ACT CGA GTT TAC CAC TCC C-3'

および

tet5: 5'-CCC AAG CTT AGC TCG ACT TTC ACT TTT CTC-3'

である。増幅したフラグメントをSstIおよびHindIII (これらの部位は、それぞれtet3およびtet5に存在する) で消化し、SstI/HindIIIで消化したpAAO-E-TATAにクローンして、pAAO-E-TATA-7xtet0を得た。

20

## 【 0 2 0 1 】

作製したpWE/Ad35.pIXrITR.TetOE4コスミドクローンの機能性を調べるために、このDNAをNotIで消化した。次いで、wtAd35 DNAの左末端をプライマー35F1および35R4を用いて増幅した。(実施例7参照)。増幅の後、PCR混合物を精製し、SalIで消化して完全なウイルスDNAを取り出した。次に、消化したpWE/Ad35.pIX-rITR.TetOE4およびPCRフラグメントの両方の4grを、前日にT25フラスコに播種したPER.C6-tTA細胞に同時トランスフェクションした。2日後、トランスフェクションした細胞をT80フラスコに移し、その2日後にCPEを得た。この結果、コスミドのバックボーンが機能的であることが分かった。

30

## 【 0 2 0 2 】

(実施例14)

E1欠損Ad35ウイルスを補完することのできる細胞株の産生

pIG135およびpIG270の産生

構築物pIG.EIA.EIBは、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター (PGK) およびB型肝炎ウイルスのpolyA配列と作用的に連結された459~3510のwt Ad5配列 (Genbank寄託番号M72360) に対応するAd5のE1領域配列を含む。この構築物の産生についてはW097/00326に記載されている。Ad5のE1配列をAd35の対応する配列で次のように置換する。pRSV.Ad35-E1 (実施例8において説明) をEcoRIおよびSse8387Iで消化し、Ad35 E1配列に対応する3 kbのフラグメントをゲルから単離した。構築物pIG.EIA.EIBをSse8387Iで完全に消化し、EcoRIで部分的に消化した。Ad5 E1領域を有しないが、PGKプロモーターを有するベクター配列に対応する4.2 kbのフラグメントをLMPアガロースゲル上の他のフラグメントから分離し、ゲルからコレクトバンド (correct band) を励起する。得られたフラグメントの両者をライゲートし、pIG.Ad35-EIを得た。このベクターを更に修飾して、pUC119ベクターのバックボーンに存在するLacZ配列を取り出す。ここで、ベクターをBsaAIおよびBstXIで消化し、ゲルから巨大フラグメントを単離する。2本鎖オリゴを次の2つのオリゴをアニールして調製する。

40

BB1: 5'-GTG CCT AGG CCA CGG GG-3'

および

BB2: 5'-GTG GCC TAG GCA C-3'

である。

50

## 【0203】

このオリゴおよびベクターフラグメントのライゲーションにより、構築物pIG135を生じた。オリゴの適正な挿入によりBsaAIおよびBstXI部位を修復し、かつ固有のAvrII部位を導入する。次に、pIG135のAd35-E1発現カセットの3'末端に固有部位を導入した。ここで、構築物をSapIで消化し、3'突出末端をT4 DNAポリメラーゼで処理して平滑末端化した。このように処理した線状プラスミドをBsrGIでさらに消化し、巨大ベクターを含有するフラグメントをゲルから単離した。HBVpolyA配列の3'末端を修復するため、および固有部位を導入するためにPCRフラグメントを次のプライマーを用いて作製した。

270F: 5'-CAC CTC TGC CTA ATC ATC TC -3'

および

270R: 5'-GCT CTA GAA ATT CCA CTG CCT TCC ACC -3'

である。

## 【0204】

Pwoポリメラーゼ (Roche) を用い、製造元の説明書に従ってpIG.Ad35.E1 DNAに対してPCRを行った。得られたPCR産物をBsrGIで消化し、かつTsap酵素 (LTI) を用いて脱リン酸した。後者はBsrGI部位における挿入二量体化を防ぐためである。PCRフラグメントおよびベクターフラグメントをライゲーションして、構築物pIG270を得た。

## 【0205】

ラットのプライマリー細胞の形質転換が可能なAd35 E1配列

新生WAG/RIJラットを妊娠1週で屠殺し、腎臓を取り出した。被膜を慎重に取り除いた後、37 °Cのトリプシン/EDTA (LTI) 中で複数回インキュベーションし、1%FBSを含有する冷PBS中で浮遊細胞を収集することにより腎臓を単細胞懸濁液に分解した。腎臓のほとんどがトリプシン処理されると、10%FBSを補ったDMEM中に全細胞を再懸濁し、滅菌チーズクロスで濾過した。1つの腎臓から得た胚ラット腎臓 (BRK) 細胞を5つの皿 (Greiner, 6cm) に入れた。細胞密度が70~80%に達すると、製造元の説明書に従い、CaPO<sub>4</sub>を用いて細胞を1または5 μg DNA / 皿でトランスフェクトした。次の構築物を別々のトランスフェクションに用いた。pIG.E1A.E1B (Ad5-E1部位を発現)、pRSV.Ad35-E1、pIG.Ad35-E1およびpIG270 (後者はAd35-E1を発現) である。病巣がトランスフェクトした細胞に現れるまで、細胞を37 °C、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。表4は環状または線状DNAを用いた幾つかのトランスフェクション実験から得られた病巣の数を示している。予想通り、Ad5-E1部位は効率的にBRK細胞に転換した。効率は低いが、病巣はAd35-E1トランスフェクト細胞層にも発現した。Ad35に転換した病巣はより遅い時期に現れた。Ad5-E1では7~10日であったのに対し、Ad35ではトランスフェクト後約2週間であった。これらの実験は、BグループウイルスAd35のE1遺伝子がげっ歯類プライマリー細胞を転換することができることを明白に示している。これによりAd35-E1発現構築物の機能性が証明され、かつBグループウイルスAd3およびAd7の転換能力に関する初期の発見 (Dijkema, 1979年) が追認された。病巣内の細胞が実際に転換されたものであるか否かを調査するために、幾つかの病巣を取り出して増大した。7つの病巣中少なくとも5つが確立した細胞株として増殖することが分かった。

## 【0206】

プライマリーヒト羊膜由来の新たなパッケージング細胞の作製

羊膜穿刺後に得た羊水を遠心分離し、細胞をAminoMax培地 (LTI) 中に再懸濁し、組織培養フラスコ内で37 °C、10%CO<sub>2</sub>で培養した。細胞が順調に増殖した時点 (およそ1細胞分裂 / 24時間) で、AminoMax完全培地とGlutamax 1 (最終濃度4 mM、LTI)、グルコース (最終濃度4.5g/L、LTI) および10%FBS (LTI) を補ったDMEM低グルコース培地 (LTI) との1:1混合液に培地を交換した。トランスフェクションのために、約5 × 10<sup>5</sup>細胞を10cm細胞培養皿に入れた。翌日、CaPO<sub>4</sub>トランスフェクションキット (LTI) を用い、製造元の説明書に従って細胞を皿当たり20マイクログラムの環状pIG270でトランスフェクトし、DNAを沈降させながら細胞を一晩インキュベートした。その翌日、細胞をPBSで4回洗浄して沈殿物を除去し、転換細胞の病巣が現れるまで3週間以上さらにインキュベートした。1

10

20

30

40

50

週間に1回、培地を新しい培地に交換した。他のトランスフェクション剤、例えばLipofectAmine (LTI) またはPEI (ポリエチレンジアミン、高分子量、水フリー、Aldrich) を用いたが、これに限定されるものではない。これら3つの薬剤のうち、一次ヒト羊膜に対してPEIが最も高いトランスフェクション効率を達成する。すなわちpAdApt35.LacZのトランスフェクション後48時間で約1%の青色細胞である。

#### 【0207】

病巣を次のようにして分離する。培地を取り除き、PBSに交換した後、ディスポーザブルフィルターのチップを取り付けた50~200 $\mu$ lギルソンピペットを用いて、細胞をそっと擦り取って病巣を分離する。10 $\mu$ l PBSに収容した細胞を15 $\mu$ lトリプシン/EDTA (LTI) を入れた96ウエル皿に移し、ピペットで上下し、室温で短時間インキュベーションすることによって単細胞懸濁液を得た。AminoMax完全培地と補助剤および10%FBSを含んだDMEMとの前記1:1混合液を200 $\mu$ l加えた後、細胞をさらにインキュベートした。増殖を続けるクローンを増大し、異なるサブグループのE1欠失アデノウイルスベクター、具体的にはBグループウイルス、特にAd35またはAd11から誘導されたものの補体増殖に対する能力を分析した。

#### 【0208】

ヒト胚網膜芽細胞からの新たなパッケージング細胞株の作製

ヒト網膜細胞を流産した胎児の目から分離し、10%FBS (LTI) を補ったDMEM培地 (LTI) 中で培養する。トランスフェクションの前日に、約 $5 \times 10^5$ 細胞を6cm皿に入れ、37、10%CO<sub>2</sub>で一晩培養する。製造元の説明書に従い、CaPO4沈殿キットを用いてトランスフェクションを行う。環状プラスミドまたは精製フラグメントのいずれかとして、各皿を8~10 $\mu$ gのpIG270 DNAでトランスフェクトする。精製フラグメントを得るために、pIG270をAvrIIおよびXbaIで消化しAd35 E1発現カセットに対応する4kbのフラグメントをアガラーゼ処理 (Roche) によりゲルから単離した。翌日、滅菌PBSで4回洗浄して、沈殿物を慎重に洗い流す。次いで、新しい培地を加え、転換細胞の病巣が現れるまでトランスフェクトした細胞を更に培養する。十分に大きくなると (>100細胞)、病巣を取り出し、前記したようにして96ウエルに入れる。増殖を続けるトランスフォームしたヒト胚網膜芽細胞のクローンを増大し、異なるサブグループのE1欠失アデノウイルスベクター、具体的にはBグループウイルス、特にAd35またはAd11から誘導されたものの補体増殖に対する能力を分析した。

#### 【0209】

PER.C6由来の新しいパッケージング細胞株

実施例8で説明したとおり、Ad35-E1発現構築物、例えばpRSV.Ad35.E1の同時トランスフェクションと共に、Ad35 E1欠失ウイルスをPER.C6細胞上に作製および増殖させることができる。しかし、この方法を用いた組換えアデノウイルスの大規模生産は煩雑である。なぜなら、各増幅ステップに対して、Ad35-E1構築物のトランスフェクションが必要だからである。さらに、この方法では、プラスミドとウイルスゲノムとの間での非相同的組換えの危険性が増すと同時に、E1配列を組み込んだ組換えウイルスを作製する可能性が高くなり、複製コンピテントウイルスを生じる。これを避けるために、PER.C6におけるAd35-E1タンパク質の発現を、ゲノム中の発現プラスミドの完全複製により媒介する必要がある。PER.C6細胞は既に形質転換されており、かつAd5-E1タンパク質を発現しているので、さらにAd35-E1発現を加えることは細胞に対して有毒となり得る。しかし、Ad5-E1を発現するA549細胞が作られているので、E1タンパク質を有する転換細胞を安定にトランスフェクトすることも不可能ではない。

#### 【0210】

サブグループBウイルスAd7由来の組換えアデノウイルスを作製する試みにおいて、Abrahamsenら (1997年) はwt Ad7に汚染されずにE1欠失ウイルスを293細胞に作製することはできなかった。293-ORF6細胞のブランク精製後に取り出したウイルス (Broughら、1996年) は、非相同的組換えによりAd7 E1B配列が組み込まれたことを示していた。したがって、Ad7組換えウイルスの効率的増殖によりAd7-E1B発現およびAd5-E4-ORF6発現の存在の可能性

のみが証明された。E1Bタンパク質はウイルスタンパク質と同様に細胞タンパク質と相互作用することが知られている (Bridgeら、1993年; White、1995年)。おそらく、E1B 55Kタンパク質と、ウイルスタンパク質のmRNA放出の増大および細胞mRNAの大半の放出の阻害に必要なE4-ORF6との間で形成された複合体は、臨界的かつある程度血清型に特異である。Ad5のE1Aタンパク質はAd7-E1A欠失を補完することが可能であり、またアデノウイルスパッケージング細胞自体でのAd7-E1B発現は安定な補完細胞株を作製するには十分でないということを前記の実験は示唆している。Ad35-E1Bタンパク質の一方または両方がPER.C6細胞上でのAd35ベクターの効率的増殖の制限因子であるか否かを調査するために、E1BプロモーターおよびE1B配列を含むが、E1Aに対するプロモーターおよびコード領域を持たないAd35アダプタープラスミドを作製した。ここで、製造元の説明書に従い、wtAd35 DNAの左末端を35F1および35R4 (いずれも実施例7で説明した) を用いてPwo DNAポリメラーゼ (Roche) で増幅した。4.6kbのPCR産物をPCR精製キット (LTI) を用いて精製し、SnaBIおよびApaI酵素で消化した。続いて、QIAExIIキット (Qiagen) を用いて、得られた4.2kbフラグメントをゲルから精製した。次に、pAdApt35IP1 (実施例7) をSnaBIおよびApaIで消化し、GeneCleanキット (BIO 101社) を用いて2.6kbのベクターを含むフラグメントをゲルから単離した。単離したフラグメントの両方をライゲートしてpBr/Ad35.left ITR-pIXを得た。PCR中の適正な増幅を次の機能性テストにより確認した。DNAをBstBIで消化して、ベクター配列から挿入したAd35を遊離させ、このDNA 4 μgをNotI消化pWE/Ad35.pIX-r ITR (実施例7) と共にPER.C6細胞に同時トランスフェクトした。2日後にトランスフェクトした細胞をT80フラスコに移し、さらに2日後CPEが形成された。これは機能的E1配列を含む新しいpBr/Ad35.left ITR-pIX構築物を示している。次いで、pBr/Ad35.left ITR-pIX構築物を次のように修飾した。SnaBIおよびHindIIIでDNAを消化し、クレノー酵素を用いて5'HindIIIオーバーハングを補った。消化したDNAの再ライゲートおよびコンピテント細胞 (LTI) への転換により構築物pBr/Ad35.left ITR-pIXE1Aを得た。この後者の構築物は、bp450と1341との間のE1A配列を除いて左末端4.6kbのAd35を有しており、したがってE1AプロモーターおよびE1Aコード配列のほとんどを有していない。次いで、pBr/Ad35.left ITR-pIXE1AをBstBIで消化し、この構築物 2 μgをNotI消化したpWE/Ad35.pIX-r ITR (実施例7) と共にPER.C6細胞に同時トランスフェクトした。トランスフェクト後1週間でトランスフェクトしたフラスコ内に完全CPEを形成した。

#### 【 0 2 1 1 】

この実験から、PER.C6細胞内のAd5-E1A発現によりAd35-E1Aタンパク質が機能的に補完されること、およびPER.C6内のAd5-E1発現によりAd35-E1Bタンパク質の少なくとも1つは補完できないということが示された。さらに、PER.C6内のAd35-E1Bタンパク質を発現することによりAd35 E1欠失ウイルスに対する補完細胞株を作ることができることも示された。PER.C6細胞のゲノムの完全複製からのAd35-E1B配列の安定的な発現は、E1Bプロモーターによって始まり、例えばHBVpAであるが、これに限定されない非相同的ポリアデニル化シグナルにより終了する。非相同pAシグナルはE1B挿入と組換えベクターとの間の重複を避けるために必要である。天然E1B終結はアデノウイルスベクター上に存在すべきpIX転写単位に位置するからである。あるいは、E1B配列は、例えばヒトPGKプロモーターであるが、これに限定されない非相同プロモーターによって始まり、例えば7xtet0プロモーターであるが、これに限定されない誘導プロモーターにより終了する (GossenおよびBujard、1992年)。また、これらの場合において、転写終結を非相同pA配列、例えばHBV pA等により仲介する。Ad35-E1B配列は、wt Ad35配列のヌクレオチド1611と3400との間に位置する、E1B 21KおよびE1B 55Kタンパク質のコード領域の1つを少なくとも含む。また、挿入断片はwt Ad35配列のヌクレオチド1550と1611との間にAd35-E1B配列 (の一部) を含んでもよい。

#### 【 0 2 1 2 】

(実施例15)

初期領域1および初期領域2Aを欠失した組換えアデノウイルスベクターの生産のための産生細胞株の作製

## PER.C6- tTA細胞の作製

ここで、初期領域1 (E1) および初期領域2A (E2A) を欠失した組換えアデノウイルスベクター産生用の細胞株の作製について説明する。産生細胞株は、それぞれE1およびE2A遺伝子の構成性発現によるトランスでの組換えアデノウイルスベクター由来のE1およびE2A欠失を補完する。予め確立されたAd5-E1形質転換ヒト胚網膜芽細胞株PER.C6 (WO 97/00326) にE2A発現カセットをさらに付与した。

## 【0213】

アデノウイルスE2A遺伝子は、一本鎖DNAと高親和性を有する72kDa DNA結合タンパク質をコードする。この特徴のために、DBPの構成性発現は、細胞毒性を示す。ts125E2A変異体は、アミノ酸413でPro Ser置換するDBPをコードする。この変異により、DBPをコードするts125E2Aは、32 の許容温度で完全に活性であるが、39 の非許容温度ではssDNAに結合しない。これにより、39 の非許容温度で機能的でなくかつ毒性を示さないが、32 の許容温度への温度の変更後機能的になるE2Aを構成性発現する細胞株の作製が可能である。温度が下降するにつれて、温度感受性E2Aは次第に機能的になり、許容温度である32の温度において完全に機能的になる。

## 【0214】

A. 野生型E2Aまたは温度感受性ts125E2A遺伝子を発現するプラスミドの作製

pcDNA3wtE2A: 完全な野生型初期領域2A (E2A) コード領域を、供給元 (Boehringer Mannheim) の標準的な手順にしたがって、Expand<sup>TM</sup> Long Template PCRシステムを用い、プライマー-DBPpcr1およびDBPpcr2を用いて、プラスミドpBR/Ad.Bam-rITR (ECACC寄託番号 P97082122) から増幅した。PCRを、次の増幅プログラムを用いてBiometra Trio Thermoblockに行った。94 で2分間を1サイクル、94 で10秒間+51 で30秒間+68 で2分間を1サイクル、94 で10秒間+58 で30秒間、68 で2分間を10サイクル、94 で10秒間+58 で30秒間+68 で2分間およびサイクルごとに10秒間の伸長を20サイクル、68 で5分間を1サイクルである。プライマー-DBPpcr1: CGG GAT CCG CCA CCA TGG CCA GTC GGG AAG AGG AG (5'から3'へ) は、固有のBamHI制限部位 (下線部)、Koza k 配列 (斜体部) の5'およびE2Aコード配列の開始コドンを含む。プライマー-DBPpcr2: CGG AAT TCT TAA AAA TCA AAG GGG TTC TGC CGC (5'から3'へ) は、固有のEcoRI制限部位 (下線部)、E2Aコード配列の終止コドンの3'を含む。太字は、E2Aコード領域由来の配列をいう。PCRフラグメントを、BamHI/EcoRIで消化し、BamHI/EcoRI消化pcDNA3 (Invitrogen) にクローン化し、pcDNA3wtE2Aを得た。

## 【0215】

pcDNA3tsE2A: 完全なts125E2Aコード領域を、温度感受性アデノウイルス変異体H5ts125から単離したDNAから増幅した。PCR増幅の手順は、wtE2Aの増幅の手順と同じである。PCRフラグメントをBamHI/EcoRIで消化し、BamHI/EcoRIで消化したpcDNA3 (Invitrogen) にクローン化して、pcDNA3tsE2Aを得た。wtE2AおよびtsE2Aのコード配列を、配列決定によって確認した。

## 【0216】

B. 32、37 および39 で培養した組換えアデノウイルスベクター産生用の産生細胞の増殖特性

PER.C6細胞を、10%CO<sub>2</sub>雰囲気内、32、37 または39 のいずれかの温度で、10%ウシ胎児血清 (FBS、Gibco BRL) および10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Gibco BRL) で培養した。0日目、全体で1×10<sup>6</sup>のPER.C6細胞を25cm<sup>2</sup>組織培養フラスコ (Nunc) に播種し、細胞を32、37 または39 のいずれかで培養した。1~8日目に細胞を計数した。図30は39におけるPER.C6細胞培養の増殖率および最終細胞密度を37の場合と比較して示す。32におけるPER.C6培養の増殖率および最終密度は37 または39のものと比較して僅かに減少した。顕著な細胞死は、いずれのインキュベーション温度でも観察されなかった。したがって、PER.C6細胞は、それぞれts125E2Aに対する許容温度および非許容温度である39と32の両方で非常に良好に機能する。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 1 7 】

C . E2A発現ベクターによるPER.C6および293のトランスフェクション、コロニー形成および細胞株の産生

トランスフェクション前日に、 $2 \times 10^6$  PER.C6細胞を10%FBSおよび10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったDMEMを収容した6 cm組織培養皿 (Greiner) に播種し、10%CO<sub>2</sub>雰囲気中、37 °C でインキュベートした。翌日、10%CO<sub>2</sub>雰囲気中、39 °C で細胞をトランスフェクトする以外は供給元 (Gibco BRL) の標準手順に従って、LipofectAMINE PLUS™試薬キットを用いて組織培養皿あたり3、5または8 μg のpcDNA3、pcDNA3wtE2AまたはpcDNA3tsE2AプラスミドDNAを細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞をts125E2Aの非許容温度である39 °C に一定して保った。3日後、10%FBS、10mMのMgCl<sub>2</sub>、および0.25mg/mlのG418 (Gibco BRL) を補ったDMEMに細胞を入れ、トランスフェクション10日後に最初のG418耐性コロニーが出現した。表1に示すように、pcDNA3のトランスフェクション後に得られたコロニー全数 (約200コロニー) またはpcDNA3tsE2Aのトランスフェクション後に得られたコロニー全数 (約100コロニー) とpcDNA3wtE2Aのトランスフェクション後に得られたコロニー全数 (わずか4コロニー) との間には著しい差があった。これらの結果は、構成的に発現されたE2Aの毒性がE2A (ts125E2A) の温度感受性突然変異株を用い、かつ細胞を非許容温度である39 °C で培養することによって克服することができることを示している。

10

## 【 0 2 1 8 】

各トランスフェクションから、いくつかのコロニーをピペットで組織培養皿から細胞を擦り取ることにより採取した。続いて、剥がした細胞を24ウェル組織培養皿 (Greiner) に入れ、10%FBS、10mMのMgCl<sub>2</sub>、および0.25mg/mlのG418を補ったDMEM中で、10%CO<sub>2</sub>雰囲気中、39 °C で培養した。表1に示すように、pcDNA3トランスフェクションコロニーの100% (4/4) およびpcDNA3tsE2Aトランスフェクションコロニーの82% (37/45) が安定な細胞株を確立した (残りの8個のpcDNA3tsE2Aトランスフェクションコロニーは徐々に増殖し、破棄された)。対照的に、1個のpcDNA3wtE2Aトランスフェクションコロニーのみが確立することができた。他の3つは採取直後に死滅した。

20

## 【 0 2 1 9 】

次に、異なる細胞株のE2A発現レベルをウェスタンブロッティングによって決定した。細胞株を6ウェル組織培養皿に播種し、準集密的な培養株をPBS (NPBI) で2回洗浄し、RIPA (1%NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、および0.1%SDSを含むPBSであって、さらに1mMフェニルメチルスルホニルフルオリドおよび0.1mg/mlトリプシン阻害剤を補充したPBS) 中に溶解し、こすり取った。氷上で15分間インキュベーションした後、ライセートを遠心分離によって取り除いた。タンパク質濃度は、供給元 (BioRad) の標準手順に従い、Bio-Radタンパク質アッセイによって測定した。等量的全細胞抽出物を10%ゲル上でSDS-PAGEによって分画化した。タンパク質をImmobilon-Pメンブラン (ミリポア) に移し、DBPモノクローナル抗体B6と共にインキュベートした。2次抗体は西洋わさびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体 (BioRad) であった。ウェスタンブロッティング法および抗体のインキュベーションは、ミリポアによって提供された手順に従って実施した。抗体複合体を、製造元 (Amersham) の手順に従ってECL検出システムによって可視化した。図31は、pcDNA3tsE2Aトランスフェクション由来の細胞株全てが72kDaのE2Aタンパク質を発現することを示す (左段のパネル、レーン4~14; 中段のパネル、レーン1~13; 右段のパネル、レーン1~12)。対照的に、pcDNAwtE2Aトランスフェクション由来の細胞株のみがE2Aタンパク質を発現することができなかった (左段のパネル、レーン2)。pcDNA3トランスフェクション由来の細胞株からの抽出物ではE2Aタンパク質が検出されず (左段のパネル、レーン1)、負のコントロールとして用いた。PER.C6細胞の抽出物はpcDNA3ts125によって過渡的にトランスフェクションされ (左段のパネル、レーン3)、ウェスタンブロット法の正のコントロールとして用いた。これらのデータは、wtE2Aの構成的発現が細胞毒性を有し、またこの毒性がE2Aのts125突然変異株を用いることによって回避することができることを確認している。

30

40

50

## 【 0 2 2 0 】

D . 全長ts125E2Aを構成的に発現するPER.C6細胞上のアデノウイルスE2A欠失の補完アデノウイルスAd5.d1802は、E2Aコード領域の主要部分が欠失したAd5由来ベクターであり、機能的DBPを産生しない。Ad5.d1802を、ts125E2Aを構成的に発現するPER.C6細胞のE2Aトランス補完活性を試験するために用いた。親PER.C6細胞またはPER.C6tsE2Aクローン3-9を、10%FBSおよび10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったDMEM中で、39℃、10%CO<sub>2</sub>で25cm<sup>2</sup>フラスコ内で培養し、m.o.i. 5でAd5.d1802による擬似感染または感染のいずれかを行った。続いて、感染細胞を32℃で培養し、細胞を、細胞の形態およびフラスコからの細胞の剥離における変化を測定することで細胞変性効果（CPE）の発現によってスクリーニングした。2日以内にAd5.d1802に感染したPER.C6tsE2Aクローン3-9に完全なCPE発現が行われた。Ad5.d1802に感染したPER.C6細胞または擬似感染細胞には、CPEは発現しなかった。これらのデータは、ts125E2Aを構成的に発現しているPER.C6細胞が許容温度32℃でAd5.d1802ベクターのE2A欠失に対してトランスで補完することを示している。

10

## 【 0 2 2 1 】

E . PER.C6tsE2A細胞株の無血清懸濁培養

ヒト遺伝子治療のために組換えアデノウイルスベクターを大規模で産生することは、任意のヒトまたは動物構成物質を欠いている培地で、産生細胞株、好ましくは懸濁培養の容易かつ拡張可能な培養方法を必要とする。このために、細胞株PER.C6tsE2A c5-9（c5-9と表す）を39℃、10%CO<sub>2</sub>中で10%FBSおよび10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったDMEMを収容した175cm<sup>2</sup>フラスコ（Nunc）で培養した。準集密性（70～80%集密）で、細胞をPBS（NPBI）で洗浄し、培地を1倍L-グルタミン（Gibco BRL）を補った25mlの無血清懸濁培地Ex-cel I™ 525（JRH）（以下SFMと示す）と交換した。2日後、軽く叩くことで細胞をフラスコから剥離し、この細胞を1000rpmで5分間遠心分離した。細胞ペレットを、5mlのSFM中に再懸濁し、0.5ml細胞懸濁液を12mlの新しいSFMとともに、80cm<sup>2</sup>組織培養フラスコ（Nunc）に移した。2日後、細胞を収穫し（全ての細胞が懸濁状態にある）、Burker細胞計数器で計数した。次に、20mlのSFMの全容量において3×10<sup>5</sup>細胞/mlの細胞密度で、細胞を125ml組織培養エルレンマイヤー（Corning）に播種した。細胞を、39℃、10%CO<sub>2</sub>雰囲気内において、125rpmのオービタルシェーカー（GFL）でさらに培養した。1～6日目に細胞をBurker細胞計数器で計数した。図4では、8つの培養から得た平均増殖曲線を示す。PER.C6tsE2A c5-9は、無血清懸濁培養で良好に機能する。培養5日以内に1mlあたり約2×10<sup>6</sup>細胞の最大細胞密度が達成された。

20

30

## 【 0 2 2 2 】

F . 37℃および39℃におけるPER.C6およびPER.C6/E2Aの増殖特性

PER.C6細胞またはPER.C6ts125E2A（c8-4）細胞を37℃（PER.C6）または39℃（PER.C6ts125E2A c8-4）のいずれかの10%CO<sub>2</sub>雰囲気内において、10%ウシ胎児血清（FBS、Gibco BRL）および10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、Gibco BRL）で培養した。0日目、全体で1×10<sup>6</sup>の細胞を25cm<sup>2</sup>組織培養フラスコ（Nunc）に播種し、細胞をそれぞれの温度で培養した。示した時期において、細胞を計数した。37℃におけるPER.C6細胞の増殖は39℃におけるPER.C6ts125E2A c8-4の増殖に匹敵した（図33）。これは、ts125E2AをコードしたDBPの構成的発現は、非許容温度である39℃において細胞の増殖に対して逆効果を有していないことを示している。

40

## 【 0 2 2 3 】

G . PER.C6ts125E2Aの安定性

幾つかの継代に対し、PER.C6ts125E2A細胞株クローン8-4を、39℃、10%CO<sub>2</sub>で、10%FBSおよび10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったDMEMを含む25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコ（Nunc）で、選択圧（G418）無しで培養した。準集密性（70～80%集密）で、細胞をPBS（NPBI）で洗浄し、RIPA（1%NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、および0.1%SDSを含むPBSであって、さらに1mMフェニルメチルスルホニルフルオリドおよび0.1mg/mlトリプシン阻害剤を補充したPBS）中に溶解し、こすり取った。氷上で15分間インキュベーションした後、ライセートを遠心分離によって取り除いた。タンパク質濃度は、供給元（BioRad）の標準手順に従い

50

、Bio-Radタンパク質アッセイによって測定した。等量の全細胞抽出物を10%ゲル上でSDS-PAGEによって分画化した。タンパク質をImmobilon-Pメンブラン（ミリポア）に移し、DBPモノクローナル抗体B6と共にインキュベートした。2次抗体は西洋わさびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体（BioRad）であった。ウェスタンブロッティング法および抗体のインキュベーションは、ミリポアによって提供された手順に従って実施した。抗体複合体を、製造元（Amersham）の手順に従ってECL検出システムによって可視化した。少なくとも16継代にわたり、ts125E2AをコードしたDBPの発現は安定であった。これはおよそ40細胞倍加に相当する（図34）。この培養期間においてDBPレベルの減少は観察されず、G418選択圧が無い場合においてさえもts125E2Aの発現が安定であることが示された。

10

## 【0224】

(実施例16)

tTA発現パッケージング細胞株の作製

A. tTA遺伝子を発現するプラスミドの作製

pcDNA3.1-tTa: tTA遺伝子、tetRおよびVP16遺伝子の融合体を、制限酵素BamHIおよびEcoRIを用いた消化により、プラスミドpUHD15-1から取り除いた（GossenとBujard、1992年）。まず、pUHD15-1をEcoRIで消化した。dNTPsの存在下で線状プラスミドをクレノー酵素で処理し、EcoRI付着末端を塞いだ。次に、プラスミドをBamHIで消化した。得られた長さ1025bpのフラグメントをアガロースから精製した。続いて、このフラグメントをBamHI/EcoRVで消化したpcDNA 3.1HYGRO(-)（Invitrogen）とのライゲーション反応に用いて、pcDNA3.1-tTAを得た。コンピテントなE.Coli DH5（Life Tech.）への転換、およびアンピシリン耐性コロニーの分析の後、pcDNA3.1-tTAに期待される消化パターンを示す一つのクローンを選択した。

20

## 【0225】

B. tTA発現ベクターによるPER.C6およびPER.C6/E2Aのトランスフェクション、コロニー形成および細胞株の作製

トランスフェクション前日に、 $2 \times 10^6$ のPER.C6細胞またはPER.C6/E2A細胞を10%FBS（JRH）および10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったダルベッコ改変基本培地（DMEM、Gibco BRL）を収容した60mm組織培養皿（Greiner）に播種し、10%CO<sub>2</sub>雰囲気中、37℃でインキュベートした。翌日、供給元（Gibco BRL）の標準手順に従って、LipofectAMINE PLUS™を用いて4~8μgのpcDNA3.1-tTAプラスミドDNAを細胞にトランスフェクトした。この細胞をLipofectAMINE PLUS™-DNA混合物とともに37℃、10%CO<sub>2</sub>で4時間インキュベートした。次いで、20%FBSおよび10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったDMEMを2ml加え、37℃、10%CO<sub>2</sub>で細胞をさらにインキュベートした。翌日、細胞をPBSで洗浄し、10%FBSおよび10mMのMgCl<sub>2</sub>を補った新しいDMEMで、10%CO<sub>2</sub>雰囲気中37℃（PER.C6）または39℃（PER.C6/E2A）のいずれかで3日間インキュベートした。その後、培地を選択培地に交換した。PER.C6細胞は10%FBS、10mMのMgCl<sub>2</sub>および50μg/mlのハイグロマイシンB（GIBCO）を補ったDMEMでインキュベートし、一方、PER.C6/E2A細胞は10%FBS、10mMのMgCl<sub>2</sub>および100μg/mlのハイグロマイシンBを補ったDMEM中に維持した。選択耐性のある細胞のコロニーは3週間以内に現れたが、非耐性細胞はこの期間内に死滅した。

30

40

## 【0226】

各トランスフェクションから、ピペットで皿から細胞を擦り取ることによりいくつかの独立のハイグロマイシン耐性細胞のコロニーを採取し、2.5cm<sup>2</sup>の皿（Greiner）に入れ、10%FBS、10mMのMgCl<sub>2</sub>を含み、かつ50μg/ml（PER.C6細胞）または100μg/ml（PER.C6/E2A細胞）のハイグロマイシンを補ったDMEM中で、それぞれ37℃または39℃、10%CO<sub>2</sub>雰囲気中で培養した。

## 【0227】

次に、これらのハイグロマイシン耐性細胞のコロニーが機能的tTAタンパク質を発現するか否かを調べた。すなわち、PER.C6/tTA細胞またはPER/E2A/tTA細胞の培養液を7xtetOプロモーターの制御下でレポーター遺伝子ルシフェラーゼを含有するプラスミドpUHC13-3で

50

トランスフェクトした (GossensとBujard、1992年)。ルシフェラーゼの発現がtTAにより媒介されることを示すため、培養液の半分をドキシサイクリンが入っていない培地中に維持した。残りの半分を8  $\mu\text{g/ml}$ のドキシサイクリン (Sigma)を入れた培地中に維持した。後者の薬剤はテトラサイクリンの類似物であり、tTAと結合し、その活性を阻害する。PER.C6/tTAおよびPER/E2A/tTAの全ての細胞株が高いルシフェラーゼレベルを生じた。これは、全ての細胞株がtTAタンパク質を発現したことを示している (図35)。さらに、ドキシサイクリンで細胞を処理した場合、ルシフェラーゼの発現は大幅に抑制された。まとめると、単離され確立されたハイグロマイシン耐性PER.C6およびPER/E2A細胞クローンは全て機能的tTAを発現したことをデータは示している。

【0228】

【表1】

血清型	溶出[NaCl] mM	VP/ml	CCID50	Log <sub>10</sub> VP/CCID50
1	597	8.66×10 <sup>10</sup>	5.00×10 <sup>7</sup>	3.2
2	574	1.04×10 <sup>12</sup>	3.66×10 <sup>11</sup>	0.4
3	131	1.19×10 <sup>11</sup>	1.28×10 <sup>7</sup>	4.0
4	260	4.84×10 <sup>11</sup>	2.50×10 <sup>8</sup>	3.3
5	533	5.40×10 <sup>11</sup>	1.12×10 <sup>10</sup>	1.7
6	477	1.05×10 <sup>12</sup>	2.14×10 <sup>10</sup>	1.7
7	328	1.68×10 <sup>12</sup>	2.73×10 <sup>9</sup>	2.4
9	379	4.99×10 <sup>11</sup>	3.75×10 <sup>7</sup>	4.1
10	387	8.32×10 <sup>12</sup>	1.12×10 <sup>9</sup>	3.9
12	305	3.64×10 <sup>11</sup>	1.46×10 <sup>7</sup>	4.4
13	231	4.37×10 <sup>12</sup>	7.31×10 <sup>8</sup>	3.8
15	443	5.33×10 <sup>12</sup>	1.25×10 <sup>9</sup>	3.6
16	312	1.75×10 <sup>12</sup>	5.59×10 <sup>8</sup>	3.5
17	478	1.39×10 <sup>12</sup>	1.45×10 <sup>9</sup>	3.0
19	430	8.44×10 <sup>11</sup>	8.55×10 <sup>7</sup>	4.0
20	156	1.41×10 <sup>11</sup>	1.68×10 <sup>7</sup>	3.9
21	437	3.21×10 <sup>11</sup>	1.12×10 <sup>8</sup>	3.5
22	365	1.43×10 <sup>11</sup>	5.59×10 <sup>7</sup>	3.4
23	132	2.33×10 <sup>11</sup>	1.57×10 <sup>7</sup>	4.2
24	405	5.12×10 <sup>12</sup>	4.27×10 <sup>8</sup>	4.1
25	405	7.24×10 <sup>11</sup>	5.59×10 <sup>7</sup>	4.1
26	356	1.13×10 <sup>12</sup>	1.12×10 <sup>8</sup>	4.0
27	342	2.00×10 <sup>12</sup>	1.28×10 <sup>8</sup>	4.2
28	347	2.77×10 <sup>12</sup>	5.00×10 <sup>7</sup>	4.7
29	386	2.78×10 <sup>11</sup>	2.00×10 <sup>7</sup>	4.1
30	409	1.33×10 <sup>12</sup>	5.59×10 <sup>8</sup>	3.4
31	303	8.48×10 <sup>10</sup>	2.19×10 <sup>7</sup>	3.6
33	302	1.02×10 <sup>12</sup>	1.12×10 <sup>7</sup>	5.0
34	425	1.08×10 <sup>12</sup>	1.63×10 <sup>11</sup>	0.8
35	446	3.26×10 <sup>12</sup>	1.25×10 <sup>11</sup>	1.4
36	325	9.26×10 <sup>12</sup>	3.62×10 <sup>9</sup>	3.4
37	257	5.86×10 <sup>12</sup>	2.8×10 <sup>9</sup>	3.3
38	337	3.61×10 <sup>12</sup>	5.59×10 <sup>7</sup>	4.8
39	241	3.34×10 <sup>11</sup>	1.17×10 <sup>7</sup>	4.5
42	370	1.95×10 <sup>12</sup>	1.12×10 <sup>8</sup>	4.2
43	284	2.42×10 <sup>12</sup>	1.81×10 <sup>8</sup>	4.1
44	295	8.45×10 <sup>11</sup>	2.00×10 <sup>7</sup>	4.6
45	283	5.20×10 <sup>11</sup>	2.99×10 <sup>7</sup>	4.2
46	282	9.73×10 <sup>12</sup>	2.50×10 <sup>8</sup>	4.6
47	271	5.69×10 <sup>11</sup>	3.42×10 <sup>7</sup>	4.2
48	264	1.68×10 <sup>12</sup>	9.56×10 <sup>8</sup>	3.3
49	332	2.20×10 <sup>12</sup>	8.55×10 <sup>7</sup>	4.4
50	459	7.38×10 <sup>12</sup>	2.80×10 <sup>9</sup>	3.4
51	450	8.41×10 <sup>11</sup>	1.88×10 <sup>8</sup>	3.7

実施例1で記載したとおり、中和化実験に用いた全てのヒトアデノウイルスをPER.C6細胞（ECACC寄託番号96022940）に産生し（Fallauxら、1998年）、CsClで精製した。HPLCカラムから異なる血清型が溶出するNaCl濃度を示した。ウイルス粒/ml（VP/ml）をAd5水準から計算した。実施例1で記載したとおり、中和化実験と並行して滴定を行って、実験の力価（CCID50）をPER.C6細胞（ECACC寄託番号96022940）上で測定した。本実験に用いた

10

20

30

40

50

44のウイルスに対するCCID50を示した。これは5日後に50%のウエルにおいてCPEを得るのに必要なウイルスの希釈率を示している。VP/CCID50の比を $\log_{10}$ で示した。これはPER.C6細胞( ECACC寄託番号96022940 )の異なるバッチの感染力の測定値である。

【0229】

【表2】

ヒト血清により中和化を免れたAdApt35.LacZウイルスである。

ウイルス	ヒト血清希釈率					
	無血清	10倍	50倍	250倍	1250倍	6250倍
AdApt5.LacZ moi: 5 VP/細胞	100%	0%	0%	1%	40%	80%
AdApt35.LacZ 250 $\mu$ l粗製 ライセート	100%	100%	100%	100%	100%	100%

10

【0230】

【表3】

異なる血清型のwtアデノウイルスに対する中和活性(NA)を有する滑液サンプルの割合である。

20

	NAを有する滑液サンプルの割合(全て陽性)	NAを有する滑液サンプルの割合(希釈率64倍以上で陽性)
Ad5	72	59
Ad26	66	34
Ad34	45	19
Ad35	4	0
Ad48	42	4

30

【0231】

【表4】

BRK形質転換実験における異なるE1発現構築物で得られた病巣の数である。

## 病巣／皿の平均値

	構築物	1 $\mu$ g	5 $\mu$ g
実験 1	pIG.E1A.E1B	nd	60
	pIG.E1A.E1B	nd	35
	pRSVAd35E1	0	3
	pIG.Ad35.E1	3	7
実験 2	pIG.E1A.E1B	37	nd
	pIG.Ad35.E1	nd	2
実験 3	pIG.E1A.E1B	nd	140
	pIG.Ad35.E1	nd	20
	pIG270	nd	30

10

## 【 0 2 3 2 】

(参考文献)

Abrahamsen, K., Kong, H-L., Mastrangeli, A., Brough, D., Lizonova, A., Crystal, R. and Falck-Pedersen, E. (1997). Construction of an adenovirus type 7a E1A-vector. *J. Virol.* 71, no. 11, p8946-8951.

20

Athappilly, F. K., Murali, R., Rux, J. J., Cai, Z. and Burnett, R. M. (1994). The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 242,430-455.

Basler, C. F., Droguett, G., Horwitz, M. S. (1996). Sequence of the immunoregulatory early region 3 and flanking sequences of adenovirus type 35. *Gene* 170: 249-54.

Bridge, E., Medghalchi, S., Ubol, S., Leesong, M. and Ketner, G. (1993) Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis. *Virology* 193,794-801.

Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) Adenovirus mediated in vivo gene transfer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716: 90-101.

30

Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein B. and Schaffner W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41,521-530.

Dijkema, R., Dekker, B. M. M., van der Feltz, M. J. M. and van der Eb, A. J. (1979). Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses. *J. Virol.* 32, No 3,943-950.

Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., Valerio, D. and Hoeben, R. C. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9,1909-1917.

40

Gossen, M., and H. Bujard (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracyclin-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89; 5547-5551.

Flomenberg, P. R., Chen, M., Munk, G., Horwitz, M, S. (1987). Molecular epidemiology of adenovirus type 35 infections in immunocompromised hosts. *J. Infect Dis.* 155 (6): 1127-34.

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. and Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2:140-144.

50

- Gahery-Segard, H., Farace, F., Godfrin, D., Gaston, J., Lengagne, R., Tursz, P., Boulanger, P. and Guillet, J.-G. (1998). Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: Antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralising activity. *J. Virol.* 72, 2388-2397.
- He, T.-C., Zhou, S., Da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2509-2514.
- Hierholzer, J. C., Wigand, R., Anderson, L. J., Adrian, T., and Gold, J. W. M. (1988) Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J. Infect. Dis.* 158, 804-813. 10
- De Jong, P. J., Valderrama, G., Spigland, I. and Horwitz, M. S. (1983). Adenovirus isolates from urine of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet* 1 (8337): 1293-1296.
- Kay, R., Takei, F., and Humphries, R. K. (1990). Expression cloning of a cDNA encoding M1/69. *J. Immunol.* 145, 1952-1959.
- Kang, W. G., Berencsi, G., Takacs, M., Ascher, Z., Fejer, G., Nasz, I. (1989a). Molecular cloning and physical mapping of the DNA of human adenovirus type 35. *Acta Microbiol Hung* 36 (1) : 67-75.
- Kang, W. G., Berencsi, G., Banrevi, A., Ascher, Z., Fejer, G., Takacs, M., Kiss, A., Nasz, I. (1989b). Relationship of E1 and E3 regions of human adenovirus 35 to those of human adenovirus subgroups A, C and D. *Acta Microbiol Hung* 36 (4): 445-57. 20
- Levrero, M., Barban, V., Manteca, S., Ballay, A., Balsamo, C., Avantaggiati, M. L., Natoli, G., Skellekens, H., Tiollais, P., and Perricaudet, M. (1991). Defective and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes in vitro and in vivo. *Gene* 101, 195-202.
- Li, Q. G., Hambræus, J. and Wadell, G. (1991). Genetic relationship between thirteen genomes of types of adenovirus 11, 34, and 35 with different tropisms. *Intervirology* 32,338-350. 30
- Prince, H. M. (1998). Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology* 30 (4), 335-347.
- Robbins, P. D. and Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* 80, 35-47.
- Schnurr, D and Dondero, M. E. (1993). Two new candidate adenovirus serotypes. *Intervirology* 36, 79-83.
- +
- Schulick, A. H., Vassalli, G., Dunn, P. F., Dong, G., Rade, J. J., Zamarron, C. and Dichek, D. A. (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J. Clin. Invest.* 99(2), 209-219 40
- Shabram, P. W., Giroux, D. D., Goudreau, A. M., Gregory, R. J., Horn, M. T., Huyghe, B. G., Liu, X., Nunnally, M. H., Sugarman, B. J. and Sutjipto, S. (1997) Analytical anion-exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles. *Hum. Gene Ther.* 8(4): 453-465.
- Toogood et al., 1989; *J. Gen Virol.* 70, 3203-3214
- Toogood, C. I., Murali, R., Burnett, R. M., Hay, R. T. (1989). The adenovirus type 40 hexon: sequence, predicted structure and relationship to other adenovirus hexons. *J. Gen. Virol.* 70, 3203-14.
- Valderrama-Leon, G., Flomenberg, P., Horwitz, M. S. (1985). Restriction endonuclease 50

ease mapping of adenovirus 35, a type isolated from immunocompromised hosts. *Jvirol.* 56 (2): 647-50.

Wadell, G. (1984). Molecular epidemiology of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110,191-220.

White, E. (1995) Regulation of p53-dependent apoptosis by Ela and Elb. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199, 34-58.

【図面の簡単な説明】

【図 1】 調査した各ヒトwtアデノウイルスの中和化に対して陽性である血清サンプルの割合を示す棒グラフである（中和化アッセイの説明については実施例 1 を参照のこと）。

【図 2】 VP/CCID50比と中和化割合との間に関係が無いことを示すグラフである。

【図 3】 Ad35 (Kangら、1989年より引用) および組換えAd35ベースのウイルスを作るために作製したクローンの部分制限マップの略図である。

【図 4】 アデノウイルス血清型の選択に対する中和活性を示す血清サンプルの割合を示す棒グラフである。血清はベルギーおよび英国の健康な志願者から得た。

【図 5】 アデノウイルス血清型 5、11、26、34、35、48 および 49 に対する中和活性を示す血清サンプルの割合を示す棒グラフである。血清はヨーロッパおよびアメリカの異なる 5 箇所から得た。

【図 6】 ヒトアデノウイルス 35 の配列である。明細書で説明したとおり、ウイルスの末端のヌクレオチド配列は正確には解明されていない。

【図 7】 pAdApt のマップである。

【図 8】 pIPspAdapt のマップである。

【図 9】 pIPspAdapt1 のマップである。

【図 10】 pIPspAdapt3 のマップである。

【図 11】 pAdApt35IP3 のマップである。

【図 12】 pAdApt35IP1 のマップである。

【図 13】 pWE.Ad35.pIX-rITR 構築のために取られたステップの略図である。

【図 14】 pWE.Ad35.pIX-rITR のマップである。

【図 15】 pRSV.Ad35-E1 のマップである。

【図 16】 PGKneopA のマップである。

【図 17】 pRSVpNeo のマップである。

【図 18】 pRSVhvbvNeo のマップである。

【図 19】 ヒトTF-1細胞における緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現に対するフローサイトメトリー分析である。非形質導入TF-1細胞を用いてバックグラウンドレベルを 1% にした。Ad5、Ad5.Fib16、Ad5.Fib17、Ad5.Fib40-L、Ad5.Fib35 および Ad5.Fib51 で形質導入した細胞における GFP 発現を示す。

【図 20】 プライマリーヒト繊維芽細胞様ストローマの形質導入である。異なるキメラ繊維ウイルスに 2 時間曝した後 48 時間で細胞を分析した。フローサイトメーターを用い、導入遺伝子である緑色蛍光タンパク質 (GFP) に対して陽性を示した細胞の割合を示す。非形質導入ストローマ細胞を用いてバックグラウンドを 1% とした。異なる実施例 (n = 3) の結果を ± 標準偏差で示す。

【図 21】 一次ヒト繊維芽細胞様ストローマ CD34<sup>+</sup>細胞および CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞の形質導入である。異なるキメラ繊維ウイルスに 2 時間曝した後 5 日で細胞を分析した。フローサイトメーターを用い、導入遺伝子である緑色蛍光タンパク質 (GFP) に対して陽性を示した細胞の割合を示す。非形質導入細胞を用いてバックグラウンドを 1% とした。また、GFP 陽性数を総分析数で除した結果 (括弧内) も示す。

【図 22A】 22a は CD34<sup>+</sup>細胞を Ad5.Fib51 で形質導入した後の GFP 陽性細胞のフローサイトメトリー分析である。R2 ~ R7 で囲まれた細胞は全て CD34 に対して陽性であるが、これらの細胞は早期分化マーカー CD33、CD38 および CD71 (Lin) の発現において異なる。R2 内の細胞は CD33、CD38 および CD71 に対して陰性であるが、R7 内の細胞はこれらのマーカーに対して陽性である。Ad5.Fib51 の特異性を示すために、GFP 陽性細胞の割合を R2 ~ R7 内で

10

20

30

40

50

測定した。その結果、91% (R2) から15% (R7) へと減少した。

【図22B】 22bは(a)と同様の実験を行ったものである(X軸はR2~R7)。但し、Ad5.Fib51と同様の挙動をするAd5.Fib35およびAd5.Fib16を示す他のAd繊維キメラウイルスを用いた。

【図23】 Ad5繊維配列と、Ad5fib16、Ad5fib35およびAd5fib51のキメラ繊維タンパク質のアライメントである。

【図24】 アデノウイルスに未分化ヒト骨髄細胞および幹細胞を曝した毒性である。アデノウイルス形質導入直前および5日後に細胞株を計数した。回収した未分化ヒト骨髄細胞(CD34<sup>+</sup>)およびHSCs(CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>)を0日目と比較して示す。

【図25】 1細胞当たり100または1000ウイルス粒子のウイルス投与量での未熟DCの形質導入である。検査したウイルスはAd5およびAd5ベースのベクターで、血清型12(Ad5.Fib12)、16(Ad5.Fib16)、28(Ad5.Fib28)、32(Ad5.Fib32)、長繊維組織40(Ad5.Fib40-L)、49(Ad5.Fib49)、51(Ad5.Fib51)の繊維組織を保有するベクターである。ルシフェラーゼ導入遺伝子発現をタンパク質1マイクログラム当たりの相対発光量として表す。

【図26】 Ad5または繊維キメラベクターAd5.Fib16、Ad5.Fib40-LもしくはAd5.Fib51の1細胞当たり1000ウイルス粒で形質導入した未熟および成熟DCのLacZ発現のフローサイトメトリー分析である。陽性を示した細胞の割合を各ヒストグラムの上隅に示した。

【図27】 1細胞当たり1000または5000ウイルス粒で形質導入した後48時間で測定したヒト未熟DCにおけるルシフェラーゼ導入遺伝子の発現である。検査したウイルスはサブグループB(血清型11、16、35および51)の繊維組織を保有する繊維キメラウイルスであった。

【図28】 Ad5、Ad5.Fib16およびAd5.Fib35の1細胞当たり1000ウイルス粒で形質導入した後48時間のヒト未熟DCにおける緑色蛍光タンパク質(GFP)発現である。非形質導入細胞を用いてバックグランドレベルを約1%(-)にした。

【図29】 マウスおよびチンパンジーDCの形質導入である。形質導入後48時間にマウスDCで測定したルシフェラーゼ導入遺伝子発現をタンパク質1マイクログラム当たりの相対発光量として表す。フローサイトメーターを用いて形質導入後48時間でチンパンジーのDCを測定した。GFP発現はAd5.Fib35(66%)に対して、Ad(35)の形質導入が低いことを示している。

【図30】 PER.C6細胞の温度依存増殖である。10%CO<sub>2</sub>雰囲気中、32、37または39のいずれかで10%ウシ胎児血清(FBS、Gibco BRL)および10mMのMgCl<sub>2</sub>を補ったダルベッコ改変イーグル培地中でPER.C6細胞を培養した。0日目に、合計1×10<sup>6</sup>のPER.C6細胞を25cm<sup>2</sup>の細胞培養フラスコ(Nunc)に播種し、細胞を32、37または39のいずれかで培養した。1~8日目に細胞を計数した。39におけるPER.C6細胞培養の増殖率および最終細胞密度を37におけるものと比較した。32におけるPER.C6細胞培養の増殖率および最終密度は37または39のものとは比較して僅かに減少した。

PER.C6細胞を25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコ当たり密度1×10<sup>6</sup>細胞で播種し、32、37または39のいずれかで培養した。示した時期において、細胞をBurker細胞計数器で計数した。PER.C6は32、37および39の何れにおいても良好に増殖した。

【図31】 pcDNA3、pcDNA3wtE2AまたはpcDNA3ts125E2AでトランスフェクトしたPER.C6細胞のDBPレベルである。

等量的全細胞抽出物を10%ゲル上でSDS-PAGEによって分画化した。タンパク質をImmobilon-Pメンブランに移し、DBPモノクローナル抗体B6を用いECL検出システムによってDBPタンパク質を可視化した。pcDNA3tsE2Aトランスフェクション由来の細胞株全てが72kDaのE2AをコードしたDBPタンパク質を発現することを示す(左段のパネル、レーン4~14;中段のパネル、レーン1~13;右段のパネル、レーン1~12)。対照的に、pcDNA3wtE2Aトランスフェクション由来の細胞株はDBPタンパク質を発現することができなかった(左段のパネル、レーン2)。pcDNA3トランスフェクション由来の細胞株からの抽出物ではDBPタンパク質が検出されず(左段のパネル、レーン1)、負のコントロールとして用い

10

20

30

40

50

た。PER.C6細胞の抽出物はpcDNA3ts125によって過渡的にトランスフェクションされ（左段のパネル、レーン3）、ウェスタンブロット法の正のコントロールとして用いた。これらのデータは、wtE2Aの構成的発現が細胞毒性を有し、またこの毒性がE2Aのts125突然変異株を用いることによって回避することができることを確認している。

【図3 2】 PER.C6ts125E2A C5-9の懸濁増殖である。

細胞株PER.C6tsE2A.c5-9を無血清Ex-cell™の懸濁液で培養した。示した時期において、細胞をBerker細胞計数器で計数した。8つの独立した組織培養の結果を示す。PER.C6tsE2Aは、無血清Ex-cell™培地の懸濁液で良好に増殖する。

【図3 3】 PER.C6およびPER.C6tsE2Aの増殖曲線である。

PER.C6細胞またはPER.C6ts125E2A（c8-4）細胞をそれぞれ37 または39 で培養した。0日目、全体で $1 \times 10^6$ の細胞を25cm<sup>2</sup>組織培養フラスコ（Nunc）に播種した。示した時期において、細胞を計数した。37 におけるPER.C6細胞の増殖は39 におけるPER.C6ts125E2A c8-4の増殖に匹敵した。これは、ts125E2Aの構成的過剰発現は、非許容温度である39 において細胞の増殖に対して逆効果を有していないことを示している。

【図3 4】 PER.C6ts125E2Aの安定性である。

幾つかの継代に対し、PER.C6ts125E2A細胞株クローン8-4を39 で、G418を含まない培地中で培養した。等量的全細胞抽出物を10%ゲル上でSDS-PAGEによって分画化した。タンパク質をImmobilon-Pメンブランに移し、DBPモノクローナル抗体B6を用い、ECL検出システムによってDBPタンパク質を可視化した。少なくとも16継代にわたり、ts125E2AをコードしたDBPの発現は安定であった。これはおよそ40細胞倍加に相当する。この培養時間においてDBPレベルの減少は観察されず、G418選択圧が無い場合においてさえもts125E2Aの発現が安定であることが示された。

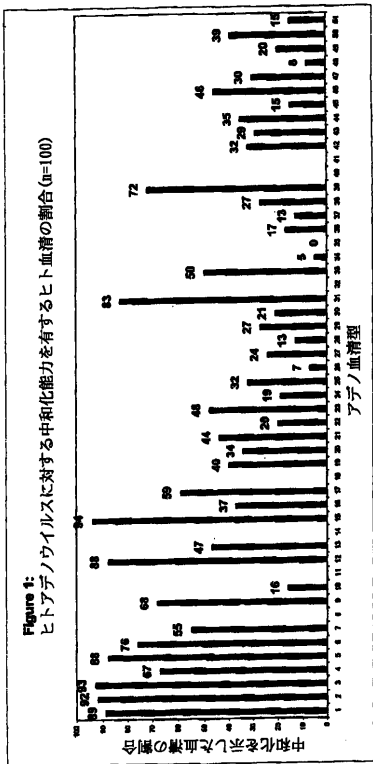
【図3 5 A】 図3 5 Aはハイグロマイシン耐性のPER.C6/tTA細胞（A）におけるtTA活性である。

16の独立なハイグロマイシン耐性PER.C6/tTA細胞コロニーと23の独立なハイグロマイシン耐性PER/E2A/tTA細胞コロニーとを10cm<sup>2</sup>ウエルで増殖し手準集密的にし、2μgのpUHC 13-3（7xtet0プロモーターの制御下でレポーター遺伝子ルシフェラーゼを含有するプラスミド）でトランスフェクトした。細胞培養液の半分をドキシサイクリンの入っていない培地中に維持し、tTAの活性を阻害した。トランスフェクション後48時間で細胞を収穫し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はタンパク質1μg当たりの相対発光量で示す。

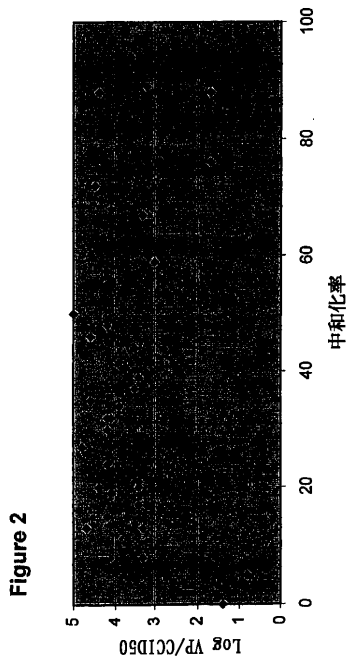
【図3 5 B】 図3 5 BはPER/E2A/tTA細胞（B）におけるtTA活性である。

16の独立なハイグロマイシン耐性PER.C6/tTA細胞コロニーと23の独立なハイグロマイシン耐性PER/E2A/tTA細胞コロニーとを10cm<sup>2</sup>ウエルで増殖し手準集密的にし、2μgのpUHC 13-3（7xtet0プロモーターの制御下でレポーター遺伝子ルシフェラーゼを含有するプラスミド）でトランスフェクトした。細胞培養液の半分をドキシサイクリンの入っていない培地中に維持し、tTAの活性を阻害した。トランスフェクション後48時間で細胞を収穫し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はタンパク質1μg当たりの相対発光量で示す。

【 図 1 】

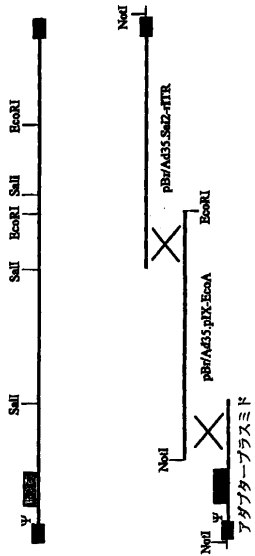


【 図 2 】

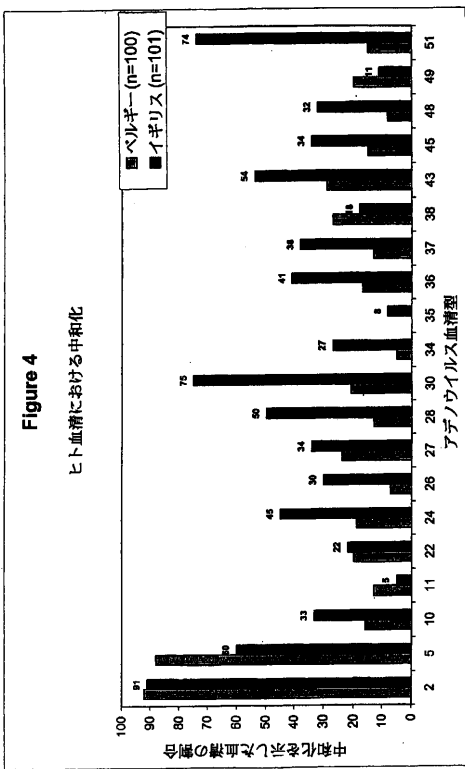


【 図 3 】

Figure 3: ウイルス産生に対するAdB5プラスミドベースのシステム



【 図 4 】



【図5】

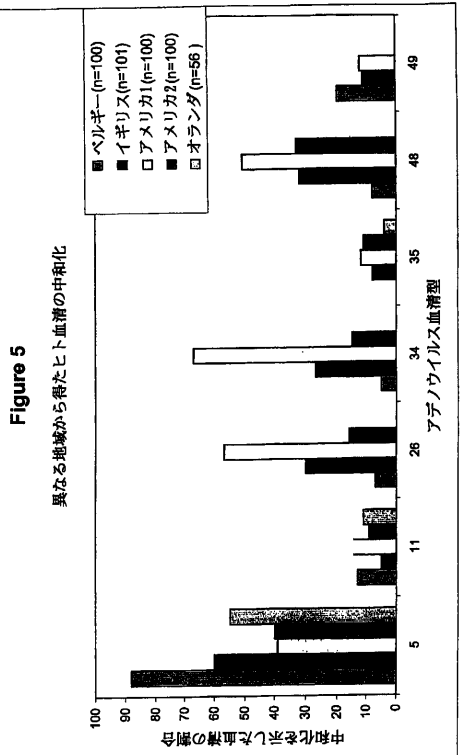


Figure 6, contd.

4341 TGGGTTTCAT TTATBAAGGA CTACCAAGAC GGTATCTCCG ATCAATTTAG GTGCACGTTG  
 4411 GATGAAAAGG CDTGAAAAA TTTGAGACCA CCTTGTGTCT ATCGAATTTT TCCATGACAG  
 4481 TAATACAAAT GGGGCGCTGG GCACCCGCCG GGGGAAACAC GTTCCGTGCG TCTGACACAT  
 4561 TTCTTGAGTT AAATCTCATC AAGCATTTTT AATGAATTTG GGGCGGAGCG TACCAGATTG  
 4621 GTTCTCTCG CCCLCGAGCG AATCTTCTCC TCACAGATTT GCAATTTCCG AGCTTTTCCG  
 4681 GAATCATCTC CACTGGGGCC CACTTASASA ACAGCTGTTT GGCCGCGGCG GTTATAGT  
 4761 CAAGTTTCTG ACGAATTGAG ATTGCGACA TCCGGTGGGG CCATAAATAA TTTCCATCAT  
 4831 TGGATTTTAA GGGACGGCGA ATCTGGCTCT TCTCGAAGCA AGGGGGACAC CTCTGTATC  
 4901 CATGCAATTT TCGTGGACC AAATCAATTA GGAAGGGTCC TCTCTAGTAT AGGATATAG  
 4971 GGAAAGGTTT TTAGCCGGTT TTAGCCGTCG AGCCATGGCC ATTTTGGAAA GAGTTTGGCT  
 5041 AGCTGTTCAG ACTCAATCTG TGTGGGAGA ACTCTGTAGC GATCCAGCAC ACCCTTCCGT  
 5111 TGGAGGGCTC CTGGATAGG BTAAGAGAG ATGGCGTCC AGCCCTGCC GRTTGGTCTC  
 5181 TCGAGTTC TGATCAGGTT TTTTCCGCTC ACGATGAGCG GGTGTGGCGC TCTTGGGGCG  
 5261 TGGCTTTGAG ACTCAATCTG TGTGGGAGA ACTCTGTAGC GATCCAGCAC ACCCTTCCGT  
 5321 GTTTCACATG AGTTGGTCCG ATAGGSCCTC GGCTTCGCTGG CCTTTGGGCC TTGGAAGGTT  
 5391 TTCTTGACAT CGCGGACGTA TGGCATTTCT ACGCAATGAC CTTGGGCGCG ABAAGAAATG  
 5461 AGTATGCATC CGGCGCCGAC GAGGCGCAA CAOTTTTACA TTTCCACAGC CAGGTTAAAT  
 5531 GGGGTCAAAA ACAAGTTTTC CCGCATATTT TTTGATGCTG TTTTACCTTT TGGTTCCTAT  
 5601 TGTGTTTTG TGAACAAGAG CBTGTGCTA TCTCGTAGA CTGATTTTAA ABBGCTCTTC  
 5671 TGGCTCGCTC TTTCTGATC AAGAACTCTG ACCACTCTGA TCAAAAGGCC CGGCTGGAGC  
 5741 GGGGTCAAAA ACAAGTTTTC CCGCATATTT TTTGATGCTG TTTTACCTTT TGGTTCCTAT  
 5811 ATGTCACCTC CTTCAGCTC CAGATAGTG ATTGGCTGTG ABBGCTCTTC TCGAGTGGAG  
 5881 TGGGCGCTC TTTCTGATC AAGAACTCTG ACCACTCTGA TCAAAAGGCC CGGCTGGAGC  
 5951 CAAGTGTGTT GGTGATATT CCTCTCGAA GGGCGGATG ACTCTGACG TCAAGTGTCT  
 6021 ACGGAGAGG ATTTGATTT GACAGTCCG GTTGGATCG CTTTCATGAG GTTTCGCTC  
 6091 AAAACAACAT TTTTATAGT TCAAGTGTG TGGCAATGTA TCCATACAGG GCGTGGTATA  
 6161 AATGATGCTC AAGTGTGTT TCTTTTCTC GTTCCGCGCG CTTITGGCGC GATGTTGAG  
 6231 TGGGTGCA GGCATCTCA TTGSSGAG ATGTTGTTA ATCTATCTG GATCAGTCTC  
 6301 TCGATATTG AAATCAACG AAGCGATGAC TCGCGTCCAC CTTGCTGATC TGGTCCACA  
 6371 GAAGTACTCT CTTTTCTGAC ACGAAGAGG GGGAAATGGG TTAGCATATA GTTACTGCGG  
 6441 TCCATGTTAA AGATTTCCGG AGTAATCTC TTATCAAAAT TCTCAAAAT AGCTGATGAG  
 6511 TTTGTCATC TGGGTTGCG ATGTCGCTC CATATGSET AAGGGATGAC CCGAGGGTCA  
 6581 GAGAGCAGAG GCATACATCG CACAGATCTA ATAGAGCTAG ATGGATCTC CAAGAAGTCG  
 6651 GAATAGCATC GLLCCCTCTC GATCTTGTG CCGACATAGT CATATAGTGT ATGTTAGTGG  
 6721 CGGAGCCCA GTGGTGGCA TGGTTTTTT TGTGTGTGA GAGCATCTG CBAAGATAGT  
 6791 GGAAGAGATG GTGGGTTCTT GAAAATGTT GAAAAGGCGA TGAGGTAGAC CTTAGCAAAA  
 6861 TGGATTAAG TCTTTGAGG CTTTGTAGC AGTTTGGCGG TGACAATGAT TCTGAGGCC  
 6931 GTTGTGTTG AATGATGTA TACGTTGTT GTTGTGTTT TTCCACAGT TCGCGTTTGA  
 7001 TCGCGATCC TTTGAGTCT CTTTACGCG AACCCCTCTA CTTTTTCTG AGGCGGGTCT  
 7071 AACTGATTA TCTCTGTA ABBGACAGC CCTTGTCTA CCGGTAGAGA GTATCTGATC  
 7141 ATAGCAAGC GTGAGTAGC SCAAAAGTGT CTTGACCAT GACTTTGAGA AATTGATTT  
 7211 CTGCTGATCC GTCCTGTTT CCGAGATGT GAACTTACT CTTTTTCTG AGGCGGGTCT  
 7281 AAGTACACAT CATTGAGAG AATTCTACCG CTTGCGGCA CAAAATGCG AGTATGCGG  
 7351 GTCACGGCT CCGATGTA TCTTTCGAG GATTTGGCG GATTTGGCG AAGCGTTGA  
 7421 TCGATGTTT AATTTATGA AAGCGGCTGT GACTCTGAC TGAAGTACT TACTGACT  
 7491 ABBGCTGTTG GTCAGATAA GRCATGTTT TCGAGACCC ATTCGTGAG GTGAGATT  
 7561 ATGATGACCA AAGTCTACT CCGGATGCT TTGTTAACT GTCCGATAC TGGCAAAAT  
 7631 TGGCATTTT AGAGCTCAAT GCTTTGAGG GTTGCTGAG CTGTGAGCA CTCTTTT  
 7701 ATGGTATAG GTCGAGATA GTTGCAGCA CCTTCTTCTA CTGAGATTT CATGACAC  
 7771 CTAGTGTAT GCAAGAGAT CCTCTACAG GATGATTCT CACATCTGAT CTGAGAGA  
 7841 GCGAGATGA GAGCTGATG TCTTTTCAG GTCCTGGCG CACACCTGAG GTCGATG  
 7911 TGGAAATGA AGTTCTTCTG GCGCGCCG CAITGCTGT TGTGTTTGA CAGACCGCG  
 7981 ABBGCTGAC GGGTGTACT TCGTGAATGA GTCCTACTG GTTCTCTGTC AGGAAAT  
 8051 CGGAGCTC CCGATGTA TCTTTCGAG GTCCTGGCG CACTCTGAT GTCATGAT  
 8121 ATGGTGTGA TCTGACAGG CCCCAGCGG ABBGACTCG AGACCTGCG GGGGAGGGG  
 8191 GAGAGAGAG CCGCAGCTG GAGCTGTCCA GAGTCTGAGA ACCTTCCGGA CTTAGTGG  
 8261 GACAGATTA ACTGCTATG TCTTTCGAG GTCCTGGCG CACTCTGAT GTCATGAT  
 8331 TGGTGTGTA AGAGCTCAAT GCTTTGAGG GTTGCTGAG CTGTGAGCA CTCTTTT  
 8401 TCTTTGAT CGBTGTTGG TCTTGTGTT TGTGATCT CAGAABGCT GCGCGGAGC  
 8471 GRCAGGCTT GTCGAGAG CCGGGGCATG GTCGGTAGT GCACCTGGCG GCGCGGCTG  
 8541 GSTATGCG TCGAGAGA TTTGCTGG CACACAGG CGGATGAGG TCTGTATC  
 8611 GGTGAAGCT CCGCGGCG TGACTTTGA CTTGAAGAG AGTTCAACAG AATCAATCT  
 8681 ACBCAGCT TCTGAGAT TCTTGTAG CACAGAGT GTTCTGTA GCGGATCC  
 8751 GCTGATTC TTTCTGTA ASATCTCGC GACCCGCT TCGAGGTG GCGCGAGT

【図6】

Figure 6: Total sequence of Ad35.

1 CATCATCAAT AATATACCT ATAGATBSA TGTGCCAAT ATGTAAATA GCTGTTTTA AAAAGTGGG  
 71 CCCTCGTGGT GATTGCGCT GGGSTTAAG GTTAAAAGGG CGGCGCGCGC CBTGGAAAA TGACTA  
 141 TGGGGGTGGA GTTTTTTTC AAGTTGTCG GGGAAATGTT ACGCATAAAA AGGCTCTCTT TCCACGGAA  
 211 TACTATGATT TCCACAGGT ATTTAAGAG AAATGAGGTA GTTTGACCG GATGCAAGTG AAAATGCTG  
 281 ATTTTTCGCG GAACATGGG TGGGAAAGT GATGAGTGT TTTATGCGG TTTATGCGG GDTGGAGTA  
 351 TGTTCAGGG CAGGTAGCT TTTGACACT TACGTGAGAG TTTGCTATC CBTGTTTTT ACGTAAATTT  
 421 CCGGCTACCG TGTCAAGTC TCTGTTTTT ACGTATGTT CAGCTGATG CTAGGATAT TAFACCTTAG  
 491 GTTCTGTGTC AGTCTGAGT AAAGTGTGTT GAGTGTGTT AAGTGTGTT AAGGAGGCT CAGTGTGTT  
 561 ATAAAAAAT GAGAGATTTT CCAATTCGCG CTCAGGAAT AATCTGTCTC GAGACTGGA ATGAAAT  
 631 GAGCTGTG TGACAGCCG TATGAGGAGA GATGCGGAG CCACCTGTC AGCTTTTGA GCTCTCAACG  
 701 CTTGACAGAG ATGATGAT AGAGAGGAG GATGCGGAG ATTCTATGA GACAGCTGTC ATGATGAT  
 771 TTAGCGATC TATGTTTTA CTGCTAATG AAGGATAGA ATTAGATCC CTTTGGACA CTTTCAATC  
 841 TCCAGGGTG ATTTGGAAA GCGGTACAG TGTAGAAA TTAGCTGAT TGAATTCCT GAGCTGTGAT  
 911 TTAGCTGCT ATGAGAGGG GTTCTCCCG AGTATGATG AGGCACATGA AAAAGAGAG TCCATCGAGA  
 981 GTCACGGGCG TGGAGGATG AAGCTGAGT ATGTTGGTT TACGTGAGT TCCGCGAC TTTCTGAAA  
 1051 TGGCTTAAG TCTTGAAT TTACAGGAAA AAATCTGGA TAAAGAAC TGTATGTCT GCTTTGTTAT  
 1121 ATGAGAGCG ACTGCACTT TATTACAGT AAGTGTGTT AAGTATAAT TAAAGGAT ATGCTTTTT  
 1191 TCACTATAT ATGAGTGTG AGTATGTTG TCTTATAT AGTCTGTT TGTAGATG ATGATGCTC  
 1261 ATCTCCTAG TACTACTC CACTTCTGA TATTCAAGCA CCGTTCCTG TGGAGCTGCG CAGCCACTT  
 1331 CTTGTGAGC TTAAGCTCG GAAACCTCA GCACTGAGGA ACTTGSAGA CTTGTACAG GGTGGGGAG  
 1401 GACTTTGGA CTTGATGTA CBAAGTCTC CAGAGATA ATGTGTCAT ATCGGTTT ACITAAAGGTT  
 1471 ACCTCAAT TGTGTGAGA GTCAATGTA ATAAAAAT GTTAACTG CAGTGTGTT TATGCTTTT  
 1541 TGGGCGGGA CTCAGTATA TAGTABAAG CAGACTGTC TGGTACTC ATAGACGTC GTTCTTACG  
 1611 ATGAGGTTT GGGCATTIT GGAAGACTT GGAAGACTA GBAACACTT AGAAGGCTC TCGAGCGAG  
 1681 TCTCCGTTT TGGAGACT TGGTCTGTA GTAAATAD TAGSAGT TTAGATAA AACAGACTA  
 1751 TAAACAGAA TTTGAAAGT TGTGGTABA TTTGCGAGA CTTTITGAG CTTTAAIT TGGACATCA  
 1821 TGTACTTGA AAGAAATTT TGTGACTT TGGACTTT CAACCCAGG TAAACCTCT GCTGCTGCG  
 1891 TTTTCTTAC TTTTATATA GATAAATGA TCCCGGACG TCAITTCAG AGGGATAGA TTTGAGT  
 1961 CATAGCCACA GATTGTTGA GAACATGGA GTTGCAGG ATGAGACAAA TTTAGTATA TGGCAGTG  
 2031 GAGCTTTGG GATAGTGGG AATGTGAGG TCTGACCG TCACTGAGC GGTTCGAG GAGGACAGC  
 2101 AAGGACAAA CCGAGAGCC GCGTGGCG CTTCCATGA CTTCCATGA GAGGCGGAG TGTGTGT  
 2171 TCGACAGGG TGTACTGCG ATCTACCTC ACTGAGCGG ATAGGCGCT TAAAGGGAG AGGCATCA  
 2241 GGTGACTGA TGTAGACTT GAGTGGCTT TAACTTAA TACTGCGGA GGTCTGAAA CAAATGTGTT  
 2311 CATAGGTT CABAAGAGG GAGAGATA AGTCTGTA TTAGAGAGA AATTAATC GBAAGAGGTT  
 2381 AAAACATGTT GTTGGAGCC AGAGATGAT TGGCGTGG CCAATAAAA TTAGCCAG ATGAGTTGA  
 2451 GCGCTGATA ACATATAAG ATCAGTACG GATATAAT CCGGAATCT TGTACATAT CTTGAAATGG  
 2521 CTGATGCTA TGAAGAGC CACTTTGTA AATGTAAGT TTAGGAGAG TGTATAAT GAAATGAGT  
 2591 TTAGGCTCA TACCAACT ATATTGATG GTTGAGCTT TTTGCTTC ACGAATCT GGTAGAGTA  
 2661 TTAGGCTCA TACCAACT ATATTGATG GTTGAGCTT TTTGCTTC ACGAATCT GGTAGAGTA  
 2731 CCGGACGAG TACTGAGTA CTAACAGAA GAGATATG ATGATGCTT CAACCCAGG TGAACCTCT  
 2801 AGTCAATTG CTTGAGAAA ATGCATATC CAAGAATGA ACTGGCAT CTTGAAGT TGGAGAGAA  
 2871 GGGCTGCTA CTGCGCTC ACAGATGCT GATGTTAT TTAATAGG GAAATGCA CCGTAAAGCA  
 2941 TACTGCTG ACAGATGCT GATGATGAG CCGTGGCG CCGTGGCG TACTGAGT TGTCTGTA  
 3011 ATGCTGCTA CTGCTCAT GTTTTCCAT CAACGAAAA AATGCGCT TTTTACAC AATGTTGTA  
 3081 CAAATGCTC ATGCAATCA GGTGGGCTA GAGGATGTT TATGCTTAC GAGTATAA TGAATCAT  
 3151 GAGTGTGCT ATGCAATCA GGTGGGCTA GAGGATGTT TATGCTTAC GAGTATAA TGAATCAT  
 3221 ACTGAGAGA TCTGATGTA TGAATGAC AGATCGAGG TGAACCCATC CAAATGAGG GCGACAGT  
 3291 CAAGTCTCA CCGGCTGTG TGAATGTA CCGAAGCTC CAGACGAGT GATGGTTA TGGCCGAC  
 3361 TGGAGCAG TTTGATGTA TGGAGAGA ACTGATGTA GGTGATGTT GGGAAAGTT TGGGGTGA  
 3431 TTTTCAGAG TGTGCTGTA CAAGAAATG TAAATGCTG TTAAGCTCT CAAAGTCTG TGAATGTA  
 3501 TTTAAGGG GAGCTTCA CCGTATCT CAGACGCGT CCGCATCT GAGCAGAGT CTGCAAGT  
 3571 GTTGGGAT TACTGTGGA TGGAGAGCC GTTCAAGCC CCAATCTC AGCCAGTAC TATGCTACT  
 3641 TAAAGTCTG TGGGCTGTA TGGAGAGCC GTTCAAGCC CCAATCTC AGCCAGTAC TATGCTACT  
 3711 AATGGTTC TATGAGCA TCGTGCTA TTTCCACT TCTAATAC CTCTACAC CATCCAGCAG  
 3781 AAGTACTG TCTTTGCG CAGTGGAG GTTGTGAC AAGCTGGG TGAATCTT CAGCAGTTG  
 3851 CCGATGTTG TGTGAGTA GAGTGGAG GAGTGGAG TGTGAGTA TGTGAGTA TGTGAGTA  
 3921 ATGATAAAT AAGACGCTT GTTGTGAT TAAATCAA GTTTTATG TCTATTTCG CCGAGCTG  
 3991 GCGCTGGAC ACGATGCT ATCATGTA ACTCGTGG TTTTCTCA ATCTATAG AGCTGGGATT  
 4061 GAAATGTTG TGTGAGTA TGTGAGTA TGTGAGTA TGTGAGTA TGTGAGTA TGTGAGTA  
 4131 GCGGCTAG TGTGAGTA CCGAGTCA ACGAGTGG AGTGTACT GTTGAAGA ATCTTTTGA  
 4201 ATGAGCTG TGGCACAGA TAAACCTG GTTGTGAT TACAAACC GTTGAAGT GAGGAGTGA  
 4271 TCGAGGTA AATTATGCT ATTTGATG GATTTTAA GTTGGATA TTTGCCAAA GATCCGCTC

Figure 6, contd.

8821 ACGGECCTG AGTGGGAGA ATGACTTAT CCGGCTGCG TTCACAGCG GGTGTAAAC CAGCGCCCC  
 8891 TCGSAGTCT TGGCGCAT CACACCTGA GCGAGTATG GTCCTCAGT TGTGGGAG ACCGATAGT  
 8961 TGTATAGGC CTBAAAAGG TAGTGTAGT TGGTGCAT TGTCTGCGC ACGAAGAA ACATGATCC  
 9031 TGTCTGAGT GACTGGAG TGGGAGTTC AAGCTGCTC TGGCTGCTA GATGATGCTC  
 9101 CAAAATAA AAACATGGA GTTTCGGCG GACGACCTA ATCTCTCC TGAAGACCG ATGATGTGG  
 9171 TATGTTGCG CCGTACTTG GTTGGAGG CTTCCGGAT CTCTCTTCC TCTCTTCC  
 9241 TACGCTCT ATGACTGCT CCGATGAGT CCGTGGCG CCGTGGCG TCAACGCG CCGCAGTCA  
 9311 GCGTGTAGA ATGTTCAA GACTCTCC GCGGCGCG GCGTGGTTC ATGACGCG CCGGCTGTT  
 9381 CCGCGCTCG CAGATGAAA ACACCGCCG CACTCTTT AAAGTGGTA CTTGGAGTT CTTGCTTTG  
 9451 GAGGAGGCG CCGTGTGTA CAATTTAT TAAITGGCC GTAGGACT CCGCAGAG TCTGATGTT  
 9521 TCAAGATCA CCGGATCTA AAACCTTCC AGGAAGCT CTAACACT ACATGCA TGAAGTTCA  
 9591 TACGCGTCT TTTGGGGG GGGGTTAT GTTGTGGT TGGGCTCT GTTCTTCT CATTCTGGA  
 9661 TACTGCTG ATGCTCTG TGTAAATTT AAGTGGCA GTT TTAGAC GCGGATGCT GCGGAGCG  
 9731 ACGACTTCT TGGGCGCG TGTGATA CCGAGCAT GGGTACTTC CAAAGATA TCTGATGA  
 9801 TAGAAGATC TTTGTATG TCTTGTGA CCGCTTGA GCGCTTCA GCGCTTACC TTTTGTGAT  
 9871 CATAGTGTG ATCTCAAT CCGCATGCG TGTGATGAT GCCAATGAC CTACAGCT TTTGCGGAG  
 9941 TACTGCTG ATGACTGCT CAGTGGAG TGTGAGTT TAAITGGCC GTAGGACT CCGCAGAG  
 10011 TATTAATG GTAGCACAG TTTGCGTGA CTGACATG TAACTTCC TGAACGGC GCGCAGCT  
 10081 GTGTATTTA ABBGCGAAT ABBGCGGAT GTCAGATG TAACTTCC AAGTGGCA TCTGATG  
 10151 TACCTATA GAAATGCG CCGTGTGG CCGTGAAG CAGTCTTC TGTAGTGA GCGCAGCG  
 10221 GAGGCTTCT CAACAAGG CCGTATAG CCGTATAG CTGATGAT CTTGAGCT CAGGTTCT  
 10291 ATGAGAGCC CAGAAACT CCGTACCG GTTCAAGT TTTGTTGCG GATGAGCT GATTTGTTA  
 10361 GCGAGTGT GACAGTAG GCGCGGAG TCAITGATG TCTATAGA CCGAAGAA GBAAGCT  
 10431 ACGCACGA CCGCTAGC TCGTAGCG TGGAGAAC TGAAGCTG CCGTAACT GCGGATCT  
 10501 TACTGAGC GCGCGAGC GCGCTAAC TGGATTGG ACTCCTGCT GAGCCAGC TACAATAA  
 10571 CAGTATCG AATCAGTGT TTTGTTGT TCGGATGCG CAGGAGTG AGTCTATT TTTTTTT  
 10641 TTTGCGTCT AGATCATC CCGCTGCG CAGTGCBC CCAACAGC CCGGCTCC CAGACAGC  
 10711 ACGCACAGC ACAAAGCT TTTCCGAA CTACTGAC TCCCGCTC GCGCTGCG CAGACAGC  
 10781 CATATGCT CAGTGGAG TGGGAGG ACTTGGCT GATGTGCG CTTGCGCA CCGCATG  
 10851 CAGTCTCA TGAAAAAGA TTTCCGAG GGTATGTC CCGCAAAA CCTATTGA CAGACAGC  
 10921 GCGAGACCG GAGGATAG CAGTCTCC GTTTAGC GGGTCTGAG CTTGCTCAG TTTGAGC  
 10991 AAGAGCTG TGTGAGAG ACGATTTGA AATGATGA TGAAGAGA TCGATGCG CAGGACAG  
 11061 GTGGTGG CCAACTGTT ATGCGTTT GAGGAGAG TAAAGAGG GCAACTTC CAAAGCTG  
 11131 TAAATATA TGTGGAAC TGTATGCC CCGAAGAT TACTTGTG TGTATGAT TGTGGATT  
 11201 TATGAGACT ATCATGGA ACTCTAG CAACTTAG CAGCTGCT ACCCCGAG TTTGTGCT  
 11271 ACGAGAG ATAGACTTT CAGAGAGC CCGTGAAC TACTGATC TGTGAGG TGGTGTGA  
 11341 ATCTTACA CATCTAC AGATCATAG TCGAGGCG CAGCTGGC CTTGCGGA AGTAGTCTG  
 11411 CATCAATAC TGGGTTTG GTTGGAAA ATATTGCT GCGAACTG TTTGTTGCT GTTGCAGC  
 11481 ATAGACAG AATGATAG ATATGTTG TACTGCGA TGAACCTA GTTGTGAG CTTGAGT  
 11551 ATCTGGGGT GATCCAA TCAAGATG ATCGCGCT TACCCAC CAGAGCGG AGAGGCGG  
 11621 CAGGAGCTG ATGACATG TCAAGAGC TGTGCTGG CTTGAGAC AGGTTAGAA TTTACTGAG  
 11691 ATGGAGG ATCTAGCG GCGCTAGT CCGGCTGCT TGAAGCGG GAGGAGG TGTGACTC  
 11761 CTTACTAGA AGGEGGAT GAGGCGAG AAGGAGGCG CAATGATC GAGACTGT GCGACACT  
 11831 TGTTTTTT CAGATGGA CAGCACAC CCGATCCG CAGTGGCG GCGCTGGA GCGACAGCT  
 11901 GCGATTA TCTTGGAG ATTTGACCA GCGCATGA GATCATG CTTGAGCG TCGAACCC  
 11971 GAGCTTGA CAGCAAC CCGCCAC CCGTATCG CCGATGGA AGTGTAGT CTTCCGAT  
 12041 CAAATCCAG TCTGAGAG GTTGTGCC TGTGAGCG GTTGGTGA GCAAGCTA TTTGCTGAG  
 12111 TGGCGGCA CBTGATA ACCTCTCT ADAACCGT GCTGCTGA CAGTATGA TGTGAAAC  
 12181 AATTTGAGC GTATGATA AAGTATGCG GAAGCTGT CAGCTGCA AAGTGTGCG CBTGATCA  
 12251 ACTGTTGCT TGTGTTGG TAAATGT TTTGATG CTTGAGCT CAGCTGCG GTTGTGGA  
 12321 GATTTACT AACTTTTTA GTCTTTGAG ACTGATGA CCGAAGAT CCGAGATG AGTGTAG  
 12391 TGTGCTG ATACTCTA TGTGATG ABAAGGCT TGAAGGCT AAATGAG AACTGTGA CCGATTTA  
 12461 AAAAATTTA AGTTTGTG GAGTGTGCT CCGCGTGG AAGAAAGA ACCDTGTA CTTGTTAC  
 12531 TCGAGTCC CCGTGTAT TACTGTTG AGTCTTCT ACCAGAGC GATGATCA CCGAATTT  
 12601 TTTTGTG ATGACTGAG GCGCTGAG GAGGAGTGA GCGGAGAG GAGGAGAG CAGCAGC  
 12671 ABAATAT CAACTGAG CCGCTTGG CAGAGAGA CCGTCACT TGGAGCCA CTTGATT  
 12741 TGTCTTAC AATGCTGCT AAAAGTCC TCTCAAT TGTCTTACT CCGAGAGCA GAGGATCTT  
 12811 TTTTGTG ATGACTGAG GCGCTGAG GAGGAGTGA GCGGAGAG GAGGAGAG CAGCAGC  
 12881 TGAACGCG AAATATGAG CCGCAGCT ATCTGTA CCGACTTT ATTAACAA TGGTGTCA  
 12951 TGTGAGCA GCTGCTGTA TGAATCTG TTTACTG ATTTACTG TAAACCGTA CCGCTGCCC  
 13021 CAGCTGCG CTTATGAG CTTGAGG GAGTGGAG ATTTGAGG ATTTGTTG GAGCAGCTG  
 13091 ACGAGACT TTTTCTACT CTTTCTG CACTGAGT GAAAGAAA GGGGTTGTA GAGTCTG  
 13161 TGTGATCG CTTGCGGG CATTGGTG TACGCGCT GAGGCGAG CTTGACAT TTTCTTAT  
 13231 CTACCCTTT CTCTACAGG TGTGACTG ACGAAGTGG GTAGAGAG TCCCGCAGT TTAATGGCG

Figure 6, contd.

13301 AAGAGGAGTA CTTAAACGAT TCCCTGCTCA GACCGGCAAG AAAAAAATA TTCCCAACA ATGGAAATGA 17781 AAAACGAGGC GACAAAGCTC GCGCTCCGA TTGGGAAGG ACGCTGGTGA CCGCGGTAGA TBAACCCCTT

Figure 6, contd.

17781 AAAACGAGGC GACAAAGCTC GCGCTCCGA TTGGGAAGG ACGCTGGTGA CCGCGGTAGA TBAACCCCTT 17791 GAAACCTTTC TCAAGTTCAT GACCCGCTCA CCGCTGGATG GCGCCCTCCC CTTGCTGCTA CTTGCTGTAC

Figure 6, contd.

22281 TGCATCCCA GTCAGAGGGA ATGCATAGTA TCCCTGGGCTC ATCCCTGCTG ATTCCTG6AT AACCCGCTCT 22331 GATGAAGGCA TCCAGGAGGCA TACAGGAGGCA TACAGGAGGCA TACAGGAGGCA TACAGGAGGCA TACAGGAGGCA

Figure 6, contd.

26741 GCGCCGCTAG TGTACACGGA AAGTCCCGCT CCGCCACACTG TATTACTTCT TCGAGCGCC CAGCGCGAAG 26751 GATGATGATG TAATGATGAT GCGCAGGATG CTRCGCGCT CAGCTGATCT CCGTCCAGAG TCGCTGCTAT

Figure 6, contd.

```

31221 ACACCTTATG GACTGGAATA ACCCTCCAC CTAAGTGTCA AATTGTGAAA AACACTAATA CAAATGATGG
31291 CAACCTTACT TTAGTATTAG TAAAAATGG AGGGCTTGTI AATGGGTACG TGCTCTAGT TGCTGTATCA
31381 GAACTGTGGA ACCAAATGTT CACACAAAAG ACAGCAACA TCCAATTAG ATTATATTTT GACTCTTCTG
31431 GAAATCTATT AACGAGGAA TGAGACTTAA AATTCACAT TAAAAAATA TCTCTACAG GACACAGTGA
31501 AACGTGAGCC AGCAGCAAGC CDTTATGCCC AAGTACTACA GCCTTATCCC TCAACACCAC TACTAGGAT
31571 AGTGAAGAACT ACATTCATG AATATGTAC TACATGACTA GTTATGATAG AAGTCTATTT CCTTGAACA
31641 TTCTATAAT OCTAAACAG CTAATGATT CTTCGAATGT TGCCATGCC ATACAATTTG AATGGAAATC
31711 AAATGCCAAGT GAATCTCCAG AAAGCAACAT AGCTAGCTGC ACCACATCC CTTTTTTTTT TCTTACAT
31781 ACAGAAAGCC ACAACTAAMA TAAAGTTAA GTGTTTTAT TAAAAATCAC AAAATTCGAG TAGTATATTT
31851 GCTCCCACTT TCCCATTTGA CAGAATACAC CAATCTCTCC CCACGACAG CTTTAAACAT TTGGATACCA
31921 TTGAGATAG ACATGTTTTI AATTCACAG TTCCAAAGAG TTCCGAGAGC AGCCAACTCG GGCTCAGTGA
31991 TAGATAAAAA TCCATCCGCA TAGTCTTTTA AAGCCCTTTC ACAGTCCAAC TGC TCGGGAT GGCATCCGG
32061 AGTTTGGATC ACGTCACTCT GGAAGAAAGA CGATGGGAAT CATAATCCGA AACGGGTATC GGACCAATGT
32131 GTCTCATCAA ACCCAAGAGC AGCCCTGTCT TGCTGTCTCC CCGTGGACTG CTTGTTATGG GATAGGGTCT
32201 CACAGTTTCC TGAAGCATGA TTTTAAATAG CTTTAAATAG AACTTTCTGG TCGCATGCCG GCACGAACGC
32271 ATTCGATTTT CACTCAAAATC TTGCGAGTAG GTACAAACACA TTATTAACAAT ATTGTTTTAAT AAACCAATAAT
32341 TAAAGGCGCT CCAGCAAAA CTAATATCTG ATATATATCC CCCTGGATGA CCATCATACC AAAGTTTAAAT
32411 ATAAATTAATA TGACCTTCCC TCAAAAACAC ACTACCCACA TACATGATCT CTTTTGGCAT ATGCATATTA
32481 ACAATCTGTC TGTACCATGG ACAAGTTGG TTAATCATGC AACCCAATAT AACCTTCCGG AACCCACTGG
32551 CCACACAGCC TCCCACAGCC ATGCATTTGA GTGAACCTCG CTGATTACAA TGACAATGAA GAACCCAAT I
32621 CTCTCGACCG TGAATCACTT GAGAAATGAA AATATGTATA GTGGCAAC ATAGACATAA ATGCATATCA
32691 CTCTCATAA TTTTTAACTC CTCAGGATTT AGAAACATAT CCGAGGAAT AGGAAGCTCT TGAGACAG
32761 TAAAGCTGGC AGACAAAGGA AGACCAAGAA CACAACCTAC ACTATGCATA GTCATATGAT CACAATCTGG
32831 CACAGAGGGG TGGTCTTCCG TCATAGAACG TCGGTTTCCA TTTTCTCCAG AAGTGGTAA CTGGGCTCTG
32901 GTGTAAGGAT GATGCTCGCC GCATGATGTC GAGCGTGGCC GCAACCTTGT CATAATGGAG TTGCTCTCTG
32971 ACATCTCGT ATTTTGTATA GCAAAAGCGG GCCCTGGCAC AACACACTCT TCTTCGCTTT CTATCTCGCC
33041 GCTTAGGTCG TGTGTGTGA TASTTAAAT ACAGGCCACG CTTTAAATGT GTCAAAAAGA TGCTGGCTCT
33111 AGTGTAACT AANAATCCAT CCACTTAAT GTTCTGAGG AATCACTCCA CGGTAGATA TGCAAAATCCC
33181 AACCAAGCAA TGCAACTGGA TTGCTTTCA AGCAGGAGAG GAGAGGDAAG AGACGGAAGA ACCATGTTAA
33251 TTTTATTCC AAACGATCTC GCAGTACTTC AAATTTGAGA TCGCCAGAT GGCATCTCTC GCGCCACTG
33321 TGTGCTGAA AAAGCACAGC TAAATCAAAA GAAATGCCAT TTTCAGGTTG CTCACAGGTC GCTTCCACCA
33391 AAGCTCCAC GCCACATCC AAGACAAA AAATACCAA AGAAGGAGCA TTTTCAACT CCTCAATCAT
33461 CATATACAT TCCGACCA TTCCAGATA ATTTTCACT TCCAGCTT CAATTTATCC TGCTAGTTCT
33531 TGGTAAAT CCAATCCACA CATTAACAAC AGGTCCTGGA GGGGCGCTC CAGCACCATT CTTAAACACA
33601 CCTCATAAT GACAAAATAT CTGCTCTG TGTACCTGT AGCGAATGGA GAATGGCAAC ATCAATTTAC
33671 ATGCTCTGG CTCATGATCT TTCTTAACT TCTAGTTGTA AAAACTCTCT CATATTATCA CCAACTGCT
33741 TAGCCAGAG CCCCAGGGA ACAAGAGAGG GGGAGCTAG AGTGAATAG AAGCGAGAG CTTCCCAAT
33811 GGTCCAGCA AAACAAAGT TGAATAAGC ATATTGGGAA CCACAGTAA TATCATGAA GTTCCGTTGA
33881 ATATAATCAG CGAGATTTTC TTGTAGAAAT TGAATAAAG AAAAATTTGC CAAAAAACA TTCAAAACCT
33951 CTGGAATGA AATGCAATAG GTTACCGCC TCCCTCCACA CATTGTAGT TTTGAAATAG TCTCAAAA
34021 TAAAAAATA ACAAGCTCA TATCATGTA CCTGACGAA CAGGTGATA AATCAGTCTT TCCATCACAA
34091 GACAGGCAC AGGGTCTCA GCTGACCTCT CGTAAACCT GTCATGCTGA TTAACAACA GCACCGAAG
34161 TTCTCGGGG TGGCAGCAT GAATAGCTC TGAATGAGCA TACAAATCAG ACATGTTAG ATCAGTAAAG
34231 GAGAAAAAAC AGCCACATA GCCTTTGGT ATAATATGC TTAATCTAA CTATAGCAA GCCACCTCT
34301 CGGATACAA AGTAAAGGC ACAGAGAAAT AAAAATATA ATATTCTC TCTGCTGTT TAGGCAAGT
34371 GCGCCCGGT CCTCTAANT ACACATACA ABCTCATCA GCGATGCTT ACCAGAGAA GTACAGCGGG
34441 CACACAAACC ACAAGCTCA AAGTCACTCT CCAACTTSC CACAATAT ATACACAGC CTAACCTGA
34511 CGAATGGGA CTAAGTGT AAAAAATCCG CCAACCCCA CACACACCCC GAAACTGCTC CACAGGGAA
34581 AAGTACAT TTACTTCCG AATCCACA AGCTCACTT CCTTTTCT ACGBTACCT ACATCCCAT
34651 AACTTACAAC GTCAATTTCC CAGCGCCGG CCGCTTTT TAAAGTTAA CCCACAGCC AATCCACA
34721 CCGCCACAC TTTTAAAAAT CACTCATTT ACATATTGSC ACCATTCAT CTATAAGTA TATTATTGAT
34791 GATG

```

【 7 】

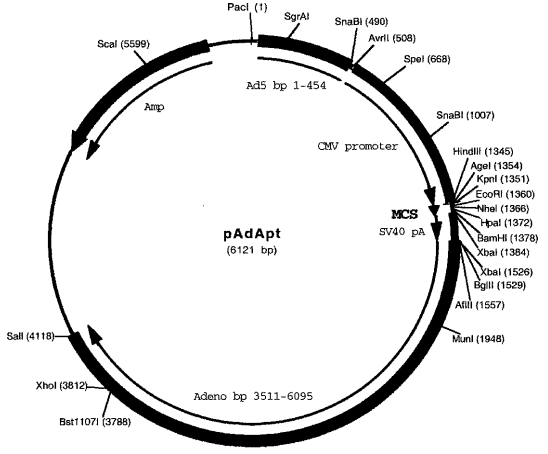


Figure 7

【 8 】

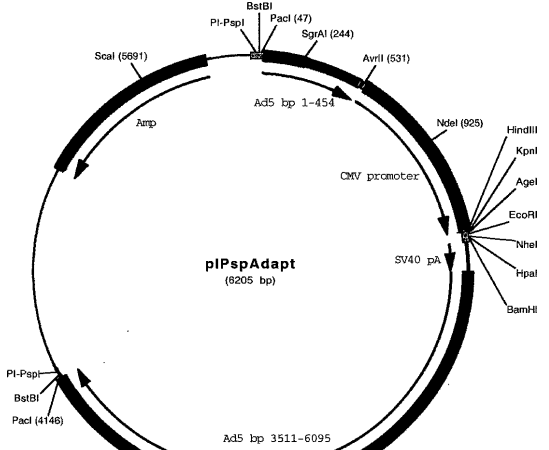


Figure 8

【 9 】

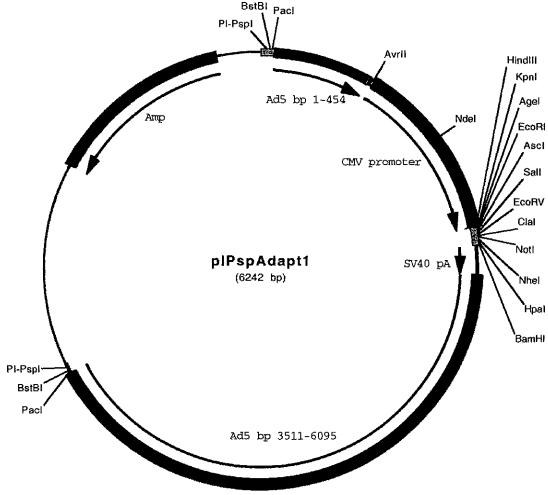


Figure 9

【 図 10 】

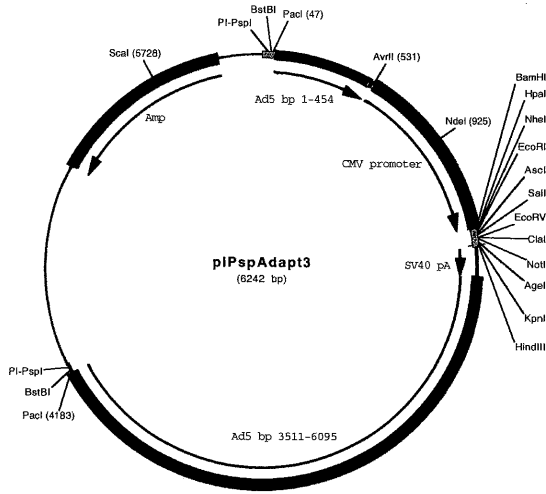


Figure 10

【 図 11 】

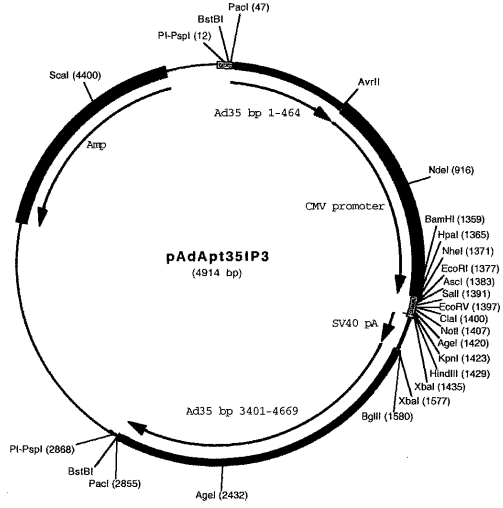


Figure 11

【 図 12 】

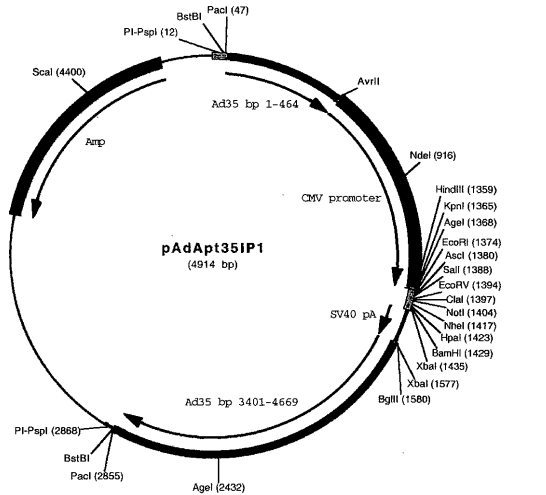


Figure 12

【 図 13 】

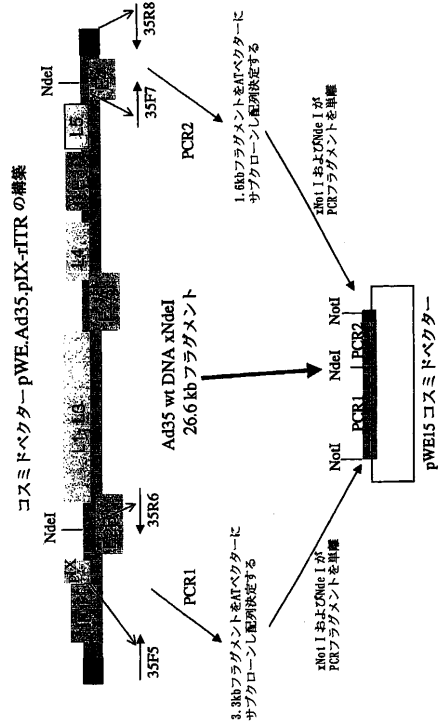


Figure 13

【 14 】

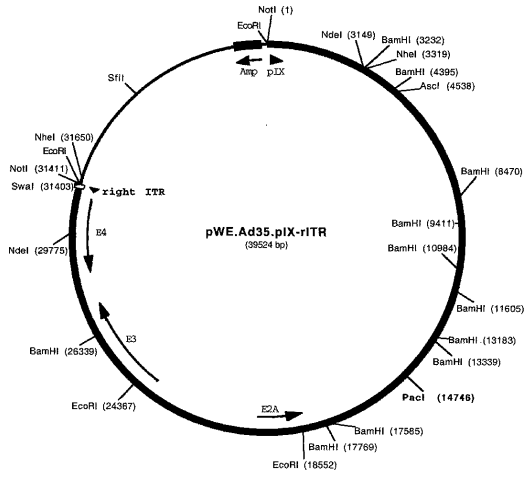


Figure 14

【 15 】

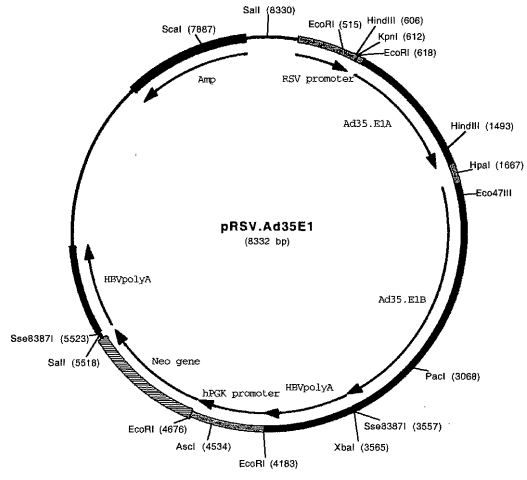


Figure 15

【 16 】

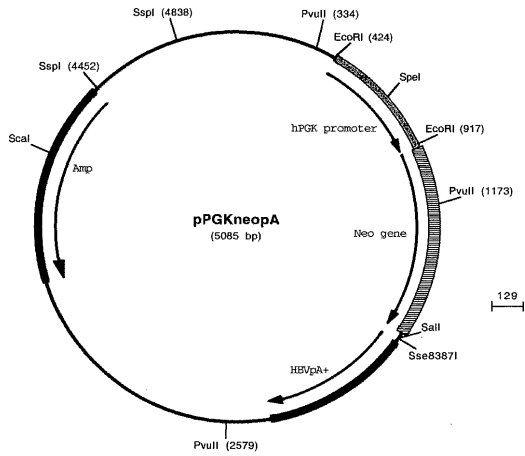


Figure 16

【 17 】

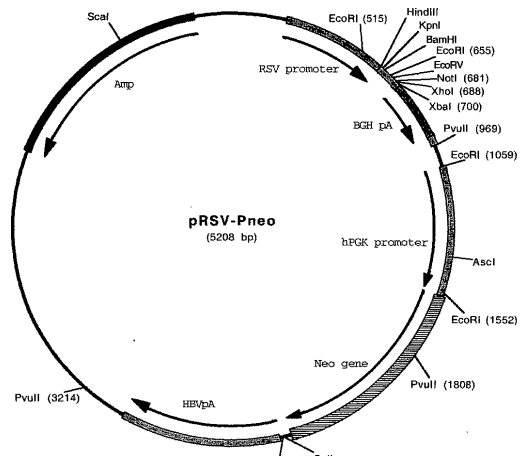


Figure 17

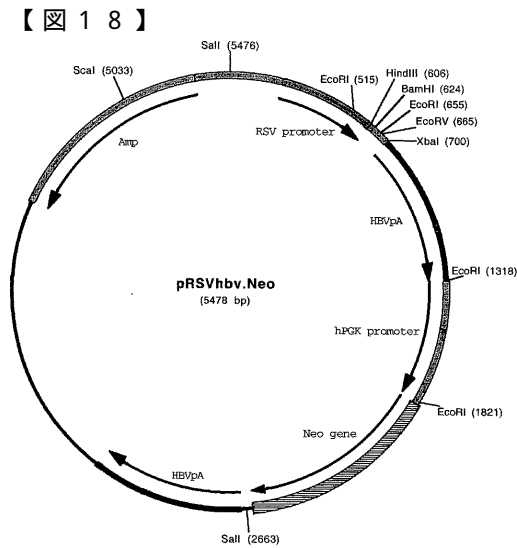


Figure 18

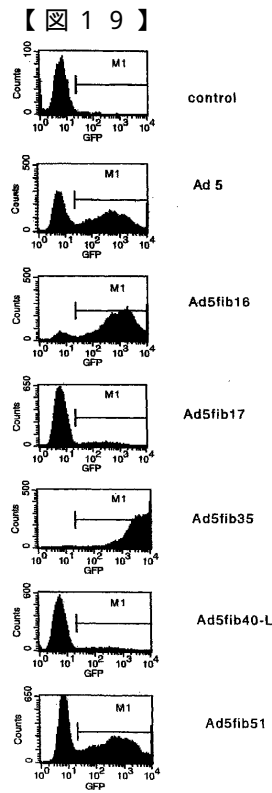
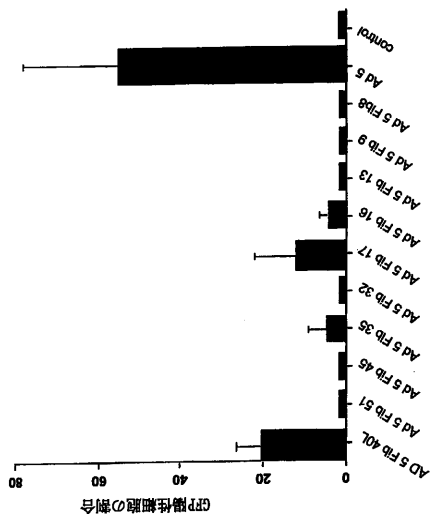


Figure 19

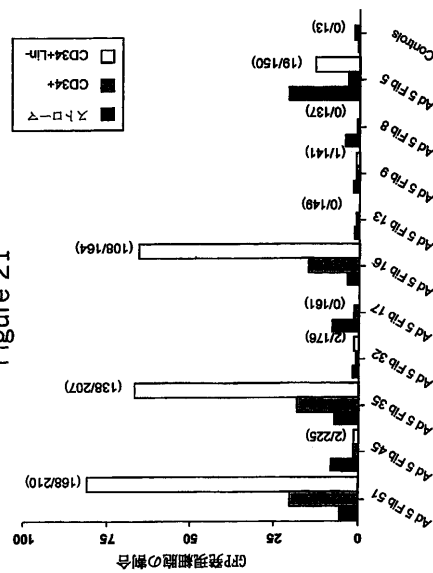
【 20 】

Figure 20



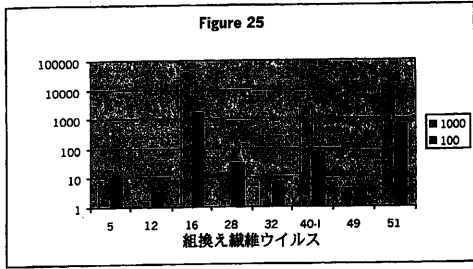
【 21 】

Figure 21





【図 25】



【図 26】

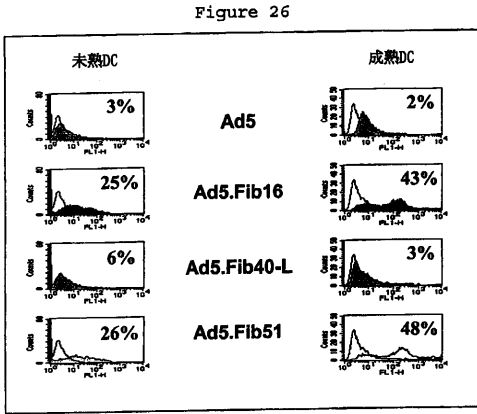


Figure 26

【図 27】

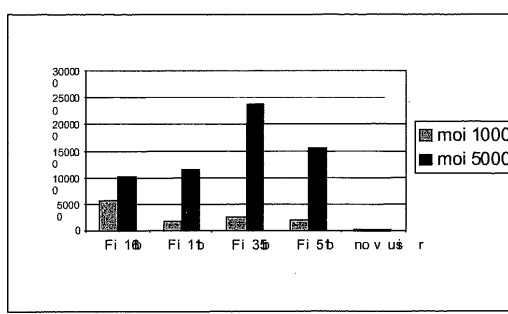


Figure 27

【図 28】

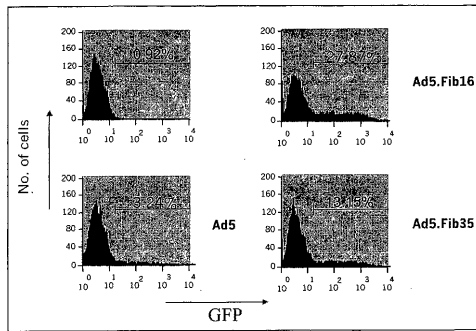


Figure 28

【図 29】

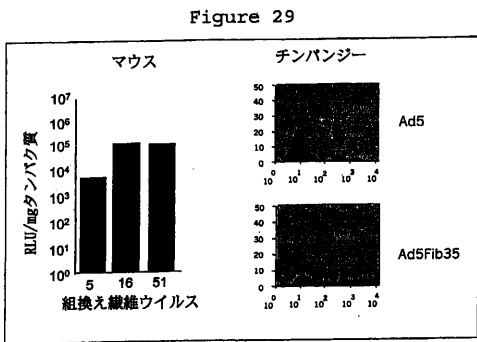


Figure 29

【図 30】

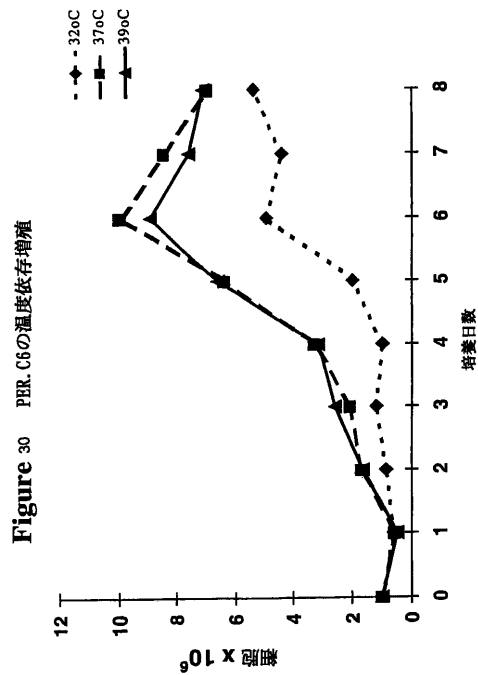
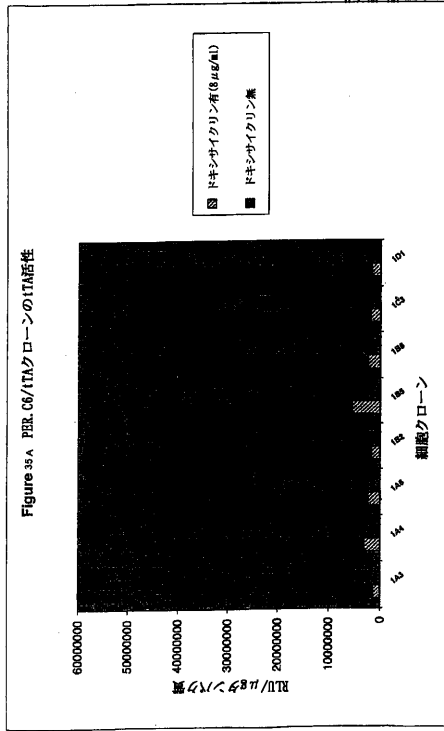


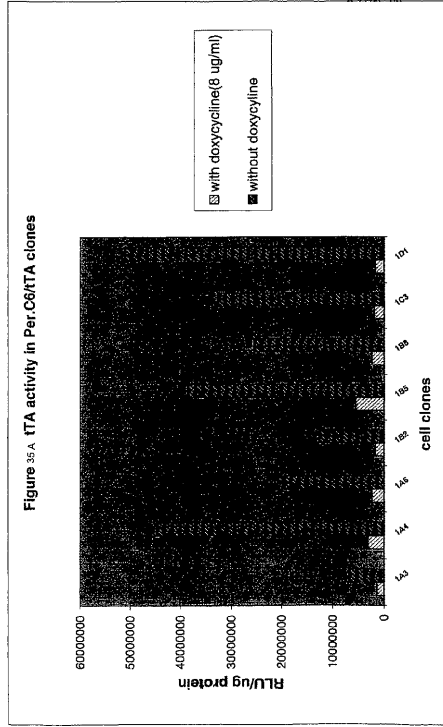
Figure 30



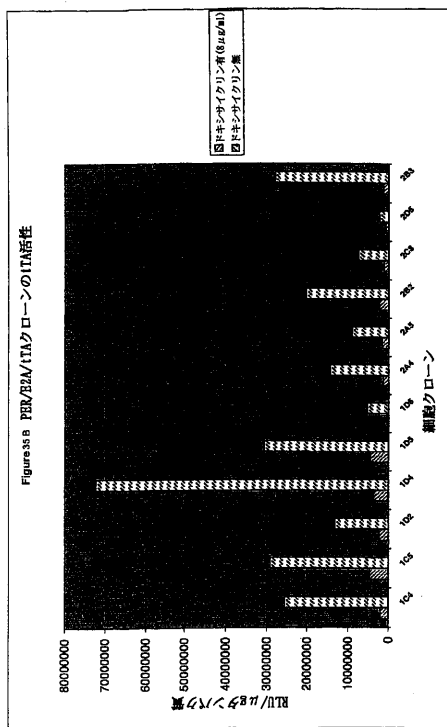
【 3 4 A 】



【 3 5 A 】



【 3 5 B 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 メンゾ ヤンフ エムコ ハーヴェンガ  
オランダ国 2401 ビーヴェー アルフェン アン デ レイン ストルタメルク 57
- (72)発明者 ロナルド ヴォーゲル  
オランダ国 3461 ハーウェー リンスコーテ ヴァン リートラーン 4

## 合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 加々美 一恵

審判官 鶴飼 健

- (56)参考文献 国際公開第98/40509(WO, A1)  
Gene(1996)Vol.170, p.249-254  
Human Gene Therapy(1998)Vol.9, p.1909-1917  
J. Infectious Diseases(1987)Vol.155, No.6, p.1127-1134

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

PUBMED