

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3672494号
(P3672494)

(45) 発行日 平成17年7月20日(2005.7.20)

(24) 登録日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 5/10

// A 6 1 K 48/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/00 B

A 6 1 K 48/00

請求項の数 40 (全 111 頁)

(21) 出願番号 特願2000-553572 (P2000-553572)
 (86) (22) 出願日 平成11年6月11日(1999.6.11)
 (65) 公表番号 特表2002-526031 (P2002-526031A)
 (43) 公表日 平成14年8月20日(2002.8.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL1999/000367
 (87) 国際公開番号 W01999/064582
 (87) 国際公開日 平成11年12月16日(1999.12.16)
 審査請求日 平成13年6月1日(2001.6.1)
 (31) 優先権主張番号 09/097,239
 (32) 優先日 平成10年6月12日(1998.6.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ECACC 96022940

(73) 特許権者 502081952
 ガラパゴス ゲノミクス エヌ. ヴィ.
 ベルギー国 B-2800 メチェレン,
 ゲネラル ド ウィッテラアン 11
 A 3
 (74) 代理人 100064344
 弁理士 岡田 英彦
 (74) 代理人 100105728
 弁理士 中村 敦子
 (72) 発明者 ショウテン, ゴヘルト
 オランダ エヌエル-2321 エーエル
 ライデン ダ コスタストラート 82

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能的ゲノム適用にライブラリーを使用される遺伝子機能に関する高度処理能力スクリーニング法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

多数の発現すべき独特な核酸を含むライブラリーであって、該ライブラリーは多数の区画を有し、該多数の区画のそれぞれは、前記ライブラリーに添加された水性培地中に1つ以上のアデノウイルスベクターを有し、該アデノウイルスベクターは、発現すべき独特な核酸を少なくとも1つ有するとともに、

(i) 前記発現すべき独特な核酸を宿主細胞に導入することができ、

(i i) 前記発現すべき独特な核酸の生産物を前記宿主細胞内で発現させることができ、

(i i i) 前記宿主細胞内で複製に必要なアデノウイルスゲノムの一部が取り除かれていることを特徴とするライブラリー。 10

【請求項2】

前記発現すべき独特な核酸によって発現した全ての生産物の機能は、前記ライブラリーが初めて作製された時に知られていないことを特徴とする請求項1に記載のライブラリー。

【請求項3】

前記区画は、前記取り除かれたアデノウイルスゲノムの一部を含むパッケージング細胞を除き、複製可能なアデノウイルスベクターを含まないことを特徴とする請求項1又は2に記載のライブラリー。

【請求項4】

前記宿主細胞は、ゼブラフィッシュの細胞や人間の細胞などの動物細胞の真核細胞であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。

【請求項 5】

前記宿主細胞は、ゼブラフィッシュ胚などの動物の一部であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。

【請求項 6】

少なくとも 1 つの前記区画は、少なくとも 2 つの前記アデノウイルスベクターを有することを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの前記区画は、前記アデノウイルスベクターを 1 つ有することを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。 10

【請求項 8】

前記アデノウイルスベクターは、アデノウイルスキャプシドにパッケージされていることを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。

【請求項 9】

前記アデノウイルスベクターは、E 1 領域タンパク質をコードする配列が削除されたアデノウイルスゲノム配列を有することを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。

【請求項 10】

前記アデノウイルスベクターは、E 2 A 領域タンパク質をコードする配列、E 2 B 領域タンパク質をコードする配列、完全な E 2 領域タンパク質をコードする配列及び E 3 領域タンパク質をコードする配列からなる群より選択された配列が削除されたアデノウイルスゲノム配列を有することを特徴とする請求項 9 に記載のライブラリー。 20

【請求項 11】

前記アデノウイルスベクターは、E 2 A 領域タンパク質をコードする配列、E 2 B 領域タンパク質をコードする配列及び完全な E 2 領域タンパク質をコードする配列からなる群より選択された配列と、E 3 領域タンパク質をコードする配列とが削除されたアデノウイルスゲノム配列を有することを特徴とする請求項 9 に記載のライブラリー。

【請求項 12】

アデノウイルスベクターは、多数のアデノウイルス繊維タンパク質をコードする配列を有し、該多数のアデノウイルス繊維タンパク質は、少なくとも 2 つのアデノウイルス血清型に由来するものであることを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。 30

【請求項 13】

前記アデノウイルスベクターは、最小ベクターであることを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。

【請求項 14】

前記最小ベクターは、インキャプシデーションシグナルと、アデノウイルスの逆方向末端反復配列 (ITR) の少なくとも 1 つのコピーとを有することを特徴とする請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。 40

【請求項 15】

前記最小ベクターは、アデノ関連ウイルス末端反復を有することを特徴とする請求項 13 又は 14 に記載のライブラリー。

【請求項 16】

前記アデノウイルスベクターは、前記発現すべき独特な核酸と操作可能にリンクした誘導プロモーターを有することを特徴とする請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。

【請求項 17】

前記誘導プロモーターは、アデノウイルス E 1 遺伝子生産物により抑制されることを特徴とする請求項 16 に記載のライブラリー。 50

【請求項 18】

前記誘導プロモーターは、AP1依存性プロモーターであることを特徴とする請求項17に記載のライブラリー。

【請求項 19】

前記多数の区画は、少なくとも6ウエルのマルチウエルフォーマットを含むことを特徴とする請求項1から18のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項 20】

前記多数の区画は、少なくとも96ウエルのマルチウエルフォーマットを含むことを特徴とする請求項1から18のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項 21】

多数の前記発現すべき独特な核酸のそれぞれは、核酸の集団の構成員に由来し、該核酸の集団は、メッセンジャーRNA、DNA、cDNA、EST、遺伝子及び遺伝子サプレッサー要素からなる群より選択された天然に生じる核酸の集団と、合成オリゴヌクレオチドと、アンチセンス核酸とを有することを特徴とする請求項1から20のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項 22】

前記多数の区画のそれぞれは、パッケージング細胞の粗製リゼイトを有することを特徴とする請求項1から21のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項 23】

多数の区画に配置された多数の発現すべき独特な核酸からなるライブラリーを作製する方法であって、前記多数の区画のそれぞれは、少なくとも1つの前記発現すべき独特な核酸を有する複製欠損アデノウイルスベクターを有し、

前記方法は、(i)(a)そのゲノムに組み込まれた第1のアデノウイルスゲノム部分を包含するパッケージング細胞と、(b)プロモーターに操作可能にリンクされた前記発現すべき独特な核酸と第2のアデノウイルスゲノム部分を含み、該第2のアデノウイルスゲノム部分は、アデノウイルスの逆方向末端反復配列(ITR)を少なくとも1つ有する核酸デリバリーベクター及び(c)第3のアデノウイルスゲノム部分を主成分とするヘルパー核酸の混合物とを混合する形質移入工程を含み、

(ii)前記第1のアデノウイルスゲノム部分の配列は、第2のアデノウイルスゲノム部分の配列及び第3のアデノウイルスゲノム部分の配列とは重複しておらず、

(iii)前記第1のアデノウイルスゲノム部分と第2のアデノウイルスゲノム部分と第3のアデノウイルスゲノム部分は、インキャプシデーションと複製とに必須のアデノウイルスタンパク質がパッケージング細胞内で発現可能なように配列されていることを特徴とするライブラリーを作製する方法。

【請求項 24】

前記第2のアデノウイルスゲノム部分の配列と前記第3のアデノウイルスゲノム部分の配列は、デリバリーベクター核酸とヘルパー核酸との相同組換え体と少なくとも部分的に重複していることを特徴とする請求項23に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 25】

前記デリバリーベクター核酸と前記ヘルパー核酸とに含まれるアデノウイルスゲノムの配列は、アデノウイルスゲノムのE1領域の部分を含まないことを特徴とする請求項23又は24に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 26】

前記パッケージ細胞の系列は、アデノウイルスゲノムのE1領域が組み込まれた真核細胞を有していることを特徴とする請求項23から25のいずれか1項に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 27】

前記真核細胞は、アデノウイルスゲノムのE2領域が組み込まれていることを特徴とする請求項26に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

前記真核細胞に組み込まれたアデノウイルスゲノムの E 2 領域は、アデノウイルスゲノムの E 2 A 領域又はアデノウイルスゲノムの E 2 B 領域であることを特徴とする請求項 27 に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 29】

前記真核細胞は、アデノウイルスゲノムの E 4 領域が組み込まれていることを特徴とする請求項 27 又は 28 に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 30】

前記デリバリーベクター核酸の配列とヘルパー核酸の配列は、混合される制限酵素によって線状化可能なものから選択され、該制限酵素は、パッケージング細胞への形質移入工程前に除去されることを特徴とする請求項 23 から 29 のいずれか 1 項に記載のライブラリーを作製する方法。

10

【請求項 31】

前記デリバリーベクターは、制限酵素によって分割可能な制限酵素部位配列を少なくとも 1 つ有し、該制限酵素は、前記発現すべき独特な核酸がコードされた配列を分解しないものであることを特徴とする請求項 23 から 30 のいずれか 1 項に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 32】

前記制限酵素部位配列は、特異な切断制限エンドヌクレアーゼ又はイントロンコード化エンドヌクレアーゼが認識するための配列を有することを特徴とする請求項 31 に記載のライブラリーを作製する方法。

20

【請求項 33】

前記制限酵素部位配列は、PacI、BsfBI 及び PspI からなる群より選択された制限酵素によって認識される配列であることを特徴とする請求項 31 又は 32 に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 34】

前記パッケージング細胞は、PER. C6 細胞 (ECACC deposit number 96022940) 又は、PER. C6 細胞由来のものであることを特徴とする請求項 23 から 33 のいずれか 1 項に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 35】

前記パッケージング細胞は、アデノウイルスゲノムの E 2 領域を有することを特徴とする請求項 34 に記載のライブラリーを作製する方法。

30

【請求項 36】

行うべき工程の少なくとも 1 つは自動化されていることを特徴とする請求項 23 から 35 のいずれか 1 項に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 37】

前記 (i) の形質移入工程では、ポリエチレンジオキサン (PEI) が形質移入剤として使用されていることを特徴とする請求項 23 から 36 のいずれか 1 項に記載のライブラリーを作製する方法。

【請求項 38】

前記複製欠損アデノウイルスベクターは、パッケージング細胞の粗製リゼイト存在下で宿主細胞への形質移入に使用されることを特徴とする請求項 23 から 37 のいずれか 1 項に記載のライブラリーを作製する方法。

40

【請求項 39】

ハイスループット設定で、その機能が知られていない発現すべき独特な核酸の機能を測定する機能測定方法であって、

請求項 1 から 22 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスベクターの組換え体のライブラリーを調達する第 1 工程と、

前記第一工程のアデノウイルスベクターの組換え体を宿主細胞に導入する第 2 工程と、

前記発現すべき独特な核酸の生産物を前記宿主細胞内で発現させることで該宿主細胞の表現型を改変する第 3 工程と、

50

該改変された宿主細胞の表現型を同定する第4工程と、
発現すべき独特な核酸によってコード化された前記生産物の機能を割り当てる第5工程と、
からなることを特徴とする機能測定方法。

【請求項40】

ライブラリー内に存在する前記発現すべき独特な核酸の機能測定のための請求項1から22のいずれか1項に記載のライブラリーの使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来の技術】

10

（発明の背景）

本発明は、サンプル核酸とその産物の機能を同定するための高度処理能力を有する方法に関する。本発明は、サンプル核酸の産物を機能させるよう高度処理能力設定で組換えアデノウイルスベクターを産生するために、E1欠失プラスミドをベースとする生成システムと組み合わせたE1相補性アデノウイルスパッケージング細胞系列PER.C6の使用により例示される。

【0002】

ヒトゲノム計画の最終目標は、ヒトゲノム全体を配列決定することである。この努力により予想される結果はヒトにおいて発現される7万～10万の遺伝子の正確な遺伝子地図である。しかし、ヒトコード配列のかなり完全な一覧表が近いうちに公表されて入手可能になる可能性が大きい。1980年代初頭以来、非常に多くのEST（Expressed Sequence Tags; cDNA分子の末端から読み出された部分DNA配列）が政府および民間研究機関の両方により得られてきた。ワシントン大学ゲノム配列決定センターおよびIMAGE（Integrated Molecular Analysis of Gene Expression; 遺伝子発現の組込み分子分析）会議（<http://www-bio.llnl.gov/bbrp/image/image.html>）のメンバーの間の協力により実施されているこうした努力の特徴は、公共のドメインへのそうした配列の急速な蓄積およびそれに付随していくつかの配信業者から得られるシーケンスタグ（sequence-tagged）されたcDNAクローンであった（Marraら, (1998) Trends Genet. 14 (1):4-7）。現在、cDNAのコレクションは、肝臓、脳、脾臓、B細胞、腎臓、筋肉、心臓、消化管、網膜、視床下部を含むさまざまな組織で発現されるおよそ5万の異なるヒト遺伝子を代表していると考えられており、またその数は日に日に増加している。

20

30

【0003】

がんゲノム解剖計画のそれに類する、目立った動きが最近あって、1999年までのUniGeneセット（公表されていて入手可能なcDNAクローンのセット）のクローンの完全長配列を得るための努力を支援している。同時に、商業ベースの団体が、1999年までに4万の完全長cDNAクローンを評価（再配列決定）することを提案しており、また個々のクローンは関心をもっているいずれの団体でも入手可能である。新規の遺伝子のコード配列が同定される速度は、それらの遺伝子の機能が解明される速度とは非常に対照的である。データベースのcDNAに対してそれらの機能を対応させること、あるいは機能的ゲノムは、今日のバイオテクノロジーにおける1つの主要な挑戦となっている。

40

【0004】

数十年間、新規の遺伝子は生物学的プロセスあるいは遺伝性疾患およびその同定よりも重要である遺伝子の機能を説明するために計画された研究の結果として同定された。機能的ゲノムにおいては、遺伝子のコード配列はまずクローン化され、また配列決定され、またその配列はその後に機能を見出すために使用される。ショウジョウバエ、C.elegans、ゼブラフィッシュなどのほかの生物体が基本的な遺伝子の分析には高度に有用であり、複雑な哺乳動物の生理学的形質（血糖、心血管系疾患、炎症）に関しては、動物モデル系列が欠かせない。しかし、再生産の速度が遅いこと、また動物モデルの飼育収容コストの高さが、遺伝子の機能的な高度処理能力分析には主要な制約となっている。労働集約的な努力が、遺伝子機能の解明を可能にする表現型あるいはヒト疾患に関連している研究

50

における化学的あるいは遺伝子工学的処理により変異した（標識された）遺伝子によりマウス株のライブラリーを確定するために努力が行われているが、哺乳動物遺伝子の完全なスペクトルの系列立った分析は、それがヒトあるいは動物に関するものにせよ、1つの意義のある課題である。

【0005】

配列データの量に遅れないようにするため、機能的ゲノムの分野では、真のゲノム機能の高度な処理能力の分析を行う能力が必要とされている。最近、遺伝子発現に特異的な組織と細胞を遺伝子機能に結び付けるように設計された数々の技術が開発されてきている。これら技術には、cDNAマイクロアレイ、遺伝子チップ技術、ディファレンシャルディスプレイmRNAが含まれる。SAGE（遺伝子発現連続分析；Serial Analysis of Gene Expression）あるいはmRNAのディファレンシャルディスプレイにより、腫瘍組織では発現するが、各正常あるいは健常組織にはない遺伝子を同定することができる。このように、調節機能を有する潜在的な遺伝子が、少量薬剤スクリーニングあるいは遺伝子治療計画に有用であるという機会がより少ない、普遍的に発現される過剰な遺伝子から選択することができる。遺伝子チップ技術は、たった数時間のうちに、非常に数の多い遺伝子の細胞におけるmRNA発現レベルの測定により遺伝子発現のモニタリングを可能にする潜在能力を有している。さまざまな条件下で培養される細胞は、mRNA発現パターンに関して分析され、比較することができる。現在では、4万の非冗長ヒト遺伝子を伴うDNAマイクロアレイチップが生産されており、また1999年には市場に登場する計画がある（特集頁（1998）Nat. Genet. 18（3）:195-7）。しかし、これらの技術は本来的には、がん細胞をスクリーニングするために設計されているもので、特定の遺伝子機能に関してスクリーニングするために設計されているわけではない。

【0006】

二重あるいは三重ハイブリッドシステムもまた、ゲノムデータベースに機能的なデータを付け加えるために使用されている。これらの技術測定法は、酵母あるいは哺乳動物細胞におけるタンパク質-タンパク質、タンパク質-RNA、あるいはタンパク質-DNA相互作用に関して測定するために使用される（BrentとFinley（1997）Annu. Rev. Genet. 31:663-704）。しかし、この技術は、分化、運動性、シグナル形質導入、酵素および輸送活動などのほかの遺伝子機能の数々に関しては測定するための手段を提供してはいない。酵母発現システムは、哺乳動物起源の天然に分泌されるものおよび膜タンパク質に関してスクリーニングするのに使用されるものが開発されている（Kleinら、（1996）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93（14）:7108-13）。このシステムはまた、大きなライブラリーを特定の遺伝子および遺伝子産物の同定に助けとなるある種の特性をもったライブラリーへの分解を見込んでみている。このシステムの短所は、主として分泌タンパク質をコードする遺伝子が選択されることである。第2に、この技術は異種発現システムとしての酵母をベースにしており、またしたがって、偏ったライブラリーに結果的になる、適切に折り込まれているのではない遺伝子産物が存在することであろう。

【0007】

ほかの現在の戦略には、トランスジェニックマウスあるいはノックアウトマウスの作成が含まれる。こうしたアプローチによる遺伝子発見の成功例は、オステオプロテジェリン（osteoprotegerin）遺伝子の同定である。DNAデータベースは、同族体の遺伝子にコードされる分泌タンパク質を示唆する特徴を備えたESTを選択するためにスクリーニングされた。その遺伝子の生物学的機能が、肝特異的プロモーターの制御下に対応する完全長cDNAを置くことにより評価された。こうしたコンストラクトのそれぞれについて作成されたトランスジェニックマウスは結果的には、該当するタンパク質の高いプラズマレベルを有している。引き続き、トランスジェニック動物は定性的および定量的な表現型の研究調査の総合的試験にかけられた。マウスのなかにトランスフェクションされた遺伝子の1つが、骨密度が増加したマウスを産み、それが、その後、潜在能力のある抗骨粗鬆症因子の発見につながった（Simonetら、（1997）Cell. 89（2）:309-19）。こうした方法は、コストがかかり、また非常に時間を費やすものであるという短所を有している。

10

20

30

40

50

【0008】

機能的ゲノムにおける挑戦は、上述されたすべての技術を開発し、磨き上げ、また、いかに遺伝子機能が細胞の代謝および新規な製剤の開発のなかで使用するために注入されるこの知識のための手段を構成しているかの青写真の発展を準備するよく発展させたデータベースにおける既存のデータとその結果を総合することである。現在の技術には制約があり、また真の機能的なデータを必ずしも生じてはいない。したがって、適当なin vitro測定システムと動物モデルにおいて高度な処理能力が設定されている、遺伝子のコレクション（遺伝子プールあるいは個々のクローン）から単一の遺伝子機能の直接的な測定を見込んだ方法に対する需要がそこにはある。

【0009】

高度な処理能力スクリーニングの開発は、JayawickremeとKost, (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:629-634のなかで論じられている。稀に転写される分化発現遺伝子に関する高度な処理能力のスクリーニングが、von Steinら、(1997) Nucleic Acids Res. 35:2598-2602のなかで説明されている。高度な処理能力により遺伝子型別に分けることは、Hallら、(1996) Genome Res. 6:781-790のなかの開示されている。トランスドミナント細胞内エフェクターペプチドおよびRNA分子はNolan, P C T国際公開第W0 97/ 27212号、第W0 97/ 27213号に開示されている。

【0010】

【課題を解決するための手段】

そこで使用される諸方法と成分は、プラスミドをベースにするE1欠損アデノウイルスベクターシステムおよびE1相補性宿主細胞を使用して、機能が未知のサンプル核酸の機能を高度な処理能力の設定で、直接的に、迅速にまた曖昧な点のないように測定するために提供される。その方法には、cDNA、DNA、EST、遺伝子、合成オリゴヌクレオチドあるいは核酸のライブラリーのセットをE1欠損アダプタープラスミドに挿入することによりアダプタープラスミドのセットを構築する工程と、アダプタープラスミドのセットあるいはライブラリーおよびアダプタープラスミドのセットのなかにある配列に相同性である配列を有するプラスミドとともにE1相補性細胞系列をコトランスフェクションする工程とが含まれ、その方法にはまた、好ましくは、小型化した、高度な処理能力を有する設定において、組換え体アデノウイルスベクターのセットあるいはライブラリーを産生するための複製およびパッケージングにするために必要であって、相補性細胞系列あるいはアダプタープラスミドにより提供されることがないすべてのアデノウイルスが含まれる。サンプル核酸によりコードされる産物を同定し、また機能を対応させるために、宿主は、サンプル核酸の産物を発現し、それによって宿主の表現型を改変する組換えアデノウイルスベクターを高度な処理能力を有する設定で形質導入される。改変された表現型は同定され、また、サンプル核酸によりコードされる産物に機能を対応させるために基礎的なものとして使用される。プラスミドをベースとしたシステムは、高度な処理能力を有するスクリーニングのために好適にはRCAが遊離したアデノウイルスベクターライブラリーを迅速に産生するのに使用される。この方法の各ステップは複数ウェルフォーマットで実施することができ、またこのシステムの容量をさらに増加するために自動化することができる。この高度な処理能力システムは、in vitroおよびin vivoでのヒトおよびほかの生物体から得られる非常に多数のサンプル核酸の発現分析を容易にし、また当分野におけるそのほかの入手可能な技術を上回って著しく改良されている。

【0011】

【発明の実施の形態】

1つの態様において、本発明は、多数の区画を有する発現可能な核酸のライブラリーを提供するものであり、各区画が、前記ライブラリーの少なくとも1つの核酸を有する少なくとも1つのビーイクルを有している。これにより、前記ビーイクルは、その核酸を発現させることができるように、細胞のなかに前記少なくとも1つの核酸を非常に効率的に導入することができる。前記ライブラリーの1つの長所は、前記ライブラリーが非常に効率的に細胞のなかに導入できることである。前記ライブラリーのもう1つの長所は、各区画が

10

20

30

40

50

少なくとも1つの核酸を有する、多数の区画を有することである。前記ライブラリーは、細胞のなかで発現させた核酸の効果を研究するのに好んで使用される。このアーキテクチャを備えたライブラリーは、細胞内で発現させるときにある一定の効果を発揮する少なくとも1つの核酸を有するそうした区画を迅速に選択するのに好んで使用することができる。区画が、たった1つの核酸を有する場合には、その核酸は効果を発揮することがわかる。1つの区画が1つよりも多い核酸を有する場合には、その1以上の核酸のうちの少なくとも1つは、効果を発揮することがわかる。どの区画が、ある一定の効果を発揮することができる核酸を有するかを知ることの有利性は、前記区画がかなり少ない異なった核酸を有する場合により大きく、また、前記区画が、たった1つの核酸を有する場合には、それが最高となる。とくに大きなライブラリーでは、区画毎の異なる核酸の数を正確に知っ

10

【0012】

発現可能な核酸は、タンパク様分子、RNA分子あるいはDNA分子をコードする核酸などのいずれかの発現可能な核酸でありうる。

1つの好適な実施態様においては、前記ビーイクルは、ウイルスエレメント、あるいは機能的部分、その誘導体および／またはその類似体を有する。ウイルスエレメントは、アデノウイルスに限定するものではないが、そうしたもののなどの外被(enveloped)レトロウイルス粒子あるいは非外被(non-enveloped)ウイルスのウイルスキャプシドに限定されないが、そうしたウイルス粒子を包含する。一つのウイルス粒子は、1つの細胞のなかに前記少なくとも1つの核酸を容易に効率よく導入することが可能であるので好ましい。ウイルスエレメントはまた、細胞のなかで前記ライブラリーの増幅を可能にするウイルス核酸を含むことができる。ウイルスエレメントは、前記ビーイクルがウイルス粒子である場合には、1つのビーイクルのなかに前記少なくとも1つの核酸をパッケージングすることを可能にするウイルス核酸を含むことができる。

20

【0013】

1つの好適な実施態様においては、前記ウイルスエレメントは1つのアデノウイルスから由来する。好適には、前記ビーイクルは1つのアデノウイルスキャプシドのなかに詰め込まれたアデノウイルスベクターを有する。

細胞は、いかなる種類のものもありうる。例えば、前記ライブラリーが潜在的な治療的価値を備えた核酸の存在に関してスクリーニングされる場合には、前記細胞は好ましくは、真核細胞であり、好適には哺乳動物の細胞である。

30

【0014】

1つの実施態様においては、少なくとも1つの区画は、前記少なくとも1つのビーイクルの少なくとも2つを有する。とくに、大きなライブラリーに限定されるわけではないが、行う必要のあるスクリーニング測定の数少なくとも部分的に減らすために、区画の数を減らすことは長所となる。例えば、そうしたケースでは、1つよりも多いビーイクルを有するライブラリーが提供される。スクリーニング測定に引き続いて、ある一定の効果がある一定の区画に相関している場合には、前記区画のなかの前記ビーイクルは、その発現が効果を発揮する核酸を有するビーイクルを選択するために、付加的なスクリーニング測定において、別に分析されることができる。他方ではしかし、1つの区画のなかにビーイクルが1つよりも多く存在することは、もう1つの設定のなかで使用するのに都合がよいと考えられる。例えば、区画毎に1つのビーイクルを含む1つのライブラリーが、1つの特定のほかの核酸と組み合わせて効果を発揮することができる核酸に関してスクリーニングされる場合である。前記ほかの核酸は、その後、そのスクリーニング測定を行う前に、すべての区画に対して前記特定のほかの核酸から成る1つのビーイクルを加えることにより、前記細胞に提供することができる。同様に、前記少なくとも1つのビーイクルは、少なくとも2つの核酸を有することができる。

40

【0015】

1つの好適な実施態様においては、アデノウイルスから誘導される前記核酸は、アデノウイルス後期タンパク質あるいは機能的な部分、その誘導体および／またはその類似体をコ

50

ードする核酸を含む。例えば、アデノウイルス後期タンパク質であるアデノウイルス線維タンパク質は、ある一定の細胞に対して前記少なくとも1つのビーイクルを標的にするのに、あるいは前記細胞に対して前記少なくとも1つのビーイクルの送達の促進を誘発するために、好んで使用することができる。好適には、アデノウイルスから誘導される前記核酸は、アデノウイルスキャプシド全体あるいは機能的な部分、その類似体および／またはその誘導体の形成を可能にするすべてのアデノウイルス後期タンパク質を主にコードする。好適には、アデノウイルスから誘導された前記核酸は、アデノウイルスE2A又は機能的な部分、その誘導体および／またはその類似体をコード化する核酸を含む。好適には、アデノウイルスから誘導された前記核酸は、少なくとも1つのE4領域タンパク質あるいは機能的な部分、その誘導体および／またはその類似体をコードする核酸を含む。したがって、細胞内のアデノウイルス誘導核酸の少なくとも部分的な複製を容易にする。

10

【0016】

1つの実施態様においては、アデノウイルスから誘導される前記核酸は、少なくとも1つのE1領域タンパク質あるいは機能的な部分、誘導体および／またはその類似体をコードする核酸を含む。E1領域タンパク質をコードするアデノウイルス核酸は、細胞内の前記核酸の少なくとも部分的な複製を容易にする。こうした複製能力は、スクリーニングが、腫瘍細胞を照射することができる発現可能な核酸に対して行われる場合に、例えば、ある一定の適用において好まれる。こうした場合には、例えば、腫瘍細胞を有する哺乳動物における前記ビーイクルの増幅につながるアデノウイルス核酸の複製は、また転移腫瘍細胞の照射にもつながる可能性がある。一方、E1領域タンパク質をコードするアデノウイルス核酸の存在は、例えば、細胞内の前記核酸の少なくとも部分的な増幅を容易にし、例えば、前記アデノウイルス核酸を有するビーイクルの増幅を容易にする。

20

1つの実施態様においては、前記ビーイクルはさらに、アデノ関連ウイルス末端反復あるいは機能的な部分、誘導体および／またはその類似体を含む核酸を有する。このように、細胞のなかの前記少なくとも1つの核酸の組込みは可能となる。1つの実施態様においては、アデノウイルスから誘導される前記ウイルスエレメントは、アデノウイルスキャプシド、あるいは機能的な部分、誘導体および／またはその類似体を含む。アデノウイルスの生物学は、分子レベルにおいてもまた比較的よく知られている。アデノウイルスベクターに対する多くのツールが開発されてきて、また引き続き開発されており、したがって、アデノウイルスキャプシドを本発明のライブラリーのなかに組み込むための選り抜きの好適なビーイクルとする。アデノウイルスは広範なさまざまな細胞を感染させることができる。しかし、異なるアデノウイルス血清型が細胞に対する異なった選好を有する。好ましい実施態様において、本発明のアデノウイルスキャプシドが入ることができる標的細胞集団を組み合わせ、及び広げるために、前記ビーイクルは、少なくとも2つのアデノウイルス由来のアデノウイルス線維タンパク質を含む。

30

【0017】

もう1つの態様においては、本発明は、本発明によるライブラリーのなかに存在する少なくとも1つの核酸の少なくとも1つの機能を測定するための方法であって、前記ライブラリー由来の少なくとも1つの核酸を有する少なくとも1つのビーイクルにより多様な細胞に形質導入する工程と、前記少なくとも1つの核酸の発現を見込む一方で前記細胞を培養する工程と、及びその発現された機能を測定する工程とを有する方法を提供する。現在、さらに多くの核酸が配列決定され、またクローン化されている。事実、核酸のクローン化と配列決定は、新たにクローン化され配列決定されている核酸の大半のものは、こうした速度で進められているが、その機能が分かっていない。公知の機能を備えた核酸に関してもまた、すべての機能が分かっているわけではない。本発明の1つの目的は、核酸の機能を測定するための方法を提供することである。それゆえ、本発明の一つの態様においては、本発明のライブラリーをスクリーニングするための方法を提供するが、核酸の機能を評価することができるスクリーニング測定法である。こうした測定法においては、その機能が中心的なものである。また、本発明のライブラリーは前記機能の少なくとも一部に影響を与えることができる発現可能な核酸の存在に関してスクリーニングされる。

40

50

【0018】

1つの好適な実施態様においては、前記多様な細胞は、多くの区画化に区分けされ、各区画は前記ライブラリー由来の少なくとも1つの核酸を有する少なくとも1つのビーイクルを有する。前記の多くの区画の数は、好適には、前記ライブラリーの前記数多くの区画の多様性に対応する。1つの好適な実施態様においては、前記方法はさらに、所望される機能を有するビーイクルを選択する工程を有する。

【0019】

もう1つの態様においては、本発明は、細胞のなかで発現するときに、所望される機能を有する発現可能な核酸を得るための方法を提供するが、前記方法は本発明によるライブラリーにおいて存在する少なくとも1つの核酸の少なくとも1つの機能を測定する工程を有し、前記方法は、前記ライブラリー由来の少なくとも1つの核酸を有する少なくとも1つのビーイクルにより多様な細胞に形質導入する工程と、前記少なくとも1つの核酸の発現を見込む一方、前記細胞を培養する工程と、発現させた機能を測定する工程とを有する。

10

【0020】

もう1つの態様においては、本発明は、各区画が少なくとも1つの核酸送達ビーイクルを有し、各区画が少なくとも1つの核酸から成る数多くの区画を有する1つのライブラリーを産生するための方法を提供し、前記方法は、少なくとも1つの核酸によりビーイクル核酸を組み換える工程を有し、それによって、発現可能な方法で、細胞に前記少なくとも1つの核酸を送達することができるビーイクルを産生する。核酸の発現に関しては、当技術分野では周知の数多くの分子エレメント、たとえば、プロモーター、エンハンサー、ポリ

20

【0021】

前記組換えは、PCRおよびNASBAなどの分子クローニングおよび／またはポリメラーゼ仲介増幅技術といった手段などのいずれかの手段により、行うことが可能である。しかし、前記組換えは好適には、ビーイクル核酸において少なくとも部分的に重複している配列と前記少なくとも1つの核酸の間の相同組換えを含む。とくに、大きなウイルス由来核酸の創製には、相同組換えが好ましい。好適には、前記ビーイクル核酸および／または前記少なくとも1つの核酸は、アデノウイルス核酸あるいは機能的部分、その誘導体および／またはその類似体を含む。1つの実施例においては、前記アデノウイルス核酸は、非

30

【0022】

1つの態様においては、本発明は、本発明の方法により得ることができるライブラリーを提供する。

本発明はさらに、本発明の1つのライブラリーのなかに存在する少なくとも1つの核酸の少なくとも1つの機能を測定するための本発明の方法により得ることができるライブラリーの使用法を提供する。

【0023】

本発明はさらに、前記ビーイクルを細胞に供給する工程と、前記ビーイクルの増幅を可能にする前記細胞を培養する工程と、前記細胞により増幅されるビーイクルを収集する工程とを、本発明の1つのライブラリーのなかに存在するビーイクルを増幅するための方法において、提供する。好適には、前記細胞は霊長類の細胞である。このように、前記ビーイクル核酸の複製を可能にするウイルスエレメントを含むビーイクルの増幅を可能にする。好適には、前記細胞はアデノウイルスE1領域タンパク質をコードする核酸を含む。このように、E1領域の少なくとも一部分の機能的欠失を有するアデノウイルス核酸を有するアデノウイルスに由来するウイルスエレメントを有するビーイクルの増幅を、とりわけ可能にする。好適には、前記細胞は、PER.C6細胞（ECCC寄託番号96022940）あるいは機能的なその誘導体および／またはその類似体である。前記PER.C6細胞あるいはその機能的誘導体および／またはその類似体における前記アデノウイルス核酸と染色体核酸が、複製コンピテントアデノウイルスの形成につながる前記アデノウイル

40

50

スと染色体核酸間の相同組換えを可能にする配列重複を有していない例のなかで、P E R . C 6 細胞あるいはその機能的誘導体および／またはその類似体は、複製コンピテントな（複製応答能を有する）アデノウイルスに付随する産生を伴うことなく、E 1 コード領域の欠失したアデノウイルス核酸の複製を可能にする。

【0024】

好適には、前記細胞はさらに、アデノウイルス E 2 A および／またはアデノウイルス E 4 領域タンパク質あるいは機能的部分、その誘導体および／またはその類似体をコードする核酸を含む。このように、アデノウイルス E 2 A および／またはアデノウイルス E 4 領域タンパク質をコードする核酸の機能的欠失したアデノウイルス核酸の複製を可能にし、それによって、アデノウイルス E 2 A および／またはアデノウイルス E 4 領域タンパク質あるいは機能的部分、誘導体および／またはその類似体をコードする核酸を有しない細胞、例えば、ある一定の機能を表示することができる細胞のなかの前記アデノウイルス核酸の複製を阻害する。

10

【0025】

1つの実施例においては、ビーイクル核酸は、E 1 領域コードタンパク質が存在しない場合に複製することができるビーイクル核酸の形成につながる、前記細胞のなかに存在するほかの核酸との配列重複を有してはいない。

【0026】

本発明はさらに、前記多様な区画が複数ウェルフォーマットを含む、本発明によるライブラリーあるいは本発明による方法を提供する。複数ウェルフォーマットは、本発明の諸方法の少なくとも一部分の自動化実施には非常に適している。

20

【0027】

1つの態様においては、本発明は、前記少なくとも1つの核酸が機能未知の産物をコードするライブラリーを提供する。

本発明のライブラリーおよび／または本発明の諸方法は、好適には、少なくとも実質的に自動化された設定において使用される、あるいは実施される。

【0028】

本発明はさらに、本発明によるライブラリーを含む多様性のある細胞を提供する。

本発明は、サンプル核酸の発現産物に機能を対応させる1つの手段として、宿主の表現型を改変するために、宿主のなかのアデノウイルスベクターライブラリーの高度な処理能力を備えたスクリーニングにより追跡される1つあるいはそれ以上のサンプルを含む組換え体アデノウイルスベクターライブラリーの高度な処理能力を備えた生成法を使用する。E 1 欠失アデノウイルスのライブラリーは、核酸コンストラクトと形質転換相補性的パッケージング細胞を使用して、高度な処理能力を備えた設定において創製される。サンプル核酸ライブラリーは、明確に定義されたあるいは定義されていない配列のセットでありうるし、あるいは定義されていない、あるいは定義された配列のプールでありうる。第1の核酸コンストラクトは相対的に小さく、また、操作可能な形態で少なくとも左 I T R、パッケージングシグナル、及び発現カセットを有するアダプタープラスミドを、サンプル核酸とともに操作するのが容易である。

30

第2の核酸コンストラクトには、各ほかのおよび／または第1のコンストラクトにおける配列と部分的に重複する1つあるいはそれ以上の核酸分子が含まれており、また、アダプタープラスミドあるいはパッケージング細胞によっては提供されない組換えアデノウイルスの複製およびパッケージングのために必要な少なくともすべてのアデノウイルス配列が含まれる。第2の核酸コンストラクトは、ウイルス生成に必要な配列、および／またはE 2 A、E 3 および／またはE 4 領域配列のほかに、E 1 領域配列および任意にはE 2 B 領域配列において欠失を引き起こしている。パッケージング細胞のなかへの第1および第2の核酸コンストラクトのコトランスフェクションは、第1および第2の核酸コンストラクトにおける重複配列の間、および、それが1つの核酸分子以上のものから作り上げられている場合には、第2のコンストラクトの間での相同組換えにつながる。一般的には、その重複配列は、5000 bp 以上ではなく、またウイルス産生に欠かせないE 2 B 領域配

40

50

列を包含する。組換えウイルスDNAは、組換え体アデノウイルスベクターライブラリーを産生するためにE1相補性パッケージング細胞において複製および増幅することができるE1欠失により生成される。アデノウイルスベクターライブラリーは、その生物学的活性の検出と分析を可能にするために、サンプル核酸によりコードされる産物の十分な発現を可能にするように増殖される高度処理能力を備えた設定における宿主のなかに導入される。宿主は、*in vitro*の細胞あるいは動物あるいは植物モデルでありうる。サンプル核酸によりコードされる産物の十分な発現はその宿主の表現型を改変する。生物学的活性に関する*in vitro*およびまたは*in vivo*でのさまざまな測定法のいずれかを使用して、改変された表現型が同定され、また分析され、機能はそれによって、サンプル核酸の産物に対応付けられる。本出願において説明されているプラスミドをベースにするアデノウイルスベクターシステムは、ヒト疾患に適用可能な新規な遺伝子に関してスクリーニングするのに使用することができる大きな遺伝子転移ライブラリーの作成が提供される。特定のアデノウイルス仲介形質導入による有用あるいは有益な生物学的効果の同定により、結果的には、ヒト疾患の治療に対する小さな分子薬剤のための有用な遺伝子治療用産物あるいは標的を得ることができる。

【0029】

現在入手可能な技術を上回る長所が、対象となっている本発明にはいくつかある。プロセス全体では96ウェルあるいはそのほかの複数ウェルフォーマットにおいて実施される場合にはとくに自動化に適合している。数多くの異なる*in vitro*測定法を使用した高度な処理能力を備えたスクリーニングは、かなり短い時間で機能情報を効率的に得る手段を提供する。*in vitro*あるいは*in situ*で宿主に所望される表現型を示すあるいは導入する組換えアデノウイルスライブラリーの構成員（単数／複数）は、組換えアデノウイルスベクターの管理可能な数あるいは動物モデルにおいて*in vitro*で試験することができるクローンにそのライブラリーを分解するために同定される。

【0030】

対象となっている本発明のもう1つの明確な長所は、本諸方法がRCA遊離アデノウイルスライブラリーを産生することである。ライブラリーを通してRCA汚染が、とくに、複数のスクリーニング計画で使用されるライブラリーが継続的に増幅されている場合には、主要な障害となる可能性がある。さらに対象となる本発明の長所は、プロセスに関係しているステップの数を少なくしている点である。対象となっている本発明の諸方法は、高度な処理能力を備えたスクリーニング計画において使用する前に、各個々のアデノウイルスのクローニングを必要とすることはない。ほかのシステムには、ベクター生成に必要な、さまざまなアデノウイルスプラスミドに対して相同組換えを達成するために、*E. coli*において1つあるいはそれ以上のステップが含まれる（Chartierら, (1996)J. Viro. 70(7):4805-4810;Crouzetら, (1997)Proc. Natl. Acad. Sci. 94(4):1414-1419;Heら, (1998)Proc. Natl. Acad. Sci. 95(5):2509-2514）。アデノウイルス組換えおよびアデノウイルスベクター生成に使用されてきて、また、ヒト細胞における相同組換えをベースにしているもう1つのプラスミドシステムは、プラスミドのpBHGSシリーズである。しかし、これは293細胞で使用されており、そのプラスミドはE1配列との重複を有しており、それに加えて、そのプラスミドの不安定性につながる2つのITRをプラスミドpBHGSと一緒に近しく含んでいる。すべてこれらの特徴は望ましいものではなく、またRCA産生あるいはそうでなければ、欠陥の多いアデノウイルスベクター産生につながる（Bettら, (1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (19):8802-8806）。対象となっている本発明の組換え核酸は、これらの望ましくはない特徴を備えた構成を回避するために設計された。

対象となっている本発明のさらに長所は、導入されたサンプル核酸の高度な発現という結果になる、*in vitro*および*in vivo*でのさまざまな哺乳動物細胞と組織における組換え遺伝子を効率的に導入し、また発現する組換えアデノウイルスの能力である。静止状態の細胞に生産的に感染する能力は、さらに、組換えアデノウイルスライブラリーの有用性を拡張する。さらに、高い発現レベルが、サンプル核酸の産物（単数／複数）が

10

20

30

40

50

、十分なレベルで発現されて、検出されるべき宿主の表現型の変化を誘導し、かつその測定されるサンプル核酸によってコードされる産物（単数／複数）の機能を許容することを保証する。

【0031】

サンプル核酸は、ゲノムDNA、cDNA、事前にクローン化されたDNA、遺伝子、EST、合成二本鎖オリゴヌクレオチド、あるいは1つあるいは複数の関連あるいは非関連配列から誘導される無作為な配列でありうるし、またポリペプチド、アンチセンス核酸あるいは遺伝抑制因子（GSE）として直接的に発現することができる。サンプル核酸配列は、哺乳動物（例えば、ヒト、サル、マウス）、魚（例えば、ゼブラフィッシュ、フグ、サケ）、線虫（例えば、*C. elegans*）、昆虫（例えば、ショウジョウバエ）、酵母、真菌、細菌、植物から得ることができる。代替的には、サンプル核酸は商業的に入手可能なDNAシンセサイザーおよびキットを使用して合成オリゴヌクレオチドとして作成される。サンプル核酸と相補鎖のポリペプチドあるいは産物のオープンリーディングフレームをコードする鎖は個々に作成され、また二本鎖DNAを形成するためにアニーリングされる。特別なアニール化の条件は必要ない。サンプル核酸の配列は、無作為化されるが、あるいは変異原性化あるいは組換えを促進する方法によらずに行われる。サンプル核酸は生物学的活性が分かっていない産物をコードする。生物学的活性という用語は、*in situ*、*in vivo*、あるいは*in vitro*のいずれかで検出可能かあるいは測定可能である活性を意味することが意図されている。生物学的活性の実施例には、改変された生存率、形態学的変化、アポトーシス誘発、DNA合成、腫瘍発生、疾患あるいは薬物感受性、化学応答性あるいは分泌、タンパク質発現に限定されるわけではないが、それらが含まれる。

【0032】

サンプル核酸には好適には、正しい配向でのベクターへの結合を容易に、また、プロモーターにサンプル核酸を操作可能にリンクするために、適合性のある末端が含まれる。合成二本鎖オリゴヌクレオチド結合の例では、ベクターに対して適合性のある末端が、オリゴヌクレオチドのなかに入れるように設計することができる。サンプル核酸はEST、ゲノムDNA、cDNA、遺伝子あるいは事前にクローン化したDNAである場合には、適合性のある末端は制限酵素による消化あるいは適当な制限酵素部位を含むDNAへのリンカーの結合により形成することができる。代替的には、ベクターはリンカーを使用することにより修飾することができる。ベクター由来のサンプル核酸の転写が所望される産物、すなわち、ポリペプチド、アンチセンス核酸あるいはGSEを産生するように、制限酵素部位は選択される。

【0033】

サンプル核酸が好適に導入されるベクターには、サンプル核酸のライブラリーの挿入のためには、操作不可能な形態、ITR、少なくとも1つのクローン化部位、あるいは好適には、マルチプルクローニングサイトが含まれ、そして、宿主におけるサンプル核酸の送達と発現には、転写調節構成要素が含まれる。一般的には、後期遺伝子発現、E2A領域配列、E3領域配列あるいはE4領域配列に必要なそうしたもののほかには、E1領域配列、E2B領域配列は含まれない。E1欠失送達ベクターあるいはアダプタープラスミドは、それが合成二本鎖オリゴヌクレオチド、ゲノムDNA、cDNA、EST、あるいは事前にクローン化されたDNAであるかどうか、サンプル核酸の直接的なクローニングのために適当な末端を作り出すために、適当な制限酵素により、同時にか、順々にかのいずれかで、加水分解される。制限酵素分解は、製造業者のプロトコールに従って市販されていて入手可能な試薬を使用して、日常的に行われ、また選択される制限酵素によりさまざまに変化させられる。サンプル核酸の別個のセットあるいはプールが、アデノウイルスベクターの産生用プラスミドの対応するセットあるいはライブラリーを産生するためにE1欠失アダプタープラスミドのなかに入挿される。アダプタープラスミドの1つの実施例は、アデノウイルスヌクレオチド1-458、それに続いてアデノウイルス主要後期プロモーター、機能的に単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子にリンクされ、また続いてアデ

10

20

30

40

50

ノウイルスヌクレオチド 3511-6095により作り上げられる pMLPI. TKである。アダプタープラスミドの他の実施例は、pAd/L420-HSA (図1) および pAd/Clip (図22) である。pAd/L420-HSAには、アデノウイルスヌクレオチド 1-454、マウスのHSA遺伝子にリンクされるL420プロモーター、ポリAシグナル、それに続いてアデノウイルスヌクレオチド 3511-6095が含まれる。pAd/CLIPは、CMVプロモーター、マルチクロニングサイト、イントロン、ポリAシグナルを備えた発現カセット (L420-HSA) の置換により pAd/L420-HSAから作成された。

【0034】

一旦加水分解されると、ベクターとサンプル核酸は、ゲル電気泳動法により精製される。その核酸は、例えば、アガロース加水分解、電気溶出、溶解あるいは高塩抽出法によりさまざまなゲルマトリックスから抽出することができる。これらの諸方法と組み合わせて、あるいは代替的に、加水分解核酸は、クロマトグラフィ (例えば、Qiagenあるいは等価のDNA結合レジン) あるいはフェノール/クロロホルム抽出法、エタノール沈降法により精製することができる。最適な精製方法は、ベクターとサンプル核酸のサイズとタイプによる。両方とも精製を行わずに使用することができる。一般的には、サンプル核酸には、5'-リン酸基が含まれ、またベクターは、核酸-ベクター結合を促進し、またベクター-ベクター結合を防ぐためにアルカリ性ホスファターゼにより処理される。サンプル核酸が合成オリゴヌクレオチドである場合には、5'-リン酸基が化学的あるいは酵素的な手段により加えられる。結合に際しては、サンプル核酸 (挿入) のベクターDNAに対するモル比は、およそ10:1~0.1:1の範囲である。結合反応は、T4-DNAリガーゼあるいは、二本鎖DNAライゲーションを触媒するいずれかのほかの酵素を使用して行われる。反応時間と温度はそれぞれ、約5分間~18時間、約15℃~室温の範囲で変動させることができる。

【0035】

発現の強度は、転写活性において異なるプロモーター (CMV即時型プロモーター、SV40プロモーター、レトロウイルスLTR) を使用して調節することができる。サンプル核酸を、CMV即時型プロモーターおよび任意に1つあるいはそれ以上のエンハンサー構成要素などの強力なプロモーターに操作可能にリンクすることにより、宿主の表現型を改変するために感染の数を少なくして使用することを可能にする高発現率という結果を生じる。低めの感染の数を使用するという選択肢は、ライブラリーを *in situ*、*in vivo*、および *in vitro* で使用することができる回数が増加する。さらに、スクリーニング計画、測定、動物モデルで使用されている感染および投与量のウイルスライブラリーの数を低くすると、形質導入宿主での毒性効果を喚起する機会が減少し、本発明の主題であるシステムの信頼性が再び増大する。ライブラリーの発現に関連する可能な毒性効果を減らすもう1つの方法は、一時的なおよび/または細胞型に特異的な制御をスクリーニング測定を通して提供するために、調節可能なプロモーター、とくにウイルス生産の間に抑制されるが、しかし、アデノウイルスライブラリーにより機能的なスクリーニングの間に始動することができ、あるいは活性化する調節可能なプロモーターを使用することである。このように、ライブラリーの構成員であり、また相補性細胞系列に毒性があり、あるいは阻害性があり、あるいはいずれかの方法でアデノウイルス複製および生産を干渉するサンプル核酸が、いまだにアデノウイルスベクターとして産生することができる (WO 97/20943)。プロモーターのこのタイプの例としては、アデノウイルスE1遺伝子産物により抑制されるAP1依存性プロモーターがあり、これによりアデノウイルスライブラリー産生時にサンプル核酸の発現が遮断されることになる (van Damら, (1990) Mol. Cell. Biol. 10(11):5857-5864を参照)。こうしたプロモーターは、コンビナトリアル技術を使用して作成することができ、あるいはプロモーターの天然あるいは適応形態を含めることができる。AP1依存プロモーターの例としては、コラーゲナーゼ、c-myc、単核細胞化学誘因物質タンパク質 (JEあるいはmcp-1/JE)、ストロメライシン遺伝子由来のプロモーターがある (Hagemyerら, (1993) EMBO J. 12(9):3559-3572; Offringaら, (1

10

20

30

40

50

990)Cell 62(23):527-538; Offringaら,(1998)Nucleic Acids Res. 16(23):10973-10984; van Damら,(1989) Oncogene 4(10):1207-1212)。代替的には、複合 *in vitro* スクリーニングが用いられるあるいは *in vivo* モデルが用いられ、また組織調節発現が所望される場合にはとくに、ほかのさらに特異的であるが、しかしより強力なプロモーターを使用することができる。選択された宿主のなかで機能的ないずれかのプロモーター／エンハンサーシステムを使用することができる。組織調節プロモーターの例としては、アルブミンプロモーターなどの肝臓において特異的な活性あるいは促進活性を備えたプロモーターが含まれる (Troncheら,(1990)Mol.Biol.Med. 7(2):173-185)。促進発現に対するもう1つのアプローチは、3' 非翻訳領域における安定化配列を含めることにより、サンプル核酸から転写されたmRNAの半減期を増加させることである。複製とパッケージングに必要なすべての必要なアデノウイルス遺伝子を保持する、E1欠失アダプタープラスミドにおける配列に相同的な配列を有する第2の核酸コンストラクトであるヘルパープラスミドもまた作成される。好適には、ヘルパープラスミドは、複製応答能のあるアデノウイルスの産生につながると考えられるパッケージング細胞により発現される相補性配列は有していない。さらに、好適には、ヘルパープラスミド、アダプタープラスミド、パッケージング細胞は、相同組換えおよびRCA形成につながると考えられる配列重複は有していない。アダプタープラスミドとヘルパープラスミドの間で共有されている配列重複の領域は、相同組換えや、E1欠失、複製欠損性組換えアデノウイルスゲノムの形成を可能にしている。一般的には、重複領域は後期遺伝子発現に必要であるE2B領域配列を包含する。ライブラリーのインサートサイズを認識できるほどに減らすことなくもっとも良い効率を提供する重複領域のサイズは、経験的に決定することができる。配列重複は、一般的には10bp～5000bpであり、さらに好適には、2000～3000bpである。

【0036】

所望されるアデノウイルスライブラリーにおけるサンプル核酸あるいはDNAインサートのサイズは、数百塩基対（例えば、神経ペプチドをコードする配列）から30kbp（例えば、タイチン）まで変化することができる。アダプタープラスミドを使用して産生されるアデノウイルスベクターのクローン化能力は、E1相補性細胞系列の誘導体によりその後容易に補足される付加的なアデノウイルス遺伝子（単数／複数）により増加させることができる。1つの例としては、欠失のための候補遺伝子には、E2、E3、および／またはE4が含まれる。例えば、アデノウイルス複製およびパッケージングに欠かせない領域は、アダプターならびにヘルパープラスミドから欠失され、また、例えば、その相補性細胞系列により、発現される。E3欠失に関しては、この領域における遺伝子は、*in vitro* モデルに関してパッケージング細胞に補足される必要はなく、また *in vivo* モデルに関して組換えウイルスの免疫原性上でのインパクトは、その時々のもに限定して対処することをベースにして評価することができる。

【0037】

特定のアダプタープラスミドのセットあるいはライブラリーあるいはアダプタープラスミドのプール（単数／複数）は、アデノウイルスベクターのセットあるいはライブラリーに変換される。サンプル核酸を含むアダプタープラスミドは線状化され、アダプタープラスミドにある配列に相同な配列を有し、また複製とパッケージングに必要なすべてのアデノウイルス遺伝子を含んでいるヘルパープラスミドと一緒に、好適には、96、384、1,536あるいはそれ以上のプレート毎のウェル（穴）を備えたマイクロ力価組織培養培地プレートに接種されたE1相補性細胞系列にトランスフェクトされる。好適には、E1相補性細胞系列において複製およびパッケージされるE1欠失、複製欠損性アデノウイルスゲノムを生成するために、アダプターおよびヘルパープラスミドにより共有されている相同性配列の間の組換えは、好ましくは、E1相補性細胞系列内において、複製され、パッケージングされる、E1欠損、複製欠損性のアデノウイルスゲノムを生成する。1つ以上のヘルパープラスミドが使用される場合には、一方の腕側でのヘルパープラスミドの間で共有されている相同性領域の間の組換えと、アダプタープラスミドとの相同組換えとに

より、結果として、複製欠損性組換えアデノウイルスゲノムが形成される。アダプターおよびヘルパープラスミドの間の配列重複の領域は、約数百ヌクレオチドあるいはそれ以上に变化させることができる。組換え効率は、重複のサイズを増加することにより、増加することになる。

【0038】

転移相補性パッケージング細胞により供給されるE1機能は、E1欠失組換えアデノウイルスゲノムの複製およびパッケージングを可能にする。アダプターおよび／またはヘルパープラスミドは、好適には、それらの間に配列重複を有さず、あるいは複製応答能のあるアデノウイルス(RCA)の形成につながるパッケージング細胞における相補性配列を含む配列重複を有しない。好適には、アダプター及びヘルパープラスミド上の少なくとも一つのITRが、アデノウイルス配列あるいは発現カセットに存在しない一つの制限酵素部位によって隣接されており、ITRがその制限酵素によるDNAの消化によってベクター配列から遊離されるようになっている。このように、複製の開始はさらに効率的に起こる。組換えアデノウイルス生成の効率を増加させるために、より高度な処理能力が、大きな組織培養培地バイアルあるいはフラスコを使用する代わりに、プレート毎に96、384、1,536穴を有するマイクロ力価組織培養プレートを使用することにより得ることができる。E1相補性細胞系列が、マイクロ力価プレートのなかで増殖され、また、アダプタープラスミドおよびヘルパープラスミドのライブラリーとがコトランスフェクションされる。例えば、ロボットは、產生することができるアデノウイルスベクターの数をさらに増加することができる(Hawkinsら,(1997)Science 276(5320):1887-9,Houston,(1997)Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 19 Suppl. A:43-5)。

【0039】

アダプタープラスミドに対する1つの代替物として、サンプル核酸は「最小」アデノウイルスベクタープラスミドに結合することができる。本発明によるいわゆる「最小」アデノウイルスベクターは、複製に必要とされる線状アデノウイルスゲノムの末端に由来するDNA配列である逆方向末端反復配列(ITR)の少なくとも機能的な一部分あるいは誘導体の少なくとも1つのコピーだけではなく、ウイルス粒子のなかへのゲノムのインキャプションに必要であるウイルスゲノムの少なくとも一部分(インキャプションシグナル)を保持している。最小ベクターは、好適には、ヘルパーフリー及びRCAフリーの組換えアデノウイルスベクターのストックの創製と生産に使用され、また、38kbまでの外因性DNAを収容することができる。最小アデノウイルスベクターのヘルパー機能は、好適には、ベクターゲノムにある相補性細胞あるいは遺伝子に存在するそうした遺伝子は例外として、必要とされる遺伝子産物をコードするすべてのウイルス遺伝子を含むインキャプション欠損、複製応答能のあるDNA分子によってトランスに供給される。

【0040】

「最小」アデノウイルスベクターのパッケージングは、ヘルパーウイルスによる、あるいは代替的には、パッケージング欠損複製ヘルパーシステムによる、E1相補性細胞系列のコトランスフェクションにより達成される。好適には、パッケージング複製ヘルパーは、トランスフェクションの後に増幅され、またパッケージング細胞系列によっては発現しない最小アデノウイルスベクターの複製およびパッケージングに必要な配列を発現させる。そのサイズがアデノウイルスビリオンの容量を越えるため、および／またはそれは機能的インキャプションシグナルを欠くため、パッケージング欠損複製ヘルパーはアデノウイルス粒子のなかに詰め込まれることはない。パッケージング欠損複製ヘルパー、最小アデノウイルスベクター、相補性細胞系列は、好ましくは、RCA形成を可能にする配列重複の領域は有していない。

【0041】

複製、パッケージング欠損ヘルパー分子には常に、パッケージング細胞系列により供給されるものにより、あるいはそれによらずに、複製およびパッケージングに必要なタンパク質を産生するすべてのアデノウイルスコード配列が含まれる。前記ヘルパー分子それ自体

10

20

30

40

50

の複製は、アデノウイルスタンパク質および I T R により仲介される、あるいは仲介されないことがある。アデノウイルスタンパク質（細胞タンパク質と一緒に作用する E 2 遺伝子産物である）の活性により複製するヘルパー分子には、アデノウイルスから誘導される少なくとも1つの I T R が含まれる。E 2 遺伝子産物は、E 1 依存性あるいは E 1 依存性プロモーターにより発現させることができる。1つだけの I T R がアデノウイルスから誘導される場合には、ヘルパー分子には、好ましくは、ヘアピン様構造を形成するために分子内でアニール化される配列も含まれる。

【0042】

E 2 遺伝子産物発現の後、アデノウイルス D N A ポリメラーゼはヘルパー分子上に I T R を認識し、また一本鎖コピーを産生し、および 3' -末端が分子内でアニール化され、逆鎖合成のためのプライマーとして役立つヘアピン様構造を形成する。逆鎖合成の産物は1つの末端に I T R を伴う二本鎖ヘアピンである。この I T R は、I T R を両方の末端に伴う二本鎖分子を産生するアデノウイルス D N A ポリメラーゼにより認識され（例えば、図 13 を参照）、またトランスフェクションされた分子の長さの 2 倍になる（われわれの実施例では、それは 35 K b ~ 70 K b から複製される）。ヘルパー D N A の複製はアデノウイルスタンパク質の十分なレベルの産生を促進する。好適には、複製分子のサイズはアデノウイルスビリオンのパッケージング容量を越え、また、したがって、アデノウイルス粒子のなかには詰め込まれることはない。ヘルパー分子に機能的インキャプシデーションシグナルがない場合は、そのヘルパー分子がパッケージング欠損であることが保証される。産生アデノウイルスタンパク質がコトランスフェクションされた、あるいはコインフェクションされた最小ベクターの複製およびパッケージングを仲介する。

【0043】

ヘルパー分子の複製がアデノウイルス E 2 タンパク質には依存していない場合には、ヘルパーコンストラクトには、好適には、S V 40 に由来する複製起点が含まれる。S V 40 ラージ T タンパク質をも誘導的に発現させる、あるいは効率的な複製に必要とされる分量の S V 40 由来タンパク質を誘導的に発現させる E 1 含有パッケージング細胞系列における最小アデノウイルスベクターと一緒にされたこの D N A のトランスフェクションは、ヘルパーコンストラクトの複製とアデノウイルスタンパク質の発現につながる。これらは、その後、コトランスフェクションあるいはコインフェクションされた最小アデノウイルスベクターの複製およびパッケージングを開始する。好適には、そこには、R C A の生成につながる可能性がある複製欠損パッケージングコンストラクト、最小アデノウイルスベクター、相補性細胞系列によって共有される重複配列が存在しない。

【0044】

最小アデノウイルスベクターの増殖時には、最小ベクターはそれ自体は E 1 相補性細胞上では複製することができないため、E 1 相補性細胞上の各増幅ステップは説明したヘルパー分子のいずれかのトランスフェクションに付随して行われている。代替的には、安定的にゲノム内に組み込まれる複製およびパッケージングに必要なすべてのアデノウイルス遺伝子を含むし、また切断および条件的に複製が可能である細胞系列は使用することができる（Valerio と Einerhand, PCT/NL9800061）。

【0045】

細胞への核酸のトランスフェクションは、ウイルス粒子のなかへの組換えベクターのパッケージングのために必要であり、またリポソーム、D E A E -デキストラン、ポリブレン、ホスファゼンあるいはホスファゼン誘導体を含むさまざまな化学物質により媒介される。リポソームは、さまざまな商業的な供給者から入手可能であり、それには D O T A P（Boehringer-Mannheim 社）、T f x - 50^R、T r a n s f e c t a m^R、P r o F e c t i o n^R（Promega 社、Madison 市、ウィスコンシン州）、L i p o f e c t A m i n^R、L i p o f e c t i n^R、L i p f e c t A c e^R（GibcoBRL、Gaithersburg、メリーランド州）が含まれる。溶液中で、脂質は核酸に関連している小胞を形成し、また細胞膜との小胞の融合によりあるいはエンドサイトーシスにより細胞のなかへのその導入を容易にする。ほかのトランスフェクション法には、電気穿孔法、リン酸カルシウム共沈降法、マイクロイン

10

20

30

40

50

ジェクション法がある。任意の細胞系列に対するトランスフェクション条件が確立されていなかった場合、あるいは分からない場合には、それら条件は経験的に決定することができる (Maniatisら, Molecular Cloning, 16.30-16.55頁)。

【0046】

組換え体アデノウイルスのウイルスベクターの収量は、E1相補性細胞系列へトランスフェクションする前に二本鎖プラスミドDNAを変性させることにより増加させることができる。変性は、例えば、95～100℃にて二本鎖プラスミドDNAを融解することにより、それに引き続いて、重複配列を有するアダプターおよびヘルパープラスミドのさまざまな割合のものを使用して急速冷却することにより、行われる。また、E2A (DNA結合タンパク質) および／またはE2B遺伝子 (pTP-Pol) を安定的に、あるいは一過性に発現させるPER.C6誘導体は、細胞当たりの複製比率を増加させることにより、ウェル当たりのアデノウイルス産生を増加させるのに使用することができた。代替的には、リコンビナーゼタンパク質 (単数／複数) あるいはリコンビナーゼDNA発現コンストラクト (単数／複数) すなわち、Kluyveromyces waltii由来のリコンビナーゼのコトランスフェクション (Ringroseら, (1997) Eur. J. Biochem. 248(3):903-912)、あるいは、いずれかのほかの遺伝子あるいは相同組換え効率を増加させることができる遺伝子コード因子を使用することができる。パッケージング細胞上でのトランスフェクションおよび／または複製中における0.1～100mM酪酸ナトリウムの封入は、ウイルス産生を増加させることができる。これらの改良により、マイクロ力価ウェル当たりのウイルス収量が改善される結果となり、またしたがって、単一のライブラリーにより実施することができる試験の数とタイプは増加し、また、ライブラリー中のさまざまな遺伝子あるいはサンプル核酸間の変異性を克服することになるであろう。

【0047】

E1領域産物を発現するアデノウイルスベクターの産生に使用される細胞系列には、例えば、293細胞、PER.C6 (ECACC 96022940)、あるいは911細胞が含まれる。これらの細胞系列のそれぞれはアデノウイルスE1領域をコードする核酸によりトランスフェクションされている。これらの細胞はE1領域遺伝子産物を安定的に発現させ、また、E1欠失組換え体アデノウイルスベクターをパッケージすることが示された。PER.C6細胞上で得られる組換え体アデノウイルスの収量は、293細胞上で得られるよりも高い。

【0048】

これらの細胞系列のそれぞれは、例えば、対応する遺伝子における変異、欠失、あるいは挿入を有するアデノウイルスベクターの増殖を可能にするE2BあるいはE2Aコンストラクト (例えば、ts125E2Aおよび／またはhrE2A)、あるいはE4などの導入のための基礎を提供する。これらの細胞は、適当なアデノウイルス遺伝子を安定的に発現させる組換え核酸の導入によって付加的なアデノウイルス遺伝子産物を発現させるように修飾することができる、あるいは、適当な遺伝子 (単数／複数)、例えば、パッケージング欠損複製ヘルパー分子あるいはヘルパープラスミドを一過性に発現させる組換え核酸を導入することができる。

【0049】

マイクロ力価プレートウェル (96、384、1,536あるいはそれ以上のウェル) で増殖されるすべてあるいはすべてに近いトランス相補性細胞は、アダプタープラスミドかあるいは最小アデノウイルスプラスミドライブラリーおよび適当なヘルパー分子 (単数／複数) かのいずれかによりトランスフェクションの後に、組換えアデノウイルスを産生する。非常に多くの数のアデノウイルス遺伝子転移ベクターあるいはライブラリーは、それぞれ独特な遺伝子を発現するが、このように、in vivoとin vitroの両方の特定遺伝子産物の生物学的活性の分析を可能にする規模で都合よく生産することができる。アデノウイルスベクターの広範な組織の向性のために、数多くの細胞および組織タイプは、アデノウイルスライブラリーを形質導入可能である。

【0050】

遺伝子あるいはサンプル核酸のライブラリーは、好ましくは、R C Aフリーのアデノウイルスライブラリーに対する上述の諸方法を使用して変換される。未知の機能を有する遺伝子あるいはサンプル核酸のアデノウイルスライブラリーは、その後、E L I S A法を含む免疫学的測定法、増殖測定法、薬物耐性測定法、酵素活性測定法、臓器培養、分化測定法、細胞毒性測定法など、数多くの *i n v i t r o* 測定法を含めた高度な処理能力を備えたスクリーニングを行うのに使用される。アデノウイルスライブラリーは、初代内皮および平滑筋細胞培養培地を含む組織あるいは組織部位、あるいは組織誘導初代短期生存細胞培養培地 (Wijnbergら, (1997) *Thromb Haemost* 78(2), 880-6)、冠動脈バイパス移植ライブラリー (Vassalliら, (1997) *Cardiovasc Res.* 35(3), 459-69; FusterとChesebro, (1985) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 13, 285-99)、H U V E Cを含む 10
 臍帯組織 (Gimbrone, (1976) *Prog. Hemost. Thromb.* 3, 1-28; Strikerら, (1980) *Methods Cell. Biol.* 21A, 135-51)、couplet肝細胞 (Grafら, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(20), 6516-20)、表皮培養培地 (Fabre, (1991) *Immunol. Lett.* 29(1-2), 161-5; Phillips, (1991) *Transplantation* 51(5), 937-41) 上で試験することができる。懸濁培養培地を含む植物細胞培養培地はまた、ヒト由来DNA配列ならびに植物由来配列を含むいずれかのDNA配列を保持するアデノウイルスライブラリーに対する宿主細胞としても使用することができる (de Vriesら, (1994) *Biochem. Soc. Symp.* 60, 43-50; Fukadaら, (1994) *Int. J. Devel. Biol.* 38(2), 287-99; Jones, (1983) *Biochem. Soc. Symp.* 48, 221-32; Kieranら, (1997) *J. Biotechnol.* 59(1-2), 39-52; Stanleyら, (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3(1), 91-6; Taticekら, (1994) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5(2), 20
 165-74)。

【0051】

初期非選択ライブラリーのサイズにより、一旦遺伝子のアデノウイルスライブラリーが、*i n v i t r o* 測定により、合理的な数の候補群に分解されると、そのアデノウイルスは適当な動物モデルで試験することができる。使用することができる動物モデルの実施例には、アルツハイマー病、動脈硬化症、不活性化された遺伝子 (単数/複数) を有するマウスを含む内因性あるいは外因性遺伝子の発現を改変したトランスジェニック動物、特定部位に移植されたがんを有する動物、がん転移モデル、パーキンソン病モデル、N O D - S C I Dマウスなどのヒト骨髄キメラマウスなどモデルが含まれる。付加的な試験が必要であるので、候補であるアデノウイルスの菌株は、適当なトランス相補性条件下でアデノ 30
 ウイルスを継代していくことにより拡張することができる。

【0052】

使用された動物モデルにより、アデノウイルスベクターあるいはアデノウイルスベクターの事前を選択されたプールの混合物を、非ヒト霊長類の肺 (Seneら, (1995) *Hum. Gene Ther.* 6(12):1587-93)、アルツハイマー病 (Walkerら, (1997) *Brain Res. Brain Res. Rev.* 25(1):70-84) のための正常およびアポE欠損マウスの脳 (Robertsonら, (1998) *Neuroscience* 82(1):171-80)、パーキンソン病モデルの脳 (Hockmanら, (1971) *Brain Res.* 35(2):613-8.; Zigmondと Stricker, (1984) *Life Sci.* 35(1):5-18) などの所望される動物の適当な部位に点滴、あるいは塗布あるいは投与することができ、肝不全およびウイルス 40
 ン病を含む肝疾患モデル (Cuthbert, (1995) *J. Investig. Med.* 43(4):323-36; Karrerら, (1984) *Curr. Surg.* 41(6):464-7) や、転移モデルを含む腫瘍モデル (Esandiら, (1997) *Gene Ther.* 4(4):280-7; Vincentら, (1996) *J. Neurosurg.* 85(4):648-54; Vincentら, (1996) *Hum. Gene Ther.* 7(2):197-205) の血液流 (例えば、静脈内) に注射することができる。選択アデノウイルスベクターをヒトキメラN O D - S C I Dマウスの骨髄中に直接注射することも可能である (Dickら, (1997) *Stem Cells* 15 Suppl. 1:199-203; Mosierら, (1998) *Nature* 335 (6187):256-9)。最終的に選択されたアデノウイルスは、例えば、再狭窄動物モデルの疾患血管組織に局所的に適用することができる (Karasら, (1992) *J. Am. Coll. Cardiol.* 20(2):467-74)。

【0053】

さらに、実験室での生の測定法は、アデノウイルスライブラリーが構築されている配列デ 50

ータベースの電子版を使用することにより、補完することができる。これにより、例えば、タンパク質モチーフ検索、およびしたがって、ファミリーの新しい構成員を、同じファミリーの既知の機能を有する既知の構成員にリンクすることが可能になる。「隠蔽マルコウモデル (Hidden Markow Model)」 (HMM) (Eddy. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(4):1414-1419) を使用すると、ファミリーの重要な特徴を抽出し、またその構成員たちがどんな様子であるはずのものなのかについて1つのモデルを構築することにより、新規のファミリーを確立することができる。最終的には、これは、既知の構造をスレッドとして使用し、スレッディングアプローチを使用することにより新規なタンパク質の実際の構造を決定することをせずに推定構造を見出すことを試み、構造的なデータと組み合わせることができる (Rastanと Beeley (1997) Curr. Opin. Genet. Dev. 7(6):777-83)。

当然のことながら、本出願において開示されている諸方法により作成されるアデノウイルスライブラリーを使用して得られる機能的データは、予想されるあるいは所望される諸機能を備えた新規な遺伝子を発見する努力の基礎となり、また機能的ゲノム学の核となることであろう。最終的には、一度アデノウイルスベクターの数が、動物実験を実施することができるレベルになれば、その方法にもう1つ付け加えるのは、候補となる遺伝子を保持する候補となるアデノウイルスベクターの選別法を発展させることである。これは、例えば、線維のノブドメインのHiループで標識化されたアデノウイルスを使用することにより、そのクローンの精製によって得られるであろう。あるいは、大規模なHPLC分析が、さらに精製されたアデノウイルス調製が所望される動物実験あるいはin vitroスクリーニング用の部分的に精製されたアデノウイルスサンプルを得るために、半調製の形態で使用される。したがって、前記方法と試薬によれば、遺伝子のコレクションを、そうでなければ可能にならないであろう限られた数の動物のin vivoでの研究へ迅速に移行させることが可能となる。ロボットを使用した手順の各ステップを自動化すれば、さらに、機能させることができる遺伝子ならびにサンプル核酸の数を向上させることになる。

10

20

【0054】

1つの態様においては、本発明は組換え体アデノウイルスベクターライブラリーを產生する方法であって、アデノウイルスE1相補性配列を含む複数の細胞を、

i) 前記複数の細胞におけるE1領域配列、あるいは前記パッケージング細胞のなかに挿入される組換え核酸と重複するE1領域配列を有していないアデノウイルスをベースとするか、あるいはそのアデノウイルスに由来するアダプタープラスミドを含むアダプタープラスミドライブラリーであって、前記複数の細胞において複製応答能のあるアデノウイルスの生成につながり、本質的なE2B配列のほかにはE2B領域配列はなく、E2A領域配列がなく、E3領域配列がなく、E4領域配列がなく、操作可能な形態において、機能的逆方向末端反復配列 (ITR)、機能的インキャプシデーションシグナル、前記組換え核酸との相同組換えを許容するのに十分なアデノウイルス配列と、プロモーターに操作可能にリンクされる前記アダプタープラスミドのなかに挿入されるサンプル核酸インサートのライブラリーと、

30

ii) アデノウイルスをベースにし、あるいはアデノウイルスに由来する組換え核酸であって、前記組換え核酸は、操作可能な形態において、機能的な逆方向末端反復配列 (ITR) と複製用の十分なアデノウイルス配列を含み、前記組換え核酸は、複製欠損、組換えアデノウイルスに導くような相同組換えを許容する前記アダプタープラスミドライブラリーと部分的に重複する組換え核酸；

40

とを含む多数の細胞を含有する細胞培養を、組換え体アデノウイルスベクターライブラリーが產生される条件下で増殖させる工程を、備える方法を提供する。

【0055】

好ましくは、前記アダプタープラスミドライブラリーの少なくとも1つと前記組換え核酸は前記複数の細胞あるいは前記複数の細胞の子孫にトランスフェクションする前に熱により変性される。

好ましくは、前記アデノウイルスE1相補性配列と、前記アダプタープラスミドライブラ

50

リーと、前記組換え核酸が、それらが導入される細胞中での複製応答能のあるウイルスに導くような相同組換えを許容する重複配列を有しない。

【0056】

1つの態様においては、本発明は組換え体アデノウイルスベクターライブラリーを産生する方法であって、アデノウイルス E 1 相補性配列を含む複数の細胞を、

i) アデノウイルスをベースにするか、あるいはアデノウイルスに由来する第1の組換え核酸を有する組換え核酸ライブラリーであって、操作可能な形態において、2つの機能的逆方向末端反復配列 (ITR)、1つの機能的インキャプシデーションシグナルを有し、また機能的なアデノウイルス遺伝子がなく、プロモーターに操作可能にリンクされる前記第1の組換え核酸に挿入されるサンプル核酸のライブラリーを有する、ライブラリーと、

10

ii) アデノウイルスをベースとするか、あるいはそれに由来する第2の組換え核酸であって、操作可能な形態において、2つの機能的逆方向末端反復配列 (ITR) と、複製のための十分なアデノウイルス配列とを有し、前記第2の組換え核酸は、少なくとも E 1 領域の欠失と、前記アデノウイルスのインキャプシデーションシグナルとを有する、核酸、とを含むアデノウイルス E 1 相補性配列を含む複数の細胞を含む細胞培養を、組換えアデノウイルスベクターライブラリーが産生される条件下で、増殖させる工程を有する、方法を提供する。

好適には、前記細胞培養培地は、複数ウェルフォーマットのなかにある。

好適には、前記アデノウイルス E 1 相補性配列と、前記第1の組換え核酸と、前記第2の組換え核酸が、それらが導入される細胞中の複製応答能のあるウイルスに導くような相同組換えを許容する重複配列を有しない。

20

好ましくは、前記細胞培養は、前記細胞培養培地が PER. C 6 細胞培養培地である。

1つの実施例においては、前記細胞培養の増殖培地には、前記組換えアデノウイルスベクターライブラリーの産生を促進するのに十分な量で酪酸ナトリウムを含んでいる。

好適には、前記複数の細胞はさらに、アデノウイルス前期末端タンパク質と、ポリメラーゼ相補性配列の少なくとも1つを含む。

好適には、前記複数の細胞が、さらに、アデノウイルス E 2 相補性配列を含む。好適には、前記 E 2 相補性配列は E 2 A 相補性配列あるいは E 2 B 相補性配列である。

【0057】

1つの態様においては、前記複数の細胞はさらに、リコンビナーゼタンパク質から成り、それによって、複製欠損、組換えアデノウイルスにつながっていく前記相同性組換えが促進される。好適には、前記リコンビナーゼタンパク質は *Kluyveromyces waltii* リコンビナーゼである。

30

【0058】

もう1つの態様においては、前記複数の細胞はさらに、リコンビナーゼタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。好適には、前記組換えタンパク質が *Kluyveromyces waltii* リコンビナーゼである。

【0059】

1つの態様においては、前記組換えアデノウイルスベクターライブラリーの構成員が同一である。

40

1つの態様においては、前記プロモーターは誘導的プロモーターである。好適には、前記プロモーターは、アデノウイルス E 1 遺伝子産物により抑制されるかあるいはダウンレギュレーションされる。1つの態様においては、前記プロモーターは、A P 1 依存性プロモーターを有する。好適には、前記 A P 1 依存性プロモーターは、コラーゲナーゼ、c-myc、単核細胞化学誘因物質タンパク質あるいはストロメライン遺伝子に由来する。

【0060】

1つの態様においては、前記サンプル核酸は、機能未知の産物をコードする。もう1つの態様においては、前記サンプル核酸は合成オリゴヌクレオチド、DNA、cDNA、遺伝子、EST、アンチセンス核酸、あるいは遺伝子抑制構成要素からなる群から選択される構成されるグループから選択される。

50

【0061】

1つの態様においては、本発明はサンプル核酸によりコードされる産物に機能を対応させるための方法を提供し、

本発明の方法により産生される組換えアデノウイルスベクターライブラリーを含む宿主細胞を増殖させる工程であって、それによって、前記サンプル核酸によりコードされる産物が、前記宿主細胞のなかで少なくとも1つの改変された表現型を産生するように発現される工程と、

前記少なくとも1つの改変された表現型を同定する工程であって、それによって、1つの機能を前記サンプル核酸によりコードされる前記産物に対応させる工程と、

を備える方法を提供する。

10

好ましくは、前記宿主細胞は植物細胞あるいは動物細胞である。好ましくは、前記動物細胞はヒト細胞である。

【0062】

1つの態様においては、前記宿主細胞は細胞培養の構成員である。好適には、前記細胞培養は複数ウェルフォーマットのなかにある。

好適には、本発明の方法は自動化されたものである。

【0063】

本発明は、さらに、組換え複製欠損アデノウイルスベクターライブラリーを含む非ヒト宿主細胞を提供する。

本発明はさらに、組換え複製欠損アデノウイルスベクターライブラリーを提供し、前記複製欠損アデノウイルスベクターライブラリーは、本発明の方法による方法によって産生される。

20

【0064】

本発明はさらに、複製欠損アデノウイルスベクターライブラリーを含む分離された宿主細胞を提供する。

本発明はさらに、複製欠損アデノウイルスベクターライブラリーを含む分離された宿主細胞を提供し、前記複製欠損アデノウイルスベクターライブラリーは、本発明による方法によって産生される。好ましくは、前記宿主細胞はヒト細胞である。

【0065】

本発明はさらに、組換えアデノウイルスベクターライブラリーを産生する方法であって、アデノウイルス E1 領域配列を発現し、E2A 領域及び E4 領域から選択される少なくともひとつのアデノウイルス領域によってコードされた1またはそれ以上の機能的産物を発現する複数の細胞を含む細胞培養を増殖させる工程を有し、前記複数の細胞は、

30

i) 前記複数の細胞における E1 領域配列あるいは前記パッケージング細胞に挿入される組換え核酸と重複する E1 領域配列を有していないアデノウイルスをベースとして、あるいはそのアデノウイルスに由来するアダプタープラスミドを有するアダプタープラスミドライブラリーであって、アデノウイルスは本質的な E2B 配列のほかには E2B 領域配列を有せず、E2A 領域配列を有せず、E3 領域配列を有せず、E4 領域配列を有せず、アデノウイルスは、操作可能な形態で、機能的逆方向末端反復配列と、機能的インキャプションシグナルと、前記組換え核酸との相同組換えを許容する十分量のアデノウイルス配列と、プロモーターに操作可能にリンクされる前記アダプタープラスミドのなかに入入されるサンプル核酸のライブラリーを有する、ライブラリーと、

40

ii) 前記複数の細胞中の E1 配列と重複している E1 領域配列を有しておらず、また、複製応答能のあるアデノウイルスの生産につながる、前記複数の細胞において発現される E2A 領域配列あるいは E4 領域配列を有していない、アデノウイルスをベースにし、あるいは該アデノウイルスに由来する組換え核酸であって、操作可能な形態において、機能的アデノウイルス逆方向末端反復配列と、前記複数の細胞における複製のための十分なアデノウイルス配列を有し、前記組換え核酸は、前記パッケージング細胞における組換えアデノウイルスの産生につながる相同組換えを提供するために前記アダプタープラスミドと十分な十分を有している、組換え核酸、

50

とともに、

組換えアデノウイルスベクターライブラリーが前記複数の細胞中で産生される条件下で、前記細胞培養を増殖させる工程を有する、方法を提供する。

【0066】

好適には、前記複数の細胞は、少なくとも1つの機能的E2A遺伝子産物を発現させる。

好適には、前記少なくとも1つの機能的E2A遺伝子産物は変異遺伝子産物である。好適には、前記変異遺伝子産物は温度感受性である。

好適には、前記アダプタープラスミドライブラリーと前記組換え核酸の少なくとも1つが、前記複数の細胞あるいは前記複数の細胞の子孫をトランスフェクションする前に熱により変性される。

10

【0067】

好適には、前記複数の細胞は、E2B領域配列によりコードされる1つあるいはそれ以上の機能的遺伝子産物を発現させ、また、ウイルス生成に必要とされるそうしたものの以外に、前記機能的E2B領域遺伝子産物のためのE2B領域配列が、前記組換え核酸から削除され、また、任意にはすべてのE2B遺伝子領域配列にいたるまで前記アダプタープラスミドから削除される。

【0068】

好適には、前記複数の細胞は、E2B領域配列によりコードされるすべての遺伝子産物を発現させ、また、ウイルス生成に必要とされるそうしたものの以外には前記機能的E2B領域遺伝子産物のためのE2B領域配列が前記組換え核酸から削除され、また任意には、すべてのE2B遺伝子領域配列にいたるまで前記アダプタープラスミドから削除される。

20

【0069】

好適には、前記細胞培養培地はPERC6細胞培養培地である。

好適には、前記プロモーターは誘導可能なプロモーターである。

【0070】

1つの態様においては、本発明は、組換え複製欠損アデノウイルスベクターライブラリーを含む複数の細胞を提供し、前記組換え複製欠損アデノウイルスベクターライブラリーは、本発明の方法により産生される。好適には、前記複数の細胞はPERC6細胞である。

【0071】

本発明はさらに、組換え核酸を提供し、

前記組換え核酸は、

E1領域配列を有しないアデノウイルスをベースにする、あるいは該アデノウイルスに由来する核酸を有し、前記核酸は、それが導入されるパッケージ細胞で複製応答能を有するアデノウイルスの産生を導くE1領域配列を有さず、また、前記核酸は、操作可能な形態で、機能的アデノウイルス逆方向末端反復配列と、前記パッケージング細胞において組換えアデノウイルスの産生を導く相同組換えのために供給されるアダプタープラスミドと十分な重複を有する、核酸である。好適には、前記組換え核酸は、前記パッケージング細胞において発現するウイルス生成のために欠かせないE2B領域配列以外にE2B領域配列を有していない。好適には、前記組換え核酸はE3領域配列を有していない。好適には、前記十分な重複は約10bp～約5000bpである。好適には、前記十分な重複は、約2000bp～約3000bpである。好適には前記十分な重複は、ウイルス生成に欠かせないE2B領域配列から成る。

30

40

【0072】

本発明はさらに、アダプタープラスミドを提供し、前記アダプタープラスミドは、

アデノウイルスをベースにする、あるいは該アデノウイルスに由来する核酸を有し、それが導入されるパッケージング細胞におけるE1領域配列と重複し、複製応答能を有するアデノウイルスの産生に導く、E1領域配列を有さず、不可欠なE2B配列以外にE2B領域配列を有さず、E2A領域配列を有さず、E3領域配列を有さず、前記パッケージング細胞にインサートされる、あるいは前記パッケージング細胞に含まれる他の核酸と重複す

50

るE4領域配列を有さず、そして、操作可能な形態で、機能的逆方向末端反復配列と、機能的インキャプシデーションシグナルと、複製欠損組換えアデノウイルスにつながる前記他の核酸との相同組換えを許容する十分なアデノウイルスと、クローニングサイトあるいはマルチクローニングサイトを備えている。好適には、前記クローニングサイトあるいはマルチクローニングサイトはプロモーターに操作可能にリンクされる。好適には前記プロモーターは誘発性プロモーターである。好適には、前記プロモーターは、アデノウイルスE1遺伝子産物により抑制され、あるいはダウンモデュレーションされる。好適には、前記プロモーターはAP1依存性プロモーターである。好適には、前記AP1依存性プロモーターはコラーゲナーゼ遺伝子、c-myc遺伝子、単核細胞化学誘因物質タンパク質遺伝子あるいはストロメライン遺伝子に由来する。好適には、サンプル核酸のライブラリーは前記マルチクローニングサイトのなかに挿入される。

10

好適には、本発明の方法は自動化される。

【0073】

実施例

(実施例1)

E1欠損組換えアデノウイルス・ベクターをトランス相補にできるセルラインの作製

911セルライン

E1欠損組換えアデノウイルスをトランス相補にすることのできるアデノウイルス5型のE1配列を宿すセルラインが作製された(Fallauxら、Hum. Gene. Ther. 7巻: 215-222頁(1996年))。このセルラインを、Ad5の番号80-5788を含むpAd5XhoICを用いたヒト二倍体ヒト胚網膜芽細胞(HER)の形質移入によって得た。生じる形質転換体の内の1つは、911と称された。このセルラインは、E1欠損組換えアデノウイルスの増殖に有用であることが示された。それは、293細胞より優れていることが分かった。293細胞と異なり、911細胞は、アデノウイルス・パッケージングラインとしてより優れた作用をする原因で最もありそうな十分に形質転換した表現型を欠く:

20

プラークアッセイを、いっそう迅速に行う(293では8-14日の代わりに4-5日)ことができ、911細胞の単層は、プラークアッセイのために必要とされたとおり寒天上塗り下でよりよく生存し、E1欠損ベクターの増幅が多くなる。

さらに、共有したアデノウイルスDNAで形質移入された293細胞と異なり、規定された構築物を用いて911細胞を形質移入させた。911細胞の形質移入効率は、293のものに匹敵する。

30

【0074】

新たなパッケージング構築物

アデノウイルス配列の源

アデノウイルス配列は、ヒトアデノウイルス5型(Bernardsら、Virology 127巻: 45-53頁(1983年))の番号80~9460を含むpAd5.SalBから、または野生型Ad5のDNAから由来する。pAd5.SalBを、SalIおよびXhoIで消化させ、そして大型断片を、再連結し、そしてこの新規クローンを、pAd5.X/Sと名付けた。pTN構築物(オランダ国、イントロジェンのR. Vogeels博士によって構築された)を、ヒトPGKプロモーターおよびNEO遺伝子の源として使用した。

40

【0075】

ヒトPGKプロモーターおよびNEO遺伝子(NEO^R gene; 商標名)

新規パッケージング構築物中のE1A配列の転写は、骨格としてpUC119(Vieiraら、酵素学における方法、Acad. Press Inc.、3~11頁(1987年))を使用するプラスミドpTN(R. Vogeelsの贈与)から誘導されるヒトPGKプロモーター(Michelsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80巻: 472-476頁(1983年); Singer-Samら、Gene 32巻: 409-417頁(1984年))によって起動される。このプラスミドも、B型肝炎

50

炎ウイルス（HBV）ポリアデニル化シグナルに融合したNEO遺伝子の源として使用した。

【0076】

PGKプロモーターのE1遺伝子への融合（図1）

Ad5のE1遺伝子配列（ITR、複製の起点およびパッケージングシグナル）を、異質配列に交換するために、プライマーEa1（配列番号：27）およびEa2（配列番号：28）を用いて、PCRによってAd5のE1配列（番号459から番号960まで）を増幅した（表I参照）。生じたPCR産物を、ClaIで消化させ、そしてBluescript（ストラタジーン（Stratagene））に連結し、ClaIおよびEcoRVで予備消化させ、それにより構築物pBS.PCRIを得た。

10

【0077】

ベクターpTNを、制限酵素EcoRI（部分的に）およびScaIで消化し、そしてPGKプロモーター配列を含むDNA断片を、ScaIおよびEcoRIで消化したpBS.PCRIに連結させた。生じた構築物pBS.PGK.PCRIは、Ad5 E1配列の番号459から番号916までに操作的に連結されたヒトPGKプロモーターを含む。

【0078】

pIG.E1A.E1Bの構築（図2）

pIG.E1A.E1B.Xは、PGKプロモーターの指向性下でE1AおよびE1Bコーディング配列を含む。Ad5配列番号459から番号5788までが、この構築物中に存在する場合、アデノウイルスのpIXタンパク質も、このプラスミドによってコード化される。pIG.E1A.E1B.Xは、pAT-X/SのScaI-BspEI断片を、pBS.PGK.PCRIから得られる対応の断片（E1A配列に連結したPGKプロモーターを含む）に置換することによって作製した。

20

【0079】

pIG.E1A.NEOの構築（図3）

完全なE1Bプロモーターを誘導し、そしてE1B 21kDのAUGコドンが、NEO（NEO^R；商標名）のAUGコドンとして正確に機能するような手段でこのプロモーターを融合させるために、プライマーEa3（配列番号：29）およびEp2（配列番号30）を使用して、E1Bプロモーターを増幅させた。ここで、プライマーEp2は、PCR断片にNcoI部位を導入する。その結果生じる、PCR IIと称されるPCR断片を、HpaIおよびNcoIで消化させ、そしてpAT-X/Sに連結させ、そしてそれを、HpaIで、そしてNcoIで予備消化させた。生じるプラスミドを、pAT-X/S-PCR2と称した。NEO遺伝子と部分的なB型肝炎ウイルス（HBV）ポリアデニル化シグナルを含むpTNのNcoI-StuI断片を、NcoIおよびNruIで消化されているpAT-X/S-PCR2にクローニングした。生じる構築物は、pAT-PCR2-NEOであった。ポリアデニル化シグナルは、pAT-PCR2.NEOのSacI-SalI断片を、pTNの対応の断片に置換することによって完了され、それによりpAT.PCR2.NEO.p(A)を生じた。pAT.PCR2.NEO.p(A)のSacI-XbaIを、E1A遺伝子に連結したPGKプロモーターを含んだpIG.E1A.E1B-Xの対応の断片に置き換えた。生じる構築物を、pIG.E1A.NEOと名付け、そしてそれゆえヒトPGKプロモーターの制御下でAd5 E1配列（番号459から番号1713まで）を含む。

30

40

【0080】

pIG.E1A.E1Bの構築（図4）

pIG.E1A.E1Bは、E1AおよびE1Bタンパク質をコード化するAd5の番号459から番号3510までを含む。E1B配列が、番号3511にあるスプライシングアクセプターで終止される。pIX配列で、この構築物に存在するものはない。

pIG.E1A.E1Bを、以下のとおり作製した。E1B 55kdのN末端アミノ酸をコードする配列を、プライマーEb1（配列番号：31）、およびXhoI部位を導入するEb2（配列番号：32）を用いて増幅させた。生じるPCR断片を、BglIIで

50

消化させ、そして p A T - X / S の B l I I / N r u I にクローニングさせ、それにより p A T - P C R 3 を得た。p I G . E 1 A . N E O の X b a - S a l I 断片、および p A T . P C R 3 の X b a I X h o I 断片の交換によって、p I G . E 1 A . N E O の H B V ポリ (A) 配列を、p A T - P C R 3 の E 1 B 配列の下流に導入した。

【0081】

p I G . N E O の構築 (図 5)

この構築物は、樹立細胞を、E 1 A . E 1 B 構築物に形質移入させ、そして N E O 選択を要求する場合の用途のものである。N E O 発現が、E 1 B プロモーターによって指示されるので、N E O 耐性細胞が、同時発現することが予想される。E 1 A、それは細胞の長期培養期間じゅうの E 1 A の発現を高いレベルに維持することに有益でもある。A d 5 E 1 B プロモーターの制御下で N E O 遺伝子を含む p I G . E 1 A . N E O の H p a I - S c a I 断片を、E c o R V および S c a I で消化させた p B S にクローニングすることによって、p I G . N E O を作製した。

【0082】

構築物の試験

構築物 p I G . E 1 A . N E O、p I G . E 1 A . E 1 B . X および p I G . E 1 A . E 1 B の組み込みを、制限酵素マッピングによって評価した。さらに、P C R 分析によって得られた構築物の一部を、配列分析によって確認した。ヌクレオチド配列における変化は、見られなかった。

構築物を、一次 B R K (仔ラット腎臓) 細胞に形質移入し、そしてこれらの細胞を不死化する (p I G . E 1 A . N E O)、または十分に形質転換する (p A d 5 . X h o I C、p I G . E 1 A . E 1 B . X および p I G . E 1 A . E 1 B) それらの能力について試験した。6 日齢の W A G - R i j ラットの腎臓を単離し、均質化し、そしてトリプシン消化した。B R K 細胞培養のサブコンフルエント皿 (直径 5 c m) を、1 または 5 μ g の p I G . N E O、p I G . E 1 A . N E O、p I G . E 1 A . E 1 B、p I G / E 1 A . E 1 B . X、p A d 5 X h i I C で、または S V 4 0 初期プロモーターの制御下で A d 5 . E 1 B 遺伝子を担持する P D C 2 6 (E l s e n ら、V i r o l o g y 1 2 8 巻: 3 7 7 - 3 9 0 頁 (1 9 8 3 年)) と一緒に p I G . E 1 A . N E O で形質移入させた。発生点が見える形質移入の 3 週後、皿を固定し、ギムサ染色し、そして発生点を計数した。

【0083】

作製アデノウイルスパッケージング構築物の概観、および B R K を形質転換するそれらの能力が、図 6 に表される。結果では、構築物 p I G . E 1 A . E 1 B および p I G . E 1 A . E 1 B . X が、用量依存手法で、B R K 細胞を形質転換することができることが示される。形質転換の効率は、両方の構築物に類似し、そして 9 1 1 細胞、特に p A d 5 . X h o I C を作製するのに使用された構築物で見られるものに匹敵する。

予想されるとおり、p I G . E 1 A . N E O は、ほとんど B R K を不死化することはできなかった。しかし、E 1 B 発現構築物 (P D C 2 6) の同時形質移入は、形質転換体の数の明らかな増加を起し (1 8 対 1)、それにより、p I G . E 1 A . N E O によってコードされた E 1 A が機能性があることが示された。したがって、我々は、新たに作製されたパッケージング構築物が、新規アデノウイルスパッケージングラインの作成に適していると結論づけた。

【0084】

新規パッケージング構築物セルラインを用いたセルラインの作製および細胞培養

ヒト A 5 4 9 気管支癌腫細胞 (S h a p i r o ら、B i o c h e m . B i o p h y s . A c t a 5 3 0 巻: 1 9 7 ~ 2 0 7 頁 (1 9 7 8 年)、ヒト胎児網膜芽細胞 (H E R)、A d 5 - E 1 - 形質転換ヒト胎児腎臓 (H E K) 細胞 (2 9 3 ; G r a h a m ら、J . G e n . V i r o l . 3 6 巻: 5 9 ~ 7 2 頁 (1 9 7 7 年) および A d 5 - 形質転換 H E R 細胞 (9 1 1 ; F a l l a u x ら、H u m . G e n e T h e r . 7 巻: 2 1 5 - 2 2 2 頁 (1 9 9 6 年)) および P E R 細胞を、3 7 ° C で、5 % の C O ₂ 雰囲気下で 1 0 % 胎仔ウシ血清 (F C S) および抗生物質で補足したダルベッコの修正イーグル培地 (D M E M

10

20

30

40

50

）中で育成した。細胞培養培地、試薬および血清は、ジブコ・ラボラトリーズ（ニューヨーク州、グランド・アイランド）から購入した。培養用可塑物は、グレニエール（Greiner）（ドイツ国ノッティンゲン（N, r t i n g e n、Germany））およびコーニング（ニューヨーク州コーニング）から購入した。

【0085】

ウイルスおよびウイルス技術

組換えアデノウイルスベクター I G. A d. M L P. n l s. l a c Z、I G. A d. M L P. l u c、I G. A d. M L P. T K および I G. A d. C M V. T K の構築は、欧州特許出願第 9 5 2 0 2 2 1 3 号に詳細に記述されている。組換えアデノウイルスベクター I G. A d. M L P. n l s. l a c Z は、A d 2 主要後期プロモーター（M L P）の存在下で、β-ガラクトシダーゼをコードするイー・コリ l a z Z 遺伝子を含み、I G. A d. M L P. l u c は、A d 2 M L P によって起動されるホタルのルシフェラーゼ遺伝子を含み、そしてアデノウイルスベクター I G. A d. M L P. T K および I G. A d. C M V. T K は、それぞれ、A d 2 M L P およびサイトメガロウイルス（C M V）エンハンサー／プロモーターの制御下で単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ（T K）遺伝子を含む。

10

【0086】

形質移入

製造業者のプロトコルにしたがって、ジブコ・カルシウム・リン酸形質移入システム（ジブコ・ビーアールエル・ライフ・テクノロジーズ・インク.、米国カイザーズバーグ）を用いて、カルシウム-リン酸沈殿 DNA（Graham ら、V i r o l o g y 5 2 巻：4 5 6-4 6 7 頁（1 9 7 3 年））によって全ての形質移入を行った。

20

【0087】

ウエスタン・ブロッティング

急激に成長する 2 9 3、9 1 1 および A d 5-E 1-形質転換 A 5 4 9 および P E R 細胞のサブコンフルエント培養物を、P B S で洗浄し、そして F o s-R I P A 緩衝液（1 0 m M トリス（p H 7. 5）、1 5 0 m M の N a C l、1 % N P 4 0、0. 1 % ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）、1 % N A-D O C、0、5 m M フェニルメチルスルホニルフルオリド（P M S F）、0、5 m M トリプシン阻害剤、5 0 m M N a F および 1 m M ナトリウムバナデート）に掻き寄せた。室温で 1 0 分後、溶解液を、遠心分離によって透明にした。バイオラッド・タンパク質アッセイキットを用いてタンパク濃度を測定し、そして 2 5 μ g の総細胞タンパク質を、1 2. 5 % S D S-P A A ゲルに掛けた。電気泳動後、タンパク質を、ニトロセルロース上に移した（3 0 0 m A で 1 時間）。予め染色した標準（シグマ、米国）を、平行に起動させた。フィルターを、1 時間、T B S T（1 0 m M トリス（p H 8）、1 5 m M N a C l および 0. 0 5 % ツイーン-2 0）中の 1 % ウシ血清アルブミン（B S A）で遮断した。一次抗体は、マウスのモノクローナル抗 A d 5-E 1 B-5 5-k D A 抗体 A 1 C 6（Z a n t e m a ら、未出版）、ラットのモノクローナル抗 A d 5-E 1 B-2 2 1-k D a 抗体 C 1 G 1 1（Z a n t e m a ら、V i r o l o g y 1 4 2 巻：4 4-5 8 頁（1 9 8 5 年））であった。二次抗体は、西洋ワザビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス抗体（プロメガ）であった。シグナルは、増強ケモルミネッセンス（アマシャム・コープ.（A m e r s h a m C o r p.）、英国）によって可視化された。

30

40

【0088】

サザン・ブロット分析

高分子量 DNA を単離し、そして 1 0 μ g を、完全に消化させ、そして 0. 7 % アガロースゲルで分画した。0. 4 M の N a O H、0. 6 M の N a C l 転移溶液（C h u r c h および G i l b e r t、1 9 8 4 年）を用いて、ハイボンド N⁺（アマシャム、英国）へのサザン・ブロットの転移を行った。p A d 5. S a l B から得られる 2 4 6 3-nt S s p I-H i n d I I I 断片（B e r n a r d s ら、V i r o l o g y 1 2 7 巻：4 5-5 3 頁（1 9 8 3 年））を用いてハイブリダイゼーションを行った。この断片は、A d

50

5 b p. 342～2805から構成される。ランダム・ヘキサヌクレオチド・プライマーおよびクレノーDNAポリメラーゼを使用して、 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTPで断片を、放射性標識した。サザン・ブロットを、 -80°C で、コダックXAR-5フィルムに、そしてビー・アンド・エル・システムズ・モレキュラー・ダイナミックス・ソフトウェアによって分析されるホスホイメージャー・スクリーンにさらした。

【0089】

A549

Ad5-E1-形質転換A549ヒト気管支癌腫セルラインを、pIG. E1A. NEOで形質移入させ、そしてG418耐性について選択することによって、作製した。31個のG418耐性クローンを樹立した。pIG. E1A. E1Bと、pIG. NEOとの同時形質移入は、7個のG418耐性セルラインを生じた。

10

【0090】

PER

Ad5-E1-形質転換ヒト胎児網膜(HER)細胞を、プラスミドpIG. E1A. E1Bを用いた一次HER細胞の形質移入によって作製した。形質転換セルラインは、十分に分離した発生点から樹立された。我々は、PER. C1、PER. C3、PER. C4、PER. C5、PER. C6、PER. C8およびPER. C9と称する7つのクローナルセルラインを樹立できた。PERクローンの内の1つ、特にPER. C6は、番号96022940号の下にECCCに寄託された。

20

【0091】

形質転換A549およびPER細胞でのAd5 E1AおよびE1B遺伝子の発現

樹立したA549およびPER細胞におけるAd5 E1Aおよび55-kDaおよび21-kDaのE1Bタンパク質の発現は、モノクローナル抗体(mAb)の使用によるウェスタン・ブロッティングの手段によって調査された。mAb M73は、E1A産生物を認識する一方で、mAbのAIC6およびC1G11は、それぞれ55-kDaおよび21-kDaのE1Bタンパク質に向けられる。抗体は、親株のA549または一次HER細胞からの抽出物中のタンパク質を認識しなかった(データは示されず)。pIG. NEOおよびpIG. E1A. E1Bの同時形質移入によって作製されたA549クローンで、検出可能なレベルのE1AまたはE1Bタンパク質を発現したものはなかった(図示せず)。pIG. E1A. NEOで形質移入されて作製されたA549クローンの内のいくつかは、Ad5 E1Aタンパク質を発現した(図7)が、そのレベルは、293細胞から得られるタンパク質溶解液で検出されるものよりかなり低かった。PER細胞から得られるタンパク質抽出物で検出される安定な状態のE1Aレベルは、A549由来の細胞から得られる抽出物で検出されるものよりかなり高かった。全てのPERセルラインは、同様のレベルのE1Aタンパク質を発現した(図7)。E1Bタンパク質の発現、特にE1B 55-kDaの場合には、いっそう変動する。911および293に比較すると、PERクローン態の大半は、高いレベルのE1B 55-kDaおよび21-kDaを発現する。安定な状態のE1B 21-kDaのレベルは、PER. C3で最高であった。PERクローンで、細胞の一連の継代でAd5 E1遺伝子の発現を失ったものはなかった(図示せず)。PER細胞中でのE1発現のレベルは、少なくとも100の集団倍加について安定性を維持することが分かった。我々は、いっそう詳細にPERクローンを特徴づけることを決断した。

30

40

【0092】

PERクローンのサザン分析

PERクローンでのAd5-E1コード化配列の配置を調べるために、サザン分析を行った。細胞性DNAを、全PERクローンから、そして293および911細胞から抽出させた。そのDNAを、Ad5 E1領域で一度切るHindIIIで消化させた。放射性標識Ad5-E1-特異的プローブを用いた、HindIII消化したDNAにおけるサザンハイブリダイゼーションでは、PERクローンのゲノム中にpIG. E1A. E1Bのいくつかの組込みコピーの存在が示された。図8は、異なるPERセルラインの高い分

50

子量のDNAでのE1配列の分布パターンを示す。コピーを、単独バンドで濃縮し、そしてそれは、タンデム反復しとして組込まれることを示唆する。PER. C3、C5、C6およびC9の場合に、pIG. E1A. E1Bの切断したコピーの存在を示す低分子量の別のハイブリダイゼーションバンドを知見した。コピーの数を、ホスホイメジャーを使用して測定した。我々は、PER. C1、C3、C4、C5、C6、C8およびC9が、それぞれ、Ad5 E1コーディング領域の2、88、5、4、5、5および3コピーを含むこと、および911および293細胞が、それぞれ、Ad5 E1配列の1および4コピーを含むと概算した。

【0093】

形質移入効率

組換えアデノベクターを、293細胞へのアダプター・プラスミドおよびAd5の大型C1aI断片の同時形質移入によって作製する（欧州出願第95202213号）。組換えウイルスDNAは、プラスミドおよびアデノウイルスDNAに存在する相同ウイルスの配列の間で相同組換えによって形成される。選択的攻略法のものと同様に、この方法の効力は、ヘルパー細胞の形質移入性におおいに依存する。したがって、我々は、レセプターとしてイー・コリβ-ガラクトシダーゼ・コード化lacZ遺伝子を用いて、PERクロンの内のいくつかの形質移入効率を、911細胞と比較した（図9）。

【0094】

組換えアデノウイルスの産生

293、911、PER. C3、PER. C5およびPER. C6に様々なアデノウイルス・ベクターを接種した後に得られる組換えアデノウイルスの収量は、表IIに表される。

結果は、PER細胞で得られた組換えアデノウイルス・ベクターの収量が、少なくとも、現存のセルラインで得られるものと同じくらい高いことを示す。さらに、新規アデノウイルス・ベクターIG. Ad. MLP. TKの収量が、試験された全てのセルラインにおける他のウイルスベクターについて得られた収量に類似であるか、またはそれより高い。

【0095】

新規アデノウイルス・ベクターの作製（図10）

使用される組換えアデノウイルス・ベクター（欧州特許出願第95202213号参照）を、E1配列459からnt. 3328までについて欠失させる。構築物pE1A. E1Bが、Ad5配列459からnt. 3510までを含むとき、パッケージング構築物pIG. E1A. E1Bと、例えばIG. Ad. MLP. TKのような組換えアデノウイルスにあるE1B配列の間に183nt. の配列重複がある。重複配列が、新たなアデノウイルス・ベクターから欠失された。さらに、元の構築物に存在するlacZから誘導される非コーディング配列も、同様に欠失された。これは、プライマーSV40-1（配列番号：33）（BamHI部位を導入する）およびSV40-2（配列番号：34）（BglII部位を導入する）を用いて、pMLP. TKから得られるSV40ポリ（A）配列のPCR増幅によって達成された（図10）。さらに、この構築物に存在するAd5配列を、nt. 2496（Ad5、BglII部位を導入する）からnt. 2779（Ad5-2）までを増幅させた。両方のPCR断片を、BglIIで消化させ、そして連結させた。連結産物を、プライマーSV40-1およびAd5-2（配列番号：36）を用いてPCR増幅させた。得られたPCR産物を、BamHIおよびAflIIで切断し、そして同じ酵素で予め消化させたpMLP. TKに連結した。pMLPI. TKと称される生じた構築物は、nt. 459からnt. 3510までのアデノウイルスE1配列での欠失を含む。

【0096】

パッケージング・システム

なんら配列重複を有しない、新規パッケージング構築物pIG. E1A. E1Bと、組換えアデノウイルスpMLPI. TKとの組合せは、図11に表される。この図で、配列重複が示される元の状態も、表される。pIG. E1A. E1BおよびpMLPI. TKの

10

20

30

40

50

間の重複配列の不在（図11a）は、パッケージング構築物と組換えウイルスとの間の相同組換えの可能性を排除し、したがって、元の状況と比較すると組換えアデノウイルスの産生についての明らかな改善である。

図11bでは、その状況は、pIG. E1A. NEOおよびIG. Ad. MLP I. TKについて描写される。樹立細胞への形質移入された場合、pIG. E1A. NEOは、E1欠失組換えアデノウイルスの増殖を支持するのに十分であることが予想される。この組合せは、なんら配列重複を有せず、それにより、相同組換えによるRCAの産生を予防する。さらに、この従来のパッケージング・システムは、E1A配列のみについて欠失させて、そしてE1B配列については欠失されていない組換えアデノウイルスの増殖を可能にする。

10

E1Aの不在下でE1Bを発現する組換えアデノウイルスは、E1Bタンパク質と同様に活発であり、特に、E1B19kDは、感染ヒト細胞を、腫瘍壊死因子（TNF）による溶解から守ることができる（Goodingら、J. Virol. 65巻：3083-3094頁（1991年））。

【0097】

pMLP I. TKから誘導される組換えアデノウイルスの作製

組換えアデノウイルスを、Sal I線状化pMLP I. TK DNAおよびCla I線状化Ad5 wt DNAを用いた293細胞の同時形質移入によって作製した。その手段は、図12に図式で表される。

【0098】

（実施例2）

組換えアデノウイルス・ベクターの高速RCA不含生成についてのプラスミド基本システム

アデノウイルス・クローンpBr/Ad. Bam-r ITR（ECACC寄託P97082122）の構築

ITR配列の平滑末端クローニングを促進するために、野生型ヒトアデノウイルス5型（Ad5）DNAを、過剰のdNTPの存在下でクレノー酵素で処理した。クレノー酵素の不活性化およびフェノール/クロロホルム抽出、続いてエタノール沈降させることによる精製の後、DNAを、BamH Iで消化した。このDNA製品を、以下のとおり製造されたpBr322由来ベクターDNAとの連結反応でさらに精製することなしに使用した。

30

pBr322 DNAを、EcoR VおよびBamH Iで消化し、TSA P酵素（ライフ・テクノロジーズ）で処理することによって脱リン酸化し、そしてLMPアガロースゲル（シーブラーク・ジーティージー（SeaPlaque GTG））上で精製した。コンピテント・イー・コリDH5a（ライフ・テクノ）への形質転換およびアンピシリン耐性コロニーの分析の後、Ad5にあるBamH I部位から、右側ITRまで伸長する挿入物について予想されるとおりの消化パターンを示す1つのクローンを選択した。右側ITRにあるクローニング境界の配列分析では、ITRの最も3'のG残渣が失われたことが示され、そのITRの残りは、正しいことが分かった。上記の失われたG残渣は、複製の間、他のITRによって相補される。

pBr/Ad. Sal-r ITR（ECACC受託番号P97082119号）

40

pBr/Ad. Bam-r ITRを、BamH IおよびSal I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（シーブラーク・ジーティージー）で単離し、そしてwt Ad5 DNAから得られた4.8 kbのSal I-BamH I断片に連結し、そしてジーンクリーンIIキット（バイオ101, インク.）で精製した。1つのクローンを選択し、そしてAd5配列の組込みを、制限酵素分析によって決定した。クローンpBr/Ad. Sal-r ITRは、16746 bpにあるSal I部位から、r ITR（最も3'のG残渣を欠く）まで、そしてそれを含むアデノ5型配列を含む。

【0099】

pBr/Ad. Cla-Bam（ECACC受託番号P97082117号）

50

wt アデノ 5 型 DNA を、C l a I および B a m H I で消化し、そして 2 0 . 6 k b 断片を、電気溶離によってゲルから単離した。p B r 3 2 2 を、同じ酵素で消化し、そして、ジーンクリーンによってアガロースゲルから精製した。両方の断片を連結し、そしてコンピテント D H 5 α に形質転換させた。生じたクローン p B r / A d . C l a - B a m を、制限酵素消化によって分析し、そして b p 9 1 9 から 2 1 5 6 6 までのアデノウイルス配列を有する挿入物を含むことが示された。

p B r / A d . A f l I I - B a m (E C A C C 受託番号 P 9 7 0 8 2 1 1 4 号)

クローン p B r / A d . C l a - B a m を、E c o R I (p B r 3 2 2 中) で線状にし、そして A f l I I で部分的に消化した。6 5 ° C で、2 0 分間、A f l I I の加熱不活性化の後、断片末端を、クレノー酵素で満たした。その後、DNA を、P a c I 部位 (5 ' - A A T T G T C T T A A T T A A C C G C T T A A - 3 ') (配列番号 : 1) を含む平滑二本鎖オリゴリンカーに連結した。このリンカーを、以下の 2 つのオリゴヌクレオチド : 5 ' - A A T T G T C T T A A T T A A C C G C - 3 ' (配列番号 : 2) および 5 ' - A A T T G C G G T T A A T T A A G A C - 3 ' (配列番号 : 3) をアニーリングすることによって作製し、続いて、クレノー酵素で平滑にした。連結 DNA を沈殿させて、緩衝液を交換した後、連結物を、過剰の P a c I 酵素で消化して、オリゴのコンカテマーを除去した。3 5 3 4 b p から 2 1 5 6 6 までの A d 5 配列およびベクター配列を含む 2 2 0 1 6 b p 部分断片を、L M P アガロース (シープラーク・ジーティージー) 中で単離させ、再連結し、そしてコンピテント D H 5 α に形質転換させた。P a c I 部位を含むことが分かり、そして大型アデノ断片を保持した 1 つのクローンを選択し、そして (失われた) A f l I I 部位にある P a c I リンカーの順行挿入を確認する 5 ' 末端で配列決定した。

【 0 1 0 0 】

p B r / A d . B a m - r I T R p a c 番号 2 (E C A C C 受託番号 P 9 7 0 8 2 1 2 0 号) および p B r / A d . B a m - r I T R 番号 8 (E C A C C 受託番号 P 9 7 0 8 2 1 2 1 号)

クローン p B r / A d . B a m - r I T R にある A d 5 の I T R のそばに P a c I 部位を挿入させるために、約 1 9 0 ヌクレオチドを、p B r 3 2 2 骨格中の C l a I 部位と、I T R 配列の出発点の間から除去した。これは、以下のとおり行われた。p B r / A d . B a m - r I T R を、C l a I で消化し、そして可変の時間の長さ (2 分、5 分、1 0 分および 1 5 分) 、ヌクレオチド B a l 3 1 で処理した。ヌクレオチド除去の程度は、同一の緩衝液および条件を用いて、p B r 3 2 2 DNA (C l a I 部位でも消化された) 上で分離反応を続けた。B a l 3 1 酵素を、1 0 分間、7 5 ° C でインキュベーションにより不活性化させ、DNA を沈殿させ、そして少量の T E 緩衝液に再懸濁させた。平滑末端を確保するために、DNA を、さらに過剰の d N T P の存在下で、T 4 DNA ポリメラーゼで処理した。S a l I を用いた (対照) p B r 3 2 2 DNA の消化後、1 0 分または 1 5 分間、処理されたサンプル中に満足な分解 (~ 1 5 0 b p) が観察された。1 0 分または 1 5 分処理された p B r / A d . B a m - r I T R サンプルを、その後、上述の平滑 P a c I リンカー (p B r / A d . A f l I I - B a m 参照) に連結した。沈殿によって連結物を精製し、過剰の P a c I で消化し、そして L M P アガロースゲル上でリンカーから分離した。再連結後、DNA を、コンピテント D H 5 α に形質転換させ、そしてコロニーを分析した。およそ所望の長さの欠失を示す 1 0 個のコロニーを、選択し、そしてさらにこれらを、T トラック配列決定 (T 7 配列決定キット、ファルマシア・バイオテック (P h a r m a c i a B i o t e c h)) によって分析した。2 つのコロニーが、r I T R のちょうど下流に挿入された P a c I リンカーを有することが分かった。P a c I での消化の後、クローン番号 2 は、2 8 b p を有し、そしてクローン番号 8 は、I T R に粘着した 2 7 b p を有する。

【 0 1 0 1 】

p W E / A d . A f l I I - r I T R (E C A C C 受託番号 P 9 7 0 8 2 1 1 6 号)

コスミドベクター p W E 1 5 (クローンテック (C l o n t e c h)) を使用して、大型 A d 5 挿入物をクローン化した。第一に、特徴的な P a c I 部位を含むリンカーを、p W

10

20

30

40

50

E15のEcoRI部位に挿入し、それによりpWE. pacが作製された。このために、pBr/Ad. AflII-BamHIについて記述されるとおり二本鎖PacIオリゴを使用した。ここで、そのEcoRI突出末端を有する。その後、以下の断片：PacIで消化されたpWE. pac、PacIおよびBamHIで消化されたpBr/AflII-Bam、およびBamHIおよびPacIで消化されたpBr/Ad. Bam-rITR番号2を、アガロースゲルから電気溶離によって単離した。これらの断片を、一緒に連結させ、そして製造業者のプロトコルによって、λファージパッケージング抽出物（ストラタジーン）を使用して封入した。宿主細菌への感染の後、コロニーを、平板上に載せ、そして完全挿入物の存在について分析した。pWE/Ad. AflII-rITRは、3534bp（AflII部位）から右側ITR（最も3' G残渣を欠く）まで、そしてそれを含む全てのアデノウイルス5型配列を含む。

10

アデノ5wtDNAを、過剰のdNTPの存在下でクレノー酵素で処理し、そして続いてSalIで消化した。それぞれ、左側ITR-Sal（9.4）およびSal（16.7）-右側ITRと称される、生じた断片の内の2つを、LMPアガロース（シープラーク・ジーティージー）で単離した。pBr322DNAを、EcoRVおよびSalIで消化し、そしてホスファターゼ（ライフ・テクノロジーズ）で処理した。ベクター断片を、ジーンクリーン法（バイオ101, インク.）を使用して単離し、そしてAd5 SalI断片に連結した。9.4kb断片との連結のみが、挿入物を有するコロニーを供した。コロニー境界の分析および配列決定の後、全長ITR配列を含み、そして9462bpでSalI部位まで伸長するクローンを選択した。

20

【0102】

pBr/Ad. lITR-Sal（16.7）（ECACC受託番号P97082118号）

pBr/Ad. lITR-Sal（9.4）を、SalIで消化し、そして脱リン酸化（TSA-P、ライフ・テクノロジーズ）した。このクローンを、Ad5にある第三のSalI部位まで伸長するために、pBr/Ad. Cla-Bamを、BamHIで線状にし、そしてSalIで部分的に消化した。9462-16746までのアデノウイルス配列を含む7.3kb SalI断片を、LMPアガロースゲルで単離し、そしてSalI消化したpBr/Ad. lITR-Sal（9.4）ベクター断片に連結させた。

【0103】

30

pWE/Ad. AflII-EcoRI

pWE. pacを、ClaIで消化し、そして5'突出末端を、クレノー酵素を用いて充填した。その後、DNAを、PacIで消化し、そしてアガロースゲルから単離した。pWE/AflII-rITRを、EcoRIで消化し、そしてクレノー酵素で処理した後、PacIで消化した。アデノウイルス配列を含む大型24kb断片を、アガロースゲルから単離し、そしてクローンテックから得たライゲーション・エクスプレス（商標名）キットを用いて、ClaI消化および平滑pWE. pacベクターに連結した。ストラタジーンから得たウルトラコンピテントXL10-金細胞の形質転換の後、予想される挿入物を含むクローンを、同定した。pWE/AflII-EcoRIは、3534-27336bpから得られるAd5配列を含む。

40

【0104】

新規アダプタープラスミドの構築

パッケージングセルライン中の組換えアデノウイルスとE1配列との間の配列重複の不在は、新規組換えウイルスの安全なRCA不含生成、および増殖に必須である。アダプタープラスミドpMLPI.TK（図10）は、本発明の改善されたパッケージング・セルラインとの組合せで、本発明による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。このプラスミドは、出発材料として使用されて、特異的プロモーターおよび遺伝子配列を含む核酸分子が、容易に交換されうる新たなベクターを作製した。

第一に、PCR断片を、以下のプライマー：LTR-1：5'-CTG TAC GTA
CCA GTG CAC TGG CCT AGG CAT GGA AAA ATA

50

CAT AAC TG-3' (配列番号: 4) およびLTR-2: 5'-GCG GAT CCT TCG AAC CAT GGT AAG CTT GGT ACC GC T AGC GTT AAC CGG GCG ACT CAG TCA ATC G-3' (配列番号: 5) を用いて pZipΔMo+PyF101 (N⁻) テンプレート DNA (PCT/NL96/00195 で記述される) から作製した。Pwo DNA ポリメラーゼ (Boehringer Mannheim) を、以下の温度サイクルで、製造業者のプロトコルに従って使用した。すなわち、1 回、5 分間 95℃ で; 3 分間 55℃ で; そして 1 分間 72℃ で、そして 1 分間 95℃ で、1 分間 60℃ で、1 分間 72℃ での 30 サイクル、続いて、1 回、10 分間 72℃ で使用した。その後、PCR 産物を、BamHI で消化し、そして PvuII および BamHI で消化した pMLP10 (Levrer 10
 ら、Gene101 巻: 195-202 頁 (1991 年)) ベクターに連結し、それによりベクター pLTR10 を生成した。このベクターは、1 bp から 454 bp までのアデノウイルス配列、続いて野生型エンハンサー配列が、突然変異ポリオーマウイルス (PyF101) から得たエンハンサーに交換されている Mo-MuLV LTR の一部を包含するプロモーターを含む。プロモーター断片は、L420 と称された。

次に、ネズミ HSA 遺伝子のコーディング領域を挿入した。pLTR10 を、BstBI で消化し、続いてクレノー処理し、そして NcoI で消化した。HSA 遺伝子を、以下のプライマー: HSA1、5'-GCG CCA CCA TGG GCA GAG CGA TGG TGG C-3' (配列番号: 6) および HSA2、5'-GTT AGA TCT AAG CTT GTC GAC ATC GAT CTA CTA ACA 20
 GTA GAG ATG TAG AA-3' (配列番号: 7) を使用して、pUC18-HSA (Kay ら、J. Immunol. 145 巻: 1952-1959 頁 (1990 年)) 上での PCR 増幅によって得た。269 bp 増幅断片を、NcoI および BglII 部位を用いて、シャトルベクターにサブクローニングした。配列決定は、HSA 遺伝子の順行コーディング配列の組込みを確認したが、TAG 終止コドンに直接続く余剰 TAG 挿入物を有した。その後、TAG 複写を含む HSA 遺伝子のコーディング領域を、NcoI (粘着)-SalI (平滑) 断片として削除し、そして pLTR10 から得た 3.5 kb NcoI (粘着)/BstBI (平滑) 断片にクローニングし、それにより pLTR-HSA10 を生じた。

最後に、左側 ITR、パッケージング・シグナル、L420 プロモーターおよび HSA 遺 30
 伝子を含む断片が、同じ酵素で消化されたベクター pMLP1.TK に挿入され、それによりプロモーターおよび遺伝子配列を置換した後、pLTR-HSA10 を、EcoRI および BamHI で消化した。これは、プロモーターおよび遺伝子配列の周囲に種々の制限酵素についての都合のよい認識部位を含む新たなアダプター・プラスミド pAd/L420-HSA (図 19) を生じた。SnaBI および AvrII は、HpaI、NheI、KpnI、HindIII と組合せて、プロモーター配列を交換することができる一方で、後者の部位は、HSA コーディング領域かれ得られる ClaI または BamHI 3' 部位と組合せて、この構築物中の遺伝子を置換することができる。

pAd/L420-HSA 中のプロモーター、遺伝子およびポリ A 配列を、CMV プロモーター、多クローニング部位、イントロンおよびポリ A シグナルに置換することによ 40
 って、核酸分子の交換を容易にさせるように設計された別のアダプター・プラスミドを、作製した。この目的のために、pAd/L420-HSA を、AvrII および BglII で消化し、続いてクレノーで処理して、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る 5.1 kb 断片を単離し、そして HhaI および AvrII で消化し、続いて T4 DNA ポリメラーゼで処理することによって得られる pcDNA1/amp (インビトロゲン) から得られる平滑 1570 bp 断片に連結した。このアダプター・プラスミドは、pCLIP と名付けられた (図 20)。

【0105】

組換えアデノウイルスの作製

w t E3 配列を有する E1-欠失組換えアデノウイルス

10

20

30

40

50

新たなプラスミド基本システムでE1-欠失組換えアデノウイルスを作製するために、以下の構築物を、作成した。重複アデノウイルスゲノム断片の3'部位で切断する制限酵素で線状にした目的の遺伝子を有する発現カセットを含み、好ましくはなんらpBr322ベクター配列を含まないアダプター構築物；PacIで消化した相補的アデノウイルスゲノム構築物pWE/Ad. AflIII-rITR。

さらに、これらの2つのDNA分子を、フェノール/クロロホルム抽出およびEtOH沈殿によって精製する。アデノウイルス・パッケージング・セルライン、好ましくは本発明によるセルラインにこれらのプラスミドを形質移入させて、アダプターと、相補的構築物（図21）との間の1段階の相同組換えによって、組換え体複製欠失アデノウイルスを作製した。選択股として、pWE/Ad. AflIII-rITRの代わりに、他の断片、例えばEcoRIおよびBamHIで消化したpBr/Ad. Cla-Bamを使用できるか、またはPacIおよびBamHIで消化したpBr/Ad. AflIII-BamHIを、SalIで消化したpBr/Ad. Sal-rITRと組み合わせることができる。この場合に、3つのプラスミドを組合せ、そして2つの相同組換えが、組換え体アデノウイルスを得るのに必要とされる（図22）。当業者は、本発明から逸脱することなしに、アダプターおよび相補的プラスミドの他の組合せを使用しうると解釈されるべきである。

以下に概説される一般のプロトコルおよび本発明の限定されない例としての手段が、種々のアダプター・プラスミドおよびAd. AflIII-rITR断片を用いて数種の組換えアデノウイルスを産生するために行われた。アデノウイルスのパッケージング・セル（PER. C6）を、 $\sim 25\text{ cm}^2$ のフラスコに蒔き、そしてそれらが、 $\sim 80\%$ 集密度にある次の日に、製造業者によって記述されるとおりDNAおよびリポフェクタミン剤（ライフ・テクノ）の混合物に形質移入させた。日常的に、 $40\text{ }\mu\text{l}$ リポフェクタミン、 $4\text{ }\mu\text{g}$ アダプター・プラスミドおよび $4\text{ }\mu\text{g}$ の相補的アデノウイルスゲノム断片AflIII-rITR（または二重相同組換えについては $2\text{ }\mu\text{g}$ の全ての3つのプラスミド）を使用した。これらの条件下で、pAd/CMV-LacZアダプターを用いた対照形質移入で測定されるとおり、 $\sim 50\%$ （形質移入後48時間）の一過性形質移入効率が得られた。2日後、細胞を、 $\sim 80\text{ cm}^2$ フラスコに継代し、そしてさらに培養した。およそ5日（単独の相同組換えのため）から11日（二重相同組換えのため）後、細胞変性効果（CPE）が見られ、それにより、機能性アデノウイルスが形成したことが示された。細胞および培地を、全CPEで回収し、そして組換えウイルスを、凍結-解凍によって放出する。当初の段階で、力価が、全CPEの発生にもかかわらず可変性であることが分かったので収量を増加するために、 80 cm^2 フラスコでの余剰の増幅段階を、日常的に行った。増幅後、ウイルスを回収し、そしてブランクを、PER. C6細胞で精製した。個々のブランクを、活性移入遺伝子を有するウイルスについて試験した。

ヒト・インターロイキン-3遺伝子（図1参照、WO88/04691）、ヒト内皮硝酸遺伝子（Janssensら、J. Biol. Chem. 267巻：14519-14522頁（1992年））、Tc1Aトランスポサゼ遺伝子（Vosら、Genes Dev. 7巻：1244-1253頁（1993年））、または細菌LacZ遺伝子（Kaldersonら、Cell 39巻：499-509頁（1984年））を含む4つの異なる組換えアデノウイルスが、このプロトコルを使用して生成された。全ての場合に、機能性アデノウイルスを形成し、そして全単離ブランクは、活性移入遺伝子を有するウイルスを含んだ。

【0106】

E3またはE4領域中の修飾を伴うE1-欠失組換えアデノウイルス

E1領域中の置換を別として、E3機能が、組換えウイルスの複製、パッケージングおよび感染のために必要でないので、アデノウイルス中のE3領域を欠失するか、またはE3領域の一部を置換することが可能である。これは、最大封入可能サイズ（wtゲノム長のおよそ105%）を超えることなしに、大型挿入物を使用するか、または1つ以上の遺伝子を挿入する機会を作り出す。これは、例えば、XbaIで消化し、そして再連結することによってpBr/Ad. Bam-rITRクローン中のE3領域の一部を欠失させるこ

10

20

30

40

50

とによって行うことができる。これは、全ての公知E3コーディング領域を含むAd5wt配列28592-30470を除去する。別の例は、新たな配列の挿入をさせるポリリンカーを有するE3領域中のgp19Kのコーディング領域の厳密な置換である。これは、全ての他の無傷のコーディング領域を残し、移入遺伝子が、E3プロモーターおよびpA配列によって起動されるので異質プロモーターについての必要を回避し、それによりコーディング配列のための空間をいっそう残し、そして少なくとも、対照E1置換ベクターでと同じくらいよく非常に高い移入遺伝子発現を生じる。

この末端に、E3領域の5'部分を含むwt Ad5から得られる2.7kbのEcoRI断片を、pBluescript (KS⁺) (ストラタジーン)のEcoRI部位にクローン化した。次に、ポリリンカー中のHindIII部位を、EcoRVおよびHincIIを用いた消化によって除去し、続いて再連結させた。生じるクローンpBS. Eco-Eco/ad5ΔHIIIを、gp19Kコーディング領域を欠失するのに使用した。プライマー1 (5'-GGG TAT TAG GCC AAA GGCGCA-3') (配列番号: 8) および2 (5'-GAT CCC ATG GAA GCT TGG GTG GCG ACC CCA GCG-3') (配列番号: 9) を使用して、wt Ad5 DNA中の配列28511に対応するpBS. Eco-Eco/ad5ΔHIIIから28734まで配列を増幅した。プライマー3 (5'-GAT CCC ATG GGG ATC CTT TAC TAA GTT ACA AAG CTA-3') (配列番号: 10) および4 (5'-GTC GCT GTA GTT GGA CTG G-3') (配列番号: 11) を同じDNA上に使用して、Ad5配列29217から29476までを増幅した。2つの生じたPCR断片を、新たに導入されたNcoI部位に基づいて一緒に連結し、そしてXbaIおよびMunIで消化した。その後、この断片を、XbaIおよびMunIで部分的に消化されたpBS. Eco-Eco/ad5ΔHIIIベクターに連結し、それによりpBS. Eco-Eco/ad5ΔHIII. Δgp19Kを生じた。

HindIIIおよびBamHI部位への外来遺伝子の挿入を可能にするために、XbaI欠失を、pBS. Eco-Eco/ad5ΔHIII. Δgp19K中で行い、pBluescriptポリリンカー中のBamHI部位を除去した。生じたプラスミドpBS. Eco-Eco/ad5ΔHIIIΔgp19KΔXbaIは、Ad5中で配列28733 (HindIII) および29218 (BamHI) に対応する特徴的なHindIIIおよびBamHI部位を含む。これらの部位への外来遺伝子の導入の後、欠失XbaI断片を、再導入するか、または挿入物を、HindIIIおよび、例えばMunIを用いてpBS. Eco-Eco/ad5ΔHIIIΔgp19Kに再クローン化するかのいずれかである。この手段を使用して、我々は、HSV-TK (McKnight、Nucleic Acids Res. 8巻: 5949~5964頁 (1980年) およびVincentら、Hum. Gene Ther. 7巻: 197~205頁 (1996年))、hIL-1α (Esandiら、Gene Therapy 5巻: xxx-yyy (1998年))、ラットIL-3β (Esandiら、Gene 11242: xxx-yyy (1998年))、ルシフェラーゼ (DeWittら、Mol. Cell Biol. 7巻: 725~737頁 (1987年)) またはLacZを発現するプラスミドを作製した。pBS. Eco-Eco/ad5ΔHIII. Δgp19Kプラスミド中の特徴的なSrfIおよびNotI部位 (目的の挿入遺伝子を有するか、または有しない) を使用して、目的の遺伝子を含む領域を、pBr/Ad. Bam-rITRの対応の領域に移行させ、それにより構築物pBr/Ad. Bam-rITRDgp19K (目的の挿入遺伝子を有するか、または有しない) を生じる。この構築物を、上記に記述されるとおり使用して、組換えアデノウイルスを生成する。ウイルスに関連して、挿入遺伝子の発現は、アデノウイルスE3プロモーターによって起動される。

E1およびE3の両方を欠失させた組換えウイルスは、目的の第一の遺伝子の挿入を伴うか、または伴わない本発明によるE1置換についてのアダプター・プラスミド、pWE/Ad. AffIII-EcoRI断片、および目的の第二の遺伝子の挿入を伴うか、または

10

20

30

40

50

伴わない pBr/Ad. Bam-r ITR Δ gp19K プラスミドを含むプラスミド基本システムを用いた E1 置換ベクターについて上に記述されるとおり二重相同組換え手段によって生成される。

【0107】

制限のない例では、我々は、E1 領域にネズミ HSA 遺伝子、および gp19K 領域にホタルのルシフェラーゼ遺伝子を含む組換えアデノウイルスの生成および機能性を記述する。ルシフェラーゼ遺伝子を、HindIII-BamHI 構築物として pAd/MLP-Luc (欧州特許第 0707071 号に記述される) から削り、そして pBS. Eco-Eco/ad5 ΔHIII. Δgp19K ΔXbaI の HindIII-BamHI 部位にクローニングした。その後、ルシフェラーゼ遺伝子を含む MscI-MunI 断片を、

10

pBS. Eco-Eco/ad5 Δgp19K の対応の部位にクローニングして、pBS. Eco-Eco/ad5 Δgp19K. luc を生成した。これは、Eco-Eco 断片を保持するが、ここで、gp19K の代わりにルシフェラーゼ遺伝子を有する。さらに操作を簡単にするために、ルシフェラーゼ挿入物中の内部 EcoRI 部位を、ルシフェラーゼ遺伝子のアミノ酸配列を変えることなしに突然変異させた。一方の EcoRI 部位は、ルシフェラーゼ挿入物の 5' -非コーディング領域にある HindIII 部位に隣接し、そして他方は、出発の ATG から 588 bp の 3' に配置された。695 bp PCR 産物を、以下のプライマー：5' -CGA TAA GCT TAA TTC CTT TGT GTT T-3' (配列番号：12) および 5' -CTT AGG TAA CCC AGT AGA TCC AGA GGA GTT CAT-3' (配列番号：13) を用いて作製し、そして HindIII および BstEII で消化した。その後、この断片を、HindIII-BstEII 消化 pBS. Eco-Eco/ad5 Δgp19K. luc に連結し、それによりこのベクター中の対応の挿入物を置換した。生じた構築物は、pBS. Eco-Eco/ad5 Δgp19K. luc² と称される。その後、ルシフェラーゼ遺伝子、および E3 領域の一部を、SrfI および NotI を用いてこのクローンから削除し、そして pBr/Ad. Bam-r ITR 中の対応の部位に導入し、それによりクローン pBr/Ad. Bam-r ITR Δgp19K/luc² を生じた。

20

二重挿入ウイルス中の E1 の置換のために使用されたアダプター・プラスミド pAd5/S1800 HSA は、レトロウイルス LTR-基本プロモーターによって起動されるネズミ HSA 遺伝子を含有する。このアダプター・プラスミドは、プロモーター配列の置換によって、以下に記述される pAd5/L420-HSA 構築物から作製された。第一に、PCR 産物を、L420 プロモーター断片 (以下に記述される) の増幅のためと同じプライマーを使用して、WO95/34669 に記述される MFG-S ベクターに基づいたレトロウイルス・ベクター上で産生させた。この PCR は、MFG-S ベクター中の 453 ~ 877 bp に対応する配列を増幅する。その後、pAd5/L420-HSA 中の L420 プロモーター (図 21) を、特徴的な AvrII および HindIII 部位を用いて、PCR 断片について交換した。その後、生じた構築物 pAd5/S430-HSA を、NheI および ScaI で消化し、そして HSA 遺伝子、pA 配列、Ad5 配列およびアンピシリン遺伝子中の ScaI 部位に対するベクター配列を含む 4504 bp 断片を、単

30

40

【0108】

構築物 pAd5/S430-HSA を、XbaI および ScaI で消化し、そして 1252 bp 断片 (アンピシリン遺伝子の残り、アデノウイルスから得られる左側 ITR およびパッケージング・シグナル、および S430 プロモーターの 5' 部分を含む) を単離した。1576 bp の第三の断片を、MFG-S-基本レトロウイルス・ベクターから単離し、続いて XbaI 消化を行い、そして 695 ~ 2271 bp に対応する MFG-S 配列を含む。

アダプター・プラスミド pAd5/S1800-HSA を、3つの単離断片を連結することによって構築した。PER. C6 細胞への以下の DNA 断片の形質移入によって (上述

50

のとおり)、二重挿入ウイルス pAd5/S1800-HSA. E3 luc を作製した: EcoRI および SalI (2 μg) で消化した pAd5/S1800-HSA。CPE の発生で、ウイルスを回収し、そして PER. C6 細胞での一連の継代によって増幅した。この HSA-luc ウイルスの活性を、E1 領域中の S1800-HSA または CMV-luc 転写単位のいずれかを含むシングル挿入 ΔE1 ウイルスと比較した。A549 細胞を、 2×10^5 細胞/ウェルに蒔き、そして 5 時間後、様々な量のウイルスに感染させた。2 日後、移入遺伝子発現を測定した。ルシフェラーゼアッセイ・システム (プロメガ) を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、そしてネズミ HSA 遺伝子の発現を、α-HSA 抗体 (M1/69, Pharmingen) で測定した。結果は、表 III に列記される。

10

この実験では、プラスミド基本組換えシステムを用いて、二重挿入ウイルスを、作製できること、および両方の挿入物が機能性があることが示される。さらに、二重挿入ウイルスのルシフェラーゼ活性は、対照ウイルスの CMV-起動ルシフェラーゼ活性に匹敵する。したがって、我々は、E3 プロモーターが、E1A タンパク質の不在下でさえ、A549 細胞で非常に活性であると結論づけた。

E3 領域での操作に加えて、E4 領域の (一部の) 変化は、pBr/Ad. Bam-r I TR で容易に達成することができる。しかし、ある種の場合には、このようなウイルスの産生および増殖は、トランス位で相補性を必要とする。

【0109】

(実施例 3)

20

アデノウイルス遺伝子を含有し、そして発現する細胞中の二本鎖 DNA 分子の産生のための逆行鎖合成についてのプライマーとしての役割を果たすヘアピン構造を形成する能力のある合成 DNA 配列の感応性の例示

使用されるプラスミドの名付け慣例:

p プラスミド

I ITR (アデノウイルス逆方向末端反復)

C サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー/プロモーターの組合せ

L ホタルのルシフェラーゼ・コーディング配列

hac、haw それぞれ、順行および逆行の配向の両方で制限エンドヌクレアーゼ Asp 718 で消化した後に形成されうる強力なヘアピン (図 15)。

30

名付け慣例は、以下のおとり例示される。pICLhaw は、アデノウイルス ITR、続いて逆行 (非機能性) 配向で CMV-起動ルシフェラーゼ遺伝子および Asp 718 ヘアピンを含むプラスミドである。プラスミド pICLhac、pICLhaw、pICLI および pICL を、標準技術を用いて作製した。これらのプラスミドの図式表示は、図 16~19 に示される。

プラスミド pICL は、以下のプラスミドから誘導される。

nt. 1 457 pMLP10 (Levrero ら、Gene 101 巻: 195-202 頁 (1991 年))

nt. 458 1218 pCMVβ (クローンテック、EMBL Bank 番号 U02451)

40

nt. 1219 3016 pMLP.luc (イントロジーン、未出版)

nt. 3017 5620 pBLCAT5 (Stein ら、Mol. Cell Biol. 9 巻: 4531~4 頁 (1989 年))

プラスミドは、以下のとおり構築された。

プラスミド pMLP10 の tet 遺伝子は、BamHI-SalI 断片の欠失によって不活性化されて、pBLP10ΔSB を生じた。プライマー組 PCR/MLP1 (配列番号: 37) および PCR/MLP3 (配列番号: 38) を使用して、合成 SalI 制限部位に隣接した Ad5-ITR を有する 210 bp の断片を、pMLP10 DNA をテンプレートとして使用して増幅した。PCR 産物を、酵素 EcoRI および SgrAI で消化して、196 bp の断片を作製した。プラスミド pMLP10ΔSB を、EcoRI および

50

SgrAIで消化して、ITRを除去した。この断片を、EcoRI-SgrAI処理PCR断片に置換して、pMLP/SALを作製した。

プラスミドpCMV-Lucを、完了までPvuIIで消化し、そして再循環させて、SV40由来のポリアデニル化シグナル、およびAd5左側末端を除いたAd5配列を除去した。生じたプラスミドで、XmnI-SacII断片を交換することによって、pCMV-LucΔAd、Ad5 ITRを、プラスミドpMLP/SALから得られるSalI部位隣接ITRに置換した。生じたプラスミドで、pCMV-LucΔAd/SAL、Ad5左側末端およびCMV-起動ルシフェラーゼ遺伝子を、SalI-SmaI断片として単離し、そしてSalIおよびHpaI消化プラスミドpBLCAT5に挿入して、プラスミドpICLを形成した。プラスミドpICLは、図19に表され、その配列番号は、図20に表される。

10

プラスミドpICLは、以下の特性を含む。

nt. 1~457 Ad5左側末端 (ヒトアデノウイルス5型の配列1~457)

nt. 458~969 ヒトサイトメガロウイルス・エンハンサーおよび最初期プロモーター (Boshartら、Cell 41巻: 521~530頁 (1985年)) (プラスミドpCMVβから、クローンテック、米国パロアルト)

nt. 970~1204 SV40 19Sエクソンおよび切断16/19Sイントロン (プラスミドpCMVβから)

nt. 1218~2987 ホタルのルシフェラーゼ遺伝子 (pMLP, lucから)

nt. 3018~3131 後期転写から得られるSV40タンデム・ポリアデニル化シグナル (プラスミドpBLCAT5から誘導される)

20

nt. 3132~5620 pUC12骨格 (プラスミドpBLCAT5から誘導される)

nt. 4337~5191 β-ラクタマーゼ遺伝子 (Amp^r耐性遺伝子、逆配向)

【0110】

プラスミドpICLhacおよびpICLhaw

プラスミドpICLhacおよびpICLhawは、制限酵素Asp718を用いたpICLの消化によって、プラスミドpICLから誘導された。線状化プラスミドを、ウシ-インテスチンのアルカリ性ホスファターゼで処理して、5'のリン酸基を除去した。部分的に相補な合成一本鎖オリゴヌクレオチドHp/a sp1 (配列番号: 39) およびHp/a sp2 (配列番号: 40) を、アニールし、そしてT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてそれらの5'末端にリン酸化した。

30

リン酸化二本鎖オリゴマーを、脱リン酸化pICL断片と混合し、そして連結した。プラスミドに挿入された単独コピーの合成オリゴヌクレオチドを含むクローンを単離し、そして制限酵素消化物を用いて特徴づけた。1つの連結でのAsp718部位へのオリゴヌクレオチドの挿入は、Asp718認識部位を再作製する一方で、他方の連結部では、認識部位を、中断させる。挿入オリゴヌクレオチドの配向および組込みは、配列分析によって選択クローンで確認された。順行配向 (3205EcoRI部位に密接したAsp718部位) でオリゴヌクレオチドを含むクローンを、pICLhacと表した。逆行配向 (SV40由来のポリシグナルに密接したAsp718部位) にオリゴヌクレオチドを有するクローンを、pICLhawと表した。プラスミドpICLhacおよびpICLhawは、図16および17に表される。

40

プラスミドpICLIを、pICLから得られるSalI-SgrAI断片の挿入によってプラスミドpICLから作製し、それにより、pICLのAsp718部位へのAd5-ITRを含んだ。194bpのSalI-SgrAI断片を、pICLから単離し、そしてイー・コリDNAポリメラーゼI (クレノー断片) およびdNTPを用いて、粘着末端を、平滑末端に変換した。ブドウのヌクレアーゼで処理することによって、Asp718粘着末端を、平滑末端に変換した。連結によって、プラスミドpICLのAsp718部位中のITRを含むクローンを、作製した。順行配向でITR断片を含むクローンを、pICLIと称した (図18)。

50

アデノウイルスAd-CMV-hcTKの生産。組換えアデノウイルスを、特許出願第95202213号に記述される方法にしたがって構築した。組換えアデノウイルスを作製するのに2つの構成要素が、必要とされた。第一に、ITRおよびパッケージング・シグナルを含むアデノウイルスゲノムの左側末端、目的の遺伝子を有する発現カセット、および相同組換えのために使用しうるアデノウイルスゲノムの一部を含有するアダプタープラスミド。さらに、アデノウイルスDNAは、前述のアダプター・プラスミドを伴う組換えのために必要とされる。Ad-CMV-hcTKの場合には、プラスミドPCMV-TKは、基本として使用される。このプラスミドは、nt. 1~455のアデノウイルス5型ゲノム、pCMV β から由来するnt. 456~1204（クローンテック、CMVエンハンサー・プロモーターおよびシミアンウイルス40から得られる16S/19Sイントロンを含むPstI-SstI断片）、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ遺伝子（欧州特許出願第95202213.5号に記述される）、SV40由来のポリアデニル化シグナル（SV40配列のnt. 2533~2668）、続いてAd5のBgIII-IScaI断片（Ad5配列のnt. 3328~6092）を含む。これらの断片は、pMLP10由来（Levreroら、Gene 101巻：195~202頁（1991年））の骨格に存在する。プラスミドpAd-CMVhc-TKを作製するために、プラスミドpCMV-TKを、ClaI（特徴的なClaI部位は、TK開放読取枠のすぐ上流に配置される）で消化し、そしてウシーインテスチン・アルカリホスフェートで脱リン酸化した。ヘアピン構造を作製するために、合成オリゴヌクレオチドHP/c1a1（配列番号：41）およびHP/c1a2（配列番号：42）をアニールし、そしてT4-ポリヌクレオチドキナーゼおよびATPで、それらの5'-OH基上でリン酸化した。二本鎖オリゴヌクレオチドを、線状ベクター断片に連結し、そしてイー・コリ株Sureを形質転換するのに使用した。ClaI部位へのオリゴヌクレオチドの挿入は、ClaI認識部位を中断する。オリゴヌクレオチドは、その末端の内の1つの側に新たなClaI部位を含む。選択クローンで、挿入オリゴヌクレオチドの配向および組込みは、配列分析によって確認された。順行配向（ITR側でClaI部位）でオリゴヌクレオチドを含むクローンは、pAd-CMV-hcTKと表された。このプラスミドを、911細胞に、ClaI消化野生型アデノウイルス5型DNAとの同時形質移入をした。CMV-hcTK発現カセットが、E1配列を置換する組換えアデノウイルスを単離し、そして標準手段を用いて増殖させた。

複製がITRで出発した後に、ヘアピンが、置換した鎖での逆行鎖の合成のためのプライマーとして使用されうるかどうかを調べるために、プラスミドpICLhacを、911細胞、例えばアデノウイルスE1領域で形質転換したヒト胚網膜細胞に導入した。プラスミドpICLhawは、対照として役割を果たした。これは、逆行配向でオリゴヌクレオチド対HP/aspl（配列番号：39）および2（配列番号：40）を含むが、しかしそうでなければ、プラスミドpICLhacと完全に一致する。さらに、この調査に含まれるのは、プラスミドpICLIおよびpICLである。プラスミドpICLIでは、ヘアピンは、アデノウイルスITRに置換される。プラスミドpICLは、ヘアピンもITR配列のいずれも含まない。これらのプラスミドは、対照として役割を果たして、末端のヘアピン構造に基づいて、複製の効率を決定した。DNA複製のために必要とされるE1タンパク質以外のウイルス性産物（これらは911細胞によって製造される。）を供するために、培養物を、形質移入の後、ウイルスIG-Ad-MLPI-TKで感染させた。数種のパラメーターは、形質移入DNA分子の適切な複製を示すために調べられるべきであった。第一に、先述のプラスミドで形質移入され、そしてIG-Ad-MLPI-TKウイルスで感染された細胞培養物から得られるDNAを、サザンブロッティングによって、予測される複写中間体の存在について、並びに、複写ゲノムの存在について分析した。さらに、形質移入し、そしてIG-Ad-MLPI-TKで感染した細胞集団から、ルシフェラーゼマーカー遺伝子を、ルシフェラーゼ陰性細胞に移行し、そしてそれを発現できるウイルスを単離した。

プラスミドpICLhac、pCLhaw、pICLIおよびpICLのプラスミドDNA

Aを、制限エンドヌクレアーゼS a l Iで消化し、そしてブンドウのヌクレアーゼで処理して、生じたDNA断片の4個のヌクレオチド一本鎖伸長を除去した。この方法で、DNA断片上の天然のアデノウイルス5' I T R末端を作製した。続いて、p I C L h a cおよびp I C L h a wプラスミドの両方を、制限エンドヌクレアーゼA s p 7 1 8で消化して、ヘアピン構造を形成する能力のある末端を作製した。消化プラスミドを、標準リン酸カルシウム同時沈降技術を使用して、9 1 1細胞に導入した（各プラスミドについて4つの皿）。形質移入の間、各プラスミドについて、培養物の内の2つを、細胞当たり5つの感染性I G . A d . M L P I . T K粒子を用いて、I G . A d . M L P I . T Kウイルスに感染させた。形質移入の24時間後、および後期形質移入の40時間に、1つのA d . t kウイルス感染および1つの未感染培養物を使用して、H i r tにより修正された手段（E i n e r h a n dら、Gene Therapy 2巻：336～343頁（1995年）に記述されるとおり）を用いて、低分子量DNAを単離した。アリコート量の単離DNAを、サザン分析のために使用した。プローブとしてルシフェラーゼ遺伝子を使用して制限エンドヌクレアーゼE c o R Iでのサンプルの消化の後、およそ2.6 kbのハイブリッド形成断片を、プラスミドp I C L h a cで形質移入されたアデノウイルス感染細胞から得られたサンプルから検出した。この断片のサイズは、ルシフェラーゼマーカ遺伝子の予測複写と一致した。これは、挿入ヘアピンが、逆行鎖合成についてのプライマーとして役割を果たす能力があるという結論を支持する。ハイブリッド形成断片は、I G . A d . M L P I . T Kウイルスが省略される場合、またはヘアピンオリゴヌクレオチドが、逆配向に挿入される場合、不在であった。

10

20

【0111】

制限エンドヌクレアーゼD p n Iは、テトラヌクレオチド配列5' - G A T C - 3'を認識するが、しかしメチル化DNAのみを切断する（つまり、イー・コリで増殖され、誘導されるプラスミドDNAのみであって、哺乳類細胞に複製されたDNAではない）。制限エンドヌクレアーゼM b o Iは、同じ配列を認識するが、しかし、未メチル化DNA（主に、哺乳類細胞で増殖されたDNA）のみを切断する。形質移入細胞から単離されたDNAサンプルを、M b o IおよびD p n Iと共にインキュベートし、そしてサザンブロットで分析した。これらの結果は、p I C L h a cおよびp I C Lプラスミドで形質移入された細胞でのみ、大型D p n I耐性断片が存在し、それは、M b o I処理サンプルでは不在であったことを示した。これらのデータは、プラスミドp I C L Iおよびp I C L h a cの形質移入の後にのみ、その断片の複製および複写が起こることを示す。

30

これらのデータは、一本鎖形態で存在している時に、アデノウイルス感染細胞で、一方の末端にアデノウイルス由来の逆方向末端反復（I T R）を有し、そして他方の末端で、同じ鎖にある配列にアニールできるヌクレオチド配列を有する線状DNA断片が、それによりヘアピン構造を生じ、そして両方の末端上に逆方向末端反復配列を有する構造に変換されることを示す。生じたDNA分子は、野生型アデノウイルスゲノムと同じ機構によって複製する。

【0112】

（実施例4）

ルシフェラーゼマーカ遺伝子、I T Rの単独コピー、封入シグナルおよびヘアピン構造を形成する能力のある合成DNA配列を含むDNA分子が、ビリオンに封入されうるDNA分子を生成するのに十分であることの例示

40

C M V - l u c マーカ遺伝子の2つのコピーを含む、実施例3で生じたDNA分子が、ビリオンに封入されうることを例示するために、ウイルスを、3回サイクルの凍結-解凍破碎を介して残りの2つの培養物から回収し、そしてネズミ繊維芽細胞を感染するのに使用した。感染の48時間後、感染細胞を、ルシフェラーゼ活性について分析した。ルシフェラーゼ活性が、ウイルス粒子を介してよりむしろ遊離DNAの移行によって誘導されている可能性を排除するために、ウイルス保存物を、DNエースIで処理して、DNA混入物を除去した。さらに、別の対照として、アリコート量のウイルス保存物を、56℃で60分間インキュベートした。加熱処理は、混入DNAに影響を及ぼさないが、しかしウイ

50

ルスを不活性化する。明らかなルシフェラーゼ活性は、p I C L h c および p I C L I プラスミドで形質移入された I G . A d . M L P I . T K - 感染細胞から誘導されるウイルス保存物に感染させた後の細胞にのみ見られた。非感染細胞でも、あるいは p I C L h w および p I C L で形質移入された感染細胞のいずれでも、明らかなルシフェラーゼ活性が示されたものはなかった。D N エース I 処理ではなく、加熱不活性化が、ルシフェラーゼ発現を完全に排除し、それにより、アデノウイルス粒子そして不含でない（混入）D N A 断片は、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子の移行に起因したことが示された。

これらの結果は、これらの小型ウイルスゲノムを、アデノウイルス粒子に封入できることを示し、そして I T R および封入シグナルが、アデノウイルス粒子への線状 D N A 断片の封入に十分であることが示唆された。これらのアデノウイルス粒子は、有効な遺伝子移行のために使用できる。少なくともある程度のアデノウイルス遺伝子（主に、E 1、E 2、E 4 および L および V A）を含み、そして発現する細胞に導入するとき、少なくとも 1 つの I T R、少なくとも一部の封入シグナル、並びにヘアピン構造を形成する能力のある合成 D N A 配列を含む組換え D N A 分子は、ビリオンに封入しうる組換えゲノムを独立に生成する固有の許容量を示す。このようなゲノムおよびベクターシステムは、遺伝子移行に使用しうる。

【0113】

（実施例 5）

アデノウイルス 5 型ゲノム（したがって、E 1 タンパク質コーディング領域、右手 I T R および封入配列を欠く）のヌクレオチド 3 5 1 0 ~ 3 5 9 5 3（主に、9 . 7 ~ 1 0 0 地図単位）、および I T R 以外の一本鎖形態で存在し、そしてその結果として、ヘアピン構造を形成する能力のある場合に D N A 分子の同じ鎖の部分に相補的である末端 D N A 配列を含む D N A 分子が、9 1 1 細胞中で複製できることの例示

上述の I C L h a c ベクターゲノムおよび似ていない最小アデノベクターに、ヘルパー細胞を介してアデノウイルス粒子に封入させることが必要とされるアデノウイルス産物を提供できる複製 D N A 分子を開発するために、A d - C M V - h c T K アデノウイルスベクターを開発した。C M V エンハンサー／プロモーター領域およびチミジンキナーゼ遺伝子との間で、アニールしたオリゴヌクレオチド対（表 I）H P / c l a 1 および 2 を挿入した。ベクター A d - C M V - h c T K を増殖させ、そして標準手段を使用して 9 1 1 細胞中で生成した。このベクターを育成し、そして形質移入のために使用される D N A の源として排他的に増殖させた。アデノウイルス A d - C M V - h c T K の D N A を、標準技術によって C s C l 密度勾配遠心分離を使用して精製されたウイルス粒子から単離した。ウイルス D N A を、制限エンドヌクレアーゼ C l a I で消化した。消化 D N A を、0 . 7 % アガロースゲル上で寸法分取し、そして大型断片を単離し、そして別の実験に使用した。9 1 1 細胞の培養物を、標準リン酸カルシウム同時沈殿技術を用いて A d - C M V - h c T K D N A の大型 C l a I - 断片で形質移入させた。プラスミド p I C L h a c を用いた先の実験でいっそう同様に、A d - C M V - h c は、右手 I T R で出発しながら複製する。いったん一本鎖が置換されると、ヘアピンは、その断片の左手末端に形成されうる。これは、右手側に向かって鎖の D N A ポリメラーゼ伸長を促進する。その過程は、置換鎖が、その二本鎖形態に完全に変換されるまで進行する。最終的に、右手 I T R を再作製し、そしてこの配置で、正常なアデノウイルス複製—開始および伸長が起こる。ポリメラーゼは、ヘアピンを通して読取り、それにより分子を複写する。一方の側にはアデノウイルス I T R 配列を、そしてヘアピン構造を形成する許容量を示した他方の側には D N A 配列を有する 3 3 2 5 0 b p の入力 D N A 分子は、複写され、その結果両方の末端が、I T R 配列を含む。生じた D N A 分子は、およそ 6 6 5 0 0 b p のパリンドロム構造から構成される。

この構造は、サザン分析を使用して、形質移入細胞から抽出される低分子量 D N A で検出される。D N A 断片のパリンドロム特性は、適切な制限エンドヌクレアーゼおよびプローブとして H S V - T K 遺伝子を用いたサザンブロッティングを用いた低分子量 D N A の消化によって示されうる。この分子は、細胞内に存在するアデノウイルス遺伝子産物に基づ

10

20

30

40

50

いて形質移入細胞でそれ自身を複製できる。部分的に、アデノウイルス遺伝子は、標的細胞のゲノム（主に、E1遺伝子産物）中に取り込まれるテンプレートから発現され、他方の遺伝子は、DNA断片それ自身を複製する上で存在する。この線状DNA断片は、ビリオンに封入されえない。それが、封入が要求される全てのDNA配列を欠くのみでなく、そのサイズも、大きすぎるので、封入されえない。

【0114】

（実施例6）

アデノウイルス5型ゲノム（したがって、E1タンパク質コーディング領域、右手ITRおよび封入配列を欠く）のヌクレオチド3503-35953（すなわち、9.7-100マップ単位）、およびITR以外のDNA分子の同じ鎖の一部に相補的であり、そして結果として、ヘアピン構造を形成する能力のある末端DNA配列を含むDNA分子は、911細胞で複製でき、そしてpICL1およびpICLhac由来のDNA断片を封入するのに必要とされるヘルパー機能を提供できることの例示

次の一連の実験の目的は、実施例5に記述されるDNA分子が、実施例3および4に記述される最小アデノベクターを封入するのに使用できることを示すことである。

Ad-CMV-hcTK DNAのエンドヌクレアーゼC1aI消化の後単離された大型断片を、エンドヌクレアーゼSalI、ブンドウ・ヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼAsp718処理プラスミドpICLhacと、あるいは対照として同様に処理したプラスミドpICLhawと一緒に911細胞に導入した（実施例5に記述されるとおり）。

48時間後、ウイルスを、形質移入細胞集団の凍結-解凍破碎によって単離した。ウイルス製品を、DNase Iで処理して、混入している遊離DNAを除去した。ウイルスを、ラット2繊維芽細胞を感染するのに連続して使用した。感染の48時間後、細胞を、ルシフェラーゼ活性について分析した。pICLhawプラスミドでなく、pICLhacプラスミドで形質移入した細胞から単離されたウイルスに感染した細胞でのみが、明らかなルシフェラーゼ活性を示した。感染の前のウイルスの加熱不活性化は、ルシフェラーゼ活性を完全に破壊し、それにより、ルシフェラーゼ遺伝子が、ウイルス粒子によって移行されることが示された。ウイルス保存物を有する911細胞の感染は、あらゆる細胞組織学上の効果を生じず、それによりpICLhacが、911細胞で増殖されるべきなんらの感染性ヘルパーウイルスもなしに生成されたことが示された。これらの結果は、提起の方法が、アデノウイルス形質転換ヒト細胞で、または非アデノウイルス形質転換ヒト細胞で独立に複製できる感染性ヘルパーウイルスを完全に欠いている最小アデノウイルスベクターの保存物を生成するために使用できることを示す。

【0115】

（実施例7）

最小アデノウイルスベクターの産生および生成のためのプラスミドの構築

最小アデノウイルスベクターは、移行されるべき外来核酸分子と共に、またはなしに、操作可能に結合した成分として、複製およびパッケージングのために必要であるアデノウイルス由来のシス要素を含む。最近、アデノウイルスベクターの十分なパッケージングについての下の限界は、ゲノム長の75%で決定された（ParksおよびGraham、1997年）。種々の長さの詰める断片の柔軟な組込みを可能にするために、多クローニング部位（MCS）を、最小アデノウイルスベクターに導入した。本発明による最小アデノウイルスベクターを得るために、以下の構築物を作製した：pAd/L420-HSA（図19）を、Bg1IIおよびSalIで消化し、そしてベクター含有断片を単離した。この断片は、Ad5から得られる左側ITRおよびパッケージングシグナル、改質したレトロウイルスLTRによって起動されたネズミHSA遺伝子を含む。アデノウイルスの右側ITRを、以下のプライマー：ポリL-ITR：5'-AAC-TGC-AGA-TC-T-ATC-GAT-AC-T-AGT-CAA-TTG-CTC-GAG-TC-T-AGA-C-TA-CGT-CAC-CGG-CCC-CGT-TCC-3'（配列番号：14）およびITR-BSN：5'-CGG-GAT-CCG-TCG-ACG-CGG-CG-CAT-CAT-CAA-TAA-TAT-ACC-3'（配列番号：15）を用

いた pBr/Ad. BamHI-rITR テンプレート DNA 上での PCR によって増幅した。増幅断片を、PstI および BamHI で消化し、そして同じ酵素で消化した pUC119 にクローン化した。ITR および MCS の補正増幅の配列確認の後、BglII-SalI 断片を単離し、そして上述される BglII/SalI 消化 pAd/L420-HSA 断片にクローン化させた。生じたクローンは、pAd/L420-HSA. ITR と名付けられた。

30 kb を越す長さの構築物を操作することができるために、最小アデノウイルスベクター pAd/L420-HSA. ITR を、コスミドベクターのバックグラウンドにサブクローニングした。この終わりに、コスミドベクター pWE15 を、改質して、骨格にある制限部位を除去した。pWE15 を、PstI で消化し、そして 4 kb および 2, 36 kb

10

の断片を、アガロースゲルから単離し、そして一緒に連結した。SV40 ori/初期プロモーターおよびネオマイシン耐性コーディング配列を剥いで生じたクローンは、pWE20 と名付けられた。その後、pWE20 を、ClaI および HindIII で消化し、そして粘着末端を、クレノー酵素で充填した。6354 bp 平滑断片を、以下の配列：5'-CGATGCAATCG-3' (配列番号：16) を有するリン酸化 NsiI リンカーに連結した。連結した DNA を、フェノール/クロロホルム抽出し、EtOH で沈殿させて、緩衝液を交換し、そして過剰 NsiI で消化した。消化 DNA を、電気泳動によってリンカーから分離し、単離し、そして再連結した。生じたクローンを、pWE25 と名付けた。NsiI リンカーの順行挿入を、制限酵素消化および配列決定によって確認した。

20

最小アデノウイルスベクターを構築するために、pAd/L420-HSA. ITR を、ScaI および NotI で消化し、そしてアンピシリン遺伝子の一部およびアデノ ITR を含む 2 kb 断片を、SacI および NotI で消化した pWE25 にクローニングした。生じたクローンは、pMV/L420H と名付けられた (図 24)。このクローンは、プロモーターおよび/または遺伝子を変換する簡単な操作を可能にし、そしてさらに、正常なプラスミド骨格に容易にクローン化されない長さの DNA 断片の挿入を可能にする。

L420-HSA 断片 (SnaBI-BamHI) を、CMV プロモーターおよび LacZ コーディング配列を含む pcDNA3-nlsLacZ (NruI-BamHI) から得られる断片に交換することによって、プラスミド pMV/CMV-LacZ を作製した。

pcDNA3-nlsLacZ を、KpnI および BamHI で消化した pcDNA3 (インビトロゲン) への nlsLacZ コーディング配列の PCR 増幅後に得られる Kp

30

nI-BamHI 断片の挿入によって構築した。プライマー 1: 5'-GGG-GTG-GCC-AGG-GTA-CCT-CTA-GGC-TTT-TGC-AA-3' (配列番号：17) および 2: 5'-GGG-GGG-ATC-CAT-AAA-CAA-GTT-CAG-AAT-CC-3' (配列番号：18) を用いて、pMLP. nlsLacZ テンプレート DNA 上で PCR 反応を行った。911 細胞における一過性形質移入実験で β-ガラクトシダーゼ発現を分析することによって、順行増幅およびクローニングを確認した。

ベクター pAd/MLPnlsLacZ を、以下のとおり作製した。pMLP10 (Levrero ら、Gene 101 巻：195~202 頁 (1991 年)) を、HindIII および BamHI で消化し、そして 3 つの部分のライゲーションで、L7RHbga

40

l から得た 3.3 kb の AvrII-BamHI 断片 (Kalderson ら、Cell 499~509 頁 (1984 年))、および HindIII および XbaI オーバーハングを有する合成リンカーに連結した。配列 5'-AGC TTG AAT TCC CGG GTA CCT-3' (配列番号：19) および 5'-CTA GAG GTA CCC GGG AAT TCA-3' (配列番号：20) の 2 つのオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによって、リンカーを作製した。生じたクローンを、pMLP. nlsLacZ/-Ad と名付けられた。次に、pMLP. nlsLacZ/-Ad を、BamHI および NruI で消化し、そして断片を含むベクターを、pAd5SalB (Bernards ら、Virology 120 巻：422~432 頁 (1982 年)) から得られる 2766 bp の BglII-ScaI 断片に連結した。これは、アダプター

50

・プラスミド pMLP. n l s L a c Zを生じた（欧州 0 7 0 7 0 7 1 号に記載された）。

最小アデノウイルスベクターの増殖は、アデノウイルス遺伝子産物の発現によってのみ達成できる。多量のウイルスの産生を保持するのに十分な高さのレベルで、アデノウイルス遺伝子産物の発現は、コーディング核酸分子の複製を必要とする。したがって、通常に、ヘルパーウイルスを複製することは、最小アデノウイルスベクターを補足するに使用される。しかし、本発明は、ヘルパーウイルスの使用なしに、最小アデノウイルスベクターについてのパッケージングシステムを供する。本発明の方法の内の1つは、5' - I T R および b p 3 5 1 0 と 3 5 9 3 8 の間の全アデノウイルス配列、すなわち、E 1 領域およびパッケージングシグナルを除いた完全なアデノウイルスゲノムを含む複製 DNA 分子を利用する。構築物 pWE / Ad. Δ 5'（図 2 3）は、2つのアデノウイルス I T R pWE / Ad. Δ 5' を含む、本発明による複製分子の例である。3つの断片から得たコスミドベクターのバックグラウンドで行われた。第一に、以下のプライマー：I T R - E P H：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'（配列番号：21）および I T R - p I X：5' - A C G - G C G - G C G - C T T - A A G - C C A - C G C - C C A - C A C - A T T - T C A - G T A - C G T - A C T - A G T - C T A - C G T - C A C - C C G - C C C - C G T - T C C - 3'（配列番号：22）を使用して、Ad 5 から得られる 5' I T R を増幅した。生じた PCR 断片を、E c o R I および A s c I で消化し、そして同じ酵素で消化したベクター pNEB 1 9 3（ニュー・イングランド・バイオラボズ）にクローン化した。生じた構築物を、pNEB / I T R - p I X と名付けた。配列決定で、ジーンバンク（Gen Bank）による予測配列（寄託番号：M 7 3 2 6 0 / M 2 9 9 7 8）との単独ミスマッチを除き p I X プロモーター（Ad 5 配列 3 5 1 1 から 3 5 3 8 まで）に結合した左側 I T R（Ad 5 配列 1 から 1 0 3 まで）にある Ad 5 配列の順行増幅が確認された。すなわち、余剰の C 残渣が、A f l I I 部位のちょうど上流に見られた。この I T R - p I X 断片を、E c o R I および A f l I I で単離し、そして Ad 5 配列 3 5 3 9 ~ 2 1 5 6 7 を含む E c o R I - A f l I I ベクター断片に連結した。E c o R I で、そして部分的に A f l I I で p B r / Ad. C l a - B a m（上記）を消化することによって、後者の断片を得た。生じたクローンは、pAd / L I T R（Δ 5'）- B a m H I と名付けられた。P a c I で消化したコスミドベクター pWE 1 5、P a c（上記）を、P a c I / B a m H I で消化した pAd / L I T R（Δ 5'）- B a m H I および P a c I / B a m H I で消化した p B r / Ad. B a m - r I T R、p a c 番号 2（上記）に連結されることによって、最終構築物 pWE / Ad. Δ 5' を作製した（図 2 3）。

【0116】

本発明によるヘルパーウイルスの使用なしに、最小アデノウイルスベクターについてのパッケージングシステムを作製する別の方法は、E 1 領域およびパッケージングシグナル以外の完全なアデノウイルスゲノムを含み、そして I T R の内の 1 つが、I T R 以外の同じ鎖の一部に相補である DNA 配列を含む断片に置換され、そしてしたがって、ヘアピン構造を形成できる複製 DNA 分子を使用することである（図 1 0）。限定されない例では、I T R 以外の同じ鎖の一部に相補である上記 DNA 配列は、アデノ関連ウイルス（AAV）末端反復から誘導される。このような複製 DNA 分子は、pWE / Ad. Δ 5' について記述されるとおり同じクローニング攻略法に続いて作製されが、しかしここで、アデノウイルス p I X プロモーターの一部に結合した AAV 末端反復で出発する。この終わりに、AAV I T R を含む p s u b 2 0 1（+）（Samulski ら、J. Virol. 63 巻：3822 ~ 3828 頁（1989 年））から得られる P v u I I / X b a I 断片を導入することによって、構築物 pNEB / I T R - p I X 中の H p a I および S p e I 部位の間のアデノウイルス I T R 配列を、AAV I T R に交換した。これは、E 1 相補セルラインで複製する構築物 pWE / AAV. Δ 5' を生じる。

最小アデノウイルスベクターについての別の選択的パッケージングシステムは、以下に記述され、そして S V 4 0 の複製システムを利用する。この方法による機能性ヘルパー分子

10

20

30

40

50

は、E1配列およびパッケージングシグナルではなく最小構築物のパッケージングを保持するのに必要である少なくともアデノウイルス配列を含み、好ましくはITRをも欠く。このアデノウイルス由来の本質は、細菌での増殖のために必要とされる配列に加えて、SV40ウイルスから複製の起点を含むベクターに存在しなければならない。E1タンパク質に加えて、SV40由来の大型T抗原タンパク質を発現するパッケージングセルライン（例えば、PER.C6）への、上記で記述された最小アデノウイルスベクターと一緒にこのような分子の形質移入は、アデノウイルス由来のヘルパー構築物の大きなT依存性複製を生じる。この複製は、最小アデノウイルスベクターの複製、およびウイルス粒子への封入のために必要である高いレベルのアデノウイルス・タンパク質になる。この方法で、最小アデノウイルスベクター構築物およびヘルパー分子の間の相同組換えに至る配列重複はない。さらに、一方の側でヘルパー分子と最小アデノウイルスベクター、そして他方の側でパッケージング細胞のE1配列の間の相同組換えに至る配列重複はない。

40 kbアデノウイルス構築物の複製を、SV40大型Tタンパク質を発現する細胞について調査した。これに関して、 2×10^6 Cos-1細胞を、リポフェクタミン試薬（ライフ・テクノ.）：8 kbコスミドベクターpWE.pac、40.5 kb構築物pWE/Ad.AflIII-rITRおよび40.6 kb構築物pWE/Ad. $\Delta 5'$ （以下に記述される）の3つのクローン（番号1、番号5および番号9）と複合した以下の構築物を用いてT25フラスコに形質移入させた。SV40ori配列なしに、PacI酵素およびCMV-LacZ発現ベクターで消化した構築物pWE.pacおよびpWE/Ad.AflIII-rITRで対照形質移入を行った。形質移入効率は、48時間後CMV-LacZベクターおよびX-gal染色を使用する別々の形質移入によって測定される場合、50%であった。全ての細胞を、形質移入に続く48時間に回収し、そしてDNAを、ハート（Hirt）の手段（Einerhandら、Gene Therapy 2巻：336-343頁（1995年）に記述されるとおり）によって抽出した。最終ペレットを、50 μ lのTE+RNエース（20 μ g/ml）中に再懸濁させ、そして10 μ lサンプルを、MboI（37°Cで、一夜、35単位）で消化させた。未消化サンプル（5 μ l）およびMboI消化サンプルを、標準の手段によって、0.8%アガロースゲルにかけ、ナイロンフィルター（アメシヤム）に移行し、そして放射性活性プローブにハイブリッド形成した。1つのプローブは、コスミドベクターpWE.pacから得られる887 bpのDpnI断片から誘導され、そして1つは、アデノウイルス配列から得られる1864 bpのBsrGI-BamHI断片から誘導された。これらのプローブは、MboI消化材料中の、それぞれ887 bpバンドおよび1416 bpにハイブリッド形成する。細菌起点からの入力DNAを、メチル化させ、そしてしたがって、MboIで消化されない。この方法で、真核生物細胞で複製されるDNAを特異的に検出することが可能である。図26Aは、構築物pWE/Ad. $\Delta 5'$ および複製のSV40起点の配置、pWE由来のプローブおよびアデノウイルス由来のプローブの図式表現を示す。下方部分は、アデノウイルスプローブ（B）およびpWEプローブ（C）にハイブリッド形成したサザンプロットのオートラジオグラムを表す。サンプル負荷の説明についての記号一覧参照。これらの実験は、SV40 oriを宿すプラスミドに形質移入されるCos-1細胞から得られる材料を含む全てのレーンが、MboI感受性DNAを含むことを示し、そして予想の長さの特定のバンドを示す。PacI消化材料で形質移入されたCos-1細胞を有するレーン（レーンB17/18およびC15-18）での複製に特異的なバンドは、おそらく不完全なPacI消化から生じる。これらの実験から、真核生物細胞中でSV40大型T/oriシステムを用いて大型DNA断片を複製する可能性があることが結論づけられる。

（実施例8）

ITR配列を欠く機能性アデノウイルス・ヘルパー分子を、上記に記述されるクローンpWE/Ad. $\Delta 5'$ で出発しながら構築した。pWE/Ad. $\Delta 5'$ を、Bst1107Iで消化し、17.5 kbベクター含有断片を、再連結して、pWE/Ad. $\Delta 5'$ -Bst1107Iを得た。その後、このクローンを使用して、右側ITRなしにアデノウイルスゲ

10

20

30

40

50

ノム配列の3'部分を増幅した。2645bpのPCR断片を、プライマーAd3' / Forw: 5'-CGG AAT TCA TCA GGA TAG GGC GGT G G-3' (配列番号: 23) およびAd3' / Rev: 5'-CGG GAT CCT ATC GAT ATT TAA ATG TTT TAG GGC GGA GTA ACT TG-3' (配列番号: 24) を用いて作製した。増幅断片を、EcoRIおよびBamHIで消化し、そして同じ酵素で消化したpBr322にサブクローニングした。配列決定による順行増幅の確認後、このクローンの2558bpのSbfI-ClaI断片を、同じ酵素で消化したpWE/Ad. 5'-Bst1107Iに再クローン化した。生じた構築物は、右側ITRを欠き、そしてpWE/ΔrI-Bst1107Iと名付けた。次に、このクローンで、左側ITRを、PacIおよび以下のプライマー: PA-pIX1 5'-TAA GCC ACT AGT ACG TAC TGA AAT GTG TGG GCG TGG C-3' (配列番号: 25) およびPA-pIX2 5'-TTA AGC CAC GCC CAC ACA TTT CAG TAC G TA CTA GTG GCT TAA T-3' (配列番号: 26) をアニーリングすることによって作られるAflIIオーバーハングを有するリンカーに置換した。これは、左側ITRを除去し、そしてpIXプロモーターの順行配列を再保存した。そのクローンは、pWE/ΔITR-Bst1107Iと称される。配列決定によって二本鎖リンカーの順行挿入が確認された。その後、欠失Bst1107I断片を、pWE/ΔITR-Bst1107Iに戻りクローニングし、そして制限消化によって順行配向を検査した。生じたクローンは、pWE/Ad-Hと称される。アデノウイルスE1タンパク質およびSV40大型T抗原を発現するパッケージング細胞へのこのDNA分子の形質移入に続いて、その分子の複製は、その分子でのアデノウイルスの本質によってコードされるアデノウイルスタンパク質のレベルが高くなりながら、起こる。

【0117】

(実施例9)

組換えアデノウイルスベクターの小型化された多ウエル産生

96孔のマイクロタイター組織培養平板(プレート1)(グレイネル(Greiner)、オランダ国、カタログ番号6555180号)は、20~120分間、室温で各ウェルをインキュベートすることによって滅菌水中に溶解されたポリL-リシン(PLL、0.1mg/ml)(シグマ)で最初に被覆した。一方、予め被覆した96孔平板を使用することができる(BectonおよびDickinson)。PLLでインキュベートした後、各ウェルを、100μl滅菌水で2回洗浄し、そして室温で、少なくとも2時間、乾燥させた。形質移入の前日に、PER.C6細胞を、トリプシン-EDTAを用いて回収し、そして計数した。その後、その細胞を100μl当たり45,000個の細胞の懸濁液に希釈し、続いて、PLL被覆96孔平板のウェル当たり100μlを種蒔きした。次の日に、2.6μlのSalI線状化pAd/CMV-LacZおよび2.6μlのPacI線状化pWE-Ad.AflII-rITRプラスミドDNA(両方とも1μg/μl)および95μlの血清不含ダルベッコ修正イーグル培地(DMEM)を、DNA混合液にリポフェクタミンを添加することによって、74.4μlの血清不含DMEMで希釈した25.6μlのリポフェクタミンと混合した。DNA/リポフェクタミン混合液を、1.3ml血清不含培地を添加した後30分間、室温に放置した。その後、後者の混合液を、形質移入前に200μlのDMEMで洗浄したPER.C6播種ウェルに添加(ウェル当たり30μl)した。湿潤CO₂インキュベーター(37℃、10%CO₂)で、10%仔ウシ血清を有する200μlのDMEMを3時間後、各ウェルに添加し、そしてその平板を、湿潤CO₂インキュベーター(37℃、10%CO₂)に戻した。次の日に、各ウェルの培地を、200μlのDMEM、10%FCS、10mM MgCl₂に換えた。その後、平板を、ウェルが、-20℃で、少なくとも1時間、凍結にかけ、続いて解凍し、そして繰返しのピペット採取によって再懸濁させた後さらに3日間、湿潤CO₂インキュベーターに放置した。形質移入効率を、別の平板でlacZ染色を使用して測定し、そしてPER.C6細胞の各形質移入ウェルについておよそ40%であることが分かった

。アリコート量の $100\mu\text{l}$ の凍結／解凍した形質移入細胞を、PLL被覆平板（平板2）なしに、上に記述されるとおり播種した新たなPER. C6細胞を用いて平板の各ウェルに移行させた。第一の形質移入平板の凍結／解凍細胞溶解物と共にインキュベートしたPER. C6細胞を有する第二の96孔平板を、CPEについて検査した。ウェルの少なくとも5%は、2日後に透明なCPEを示した。平板1から得られる溶解物で感染させた4日後、平板を、1回の凍結－乾燥サイクルにかけ、そして各溶解ウェルから得られる $10\mu\text{l}$ を、A549細胞を播種した平板のウェルに添加した（DMEM中 $100\mu\text{l}$ に播種したウェル当たり 1×10^4 個の細胞、前日に10%FCS）。感染の2日後、ウェルを、LacZ活性のために染色した。感染ウェルの内、96%が感染され、そして青色に染色した。染色した全てのウェルおよび多数のウェルは、100%青色染色し、そしてそれゆえアデノウイルスベクターを有する全細胞の形質導入は、LacZを担持することを示した。組織培養フラスコ中でのMOI実験から得られると推定すると、ウェル産生ウイルスのアデノウイルス滴定は、 ml 当たり 10^6 － 10^7 感染単位あたりである。

10

目的の発明は、未知機能の産物をコードするサンプル核酸（類）の宿主での高い生産量の送出および発現についての方法および組成物を開示する。方法は、セルラインを相補する構築、サンプル核酸を含み、アデノウイルス由来のプラスミドを、アデノウイルスベクターに封入し、宿主を、宿主中のサンプル核酸（類）の産物を発現するアデノウイルスベクターで感染し、サンプル核酸の産物（類）によって宿主で誘導される改変表現型を同定し、そしてそれにより、サンプル核酸によってコードされる産物（類）に対する機能を付与するアデノウイルス由来のプラスミドのライブラリーについて記述される。サンプル核酸は、例えば、合成オリゴヌクレオチド、DNA、cDNAでありえ、そして例えば、ポリペプチド、アンチセンス核酸またはGSEをコードできる。その方法は、十分に自動化でき、そして従来の高い生産量分析サンプル核酸ライブラリーに充てる多ウェルフォーマットで行われうる。

20

【0118】

（実施例10）

治療的およびマーカー移入遺伝子を担持するE1およびE2A欠失組換えアデノウイルスベクターの小型化多ウェル産生

cDNA配列のそれぞれのレパートリーを有するcDNAライブラリーの構築、小型化アデノウイルス産生システムのクローニング許容量を可能にするために、PER. C6の誘導体、主にPER. C6/E2Aを使用した。このセルラインは、アデノウイルス発現カセットの3つの欠失：E1、E2AおよびE3を有するベクターの産生を可能にする。これらの3つの欠失は、約10.5kbまでの長さの移入遺伝子サイズを示すベクターの理論的クローニングを認める。ここで、我々は、様々なヒトおよびマウスcDNA、並びに追加のマーカー遺伝子を担持するE1およびE2A欠失ベクターの産生を示す。

30

形質移入の前日、PER. C6/E2A細胞を、トリプシン－EDTAを用いて回収し、計数した。その後、細胞を、 $100\mu\text{l}$ 当たり22.500細胞の懸濁まで培養培地（10%仔ウシ血清および10mMの MgCl_2 を有するDMEM）で希釈し、続いてポリ－L－リシン（PLL）被覆96孔平板（ベクトン・アンド・ディキンソン）のウェル当たり $100\mu\text{l}$ を播種した。翌日、DNA混合液にリポフェクタミン混合液を添加することによって、 $100\mu\text{l}$ の量の血清不含ダルベッコ修正イーグル培地（DMEM）中の2.6 μg の線状化アダプター分子および2.6 μg のPacI線状化pWE/Ad. AflI IIR ITR. デルタE2AプラスミドDNA（実施例19参照）を、74.4 μl 血清不含DMEMに希釈した25.6 μl リポフェクタミンと混合した。DNA／リポフェクタミン混合液を、1.3ml血清不含培地が添加された後、室温に30分間放置した。その後、後者の混合液を、形質移入の前に $200\mu\text{l}$ のDMEMで洗浄したPER. C6/E2A播種ウェルに添加（ウェル当たり $30\mu\text{l}$ ）した。湿潤 CO_2 インキュベーター（ 39°C 、10% CO_2 ）で3時間後、10%仔ウシ血清および10mMの MgCl_2 を有する $200\mu\text{l}$ のDMEMを各ウェルに添加し、そしてその平板を、湿潤 CO_2 インキュベーター（ 39°C 、10% CO_2 ）に戻した。翌日、各ウェルの培地を、10%仔ウシ血

40

50

清および10 mMのMgCl₂を有する200 μlのDMEMに交換した。その後、その平板を、ウェルが-20℃で一夜凍結にかけ、続いて解凍し、そして反復ピペット採取によって再懸濁させた後、さらに7日間、湿潤CO₂インキュベーター(32℃、10%CO₂)に戻した。アリコート量の100 μlの凍結/解凍した形質移入細胞を、上で正常な96孔組織培養平板(平板2)で記述されるとおりに播種した新たなPER.C6/E2A細胞を有する平板の各ウェルに移行させた。培養し、それゆえ第一の形質移入平板の凍結/解凍細胞溶解液で感染させたPER.C6/E2A細胞を有する第二の96孔平板を、CPE形成について調べ(図27参照)、そして-20℃で保存した。図27で、新たなPER.C6/E2A細胞に対する凍結/解凍細胞の増殖の後等級付けされた細胞(CPE陽性)ウェルを産生するウイルスの含有率が描かれた。明らかに、本出願の小型化システムは、様々な移入遺伝子挿入物を有するデルタE1/E2A二重欠失ベクターの十分な産生を可能にする。

10

【0119】

(実施例11)

PER.C6/E2Aを用いた小型化産生システムで生成されたアデノウイルスベクター粒子の定量

96孔組織培養平板の1つのウェルで産生されるアデノウイルスベクターの力価を決定するために、アデノウイルスプラークアッセイを行った。

PER.C6/E2A細胞を、トリプシン-EDTAを用いて回収し、そして計数した。その後、細胞を、2 ml当たり1.5 × 10⁶細胞の懸濁まで培養用培地(10%仔ウシ血清および10 mMのMgCl₂を有するDMEM)で希釈し、続いてPLL被覆6孔平板(ベクトン・アンド・ディキンソン)のウェル当たり2 mlを播種した。アデノウイルスベクター溶解液を含むマイクロタイター平板を解凍し、そして各アデノウイルスのランダムに選択したウェルの50 μlを使用して、培養用培地中のアデノウイルスの一連の10倍希釈を行った。同じ日に種播きされたPER.C6/E2A細胞の培地を、ウェル希釈ウイルス当たり2 mlに交換し、そして50-60%単層を、湿潤CO₂インキュベーター(32℃、10%CO₂)でおよそ16時間感染させた。感染後、細胞を、ウェル当たり3 mlのアガロース混合液(2 × MEM、2%仔ウシ血清、1 mMのMgCl₂、PBSおよび1%アガロース)で上に載せ、そして湿潤CO₂インキュベーター(32℃、10%CO₂)に戻した。2週間後、1つの陰性対照を含めた9つの個々のプラークを、200 μlの培養用培地に移し、そして-20℃で保存した。アリコート量の25 μlのこの材料を使用して、PER.C6/E2A細胞(100 μl中のウェル当たり2.25 × 10⁴細胞)を感染し、感染前の1日に、96孔組織培養平板に種蒔きした。これを、完全CPEの存在が観察されるまで、湿潤CO₂インキュベーター(32℃、10%CO₂)にインキュベートし、そして続いて-20℃で保存した。

20

30

96孔組織培養平板のウェルで産生されるアデノウイルスの最終力価を、個々のプラークを引き上げた1週間後に測定した。図28で、96孔平板のウェルに産生されたpfu/mlでのアデノウイルスの力価が描かれる。0.8 ± 0.7 × 10⁹ pfu/mlの平均力価は、384孔平板を用いた機能性ゲノムスクリーンでの特に細胞基本アッセイで必要とされるMOIによって、十分なウイルスが、400-4000アッセイ(100-1000のMOI)について産生されることを暗示する。これは、1つのライブラリーを用いた複数スクリーンを可能にする。

40

【0120】

(実施例12)

PER.C6/E2A細胞におけるマイクロタイター平板で産生されるアデノウイルスベクターの品質

産生組換えアデノウイルスの機能性を試験するために、それぞれのアデノウイルスベクターに感染した細胞における以下の機能性アッセイを行った。

-β-ガラクトシダーゼアッセイ

-hIL3アッセイ

50

ルシフェラーゼアッセイ
 - c e N O S アッセイ
 - G L V R 2 アッセイ
 - E G F P アッセイ

【0121】

- β -ガラクトシダーゼアッセイ

A549細胞を、トリプシン-EDTAを用いて回収し、そして計数した。その後、細胞を、100 μ l 当たり10,000個の細胞の懸濁まで培養用培地（10%加熱不活性化FBSを有するDMEM）で希釈し、続いて、96孔組織培養平板のウェル当たり100 μ lを種蒔きした。翌日、lacZ形質導入アデノウイルス並びに陰性対照（新たなPER.C6/E2A細胞で増幅された一次ウェルおよびプラークの両方）を含む全CPE陽性PER.C6/E2Aウェルを使用して、A549細胞を感染させた。この目的のために、凍結ウェルを解凍させ、そして各ウェルの20 μ lの凍結/解凍細胞溶解液を使用して、A549細胞の1つのウェルを感染させた。感染の2日後、感染A549細胞の培地を除去し、そして各ウェルを、2回、100 μ lのPBS（リン酸緩衝生理食塩水）で洗浄した。洗浄後、ウェル当たり100 μ l固定剤（1%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド）を添加することによって、細胞を、室温で5分間固定化した。細胞を、2回、PBSで洗浄した後、100 μ lのX-gal染色溶液（0.2MのK₃Fe(CN)₆、0.2MのK₄Fe(CN)₆、DMSO中のX-galおよび0.1MのMgCl₂）を各ウェルに添加した。

10

20

CPE陽性ウェルで感染されたウェルの全てが、青く染色した。多数のウェルは、100%青色染色、そしてそれゆえlacZを担持するアデノウイルスベクターを有する全細胞の形質導入を示した（図29参照）。

【0122】

hIL-3アッセイ

感染の前日、A549細胞を、上述のとおり播いた。翌日、ヒトインターロイキン-3（hIL-3）形質導入アデノウイルス（新たにPER.C6/E2A細胞で増幅された一次ウェルおよびプラークの両方）、並びに陽性および陰性対照を含む全CPE陽性PER.C6/E2Aウェルを使用して、A549細胞を感染させた。この目的のために、凍結ウェルを解凍し、そして各ウェルの20 μ lの凍結/解凍細胞培養液を使用して、A549細胞の1つのウェルを感染させた。感染の3日後、感染したA549細胞の100 μ lの上清上でのhIL-3濃度の定量を、ヒトIL-3免疫アッセイ（商標クアンティキン）を用いて測定した。

30

CPE陽性ウェルで感染されたウェルの全ては、高いhIL-3濃度を示した（図29参照）。

【0123】

ルシフェラーゼアッセイ

感染の前日、A549細胞を、上述のとおり播種した。翌日、ルシフェラーゼ形質導入アデノウイルス（新たにPER.C6/E2A細胞で増幅された一次ウェルおよびプラークの両方）、並びに陽性および陰性対照を含む全CPE陽性PER.C6/E2Aウェルを使用して、A549細胞を感染させた。この目的のために、凍結ウェルを解凍し、そして各ウェルの20 μ lの凍結/解凍細胞培養溶解液を使用して、A549細胞の1つのウェルを感染させた。感染の2日後、感染したA549細胞の培地を除去し、そして各ウェルを、100 μ lのPBSで洗浄した。100 μ lの1 $\times$ レポーター溶解緩衝液（プロメガ）を添加したのち、ウェルを凍結/解凍にかけ、続いて20 μ lの凍結/解凍細胞溶解液でのルシフェラーゼ活性を測定した。

40

CPE陽性ウェルで感染されたウェルの全ては、高いルシフェラーゼ活性を示した（図29参照）。

【0124】

c e N O S アッセイ

50

P E R. C 6 / E 2 A細胞を、トリプシン－E D T Aを用いて回収し、そして計数した。その後、細胞を、1 0 0 μ l 当たり2 2, 5 0 0 個の細胞の懸濁まで培養用培地（1 0 % F B Sおよび1 0 m MのM g C l₂でフェノール赤を欠いているD M E M）で希釈し、続いて、9 6 孔組織培養平板のウェル当たり1 0 0 μ l を種蒔きした。翌日、c e N O S 形質導入アデノウイルス（新たなP E R. C 6 / E 2 A細胞で増幅された一次ウェルおよびプラークの両方）、並びに陰性対照を含む全C P E 陽性P E R. C 6 / E 2 Aウェルを使用して、P E R. C 6 / E 2 A細胞を感染させた。この目的のために、凍結ウェルを解凍させ、そして各ウェルの2 0 μ l の凍結／解凍細胞溶解液を使用して、P E R. C 6 / E 2 A細胞の1 つのウェルを感染させた。感染の3 日後、5 0 μ l 着色溶液〔1 : 1 比でのグリッセA 試薬（0 . 1 % N－（1－ナフチル）エチレンジアミン）およびグリッセB 試薬（5 % リン酸中の2 5 % スルファニルアミド）〕を、感染P E R. C 6 E 2 A細胞の5 0 μ l の上清に加えた。着色溶液を添加した後、陽性c e N O S 活性を示す上清は、直ぐにピンク色になった。

10

C P E 陽性ウェルに感染されたウェルの全ては、陽性c e N O S 活性を示した（図2 9 参照）。

【0 1 2 5】

G L V R 2 両種性レセプターアッセイ

両種性レトロウイルスのためのレセプターであるG L V R 2 のアデノウイルス指向性形質導入を、ヒト神経成長レセプター（N G F R）の切断バージョンを移行する両種性レトロウイルスの上清を使用する以外は、基本的に記述される（L i e b e r ら、1 9 9 5 年）

20

とおりに測定した。G L V R 2 アデノウイルスの上清で感染されたC H O 細胞のレトロウイルス形質導入を、抗N G F R 抗体およびフローサイトメーターを用いて検出した。G L V R 2 形質導入アデノウイルス（新たにP E R. C 6 / E 2 A細胞で増幅されたプラーク）を含むC P E 陽性P E R. C 6 / E 2 Aウェルで感染されたウェルの全ては、陽性のG L V R 2 活性を示した（図2 9 参照）。

【0 1 2 6】

E G F P アッセイ

マイクロタイター平板フルオリメーター上で、またはフローサイトメーターによってE G F P 発現を測定した。

結論として、ウェルから生じた両方のウイルス、並びに生成ウェルから精製された（すなわち、クローン化された）プラークは、それらの別々の移入遺伝子の形質導入を示した。したがって、システムは、機能性アデノウイルスベクターの産生について高い忠実度を示し、そして試験された移入遺伝子の挿入物について異常な形態をなんら産生しない。

30

【0 1 2 7】

（実施例1 3）

P E R. C 6 およびP E R. C 6－E 2 A細胞におけるアデノウイルスベクターの産生のための十分に精製したプラスミドDNAを産生するDNA単離法

真核生物の細胞での形質移入調査のために使用されるプラスミドDNAは、高いレベルの形質移入効率を達成するのに十分な純度および内毒素不含のものでなければならないことはよく知られている。イー．コリからプラスミドDNAを精製するための従来の方法は、アルカリ性溶解手段（B i r n b o i m, H. C. およびD o l y, J. の組換えプラスミドDNAをスクリーニングする高速アルカリ性溶解手段。N u c l e i c A c i d R e s. 7 巻：1 5 1 3－1 5 2 2 頁（1 9 7 9 年））、続いて塩化セシウム（C s C l）勾配上でのプラスミドDNAの結合（S a m b r o o k, J. ら編、分子クローニング：実験室マニュアル、第2 版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（1 9 8 9 年）参照）、または陰イオン交換樹脂での結合および溶出（例えば、キアゲン・インク．の商標キアゲン・プラスミド精製法；およびライフ・テクノロジーズの商標コンサート・プラスミド精製システム参照）を包含する。しかし、それらは、単離当たりに相当な手作業時間を必要とするので、これらの方法の全ては、高生産量DNA単離には不適切である。したがって、そして単離当たりの経費を減少するために、他の方法を試験

40

50

した。

S a l I 線状化アデノウイルスアダプタープラスミド p C L I P - S a l I L a c Z および E 2 A 欠失ヘルパー断片 p W E / A d . A f l I I - r I T R . デルタ E 2 A を使用して試験された方法：アルカリ溶解、続いてカラム基本のプラスミド精製（キアゲン）

1. アルカリ溶解、続いてイソプロパノール沈殿、および T E 緩衝液での溶解化 2. アルカリ溶解、続いてイソプロパノール沈殿、および m l 当たり 10 マイクログラムで R N エースを含む T E 緩衝液での溶解化

3. アルカリ溶解、続いてイソプロパノール沈殿、および m l 当たり 10 マイクログラムで R N エースを含む T E 緩衝液での溶解化、続いてフェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿

4. 標準臭化セチルトリメチルアンモニウム（C T A B）プラスミド単離（N u c l e i c A c i d s R e s、16²⁰；1488）

5. m l 当たり 10 マイクログラムで R N エースを含む T E 緩衝液での溶解化以外は、標準 C T A B プラスミド単離、続いてフェノール／クロロホルム抽出

等容量の生じたプラスミドを、S a l I、続いてフェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿で線状化させた。T E 緩衝液での溶解化およびアガロースゲル上での検査に続いて、等容量の D N A（臭化エチジウム染色によって測定されたとおり）を、実施例 9 および 10 で記述されたとおりリポフェクタミンを用いて P E R . C 6 / E 2 A 細胞に形質移入させた。増殖後、ウェルを、ウェル産生についての測定として C P E 形成について等級付けした。

図 30 で、P E R . C 6 / E 2 A 細胞の形質移入の後、アデノウイルスベクター（C P E 陽性）を産生する相当量のウェルが、p C L I P - L a c Z で形質移入され、6 つの異なるプロトコルで精製した。キアゲン：標準アルカリ溶解、続いてキアゲン・プラスミド精製；A l k L y s：アルカリ溶解、続いてイソプロパノール沈殿、および T E 緩衝液での溶解化；A L + R N エース：アルカリ溶解、続いてイソプロパノール沈殿、および m l 当たり 10 マイクログラムで R N A エースを含む T E 緩衝液での溶解化；A L + R + フェノール：アルカリ溶解、続いてイソプロパノール沈殿、および m l 当たり 10 マイクログラムで R N エースを含む T E 緩衝液での溶解化、続いてフェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿；C T A B：標準 C T A B プラスミド単離 C T A B + フェノール：m l 当たり 10 マイクログラムで R N エースを含む T E 緩衝液での溶解化以外は標準 C T A B プラスミド単離、続いてフェノール／クロロホルム；D N A の品質が、6 つ全て別々に単離されたプラスミドが、C P E で類似の量のウェルを産生したとき、P E R . C 6 / E 2 A 細胞の、そしてそのウイルス産生の形質移入についての主な決定基でないことは明らかである。

結論として、P E R . C 6 / E 2 A 細胞の、そしてそのウイルス産生の高い生産量の形質移入について、標準アルカリ溶解、続いて T E 緩衝液での溶解化の後、0.6 容量のイソプロパノールで沈殿したプラスミド D N A を使用するのに十分である。

【0128】

（実施例 14）

ミニチュア化された様式でのアデノウイルスベクターの創製のための未精製の消化アダプターおよびヘルパーアデノウイルス D N A 分子の使用

総じての価格、および手法における誤差の機会を最小化し、かつ高スループット様式で組換えアデノウイルスを生産する場合のスループットを最大化するために、可能な限り多くの工程を省くのが望ましい。より小さく低いスループット規模でアデノウイルスベクターを創製する場合にもいずれのここでの改良も適用できる。組換えアデノウイルスを生産する場合に最も困難な自動化工程は、細胞の D N A でのトランスフェクションに先立っての D N A クリーンアップ工程バイフェノールクロロホルム抽出（p / c）である。線状化後に D N A を精製して無酵素 D N A を得る。これは、アダプターおよびヘルパー D N A 分子でのトランスフェクション後に高パーセンテージのウイルス生成を得るのに重要であると考えられる。p / c 精製手法を省くためのさらなる動機は、ウイルスの創製に負の効果を

10

20

30

40

50

有し得る、トランスフェクションで用いるDNAにおける痕跡量のフェノールおよびクロロホルムの危険性である。従って、p/cのクリーンアップの複雑な工程を、本出願のミニチュア化されたアデノウイルスベクター創製プロトコル主題から省くことができるかを調べた。この方法は、センスまたはアンチセンスcDNA発現ライブラリーのごときライブラリーの高スループット構築の基礎を形成する。いくつかの独立した実験を行って、アデノウイルスベクター創製の効率に対するp/c工程を省く効果をテストした。p/c精製は以下のごとくに行った。アダプターDNAおよびrITR-DNAを適当に制限酵素で消化した後、等容量のフェノールおよびクロロホルム（1：1）を添加し、徹底的に混合し、遠心した（5分、14,000rpm）。水性層を新しいマイクロ遠心管に移し、等容量のクロロホルムを加えた。再び、これを徹底的に混合し、遠心した（5分、14,000rpm）。水性層を新しいマイクロ遠心管に移し、1/10容量3M酢酸ナトリウム（pH5.2）および2.5容量の無水エタノールを添加した。これを-20℃で少なくとも20分間保持し、引き続いて遠心し（15分、14,000rpm）、ペレットを70%エタノールで洗浄した。DNAを風乾し、適当な容量の滅菌水を添加した（層流気流キャビネット中）。PER.C6/E2A細胞を用いてトランスフェクションを実施例9に記載したごとくに行った。全てのウイルスをE1およびE2A欠失し、PER.C6/E2A細胞中で生産した。第1の実験では、（実施例13に記載したごとく）6つの異なるDNA単離プロトコルのβ-ガラクトシダーゼ（pAd5.Clipsal.LacZ）を含有するアダプターDNAを分析し、CPE形成につきモニタリングすることによってアデノウイルスベクターを生産するその効率を比較した。全てのDNA試料のうち、半分を適当な制限酵素（SalI）を用いる線状化後にp/c精製し、半分は線状化後に精製しなかった。制限酵素は加熱不活化した。なぜならば、SalI部位は使用され、かくして、ヘルパーDNAの不慮の消化を排除するrITRデルタE2Aヘルパー断片に存在するからである。この実験においては、p/c精製rITRデルタE2AヘルパーDNAを用いた。用いたDNA単離方法の全てにおいて、CPEは効率的に形成された（図31A）。ある場合には、フェノールクロロホルム抽出による精製の省略は、より高いCPE効率を与えた。結論として、線状化酵素で消化したアデノウイルスアダプターDNAは先行精製なくしてトランスフェクションで用いることができる。

第2の実験において、増強された緑色蛍光蛋白質（EGFP）および増強された黄色蛍光蛋白質（EYFP）（pAd5.Clippac.EGFPおよびpAd5.Clippac.EYFP）を含有するアダプターDNAを用いて精製および精製しないことを比較した。Qiagen単離方法を用いてアダプタープラスミドDNAを単離した。用いたrITRデルタE2Aをp/cで精製した。トランスフェクション前に加熱不活化される必要のないPacIを用いてアダプターDNAを線状化した。なぜならば、rITRに存在するPacI部位はないからである。観察したCPEのパーセンテージで首尾一貫した差異は見いだされず、アデノウイルスベクターの生産は効率的であった（図31B）。第3の実験は過剰の変数を含むものであった。rITRを精製する必要性をテストした。用いたアダプターDNAはEGFP（pAd5.Clippac.EGFP）を含有し、Qiagen単離方法を用いて単離した（図30C）。トランスフェクションおよび増幅後の結果は、制限酵素消化後におけるアダプターおよびrITR DNA双方の精製は必要ないことを示す。

全ての結果を考慮し、アダプターDNAおよびrITRのフェノールクロロホルム精製工程は高パーセンテージのCPEを得るのには、かくして、アデノウイルスベクター生産には必要ないことは明らかである。例えば実施例9および10に記載された手法の前記修正の結果、自動設定においてアデノウイルスベクターライブラリーを創製した場合、およびより小さな規模で手動にてベクターを作成した場合にスループットの有意な増加がもたらされる。

【0129】

（実施例15）

生産されたベクターの安定性に関するアデノウイルスベクターの生産

10

20

30

40

50

本明細書中で種々の実施例に記載した組換えアデノウイルスの創製は、マルチウェル組織培養プレートで増殖させたトランスフェクトされた P E R . C 6 細胞（および誘導体）で生産されたウイルスの増幅から後ほぼ 5 ないし 11 日後に機能的アデノウイルスが形成されるであろうことを示す。細胞病理学効果（C P E）の観察は、機能的アデノウイルスが形成され、それが複製されつつあることを示す。トランスジーンインサートの性質および実験条件の変動はウイルス創製の速度論が可変的であるようにする。非常に多数のウェル、かくしてアデノウイルスベクターを含有するプレートを取り扱う高スループット設定において、プレートを収穫するのに間に合わせ、アデノウイルスベクター生産につきスコアを取るの望ましい。アデノウイルスベクター創製における前記変動は、可能な限り長い間、すなわち、よりゆっくりとしたウェルも生産されたアデノウイルスベクターを持つようになるまでプレートの収穫を遅延させることによって克服することができる。この目的で、一旦、少数のウイルスから出発してそれが多数のウイルスまで生産されれば、本発明者らは組換え l a c Z アデノウイルス（p C L I P - l a c Z）の安定性をテストし、次いで、力価を測定し（実施例 11 参照）、加えて、3 週間後までウイルスの l a c Z 形質導入能力を測定した。4. 10^4 細胞／ウェルを用い、C 6 / E 2 A 細胞を 2 列の 96 - ウェルマイクロタイター組織培養プレートに接種した。プレートを 39 °C で一晩インキュベートした。翌日、血清型 5 の精製された L a c Z - アデノウイルスベクターで P E R . C 6 / E 2 A を感染させた。感染は、以下のスキームに従って異なる M O I で行った（合計 21 プレート）。

【0130】

【表 1】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<u>A</u>												
B	0.01	0.01	0.01	0.1	0.1	0.1	1	1	1	10	10	10
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ウェル中で生産されたアデノウイルスの安定性に対する温度の効果を測定するために、7 つのプレートを 32 °C、7 つのプレートを 34 °C、および 7 つのプレートを 39 °C でインキュベートした。感染後 2、3、6、9、13、16 および 21 日に、かくインキュベーション温度に対する 1 つのプレートを凍結させた。以下の実験において細胞溶解物を用いた。生産されたアデノウイルスの形質導入能力を測定するために、A 549 細胞を 1×10^4 細胞／ウェルにて 96 - ウェルマイクロタイター組織培養プレートに接種し、37 °C で一晩インキュベートした。次いで、細胞を 50 μ l 細胞溶解物で感染させ、37 °C でインキュベートした。2 日後、細胞を毒性につきスクリーニングし、続いて l a c Z 染色した。M O I を増加させ、感染時間を増加させると明瞭な毒性効果が観察された。以下の表は、全ての細胞がいつ全てのウェルで青色に染色されたかをまとめる。

【0131】

【表 2】

	moi	# 感染後の 日数
32°C	0.001	9
	0.01	9
	0.1	6
	1	6
34°C	0.001	6
	0.01	6
	0.1	6
	1	6
37°C	0.001	6
	0.01	6
	0.1	3
	1	3

10

20

感染から3週間後に、100%の青色細胞／ウェルが依然として観察され、かくして、全ての細胞はlacZを担うアデノウイルスベクターを持つ。かくして、これは3週間までのインキュベーションに際して低下した感染性を示さなかった。細胞溶解物におけるウイルスの感染性ウイルス粒子の数を測定するために、各インキュベート温度MOIに対応して感染から2、6および21日インキュベートした試料につき力価測定アッセイを行った。感染から3週間後、ML当たり 2×10^{10} p f uの平均力価が観察された。力価の全体像を図32に与える。

30

前記実験は、プレートの収穫を可能な限り長く支援する、すなわち、より遅いウェルも生産されたアデノウイルスベクターを有するまで遅延することによって、アデノウイルスベクター創製における変動が克服できることを示す。本発明者らは増加するMOIおよび増加する感染時間にて明瞭な毒性効果を観察したが、感染性の減少および生産されたアデノウイルスベクターの力価の減少はない。

【0132】

(実施例16)

アンチセンスDNA配列を担い、アンチセンスmRNA配列を発現するアデノウイルスベクターのミニチュア化された生産

アンチセンスcDNA発現ライブラリーを用いるスクリーンにおける内因性遺伝子発現を減少させることは、機能的ゲノミックスプログラムで非常に有用である。また、遺伝子有効化およびアンチセンス遺伝子治療剤の開発で個々のアンチセンスアデノウイルスベクターを用いることができる。その例はアンチセンスー血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の使用である。VEGFは、内皮細胞の増殖を促進し、新生血管形成および神経膠細胞腫の増殖で主たる役割を果たす腫瘍血管形成における非常に重要な分子である。VEGFーアンチセンス分子はイン・ビボで腫瘍増殖を阻害する(Seock-Ahら, 1999, Cancer Research 59, 895-900)。アデノウイルスベクターで大きくかつ複雑なアンチセンスライブラリーを構築することは、機能的ゲノミックススクリーニングプログラムで価値があり非常に有用である。

40

実施例10に記載されたごとくに、アンチセンス向きの規定されたヒトcDNA配列およ

50

び線状化 r I T R デルタ E 2 A ヘルパー DNA を含有する線状化アダプター DNA で P E R . C 6 / E 2 A 細胞を共トランスフェクトした。アダプター DNA 中のアンチセンス向きにクローン化された遺伝子を後記表に記載する。p C L I P では、トランスジーンインサートに応じて線状化するための部位としての S a l I または P a c I にて 2 つの変異体を用いた。

【 0 1 3 3 】

【表 3】

アンチセンス-cDNA	略語	アデノウイルスベクター
構成的酸化窒素 シンターゼ	CeNOS	pCLIP, pIPspAdapt
リソソームベーター-- グルコセレブロシダーゼ	hGC	pCLIP
フェノールUDP- グルクロノシルトランス フェラーゼ	P-UGT	pCLIP, pIPspAdapt
ビリルビン 1 UDP- グルクロノシルトランス フェラーゼ	B-UGT	pCLIP, pIPspAdapt
プラスミノーゲンアクチベーター 阻害剤タイプ-1	PAT-1	pCLIP
リボソーム蛋白質L4	NA	pCLIP
ホスホエノールピルビン酸 カルボキシキナーゼ	PEPCK	pCLIP
β -グロビン	NA	pCLIP
リゾチウム	NA	pCLIP
クロムIスペック. トランス クル. KIAA0493	KIAA	pCLIP
s nRNPコア蛋白質Sm D2	SnRNP	pCLIP

【 0 1 3 4 】

図 3 3 において、本発明のミニチュア化生産システムを用いるアンチセンス c D N A アデノウイルスベクターの創製のための前記 c D N A のいくつかの例を与える。これらのウイルスを用いてテストした細胞の内因性発現を低下させようと試みる。

【 0 1 3 5 】

(実施例 1 7)

組換えアデノウイルスの創製および生産のための、特に、アデノウイルス発現ライブラリーの創製および生産のためのアダプタープラスミドの構築

センスまたはアンチセンス c D N A 配列の効果的なクローニングおよびこれらのベクターにおける c D N A ライブラリーを含めた核酸のライブラリーの創製を可能とする、多重向きの多重クローニング部位を含有する（短いアダプター中の）アデノウイルスアダプタープラスミドを構築した。さらに、これらの新しいアダプタープラスミドは、左側アデノウイルス I T R と境界を接する新規制限酵素認識配列および A d 5 ウイルスゲノムのヌクレオチド 6 0 9 5 までヘルパー断片と重複する配列をこれらの新しいアダプタープラスミドは含有する。アデノウイルスアダプタープラスミドのこれらの修飾は、挿入されたトランスジーンまたはトランスジーンライブラリーの消化なくしてアダプタープラスミドを線状

10

20

30

40

50

化する可能性を有意に増強する。pWE/Ad. AflII-rITR. デルタE2Aでの共トランスフェクションに続き、改良されたアダプタープラスミドおよびアデノウイルスコスミドの間の相同組換えの結果、機能的アデノウイルスが創製される。

第1のアダプター構築体pCLIP-Ippoi (図34A)およびpCLIP-Ippoi-polynew (図34B)はpAd5/CLIP-Pacに由来し、左側ITRの全面に11bp位に新しいI-Ppoi線状化部を含有する。加えて、pCLIP-Ippoi-polynewは、異なるまれな切断制限エンドヌクレアーゼおよびイントロンコード化エンドヌクレアーゼのための制限酵素認識配列を含むCMVプロモーターの下流に改良されたポリリンカー配列を含有する。イントロンコード化エンドヌクレアーゼのための認識配列は、ヒトゲノムを含めたゲノムで極端にまれであり、11-23塩基対よりなる。これらのイントロンコード化エンドヌクレアーゼ部位はアデノウイルスゲノムに存在しないので、無インサートpCLIP-Ippoiから得られた全アデノウイルスベクターゲノムに配列を直接挿入することができる(後記も参照)。

このアダプタープラスミドを構築するために、以下のプライマー：PCLIP PAC IP

PO: 5'-TTT TTA ATT AAT AAC TAT GAC TCT CT
T AAG GTA GCC AAA TCA TCA TCA ATA ATA TA
C CTT ATT TTG G-3' および PCLIPBSRGI: 5'-GCG A

AA ATT GTC ACT TCC TGT G-3' および Life Technologies (LTI; Breda, オランダ国)からのElongaseポリ

メラーゼを用い、pCLIP-PacI鋳型プラスミドDNAでのPCRによって、Ad

5の左側ITRの一部を増幅した。プライマーpCLIP-PacIはI-Ppoi配列の5'側にPacI部位を含有する。増幅された断片をPacIおよびBsrGIで消化し、同一酵素で消化したpAd5/CLIP-PacIから得られた6471bpの断片に255bpの得られた断片をクローン化し、1%アガロースゲルで単離した。ジデオキシヌクレオチド配列分析によってヌクレオチド配列を確認した。各々、33ヌクレオチドおよび11ヌクレオチドの距離の左側ITRの5'側にPacIおよびI-Ppoi認識配列を含有するこの構築体をpCLIP-I-Ppoiと命名した(図34A)。この構築体を引き続いて、ゲルで分離したXbaIおよびHindIIIで消化し、これを用いて新しい合成リンカー配列を挿入した。2つの一本鎖のアニールしたオリゴヌクレオチド

: LINKER POLYNEW-S: 5'-AGC TTT AAC TAT AAC

GGT CCT AAG GTA GCG ATT AAT TAA CAG TTT
AAT TAA TGG CAA ACA GCT ATT ATG GGT ATT
ATG GGT T-3'; および LINKER POLYNEW-AS: 5'-CTA

GAA CCC ATA ATA CCC ATA ATA GCT GTT TGC
CAT TAA TTA AAC TGT TAA TTA ATC GCT ACC
TTA GGA CCG TTA TAG TTA A-3'よりなるこのリンカー配列を消化した構築体に直接連結した。pCLIP-I-Ppoi-polynewと名付けたこの構築体は、今や、ポリリンカー中に制限酵素HindIII、I-CeuI、PacI、PspIおよびXbaIのための認識配列を含有する(図34B)。このリンカーの正しい挿入は、各酵素での消化および配列分析によって証明した。

【0136】

pCLIP-ベースのアデノウイルスアダプターよりも強力なCMVプロモーターならびに異なるポリ(A)配列を含有する異なるアダプター構築体pADAPTを骨格として用いて、アダプタープラスミドのもう1つの組を構築した。線状化の可能性を増強するために、多数のpADAPT誘導体を設計し、構築した。この目的で、pADAPTプラスミドDNAをSalIで消化し、Shrimpアルカリ性ホスファターゼで処理して再連結を減少させた。以下の2つのリン酸化されアニールされたオリゴ：ExSalPacF

5'-TCG ATG GCA AAC AGC TAT TAT GGG TAT
TAT GGG TTC GAA TTA ATT AA-3'; および ExSalPacR

5'-TCG ATT AAT TAA TTC GAA CCC ATA AT

40

50

A CCC ATA ATA GCT GTT TGC CA-3'よりなるリンカーを消化された構築体に直接連結し、それにより、P*i*-Psp*I*、Swa*I*およびPac*I*によってSal*I*制限部位を置き換えた。さらに、以下のプライマー：PCLIPMSF：5'-CCC CAA TTG GTC GAC CAT CAT CAA TAA TAT ACC TTA TTT TGG-3'およびpCLIPBSRGI（前記参照）を用いるPCRによって、pADAPTの左側ITRの一部を増幅した。増幅した断片をMun*I*およびBsr*GI*で消化し、pCLIP-EcoR*I*にクローン化し、これを部分的にEcoR*I*で消化し、精製後にBsr*GI*で消化した。制限酵素分析後に、構築体をSca*I*およびSgrA*I*で消化し、800bp断片をゲルから単離し、Sca*I*/SgrA*I*消化pADAPT+ExSalPacリンカーに連結した。pIPspSalAdaptと命名された得られた構築体（図34C）をSal*I*で消化し、脱リン酸化し、前記したリン酸化ExSalPacF/ExSalPacR二本鎖リンカーに連結した。Pac*I*部位がITRに最も近いクローンを制限分析によって同定し、配列分析によって配列を確認した。pIPspAdaptと命名されたこの新規なpADAPT構築体（図34D参照）は、かくして、Pac*I*、P*i*-Psp*I*およびBstB*I*のための認識配列を含有する2つのExSalPacリンカーを保有し、これはアデノウイルスアダプター構築体のアデノウイルス部分を囲み、かつアデノウイルスヘルパー断片での共トランスフェクションに先だってプラスミドDNAを線状化するのに用いることができる。

【0137】

さらにトランスジーンクローニング過突然変異を増大させるために、pIPspAdaptに基づいて多数のポリリンカー変異体を構築した。この目的で、pIPspAdaptをまずEcoR*I*で消化し、脱リン酸化した。以下の2つのリン酸化されアリアルされたオリゴ：Ecolinker⁺：5'-AAT TCG GCG CGC CGT CGA CGA TAT CGA TAG CGG CCG C 3'およびEcolinker⁻：5'-AAT TGC GGC CGC TAT CGA TAT CGT CGA CGG CGC GCC G 3'よりなるリンカーをこの構築体に連結し、それにより、Asc*I*、Sal*I*、EcoR*IV*、Cla*I*およびNot*I*のための制限部位を生じさせた。両方の向きの、このリンカーが得られ、制限分析および配列分析によって配列を確認した。順番5' Hind*III*、Kpn*I*、Age*I*、EcoR*I*、Asc*I*、Sal*I*、EcoR*IV*、Cla*I*、Not*I*、Nhe*I*、Hpa*I*、BamH*I*およびXba*I*でポリリンカーを含有するプラスミドをpIPspAdapt1と命名し（図34E参照）、他方、順番Hind*III*、Kpn*I*、Age*I*、Not*I*、Cla*I*、EcoR*IV*、Sal*I*、Asc*I*、EcoR*I*、Nhe*I*、Hpa*I*、BamH*I*およびXba*I*でポリリンカーを含有するプラスミドをpIPspAdapt2と命名し（図34F参照）。cDNAライブラリーを作成する分野の同業者であれば、オリゴGalMlu-F：5'-CGA TCG GAC CGA CGC GTT CGC GAC C-3'およびGalMlu-R：5'-GGC CGC TCG CGA ACG CGT CGG TCC GAT-3'よりなる過剰ポリリンカーがpIPspAdapt1のCla*I*およびNot*I*部位の間に挿入してpIPspAdapt6を生じることを認識するであろう（図34G参照）。pIPspAdapt6はRsr*II*、Mlu*I*およびNru*I*のための過剰制限部位を含有し、これを導入してSal*I*およびNot*I*部位の間の距離を増大させ、これはこれらの酵素の組合せの消化を改良するであろう。さらに、それらは、Sal*I*およびNot*I*での制限に先だってこのベクターのプレー消化および脱リン酸化を可能とし、これは個々のインサートまたはSal*I*-およびNot*I*-適合同突出を持つライブラリーの場合にバックグラウンド組換えを減少させるであろう。また、GalMluオリゴをpIPspAdapt2にクローン化し、pIPspAdapt7に至る（図34H参照）。

他のセンスまたはアンチセンス構築体のクローニングを容易とするために、以下の2つのオリゴヌクレオチドよりなるリンカーを設計してpIPspAdaptのポリリンカーを逆にした：HindXba⁺ 5'-AGC TCT AGA GGA TCC GTT

10

20

30

40

50

AAC GCT AGC GAA TTC ACC GGT ACC AAG CTT
 A-3': HindXba⁺ 5'-CTA GTA AGC TTG GTA CC
 G GTG AAT TCG CTA GCG TTA ACG GAT CCT CT
 A G-3'。このリンカーをHindIII/XbaI消化のpIPspAdaptに
 連結し、正しい構築体を単離した。制限酵素分析および配列決定によって確認を成した。
 この新しい構築体pIPspAdaptA(図34I参照)をEcoRIで消化し、前記
 EcoLinkerをこの構築体に連結した。両方の向きの、このリンカーが得られ、そ
 の結果、pIPspAdapt3が得られ(図34J参照)、これは順番XbaI、BamHI、HpaI、NheI、EcoRI、AscI、SalI、EcoRV、ClaI
 、NotI、AgeI、KpnIおよびHindIIIでポリリンカーを含有する。pI
 PspAdapt4は順番XbaI、BamHI、HpaI、NheI、NotI、Cl
 aI、EcoRV、SalI、AscI、EcoRI、AgeI、KpnIおよびHin
 dIIIでポリリンカーを含有する(図34K参照)。全ての配列は制限酵素分析および
 配列決定によって確認した。

【0138】

前記したごとく、イントロンコード化エンドヌクレアーゼはまれな切断酵素であり、ア
 デノウイルスゲノムを消化しない。当業者であれば、これらの酵素はアデノウイルスゲノ
 ムにおける配列の直接的連結を可能とすることを認識するであろう。というのは、それら
 はアデノウイルスゲノムに認識配列を有しないからである。ポリリンカー中のイントロン
 コード化エンドヌクレアーゼのための認識配列を含有するpADAPTバージョンを得
 るために、一本鎖配列: 5'-AGC TTA ACT ATA ACG GTC CT
 A AGG TAG CGA TAG GGA TAA CAG GGT AAT TA
 A TTA ATT TAA ATT AAT TAA TCT ATG TCG GG
 T GCG GAG AAA GAG GTA ACT ATG ACT CTC TT
 A AGG TAG CCA AAT-3'; および5'-CTA GAT TTG G
 CT ACC TTA AGA GAG TCA TAG TTA CCT CTT T
 CT CCG CAC CCG ACA TAG ATT AAT TAA TTT A
 AA TTA ATT AAT TAC CCT GTT ATC CCT ATC G
 CT ACC TTA GGA CCG TTA TAG TTA-3'よりなる、Hin
 dIII/XbaIで消化したpIPspAdaptにリンカーを連結した。このリン
 カーは4つのオリゴ: IntrolinkerF1、IntrolinkerF2、Int
 rolinkerR1およびIntrolinkerR2よりなり、イントロンコード化エン
 ドヌクレアーゼI-CeuI、I-SceI、PI-SceIおよびI-PpoIおよび
 エンドヌクレアーゼPacIおよびSwaIのための認識配列を含有する。構築体の正し
 さは配列分析によって確認し、構築体はpIPspAdapt5と詠んだ(図34L参照
)。

pIPspAdapt5またはpCLIP-IppoI-polynewを含有するウイ
 ルスからのアデノウイルスDNAを単離し、コスミドベクターpWE15/SnaB1に
 クローン化した。リン酸化オリゴヌクレオチドPacSna: 5'-TAA TAC G
 TA TTA AT-3'を自己アニーリングし、PacI-消化し、脱リン酸化したp
 WE15/PAC、pWE15の誘導体 における得られた二本鎖配列を連結することによ
 って、pWE15/SnaB1を創製した(Sambrook, Jら編 (1989
) Molecular Cloning: A Laboratory manual
 , 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Pre
 ss参照)。これはSnaB1についての制限部位を生じ、これはPacI部位によっ
 て近接挟まれている。アデノウイルスDNA-含有コスミドの創製については、平滑末端
 化したアデノウイルスDNAをDNase、プロテイナーゼKを用いる標準実験室的手法
 に従って単離し、続いてアニオン交換樹脂回転カラムで溶出した。モル過剰の得られた精
 製アデノウイルスDNAをSnaB1-制限pWE15/SmaB1に連結し、得られた
 連結混合物をE. coli Stb12細胞 (LTI, Breda)にトランスフ

10

20

30

40

50

エクトした。

得られたプラスミドDNAをイン・ビトロ連結で引き続いて用いた（図34M参照）。pIPspAdapt5-由来コスミドDNAの使用は以下における例として使用されるであろう：適合する突出を含有する二本鎖オリゴヌクレオチドをI-CeuIおよびPI-SceI部位の間、I-CeuIおよびI-PpoIの間、I-SceIおよびPI-SceIの間、およびISceIおよびI-PpoIの間で連結した。引き続いて、PacI制限エンドヌクレアーゼを用いて連結後に構築体を線状化し、それにより、左側および右側ITRを遊離させるのみならず、非組換え体を排除した。この場合、PER.C6/PER.C6/E2Aパッキング細胞またはその変異体におけるトランスフェクションで連結混合物を直接的に用い、それにより、機能的アデノウイルスを生じさせるための交差または相同組換え事象の必要性を排除することができる。

10

【0139】

代替法として、pIPspAdapt5またはpCLIP-IppoI-polynewから作成したアデノウイルスDNAを含有するアダプタープラスミドおよびコスミドを用いて、左側ITRおよびポリリンカーの第1の部分の間の領域を含むか、あるいはポリリンカーの第2の部分の右側ITRまで含む断片を生じさせた。左側および右側ITRは区別される非適合制限酵素で線状化されることに注意されたい。というのは連結効率はさまなければひどく低下するからである。pIPspAdapt5-由来コスミドDNAは例として用いられる：プラスミドpIPspAdapt5をBstBI-CeuIまたはBstBIおよびI-SceIいずれかで切断して左側ITRを含有するアデノウイルス断片を生じさせた。pIPspAdapt5-由来アデノウイルスDNAを含有するコスミドをI-PpoIおよびPacIまたはPI-SceIおよびPacIで制限して、右側ITRを含有する断片を生じさせた。左側および右側ITRを含有する断片を0.8%アガロースゲルで単離し、アニオン交換樹脂で精製した。引き続いて、5'末端におけるI-CeuIまたはI-SceIまたは3'末端におけるI-PpoIまたはPI-SceIいずれかのための適合突出を含有する二本鎖オリゴヌクレオチドを、左側および右側ITRを含有する断片と等モル量にて連結した。得られた連結混合物を、PER.C6/PER.C6/E2Aパッキング細胞またはその変異体へのトランスフェクションのために用い、再度、機能的アデノウイルスを生じさせるための交差または相同組換え事象の必要性を排除した。

20

30

【0140】

イン・ビトロで連結産物の直接的トランスフェクションは、アデノウイルスベクターDNAを単離する別の方法から利益を受ける。イン・ビトロ連結反応のトランスフェクション後にウイルス生産の効率を改良するために、アデノウイルスベクターDNAを精製アデノウイルス粒子から単離することができる（Pronk, R. ら, Chromosoma 102: S39-S45 (1992)）。このビリオンDNAはITR配列に共有結合した末端蛋白質（TP）の2分子を含有する。TP-DNAは無蛋白質DNAと比較して20倍を超えてアデノウイルスDNA複製を刺激する。従って、pIPspAdapt5-またはpCLIP-IppoI-polynew-由来アデノウイルスDNAは、記載されているごとくグアニジニウム塩酸塩を用いてビリオンから単離することができる（Van Bergen, B. ら Nucleic Acids Res. 11: 1975-1989 (1983)）。このDNAをイントロン高度化制限エンドヌクレアーゼの適当な組合せで消化し、イン・ビトロ連結反応で用いた。連結後、PacIでの消化によって非組換え体を除去した。さらなる手法は前記され、実施例10におけるものであり、およびそれを超えるものである。例としてpIPspAdapt2についての図34Nに示されたごとく、pIPspAdaptアダプタープラスミドを、PER.C6/E2Aパッキング細胞においてpWE/Ad.AfII IIRBE2Aで共トランスフェクトして、組換えアデノウイルスを生じさせた。

40

【0141】

（実施例18）

50

ミニチュア化アデノウイルスベクター生産系におけるより大きなDNAインサートのクローニングのためのE3領域に欠失を持つE1-欠失またはE1+E2A-欠失組換えアデノウイルス

培養細胞ではアデノウイルスの複製、パッキングおよび感染にE3-コード化蛋白質のいずれも要しないことは知られている。これは、組換えアデノウイルスからのE3領域の可能な除去を成し、最大パッキング能力を超えることなくより大きな遺伝子または複雑な調節エレメントを挿入する機会を生じる。例えば、E3領域の一部は、(Ad5 wt 配列 28592-30470に対応する) XbaI-XbaI断片を欠失することによって除去することができる。もう1つの例は、pVIIの停止コドンおよび(Ad5 wt 配列 27865-30995に対応する) 繊維の翻訳開始コドンの間の配列が除去されたE3領域の拡大された欠失である。

pWE/Ad. AflII-rITRΔE2Aの創製：

pWE/Ad. AflII-rITR (ECACC 寄託 P97082116) からのE2Aコーディング配列の欠失は以下のごとく達成された。左側および右側部位におけるE2Aコーディング領域を近接挟むアデノウイルス配列を、製造業者のプロトコルに従い、Expand PCRシステム (Boehringer) でのPCR反応でプラスミド pBr/Ad. Sal. rITR (ECACC 寄託 P97082119) から増幅した。

以下のプライマーを用いた：

【0142】

右側フランキング配列 (対応するAd5ヌクレオチド24033ないし25180)：

ΔE2A. SnaBI： 5'-GGC GTA CGT AGC CCT GTC GAA AG-3'

ΔE2A. DBP-スタート： 5'-CCA ATG CAT TCG AAG TAC TTC CTT CTC CTA TAG GC-3'

増幅されたDNA断片をSnaBIおよびNsiIで消化した (NsiI部位を下線を施した、プライマーΔE2A. DBP-スタート中に生じさせた)。

【0143】

左側フランキング配列 (対応するAd5ヌクレオチド21557ないし22442)：

ΔE2A. DBP-停止： 5'-CCA ATG CAT ACG GCG CAG ACG G-3'

ΔE2A. BamHI： 5'-GAG GTG GAT CCC ATG GAC GAG-3'

増幅されたDNAをBamHIおよびNsiIで消化した (NsiI部位を下線を施した、プライマーΔE2A. DBP-停止中に生じさせた)。引き続いて、消化されたDNA断片をSnaBI/BamHI消化のpBr/ad. Sal rITRに連結した。配列決定により、プラスミド pBr/Ad. Sal-rITRΔE2AにおけるユニークなNsiI部位でのDBPコーディング領域の正確な置換が確認された。ユニークなNsiI部位を用いて、組換えベクターによって導入されるべき遺伝子のための発現カセットを導入することができる。

E2Aコーディング配列の欠失は、頂部ストランドにおける100Kコーディング24048位のL4-遺伝子のスプライスアクセプター部位が無傷のままで行った。加えて、E2Aコーディング配列の左側部位における元のE2A-RNAおよびL3-RNAのポリアデニル化シグナルは無傷のままであった。これは、アデノウイルスのライフサイクルの間におけるL3-遺伝子および100K L4-蛋白質をコードする遺伝子の適切な発現を保証する。

次に、プラスミド pWE/Ad. AflII-rITRΔE2Aを生じさせた。プラスミド pBr/Ad. Sal-rITRΔE2AをBamHIおよびSpeIで消化した。E2Aコーディング領域がユニークなNsiI部位によって置き換えられた3.9-kb断片を単離した。pWE/Ad. AflII-rITRをBamHIおよびSpeIで消化した。それからE2Aコーディング配列を含有するBamHI/SpeI断片が除去され

10

20

30

40

50

た35 kb DNA断片を単離した。断片を連結し、製造業者のプロトコル (Stratagene) に従ってλファージパッキング抽出物を用いてパッキングし、プラスミドpWE/Ad. AflIII-rITRΔE2Aを得た。このコスミドクローンを用いて、アデノウイルスベクターを生じさせ、消化されたアダプタープラスミドと共にPacI消化DNAを、機能的E2A遺伝子産物を発現するパッキング細胞に共トランスフェクションすることによってE2Aにつき欠失することができる。E2A補充細胞系の例は後でおよび次に記載する：

【0144】

pBr/Ad. Bam-rITRspおよびpWE/Ad. AflIII-rITRspの創製

10

ベクターpWE/Ad. AflIII-rITRにおける3' ITRは末端G-ヌクレオチドを含まない。さらに、PacI部位は右側ITRからほとんど30bpのところに位置する。これらの特徴は共に、3' ITRにおける複製の効果的でない開始のためウイルス創製の効率を減少させ得る。ウイルスの創製の際に、アダプタープラスミドにおける左側ITRは無傷であり、相同組換え後にウイルスDNAの複製を可能とすることに注意されたし。

3' ITRにおける複製の開始の効率を改良するために、pWE/Ad. AflIII-rITRを以下のごとく修飾した：構築体pBr/Ad. Bam-rITRpac#2をまずPacIでまず消化し、次いで、AvrIIで部分的に消化し、断片を含有する17.8 kbベクターを単離し、SAP酵素 (Boehringer Mannheim) を用いて脱リン酸化した。この断片はヌクレオチド35464ないし該3' ITRからアデノウイルスを欠く。鋳型としてのpWE/Ad. AflIII-rITRおよびプライマーITR-EPH：

20

5' -CGG AAT TCT TAA TTA AGT TAA CAT CAT CAA TAA TAT ACC-3' および

Ad101： 5' -TGA TTC ACA TCG GTC AGT GC-3' を用い、630bp PCR断片を3' Ad. 5配列に対応させて生じさせた。この断片を引き続いてベクターpCR2.1 (Invitrogen) にクローン化し、PCR断片を含有するクローンを単離し、配列決定して該DNAの正しい増幅をチェックした。次いで、PCRクローンをPacIおよびAvrIIで消化し、0.5 kbアデノインサートを、PacI/部分的AvrII消化のpBr/Ad. Bam-rITRpac#2断片に連結し、pBr/Ad. Bam-rITRspを生じさせた。次に、この構築体を用いて、アデノ配列3534ないし35938に対応するインサートを有するコスミドクローンを生じさせた。このクローンをpWE/AflIII-rITRspと命名した。

30

pBr/Ad. Bam-rITRspΔXbaおよびpWE/Ad. AflIII-rITRspΔXbaの創製

プラスミドpBr/Ad. Bam-rITRspをE. coli株DM1 (dam⁻, dcm⁻) (Life Technologies) において増殖させた。プラスミドをXbaIで消化し、1.88-kb XbaI-XbaI断片を除去し、再度連結した。得られたクローンpBr/Ad. Bam-rITRspΔXbaを用いて記載されているごとくにヘルパーコスミドpWE/Ad. AflIII-rITRspΔXbaを構築した。略言すると、以下の断片をアガロースゲル (QIAGEN) からの抽出によって単離し：pWE.pacをPacIで消化し、pBr/AflIII-BamをPacIおよびBamHIで消化し、およびpBr/Ad. Bam-rITRΔXbaをBamHIおよびPacIで消化した。これらの断片をいっしょに連結し、製造業者の指示 (Stratagene) に従ってラムダファージパッキングを用いてパッキングした。宿主細菌で組み立てたファージ感染後、得られたコロニーを無傷インサートの存在につき分析した。pWE/Ad. AflIII-rITRspΔXbaはpWE/Ad. AflIII-rITRspのそれと同一な配列を含有するが、XbaI-XbaI断片は欠失している。

40

【0145】

50

pBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔE2AΔXbaおよびpWE/Ad. Afl I I-r ITR sp ΔE2AΔXbaの創製

E2AおよびE3の二重欠失を持つE1-欠失組換え体アデノウイルスの創製のために、プラスミドpBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔE2AΔXbaを構築した。E2A欠失を含有するSpeI-BamHI断片をプラスミドpBr/Ad. Sal-r ITR ΔE2Aから単離し、SpeI-BamHI-消化のpBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔXbaに挿入し、プラスミドpBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔE2AΔXbaを得た。このプラスミドを用い、前記したごとく3断片連結を用いてヘルパーpWE/Ad. Afl I I-r ITR sp ΔE2AΔXbaを構築した。pWE/Ad. Afl I I-r ITR sp ΔE2AΔXbaはpWE/Ad. Afl I I-r ITR spのそれと同一な配列を含有するが、E2A領域およびXbaI-XbaI断片の二重欠失を有する。

10

【0146】

pBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔE3およびpWE/Ad. Afl I I-r ITR sp ΔE3のおよびpBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔE2AΔE3およびpWE/Afl I I-r ITR sp ΔE2AΔE3の創製

なおよびより大きなDNA断片の挿入を行うために、完全なE3コーディング領域が除去されたE3領域の拡大された欠失を構築した。プライマー1 (5'-AAA CCG AAT TCT CTT GGA ACA GGC GGC-3') (配列番号: 1) および2 (5'-GCT CTA GAC TTA ACT ATC AGT CGT AGC CGT CCG CCG-3') (配列番号: 2) を用いて、wt Ad5ゲノムにおける配列27326ないし27857に対応する、pBr/Ad. Bam-r ITR spからの配列を増幅した。プライマー3 (5'-GCT CTA GAC CTC CTG TTC CTG TCC ATC CGC-3') (配列番号: 3) および4 (5'-TGA TGT TGT TCT GGA GCG GGA GGG TGC-3') (配列番号: 4) を用いて、wt/Ad5ゲノムにおける配列30994ないし35502に対応する、同一DNA鋳型からの配列を増幅した。増幅産物を、各々、EcoRI/XbaIおよびXbaI/AvrIIで消化し、一緒に連結した。EcoRIおよびAvrIIで消化されたpBr/Ad. Bam-r ITR spおよびpBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔE2Aのベクターに得られたEcoI-AvrII断片をクローン化し、各々、pBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔE3およびpBr/Ad. Bam-r ITR sp ΔE2AΔE3を得た。これらの2つのプラスミドを用いて前記したごとくにコスミドヘルパー分子を構築した。pWE/Ad. Afl I I-r ITR sp ΔE3はpWE/Ad. Afl I I-r ITR spのそれと同一の配列を含有するが、wt Ad5ゲノムにおける配列27857-30994に対応するE3領域の欠失を用い、他方、pWE/Ad. Afl I I-r ITR sp ΔE2AΔdE3はpWE/Ad. Afl I I-r ITR sp ΔE3と同一であるが、E2A領域のさらなる欠失を持つ。

20

30

前記したコスミドは、アデノウイルス発現ライブラリ、特に、大きなインサートのコレクションを担うライブラリの生産で特に有用である。また、実施例19および20参照。

【0147】

(実施例19)

40

治療およびマーカートランスジーンを担うE1、E2AおよびE3欠失組換え体アデノウイルスベクターのミニチュア化されたマルチウエル生産

実施例10に記載したごとく、E1、E2AおよびE3の組合せ欠失は、サイズがほぼ10.5 kbまでの外来性DNA配列のクローニングを可能とする。ここに、本発明者らは、PER. C6/E2A細胞におけるcDNAならびにマーカー遺伝子を担うE1、E2AおよびE3欠失ベクターの生産を示す。

細胞培養条件は実施例10に記載した。DNAトランスフェクションについては、実施例14に従ってアダプターおよびヘルパー分子を調製した。4つの異なるPacI-線状化ヘルパーコスミド、すなわち、pWE/Ad. Afl I I-r ITR sp、pWE/Ad. Afl I I-r ITR sp. dE2A、pWE/Ad. Afl I I-r ITR sp. d

50

Xba、およびpWE/Ad. AflII-rITRでの組合せにおけるトランスフェクションのために、線状化アダプタープラスミドpAD/CLIP-ceNOSおよびpAD/CLIP-lacZを用いた。DNAトランスフェクション手法は実施例10に記載したものと同一であった。凍結-解凍溶解物の100 μ lのアリコットを用いて、第2の96-ウェルプレートにPER. C6/E2A細胞で感染させ、CPE形成をモニターした。図35は、凍結/解凍したトランスフェクト細胞の増殖後におけるPER. C6/E2A細胞の96-ウェルプレートにおけるウイルス生産ウェル（CPE陽性）のパーセントを示す。明らかに、PER. C6/E2A細胞において治療およびマーカートランスジーンを担うE1およびE3欠失組換え体アデノウイルスベクターを生産することが可能である。

10

【0148】

（実施例20）

表現型の選択のためのセンスまたはアンチセンスの整列されたアデノウイルス発現ライブラリの構築

アデノウイルスベクター生産のミニチュア化はクローン化したまたはプールした遺伝子発現ライブラリの大規模、高スループット構築を可能とする。PER. C6（および誘導体）に基づいてアデノウイルスベクター様式でクローン化し整列させたcDNA発現ライブラリを構築するために、オリゴ（dT）セルロースを用い、ヒト胎盤のポリ（A+）mRNAを単離し、Life Technologies Inc.（LTI；Breda, オランダ国）ごとき販売業者によって供給された材料および試薬を用いてcDNAに変換した。得られた二本鎖cDNA分子は5'末端にSalI-適合突出および3'末端にNotI-適合突出を含有する。全cDNAを（cDNAインサートのセンス向きのための、pIPspAdapt6または（cDNAインサートのアンチセンス向きのための）pIPspAdapt7に連結した（アダプター立体配置については実施例17参照）。このために、pIPspAdapt6およびpIPspAdapt7を制限エンドヌクレアーゼMluIで消化し、続いて熱感受性アルカリ性ホスファターゼ（LTI）を用いて5'突出を脱リン酸化した。SalIおよびNotIでの消化後、0.8%アガロースゲルで線状化プラスミドを単離し、アニオン交換クロマトグラフィーによって精製した。プラスミドへのcDNA分子の連結に続き、BTX600電気細胞操作機または同等物でのエレクトロポレーションによってE. coli DH5aエレクトロコンピテント細菌に得られたライブラリを導入した。非増幅ライブラリを分割し、グリセロールストックとして凍結した。

20

30

平板培養の日に、バイアルを解凍し、1.5%寒天および1ml当たり50マイクログラムのアンピシリンを含むLB培地を含有する大きなペトリ皿に平板培養した。平板培養したコロニーの均一な分布を得るために、平板培養しつつガラスビーズを用いた。37°Cで一晩の増殖後、寒天-プレートを自動コロニーピッキングロボットに移した（Flexys；Genome Solution）。個々のコロニーを拾い、ロボットによって300 μ lのTerrific Broth培地および1ml当たり50マイクログラムのアンピシリンを含むマイクロタイタープレートに移した。このようにして接種したプレートを、次いで、酸素を通気するHiGroインキュベーター（Genemachine）に移し、製造業者のマニュアルに従って12-16時間増殖させた。しかる後、個々のプラスミドをSambrookら（Sambrook, J.ら編（1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press）に記載されたごとく通常のアルカリ性溶解プラスミドDNA単離方法によって個々のプラスミドを単離した。このために、プレートをまず遠心機（例えば、Eppendorf 5810RまたはHeraeus Megafuge 2.0）に移し、細菌を1500 $\times$ gで20分間ペレット化した。液体ロボットハンドラーを用い、個々のプレートの個々のウェル中の上清を取り出し、捨てた。細菌ペレットを、50mMグルコースおよび10mM EDTAを含有する100 μ lの25mMトリス、pH8.0に懸濁させ、100 μ lの

40

50

0.2 N NaOH / 1 % SDS を添加することによって細菌を溶解させる。100 μ l の 5 M 酢酸カリウムを添加することによる中和に続き、真空マニフォールドを用い、Multiscreen-NA 溶解物清浄プレート (Millipore B. V., Etten-Leur) またはその同等物での濾過によって清浄溶解物を得る。引き続いて、200 μ l の 2-イソプロパノールを添加し、4 $^{\circ}$ C にて 30 分間 1500 $\times$ g で遠心することによって、清浄溶解物中のプラスミド DNA を沈殿させる。70 % エタノールで沈殿を一回洗浄し、風乾後、20 μ l の TE に取る。

各ウェルからのプラスミド DNA のアリコットを適当な希釈の新鮮なプレートに移すことによって、Molecular Probes (Eugene, オレゴン州、米国) によって記載されているごとく Picogreen DNA 定量キットを用いて、各個々のウェル中の単離されたプラスミド DNA を定量する。一方、PER. C6 細胞、または PER. C6 / E2A のごとき誘導体を、ミニチュア化アデノウイルス創製のための他の例下で記載されたごとく接種する。各ウェルでは、55 ナノグラムの精製されたプラスミド DNA を新しいプレートに移し、65 $^{\circ}$ C で 60 分間 PipSpI で線状化した。次いで、このプラスミドを適当なヘルパー DNA 分子 (例えば、(pWE / Ad. Afl IIR ITR, デルタ E2A のごとき) E2A 欠失または E2A / E3 欠失または E2A / E3 / E4 欠失、例えば、実施例 18 参照) で PER. C6 または PER. C6 / E2A パッキング細胞に共トランスフェクトする。トランスフェクションは、マイクロタイタープレートにおけるアデノウイルス創製のための実施例 9、10 または 25 に記載された実験および方法と同様である。個々のウェルにおけるウイルス形成は、CPE 形成、プロットベースのウイルスアッセイまたはレポーターシステムを用いて定量する。次いで、整列されたアデノウイルスライブラリーは細胞ベースのスクリーニングで用いる準備ができており、ここに、特定の表現型につき選択することができる。

図 36 において、前記したごとくに構築し整列されたアデノウイルス cDNA 発現ライブラリーのスキームにつき概観を与える。このスキームは、高スループット様式での個々にクローン化されたアデノウイルスベクターライブラリーのライブラリーの構築を記載する。プールされたライブラリーに対するこの戦略の改良は、増殖利点を持つウイルスについての偏りが起こり得ないことである。これは、ライブラリーの個々のメンバーがライブラリーの平板培養後の個々のコロニー戦略の様式であり、全てのさらなる手法の間に個々に維持されるからである。

アデノウイルス発現ライブラリーは、この目的で設計した適当な未修飾細胞タイプまたはレポーター細胞系いずれにおけるキャピラリー形成、細胞増殖、細胞移動またはマーカー遺伝子発現のごとき特定の表現型の選択に適当な異なる細胞の感染である。これらの表現型の検出は、例えば、形態変化またはレポーター蛋白質の細胞内局所化の変化の自動イメージ分析を用いてなすことができる。一旦これが選択されると、クローン化細菌 DNA バージョンは、E. coli で生産された pIPSpAdapt6 または pIPSpAdapt7 アダプタープラスミドの形態で配列分析に直ちに利用できる。これは、プールされたレトロウイルスまたはプラスミドベースの発現ライブラリーの場合のように救済が必要ではないことを意味する。

所望であれば、(例えば、液体ハンドラーロボットを用いまたは手動により)、一列または一行あるいは 1 つのプレートまたは複数プレートに個々のアデノウイルスベクターを含有する個々のウェルをアッセイを行う前にプールすることができる。これは、もし所望のアッセイが高スループット分析に使用できず、合計数のウェルが初代スクリーニングで減少させる必要がある場合に当てはまる。プールされたが外来クローン化されたアデノウイルスベクターのさらなる改良または利点は、マルチ遺伝子依存性表現型が選択できることである。

【0149】

(実施例 21)

384 ウェル組織培養プレートのウェルにおけるウイルス生産

特に、この実験は、以下の些細な変化を除き、実施例 10 に記載されたごとくに行われた

10

20

30

40

50

。トランスフェクションの前日に、PER. C6/E2A細胞を培養培地（10%胎児ウシ血清および10 mM MgCl₂を含むDMEM）で25 μ l当たり11.250細胞の懸濁液に希釈し、続いて、16チャンネルマルチチャンネルピペット（Finn）を用い384-ウェル組織培養プレートのウェル当たり25 μ l接種した。1.3 mlの無血清DMEMをDNA/リポフェクチン混合物に添加した後、ウェル当たり15 μ lのこの混合物を、次いで、トランスフェクションに先だって25 μ lのDMEMで洗浄したPER. C6/E2A接種ウェルに添加した。湿潤インキュベーター（39℃、10%CO₂）における3時間後、50 μ l培養培地を各ウェルに添加し、プレートを湿潤インキュベーター（39℃、10%CO₂）に移した。翌日、各ウェルの培地を50 μ lの培養培地で置き換えた。次いで、プレートを湿潤インキュベーター（32℃、10%CO₂）にさらに4日間戻し、しかる後、ウェルを-20℃の一晩の凍結に付し、続いて、解凍し、反復ピペッティングによって再懸濁した。凍結/解凍トランスフェクト細胞の25 μ lのアリコトを、384-ウェル組織培養プレート（プレート2）上に前記したごとく接種した新鮮PER. C6/E2A細胞を含むプレートの各ウェルに移した。第1のトランスフェクトしたプレート凍結/解凍細胞溶解物と共にインキュベートし、かくしてそれで感染させたPER. C6/E2A細胞を含む第2の384-ウェルプレートをCPE形成につきチェックし、-20℃で貯蔵した。前記実験は2回行った。図37において、新しいPER. C6/E2A細胞に対する凍結/解凍トランスフェクト細胞の増殖後にスコア取りしたパーセントCPE陽性ウェルを示す。

【0150】

（実施例22）

ウイルス形成のスピードおよび生産効率に対する、増殖の省略または増殖の代わりにの培養培地の更新の効果

全手法の単純化のための自動コールにより適用できるミニチュア化アデノウイルスベクター生産のプロセスを作成する。1つの労力がかかり時間を浪費する工程は、新鮮な細胞でのトランスフェクトPER. C6/E2A細胞からの細胞溶解物の増殖であり、従って、この工程の省略が望ましい。以下の実験がこの目標に到達する。凍結/解凍トランスフェクトPER. C6/E2A細胞（例えば、実施例10その他参照）を用いて新しいPER. C6/E2A細胞（増殖）感染させるかまたは全く増殖を省略する代わりにのトランスフェクト細胞の培地の変更の効果を測定するために、以下の実験を行った。トランスフェクションの前日に、PER. C6/E2A細胞を、トリプシン-EDTAを用いて収穫し、計数した。次いで、細胞を培養培地（10%胎児ウシ血清および10 mM MgCl₂を含むDMEM）で100 μ l当たり22.500細胞の懸濁液に希釈し、続いて、96-ウェル組織培養プレートのウェル当たり100 μ l接種した。翌日、100 μ lの無血清ダルベッコウの修飾イーグル培地（DMEM）の容量中の2.6 μ gの線状化アダプター分子および2.6 μ gのPacI線状化pWE-Ad. Affli-IRITRdE2AプラスミドDNAを、リポフェクタミンミックスをDNAミックスに添加することによって、74.4 μ l無血清DMEM中に希釈した26.5 μ lリポフェクタミンを混合した。DNA/リポフェクタミン混合物を室温で30分間放置し、しかる後1.3 mlの無血清DMEMを添加した。次いで、トランスフェクションに先だって200 μ lのDMEMで洗浄したPER. C6/E2A接種ウェルに後者の混合物を添加された（ウェル当たり30 μ l）。トランスフェクションの全ては二連で行った。湿潤CO₂インキュベーター（39℃、10%CO₂）中の3時間後、200 μ l培養培地を各ウェルに添加し、プレートを湿潤CO₂インキュベーター（39℃、10%CO₂）に戻した。翌日、各ウェルの培地を200 μ l培養培地で置き換えた。次いで、プレートを湿潤CO₂インキュベーター（32℃、10%CO₂）に戻した。数日後、トランスフェクトした2つのプレートのうち1つの培地を200 μ l培養培地で置き換え、湿潤CO₂インキュベーター（32℃、10%CO₂）に戻し、しかる後CPEの形成を追跡した。図38Aにおいて、増殖および増幅新鮮PER. C6/E2A細胞の代わりにトランスフェクト細胞の培地を変更した後にスコア取りしたウイルス生産細胞（CPE陽性ウェル）のパーセンテージを示

す。

第2のプレートのウェルを -20°C で一晩の凍結に付し、続いて解凍し、および反復ピペティングにより再懸濁した。 $100\mu\text{l}$ の凍結／解凍トランスフェクト細胞のアリコットを、感染の1日前に96-ウェル組織培養プレート中に接種した、新しいPER. C6/E2A細胞($100\mu\text{l}$ 中のウェル当たり 2.25×10^4 細胞)を含むプレートの各ウェルに移した。これを、十分なCPEの存在が観察されるまで湿潤 CO_2 インキュベーター(32°C 、 $10\%\text{CO}_2$)中でインキュベートした。図38Bにおいて、新鮮なPER. C6/E2A細胞での増殖後にスコア取りしたウイルス生産細胞(CPE陽性ウェル)のパーセンテージを示す。全ての実験において、非トランスフェクトウェルを交差汚染の対照のために含めた。全ての3つのウェルはCPE形成につき陰性のままであった。図38Cにおいて、実施例10に記載したとき平行正常手法の結果を与える。これらの結果は、培地の置き換えまたはトランスフェクション後のいずれかの操作の完全な省略が、初代トランスフェクタントプレートからの溶解物での新鮮なPER. C6/E2A細胞の再感染を置き換えることができることを示す。

【0151】

(実施例23)

ウイルス形成のスピードおよび生産効率に対するPER. C6/E2A細胞の細胞増殖の影響の測定

アデノウイルス遺伝子発現ライブラリーの構築のため、アデノウイルスベクターのミニチュア化生産の条件は最適である必要がある。この目的で、ウイルス創製に影響し得る多数のパラメーターを変化させ、アデノウイルスベクター生産におけるその効果を測定した。いかにしてマイクロタイタープレートにおける接種に先だっての補充細胞系PER. C6/E2Aの細胞密集がウイルス生産のスピードおよび効率に影響するかを測定するために、以下の実験を行った。第1日にトリプシン-EDTAを用いてPER. C6/E2A細胞を収穫し、計数し、続いて3つの異なる 175cm^2 -組織培養フラスコにおいて収穫された細胞の $1/10$ 、 $1/5$ および $1/2.5$ を接種した。表9において、3つの異なる実験で各 175 -組織培養フラスコに接種した細胞の数を示す。4日後、各フラスコからのPER. C6/E2A細胞を収穫し、計数し、次いで、培養培地(10% 胎児ウシ血清および 10mM MgCl_2 を含むDMEM)で $100\mu\text{l}$ 当たり $22,500$ 細胞の懸濁液に希釈した。各細胞懸濁液から、2つの96-ウェル組織培養プレートをウェル当たり $100\mu\text{l}$ の細胞懸濁液で接種した。翌日、 $600\mu\text{l}$ 無血清ダルベッコウ修飾イーグル培地(DMEM)の容量中の $10.6\mu\text{g}$ のSalI線状化pAd/Cli p-lacZおよび $10.6\mu\text{g}$ のPacI線状化pWE-Ad. AflII-IIRIT RdE2AプラスミドDNAを、リポフェクタミンミックスをDNAミックスに添加することによって、 $446.4\mu\text{l}$ 無血清DMEM中に希釈した $153.6\mu\text{l}$ リポフェクタミンと混合した。DNA／リポフェクタミン混合物を室温で30分間放置し、しかる後、 7.8ml 無血清DMEMを添加した。次いで、トランスフェクションに先だって $200\mu\text{l}$ DMEMで洗浄したPER. C6/E2A接種ウェルに後者の混合物を添加した(ウェル当たり $30\mu\text{l}$)。湿潤 CO_2 インキュベーター(39°C 、 $10\%\text{CO}_2$ における3時間後、 10% 胎児ウシ血清および 10mM MgCl_2 を含む $200\mu\text{l}$ DMEMを各ウェルに添加し、プレートを湿潤 CO_2 インキュベーター(39°C 、 $10\%\text{CO}_2$)に戻した。翌日、各ウェルの培地を、 10% 胎児ウシ血清および 10mM MgCl_2 を含む $200\mu\text{l}$ DMEMで置き換えた。次いで、プレートを湿潤 CO_2 インキュベーター(32°C 、 $10\%\text{CO}_2$)に戻した。2日後、トランスフェクトした2つのプレートのうち1つを用いて、lacZ染色を用い、トランスフェクション効率を測定した。表9において、3つの異なる実験におけるlacZ染色後にスコア取りした各96-ウェル組織培養プレートのトランスフェクション効率を示す。2つのトランスフェクトプレートの第2のプレートをウイルス生産で用いた。トランスフェクションから7日後、第2のプレートのウェルを -20°C で一晩の凍結に付し、続いて解凍し、反復したピペティングにより再懸濁した。 $100\mu\text{l}$ の凍結／解凍トランスフェクト細胞のアリコット

10

20

30

40

50

を、感染の1日前に96ウェル組織培養プレートに接種した、新しいPER. C6/E2A細胞(100 μ l中のウェル当たり 2.25×10^4 細胞)を含むプレートの各ウェルに移した。十分なCPEが観察されるまで、これを湿潤CO₂インキュベーター(32°C、10%CO₂)中でインキュベートした。図39において、新しいPER. C6/E2A細胞への凍結/解凍トランスフェクト細胞の増殖後にスコア取りしたウイルス生産細胞(CPE陽性)ウェルのパーセンテージを示す。データーは、アデノウイルスアダプターおよびヘルパーDNA分子でのトランスフェクションに先だつてのPER. C6/E2A細胞の密集のレベルがウイルス生産ウェルの最終パーセンテージに影響を与えることを示し、より高い密集はウイルスを生産するウェルの絶対的最終数およびウイルス創製がおこるスピードで最も最適である。

10

【0152】

(実施例24)

アデノウイルス上清での長期インキュベーションは遅い表現型の検出を可能とする。機能的ゲノム中のアデノウイルスベクターライブラリーの使用は、検出可能であって、実施例12で用いたものごときものを探す遺伝子に重要な表現型に加え、HTSに適用可能である適当な細胞ベースのアッセイおよびミニチュア化の使用を必要とする。例えば、実施例20に記載された設定における、アデノウイルス発現ライブラリーでの感染後にアッセイする時間は可変的であって、アッセイされるべき表現型を決定するパラメーターに依存する。例えば、自動イメージ分析を用い、各ウェルにおける毛細血管の形成は、単に、毛細血管の形成を検出することによってアッセイすることができる。脈管形成または血管形成の指標であるこれらの構造の形成は、関連前駆体細胞の感染によって誘導することができる。かかる細胞は、関連トランスジーンを担うアデノウイルスベクター、例えば、血管内皮細胞様成長ベクター(VEGF)と共に、心臓または腫瘍起源からの内皮細胞であり得る。しかしながら、毛細血管形成のごとき複雑な表現型のみが数日ないし数週間後に出現する。従って、ある場合におけるアデノウイルス発現カセットによって媒介される遺伝子のライブラリーの発現は、表現型が現れるのを可能とするのに十分長い必要がある。図40において、96ウェルプレートでA549細胞を感染させるのに用いられたEGFP-アデノウイルスベクターでの実験結果を示す。実施例15に記載された安定性特徴に基づき、(DMEMにおける)アデノウイルス希釈は除去されなかったが、2週間まで残り、正規の間隔でEGFP発現を測定した。明らかに、これらの実験は、アデノウイルス形質導入が半安定と見なすことができ、経時的に増加さえすることを示し、これは、再感染および/または新しく分裂した細胞の感染が起こることを示唆する。これは、一過性アデノウイルスベクター系を用いて表現型につきスクリーンをすることができ、マルチウェルプレート(96, 384ウェルまたはそれより少)中の細胞にアデノウイルス上清を残すことによって現れるのに2週間以上かかることを意味する。

20

30

【0153】

(実施例25)

DNAトランスフェクション剤としてのコスト的に有利なポリエチレンジアミン(PEI)を用いる組換えアデノウイルスベクターのミニチュア化されたマルチウェル生産コスト低下および可変的毒性低下の目的では、リボソームトランスフェクション試薬のリポフェクタミンを置き換えるのが望ましい。カチオン性ポリマーポリエチレンジアミン(PEI)をこの目的で、ミニチュア化されたマルチウェル(96ウェル)アデノウイルスベクター生産システムにおいてテストした。また、実施例9および10参照。アデノウイルスヘルパープラスミド:LacZおよびEGFPにおける異なるトランスジーンインサートにて、PER. C6ならびにPER. C6/E2AのトランスフェクションにつきPEIをテストした。異なるパラメーターをテストした: PEI/DNA比率、単一ウェル当たりのPEI/DNA複合体のインキュベーション時間量。

40

【0154】

異なるPEI/DNA比率でのPEIのテスト

実施例10に記載したごとく、PER. C6またはPER. C6/E2A細胞でのトラン

50

スフェクションの前日に96ウェルマイクロタイタープレートに接種した。翌日、16ウェルにつき（異なるプレートに対し二連の8ウェル）、PER. C6についての3マイクログラムのSalI線状化pCLIP-LacZおよび3マイクログラムのPacI線状化pWEAflIIrITRおよびPER. C6/E2AについてのpWEAflIIrITRdE2Aを150 μ lの150mM NaCl中に希釈し、室温で10分間インキュベートした。また、20mM 25kDa PEI溶液を異なる量にて150 μ lの150mM NaClに希釈して異なるPEI/DNA比率を得、室温で10分間インキュベートした。表4参照。

DNAへの滴下によりPEIを添加することによってDNAおよびPEI溶液を混合し、室温で10分間インキュベートした。細胞を100 μ lの無血清ダルベッコウ修飾イーグル培地（DMEM）/ウェルで洗浄した。次いで、1.3mlのDMEMをミックスに添加し、ウェル当たり80 μ lの各ウェル中の細胞に添加した。陽性対照として、（実施例9に従って調製した）DNA/リポフェクタミン複合体をトランスフェクトした。さらなる対照インキュベーションはDMEMのみ、DNAなしのPEIのみ（比率13）であって、2倍量のPEI/DNA比率13を含めた。PEIトランスフェクションでは、湿潤CO₂インキュベーターにおけるPER. C6についての37℃でのおよびPER. C6/E2Aにおける39℃でのインキュベーションの4時間後に、80 μ lのPEI PER. C6培地（20% v/v 胎児ウシ血清（FCS）および10mM MgCl₂）/ウェルを細胞に添加した。リポフェクタミントランスフェクションでは、180 μ lのDMEM 10% v/v FCS 10mM MgCl₂/ウェルを細胞に添加し、プレートを湿潤CO₂インキュベーターに戻した。翌日、各ウェルの培地を200 μ lのDMEM 10% v/v FCS 10mM MgCl₂で置き換えた。次いで、プレートを、湿潤CO₂インキュベーター中PER. C6プレートでは37℃で、PER. C6/E2Aプレートでは32℃で放置した。3日後、二連プレートのうちの1つをX-galで染色してトランスフェクション効率を測定した。トランスフェクション効率結果を表5に示す。トランスフェクションの4日後に、プレートを20℃での4時間の凍結に付し、続いて解凍し、反復ピペッティングにより再懸濁した。前日、前記したごとく接種したPER. C6またはPER. C6/E2A細胞の新しいプレートに100マイクロリットルのアリコットを移した。次いで、プレートをCO₂インキュベーターに戻した。増殖後14日に、ウイルス形成用のインジケーターとしてのCPEをスコア取りし、プレートを20℃での4時間の凍結に付し、続いて、解凍し、反復ピペッティングによって再懸濁した。100 μ lの容量中の96ウェルプレートのウェル当たり1.10⁴ A549細胞で接種したプレートのウェルに20 μ lのアリコットを移した。感染の2日後、実施例9に記載したごとくLacZ活性につき、ウェルをX-Xalで染色した。結果を表6にまとめる。

【0155】

ウェル当たりの異なる量の複合体での組合せにおける異なるPEI/DNA比率でのPEIのテスト

最適をテストするために、毒性であることなく細胞に適用することができる2つの比率でのPEI/DNA複合体の最適な絶対量をテストするために、PEI/DNA比率の5および11.7をテストした。これをPER. C6/E2Aでテストした。標準濃度（1X）は前記したトランスフェクション実験に記載した濃度である（表4参照）。

0.9および42 μ lの間のPEIの量でPEI溶液を作成するために、種々の量の150mM NaCl溶液を20mM 25kDa PEI（Fluka cat. nr. 03880）に300 μ lの最終容量まで添加した。この溶液から、150マイクロリットルをDNAミックスに添加した（表7参照）。

150mM NaClでの150マイクロリットルへのDNA（50% pCLIP-LacZおよび50% pWEAflIIrITRdE2A）

トランスフェクションを前記したごとくに行った。リポフェクタミンを陽性対照ならびにいずれの添加剤もなくしてのDNAまたはPEIまたはDMEMとして用いた。3日後、

二連プレートを用いてlacZ発現につき染色し、結果を表8に与える。まず、細胞を毒性につきチェックした。2つの比率の間で差異が観察できた。比率11.7では2倍濃度(2X)はより毒性であるが、トランスフェクション効率はXほど高い。両比率での濃度0.1Xでは染色後に青色細胞は観察されず、これは細胞がトランスフェクトされなかったことを示す。

プロセッシング、CPEモニタリング、A549形質導入およびlacZ染色を以下のごとく行った。定量的に毒性をテストするために、後者のトランスフェクションを反復し、培地置換の2日後、細胞増殖アッセイ(Promega)を用いて、生細胞の数およびPEI/DNA複合体の毒性を測定した。全ての操作は製造業者のプロトコルに従った。37℃でのインキュベーションの4時間後、マイクロプレートマネージャー(Bio-Rad)を用いてプレートを読んだ。PEI比率5および11.7についてのこの実験の結果は図41にまとめる。明らかに、毒性は、比率5において(標準量の1.5倍)および標準状態の比率11.7において(標準量の0.5および1.5倍の間)最低であって、ウイルス創製に最適である。

【0156】

異なるPEI/DNA比率での、異なる遺伝子および温-対-冷PEIでのDNAキャリアーとしてのPEIのテスト

PEIの温度が複合体形成に影響するかをテストするために、前記プロトコルを4℃および室温にてPEIでテストした。加えて、もう1つのトランスジーンインサートをテストした;EGFP。また、2つの比率の最良濃度をこのトランスフェクション実験で用いた(450 mg DNA/ウェル PEI/DNA比率5および300 ng DNA/ウェル PEI/DNA比率11.7)。プロセッシング、CPEモニタリング、A549形質導入およびlacZ染色は記載したごとくに行い、図42に観察することができる。温および冷PEI間で観察された有意な差異はなかった。EGFPおよびPEIでのウイルス形成は非常に良く働いた(PEI比率5温および陽性対照リポフェクタミン 共100% CPE)。

【0157】

ウェル当たりの異なるPEI/DNA複合体容量でのDNAキャリアーとしてのPEIのテスト

DNA/PEI複合体の容量が前記したプロトコルでウイルス創製の効率に影響するかのテストをするために、異なる容量のPEI/DNA複合体(ウェル当たり比率5 450 ng DNA、PEI 20 mM 25 kDa Fluka)を細胞に添加した。この場合、ウェル当たり30、80および120マイクロリットルを添加した。プロセッシング、CPEモニタリング、A549形質導入およびlacZ染色は前記したごとくにした。図43でわかるごとく、30 μl、80 μl、および120 μlを適用する間でトランスフェクション効率に有意な差異がある。30 μlを用いると、ウェル内の細胞の1%のみが青色に染色され、他方、80 μlでは細胞の60%が青色に染色された。複合体の量を120 μlに増加させた結果、80 μlを適用するのと同じ結果が得られた。ウイルス形成では、同一の傾向が観察された;30 μlではCPEは見いだされず、他方、80および120 μlは同様のパーセンテージを与えた(示さず)。結論として、PEIを用いてミニチュア化設定でアデノウイルスベクターを生産することができる。

【0158】

(実施例26)

トランスフェクションに先だって細胞洗浄工程がない組換えアデノウイルスベクターのミニチュア化マルチウェル生産

組換えアデノウイルスベクターのミニチュア化マルチウェル生産の自動化における工程の減少およびコストの低下の目的で、トランスフェクションに先だてのPER.C6またはPER.C6/E2A細胞または誘導体の無血清培地(SFM)洗浄工程を標準プロトコルから取り除いた。トランスフェクションは実施例10に記載したごとくに行った。ヒトceNOSをトランスジーンインサートとして用いてトランスフェクションを行い、細

10

20

30

40

50

胞洗浄工程の除去をテストし、洗浄を含む標準手法と比較した。プロセッシングおよびCPEモニタリングは前記したごとくに成し、図44でわかるごとく、細胞がトランスフェクションに先だって洗浄されない場合、ウイルス生産で観察された有意な減少はない。結論として、標準トランスフェクションプロトコルの一部としての血清蛋白質のバルクを除去する細胞洗浄工程の取り除きはCPE効率に影響することなく可能である。組換えアデノウイルスベクターのミニチュア化およびマルチウェル生産を自動化する場合に望ましい全プロセスの複雑性を減少させる場合に後者は非常に有用である。

【0159】

(実施例27)

ゼブラフィッシュにおいて遺伝子発現を変調するためのアデノウイルス構築体の使用
全動物におけるアデノウイルス構築体による遺伝子発現の変調は遺伝子の機能について重要な情報を与えることができる。例えば、全長蛋白質をコードするセンスcDNA構築体を発現するアデノウイルス構築体は動物モデル系においてその蛋白質の過剰発現で用いることができ、他方、アンチセンスcDNAを発現するアデノウイルス構築体は内因性蛋白質の発現レベルを減少させるのに用いることができる。加えて、アデノウイルスーコード化蛋白質の過剰発現は突然変異体表現型を救済し得る。動物モデルにおける遺伝子発現のアデノウイルスー媒介変調は遺伝子の機能についての重要な情報を与えることができる。本実施例では、ゼブラフィッシュ、Danio rerioはアプローチの可能性を示すために動物モデル系として議論されるであろう。この目的で、本出願に記載した方法によって同定され単離されたcDNAでゼブラフィッシュcDNAライブラリーがスクリーニングされるであろう。全長蛋白質をコードするかく得られた相同ゼブラフィッシュcDNAは単離され、pIPSPAdaptシリーズのアダプタープラスミドにおいて、両方の向き、センスおよびアンチセンスにクローン化されるであろう（実施例17参照）。引き続いて、これらを用いて組換えアデノウイルスが創製され、これを用いて野生型または突然変異体（例えば、Development 1996 Volume 123, 12月参照）ゼブラフィッシュ胚いずれかを感染させるであろう。ゼブラフィッシュを育種する方法は同業者によく知られている。

野生型または突然変異体胚または成体魚において、遺伝子発現の上昇—または下降—変調の効果を実験することができる。胚は以下のごとくに収集されるであろう：ゼブラフィッシュはその育種において光周期的であり、日の出後まもなくの毎朝胚を生じる。比較的少数の胚（1日につきタンク当たり30—50）の連続的生産には、等しい数の雄および雌を用いる。昼一夜のサイクルは自動タイマー（14時間照射／10時間暗所）で制御する。タンクの底を単一層の大理石で覆って、魚が新しく産んだ卵を食べないようにする。タンクの底からサイフォン処理することによって新たに生産された胚を各朝収集し、組換えアデノウイルスで感染させる。これは後記するごとくいくつかの方法で達成することができる。選択された方法は遺伝子の発現パターンに依存する。

組換えウイルスは卵膜液に直接注入することができ、しかる後胚を洗浄し、系の水中でさらに培養する。同様に、組換えアデノウイルスは、例えば、血流への注入によって、あるいは経口もしくは直腸投与によって胚または成体魚中の特定の部位に沈積させることができる。注入は、胚を1.5%アガロースにてプラスチックモールドで作成した楔形形状の箱中に胚を保持することによって行うことができ、ここに、その卵膜を除去する必要はない。各箱は（卵膜と共に）ほぼ35の胚を保持することができる。胚はそれをピンセットで軽く叩いて落とすことによって整列させることができる。もしピペット先端が事故により表面に接触してもそれは一般に壊れないので、アガロースは有用である。ピペットが卵膜に侵入するにつれ、胚は箱の後方垂直壁に対して押し付けられる。胚内のピペット先端の正確な位置決めは、ミクロマニピュレーターでのピペットのわずかな動きによって、あるいはステージの動きによって達成される。別法として、胚は脱卵膜することができ（後記参照）、組換えアデノウイルスを含有する培地中でインキュベートすることができる。注入後、25—30の卵が250mlのビーカーに沈積されるであろう。孵化の後、稚魚を新しいビーカーに移し、その卵膜から完全に分離する。稚魚は当業者によく知られた標

10

20

30

40

50

準条件下で育てる。

ゼブラフィッシュのアデノウイルス感染後のモニタリング変化は、胚段階ほど早期に成すことができる。ゼブラフィッシュ発生いくつかの観察は卵膜を直接介して成すことができる。しかしながら、ほとんどの手法では、卵膜を除去するのが良好である。卵膜は鋭いピンセットで容易に除去することができる。28.5℃で育てると、ゼブラフィッシュはその卵膜の外部で正常に発育する。その卵膜から取り出した胚は、火煙研磨したパストールピペットでそれらを温和にピペッティングすることによるか、温和な注入によって1つの容器からもう1つの容器に移すことができる。小さなペトリ皿(35mm直径)が、発生の最初の数日の間に25までの胚を保持するのに適切である。培地を円状運動で温和に攪拌することによって観察するために胚を皿の中央まで運ぶことができる。稚魚および成体魚をさらに処理することなくモニターすることができる。より精巧な分析方法は、古典的な組織学的方法による、あるいは分子レベルでの差異を見るためのアンチセンスハイブリダイゼーションまたは抗体とのインキュベーションのごとき特別の方法を用いることによるセクションの染色を含む。

組換えアデノウイルスでのゼブラフィッシュの感染後に観察された表現型変化は、イン・ビボでコード化遺伝子の機能について重要な情報を与えることができる。また、前記した方法は他の動物モデルに適用することもできる。

【0160】

【表4】

比率	# 20 mM PEI (μ l)	# 150 mM NaCl (μ l)
8.3	7.5	142.5
10	8	142
11.7	10.5	139.5
13	12	138
15	13.5	136.5

【0161】

【表5】

比率	%青色細胞 PER. C6	%青色細胞 PER. C6E2A
8.3	45	60
10	45	60
11.7	55	65
13	55	65
15	50	40
2*13	10	10
PEI 13のみ	0	0
DMEMのみ	0	0
LIPO	65	80

【0162】

【表6】

PER. C6 比率	# CPE	% CPE	A549の 感染後の 青色ウエル の数	A549の 感染後の %青色 ウエル
8.3	6/8	75	7/8	87.5
10	3/8	37.5	5/8	62.5
11.7	4/7	57	4/7	57
13	4/8	50	5/8	62.5
15	3/7	37.5	3/7	43
2*13	0/8	0	0/8	0
PEI 13のみ	0/8	0	0/8	0
DMEMのみ	0/8	0	0/8	0
リポフェクタミン	1/16	6	1/8	12.5

10

PER. C6/E2A 比率	# CPE	% CPE	青色ウエル A549細胞 の数	%青色 A549細胞
8.3	0/8	0	0/8	0
10	1/8	12.5	3/8	37.5
11.7	3/8	37.5	6/8	75
13	1/8	12.5	2/8	25
15	1/8	12.5	2/8	25
2*13	0/8	0	0/8	0
PEI 13のみ	0/8	0	0/8	0
DMEMのみ	0/8	0	0/8	0
リポフェクタミン	11/16	69	13/16	81

20

30

【0163】

【表7】

PEI/DNA 複合体の濃度	DNA/ウエル の量 (ng/ μ l)	DNA (μ l)	PEI比率11.7 (μ l)	PEI比率5 (μ l)
2 X	600	12	42	18
1.5 X	450	9	31.5	13.5
Standard 1 X	300	6	21	9
0.5 X	150	3	10.5	4.5
0.1 X	30	0.6	2.1	0.9

40

【表8】

複合体	ウェルあたりの DNA (ng) の量	%青色細胞 PEI 比率 5	%青色細胞 PEI 比率 11.7
PEI 2 X	600	30	45
PEI 1.5 X	450	40	55
PEI 標準 X	300	25	測定されず
PEI 0.5 X	150	5	40
PEI 0.1 X	30	0	0
リポフェクタミン	100	65	65
-/-	0	0	0

10

【表 9】

トランスフェクションのために収穫した細胞の密集

T175 フラスコ	細胞数第 1 実験	細胞数第 2 実験	細胞数第 3 実験
1/10	2.3×10^6	1.3×10^6	3.3×10^6
1/5	4.7×10^6	2.6×10^6	6.7×10^6
1/2.5	-	5.2×10^6	13.3×10^6

20

トランスフェクション効率

30

96-ウェル- プレート	効率第 1 実験	効率第 2 実験	効率第 3 実験
1/10	30-40%	50-60%	50-60%
1/5	70-80%	50-60%	50-60%
1/2.5	-	50-60%	50-60%

【0164】 本明細書中で言及した全ての刊行物および特許出願は、本発明が関する当業者のレベルを示す。各個々の刊行物または特許出願は引用により具体的かつ個々に本明細書の一部と見なすごとく、引用によりここに同一程度一体化させる。

さて、本発明を十分に記載してきたが、添付の請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく多くの変形および修飾を成すことができるのは当業者に明らかであろう。

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】 pBS. PGK. PCRI. の構築。pBS. PGK. PCRI. は、アデノウイルス 5 (Ad5) E1ヌクレオチド 459～916 に作用可能にリンクされているヒトホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター (PGK) をコードする。このプラスミドを構築するために、アデノウイルス 5 (Ad5) E1ヌクレオチド 459～916 を、プライマー Ea-1 (配列識別番号：27) および Ea-2 (配列識別番号：28) により PCR 法によって増幅し、Cla I により分解し、また、pBluescript (Stratagene) の Cla I-EcoRV 部位にクローン化して、pBS. PCRI. を得た。PGK プロモーターを、Sca I による完全な分解及び EcoRI による部分的な分解によって pTN か

50

ら切り出し、また pBS.PCRI の対応する部位にクローン化することで、pBS.PGK.PCRI を得た。

【図2】 pIG.E1A.E1B.X. の構築。pIG.E1A.E1B.X. は、ヒト PGK プロモーターに作用的にリンクされている Ad5 スクレオチド 459-5788 (E1A と E1B 領域) をコードする。pIG.E1A.E1B.X. はまた、Ad5 pIX タンパク質をコードする。pIG.E1A.E1B.X. は、pAT-X/S の ScaI-BspEI 断片を、pBS.PGK.PCRI の対応する断片に置換することによって構築された。

【図3A】 pAT-PCR2-NEO の構築。このプラスミドを構築するために、E1B プロモーターおよび E1B 21kDa タンパク質の開始コドン (ATG) を、プライマー E-a-3 (配列識別番号: 29) および E-p-2 (配列識別番号: 30) により PCR 法で増幅した。なお、E-2 は 21kDa タンパク質開始コドンに NcoI 部位 (5'-CCATGG) を導入する。PCR 産物 (PCR II) は HpaI および NcoI により分解され、また、pAT-X/S の対応する部位に結合され、pAT-X/S-PCR2 を産生した。Neo^R を含む pTN の NcoI-StuI 断片と HBV ポリ (A) 部位の一部が pAT-X/S-PCR2 の NcoI-NruI 部位に結合されて、pAT-PCR2-NEO を産生した。

【図3B】 pIG.E1A.NEO の構築。pIG.E1A.NEO は、ヒト PGK プロモーターに作用的にリンクされている Ad5 スクレオチド 459~1713 をコードする。また、ネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^R) と B 型肝炎ウイルス (HBV) ポリ (A) シグナルに機能的にリンクされる E1B プロモーターもコードされる。この構築では、E1B 21kDa タンパク質の AUG コドンが Neo^R の開始コドンとして機能する。pAT-PCR2-NEO の HBV ポリ (A) シグナル (図3A を参照) は、pAT-PCR2-NEO の ScaI-SalI 断片を、pTN の対応する断片に置換することで完成し、pAT.PCR2-NEO.p(A) が産生され、また pAT.PCR2-NEO.p(A) の ScaI-XbaI 断片を pIG.E1A.E1B.X の対応する断片に置換して、pIG.E1A.NEO を産生した。

【図4】 pIG.E1A.E1B の構築。pIG.E1A.E1B は、PGK プロモーターおよび HBV ポリ (A) シグナルに作用的にリンクされる Ad5 スクレオチド 459~3510 (E1A および E1B タンパク質) を含む。このプラスミドは、プライマー E-b-1 (配列識別番号: 31) および E-b-2 (配列識別番号: 32) により E1B 55kDa タンパク質の N 末端アミノ酸の PCR 法による増幅によって構築されたが、それは XhoI 部位を導入しており、BglII で分解され、また、pAT-X/S の BglII-NruI 部位にクローン化されて、pAT-PCR3 を産生した。pAT-PCR3 の XbaI-XhoI 断片は、pIG.E1A.NEO の XbaI-SalI (HBV ポリ (A) 部位を含む) に置換されて、pIG.E1A.E1B が産生された。

【図5】 pIG.NEO の構築。pIG.NEO は、E1B プロモーターに作用的にリンクされる Neo^R を含有する。pIG.NEO は、E1B プロモーターおよび Neo^R を含む pIG.E1A.NEO の HpaI-ScaI 断片を、pBS の EcoRV-ScaI 部位に結合することにより構築された。

【図6】 アデノウイルスのパッケージングコンストラクトによる初代仔ラットの腎臓 (BRK) の細胞の形質転換を示す。BRK 細胞のサブ融合性培養皿は、SV40 初期プロモーターの制御下で Ad5 E1B 遺伝子を発現させる pIG.NEO、pIG.E1A.NEO、pIG.E1A.E1B、pIG.E1A.E1B.X、pAd5XhoIC、あるいは pDC26 を加えた pIG.E1A.NEO のいずれかの 1 あるいは 5 μg でトランスフェクトされた。トランスフェクト後 3 週間で、細胞増殖巣が観察されて、細胞が固定されたので、ギムザ染色して、細胞増殖巣を数えた。図示の結果は、5 複製培養皿毎に細胞増殖巣の平均数である。

【図7】 pIG.E1A.NEO によってトランスフェクトされた A549 クローンと、pIG.E1A.E1B (PER クローン) によりトランスフェクトされたヒト胚性網

10

20

30

40

50

膜芽細胞（HER細胞）のウェスタンブロット分析。トランスフェクトされたA549細胞およびPER細胞におけるAd5 E1AとE1B 55 kDおよび21 kDタンパク質の発現は、E1A遺伝子産物を認識するマウスのモノクローナル抗体（Mab）M73、及びそれぞれE1B 55 kDaタンパク質および21 kDaタンパク質を認識するMabs AIC6及びC1G11によるウェスタンブロットによって測定された。Mab結合は、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識化したヤギ抗マウス抗体を用いて、化学発光を向上させることで視認化した。293と911細胞はコントロールとして使用した。

【図8】 293、911とPER細胞系列のサザンブロット分析。細胞のDNAを抽出し、HindIIIで分解して、電気泳動してHybond N+膜（アマシャム社（Amersham））に移した。膜は、pAd5. SalB（Ad5ヌクレオチド342～2805）のSspI-HindIIIの無作為プライミングにより生成された放射能標識されたプローブにハイブリダイズした。

10

【図9】 PER. C3、PER. C5、PERC6および911細胞のトランスフェクション効率。細胞は6ウェルの皿に培養し、リン酸カルシウム共同沈降法により5 µg pRSV. lacZによって、二重にトランスフェクトされた。トランスフェクト後48時間で、細胞をX-Galで染色し、青色細胞を数えた。示された結果はウェル毎の青色細胞の平均パーセンテージである。

【図10】 アデノウイルスベクター、pMLPI. TK. の構築。pMLPI. TKは、パッケージングコンストラクトであるpIG. E1A. EABと重複する配列を有しないように設計された。pMLPI. TKは、pIG. E1A. E1Bと重複する配列の領域を欠失させ、lacZから誘導されたコードしない配列を欠失させることによって、pMLP. TKから誘導された。pMLP. TKのSV40ポリ（A）配列は、BamHI部位を導入するためのプライマーSV40-1（配列識別番号：33）、およびBglII部位を導入するためのSV40-2（配列識別番号：34）とによってPCR法によって増幅された。pMLP. TK Ad5の配列2496～2779は、BglII部位を導入するプライマーAd5-1（配列識別番号：35）とAd5-2（配列識別番号：36）とによって、PCR法によって増幅された。両方のPCR産物は、BglIIで分解されて結合され、プライマーSV40-1およびAd5-2によりPCR法によって増幅された。この第3のPCR法による産物は、BamHIおよびAflIIIで分解されて、pMLP. TKの対応部位に結合されて、pMLPI. TKが産生された。

30

【図11A】 新しいアデノウイルスのパッケージングコンストラクト、pIG. E1A. EABは、新しいアデノウイルスベクター、pMLPI. TKと重複する配列を有していない。911細胞に発現されるパッケージングコンストラクト、pAd5XhoICと、相同性組換えおよび複製能力を有するアデノウイルスの形成が可能なアデノウイルスベクター、pMLP. TKとの間の重複する配列領域を示す。対照的にPER. C6細胞で発現する新しいパッケージングコンストラクト、pIG. E1A. E1Bと、新しいアデノウイルスベクター、pMLPI. TKの間には配列重複の領域はない。

【図11B】 新しいアデノウイルスパッケージングコンストラクト、pIG. E1A. NEOは、新しいアデノウイルスベクターpMLPI. TK. と重複する配列を有しない。新しいパッケージングコンストラクト、pIG. E1A. NEOと、相同性組換えおよび複製能力を有するアデノウイルスの形成を可能な、新しいアデノウイルスベクター、pMLPI. TKとの間には、配列が重複する領域がない。

40

【図12】 組換え体アデノウイルス、IG. Ad. MLPI. TKの創製。組換え体アデノウイルス、IG. Ad. MLPI. TKは、SalIによって線形化されたpMLPI. TKと、ClaIで分解された野生型Ad5 DNAの右アームとで、293細胞のコトランスフェクションにより生成された。線形化されたpMLPI. TKと野生型Ad5 DNAとの間の相同性組換えによって、ヌクレオチド459～3510のE1欠失を含有するIG. Ad. MLPI. TK DNAが産生される。293細胞は、欠失したAd5ゲノムをトランスコンプリメントし、それによりIG. Ad. MLPI. TK DNAの複製と、このDNAのウイルス粒子へのパッケージングを可能にする。

50

【図13】 アデノウイルス複製タンパク質を発現する細胞において二重にし、また複製するアデノウイルス由来の誘導組換えDNA分子の設計の原理。E1、E2、E3、E4およびL領域のおおよその位置を示すアデノウイルス二本鎖DNAゲノムの線図を示す。5'末端に付加された末端ポリペプチド(TP)は、閉サイクルで示される。アデノウイルスゲノムの右アームは、制限酵素加水分解による左アームの除去によって精製することができる。293あるいは911細胞への右アームのトランスフェクションに続いて、右アームにコードされたアデノウイルスDNAポリメラーゼ(白矢印)は一本鎖の形態のみを産生する。二本鎖あるいは一本鎖DNAのどちらも1つの末端にITRを欠いているために複製することができない。DNAポリメラーゼの基質として役立せることができ、3'末端でヘアピン構造を形成することができる配列を一本鎖DNAに提供することにより、分子の全長に沿ってヘアピン構造が伸長する。この分子はまた、DNAポリメラーゼのための基質として用いることができるが、その産物は、両末端にITRを有する二重分子で、アデノウイルスタンパク質の存在下で複製することができる。

10

【図14】 アデノウイルスゲノムの複製。アデノウイルスゲノムを一番上の左に示す。原始体あるいは複製体は、ゲノム末端にある左および右のITR内に位置している。DNA複製は2段階で起こる。複製は、1つの右のITRが、娘二本鎖とアデノウイルスDNA結合タンパク質(DBP、白丸)により被覆されている、置換された親一本鎖を生成することから進行し、両末端でのITR配列のアニールングによりパンハンドル構造が形成される。このパンハンドル部分は、二本鎖ゲノムDNAを産生するためのDNAポリメラーゼ(Pol; 白矢印)の基質である。あるいは、複製は両方のITRから進行して、2つの娘分子を生成し、それによってパンハンドル構造の必要をなくす。

20

【図15】 HP/asp配列(配列識別番号:47)を含有する一本鎖DNA分子の潜在的なヘアピンコンホメーション。クローン化されたオリゴヌクレオチド、HP/asp1およびHP/asp2を含有するpICLhaのAsp718I加水分解は、1つの末端にAd5 ITRを有し、もう1つの末端にHP/asp配列を有する線形二本鎖DNAを産生する。細胞内では、アデノウイルスE2領域が発現し、5'末端にAd5 ITRを有し、また3'末端にヘアピンコンホメーションを有する一本鎖DNAが産生される。一度形成されると、そのヘアピンは、一本鎖DNAを二本鎖DNAに変換するための、細胞および/またはアデノウイルスDNAポリメラーゼのプライマーとして利用することができる。

30

【図16】 pICLhacの線図。pICLhacは、pICL(図19)のすべての構成要素を含有するだけでなく、Asp718部位に、HP/asp配列を、Asp718加水分解と、アデノウイルスE2タンパク質を発現する細胞へのトランスフェクションによる線形化に引き続いて、図15に示されているヘアピン構造を産生する配向で含有する。

【図17】 pICLhawの線図。pICLhawは、挿入されたHP/asp配列が反対の配向であることを除いて、pICLhac(図16)と同一である。

【図18】 pICLIの概略図。pICLIは、pICL(図19)のすべての構成要素を含有し、Asp718部位にAd5 ITRを含有する。

【図19】 pICLの線図。pICLは以下のものから誘導される。すなわち、(i) 左ITRを含む、ヌクレオチド1~457、Ad5ヌクレオチド1~457、(ii)ヌクレオチド458~969、ヒトCMVエンハンサー、即時型初期プロモーター、(iii)ヌクレオチド970~1204、SV40 19Sエキソン、トランケート16/19Sイントロン、(iv)ヌクレオチド1218~2987、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、(v)ヌクレオチド3018~3131、後期転写から得られるSV40縦列ポリアデニル化シグナル、(vi)ヌクレオチド3132~5620、Asp718部位を含むpUC12配列、(vii)逆配向でのアンピシリン耐性遺伝子。

40

【図20】 pBr322(プラスミド)あるいはpWE15(コスミド)誘導ベクターでクローン化されたアデノウイルス断片の概念図を示す。一番上の列はそのITR(黒矩形)が側面に位置し、またいくつかの制限部位を示した完全なアデノウイルスゲノムを示

50

している。制限部位に続く数字は、Ad5ゲノムにおけるおおよその加水分解部位(kb単位で)を示す。

【図21】 アダプタープラスミドpAd/L420-HSAの図である。

【図22】 アダプタープラスミドpAd/Clipの図である。

【図23】 プラスミドベースのシステムを使用した組換え体アデノウイルスの創製の略図である。一番上には、Ad5のゲノム組織が、異なる初期および後期転写領域ならびに側面に位置するITRを黒く塗った箱型で表して示されている。中間には、単一相同性組換えに使用され、また、パッケージング細胞へのトランスフェクト後に、組換えウイルス(一番下に提示)を導入するのに使用される2つのDNAを表わす。

【図24】 最小のアデノウイルスベクターpMV/L420Hの図である。

10

【図25】 最少アデノウイルスベクターの複製とパッケージングのためのヘルパーコンストラクトを示す。ヘルパーコンストラクトpWE/AdΔ5'生成のためのクローン化ステップの略図である。

【図26】 COS-1細胞における大きなアデノウイルスコンストラクトのSV40-LargeT/oriに仲介される複製の証拠。図26Aは、コンストラクトpWE/Ad. AdΔ5'の略図を示す。SV40 ori配列とプローブを作成するのに使用される断片の位置が示されている。COS-1細胞における大きなアデノウイルスコンストラクトのSV40-LargeT/oriに仲介される複製の証拠である。図26Bは、アデノウイルスプローブにハイブリダイズされたサザンブロット法のオートラジオグラムを示す。図26Cは、pWEにプローブハイブリダイズされたサザンブロット法のオートラジオグラムを示す。レーン1、マーカーレーン; EcoRI及びHindIIIにより加水分解されたλDNA。レーン4は空白である。レーン2、5、7、9、11、13、15、17には、未分解のDNAが含まれ、またレーン3、6、8、10、12、14、16、18には、MboIで加水分解されたDNAが含まれる。すべてのレーンには、本文で説明したように、pWE. pac (レーン2および3)、pWE/Ad. Δ5'コンストラクト#1 (レーン5および6)、#5 (レーン7および8)、#9 (レーン9および10)、pWE/Ad. AffIII-rITR (レーン11および12)、pMV/CMV-LacZ (レーン13および14)、PacIにより加水分解されたpWE. pac (レーン15および16)あるいはPacIにより加水分解されたpWE/Ad. AffIII-rITR (レーン17および18)によりトランスフェクションされたCOS-1細胞由来のDNAが含まれる。矢印は、1416 bp (図26B)および887 bp (図26C)の予想されるポジティブシグナルを指している。

20

30

【図27】 E1/E2A欠失アデノウイルスベクターの産生とに基づく小型化PER. C6/E2Aをベースとする産生システム(実施例10)におけるその効率。

【図28】 PER. C6/E2Aをベースにするブラック測定(実施例11)を使用して測定した96ウェルプレートで産生される平均濃度を示す。

【図29】 種々のマーカーおよびヒトcDNA形質転換遺伝子の小型化PER. C6/E2Aをベースにする産生システム(実施例12)におけるアデノウイルスベクター産生の適合度を示す。

【図30】 6つの異なるプロトコルにより精製された、pCLIP-LacZとのPER. C6/E2A細胞のトランスフェクション後のCPEを有するウェルの相対的な量を示す(実施例13)。Qiagen: 標準アルカリ性溶液への溶解の後、Qiagenプラスミドの精製; AlkLys: アルカリ性溶液への溶解の後、イソプロパノール沈降とTE緩衝液における可溶化; AL+RNAse: アルカリ性溶液へ溶解後、イソプロパノール沈降と、10マイクログラム/mlでRNAseを含むTE緩衝液による可溶化; AL+R+フェノール: アルカリ性溶液への溶解後、イソプロパノール沈降と10マイクログラム/mlでRNAseを含むTE緩衝液において可溶化し、その後にフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈降; CTAB: 標準CTABプラスミド分離; CTAB+フェノール: 標準CTABプラスミド分離、しかし、10マイクログラム/mlでRNAseを含むTE緩衝液において可溶化し、その後にフェノール/クロロホルム抽出。

40

50

【図31】 フェノールクロロホルム洗浄をしないトランスフェクションで加水分解プラスミドを使用する効果（実施例14）。すべての実験の結果は、CPE形成を示すウェルのパーセンテージとして示されまた表現される。A) LacZ-アダプターDNAは、6つの異なる分離方法を使用して分離された（実施例13を参照）；1：Qiagen、2：アルカリ性溶解、3：アルカリ性溶解+RNase処理、4：アルカリ性溶解+RNase処理+線形化の前にDNAのp/c精製、5：CTAB（セチルトリメチルアンモニウムブロミド）、6：CTAB+線形化の前にDNAのp/c精製、rITRはp/c精製された、B) 精製および未精製EGFP-およびEYFP-アダプターDNA、rITRはp/c精製された、C) EGFP-アダプターDNAおよびrITRは精製および精製されていないものが試験された；1：両方のアダプターおよびrITRを精製（コントロール）、2：rITRを精製、アダプターDNA未精製、3：rITRおよびアダプターを未精製。

10

【図32】 小型化フォーマットで産生され、また3つの異なる温度で3週間インキュベートされ、アデノウイルスベクターに関するプラーク形成検定を使用して測定されたアデノウイルスの安定性（実施例15）。

【図33】 アンチセンス（AS）配向のcDNAを含むいくつかのアデノウイルス（E1およびE2A欠失）のウイルス創製後の、CPEのパーセンテージにみるウイルス創製の効率を示す（実施例16）。

【図34A～M】 アデノウイルスアダプタープラスミドのプラスミド遺伝子地図を示す（実施例17）。これらのアデノウイルスアダプタープラスミドは、本出願の目的物などのアデノウイルスベクターにおける発現ライブラリーの構築に、特に有用である。それらは、アダプターやアダプターのライブラリーの線形化（形質転換遺伝子の挿入による）に関しては非常に稀な制限部位を有しており、挿入断片の加水分解によりアダプターを不活性化することはない。

20

【図34M】 pIPspAdapt5-あるいはpCLIP-IppoI-polynew-から誘導されたアデノウイルスDNAを含有するコスミドは、in vitroでの結合に使用することができる。適合性のあるオーバーハングを含有する二本鎖オリゴヌクレオチドは、I-CeuIとI-PpoIの間、I-SceIとPI-SceIの間、I-SceIとI-PpoIの間で結合される。PacI制限エンドヌクレアーゼは、結合後にコンストラクトを線形化して、左と右のITRを解放するだけでなく、非組換え体を除外するのにも使用される。

30

【図34N】 pCLIP-LacZおよびアダプタープラスミドpIPspAdapt2によるPER. C6/E2A細胞のトランスフェクション後のCPEを伴うウェルの相対的な量を示す。

【図35】 （実施例19）凍結／融解トランスフェクトされた細胞リゼイトの増殖後の、PER. C6/E2A細胞の96ウェルのプレートにおけるウイルス産生ウェル（CPE陽性）のパーセンテージを示す（実施例19）。コトランスフェクションに使用されるヘルパー分子は、（1）pWE/Ad. AflII-rITRsp、（2）pWE/Ad. AflII-rITRsp. dE2A、（3）pWE/Ad. AflII-rITRsp. dXba、及び（4）pWE/Ad. AflII-rITRである。

40

【図36（IおよびII）】 （実施例20）配列されたアデノウイルスcDNA発現ライブラリーを構築するところを示す概念図である。

【図37】 （実施例21）384ウェルプレートでの異なるアダプタープラスミドおよびpWE/Ad. AflII-rITRDE2Aのトランスフェクションの96ウェルプレートでのコトランスフェクションとの比較を示す。図示されているのは、トランスフェクション後5日（上方パネル）あるいはトランスフェクション後7日（下方パネル）の新しいPER. C6/E2A細胞に対して、凍結融解トランスフェクション細胞の増殖後に示された、異なる時点で評価されたウイルス産生ウェル（CPEポジティブウェル）のパーセンテージである。

【図38A, B, C】 （実施例22）トランスフェクションから7日後のトランスフェク

50

トされた細胞の培地を変化させた後の異なる時点でのウイルス産生ウェル（CPEポジティブウェル）のパーセンテージ（A）、培地を取り替えなかった後（B）、新しいPER. C6/E2A細胞への凍結融解トランスフェクション細胞の標準的な増殖の後。

【図39】（実施例23）トランスフェクション時に融合性を示すトランスフェクションのためにPER. C6/E2A細胞を使用した3つの異なる実験において、新しいPER. C6/E2A細胞への凍結融解トランスフェクション細胞の増殖後に評価されたウイルス産生細胞（CPE陽性）ウェルのパーセンテージを示す。数字と凡例は、各実験における各フラスコから得られた細胞の絶対数が数えられている表9を引用している。これらのフラスコから得られた細胞は、アデノウイルスアダプターとヘルパーDNA分子によるトランスフェクションのための96ウェルプレートに接種するのに使用された。

10

【図40】 アデノウイルス発現ライブラリーの感染後、表現型の遅延読み出しを伴う測定法のための半安定発現システムとしてのアデノウイルス発現ベクターの使用を示す（実施例24）。使用されている形質転換遺伝子：グリーン蛍光タンパク質（EGFP、Clontech社）。粗製PER. C6/E2A産生リゼイトは、約500～1000のMOIで使用された。

【図41】 小型化されたフォーマット（実施例25）におけるアデノウイルスベクターの創製でのPEIの使用を示す。トランスフェクション効率、ウイルス形成（CPE）および増殖(proliferation)（毒性）が示されている。

【図42】 CPE効率におけるトランスフェクション時のPEI温度の効果を示す（実施例25）。W：暖温度（室温）およびC：冷温度（4℃）。

20

【図43】 トランスフェクション効率におけるPEIトランスフェクション容積の影響を示す（実施例25）。

【図44】 リポフェクタミン-DNA複合体を適用する前の無血清培地でのPER. C6/E2Aの洗浄を示す（実施例26）。

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: VOGELS, RONALD,
BOUT, ABRAHAM,
VAN ES, HEIMUTH HG,
SHOUTEN, GOVERT

(ii) TITLE OF INVENTION: HIGH THROUGHPUT SCREENING OF GENE FUNCTION
USING ADENOVIRAL LIBRARIES FOR FUNCTIONAL GENOMICS APPLICATIONS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 47

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: RAE-VENTER LAW GROUP
(B) STREET: PO BOX 60039
(C) CITY: PALO ALTO
(D) STATE: CALIFORNIA
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 94306

10

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.30

20

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US NOT ASSIGNED
(B) FILING DATE: 12-JUN-1998
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: RAE-VENTER, BARBARA
(B) REGISTRATION NUMBER: 32,750
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: INGE.008.00US

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (650)328-4400

(B)TELEFAX: (650)328-4477

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

10

AATTGTCTTA ATTAACCGCT TAA

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 19 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

AATTGTCTTA ATTAACCGC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 19 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

AATTGCGGTT AATTAAGAC

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 47 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

CTGTACGTAC CAGTGCACTG GCCTAGGCAT GGAAAAATAC ATAACTG

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 64 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

GCGGATCCTT CGAACCATGG TAAGCTTGGT ACCGCTAGCG TTAACCGGGC GACTCAGTCA A
TCG

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 28 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

GCGCCACCAT GGGCAGAGCG ATGGTGGC

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 50 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

GTTAGATCTA AGCTTGTCGA CATCGATCTA CTAACAGTAG AGATGTAGAA

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

GGGTATTAGG CCAAAGGCGC A

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

GATCCCATGG AAGCTTGGGT GGCGACCCCA GCG

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

20

(A) LENGTH: 36 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:
GATCCCATGG GGATCCTTTA CTAAGTTACA AAGCTA
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 19 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:
GTCGCTGTAG TTGGACTGG
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 25 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:
CGATAAGCTT AATTCCTTTG TGTTT
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 33 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid

10

20

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:
CTTAGGTAAC CCAGTAGATC CAGAGGAGTT CAT
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:14:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 63 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:
AACTGCAGAT CTATCGATAC TAGTCAATTG CTCGAGTCTA GACTACGTCA CCCGCCCCGT
TCC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:15:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 39 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:
CGGGATCCGT CGACGCGGCC GCATCATCAA TAATATACC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:16:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 10 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

10

20

(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:
CGATGCATCG

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

GGGGTGGCCA GGGTACCTCT AGGCTTTTGC AA

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 29 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

GGGGGGATCC ATAAACAAGT TCAGAATCC

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

10

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:
AGCTTGAATT CCCGGGTACC T

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

CTAGAGGTAC CCGGGAATTC A

10

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 39 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

CGGAATTCTT AATTAAGTTA ACATCATCAA TAATATACC

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:22:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 66 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

ACGGCGCGCC TTAAGCCACG CCCACACATT TCAGTACGTA CTAGTCTACG TCACCCGCCC

CGTTCC

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

CGGAATTCAT CAGGATAGGG CGGTGG

10

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 44 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

CGGGATCCTA TCGATATTTA AATGTTTTAG GGCGGAGTAA CTTG

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

TAAGCCACTA GTACGTACTG AAATGTGTGG GCGTGGC

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:26:

20

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 43 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

TTAAGCCACG CCCACACATT TCAGTACGTA CTAGTGGCTT AAT

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:27:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

CGTGTAGTGT ATTTATACCC G

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:28:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

TCGTCACTGG GTGGAAAGCC A

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:29:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs

10

20

(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:
TACCCGCCGT CCTAAAATGG C
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:30:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 21 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:
GCCTCCATGG AGGTCAGATG T
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:31:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:
GCTTGAGCCC GAGACATGTC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:32:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

10

20

(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:
CCCCTCGAGC TCAATCTGTA TCTT
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:33:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:
GGGGGATCCG AACTTGTTTA TTGCAGC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:34:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 25 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:
GGGAGATCTA GACATGATAA GATAC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:35:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

10

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:
GGGAGATCTG TACTGAAATG TGTGGGC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:36:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 24 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:
GGAGGCTGCA GTCTCCAACG GCGT
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:37:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 32 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:
GGCGAATTCG TCGACATCAT CAATAATATA CC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:38:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 17 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:
CTGTGTACAC CGGCGCA

10

20

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:39:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 50 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:

GTACACTGAC CTAGTGCCGC CCGGGCAAAG CCCGGGCGGC ACTAGGTCAG

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 50 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

GTACCTGACC TAGTGCCGCC CGGGCTTTC CCGGGCGGCA CTAGGTCAGT

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:41:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 55 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:41:

GTACATTGAC CTAGTGCCGC CCGGGCAAAG CCCGGGCGGC ACTAGGTCAA TCGAT

(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:42:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

20

(A) LENGTH: 55 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:
GTACATCGAT TGACCTAGTG CCGCCCGGGC TTGCCCCGGG CGGCACTAGG TCAAT
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:43:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:
TGGACTTGAG CTGTAAACGC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:44:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:
GGGGGATCCT CAAATCGTCA CTTCCGT
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:45:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid

10

20

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:
GGGGTCTAGA CATCATCAAT AATATAC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:46:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 32 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:
GGCGAATTCG GTACCATCAT CAATAATATA CC
(2) INFORMATION FOR WEQ ID NO:47:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 45 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:47:
GTACACTGAC CTAGTGCCGC CCGGGCAAAG CCCGGGCGGC ACTAG

10

20

【图 1】

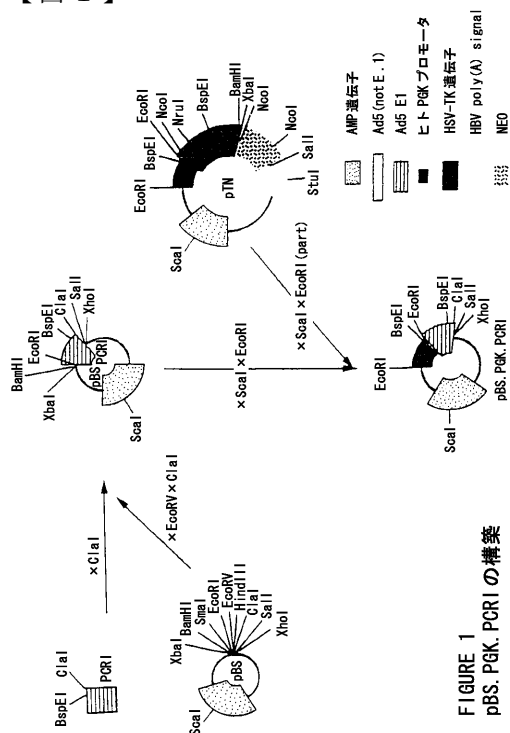


FIGURE 1
pBS. PGK. PCR1 の構築

【图 2】

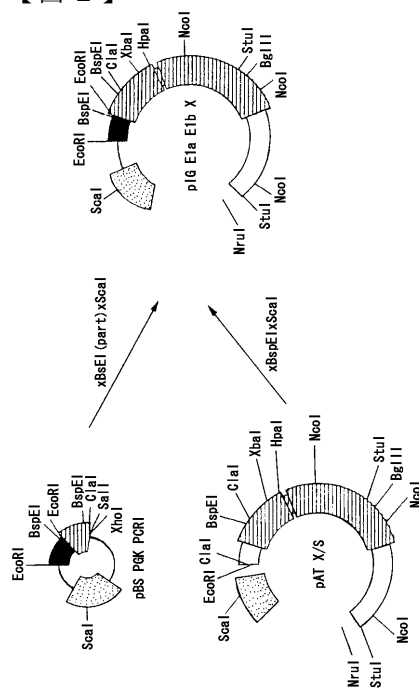


FIGURE 2
p1G.E1a.E1b.Xの構築

【図 3 a】

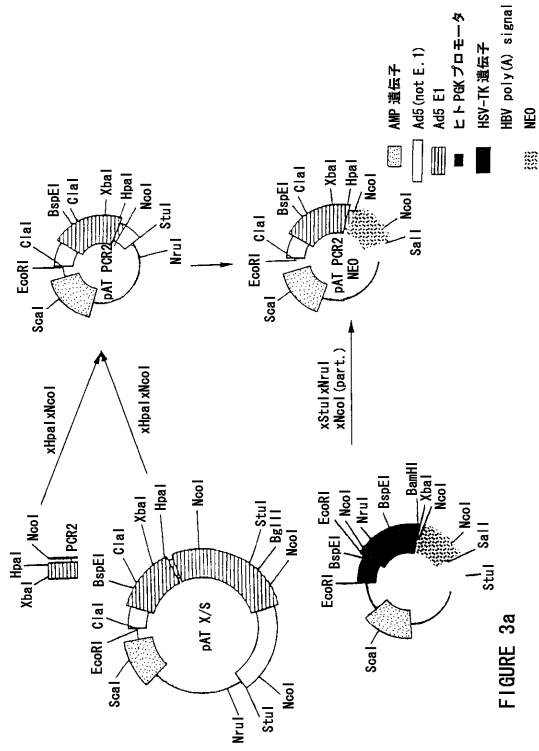
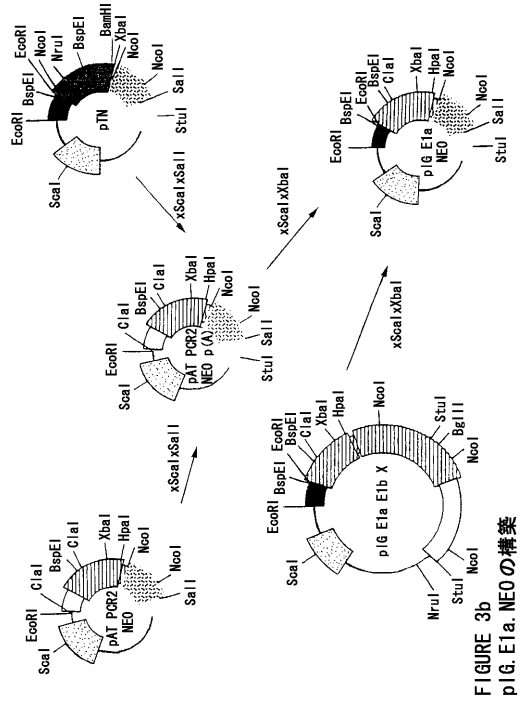
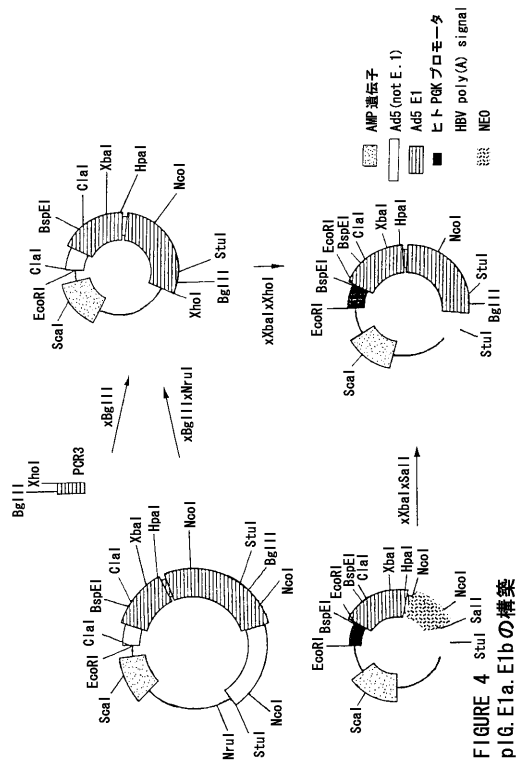


FIGURE 3a

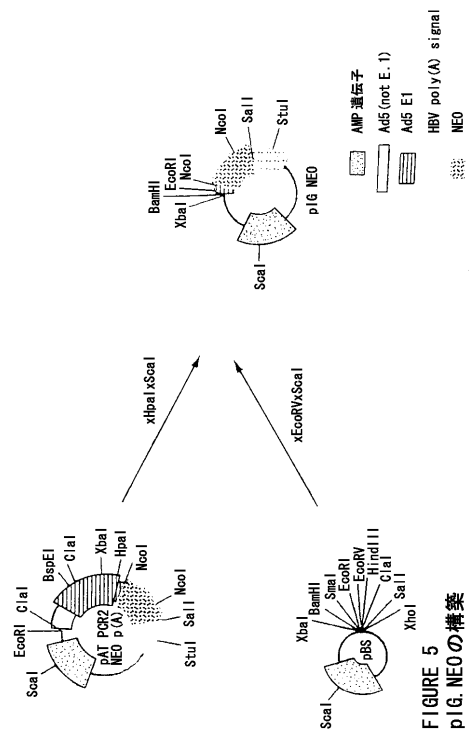
【図 3 b】

FIGURE 3b
pIG.E1a.NEOの構築

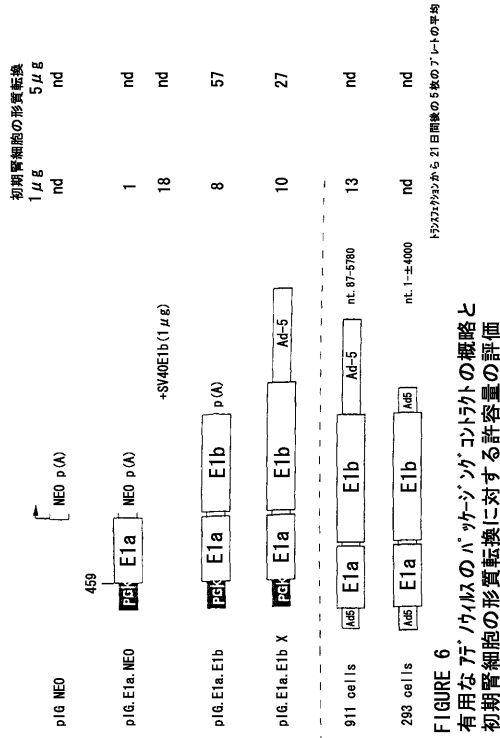
【図 4】

FIGURE 4
pIG.E1a.E1bの構築

【図 5】

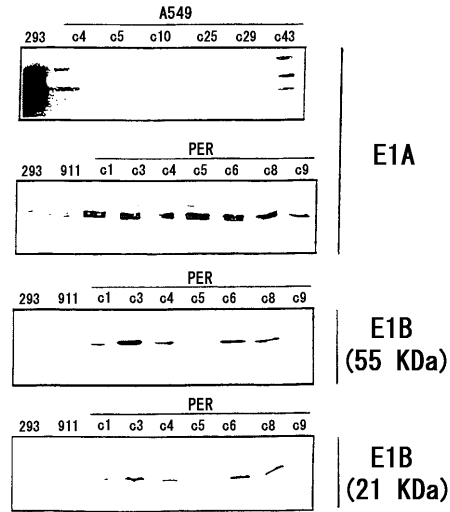
FIGURE 5
pIG.NEOの構築

【 図 6 】



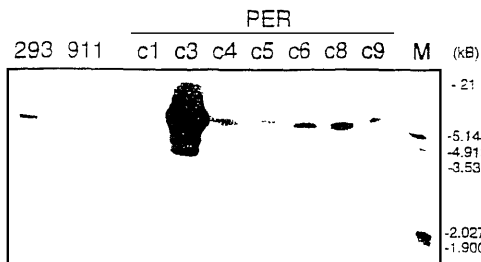
【図 7】

FIGURE 7
pIG.E1A, NEO 及び PERクローンでトランスフェクトされた
A549クローンの ウェスタンブロット分析
(pIG.E1A, E1B でトランスフェクトされた HER細胞)



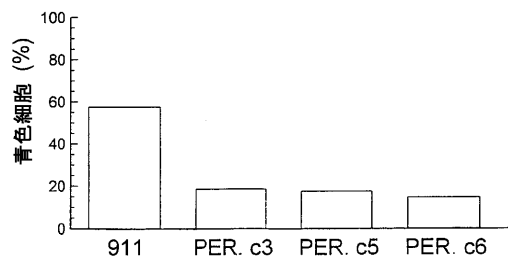
【图 8】

FIGURE 8
293, 911 及び PER 細胞系列の サンプル ロット 分析



【図 9】

FIGURE 9
PER. C3. PER. C5. PER. C6 及び 911 細胞のトランスフェクション効率
細胞を 6-well の皿に培養し、リソ酸カプシム共沈によって
5 μ g の pRSV. lacZ でトランスフェクトさせた (n=2)。
48 時間後、細胞を X-GAL で染色した。
青色細胞の百分率の平均を示す。



【 図 1 0 】

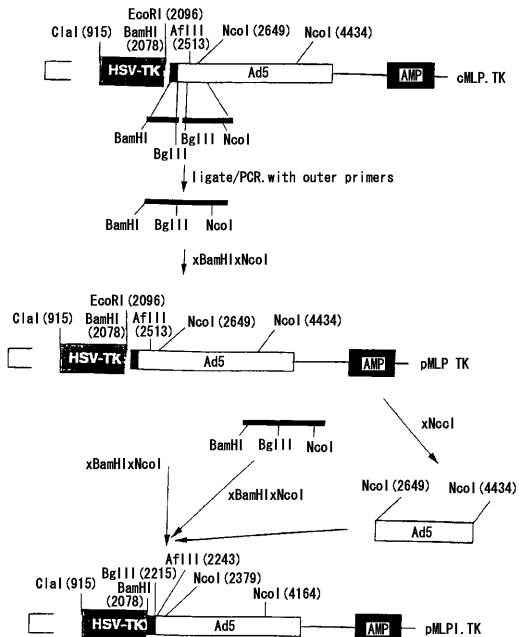
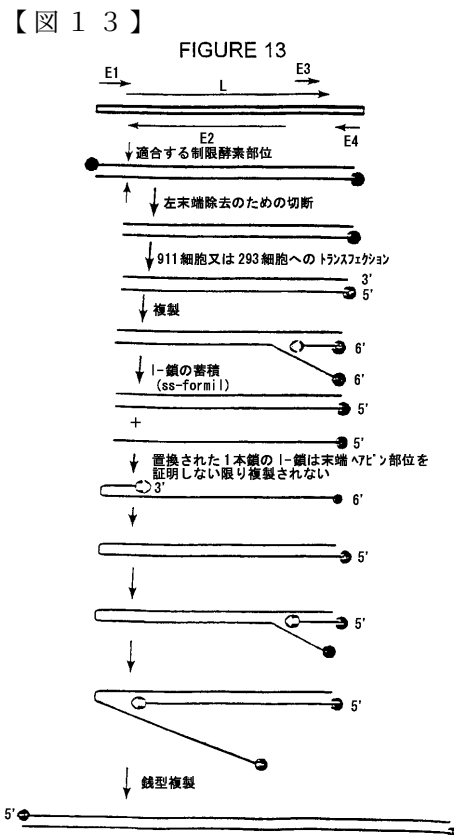
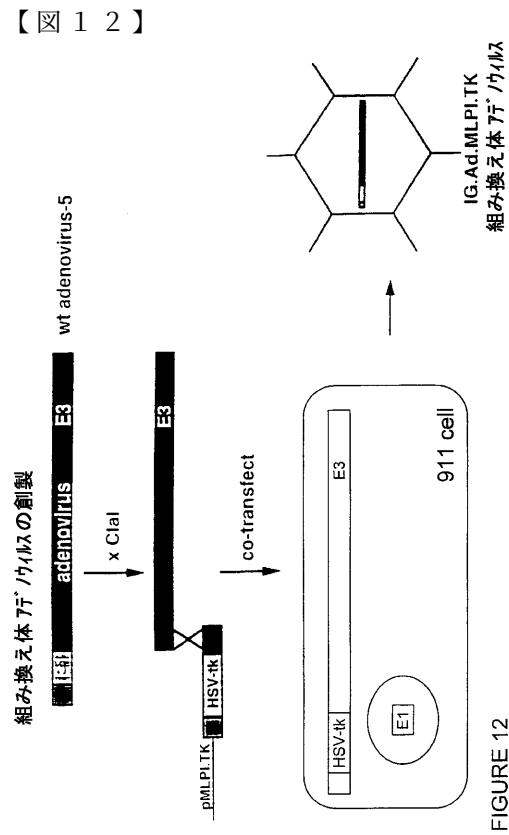
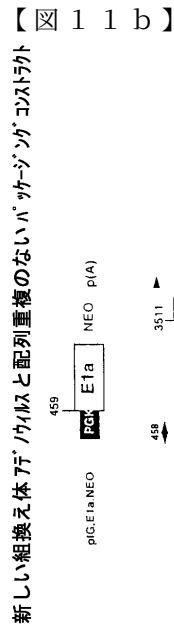
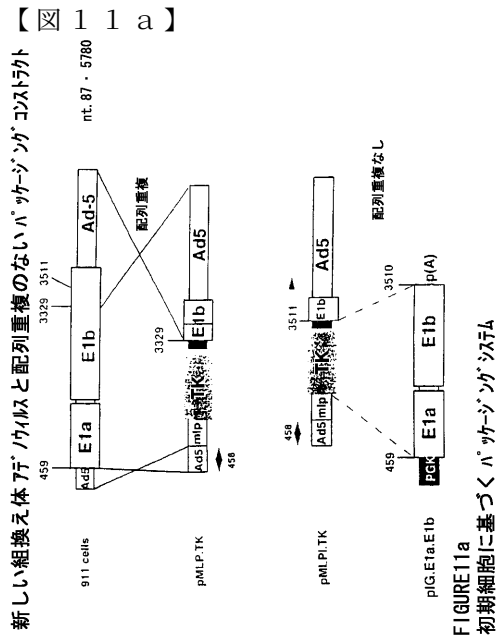


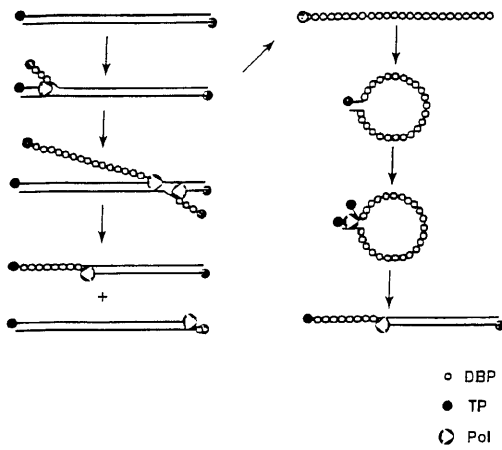
FIGURE10
pMLP.TKからのpMLP.I.TKの構築



【図 14】

FIGURE 14

アデノウィルスの複製



【図 15】

この実験では、HP/asp配列を含有する単鎖のDNA分子の潜在的なヘアピン立体配座(コンフォメーション)を用いた。アニールされたオリゴヌクレオチドのペアであるHP/asp1とHP/asp2を含有するプラスミドpICLhaの制限エンドヌクレアーゼ Asp718 I による切断により、線状の二重鎖のDNAフラグメントが得られるであろう。必要とされるアデノウィルス遺伝子が存在する細胞内では、ITR配列を有する末端で複製が開始される。分子鎖が伸長される間に、一方の鎖が置換される。一本鎖の置換された鎖状分子の末端は、上述のコンフォメーションをとることができる。このコンフォメーションでは、3'-自由末端が、細胞性及び/又はアデノウィルス性のDNAポリメラーゼのためのプライマーとされ得る。結果として、置換された分子鎖の転換が二重鎖の形態で起こる。

```

5' -GTACACTGACCTAGTGCCGCCCGGGCA
      |||||
3' -GATCACGGCGGGGCCGA
  
```

【図 16】

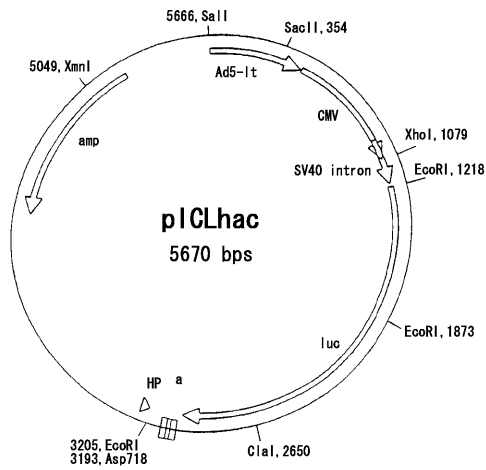
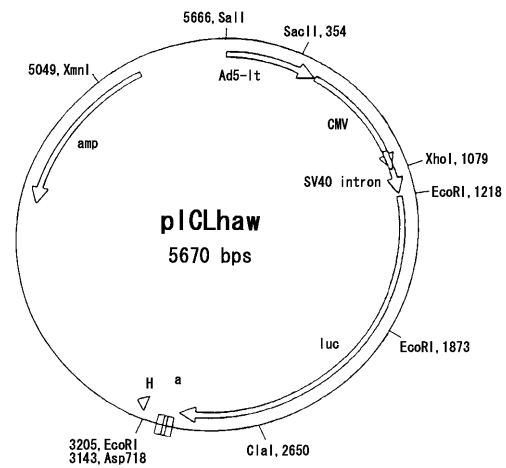


FIGURE 16

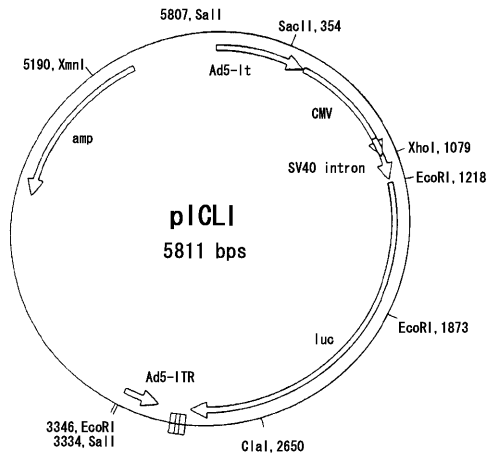
【図 17】

FIGURE 17



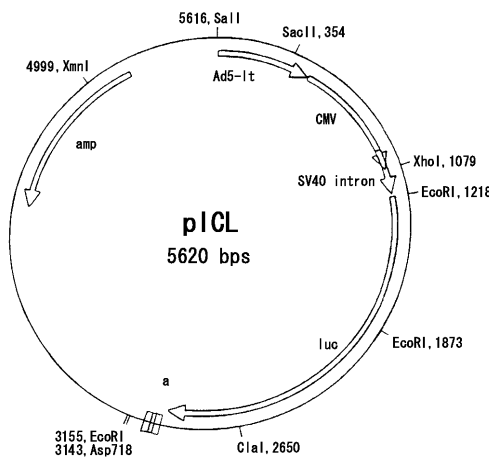
【図 18】

FIGURE 18



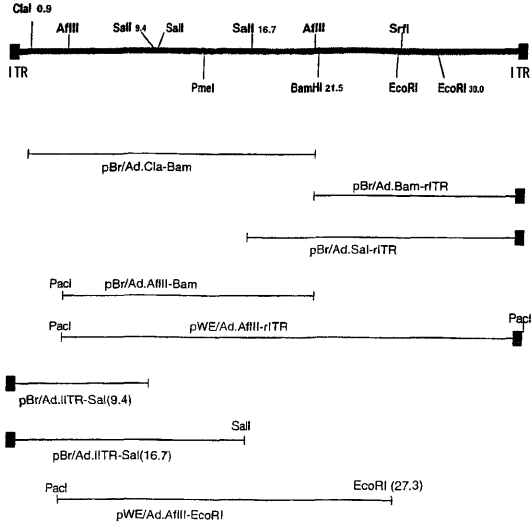
【図 19】

FIGURE 19



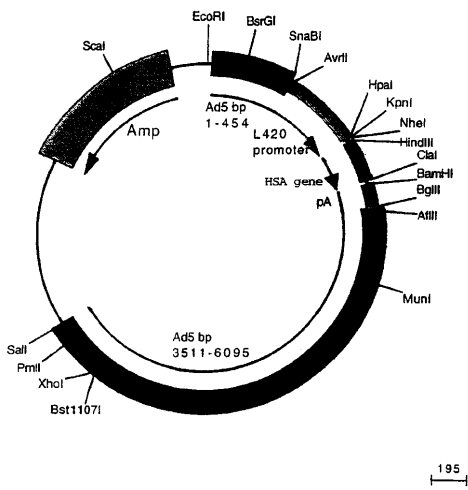
【図 20】

FIGURE20: クローンされたアデノウイルスのフラグメント



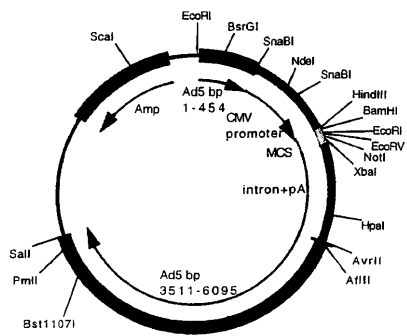
【図 21】

FIGURE21: ターゲットプラスミド pAd5/L420-HSA



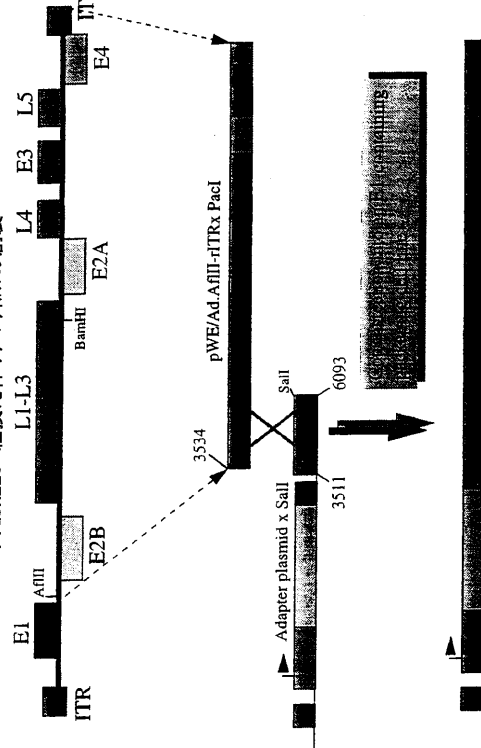
【図 22】

FIGURE22:7タープ-ラスミト pAd5/CLIP



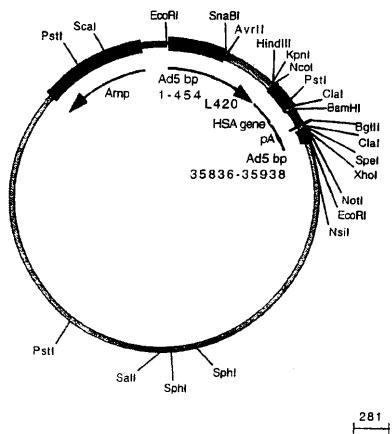
【図 23】

FIGURE23:組換え体7タープの創製



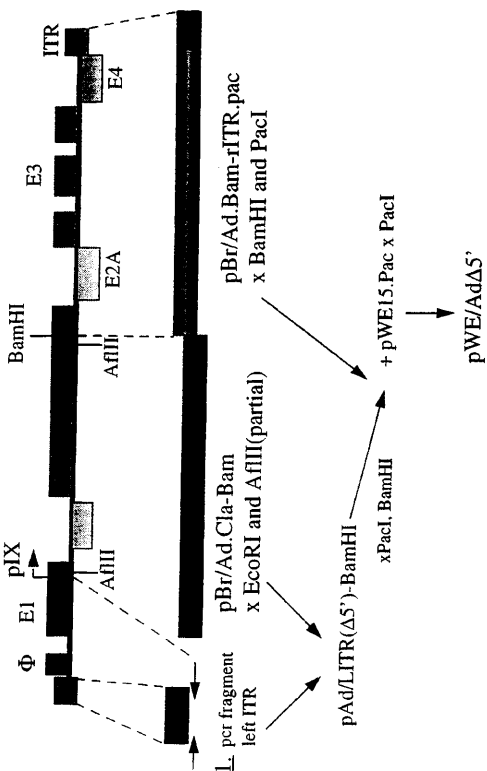
【図 24】

FIGURE24: 最小の7タープウイルスベクター pMV/L420

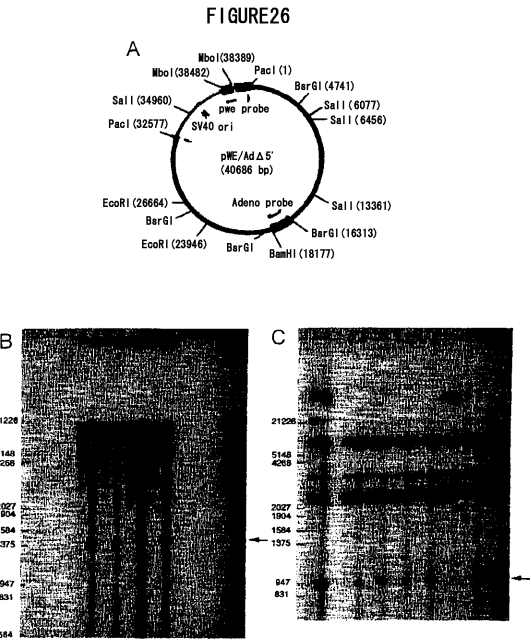


【図 25】

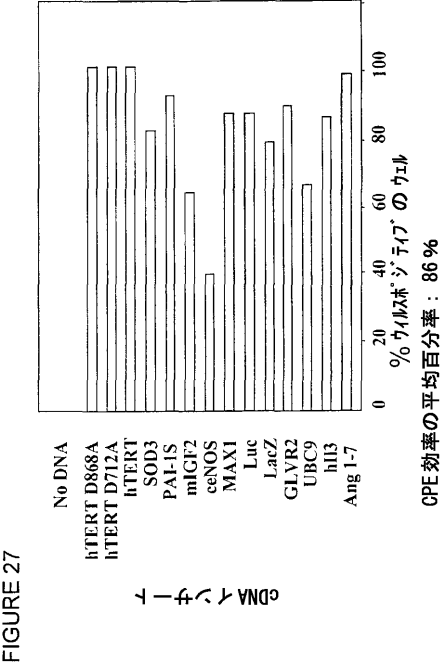
FIGURE25:pWE/AdΔ5'の構築



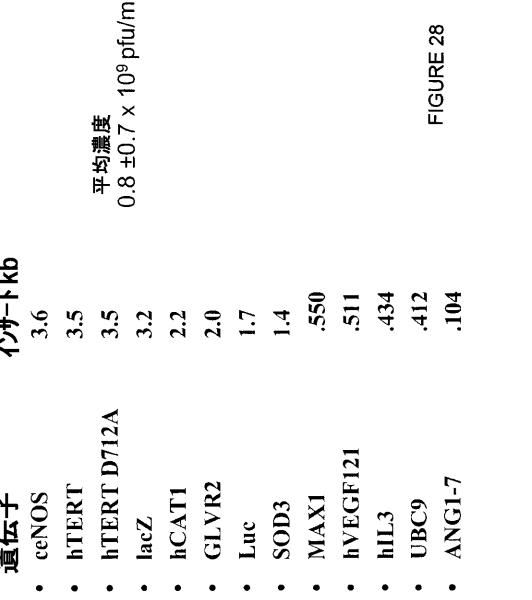
【図 26】



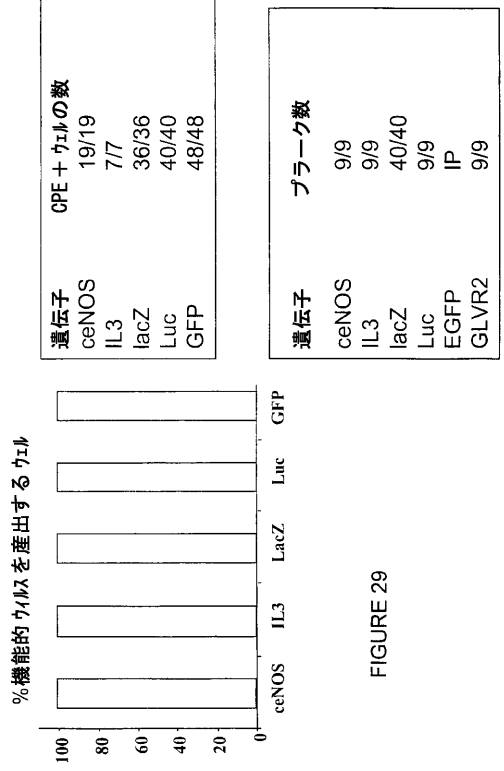
【図 27】



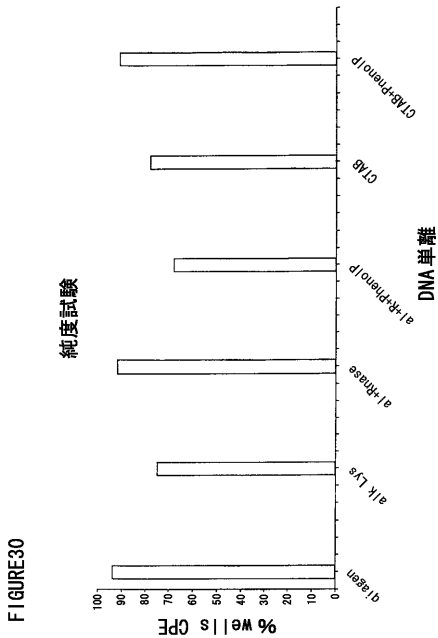
【図 28】



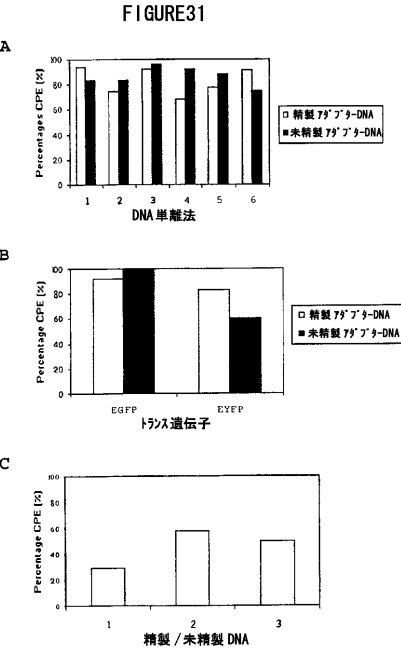
【図 29】



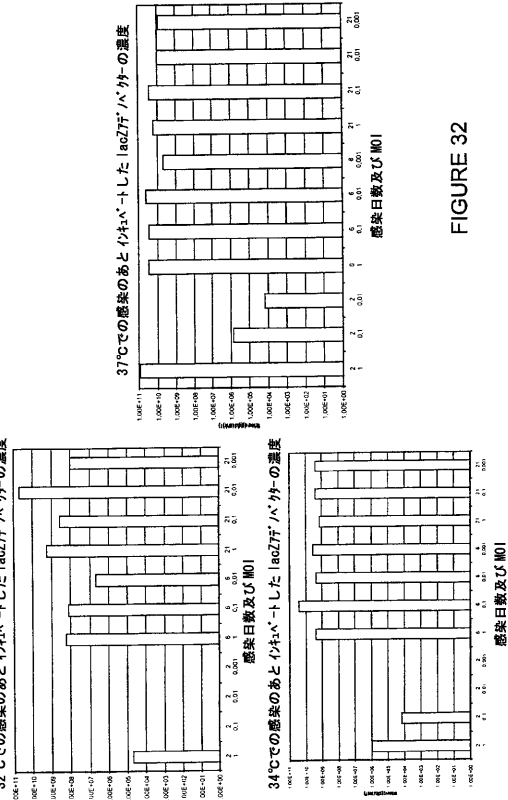
【図 30】



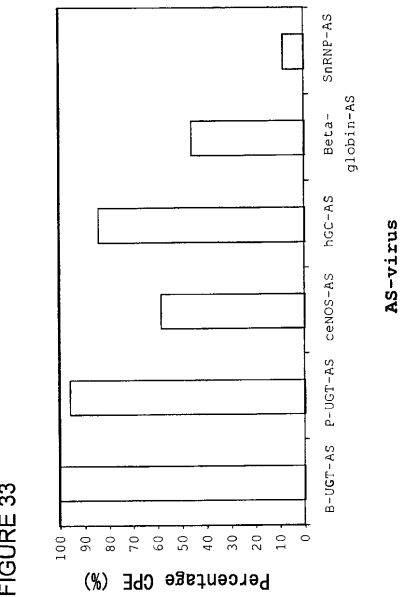
【図 31】



【図 32】



【図 33】



【図 3 4 A】

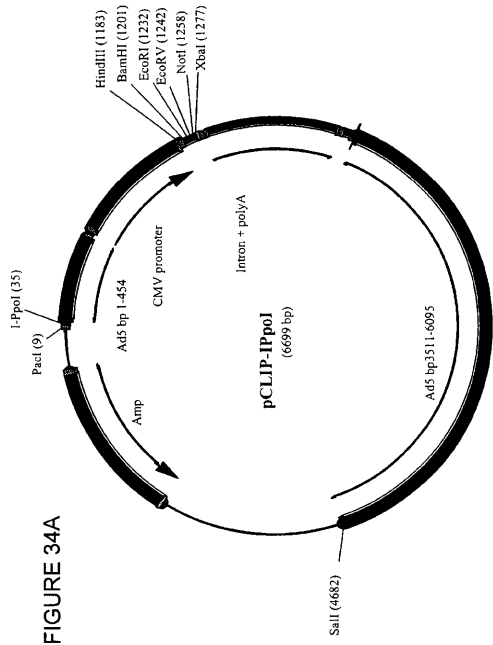


FIGURE 34A

【図 3 4 B】

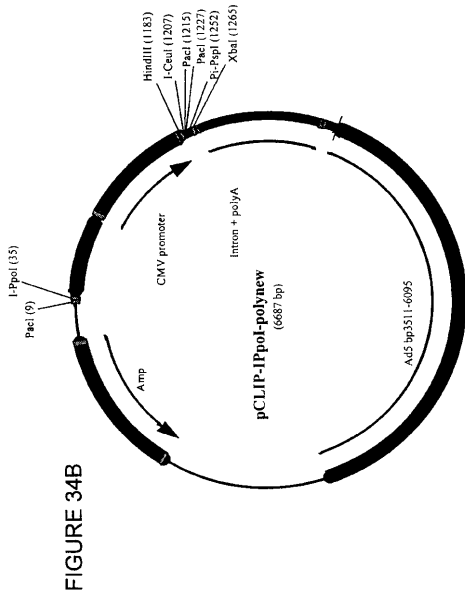


FIGURE 34B

【図 3 4 C】

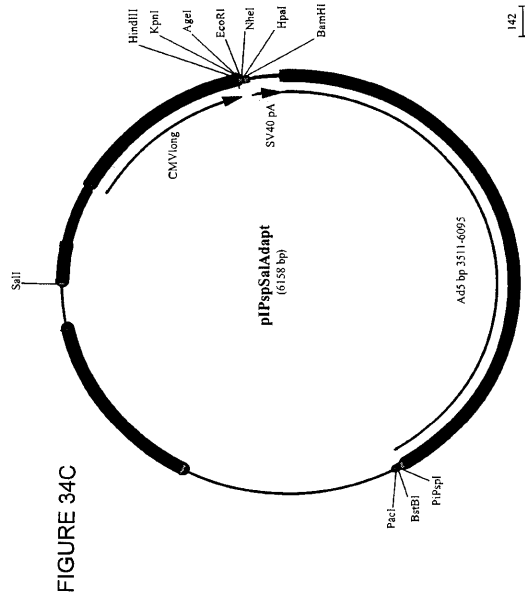


FIGURE 34C

【図 3 4 D】

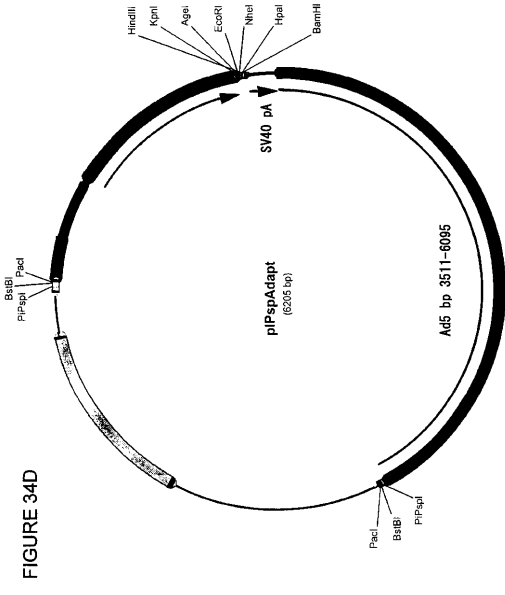


FIGURE 34D

【 3 4 E 】

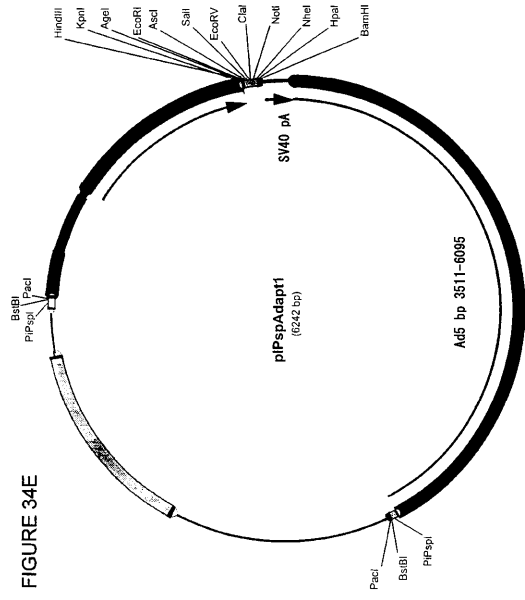


FIGURE 34E

【 3 4 F 】

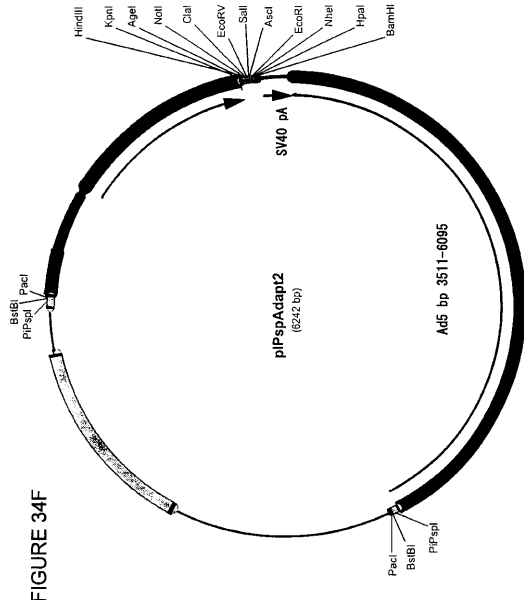


FIGURE 34F

【 3 4 G 】

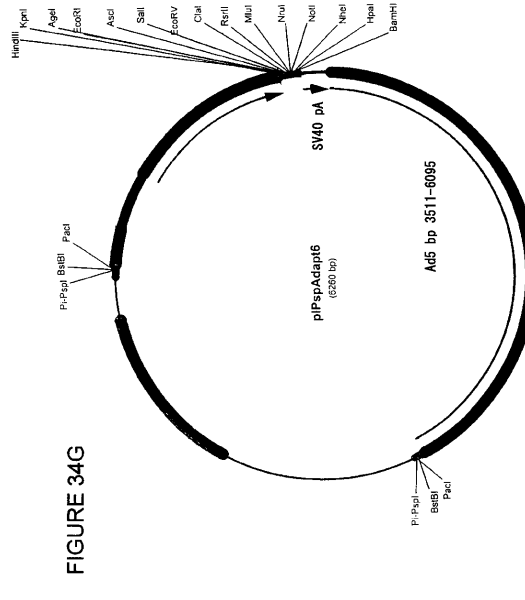


FIGURE 34G

【 3 4 H 】

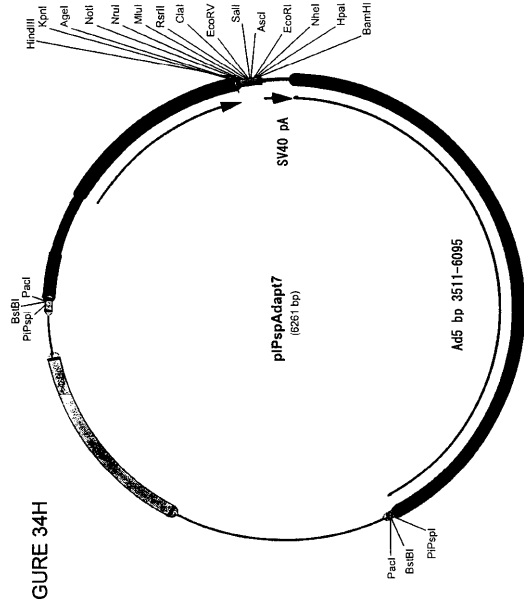


FIGURE 34H

【図 3 4 I】

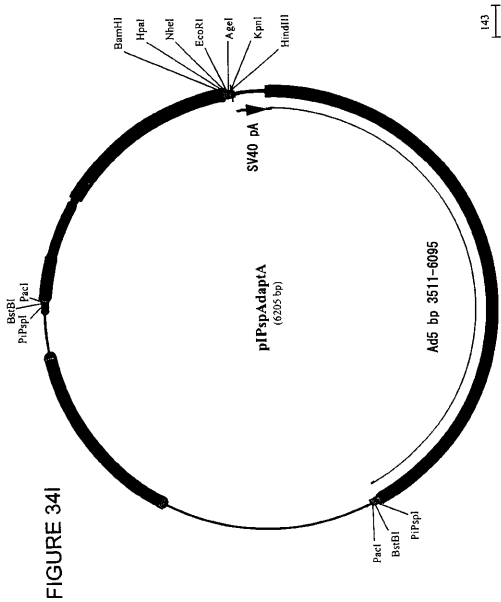


FIGURE 34I

【図 3 4 J】

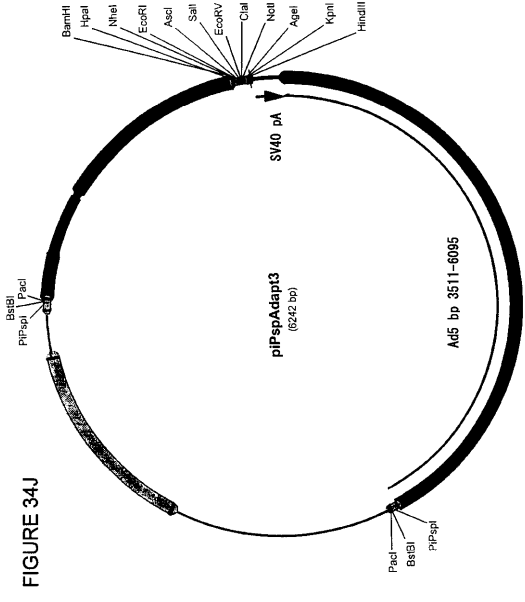


FIGURE 34J

【図 3 4 K】

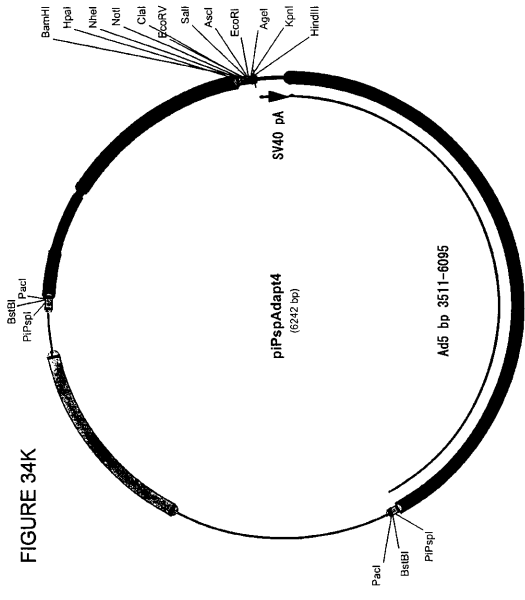


FIGURE 34K

【図 3 4 L】

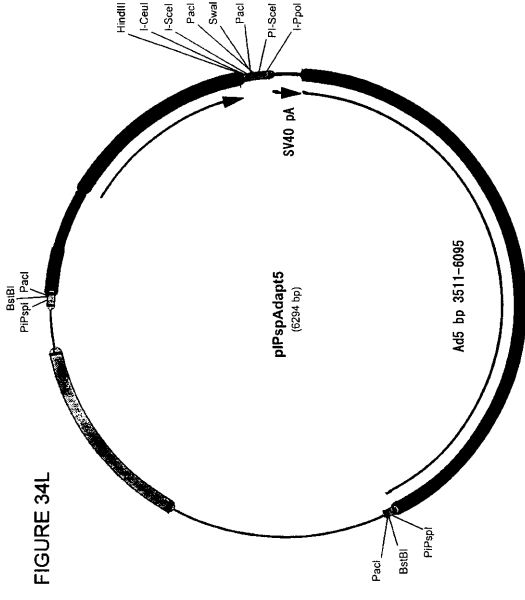
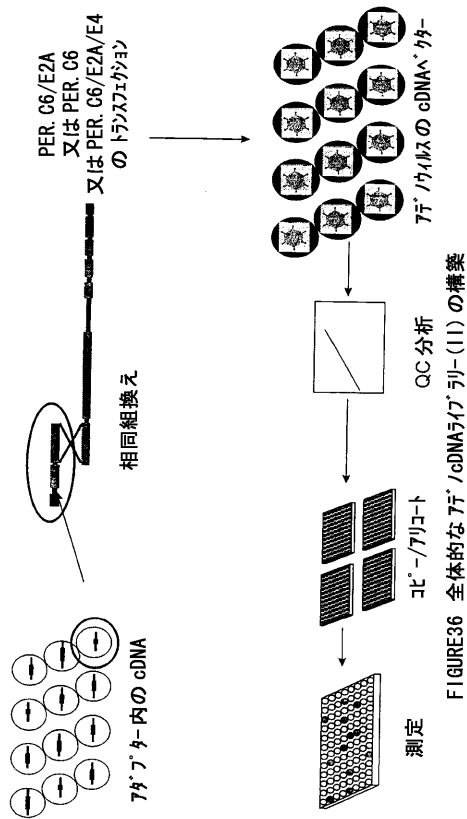


FIGURE 34L

【図 36】



【図 38】

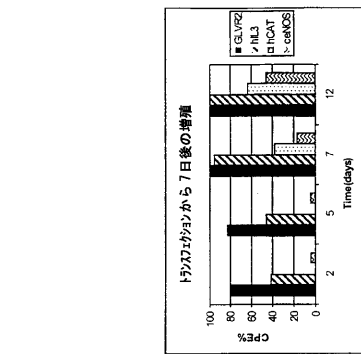
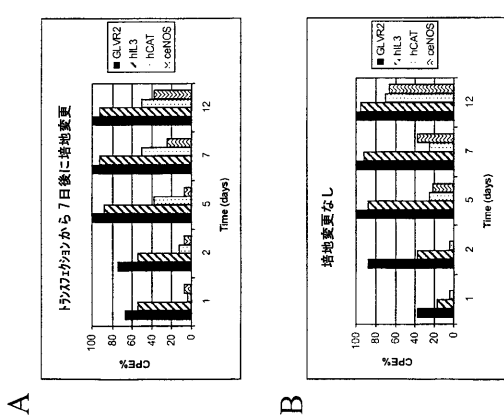


FIGURE 38

【図 39】



【図 37】

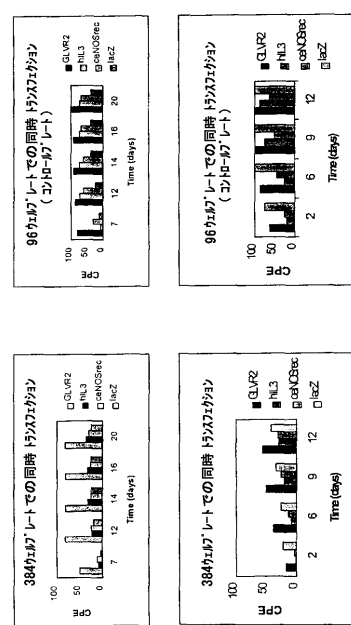


FIGURE 37 実施例 21 の 384ウェルプレートにおける経過

【図 39】

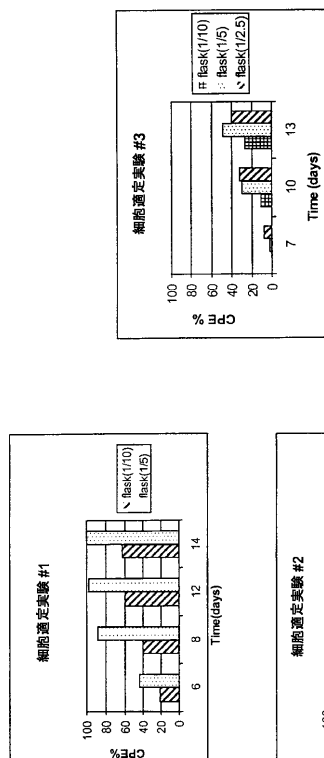


FIGURE 39

【図 40】

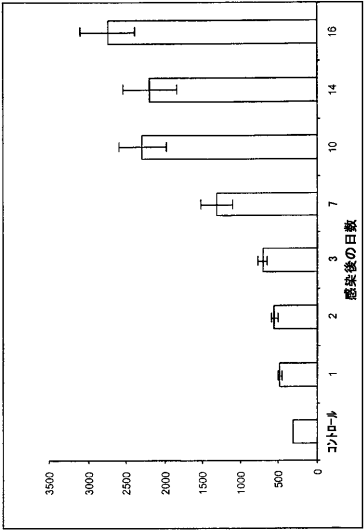


FIGURE 40

【図 41】

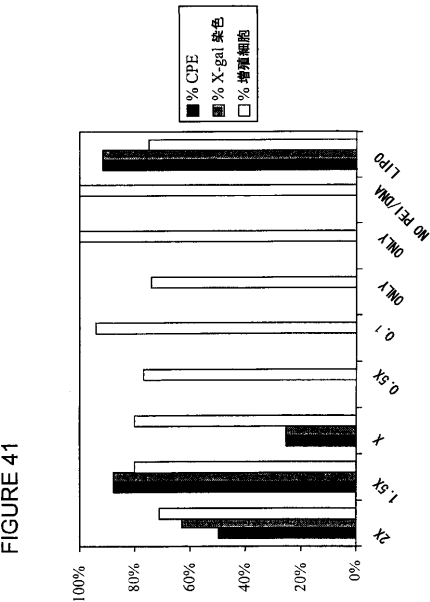


FIGURE 41

【図 42】

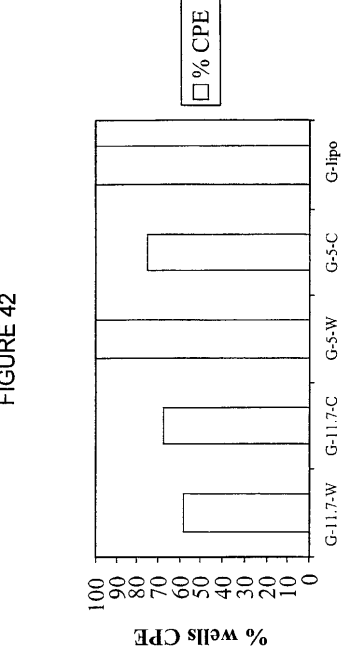


FIGURE 42

【図 43】

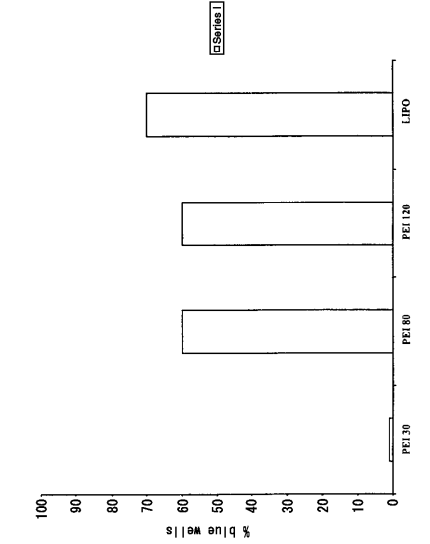


FIGURE 43

【図 4 4】

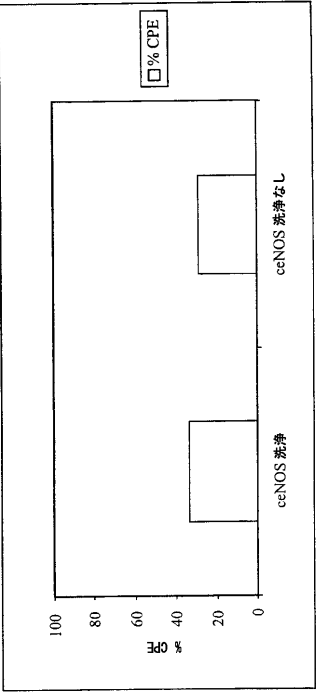


FIGURE 44

フロントページの続き

- (72)発明者 フォーゲルス, ロナルド
オランダ エヌエルー 3 4 6 1 エイチダブリュー リンスショウテン ファン リートラーン
4
- (72)発明者 ボウト, アブラハム
オランダ エヌエルー 2 7 5 1 エーエル モエルカペーレ コイマンスストラート 2 4
- (72)発明者 ファン エス, ヘルムート
オランダ エヌエルー 2 1 3 3 ディージェイ フッフドールプ バンドホルム 8 9

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第97/000326 (WO, A1)
特開平08-238092 (JP, A)
特表平09-509330 (JP, A)
国際公開第97/027212 (WO, A1)
国際公開第97/027213 (WO, A1)
特表2002-507897 (JP, A)
国際公開第99/32618 (WO, A1)
国際公開第98/32860 (WO, A1)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.91,No.7(1994)p.2629-2633
Genome Res.,Vol.6,No.9(1996)p.781-790
Curr.Opin.Biotechnol.,Vol.8,No.5(1997)p.629-634
Nucleic Acids Res.,Vol.25,No.13(1997)p.2598-2602
Genomics,Vol.50,No.3(1998.Jun.15)p.306-316

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed