

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4749334号
(P4749334)

(45) 発行日 平成23年8月17日 (2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年5月27日 (2011.5.27)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/00

請求項の数 5 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2006-530273 (P2006-530273)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月4日 (2004.10.4)
 (65) 公表番号 特表2007-507216 (P2007-507216A)
 (43) 公表日 平成19年3月29日 (2007.3.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/052428
 (87) 国際公開番号 W02005/033320
 (87) 国際公開日 平成17年4月14日 (2005.4.14)
 審査請求日 平成19年10月1日 (2007.10.1)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP03/50679
 (32) 優先日 平成15年10月2日 (2003.10.2)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 301055549
 クルセル ホランド ベー ヴェー
 オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデ
 ン アルキメデスウェツハ 4
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100072051
 弁理士 杉村 興作
 (74) 代理人 100107227
 弁理士 藤谷 史朗
 (74) 代理人 100114292
 弁理士 来間 清志
 (74) 代理人 100119530
 弁理士 富田 和幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えアデノウイルス用パッケージング細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞のゲノム中に統合されるアデノウイルスの E 1 A および E 1 B - 1 9 K および E 1 B - 5 5 K のコード配列をもち、前記アデノウイルス配列が前記細胞において発現されるようにそれらの配列が調節配列の制御下にある細胞を調製する方法であって、前駆体細胞中に、次の

E 1 A および E 1 B - 1 9 K および E 1 B - 5 5 K のコード配列を備え、前記 E 1 A および少なくとも 1 種の E 1 B コード配列が少なくとも 8 k b によって分けられた単一の核酸分子であるもの、または E 1 A および E 1 B - 1 9 K および E 1 B - 5 5 K のコード配列を備える 2 つまたはそれよりも多くの核酸分子で、前記 2 つまたはそれよりも多くの核酸分子は末端間結合によって単一分子を形成するとき、前記 E 1 A および少なくとも 1 種の E 1 B コード配列が少なくとも 8 k b によって分けられたものを導入するステップを含む、細胞の調製方法。

【請求項 2】

前記 E 1 A および少なくとも 1 種の E 1 B コード配列は少なくとも 1 0 k b によって分けられた、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記 E 1 A および少なくとも 1 種の E 1 B コード配列は少なくとも 3 4 . 5 k b によって分けられた、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

E 1 欠損アデノウイルスベクターを、ヘルパー依存性 E 1 含有粒子を生じさせずに補うことが可能な、請求項 1 - 3 のいずれか一項記載の方法によって得られた、細胞。

【請求項 5】

E 1 領域において欠失をもつ組換えアデノウイルスのバッチを生成するための方法であって、次のステップ

- a) 前記組換えアデノウイルスまたはそのゲノムを、前記組換えアデノウイルスの欠失 E 1 配列を補うことが可能なアデノウイルスの E 1 配列を備えた細胞中に導入すること、
 - b) 前記細胞を培養すること、および前記組換えアデノウイルスを収集すること
- を含み、

前記細胞は請求項 4 記載の細胞であることを特徴とする、方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、分子及び細胞生物学の分野、更に詳しくは、パッケージング細胞、及び組換えアデノウイルスのバッチの生成のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

複製欠損組換えアデノウイルスは、例えば、遺伝子治療において、及びワクチン接種目的のために有用である。それらは、通常、アデノウイルスの E1-領域を欠き、及び従って E 1 配列を提供する補完細胞 (complementing cells) において増殖する。パッケージング細胞は、細胞において包まれ、組換えウイルス粒子を形成するベクターの複製のために必要なすべての情報を提供する。パッケージング細胞の例は、293細胞であり、それは、アデノウイルス 5 のゲノムのヌクレオチド 1-4344 を含み (Louis (ルイス) 等、1997 年)、それは、5' 逆方向末端反復 (ITR、inverted terminal repeat)、パッケージング信号、E1A 及び E1B のコード配列及び pIX コード配列を含む。パッケージング細胞におけるアデノウイルス配列及びベクター間の重複 (overlap) は、これらの配列間の相同組換えを導くことがあり、結果として、複製適格性アデノウイルス (RCA、replication competent adenovirus) の生成をもたらす [Lochmuller (ロッホミュラー) 等、1994 年]。この問題は株細胞 (cell line) 及びベクターからなるパッケージングシステムを用いることによって解決されており、それらは、かかる重複配列 (overlapping sequences) を欠くことによって互いに適合される [Fallaux (ファラオー) 等、1998 年; US patent (米国特許) 第 5,994,128 号明細書]。かかる適用において特に有用な株細胞の 1 種の例は、PER.C6^(R) (商標) 株細胞である [米国特許第 5,994,128 号明細書; Nichols (ニカルズ) 等、2002 年]。

20

30

【0003】

最近、PER.C6^(R) 細胞を、PER.C6^(R) のゲノムにおいて E1 配列と相同な 177bp の配列をいまだに含むベクターと併せて用いる際、単一のクロスオーバー事象がヘルパー依存性複製適格性ウイルスの低頻度 (low frequency) での生成をもたらす場合があることが報告された [Murakami (ムラカミ) 等、2002 年]。生じた非定型の RCA はヘルパー-依存性 E1 含有粒子 (H 40 DEP、helper-dependent E1 containing particle) と称された。予期されるように、ベクターが用いられ、それが E1 配列との配列重複を PER.C6^(R) 細胞のゲノムにおいて欠くとき、この種の粒子の出現は回避された (Murakami 等、2002 年)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、今回、予想に反して、適合したベクター及び PER.C6^(R) 細胞のシステムを用いると、組換えアデノウイルスの若干のバッチが極めて低頻度で粒子によって汚染され、それらは、細胞病理学的効果 (CPE、cytopathological effect) が E1 配列を欠く細胞において生じ得ることがわかる。粒子はヘルパー依存性で、及び E1-配列を含み、及び従ってまた H 50

DEPでもある。このHDEPは、ベクター及びパッケージング細胞間の実質的な相同性の不存在下に生じる(Murakami等、2004年参照)。RCAは、規制当局(regulatory authorities)によって、潜在的な問題として認識され、及び臨床的使用のためのパッチにおけるRCAの検出は必須であり[USDHHS、FDA、CBER、Guidance for Industry(産業用ガイダンス)、Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy(ヒト体細胞治療及び遺伝子治療のためのガイダンス)、1998年3月]、HDEPの安全性の観点は不明である。HDEPは、それが自己複製のための必要なウイルス遺伝子を欠くので、複製欠損性(replication deficient)であり、及び従って、HDEPは宿主において広まらない。しかし、組換えベクター又は野生型アデノウイルスの同じ細胞での存在がHDEPの救出(rescue)及び拡がりを引き起こすかもしれないという理論的な可能性は完全には除くことができない。それ故に、少なくとも、組換えアデノウイルス粒子のパッチの調製の間のE1-含有粒子の生成を防止するための手段及び方法について潜在的な必要性が存在する。この目的のために、本発明は、新しい株細胞を調製する方法、新しい株細胞、及びRCA-を含まない(フリー)及びHDEP-フリーの組換えアデノウイルスベクターのパッチを作製するためのそれらの使用を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

(図面の説明)

図1はpIG.E1Aのマップである。図2はpIG.E1AB21のマップである。図3はpE1Bのマップである。図4はpCC.E1Aのマップである。図5はpCC.E1AB21のマップである。図6はpCC101のマップである。図7はpCC105のマップである。図8はpCC.55Kcolのマップである。図9はpIG.E1Bのマップである。図10はpCC.E1Bcolのマップである。図11はpEC.E1Bのマップである。図12はpSC.55Kのマップである。

図13は一次細胞(primary cells、初代培養細胞)の形質転換に適切な大分子の設計の例である。

I: スペース-DNAによって隣接される(flanked)E1A及びE1B蛋白質(A及びB、それぞれの)のためのコード領域を有する単一のコスミドベクターの図式的な提示であり、RE=スペース-DNA又はE1配列において存在しない制限酵素認識部位であり、

II: スペース-DNAによって隣接されるいずれかのE1A(A)又はE1B(B)のコード領域を持つ2種の別々の核酸(例えば、プラスミド又はコスミドベクター)の図式的な表示であり、

III: 一次細胞の宿主細胞ゲノムへの、Iからの分子なのか、又はIIの2種の分子での形質転換、及び統合(integration、組込み)後に起こるかもしれない状態である。宿主ゲノムにおいて、挿入物(insert)はスペース-DNA、及び逆方向にされる配向(inverted orientation)におけるその断片/それらの断片群の第2のコピーによって分けられるE1A領域及びE1B領域で構成される。J: 逆方向反復の間の接合部(junction)。これらの配列の1部分(矢によって示される)が組換えアデノウイルスにおいて組み換えられる場合、ゲノムは包まれるには余りにも大きくなる。ITR: 逆方向末端反復、: パッケージング信号、FI: 組換えウイルス中に挿入される断片で、ここには逆方向反復配列を含む。逆方向反復の存在は、その後に必要なウイルスゲノムからの他の配列を欠失させる工程に役立つかもしれないが、逆方向反復配列の存在は、組み換えられるウイルスの左端の鏡像重複(mirror-imaged duplication)をウイルスゲノムの複製の間にもたらし、及び再びスペース-DNAのために包まれるには余りにも大きなゲノム(重複される断片、DF)を生じさせる。

図14はpIG.E1A.E1Bのマップである。図15はpCC200のマップである。図16はpCC205のマップである。図17はpdys44のマップである。図18はp44-l.ccE1Aのマップである。

図19は生じる株細胞からの蛋白質溶解物(lysates)のウエスタンブロットである。レーンは、1: HER01-B-71、2: HER01-H-86、3: HER01-H-87、4: HER01-H-88、5: HER01-H-89、6: HER01-B-90、7: HER01 pn06細胞、8: PER.C6細胞である。

図20は形質転換細胞クローン、-: 陰性対照(control); MOF: 蛍光の平均; B-71、B-90、H-86、H-87、H-88、H-89: 生じる形質転換細胞クローンを用いるE1-欠失アデノウイルスベクターの相補性(complementation)の例示である。

図21は、形質移入(トランスフェクション)のために用いるAd5.E1構築物の例3における

図式的概観である。ゲノムDNAを消化するため、及び探査子(プローブ)断片を生じさせるために用いる制限部位を示す。E1A及びE1BのDNA断片をE1A-含有断片の5'端で番号付けが開始されるヌクレオチドと仮想的に連結(linked)する。

図22は本発明の若干の具体例の図式的な提示である(寸法通りではない)。調節配列(Regulating sequences)(プロモータ及びポリA信号のようなもの)は描いていない。

Aは、アデノウイルスゲノムのE1-領域の自然な配置であり：E1Aに次いでE1Bがあり、それはE1B-19K及びE1B-55Kからなる。スペーサー配列はE1A及びE1Bの間に存在しない。従来技術のパッケージング細胞は、DNAをこの配置において導入することによって構成され、及び従ってまた、E1領域をそれらのゲノムにおけるこの配置において持つ。

Bは、本発明に従う2種の最も単純な可能な配置であり、そこでは、スペーサー[又はスタッファ(詰めもの、stuffer)]がE1領域において存在する。1は、E1A及びE1B-19Kの間に導入されるスタッファ、2は、E1B-19K及びE1B-55Kの間に導入されるスタッファである。理論的根拠は、E1A、E1B-19K及びE1B-55Kの間の距離を、自然な状況に比べて増加させ、これらの3種の読み枠の単一アデノウイルス粒子への同時取込みの可能性を低下させるか、又は全体を妨げる(RCA及びHDEPを妨げる)。スタッファは、本発明に従う株細胞を得るには、少なくとも4kbであるべきであり、前記細胞はアデノウイルスのE1A及びE1B-55K及びE1B-19Kのコード配列をそのゲノムにおいて備えており、前記細胞は核酸配列のストレッチ(伸張)を欠き、そこでは、前記E1A及び双方のE1Bのコード配列が4kb未満によって前記ゲノムにおいて分けられることを特徴とする。読み枠の次数(程度、order of)は、それらが、ゲノムにおいて、E1A、E1B-19K及びE1B-55Kの発現があるような方法ですべて存在する限り、問題にならない。したがって、次数は、E1A-E1B/19k-E1B/55k、E1B/19k-E1B/55k-E1A、E1B/55k-E1B/19k-E1A、E1B/55k-E1A-E1B/19k又はE1B19k-E1A-E1B55kでよい。E1B/19k及びE1B/55kが隣接し、それらが単一の転写単位としてか、又は別々の転写単位として存在してよいとき、これは、本発明にとって重大ではない。双方の配置(1及び2)は本発明にかかるこの間隔基準(spacing criterion)を満たす株細胞を生じさせることができる。少なくとも6、8、10、15又は34.5kbのスタッファ長は、すべての3種の読み枠を持つが、核酸配列のストレッチを欠く本発明に従う細胞を生じさせることができ、そこでは、前記E1A及び双方のE1Bのコード配列が6、8、10、15又は34.5kb未満によってそれらのゲノムにおいて分けられる。このことは、E1A+E1B-19K+E1B-55Kを含有する単一の断片が、互いに、生じる細胞から由来すべきとき、この断片が、少なくとも7kb(スタッファ4kb)、9kb(スタッファ6kb)、等、少なくとも37.5kb(34.5kbのスタッファ)までで、Aにおける状況とは対照的であるべきで、そこでは、これらの配列は、かかる構成物(E1A+E1B-19K+E1B-55Kの読み枠が互いに約3kbを備える)を用いて生じるパッケージング細胞のゲノムの単に3kbに過ぎない断片において見出すことができる。

Cは、Bの原理の拡張であり：Bにおいて示すような断片が互いに隣接して統合し得るので、スタッファがまた、本発明の好適例においてE1Aの前及び/又はE1Bの後に位置される(E1Bの第1の反復によるE1Aの第2の反復への近接近を妨げる)。得られるパッケージング細胞のゲノムを示すが、ここでは、スタッファDNAを備えるE1領域の2種のコピーが、互いに隣接してタンデム(直列、tandem)反復において統合されるときに示される。本発明にかかるこれらのパッケージング細胞は、それらのゲノムE1A及びE1B-19K及びE1B-55Kにおいて統合するが、核酸のストレッチをそれらのゲノムにおいて含んでおらず、そこでは、前記E1A及び双方のE1Bのコード配列は4kb未満、等によって、スタッファ長に依存して分けられる[この例においては、E1A及びE1B-19Kの間(第1番(no. 1))のか、又はE1B-19K及びE1B-55Kの間(第2番(no. 2))の少なくとも4kb、及び少なくともE1Aの上流の2kb及びE1B-55Kの下流の2kb(直接に隣接して統合されるとき互いに4 kb)であるべきである]。

【 0 0 0 6 】

(発明の記載)

本発明は、アデノウイルスのE1A及びE1Bの配列を備えるパッケージング細胞を生じさせる方法を記載し、そこでは、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード領域が互いから細胞のゲノムにおいて分けられる。この目的のために、少なくとも3種の具体例を提供する。第1

10

20

30

40

50

の具体例において、E1A及びE1Bを前駆細胞において異なる時点で導入することができ、E1A及びE1Bが同じ染色体位置上に共-統合(co-integrate)される機会を減らす。第2の具体例では、同じ遺伝子座への共-統合の機会、E1A及びE1Bのコード配列を前駆細胞中に、2種の異なる分子上で、さもなければ、これらの配列間の相同組換えを導くことがある重複配列を欠くものにおいて導入することによって減らす。第3の具体例では、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード領域を1種の核酸分子に基づいて導入し、そこでは、これらの配列がある所定の距離によって分けられる。第3の具体例において、また、単一の核酸分子の代わりに、2種又はそれよりも多い種類の核酸分子を導入することができ、それらは、これらの2種又はそれよりも多い種類の分子が、1種の分子、例えば、連結、組換え、及び同様のものによって形成される場合に、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード領域が所定の距離によって分けられる基準を満たすことは明らかである。得られるパッケージング細胞は、E1A及び双方のE1Bのコード領域が互いから距離を隔てて存在し、及び従って、そのようなパッケージング細胞において増殖する組換えアデノウイルスのゲノム中に組み込まれるE1A及び双方のE1Bのコード配列の機会を減少させることで特徴付けられる。

【0007】

本発明は、E1欠損アデノウイルスベクターを、ヘルパー依存性E1含有粒子を発生させることなく補うことができる細胞を調製する方法を提供するが、この方法は、次の工程で構成される：a)前駆体又は祖先に、E1A遺伝子機能及びE1B遺伝子機能をコードする細胞核酸配列(群)を、又は前駆細胞が既に1種のE1A又はE1B遺伝子機能を備える場合には、他のE1A及びE1Bの遺伝子機能を導入する工程；及びb)1種又はそれよりも多い種類のE1遺伝子機能について欠損する組換えアデノウイルスベクターを補うのに、細胞を用いるときに、ヘルパー依存性E1含有粒子の形成を妨げる染色体配置において得られるE1A及びE1Bを持つ細胞を選定する工程又は確認する工程を含んでおり、前記ベクターは、さもなければ、相同組換えを起こすことがある染色体性に位置付けられる(chromosomally located)E1配列との実質的な重複を持つ核酸配列を欠く。

【0008】

1種の局面では、本発明は、アデノウイルスE1A及びE1B-19K及びE1B-55Kのコード配列を持つ細胞を調製する方法を提供し、そこでは、前記配列を備える核酸配列は、前駆細胞中に導入され、その方法は、次の点において特徴付けられる：a)前記配列を互いに備える少なくとも2種の核酸分子を前駆細胞中に導入し、そこでは、前記E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列が異なる核酸分子上に存在し、それらが、前駆細胞中に、異なる時点において導入され、及びそこでは、前記前駆細胞が仔ラット腎細胞ではなく；又はb)E1Aコード配列を備える核酸分子及びE1Bコード配列を備える核酸分子が前駆細胞中に導入され、そこでは、前記核酸分子が、さもなければ、前記少なくとも2種の分子間の相同組換えを導くことがある実質的な重複を欠き；又はc)E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列を備える前記核酸配列が、これらが単一の核酸分子を形成するときに、少なくとも4kbによって単一の核酸分子上か、又は2種又はそれよりも多い種類の核酸分子上で分けられる。好ましくは、具体例において、c)前記配列は少なくとも10kb、より一層好ましくは少なくとも34.5kb又はそれよりも大きいものによって分けられる。好ましくは、分離される配列は非-E1配列であり、その結果、E1A及びE1Bの一緒の双方の発現カセットの単一ウイルスゲノムにおける統合は、極めて起こりそうにないか、又は不可能にされる。代わりに、E1A及び少なくとも1種のE1B配列が0-15kbによって分けられるとき、生じる細胞におけるE1-配列の逆方向反復が存在しないことについての選抜を用いて、生じる細胞における組換えアデノウイルスの増殖の際のHDEPの発生の可能性を減少させるか、又は不存在になる細胞について選定することができる。本発明はまた、本発明に従う方法によって得られ得る細胞を提供する。本発明は更に、アデノウイルスのE1A及びE1B-55K及びE1B-19Kのコード配列を細胞のゲノムにおいて備える細胞を提供し、前記細胞が、核酸配列のストレッチを欠き、そこでは、前記E1A及び双方のE1Bのコード配列が4kb未満によって前記ゲノムにおいて分かれることにおいて特徴付けられる。好ましくは、前記細胞は、核酸配列のストレッチを欠き、そこでは、前記E1A及び双方のE1Bのコード配列が10kb未満によって前記ゲノ

10

20

30

40

50

ムにおいて分けられ、より一層好ましくは、前記細胞は核酸配列のストレッチを欠き、ここでは、前記E1A及び双方のE1Bのコード配列が34.5kb未満によって前記ゲノムにおいて分けられる。

【0009】

本発明の別の局面は、アデノウイルスE1配列を備える細胞を、与えるか、又は生じさせる方法を提供するが、そこでは、前記E1配列はE1A及びE1Bのコード配列を含んでおり、前記方法が前記E1配列を備える逆方向反復を欠く細胞を選定する工程を含むことにおいて特徴付けられる。本発明は更に、アデノウイルスE1配列を細胞のゲノムにおいて備える細胞を提供し、そこでは、前記E1配列はE1A及びE1Bのコード配列を含んでおり、前記E1配列が逆方向反復の形態で前記細胞において存在しないことで特徴付けられる。その1具体例では、前記細胞は前記アデノウイルス配列の少なくとも2種のコピーをそのゲノムにおいて備え、それらのコピーが同じ染色体上にあることができる。その別の具体例では、前記細胞は前記E1配列の1種のコピーをそのゲノムにおいて備え、及び更にアデノウイルスの(機能的)pIXを暗号化するそのゲノムにおいて配列を欠く。

【0010】

本発明の別の局面は、E1領域において欠失を持つ組換えアデノウイルスのバッチを生じさせるための方法を提供し、それは、次の工程：a)前記組換えアデノウイルスを、前記組換えアデノウイルスの欠失したE1配列を補うことができるアデノウイルスのE1配列を備える細胞中に導入する工程；b)前述の細胞を培養する工程、及び前記組換えアデノウイルスを収集する工程を含み、その方法は前記細胞が本発明に従う細胞であることで特徴付けられる。前記組換えアデノウイルスの導入工程の代わりに、前記組換えアデノウイルスのゲノムを形成することができる1種又はそれよりも多い種類の核酸断片を用いることによって、組換えアデノウイルスの生成を開始させることもまた可能であり、及びそれは、前記細胞における複製及びパッケージングの後に前記組換えアデノウイルスを形成させることは、当業者にとって明らかである。それ故に、この具体例にとって、組換えアデノウイルスはまた、組換えアデノウイルスのゲノムであることができる。好適例において、前記組換えアデノウイルスは、前記細胞において存在するE1配列との実質的な配列重複を欠き、それは、さもなければ、相同組換えを導くことがある。更に別の具体例では、本発明は、細胞のゲノムにおけるE1配列、及びE1領域における欠失を有する組換えアデノウイルスベクターを備えるパッケージング細胞を含むパッケージングシステムを提供し、そこでは、前記ベクターのゲノムは、前記パッケージング細胞のゲノムにおいてE1配列との実質的な重複を欠き、そこでは、前記パッケージング細胞が本発明に従う細胞であることで特徴付けられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

(発明の詳細な記載)

複製適格性アデノウイルス(RCA)は、ヘルパーアデノウイルスについての必要性を伴わない細胞において複製が可能なアデノウイルス粒子である。‘HDEP’(ヘルパー依存性E1-含有粒子)は、本明細書において用いるように、アデノウイルスからの少なくともE1A及びE1B-55Kのコード配列を備えるウイルス粒子として規定され、前記粒子は、機能的なE1A及び/又はE1B-55Kを欠く細胞において‘ヘルパーウイルス’の不存在下に複製されることがない。ヘルパーウイルスは、野生型又は突然変異体のアデノウイルスでよく、しかしまたHDEPにおいて欠ける機能を提供する任意のアデノウイルスベクターであってよく、及び従ってパッケージング細胞上で増殖する(E1欠損の)望ましい生成物の組換えアデノウイルスによって提供することができる。E1A及びE1B 55Kの配列はアデノウイルスの増殖のために要求される。HDEPは通常、更にE1B-19Kのコード配列を含む。HDEPにおいて存在するE1配列は、組換えE1-欠損アデノウイルスを補うことができるべきで、それは、HDEPのためのヘルパーウイルスとして働くことができる。HDEPは、パッケージング細胞におけるE1配列及びベクターの間の重複における相同組換えによって生じることがあるが(Murakami等、2002年)、今回、いくつかの調査から予想に反して分かるように、それは、パッケージング

細胞における配列及びベクターの間の実質的な相同/重複の不存在下に、即ち、本明細書に言及する非-相同的組換えのようなプロセスによっても生じさせることができる(例えば、Murakami等、HDEPの可能な構造についての2004年を参照)。したがって、本明細書で用いるように、‘実質的な重複’は、相同組換えについて十分な重複として規定される。本発明で‘実質的な重複の不存在’として言及する具体例における任意の場合に、この条件は、重複が、50種のヌクレオチド(nt)以下、好ましくは40nt未満、より一層好ましくは30nt未満、更により一層好ましくは20nt未満、更により一層好ましくは10nt未満で存在し、最も好ましくはまったく重複がない場合に、満たされると考えられる。HDEPの形成の機構は現在、十分には理解されないが、その中で、E1配列がパッケージング細胞のゲノムから由来することは明らかである。E1配列の組換えアデノウイルスバッチにおける存在は望まれておれず、それはRCA又はHDEPの形態である。本発明はHDEPを生じさせる機会を最小にする方法及び手段を提供する。加えて、細胞を調製するための方法及び得られる細胞を提供し、そこでは、細胞をE1-欠損組換えアデノウイルスベクターの相補性のために用いるとき、ベクター及び本発明にかかる補完細胞の染色体性に位置付けられるE1配列の間の実質的な配列重複の不存在下に、組換えアデノウイルス中へのE1A及びE1Bのコード配列の一緒の導入、及び従ってHDEPの形成を妨げる染色体配置において、前記細胞はE1A及びE1Bを持つ。この目的のため、本発明の1具体例に従う細胞の染色体配置はE1A及び少なくとも1種のE1Bのコード領域が新しい細胞のゲノムにおいて分かれるようなものである。逆方向反復がアデノウイルス配列の欠失を刺激することによってHDEPの形成に寄与すると思われるので、別の具体例において、本発明は、E1A及びE1Bのコード配列を備える細胞を提供し、そこでは、E1配列が前記パッケージング細胞のゲノムにおいて逆方向反復配置で存在しない。

【0012】

本発明にかかる細胞は、それらのゲノムにおけるアデノウイルスのE1A及びE1Bのコード配列を備え、及び好ましくは、それらは、それらのゲノムにおいてすべての機能的なE1A及び双方のE1B(E1B-55K及びE1B-19K)蛋白質のためのコード配列を備える。E1A及び少なくとも1種のE1B蛋白質は、同じであってよく、又は随意に本発明に従い異なる血清型であってもよい。

【0013】

好ましくは、これらの具体例において、少なくとも1種のE1A及びE1Bは、E1A及びE1Bのプロモータとはそれぞれ異なるプロモータによって調節される。

【0014】

(本発明にかかる細胞)

組換えアデノウイルスは、株細胞から>20kbのDNAを取り込むことができ、その中でそれは増殖し、及び効率的なパッケージングを可能にするアデノウイルスの最大ゲノム長はおよそ38kbである(アデノウイルスのタイプ5系ベクターのものについて;この形態(figure)は血清型に若干依存することがある)。この特性を、本発明にかかる新しい補完細胞を調製するのに用い、前記細胞はE1A及びE1Bのコード配列を備え、及び前記細胞は、前記E1A及び少なくとも1種のE1Bの配列が、少なくとも4kb、好ましくは少なくとも10kb、より一層好ましくは少なくとも34.5kbによって前記ゲノムにおいて分けられることを特徴とする。このことは、かかる細胞のゲノムが、核酸配列のストレッチを欠き、そこでは、前記E1A及び双方のE1Bのコード配列が、4、10又は34.5kbのそれぞれ未満によって分けられることを意味する(例えば、図式的表示としての図22参照)。本発明で述べるように、2種の配列が少なくとも所定の距離によって細胞のゲノムにおいて分けられるのは明らかであり、この要件は、2種の配列が別々の染色体上に存在するときに、同様に満たされるとみなされる。したがって、2種の配列が異なる染色体にある具体例には、本明細書において用いるように、その意味の範囲内での‘少なくともxのkb離れて(apart)’又は‘少なくともxのkbによって分けられる’が明白に包含される。かかる具体例は、この技術の熟練者(当業者)に既知の方法、例えば、インシトゥハイブリダイゼーションにおける蛍光(FISH)によって簡易に調べることができ、それを用いて所定の配列が存在する染色体及び/又は染

色体位置を位置付けることができる。

【0015】

本発明にかかる細胞は、それらのゲノムにおいてアデノウイルスの配列を備え、及び好ましくは、前記アデノウイルスの配列はすべてのE1蛋白質を暗号化するが、pIX、又はその一部分を暗号化する配列を欠く(即ち、かかる細胞は、好ましくはpIXの読み枠からの配列を含まず(Ad5 E1配列を有する細胞について、このことは、それらが好ましくはwt Ad5又はその一部分のnt 3609-4031を含まないことを意味し)、及びより一層好ましくは、それらはまた、pIXのプロモータにおいて欠失を持ち(Ad5 E1配列を有し、好ましくは、nt 3550、より一層好ましくは3525から下流のpIXプロモータの配列を持たない細胞について)、それにより、その独自のプロモータの制御下のpIXを持つアデノウイルスベクターとの実質的な重複が妨げられる)。パッケージング細胞のゲノムからのpIX配列が不存在であることは、前記ゲノム及び組換えアデノウイルスベクターの間の重複を妨げるのに助けとなる(米国特許第5,994,128号明細書)。

10

【0016】

本発明に従う細胞は、A549、ヒーラ(Hela)及び同様のもののような不死化細胞(immortalized cells)から導くことができ、その場合において、選択マーカーが細胞を確立するのに要求される。好ましくは、本発明に従う細胞は、一次細胞から導き、その場合において、選定はE1A及びE1Bの形質転換活性(transforming activity)によって提供される(例を参照)。好ましい局面では、前記細胞は網膜細胞から導かれる。それらは、ヒト起源を含む、任意の起源の細胞でよい。ヒトアデノウイルスの増殖のために、ヒト起源の細胞が好ましい。細胞は、例えばまた、組換えウシアデノウイルスの増殖のためのウシ起源でよい(米国特許第6,379,944号明細書)。細胞の起源は、当業者によって選ばれ、選択できる組換えアデノウイルスに適合性であることができる。

20

【0017】

1種の局面では、細胞は一次ヒト網膜細胞から導かれる(また、HER細胞と称される)。かかる細胞のアデノウイルスE1配列を用いた不死化は、例えば、米国特許第5,994,128号明細書において、Byrd(バード)等の、1982年、1988年、及びGallimore(ガルリモア)等の、1986年において記述されている。一次HER細胞は、胎仔から分離することができる(Byrd等、1982年、1988年)。他の具体例では、細胞は、一次ヒト胎児由来腎臓細胞(embryonic kidney cells)から導かれる(例えば、Graham(グラハム)等、1977年参照)。また他の具体例では、ヒト一次羊膜細胞のような一次羊膜細胞から導かれる(例えば、アデノウイルスE1配列を有する一次羊膜細胞の不死化の方法についての米国特許第6,558,948号明細書参照)。

30

【0018】

(細胞の生成)

本発明に従う細胞は、アデノウイルスE1A及びE1B-55K及びE1B-19Kのコード配列を前駆体のか又は祖先の細胞に導入することによって生じさせることができる(従って細胞はそこの中へのE1配列の導入によって前駆体か又は祖先の細胞から導かれる)。本発明によれば、前記E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列は、前記前駆体細胞中に非連鎖の(unlinked)様式において導入されるべきものである。この意味合いで用いるような‘非連鎖’は、アデノウイルスにおいて見出されるように、E1A及びE1Bの自然な配置、即ち互いに直接隣接する配置を称するように意図されるものとは異なる(例えば、図14を参照し、そこでは、自然の-即ち、E1A及びE1Bの‘連結した’-配置がプラスミドのpIG.E1A.E1Bにおいて存在するとして示される)。本発明に先立っては、そのゲノムの中にアデノウイルスE1A及び双方のE1Bのコード配列を備えるパッケージング細胞を得るのを望む当業者が、E1A及び少なくとも1種のE1Bの配列を非連鎖の様式において導入することを熟慮しないことに注目すべきであり、その理由は:a)それがより一層多くの作業、及びそれ故により一層不便であり、及びb)双方のE1A及びE1Bの配列が不死化のために求められるからである。以前の調査では、E1A及びE1Bの蛋白質の形質転換の能力に洞察力を注ぐものは、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列の導入によって確立されたクローンが導かれることを例証してい

40

50

る(van den Elsen(ファン・デン・エルセン)等、1982年; Gallimore等、1986年; Jochemsen(ヨッヒェンセン)等、1987年; Rao(ラオ)等、1992年; Nevels(ニーベルス)等、2001年)。しかし、これらのプラスミドの同時導入、及び/又は導入配列、例えば、プラスミド配列、プロモータ及び/又はポリアデニル化信号のような調節配列の間の重複、及びE1B-55K及びE1B-19Kの重複配列は、同じ遺伝子座でのゲノムにおけるE1A及び双方のE1Bのコード領域の共-統合をもたらし得る。実際、かかる共-統合はvan den Elsen等によって観察された(1982年)。ある場合に(Jochemsen等、1987年)、仔ラット腎臓(BRK)細胞は、まずE1Aで形質移入され、及び次いで採集したクローンをE1Bプラスミドで形質移入し、E1A発現におけるE1B発現に及ぼす影響を調査した。明らかに、この調査は細胞の特定の種類において、及び本出願に記載の発明に無関係な理由のために行われた。本発明に先立っては、パッケージング細胞を生成する目的のために、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列を別々に形質移入する理由は存在しなかった。組換えアデノウイルスのゲノム及びパッケージング細胞の間の実質的な重複の不存在下でのHDEPの形成は、今までには記述されていない。さらに、当業者は、実際、例えば、ヒト細胞のようなBRK-誘導細胞以外を得るためにこの方法を用いることを断念させられ、その理由は、Gallimore等(1986年)により、ヒト細胞が単にE1Aだけの発現によってしか形態学的に形質転換されず、及びほとんどのクローンがインシトゥで、又は分離後直ちに死滅することを記述したからである。唯一の場合、クローンをもたらすAd12(亜群(subgroup)A)のE1A発現プラスミドが形質移入後114日に確認され、及びクローンが皿(dish)で大いに増殖した(overgrown)後に採集できたに過ぎない。明らかに、当業者はE1A及び少なくとも1種のE1Bの遺伝子を前駆体細胞中に導入することに對して、従来技術に基づく別の時点では動機付けられない。細胞のゲノムにおいて分けられるE1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列を持つ細胞を得るためにかかる方法を提供することは、本発明の長所である。一定の局面では、本発明にかかる細胞は、好ましくは、仔ラット腎臓(BRK)細胞でない。1種の好適な局面では、本発明にかかる細胞は、好ましくはヒト細胞である。好適な局面では、細胞はHER細胞から導かれる。細胞は、ここではE1配列を本発明に従って導入するが、前記導入の前には、好ましくは、アデノウイルスのE1A及びE1Bのコード配列をそれらのゲノムにおいて含まず、及び配列の導入によってのみ、それらのゲノムにおけるE1配列が得られ、それによって、不死化してきて、及び欠失をE1領域において有する組換えアデノウイルスをパッケージングできることは明らかである。例えば、国際公開第W003/031633号パンフレットは、Ad11 E1B-55kの293細胞への導入を記述し:これは明らかに本発明の利点をもたらさず、その理由は、293において既に存在するようなE1配列が元の配置において残り、及びE1AのORFから4kb未満離れてE1BのORFを持つからである。対照的に、本発明は、アデノウイルスのE1A及びE1B-19K及びE1B-55Kのコード配列を細胞のゲノムにおいて持つ細胞を生じさせる方法、並びにこれらの方法から得られる細胞を提供し、それによって、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列を備える核酸配列が、互いに十分に分けられ、細胞のゲノムからのすべてのE1A及びE1Bの配列が単一のアデノウイルス粒子のゲノム中に同時に導入されるのを妨げる。

【0019】

本発明にかかる細胞を生じさせるための第1の具体例によれば、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列を、前記前駆体細胞中に異なる時点で導入される別々の分子上にそれらを配置することによって、前記細胞中に別々に導入し、及び前記前駆体細胞はBRK細胞ではない。その1種の具体例では、まず、E1A及びE1B-21Kのコード配列を導入する一方で、E1B-55Kのコード配列をより一層遅い時点で導入する。

【0020】

本発明にかかる細胞を生じさせるための第2の具体例によれば、前記E1A及び前記E1Bのコード配列を一緒に備える少なくとも2種の核酸分子を前記前駆体細胞中に導入するが、前記少なくとも2種の核酸分子が実質的な重複順序を欠くことで特徴付けられる。かかる重複配列の存在は、前記少なくとも2種の分子の間の少なくとも何かの相互作用、及びその後の、前記分子が導入される前駆体細胞のゲノムの同じ遺伝子座への前記分子上の配列の共-統合の可能性を高めると考えられるが、それに対し、これを回避するのが本発明の

目的である。その1具体例では、少なくとも1種のE1A及びE1Bのコード領域は、プロモータ及びポリアデニル化配列のような異なる異種の調節配列の制御下に位置される。これに関する別の具体例では、重複している、E1B-55K及びE1B-19Kの配列を分けさせ、及びこれらのコード配列の間のすべての重複を、遺伝暗号の重複性の知識を用いる遺伝子工学により、当業者に既知の方法に従って除去し、それによって、これらのE1Bコード配列の導入を無関係に可能にし、及び互いから非連鎖させる。この具体例でのE1A及びE1Bのコード領域の導入は、例えば、前記少なくとも2種の分子の共-形質移入(co-transfection)によって同時でよいが、明らかに、第1及び第2の具体例はまた、組み合わせても、即ち、E1A及び双方のE1Bのコード配列と一緒に備える核酸配列を含む少なくとも2種の分子の導入でもよく、そこでは、前記少なくとも2種の分子は、互いに関して実質的な重複を欠き、及びそこでは、前記少なくとも2種の分子は、前駆体細胞中に異なる時点で導入される。

10

【0021】

第3の具体例では、E1Aを暗号化する配列及び少なくとも1種のE1Bコード配列を、それらを単一の核酸分子上に位置させることによって、非連鎖させ、そこでは、前記E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列が(明らかにこれは双方のE1Bコード配列のようなものでよい)、少なくとも4kb、好ましくは少なくとも6kb、より一層好ましくは少なくとも8kb、更により一層好ましくは少なくとも10kb、更により一層好ましくは少なくとも15kb、最も好ましくは少なくとも34.5kbの核酸、本明細書において言及する‘スパーサー’又は‘スタッファ’核酸のようなものによって分けられる。スパーサー核酸配列は、有利に、スパーサー核酸配列に関して後に記載するような特徴を持ち、特に、前記配列はE1A及びE1Bのコード配列を欠き、少なくともイントロン配列(介在配列)の部分で造り上げられ、及びE1A及び/又はE1Bのコード配列の調節配列を備えることができる。当業者にとって、第3の具体例の等価の変形において、前記E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列が、1種の分子上での代わりに、異なる核酸分子が、例えば、(相同)組換え又は連結(ligation)又は端々接合(end-to-end joining)によって、単一の分子を形成するとき、それらの配列が、少なくとも指定される距離によってまだ分けられている限り、前記異なる核酸配列上に存在してもよい(例えば、図13のI、II、及び例えば、例3参照)。着想は、また、かかる場合に、前駆体細胞のゲノム中に統合されるとき、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列が、まだ、少なくとも4kb、好ましくは少なくとも6kb、より一層好ましくは少なくとも8kb、更により一層好ましくは10kb、更により一層好ましくは15kb、最も好ましくは少なくとも34.5kbによって分けられるというものである(例えば、例3及び図21参照)。言い換えれば、本発明の第3の具体例は、従って前駆体細胞中に、E1A及びE1B-19K及びE1B-55Kのコード配列を備える単一の核酸分子(‘分子A’)を導入することによって実行することができ、これらの3種のコード配列の少なくとも2種は、少なくとも4kbによって(具体例3a);又は同様に良好に、2種又はそれよりも多い種類の核酸分子であって、これらが単一の核酸分子を形成するときに‘分子A’を形成するものによって(具体例3b)、分けられる。第3の具体例の一定の局面では、E1A及びE1Bの側方の(flanking)スパーサー核酸の間も、E1A及びE1Bのコード配列のための調節配列においてもまた、実質的に重複する配列は存在せず、それで、相互作用及びこれらの分けられた配列間の可能な相同組換えの機会が減らされる。

20

30

【0022】

(E1A及びE1Bを暗号化する組換え分子)

1種の局面において、本発明はアデノウイルスのE1A蛋白質及び少なくとも1種のアデノウイルスのE1B蛋白質を暗号化する核酸配列を備える組換え分子を提供するが、E1A蛋白質を暗号化する前記核酸配列及び少なくとも1種のE1B蛋白質を暗号化する前記核酸配列が、少なくとも4kb、好ましくは少なくとも10kb、より一層好ましくは少なくとも34.5kbによって分けられることで特徴付けられる。かかる分子は、本発明に従う方法において用い、本発明に従う細胞を生じさせることができる。かかる分子は、プラスミド、コスミド、細菌性人工染色体、YAC、及び同様のもののような、当業者に既知の種々の形態を採ることができる。

40

【0023】

50

等価の具体例において、初期に別々の分子として存在する前記E1A及びE1Bの蛋白質を暗号化する核酸を持つことが、また可能である。かかる分子は、随意に、相同組換え、連結、部位-特異的組換え、端々接合、及び同様のものによって、単一の分子を形成することができる。したがって、本発明の1種の局面では、少なくとも2種の核酸分子の組合せを提供するが、これには:a)アデノウイルスのE1A蛋白質を暗号化する核酸分子で、そこでは、前記核酸分子が、少なくとも5kb、好ましくは少なくとも17kbのスペーサー核酸配列を前記E1Aコード配列の双方の側上に持ち、前記スペーサー核酸がE1B蛋白質を暗号化しないもの;及びb)アデノウイルスのE1B蛋白質を暗号化する核酸分子で、そこでは、前記核酸分子が、少なくとも5kb、好ましくは少なくとも17kbのスペーサー核酸配列を前記E1Bコード配列の双方の側上に持ち、前記スペーサー核酸がE1A蛋白質を暗号化しないものが備わる。前記スペーサー核酸は、任意の他の核酸でよく、及び好ましくは、それが不活性であり、即ち、コード配列を含まず、好ましくは既知の調節配列がなく、染色体の不安定性を導くことがある高度な反復領域、及び同様のものがないように選ばれる。好ましくは、E1A暗号化配列の側方の前記スペーサー核酸配列は、E1B蛋白質暗号化配列の側方の前記スペーサー核酸配列と実質的な相同性を含まない。スペーサー断片は、異種プロモータ及び/又はポリアデニル化部位のような、E1A及びE1Bの発現カセットの調節配列を含んでよい。

【0024】

組換え分子の宿主中での増殖は、通常、分子が環状形態(circular form)であるときに、有利に実行することができる。一定の局面では、本発明にかかる組換え分子は、線状形態である。これは、前駆体株細胞の形質移入において助けることがあり、それは概して、線状分子が用いられるとき、より一層効率的である。直線化は、当業者に知られているように、例えば、組換え分子の1種又はそれよりも多い種類の制限酵素による消化によって影響を及ぼされることがある。

【0025】

(E1配列を逆方向反復配向において欠失する株細胞)

HDEPを、パッケージング細胞と組換えアデノウイルスとの間の実質的な重複の不存在下に生じさせる機構が何であろうと、第1の工程は、この処理において、パッケージング細胞のゲノムからのE1配列のウイルスゲノムへの統合の事象であり得る。これらの余分な配列について適応させるためには、ウイルスはその後アデノウイルス配列を削除しなければならない(Murakami等、2002年)。この工程は、逆方向反復が存在するときにより一層効率的となり得る(Steinwaerder(シュタインブエルデ)等、1999年)。PER.C6^(R)株細胞は、そのゲノム中にpIG.E1A.E1Bプラスミドのいくつかの反復を含み、それが株細胞の生成のために用いられ、そのいくつかで、反復が互いに関して逆方向配向にある。したがって、E1領域の逆方向反復のPER.C6^(R)株細胞のゲノムにおける存在は、HDEPの発生の頻度に影響を及ぼすことがある。HDEP粒子の形成がまた、他のアデノウイルスのパッケージング株細胞において起こるが、かかる株細胞において、古典的なRCAの出現のために検出されなくなることは注目すべきである。E1配列のパッケージング株細胞での逆方向反復配向における不存在は、組換えアデノウイルスがかかるパッケージング細胞上で増殖するとき、より一層低い頻度なのか、又は更に完全に不存在なHDEPの生成をもたらし得る。

【0026】

新しい株細胞で、それらのゲノムにおいてE1領域を備えるものが生じるか、又は選ばれるとき、従って、逆方向反復を欠くが、むしろ直接的な反復だけ、又はE1配列の単一の統合でさえを持つクローンを選定するのが望ましいことがある。したがって、本発明の1種の局面は、細胞を提供し、並びにアデノウイルスのE1配列を備える細胞を提供するか、又は発生させるための方法を提供することであり、前記方法には、前記E1配列を備える逆方向反復を欠く細胞を選定する工程が含まれることで特徴付けられる。本発明は、細胞のゲノム中にアデノウイルスE1配列を備える細胞を提供し、そこでは、前記E1配列には、E1A及びE1B-19K及びE1B-55Kのコード配列の少なくとも1種の機能的コピー(functional copy)が含まれており、前記E1配列又はその部分が逆方向反復の形態で前記ゲノムにおいて存在しないことで特徴付けられる。この具体例では、前記細胞は293細胞又はその誘導体では

ない。逆方向反復が存在する場合、好ましくは、かかる逆方向反復は、10kb内で前記細胞において存在せず、及び本発明にとって、逆方向反復は、少なくとも10kbの非(non)-E1の介在性の(intervening)配列を有し、更に逆方向反復とは考えられない。理論的根拠は、E1配列の1種のコピーが染色体上のどこかに統合され、及び逆方向のコピーが同じ染色体上であるが、アデノウイルス粒子における双方の反復を備えるDNAの全体のセグメントの取り込みを妨げるのに十分に大きな距離で統合されるとき、問題が予想されないことである。また、距離が、その断片の取り込みを可能にするようなものであるとき(即ち、10kb)、逆方向反復配列から得られる左端の重複(duplication)が包まれるには余りにも大きなウイルスのゲノムを与える(図13で例証される)。ウイルスのゲノムにおけるE1配列の挿入の部位は、HDEPの最終的な全長にとって重要である。E1-含有ゲノムの断片の組入れ(incorporation)がパッケージング可能な(packagable)ゲノムをもたらすという機会は、挿入がウイルスの左端に対してより一層多いときに増加することは明らかである。挿入の部位が最小のパッケージング信号からのまさに3'である場合、次いで挿入物は18.5kbほど大きいことがあり(E1A及びE1B及び逆方向反復配列の1種のコピーを含む)、及びまだパッケージング可能のままである(左側から右側端までの重複が350bpのITR及びパッケージング信号を含むと仮定する)。このことは、例えば、17kbの挿入物がHDEPsを容易に生じさせず、その理由は、まだパッケージング可能な寸法のウイルスをもたらすような断片の統合の可能な部位が、最小のパッケージング配列に対する1.5kbまでのまさに3'に制限されないことを意味する。したがって、HDEPの生成の頻度は、E1A及びE1Bのコード領域の間の距離の増加に伴って減少し、及びその距離が述べられた18.5kbよりも大いに小さいときに、まだとても良好な検出下であり得る。

【0027】

同じ推論は、逆方向反復配列の不存在下のE1A及びE1Bの直接挿入について当てはまる。その場合、アデノウイルスのゲノムにおける合計の挿入が37.5kbより大きくなることはないが(E1A及びE1Bの領域のための約3kbを含む)、それが最小のパッケージング信号から直接的に3'に挿入されるときだけである。したがって、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列が少なくとも34.5kbによってパッケージング細胞のゲノムにおいて分けられるとき、双方のこれらの配列の組換えアデノウイルスへの挿入が妨げられる。さらに、全体のアデノウイルスのゲノムは、次いでその後の処理において欠失されるべきであり、その処理は更に逆方向反復配列の不存在下にそれほど有効でないことがある(Steinwaerder等、1999年)。任意の場合、ゲノムにおける逆方向E1配列の存在に関係なく、E1A及びE1Bの配列を含む粒子の発生の機会は、E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列が更にゲノムにおいて離れているときに減少する。したがって、一定の具体例では、前記E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列が、少なくとも4kb、6kb、8kb、10kb、12kbによって、本発明に従う細胞のゲノムにおいて分けられる。これらの具体例では、好ましくは、E1配列は逆方向反復の形態では存在しない。好ましくは、前記配列は少なくとも15kbによって分けられ、及び逆方向E1配列が存在せず、それは、かかる株細胞における、前記株細胞のゲノムからのE1配列のアデノウイルスへの導入によるHDEPの発生の理論的な可能性を実際上ゼロにまで減少させることを確かにする(図13参照)。他の具体例では、前記E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列を、少なくとも18kb、20kb、25kb、30kbによって分ける。最も好ましくは、前記配列は少なくとも34.5kbによって分けられる。このことは、細胞のゲノムから導く双方のE1A及びE1Bの単一の統合がHDEPの生成をもたらすことができないことを確かにする。明らかに、上述したように、一定の等価の具体例において、前記E1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列は、細胞のゲノムの異なる染色体上に存在する。

【0028】

E1配列の逆方向反復の存在について発生させたクローンを選抜する方法は、当業者に既知であり、及びPCR、サザンブロット法、制限酵素分析、ファイバ-蛍光インシトゥハイブリダイゼーション法(Fiber-FISH)、及び同様のものが包含され得る。pIG.E1A.E1Bプラスミド(米国特許第5,994,128号明細書)のようなE1遺伝子を含むプラスミドを用いて細胞のクローンを発生させる際、クローンをまず確立することができ、及び選抜のラウンド(期

10

20

30

40

50

間)において、前記逆方向反復を欠くそれらのクローンを更なる使用のために採集する。次に、採集されたクローンからの細胞を組換えアデノウイルスの生成のために適切に用いることができ、及びこれらの細胞において発生するHDEPの頻度を、前記逆方向反復を含む細胞におけるものよりも十分に低く(又は不存在でさえ)することが期待される。したがって、本発明の別の局面は、細胞のゲノムにおいてアデノウイルスのE1A及びE1Bのコード配列を備える細胞を提供することであり、前記E1配列が前記ゲノムにおいて逆方向反復の形態で存在しないことで特徴付けられる。本発明のこの局面について、非-E1配列の少なくとも10kbによって分けられる配列は、逆方向反復として考慮されるべきでない。特定の局面では、前記E1A及びE1B配列は、前記ゲノムにおいてゲノム当たり少なくとも2種のコピーで存在する。1種の局面では、前記少なくとも2種のコピーは、1種の染色体上に存在する少なくとも2種のコピーを備える。別の具体例では、前記細胞は、それらのゲノムにおいてE1A及びE1Bのコード領域の1種のコピーのみを備える一方、アデノウイルスのpIXを暗号化する配列を欠く。もちろん、唯一の1種のコピーの前記E1配列をそのゲノムにおいて備える細胞は、HDEPの生成のより一層低い頻度(又は不存在でさえ)持つと期待するべきである。

10

【0029】

(細胞の使用)

別の局面において、本発明は、本発明に従う細胞において組換えアデノウイルスを生成するための方法を提供する。これは、この技術において既知のシステム上で生産されるパッチと比べて、著しく減少させた頻度のHDEPを持つ、好ましくはまったくHDEPのない、組換えアデノウイルスのパッチを発生させる。特に好適な具体例では、前記組換えアデノウイルスの生成のために用いるベクター及びパッケージング細胞は、実質的な配列重複を欠き(即ち、好ましくは、10nt未満、又はより一層好ましくは、まったく重複がない)、及び好ましくは重複を持たず、それによって、パッケージング細胞におけるベクター及び配列の間の相同組換えの機会を最小にし、E1-含有粒子(HDEP、RCA)を持たないウイルスパッチをもたらす。

20

【0030】

本発明に従い提供する新しい細胞がまた、先に記載するように組換え蛋白質の生産(W000/63403号)のために、及び先に記載するように他の(非-アデノウイルス)のウイルスの生産(W001/38362号)のために用いることができることは注目されるべきである。

30

【0031】

当業者にとって、導入遺伝子の血清型又は性質が本発明に対して重大でないことは明らかである。例えば、細胞の生成のために用いられるアデノウイルスのE1コード配列が、Ad5、Ad35、Ad11、Ad16、Ad49等、又はそれらの組合せのような、細胞上で増殖すべきアデノウイルスに適合する任意の都合のよい血清型から、即ち、1種の血清型からのE1A及び別の血清型からのE1Bの少なくとも1種のコード配列から採用することができることは、たちまち明らかである(例えば、W002/40665号を参照)。また、多くの他の局面において、本発明がその範囲又は精神から逸脱することなく、変形され得ることは明らかである。本発明を、これから、次の例によって例証するが、それらはその範囲を制限するものと解釈されるべきではない。

40

【実施例】

【0032】

(例)

本発明の実行では、他に示す場合を除き、通常の技術の分子生物学、細胞生物学、及び組換えDNAを採用するが、それらはこの技術の熟練の範囲内である。例えば、Sambrook(サムブルック)、Fritsch(フリッチェ)及びManiatis(マニアティス)の、Molecular Cloning(分子クローニング):A Laboratory Manual(実験室マニュアル)、第2版(2nd edition)、1989年; Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学における最新プロトコル)、Ausubel(オースベル) FM等、eds(編)、1987年; the series Methods in Enzymology(酵素学における方法論のシリーズ)(Academic Press, Inc.(アカデミック・プレス社); PCR2:A P

50

ractical Approach(実用的な手法)、MacPherson(マクファーソン) MJ、Hans(ハムス)BD、Taylor(テイラー)GR、編、1995年参照。

【0033】

(例1)(E1A及びE1Bの蛋白質を暗号化する別々の核酸を用いる補完株細胞の生成)

アデノウイルスのE1遺伝子による一次細胞の完全な形態学的な形質転換は、E1A及びE1Bの領域によって暗号化される蛋白質の組み合わせられた活性の成果である。溶菌感染において、及び形質転換において、異なるE1蛋白質の役割が広く調査されている(Zantema(ザンテマ)及びvan der Eb(ファン・デル・エバ)、1995年;White(ホワイト)、1995年、1996年において評論されている)。アデノウイルスE1A蛋白質は一次細胞の形質転換のために必須である。アポトーシスの随伴性誘導(concomitant induction)は、双方のE1B-19K及びE1B-55Kによってであるが、異なる機構によって妨げられる。E1A領域はいくつかの蛋白質を暗号化するが、全体の領域は通常E1Aのコード領域と称され、及びすべての具体例において、本明細書で用いるように、‘E1Aのコード配列’は、すべてのE1A蛋白質を暗号化する配列に言及する。

【0034】

齧歯類細胞において、E1Aと一緒にいずれかのE1B-19K又は55Kの活性は、全部の形質転換のために十分であるが、双方のE1B蛋白質と一緒にの発現は、2倍ほど有効である(Gallimore等、1985年;Rao等、1992年)。しかし、ヒト細胞において、E1B-55K蛋白質の活性は、E1B-55Kが不死の形質転換株細胞の確立のために不可欠であるという観察を考えると、より一層重要であると思われる(Gallimore等、1986年)。アデノウイルス感染及びウイルス増殖において、E1A蛋白質は、E1Bを含むアデノウイルス遺伝子及びTATA-結合蛋白質との相互作用をおそらく介する他の初期の領域の活発化において機能する(Zantema及びvan der Eb、1995年において評論される)。E1B-55K発現は、宿主蛋白質合成の遮断(shut-off)のための後期相の感染及び核から細胞質までのウイルス-暗号化蛋白質(viral-encoded proteins)の選択的輸送において重要である(Babiss(バービス)等、1985年;Pilder(ピルダー)等、1986年)。E1B-55Kのために欠失されるアデノウイルスは、非-補完ヒト株細胞上の減少した複製を示す(Harada(ハラダ)及びBerk(バーク)、1999年)。したがって、E1A-及びE1B-55K-暗号化蛋白質は、一次ヒト細胞の形質転換のため、及びヒト細胞における有効なウイルスの複製のために必要である。

【0035】

非-相同組換えは、パッケージング細胞の細胞性ゲノムからのE1配列の組換えアデノウイルスへの組入れをもたらすことができる。ヘルパー-依存性E1-含有粒子は、最終的に、最初の組換えアデノウイルスからもたらされ、非-補完(ヒト)細胞における複製-欠損ベクターの補完複製を可能にするが、自律複製を可能としない。この補完は、双方のE1A及びE1B-55K及びおそらくE1B-19Kの機能によって仲介される。したがって、双方のE1A及びE1B-55K(及び好ましくはE1B-19K)の機能がアデノウイルスベクターに終わるという機会が排除されるか、又は減少する場合、次いでHDEPの形成は排除されるか、又は減少する。

【0036】

本明細書では、本発明者等は、いずれかのE1A、E1A及びE1B-19K、E1B(E1B-19K+E1B-55K)又はE1B-55Kを発現する機能的プラスミドの例を記載し、それらを用い、互いから分けられるE1A及びE1B-55kの領域を有するアデノウイルスのパッケージング株細胞を生じさせる。

【0037】

構築物pIG.E1A.E1B(図14; SEQ. ID.NO.1(配列番号1))は、Ad5-E1領域(Ad5ゲノムのnucl. (ヌクレオチド)459-3510(Genbank(GenBank, ジェンバンク) Acc. No.(承認番号) M73260)を含み、動作可能に(operatively)ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモータ及びB型肝炎ウイルスのポリ-アデニル化配列に連鎖されており、以前に記述されている(米国特許第5,994,128号明細書)。

【0038】

(構築物pIG.E1Aの生成)

構築物pIG.E1Aを、pIG.E1A.E1BのHincIIを用いる消化によって作製し、次いで、得られる5kbの断片を、ゲルからQIAEX(キアエックス) IIのゲル抽出キット(Qiagen(キアゲン社))を製造者の指示に従って用いて精製した。単離した断片の再連結及びSTBL2適格性細胞への形質転換(Invitrogen(インビトロゲン))は、pIG.E1Aを与えた(図1)。この構築物はAd5ゲノムからのnt. 459から1578までを含む(Genbank Acc. No. M73260)。

【 0 0 3 9 】

(構築物pIG.E1AB21の生成)

構築物pIG.E1AをXbaI及びHpaIを用いて消化し、及び得られる4.8kbの断片を、ゲルから上述のように単離した。構築物のpIG.E1A.E1Bを、BsrGIを用いて消化し、Klenow(クレノウ)酵素(New England Biolabs(ニューイングランド・バイオラブズ社))を用いて処置し、5'の突出末端を平滑端に(鈍く、blunt)した。次いで、DNAを、QIAquick(キアクイック) PCRの精製キット(Qiagen)を製造者の指示に従って用いて精製し、及びその後XbaIを用いて消化した。得られる913bpの断片は、E1A及びE1B19Kのコード配列の3'部分を含み、ゲルから、記載したように単離した。2種の単離断片の連結及びDH5⁻TI⁺細胞(Invitrogen)への形質転換は、構築物pIG.E1AB21を与えた(図2)。この構築物は、このようにして、Ad5ゲノムからのnt. 459から2253までを含み(Genbank Acc. No. M73260)、それによって、E1A配列はPGKプロモータによって導かれ、及びE1BプロモータはE1B-19K遺伝子を駆動する。

【 0 0 4 0 】

Ad5 E1B-19K遺伝子はまた、ときに、Ad5 E1B-21K遺伝子と称され、その理由は、予測されるアミノ酸配列が20.6KDの蛋白質を構成するからである(例えば、本出願において、いくつかのプラスミド及びプライマはそれらの名前の一部として21Kを持つ)。

【 0 0 4 1 】

(構築物pCR5Bの生成)

Ad5-E1B領域を含む構築物を、次いで、次のようにして生じさせた。最初に、PCR断片を、プライマの5E1Bfor-1: 5'-CGG AAT TCG GCG TGT TAA ATG GGG CG-3' (SEQ.ID.NO. 2)、及び5E1B-rev: 5'-TAG CAG GCG ATT CTT GTG TC-3' (SEQ.ID.NO. 3)を用い、pIG.E1A.E1BのDNAを鋳型として、及びPwo DNAポリメラーゼ(Roche(ロシュ社))を製造者の指示に従ってDMSOの3%の終濃度と共に用いて生じさせた。増幅プログラムは、94 で2分間であり、30回のサイクルが続く(94 で30秒間、50 で30秒間及び72 で1分間)及び72 で10分間によって終わった。得られる481bpの増幅された断片を、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製し、及びPCRのクローニングキット(Stratagene(ストラタジーン社))からのpCR-ScriptAmpのベクターにSrfI酵素の存在下、製造者の指示に従って連結させた。(平滑端)連結は、挿入物の2種の配向をベクターにおいて与え、その1種は、挿入物の(5')端におけるEcoRI部位及びベクターにおけるEcoRI部位の間の最も大きな断片を有し、任意に選ばれた。このことで、構成物pCR5Bをもたらした。標的配列の正しい増幅が(KpnI及びEcoRIの部位間で)、配列決定によって確認された。

【 0 0 4 2 】

(構築物pE1Bの生成)

pCR5BをKpnI及びEcoRIで消化し、及び415bpの断片を、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いて、ゲルから単離した。構築物pIG.E1A.E1Bを次いで、EcoRI及びKpnIで消化し、及び得られる5.2kbのベクター断片をゲルから上述のように単離した。単離した断片の連結及びDH5⁻TI⁺細胞(Invitrogen)への形質転換は、構築物pE1Bをもたらした(図3)。この構築物におけるE1B配列はAd5ゲノムからのnt.1642から3510までを構成する。

【 0 0 4 3 】

次いで、全長Ad5E1の発現構築物と比較して新しい構築物の形質転換能力を試験した。これには、一次ヒト胚性網膜(HER)細胞を単離し(例えば、Byrd等、1982年、1988年を参照)、及びDMEM培地(Gibco(ギブコ)BRL社)における6cmの皿において、10%の熱失活させた胎児ウシ血清(Foetal Bovine Serum、FBS、Gibco BRL)を追加して播種した。60-70%での集密度の(confluency)細胞を、合計で20 µgのDNA/皿において、CaPO₄の共-沈(co-precipitation)キット(Invitrogen)を製造者の指示に従って用いて形質移入した。2週間後、形質転

換したクローンを一次細胞の単層において増殖巣(foci)として可視化した。細胞は増殖巣において(in a focus)一次細胞と比較してはっきり異なる形態を示した。表I(II)には、各々の形質移入を用いて得られた形質転換させたクローンの量を描く。

【 0 0 4 4 】

結果は、一次細胞がAd5-E1A及びE1B19Kの遺伝子(pIG.E1AB21)で形質転換できるという上記観察を確認する。これらの増殖巣が、概して、形質移入によって得られたものより小さく、そこでは完全なE1B領域が存在することに注目すべきである。また、構築物pIG.E1AB21での形質移入から得られる増殖巣を採集し、及び96-ウェル平板(well plate)中に播種した後、維持される細胞増殖は得られず、及びすべての細胞は死滅した。すべての他の場合に、ほとんどの採集された増殖巣は生存可能な細胞クローンをもたらした。

10

【 0 0 4 5 】

pIG.E1AB21での形質移入が形質転換した細胞を最初にもたらすので、細胞を、E1B-55K発現構築物で、例えば、最初の形質移入に次いで5-10日に再び形質移入する(re-transfect)ことが可能である。このことは、ゲノムにおける異なる遺伝子座上の双方の発現カセットが組み込まれて細胞が得られることを確かにする。

【 0 0 4 6 】

この実験によって、更に、E1A及びE1Bの遺伝子(pIG.E1A+pE1B)のための2種の別々のプラスミドを用いることによって、形質転換させた細胞クローンを発生させ、及び確立することが可能であることが確認される。しかし、双方のプラスミドが、一緒に形質移入され、及び著しい配列重複を含むので(プラスミド骨格及びプロモータ/ポリA)、E1A及びE1Bの統合がゲノムにおいて同じ遺伝子座で起こり得る。

20

【 0 0 4 7 】

このことは、発現カセットだけを有する断片を用い(ベクター配列なしで)及び配列重複を持たないようにして避けることができる。配列重複は、プロモータ及びポリアデニル化(ポリA)配列のような、調節要素から、E1A及びE1Bの配列を有する2種の発現構築物のための異なる調節配列を用いることによって、除去することができる。好ましくは、これらの配列は、相同組換え処理の間に見出される対構造(paired structures)の形成を導くことがある重複を妨げるのに十分な不一致(divergent、分岐)である。任意のプロモータ及びポリAの配列を用いることができる。好ましくは、調節配列は、これらの細胞上で増殖する組換えアデノウイルスにおける導入遺伝子からのものと異なる。明らかにこれは、所定の組換えアデノウイルスがこれらの細胞上で後期の段階で増殖し、及び特定の組換えアデノウイルスに依存するときに、定められるに過ぎない。それ故に、後者のかかる導入遺伝子の調節配列を選定するのが便利であり、それらは、本発明によって確立される細胞においてE1A及びE1Bの配列のものとは異なる。しかし、多くの現在利用できる組換えアデノウイルスベクターがCMVプロモータ及びSV40ポリAの配列によって調節される導入遺伝子を運ぶので、本明細書に例証するように、E1A及びE1Bの構築物のための好適な調節配列はCMVプロモータ及びSV40のポリAの配列とは異なる。調節の問題の観点から、更に、これらの調節配列は、好ましくは、ウイルス起源のものでない。

30

【 0 0 4 8 】

この目的のため、上述のプラスミドを更に以下に記載するように修飾(modified)する。

40

【 0 0 4 9 】

(構築物pCC.E1A及びpCC.E1AB21の生成)

E1A配列を、次のプライマを用いて増幅した：5E1A-For：5'-CCG AAT TCG ATC GTG TAG TG-3'(SEQ.ID.NO. 4)及び5E1A-rev：5'-CGG GAT CCA TTT AAC ACG CCA TGC AAG-3'(SEQ.ID.NO. 5)。反応を、pIG.E1A.E1Bの鋳型DNA上で、Pwo DNAポリメラーゼ(Roche)を製造者の指示に従うが、3%DMSOの終濃度と共に用いて行った。PCRプログラムは、94 で2分間、次いで30回のサイクルのもの(94 で30秒間、58 で30秒間及び72 で120秒間)及び72 で8分間によって終わらせる設定にした。得られる1.2kbの断片は、EcoRI(5')及びBamHI(3')の部位によって隣接される、Ad5からのE1A配列(Genbank Acc. No. M73260におけるようなヌクレオチド459から1655まで)を含む。

50

【 0 0 5 0 】

第2のPCRの断片を、逆方向プライマと一緒にプライマ:5E1AB21-rev: 5'-CGG GAT CCT C AT TCC CGA GGG TCC AG-3'(SEQ.ID.NO. 6)を用い、同じ条件を使用して、生じさせた。得られる1.8kbの断片は、EcoRI(5')及びBamHI(3')の部位によって隣接される、Ad5からのE1 A及びE1B-19Kの配列(Genbank Acc. No. M73260におけるようなヌクレオチド459から2244まで)を含む。双方のPCRの断片を、アガロースゲルから単離し、QIAEX IIゲル抽出キット(Qiagen)を用いて精製し、及びPCRクローニングベクター; pCR-TOPOblunt(プラント)(Invitrogen)においてクローン化し、及び配列を確認した。次いで、構築物を、EcoRI及びBamHIを用いて消化し、及び挿入物の断片を、QIAEX IIゲル抽出キット(Qiagen)を用いて上述のようにゲルから単離した。

10

【 0 0 5 1 】

次いで、各々の単離した断片を、ベクターpCC101(以下参照)中に連結したが、それは最初にEcoRI及びBamHIを用いて消化され、ゲルから上述のように精製された。電気的に適格性の(electro competent)DH10B細胞(Invitrogen)への形質転換は、構築物pCC.EIA(図4)及びpCC.EIAB21(図5)を生じさせた。合成ポリアデニル化信号(SPA)は、これらのプラスミドにおいて存在する(W002/40665号において記述されるように構築物pCC271から導く)。

【 0 0 5 2 】

(pCC101の生成)

pCC100(以下参照)をXbaIで消化し、及び得られる線状断片を、上述のようにQIAEX IIゲル抽出キットを用いてゲルから精製した。リンカは、オリゴヌクレオチドX-SM-1: 5'-CTA GGTGACCAATTG-3'(SEQ.ID.NO. 7)と共にX-SM-2: 5'-CTAGCAATTGGTCGAC-3'(SEQ.ID.NO. 8)をアニーリングすることによって調製した。これに、1 µgの各オリゴヌクレオチドを、2 µLの10×NEB2の緩衝液(NEB)及び20 µLの終容量までのmilliQ(ミリキュウ)H₂Oと混合した。混合物を98 °Cで位置させ、及びPCR機械において4 °Cにまで緩徐に冷却した(2 °C/分の冷却速度)。次いで、アニールしたリンカを、単離したXbaI消化断片に、4×モル過剰のリンカを断片に対して使用して連結した。連結DNAを、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)を製造者の指示に従って用いて精製し、及びXbaIで消化して自己-連結(self-ligated)ベクターDNAを除去した。XbaI酵素の熱-不活化の後、次いで、混合物を、pCC101(図6)をもたらすDH5α-TI^rの適格性細胞を形質転換するのに用いた。

20

【 0 0 5 3 】

(pCC100の生成)

構築物pCC271(W002/40665号に記述される)を、EcoRI及びPstIで消化し、及び3kbのベクター断片を上述のようにゲルから単離した。リンカを、オリゴヌクレオチドEcoPst-3: 5'-AAT TGA TAT CGA ATT CGC CGA GCT CGT AAG CTT GGA TCC CTG CA-3'(SEQ.ID. 9)と共にオリゴヌクレオチドEcoPst-4: 5'-GGG ATC CAA GCT TAC GAG CTC GGC GAA TTC GAT ATC-3'(SEQ.ID.NO. 10)のアニーリングによって調製した。ここでは、オリゴヌクレオチドを、上述のように混合し、及び98 °Cで2分間、65 °Cで30分間及び室温で2時間のインキュベーションによってアニールした。次いで、単離したベクター断片を、過剰にアニールしたオリゴに連結し、及び構築物pCC100をもたらすDH5α-TI^rの適格性細胞中に形質転換した。

30

【 0 0 5 4 】

(pCC200の生成)

プラスミドpBR322(GenBank J01749.1)をEcoRIで消化し、及び次いで、Klenow酵素で平滑端化し、次に、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)で精製した。NheIでの第2の消化の後、4150bpのベクター断片を、アガロースゲルからQIAEX IIゲル抽出キット(Qiagen)を用いて単離した。並行して、構築物pCC100を、BsaAIで消化し、Klenow酵素で平滑端化し、及びQIAquick PCR精製キット(Qiagen)で精製し、次に、XbaIでの第2の消化及び350bp断片のアガロースゲルからの単離を行った。次に、断片を、化学的に適格性のSTBL-2細胞(Invitrogen)中に連結し、及び形質転換し、pCC200をもたらした(図15)。

40

【 0 0 5 5 】

(pCC105 構築物の生成)

50

構築物pCC105は、ヒトPGKのプロモータ、及びヒトCOL1A2遺伝子から導かれるポリ-アデニル化の配列を含む。最初に、COL1A2ポリ-アデニル化配列(Natalizio(ナタリジオ)等、2002年)を、組換えTaqポリメラーゼ(Invitrogen)及びプライマCOL1A2F: 5'-CAG CTA GCC TGC AGG AAG TAT GCA GAT TAT TTG-3'(SEQ.ID.NO.11)及びCOL1A2R-sal: 5'-ACA CGT CGA CCG CTG GTAGAG ATG C-3'(SEQ.ID.NO.12)を用い、著者等によって記載するようにヒトゲノムDNAからPCRによって増幅した。

【0056】

ここに刊行された配列は、5'-端でSbfIの制限配列によって、及び3'-端でSalIの制限配列によって延長される。得られるPCR断片を、pCR-TOP04 TAのクローニングキット(Invitrogen)を用いてpCR-TOP04-TA中にクローン化した。配列決定による挿入物の確認の後、277bpの挿入物を、TOP0ベクターからSbfI及びSalIでの消化によって単離し、及びQIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した。並行して、また、プラスミドpCC101を、SbfI及びSalIで消化し、次いで、ゲル電気泳動させた。2965bpのベクター断片を、アガロースゲルから、GeneClean(ジーンクリーン)のキット(Bio101)を製造者の指示に従って用いて単離した。このベクター断片を、精製したCOL1A2pA断片に等モル量において連結し、及び化学的に適格性のSTBL-2細胞(Invitrogen)に対して形質転換させた。これはプラスミドpCC105(図7)を与えた。

【0057】

(pCC205の生成)

構築物pCC205を、SalI及びEcoRIでのpCC200の消化によって、次いで、4225ntのベクター断片のアガロースゲルからの、QIAEX IIゲル抽出キット(Qiagen)を用いる精製によって作製した。並行して、310ntのCOL1A2のpolyA(ポリA)を、構築物pCC105から、EcoRI及びSalIでの消化によって、次いで、ゲル電気泳動、及びQIAEX IIゲル抽出キットを用いる断片の精製によって単離した。次いで、2種の断片を、等モル量において連結し、及びDH5-Tlrに対して形質転換し、pCC205(図16)をもたらした。

【0058】

(pCC.55Kcolのクローン化)

ベクターpCC205を、Ad5 E1B-55k蛋白質を発現するプラスミドの構築物のために用いる。これには、PCR生成物を、次のプライマを用いて生じさせる: 55KforE: 5'-GGA ATT CGC CAC CAT GGA GCG AAG AAA CCC ATC TGA-3'(SEQ.ID.NO.13)及び55KrevB: 5'-gga tcc TC A ATC TGT ATC TTC ATC GCT AGA GCC-3'(SEQ.ID.NO.14)。PCRを、Pwo DNAポリメラーゼを、製造者のプロトコルに従って3%DMSOの存在下に行う。増幅を、pIG.E1A.E1B上で行い、及びプログラムを、94 で2分間、次に30回のサイクルのもの(94 で30秒間、60 で30秒間、及び72 で90秒間)、及び72 で8分間によって終わるように設定する。得られる1510bpの増幅した断片は、Ad5配列からのE1B-55K配列のnt.の2019から3510までを含む。断片を、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製し、EcoRI及びBamHIで消化し、次に、切断端(cleaved end)を除去するためにゲル電気泳動する。次いで、この断片を、アガロースゲルから、GeneCleanIIキット(Bio101)を用いて精製し、及びpCC205に連結し、これをまた、EcoRI及びBamHIで消化し、及びアガロースゲルから、上述のように単離する。連結混合物を、化学的に適格性のSTBL2細胞(Invitrogen)に対して形質転換し、構築物pCC.55Kcol(図8)をもたらす。

【0059】

(pIG.E1Bのクローン化)

PCR断片を、Pwo DNAポリメラーゼ(Roche)を製造者の指示に従って3%DMSOの存在下に行う。次のプライマを増幅反応において用いた: 5E1Bstart: 5'-GGA ATT CCT CAT GGA GGC TTG GG-3'(SEQ.ID.NO.15)及び5E1Brev2: 5'-GTG TCT CAC AAC CGC TCT C-3'(SEQ.ID.NO.16)。増幅をpIG.E1A.E1B上で行い、及びプログラムを94 で2分間、次に5回のサイクルのもの(94 で30秒間、56 で30秒間及び72 で60秒間)に設定し、これらのサイクルに次いで別の35回のサイクルを行い(94 で30秒間、60 で30秒間及び72 で60秒間)、及び68 で8分間によって終わらせた。次いで、390ntのPCRの断片をKpnI及びEcoR

Iを用いて消化し、347ntの断片をもたらし、それをアガロースゲルからQIAEX IIゲル抽出キット(Qiagen)を用いて単離した。

【 0 0 6 0 】

次いで、この断片を、KpnIでの及び部分的にEcoRIでの消化、次いでゲルからの単離、及びQIAEX IIゲル抽出キット(Qiagen)を用いる精製から得られる5713bpのpIG.EIA.EIBベクターの断片に連結した。連結後、混合物を化学的に適格性のSTBL-2細胞中に形質転換し、プラスミドpIG.EIBをもたらした(図9)。pIG.EIBはAd5のゲノムからのnt.の2019から3510までを含む。

【 0 0 6 1 】

(pCC.E1Bcolのクローン化)

双方の19K及び55KのAd5 E1Bコード配列を運ぶプラスミドの構築のために、プラスミドpCC.55KcolをEcoRI及びKpnIで消化する。5970ntのベクター断片をゲル電気泳動によって単離し、及びアガロースゲルから上述のようにGeneClean kitII(Bio101)を用いて精製する。次いで、構築物pIG.EIBをまた、KpnI及びEcoRIで消化し、及び347ntの断片を、ゲルから単離し、及びQIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いて精製する。この挿入物及び単離されたpCC.55Kcolのベクター断片の連結及びSTBL2細胞への形質転換は、構築物pCC.E1Bcolを与える(図10)。この構築物はAd5ゲノム配列からのnt.の1711から3510までを含む。

【 0 0 6 2 】

(pEC.E1Bのクローン化)

ヒト伸長因子(Human Elongation Factor)1- プロモータ(EF1-)を、プラスミドpEF/myc/nuc(Invitrogen)から、EcoRI及びPmlIでの消化によって単離する。消化後、Klenow酵素で平滑端化し、及び次いで、1183ntのEF1- プロモータ断片をゲル電気泳動によって単離し、及びGeneCleanIIキット(Bio101)で精製する。並行して、ベクターpCC.E1BcolをBstXIで消化し、次いで、平滑端(the ends blunt)を作製するためにT4 DNAポリメラーゼ処置を行い、及びPCR精製カラム(Qiagen)上で精製する。次いで、第2の消化をEcoRVで実行し、次いで、ゲル電気泳動を行う。次に、5827ntのベクター断片を、GeneCleanIIキット(Bio101)を用いて精製する。双方のEF1- 断片及びベクター断片を、等モル量において一緒に連結し、及び化学的に適格性のSTBL-2細胞(invitrogen)に対して形質転換し、これは、プラスミドpCC.E1Bcolにおけるような同じAd5-E1B配列を含むプラスミドpEC.E1B(図11)をもたらす。

【 0 0 6 3 】

(pSC.55Kのクローン化)

SV40のプロモータを、pEF/myc/nucプラスミドDNA(Invitrogen)から、組換えTaq DNAポリメラーゼ(Invitrogen)及び次のプライマを用いることによって増幅する: SV40.forS: 5'-CAA CTA GTA CAT GTG GAA TGT GTG TGT TCA GTT AGG-3'(SEQ.ID.NO. 17)及びSV40.RevE RI: 5'-GGA ATT CAG CTT TTT GCA AAA GCC TAG G-3'(SEQ.ID.NO. 18)。増幅プログラムを、94 で2分間、次に、5回のサイクルのもの(94 で30秒間、48 で30秒間、及び72 で45秒間)、次いで25回の追加のサイクルのもの(94 で30秒間、58 で30秒間、及び72 で45秒間)に設定し、及び68 での8分間によって終わらせた。得られる357bpの増幅された断片(SV40配列GenBank Acc. No. J02400からのヌクレオチドの266から-71まで)を、アガロースゲルから、QIAEX IIゲル抽出キット(Qiagen)を用いて単離した。次いで、この断片を、PCR TOP04bluntのクローニングキット(Invitrogen)を用いて、pCR-TOP0中にクローン化した。配列確認の後、357bpの挿入物を、TOP0ベクターから、EcoRI及びSpeIでの消化によって単離し、及びアガロースゲルから、QIAEX IIゲル抽出キット(Qiagen)を用いて単離した。並行して、プラスミドpCC.55Kcol(pBR322-バックボーン(幹)を持つもの)を、AvrII及びEcoRIで消化し、次いでゲル電気泳動する。5508ntのベクター断片をゲルから上述のように単離し、及び等モル量において、消化されたPCR断片に連結する。連結混合物を、化学的に適格性のSTBL-2細胞中に形質転換し、pCC.55Kcolのような同じAd5 E1B-55K配列を含むプラスミドpSC.55K(図12)をもたらす。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

50

一次HER細胞から形質転換したクローンを生じさせるため、DNA断片を含む適切な発現カセットをゲルから単離する。(重複)ベクター配列の排除は、共-統合の機会を減少させると考えられる。これには、pCC.E1A及びpCC.E1AB21をBsaAI及びAflIIIで消化し、及び挿入物断片を、ゲルから、ELU-Trap apparatus(トラップ装置)(Schleier (シュライエル)及びSchuell(シュル))を製造業者の指示に従って用いて精製する。この装置は多量のDNA断片の単離を可能にする。構築物pEC.E1B及びpSC.55Kを、AatII/HincII及びAflIII/HincIIのそれぞれで消化し、及び挿入物断片を上述のように単離する。一次HER細胞を培養し、及び上述のように形質移入する。pCC.E1A及びpEC.E1Bから単離される断片を、形質移入のために組み合わせる。pCC.E1AB21から単離されるDNA断片を、pSC.55Kと組み合わせるか、又は単独で形質移入する。次いで、後者の培養物を、観察されたクローンのサイズによって最初の形質移入に続く7-10日にpSC.55Kから単離されるDNA断片と共に、再形質移入(retransfected)する。形質移入前1日に、E1AB21単独で形質移入した皿の半分を10cmの皿に引き継ぎ(passed to)、及び次いで再-形質移入し、皿の他の半分を、先立って継代培養(passage)することなく、再-形質移入する。

【0065】

これらの形質移入から得られる形質転換クローンを採集し、及び更に96-ウェル平板、及び次いでより一層大きな形式(formats)に拡げる。組込み部位及び断片のコピー数を、サザンプロットを用いて研究し、及びPCRによって、挿入が近い近辺(in close vicinity)で行われたどうかを明らかにする。E1A及びE1B 55Kが単一コピーにおいて存在するか、又は1コピーよりも多く存在するが、形質移入された細胞のゲノムにおけるこれらの配列の逆方向反復配置を伴うことがないか、又はE1A及び少なくとも1種のE1Bのコード配列(この場合、E1B-55K)が、少なくとも4kbによって、好ましくは少なくとも10kbによって、より一層好ましくは少なくとも34.5kbによって分かれるクローンを、用いるのが更に好ましい。

【0066】

(例2)(より一層大きなスペーサー配列によって分かれるE1A及びE1Bの領域を持つ核酸を用いる、補完性株細胞の生成)

先の例で記載するように、安定して形質転換された細胞クローンを、一次細胞から、E1A及びE1Bについての別々のプラスミドを用いて生じさせることが可能である。しかし、DNA断片と一緒に形質移入するとき、まだ、形質移入された断片が互いに近接近する機会があるが、この機会は著しい配列重複の不存在によって減少する。30kbよりも少ないnon(非)-E1配列を有する、E1A及びE1Bの発現カセットを用いる、染色体におけるそれらの間への組込みの可能性は、大きな一片(large pieces)の非-(E1-)コードDNA配列(所謂、‘スペーサー’断片)を用いる異なるE1発現カセットを隣接させることによって避けることができる。E1A-搬送断片が、発生したパッケージング細胞のゲノムにおいてE1B-含有断片に対して隣に統合される場合、大きな側方配列が十分な距離を創成すべきであり、E1A及びE1Bの暗号化配列が、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ベクターの増殖に際し、同じ組換えベクター分子中に再び組み入れられる機会を排除する。用いることができる大きなスペーサーDNA断片の非制限的な例は、例えば、ヒトのジストロフィン遺伝子又はヒトのApo-E1遺伝子から導かれる大きな配列である。他のスペーシング(間隔空け)分子をまた、非-ヒト供給源からさえも、用いることができる。好ましくは、側方配列は、機能的蛋白質のためのコード領域を含ず、及び従ってイントロン配列から導くことができる。また、E1A及びE1Bの配列は、異なる分子上にある必要はないが、コスミドのような同じ大きな分子上に置かれてもよい。これらのE1A及びE1Bの搬送分子の例を図13に与える。好適例では、E1A及びE1Bのコード領域間の距離は>34.5kbであり、その理由は、そうするとウイルスへの2種の領域への共-挿入(co-insertion)が包まれるには余りにも大きなゲノムをもたらすからである。この状態は、例えば、発現カセットを概略中間部分において持つ、およそ40kbの2種の別々のコスミド断片が用いられる場合に達する。しかし、逆方向反復構造の形態におけるE1がHDEPの生成の頻度に貢献すると仮定すると、そのとき、E1A及びE1Bのカセットがおよそ22 kb(図13Iにおけるように)の全長の単一のコスミド断片上

に位置付けられる構築物は、第2のコピーが第1のものに対して隣の逆方向配向における細胞のゲノムにおいて位置付けられることになることでさえ十分である。次いで、鏡像構造の完全な統合はまた、>38kbの断片を包含する。また、逆方向反復の存在がHDEP形成の頻度を増加させる場合、E1A及びE1Bの2種の完全なコピーを含むDNA断片が 20kbの長さを持つときでさえ、多数コピー(multiple copies)がダイレクト(直列)反復(配列)として統合される状態は、より一層問題が少ないと考えられる。逆方向反復の不存在下では、組換えウイルスにおいて残るスペース(空間)よりも大きな任意のE1-含有断片(即ち、38kbから組換えウイルスの実際のゲノム長を減じるもの)の組換えウイルスへの統合は、それに、逐次工程として本質的なウイルス配列の部分を削除するように強いて、パッケージング及び従って増殖を確かにする。相同組換えを介して起こる最初のHDEPゲノムの分析(Murakami 等、2002年)は、ウイルス配列の欠失が可能であることを示した。

10

【0067】

細胞のゲノム中に統合するDNA配列は、クロマチン-関連抑制(associated repression)によって、転写因子の活性化のために常に利用できるものではない。特に、イントロンDNAの大きな断片が用いられるとき、それらはゲノム領域から生じ、それらは通常、これらの配列を用いて形質導入される細胞において活性ではなく、遺伝子発現は不活性な染色質によって遮断されるかもしれない。最近、配列は、この抑制を阻害することができることが確認された。例としては、ニワトリの β -グロビンHS4要素(element)(米国特許第5,610,053号明細書)のもので、それは絶縁配列、ショウジョウバエのscs又はscs'の要素(Kellum(ケラム)等、1991年; Farkas(ファークス)等、1992年)、及び抗-リプレッサー要素(Kwak(クワクス)等、2003年; WO 03/004704号)のための特定のスクリーンによって識別されるヒトゲノムにおける一連の配列(所謂、抗-リプレッサー(anti-repressor)要素又はSTAR(スター)要素)として機能する。かかる配列のE1A及びE1Bの発現構築物における組入れは、その配列がE1A及び/又はE1Bの遺伝子の位置的なサイレンシング(positional silencing)を妨げ、また、不死化したクローンの量を高める。したがって、本発明の一定の具体例において、1種又はそれよりも多い種類のSTAR-要素、例えば、STAR 7(Genbankの受入番号AY190751)又はSTAR 40(Genbankの受入番号AY190756)は、少なくとも1種のE1A及び/又はE1Bの発現構築物において存在する。好ましくは、前記要素は、双方のE1A及び/又はE1Bのコード配列に隣接し、即ち、発現構築物は、5'から3'までの: STAR要素-発現調節配列(例えば、プロモータ)-E1Aのコード配列; 又はE1A+1種のE1Bのコード配列; 又は1種のE1Bコード配列; 又は双方のE1Bコード配列-ポリアデニル化配列-STAR要素を備えることができる。

20

30

【0068】

(例3)(別々の構築物上での、及びスタッフDNAによって隣接されるE1A及びE1Bを用いる株細胞の生成)

この例は、本発明に従う新しい株細胞を、大きなスタッフDNAによって隣接されるE1A発現カセットを持つ第1のDNA断片、及びプラスミドDNAによって隣接されるE1B発現カセットを持つ第2のDNA断片の共-形質移入によって生じさせることを記載する。

【0069】

ヒトのジストロフィンのイントロン44配列(Genbank Acc. No. M86524)で、コスミドベクターの幹においてクローン化されたもの(pdys44; 図17)を、この例において、E1A発現プラスミドを囲むスタッフDNAとして採用した。

40

【0070】

構築物pCC.E1A(例1で記載する; 図4)を、AflIII及びAvrII(New England Biolabs)で消化し、及び突出末端(protruding ends)をKlenow酵素(New England Biolabs)で平滑化した。消化した断片を0.5%のTAEのアガロースゲル上で分離し、及びPGK-E1Aの発現カセットに対応する2kbの断片をゲル抽出キット(Qiagen)を用い製造者の記述に従って精製した。

【0071】

構築物pdys44(図17)をBglII(New England Biolabs)で消化し、及び突出末端をKlenow酵素で平滑端にした。断片を0.5%のTAEのアガロースゲル上で分離し、幹のプラスミド、及

50

びジストロフィンのイントロンの部分を含む27kbの断片を切り取った。次いで、ゲル薄片を少量のガラスウールを含むシリンジにおいて、プランジャーを用いて入れ、及びDNAを含む緩衝液をエッペンドルフ管において押す。このようにして得られるDNA溶液はおよそ5 ng/μLを含み、及び精製した2kbのPGK-E1Aの断片との連結反応において直接使用した。

【 0 0 7 2 】

DH5 T1の適格性細胞への形質転換は、構築物p44-l.ccE1A (図18)をもたらした。構築物は、ヒトPGKプロモータ及び合成polyA信号の制御下のE1Aを含む。

【 0 0 7 3 】

構築物pE1B (例1で記載する; 図3)を、この例において、E1B発現プラスミドとして用いた。プラスミドはそれ自身のプロモータ及びB型肝炎ウイルス(HBV)のpolyA信号の制御の下でE1Bを含む。

10

【 0 0 7 4 】

構築物p44-l.ccE1Aを、XhoI及びPmeIで消化し、及び消化したDNAをフェノール/クロロホルム(1:1)抽出によって精製し、次いでエタノール沈殿を行った(E1Aコード配列の上流の約11.6kb(PGKプロモータを含む)及び下流の約6.5kb (合成polyA信号を含む)のスタッファによって隣接されるE1Aコード配列をもたらす)。次いで、DNAをペレット化し、70%エタノールで洗浄し、及び滅菌した内毒素-フリーのTEにおいて無菌的に溶解した。プラスミドpE1Bを、ScaIで消化し、及び上述のように精製した(E1Bコード配列の上流の約1.4kb及び下流の2.3kbよりも多いスタッファ、HBVのpolyA配列を含む下流のスタッファによって隣接されるE1Bコード配列をもたらす)。

20

【 0 0 7 5 】

一次ヒトHER細胞を培養し、1種の一連の形質移入における継代番号(passage number)6 (PN6)で、及び第2の一連の形質移入におけるPN9で形質移入した。HER細胞培養及び形質移入を例1において記載する方法に従って行った。上述のように調製したDNAsを含むE1A及びE1Bを、異なる割合で、別々の形質移入において混合した(双方の断片は、重大な重複を欠き、互いに関して、ベクター配列又は調節配列から導かれ、それによって、2種の断片間の相同組換えの機会が減少し; 双方の断片が単一の核酸分子を形成し(例えば、端々接合又は連結、理論的な可能性)、及び次いで、ゲノム中に単一ユニットとして統合する場合、生じる細胞におけるE1A及びE1Bのコード配列は、4kbよりも大きなスタッファ配列によって分けられる(少なくとも6.5kb(下流のE1A)+1.4kb(上流のE1B)=E1A及びE1Bのコード配列間の少なくとも7.9kb、理論上))。合計で8枚の皿を双方の構築物のおよそ等モル比で形質移入し(17 μgのE1A及び3 μgのE1Bのプラスミド)、及び3枚の皿を各断片の10 μgで形質移入した。増殖巣を、双方の一連の形質移入において観察したが、各構築物の10 μgの場合には、比較的より一層多くの増殖巣が得られた。AseI及びBglIで消化された構築物pIG.E1A.E1Bを、別々の皿上で陽性対照(positive control)(20 μg DNA/皿)として用いた。期待されるように、増殖巣形成の効率は、(単一の)陽性対照プラスミドでのものが2種の別々の断片(p44 l.ccE1A及びpE1Bから)でのものよりも高かった。pIG.E1A.E1Bプラスミドは、およそ10×より一層有効であった。さらに、陽性対照プラスミドでのもの及び2種-断片の形質移入でのものの双方で、採集された形質転換細胞クローンの約80-90%について、実行可能(生存可能、viable)であり、及び株細胞として確立されることが見出された。

30

40

【 0 0 7 6 】

これらの実験は、明らかに、一次細胞を、別々のDNA断片上の、及び(非-重複)スタッファDNAによって隣接される、E1A及びE1Bの遺伝子で共-形質移入することによって形質転換することを可能にすることを示す。合計で6種のクローンのHER01-B-71 (European Collection of Cell Cultures(ヨーロッパ・コレクション・オブ・(アニマル・)セル・カルチャー)(ECACC)で、第04100101号の下に2004年10月1日に寄託した)、HER01-H-87 (ECACCで、第04100102号の下に2004年10月1日に寄託した)、HER01-H-86、HER01-H-88、HER01-H-89及びHER01-B-90を更に分析した。

【 0 0 7 7 】

E1遺伝子の発現をE1蛋白質についての特定の抗体を用いてウエスタンブロットにおいて

50

分析した。発生した細胞クローンの溶解物(lysate)からの10 µgの蛋白質の合計量を、ウエスタンブロットアッセイにおいて用いた。試料を、1/4容量のNuPage(中性ゲル電気泳動)試料緩衝液(Invitrogen)の添加後、15分間70 °Cで変性させた。陽性対照として、PER.C6^(R)細胞の溶解物を用いた。形質移入してない一次HER細胞溶解物(継代数6)を、陰性対照として働かせた。試料を、10% BisTris SDS PAGE(page)ゲル(Invitrogen)上で、Seebblue plus2(シーブルー・プラス2)着色(prestained)マーカー(Invitrogen)と一緒に動かした。ウエスタンブロットをゲルから調製した。次の抗体を用いた: いずれかの1) E1A: マウス抗-ヒトAd2.E1A(1:400, Santa Cruz(サンタクルーズ)), 又は2) E1B.19K: ラット抗-ヒトE1B 21Kモノクローナル(1: 500, Oncogene(オンコジーン)), 又は3) E1B.55K: マウス抗-ヒト55Kda(Dr. R. Hoeben(アール・ホーベン博士)から得られる、雑種細胞種(hybridoma)株細胞C9A1.C6から収穫される、LUMC、Leiden(ライデン))。次の抗体を、第2抗体として用いた: 1) E1A: ヤギ-抗マウスIgG-HRP(Biorad)、2) E1B.19K: ヤギ-抗ラットIgG-HRP(Epcam(イプカム社)), 3) E1B.55K: µLのヤギ-抗マウスIgG-HRP(Biorad)。蛋白質をECL+アッセイ(Amersham(アマシャム社))の使用によって視覚化した。

【0078】

これらの実験から、すべての試験したクローンがE1A及びE1Bの蛋白質を発現すること、及びそれらのレベルがPER.C6^(R)細胞(図19)に匹敵することは明らかである。これは、一次細胞の形質転換が実際、Ad5 E1発現によって誘導され、及び自発的事象の結果でないことを確認する。

【0079】

これらの株細胞におけるAd5 E1遺伝子の機能的発現はまた、細胞がE1-欠失Ad5ウイルスを補い得ることを示すことによって試験することができる。したがって、6種の異なる細胞クローンを、Ad5.eGFPベクターの複製について試験し、E1-欠失(Ad5配列のnt.455-3510の欠失)Ad5-系で、緑色蛍光蛋白質(Green Fluorescent Protein)を発現する。これについて、細胞は 1×10^6 個の細胞/ウェルの密度で播種され、5種のウイルス粒子(VP)/細胞の感染効率(a multiplicity of infection)(MOI)で後の日に感染させた。陽性対照として、PER.C6^(R)細胞をまた、播種し、及び5のMOIで感染させた。5日後、十分な細胞変性効果(CPE)がすべてのウェルで見られた。細胞及び培地(媒体)を収集し、凍結/融解(freeze/thawed)を3回行い、及び細胞片(細胞残屑、cell debris)を除去するために遠心分離した。次いで、上清(粗溶解物)を、A549細胞に感染させるのに用いた。これには、 5×10^5 個のA549細胞を24-ウェル板において播種し、及び1日後に粗溶解物の50 µLで感染させた。2日後、A549細胞を収集し、及びFACSによってGFP発現について分析した。結果はすべてのクローンがAd5.eGFPベクター(図20)を補完できることを示す。

【0080】

顕著に、アデノウイルスベクター(E1-欠失の、欠損nt 455-3510)は、株細胞(Ad5 nt 459-3510)において存在するE1配列との重複を持たず、及び従って、この例での新しい株細胞を用いるアデノウイルスベクターの組合せは、本発明に従うパッケージングシステムに達し、及びこの例での組換えアデノウイルスの発生は、本発明に従う組換えアデノウイルスのバッチを発生させる方法に達する。

【0081】

発生した株細胞からのゲノムDNAを、E1A及びE1Bのプロープ(探査子)を用いて、サザンブロット上で試験し、E1A及びE1Bのコード配列が細胞のゲノムにおいて4kbよりも大きいものによって分けられることを示す。これには、ゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼ(制限酵素)EcoRV及びBglIII(図21)で消化する。消化したDNAを、ゲル電気泳動(例えば、電場反転(field inverted)ゲル電気泳動、FIGEを用い、大きなDNA断片の分離を可能にする)によって寸法分離し、及び次いで、キャピラリー(毛管)プロットングによってナイロン膜に移す。3種の異なる探査子にプロットのハイブリダイゼーションのための放射性標識をした。1種のAd5.E1Aの探査子を、EcoRV部位からの3'に位置付けられるEcoRV-SalIの制限断片(1330bp; 図21参照)からAd5.E1A遺伝子において生じさせる。2種のAd5.E1Bの探査子を発生させる; Ad5.E1B (5'), BssHII-BglIII断片(1354bp)からのもの、及び及びAd5.E1B(3'

10

20

30

40

50

)、BglIII-BsrGIの断片(652bp)からのもので、これらは、それぞれ、Ad5.E1B遺伝子におけるBglIII部位の5'側及び3'側に位置付けされる。発生した株細胞の消化したゲノムDNAを含む同一のプロットを調製するか、又は代わりに、プロットを第1の探査子のハイブリダイゼーション後に剥ぎ取り(stripped)、及び次いで、第2のものにハイブリダイズさせる。いずれの方法も、E1A及びE1Bの探査子で得られる信号の上敷(overlay)を可能にすべきである。

【0082】

形質移入及び形質転換株細胞の発生の際の統合に次いで、E1A断片がE1B-含有断片に対して隣に統合されるようになる場合、E1A及びE1Bのための探査子は、プロット上の同じバンド、2種の遺伝子の間の距離を識別するバンドのサイズを検出する。E1A及びE1Bの断片の互いに関する配向が知られていないので、2種のE1B探査子を別々に用いて、BglIIIの制限部位の断片5'又は3'のどちらかへのハイブリダイゼーションを可能にする。E1A断片が別のE1A断片に対して隣に統合されるようになる場合、次いで、EcoRVの消化から得られるバンドは、E1B探査子によって認識されない。また、単一の組込み体(integrants)又は端部断片は、双方の探査子によって認識されないバンドを生じさせる。

【0083】

全体として、この例での実験は、はっきりと、別々のプラスミド、大きなスタッフ領域によって隣接されるE1Aを含むもの、及び幹配列によって隣接されるE1Bを含むものの一次ヒト細胞の共-形質移入が、形質転換株細胞をもたらすことを示す。さらに、これらの株細胞はE1-欠失Ad5ベクターの有効な相補性のために十分な量においてE1蛋白質を発現する。

【0084】

代わりの具体例では、E1A及びE1B配列を、単一の構成物中に、これらの配列間のスタッフ配列を用いてクローン化し、しかる後、株細胞を単一の構成物を用いて創出する。

【0085】

明らかに、E1A及びE1Bの間のより一層大きい距離が望まれる場合、E1Bコード配列はまた、より一層長いスタッフ核酸によって隣接されてよく、及び/又はE1A及びE1Bのコード配列に隣接するスタッフの長さを、標準的な日常的に行われる分子生物学の技術によって、本明細書の開示の教示に続いて、増加させてもよい。したがって、明らかに、この例は、本発明の範囲を実際に実行した実験に制限するものではなく、むしろ本発明の概念の例証として解釈される。

【0086】

【表1】

表 I(II): 一次 HER 細胞の Ad5-E1 発現構築物を用いる形質転換

構築物	量	#皿	増殖巣/皿
PIG.E1A.E1B	20 μ gr(グラム)	2	31
PIG.E1A	20 μ gr	2	0
PIG.E1A+pE1B	10 μ gr 各々	4	15
PIG.E1AB21	20 μ gr	2	11.5
pIG.E1AB21+pE1B	10 μ gr 各々	4	10
AdApt.eGFP	20 μ gr	1	0

【0087】

(参考)

Byrd(バード) P, Brown(ブラウン) KW, Gallimore(ガルリモア) PH. 1982年. Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA(クローン化アデノウイルス12 DNAによるヒト胚網膜芽細胞の悪性形質転換). Nature(ネイチャー

) 298: 69-71.

Byrd PJ, Grand(グランド) RJA, Gallimore PH. 1988年. Differential transformation of primary human embryo retinal cells by adenovirus E1 regions and combinations of E1A + ras(アデノウイルスE1領域及びE1A+rasの組合せによる一次ヒト胚網膜の示差形質転換). *Oncogene*(オンコジーン) 2: 477-484.

Fallaux(ファラオー) FJ, Bout(ブート) A, van der Velde(ファン・デル・フェルデ) I, van den Wollenberg(ファン・デル・ウォーレンバーグ) DJM, Hehir(ヘイール) KM, Keegan(キーガン) J, Auger(オーガー) C, Cramer(クラマー) SJ, van Ormondt(ファン・オーモンド) H, van der Eb(ファン・デル・エバ) A, Valerio(ヴァレリオ) D, Hoeber(ホーベン) RC. 1998年. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses(新ヘルパー細胞及び対応初期領域1-欠失アデノウイルスベクターが複製-適格性アデノウイルスの生成を妨げる). *Hum Gene Ther*(ヒューマン・ジーン・セラピー) 9: 1909-1917.

Farkas(ファークス) G, Udvardy(オドバルディ) A. 1992年. Sequence of scs and scs' *Drosophila* DNA fragments with boundary function in the control of gene expression(遺伝子発現の調節における境界機能を有するscs及びscs'のショウジョウバエDNA断片の配列). *Nucleic Acids Res*(ヌクレイック・アシッド・リサーチ). 20: 2604.

Gallimore, P. H., Byrd, P. J., Whittaker(ホイッタカー), J. L.及びGrand, R. J. A. (1985年). Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies(アデノウイルスタイプ12のE1 DNA又はE1領域の特定断片を含有するDNAプラスミドによって形質転換されるラット細胞の特性: 形質転換頻度の比較). *Cancer Res*(がん研究). 45, p2670-2680.

Gallimore, P. H., Grand, R. J. A.及びByrd, P. J. (1986年). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes(サルウイルス40、アデノウイルス及びras発癌遺伝子を用いるヒト胚網膜芽細胞の形質転換). *AntiCancer Res*(アンチがん研究). 6, p499-508.

Graham(グラハム) FL, Smiley(スマイリー) J, Russell(ラッセル) WC, Nairn(ネアン) R. 1977年. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5(ヒトアデノウイルスタイプ5からのDNAによって形質転換されたヒト株細胞の特徴付け). *J Gen Virol*(ジャーナル・オブ・ジェネラル・バイロロジー) 36: 59-72.

Jochemsen(ヨッヒェンセン) AG, Peltenburg(ペルテンブルク) LTC, te Pas(テ・パス) MFW, de Wit(デ・ウィット) CM, Bos(ボス) JL, van der Eb AJ. 1997年. Activation of adenovirus 5 E1A transcription by region E1B in transformed primary rat cells(形質転換一次ラット細胞における領域E1Bによるアデノウイルス5のE1A転写の活性化). *EMBO J*(ジャーナル). 6: 3399-3405.

Kwaks(クワクス) TH, Barnett(バーネット) P, Hemrika(ヘムリカ) W, Siersma(シーアスマ) T, Sewalt(シューワルト) RG, Satijn(サティジン) DP, Brons(ブロンス) JF, Van Blokland(ファン・ブロックランド) R, Kwakman(クバクマン) P, Kruckeberg(クルックベルク) AL, Kelder(ケルダー) A, Otte(オテ) AP. 2003年. Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells(哺乳類細胞における高く安定な蛋白質を与える抗-阻止要素の確認). *Nature Biotech*(ネイチャー・バイオテクノロジー) 21: 553-558 (+誤植(corrigendum) volume 21 number 7(第21巻、第7号), july(7月) 2003年, p. 822).

Kellum(ケラム) R, Schedl(シェーデル) P. 1991年. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains(より一層高い程度の染色体ドメインの境界についての位置-効果アッセイ). *Cell*(セル) 64: 941-950.

Lochmuller(ロツホミュラー), H., Jani(ジャニ), A., Huard(ユアール), J., Prescott(プレスコット), M., Simoneau(シモノー), M., Massie(マッシー), B., Karpath(カル

10

20

30

40

50

パト), G. 及び Acsadi (アクサディ), G. (1994年) Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (dE1+dE3) during multiple passages in 293 cells (複製-欠損アデノウイルス組換え体(dE1+dE3)の293細胞における多数継代の間の貯蔵物での初期領域1-含有複製-適格性アデノウイルスの出現). *Human Gene Therapy*, 5, 1485-1491.

Louis (ルイス) N, Eveleigh (イブレグ) C, Graham (グラハム) FL. 1997年. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line (ヒトアデノウイルスタイプ5形質転換293株細胞からの細胞性-ウイルス接合部のクローン化及び配列決定). *Virology* (バイロロジー). 233: 423-429.

Murakami (ムラカミ) P, Pungor (プンゴア) E, Files (ファイルズ) J, Do L (ドエル), van Rijnsoever (ラインソエバー) R, Vogels (フォーゲルス) R, Bout (ブート) A, McCaman (マクケイマン) M. 2002年. A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles (アデノウイルスベクター及びパッケージング株細胞の間の相同性の単一短ストレッチが細胞変性効果-誘導、ヘルパー-依存性E1-陽性粒子を生じさせ得る). *Hum Gene Ther* 13: 909-920.

Murakami P, Havenga (ハベンガ) M, Fawaz (ファバツ) F, Vogels R, Marzio (マルチオ) G, Pungor E, Files J, Do L, Goudsmit (ハウトスミット) J, McCaman M. 2004年. Common structure of rare replication-deficient E1-positive particles in adenoviral vector batches (アデノウイルスベクターのバッチにおける稀な複製-欠損E1-陽性粒子の共通構造). *J Virol* (ジャーナル・オブ・バイロロジー) 78: 6200-6208.

Nevels (ニーベルス) M, Tauber (タウバー) B, Spruss (シュプラス) T, Wolf (ウォルフ) H, Dobner (ドプナー) T. 2001年. "Hit-and-Run" transformation by adenovirus oncogenes (アデノウイルスオンコジーンによる“ヒット-アンド-ラン(奇襲攻撃)”形質転換). *J Virol*. 75: 3089-3094.

Nichols (ニカルズ) WW, Lardenoije (ラルデノイジェ) R, Ledwith (レッドウィズ) BJ, Brouwer (ブラウエル) K, Manam (マナム) S, Vogels R, Kaslow (カスロウ) D, Zuidgeest (スッドゲスト) D, Bett (ベト) AJ, Chen (チェン) L, van der Kaaden (カーデン) M, Galloway (ギャロウエー) SM, Hill (ヒル) RB, Machotka (マホトカ) SV, Anderson (アンダーソン) CA, Lewis (ルイス) J, Martinez (マルチネス) D, Lebron (ルブロン) J, Russo (ラッソ) C, Valerio D, Bout A. Propagation of adenoviral vectors: use of PER.C6 cells (アデノウイルスベクターの増殖: PER.C6細胞の使用). In *Adenoviral vectors for gene therapy* (遺伝子治療のためのアデノウイルスベクターにおいて), (Ed. (編集) Curiel (クリエル) D. T. 及び Douglas (ダグラス), J. T.). Pub (出版). Academic Press (アカデミック・プレス社), 2002年.

Rao (ラオ), L., Debbas (デバス), M., Sabbatini (サッパティーニ), P., Hockenbery (ホッケンベリー), D., Korsmeyer (コルスマイヤー), S. 及び White (ホワイト), E. (1992年). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins (アデノウイルスE1A蛋白質がアポトーシスを誘導し、それがE1B 19-kDa及びBcl-2の蛋白質によって抑制される). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ) 89, p7742-7746.

Steinwaerder (シュタインブエルデ) DS, Carlson (カールスン) CA, Lieber (リーバー) A. 1999年. Generation of adenovirus vectors devoid of all viral genes by recombination between inverted repeats (逆方向反復の間の組換えによるすべてのウイルス遺伝子を欠くアデノウイルスベクターの生成). *J. Virol*. 73: 9303-9313.

Van den Elsen (ファン・デン・エルセン) P, de Pater (デ・パテール) S, Houweling (ハウエリング) A, van der Veer (ファン・デル・ビア) J, van der Eb A. 1982年. The relationship between region E1a and E1b of human adenoviruses in cell transformation (細胞形質転換におけるヒトアデノウイルスの領域E1a及びE1bの関係). *Gene* (ジーン) 10

ン) 18: 175-185.

White, E. (1995年). Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B(E1A及びE1Bによるp53-依存アポトーシスの調節). In: The molecular repertoire of adenoviruses III(アデノウイルスIIIの分子レパートリーにおける). Eds(編集). Doerfler(ドルフラー), W. 及びBohm(ボーム), P.. Springer-Verlag(シュプリンガー出版) Berlin(ベルリン) Heidelberg(ハイデルベルク) 1995年, p33-58.

White, E. (1996年). Life, death, and the pursuit of apoptosis(生命、死、及びアポトーシスの探求). Genes Dev(ジーンズ・アンド・デベロップメント). 10(1), p1-15.

Zantema(ザンテマ), A. 及びvan der Eb, A. J. (1995年). Modulation of gene expression by adenovirus transformation(アデノウイルス形質転換による遺伝子発現の調節). 10

In: The molecular repertoire of adenoviruses III(アデノウイルスIIIの分子レパートリーにおける). Eds(編集). Doerfler, W. and Bohm, P. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1995年, p1-23.

【 0 0 8 8 】

SEQUENCE LISTING

<110> CRUCELL HOLLAND B.V.

Vogels, Ronald

Havenga, Menzo J.E.

Zuijdgheest, David A.T.M.

20

<120> Packaging cells for recombinant adenovirus

<130> 0095 WO P00 PRI

<160> 18

<170> PatentIn version 3.2

30

<210> 1

<211> 7315
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> plasmid pIG.E1A.E1B

<220>
 <221> human phosphoglycerate kinase promoter
 <222> (17)..(504)

10

<220>
 <221> E1 region of human adenovirus type 5 genome
 <222> (513)..(3564)

<220>
 <221> hepatitis B virus polyadenylation sequence
 <222> (3588)..(4205)

20

<400> 1
 gaattcgata attccacggg gttgggggttg cgccttttcc aaggcagccc tgggtttgcg 60
 caggggacgcg gctgctctgg gcgtgggtcc gggaaacgca gcggcgccga ccctgggtct 120
 cgcacattct tcacgtccgt tcgcagcgtc acccggatct tcgccgctac ccttgtgggc 180
 cccccggcga cgcttcctgc tccgccccta agtcgggaag gttccttgcg gttcgcggcg 240
 tgccggacgt gacaaacgga agccgcacgt ctactagta ccctcgcaga cggacagcgc 300
 caggggagcaa tggcagcgcg ccgaccgcga tgggctgtgg ccaatagcgg ctgctcagca 360
 gggcgcgcgcg agagcagcgg ccgggaaggg gcgg tgcggg aggcgggggtg tggggcggtg 420
 gtgtggggccc tgttcctgcc cgcgcggtgt tccgcattct gcaagcctcc ggagcgcacg 480
 tcggcagtcg gctccctcgt tccgaattcg atcgtgtagt gtatttatac ccggtgagtt 540

30

40

cctcaagagg ccactcttga gtgccagcga gtagagtttt ctctccgag ccgctccgac 60 0
 accgggactg aaaatgagac atattatctg ccacggaggt gttattaccg aagaaatggc 660
 cgccagtctt ttggaccagc tgatcgaaga ggtactggct gataatcttc cacctoctag 720
 ccattttgaa ccacctacc ttacgaact gtatgattta gacgtgacgg cccccgaaga 780
 tcccaacgag gaggcggttt cgcagatttt tcccgaactct gtaatgttgg cggtgcagga 840
 agggattgac ttactcactt ttccgccggc gcccggttct ccggagccgc ctcacctttc 900
 ccggcagccc gagcagccgg agcagagagc cttgggtccg gtttctatgc caaaccttgt 960
 accggagggtg atcgatctta cctgccacga ggctggcttt ccacccagtg acgacgagga 1020
 tgaagagggt gaggagtttg tgttagatta tgtggagcac cccgggcacg gttgcaggtc 1080
 ttgtcattat caccggagga atacggggga ccagatatt atgtgttcgc tttgctatat 1140
 gaggacctgt ggcatgttg tctacagtaa gtgaaaatta tgggcagtgg gtgatagagt 1200
 ggtgggtttg gtgtggtaat tttttttta atttttacag ttttgtggtt taaagaattt 1260
 tgtattgtga tttttttaa aggtcctgtg tctgaacctg agcctgagcc cgagccagaa 1320
 ccggagcctg caagacctac ccgccgtcct aaaatggcgc ctgctatcct gagacgcccg 1380
 acatcacctg tgtctagaga atgcaatagt agtacggata gctgtgactc cggc ccttct 1440
 aacacacctc ctgagataca ccgggtggc ccgctgtgcc ccattaaacc agttgccgtg 1500
 agagtgtgtg gccgtcgcca ggctgtggaa tgtatcgagg acttgcttaa cgagcctggg 1560
 caaccttttg acttgagctg taaacgcccc aggccataag gtgtaaacct gtgattgcgt 1620
 gtgtgggttaa cgcctttgtt tgctgaatga gttgatgtaa gtttaataaa gggtagagata 1680

10

20

30

40

atgtttaact tgcattggcgt gttaaattggg gcggggctta aagggtatat aatgcgccgt 1740
 gggctaattct tggttacatc tgacctcatg gaggcctggg agtgtttga agatttttct 1800
 gctgtgcgta acttgctgga acagagctct aacagtacct cttggtttt g gaggtttctg 1860
 tggggctcat occaggcaaa gttagtctgc agaattaagg aggattacaa gtgggaattt 1920
 gaagagcttt tgaaatcctg tggtagctg tttgattctt tgaatctggg tcaccaggcg 1980
 cttttccaag agaaggctcat caagactttg gatTTTTcca caccggggcg cgctgcggct 2040
 gctgttgctt ttttgagttt tataaaggat aaatggagcg aagaaacca tctgagcggg 2100
 gggtagctgc tggattttct ggccatgcat ctgtggagag cggttgtgag acacaagaat 2160
 cgctgtctac tgttgctctc cgtccgccg gcgataatac cgacggagga gcagcagcag 2220
 cagcaggagg aagccaggcg gcggcgccag gagcagagcc cat ggaaccg gagagccggc 2280
 ctggaccctc gggaatgaat gttgtacagg tggctgaact gtatccagaa ctgagacgca 2340
 ttttgacaat tacagaggat gggcaggggc taaagggggg aaagaggag cggggggctt 2400
 gtgaggctac agaggaggct aggaatctag cttttagctt aatgaccaga caccgtcctg 2460
 agtgatttac ttttcaacag atcaaggata attgcgctaa tgagcttgat ctgctggcgc 2520
 agaagtattc catagagcag ctgaccactt actggctgca gccaggggat gatTTTgag 2580
 aggtatttag ggtatatgca aagggtggcac ttaggccaga ttgcaagtac aagatcagca 2640
 aacttgtaaa tatcaggaat tgttgctaca tttctggg aa cggggccgag gtggagatag 2700
 atacggagga taggttgcc tttagatgta gcatgataaa tatgtggccg ggggtgctt 2760
 gcatggacgg ggtggttatt atgaatgtaa ggtttactgg cccaatttt agcggtagcg 2820

10

20

30

40

ttttcctggc caataccaac cttatcctac acggtgtaag cttctatggg tttaacaata 2880
 cctgtgtgga agcctggacc gatgtaaggg ttcggggctg tgccttttac tgctgctgga 2940
 aggggggtgt gtgtcgcccc aaaagcaggg cttcaattaa gaaatgcctc ttgaaaggt 3000
 gtaccttggg tatcctgtct gagggtaact ccagggtgcg ccacaatgtg gcctccgact 3060
 gtggttgctt catgctagtg aaaagcgtgg ctgtgattaa gcataacatg gtatgtggca 3120
 actgcgagga cagggcctct cagatgctga cctgctcgga cggcaactgt cacctgctga 3180
 agaccattca cgtagccagc cactctcgca aggcctggcc agtgtttgag cataacatac 3240
 tgaccgcgtg ttccttgcat ttgggtaaca ggaggggggt gttcctacct taccaatgca 3 300
 atttgagtca cactaagata ttgcttgagc ccgagagcat gtccaagggt aacctgaacg 3360
 ggggtgttga catgaccatg aagatctgga aggtgctgag gtacgatgag acccgcacca 3420
 ggtgcagacc ctgcgagtgt ggcggtaaac atattaggaa ccagcctgtg atgctggatg 3480
 tgaccgagga gctgaggccc gatcaact tgg tgctggcctg caccgcgct gagtttggt 3540
 ctagcgatga agatacagat tgagctcgac ctgcaggcat gcaagctgat ccttcgcggg 3600
 acgtcctttg ttacgtccc gtcggcgctg aatccgcgg acgaccctc gcggggccgc 3660
 ttgggactct ctgctccct tctccgtctg ccgttcagc cgaccacggg gcgcacct ct 3720
 ctttacgcgg tctccccgtc tgtgccttct catctgccg tccgtgtgca cttcgcttca 3780
 cctctgcacg ttgcatggag accaccgtga acgcccata gatcctgcc aaggtcttac 3840
 ataagaggac tcttgactc ccagcaatgt caacgaccga ccttgaggcc tacttcaaag 3900
 actgtgtgtt taaggactgg gaggagctgg gggaggagat taggttaaag gtctttgtat 3960

10

20

30

40

taggaggctg taggcataaa ttggtctgcg caccagcact atgcaacttt ttcacctctg 4020
 cctaatacatc tcttgtagat gtcccactgt tcaagcctcc aagctgtgcc ttgggtggct 4080
 ttggggcatg gacattgacc cttataaaga atttgagct actgtggagt ta ctctcggt 4140
 tttgccttct gacttctttc cttccgtcag agatcctgca gagcttgggtg gaaggcagtg 4200
 gaattagctt ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca 4260
 caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaataag 4320
 tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt 4380
 cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc 4440
 gctcttccgc ttctcgctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg 4500
 tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggg gat aacgcaggaa 4560
 agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg 4620
 cgtttttcca taggtccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga 4680
 ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agtccctcg 4740
 tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg 4800
 gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc 4860
 gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 4920
 gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt a tcgccactg gcagcagcca 4980
 ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtgg 5040
 ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag 5100

10

20

30

40

ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	5160	
gtgggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc	5220	
ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggaattt	5280	
tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt	5340	
ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggt ctga cagttaccaa tgcttaatca	5400	10
gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagtggcc tgactccccg	5460	
tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac	5520	
cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaagg	5580	
ccgagcgag aagtggctct gcaactttat ccgcctecat ccagtctatt aattgttgcc	5640	20
gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta	5700	
caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac	5760	
gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc	5820	
ctccgatcgt tgtcagaagt aagtggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac	5880	
tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact	5940	30
caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaaa	6000	
tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt	6060	
cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca	6120	
ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa	6180	40
aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaa aaagg gaataagggc gacacggaaa tggtgaatac	6240	

tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg 6300
 gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc 6360
 gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaa aata 6420
 ggcgtatcac gagggccctt cgtctcgcgc gtttcgggtga tgacggtgaa aacctctgac 6480
 acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag 6540
 cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat 6600
 cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata aaattgtaaa cgtaaatatt ttgttaaaat 6660
 tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa 6720
 tcccttataa atcaaaagaa tagcccgaga tagggttgag tgttgttcca gtttgaaca 6780
 agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg 6840
 gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccca aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta 6900
 aagcactaaa tcggaaccct aaaggagacc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg 6960
 cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa 7020
 gtgtagcggc cacgctgcgc gtaaccacca caccgcgcgc gcttaatgcg ccgctacagg 7080
 gcgcgtacta tgggtgcttt gacgtatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag 7140
 aaaataccgc atcaggcgcc attcgccatt caggtgcgc aactgttggg aaggcgatc 7200
 ggtgcgggcc tcttcgtat tacgccagct ggcgaaaggg ggatg tgctg caaggcgatt 7260
 aagttgggta acgccagggt tttccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagt 7315

10

20

30

40

<210>	2		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	primer 5E1Bfor-1		
<400>	2		10
	cggaattcgg cgtgttaaatt ggggcg	26	
<210>	3		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220>			20
<223>	primer 5E1B-rev		
<400>	3		
	tagcaggcga ttcttgtagtc	20	
<210>	4		
<211>	20		
<212>	DNA		30
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	primer 5E1A-For		
<400>	4		
	ccgaattcga tcgtgtagtg	20	
<210>	5		40
<211>	27		

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 5E1A-rev

<400> 5

cgggatccat ttaacacgcc atgcaag

27

10

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 5E1AB21-rev

20

<400> 6

cgggatcctc attcccagg gtccag

26

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> oligonucleotide X-SM-1

<400> 7

ctaggtcgac caattg

16

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> oligonucleotide X-SM-2

<400> 8

ctagcaattg gtcgac

16

<210> 9

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> oligonucleotide EcoPst-3

<400> 9

aattgatatc gaattcgccg agctcgtaag cttggatccc tgca

44

20

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide EcoPst-4

<400> 10

gggatccaag cttacgagct cggcgaattc gatatc

36

30

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> primer COL1A2F

<400> 11

cagctagcct gcaggaagta tgcagattat ttg

33

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> primer COL1A2R-sal

<400> 12

acacgtcgac ggctggtaga gatgc

25

20

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 55KforE

<400> 13

ggaattcgcc accatggagc gaagaaaccc atctga

36

30

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer 55KrevB

40

<400> 14

ggatcctcaa tctgtatctt catcgctaga gcc

33

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> primer 5E1Bstart

<400> 15

ggaattcctc atggaggctt ggg

23

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> primer 5E1Brev2

<400> 16

gtgtctcaca accgctctc

19

30

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer SV40.forS

<400> 17

caactagtac atgtggaatg tgtgtcagtt agg

33

40

<210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> primer SV40.RevERI

<400> 18
 ggaattcagc tttttgcaaa agcctagg

28

10

【図面の簡単な説明】

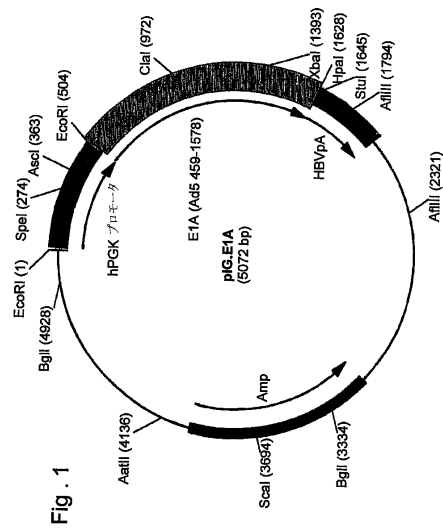
【 0 0 8 9 】

- 【図 1】 pIG.E1Aのマップである。
- 【図 2】 pIG.EIAB21のマップである。
- 【図 3】 pEIBのマップである。
- 【図 4】 pCC.EIAのマップである。
- 【図 5】 pCC.EIAB21のマップである。
- 【図 6】 pCC101のマップである。
- 【図 7】 pCC105のマップである。
- 【図 8】 pCC.55Kcolのマップである。
- 【図 9】 pIG.EIBのマップである。
- 【図 10】 pCC.EIBcolのマップである。
- 【図 11】 pEC.EIBのマップである。
- 【図 12】 pSC.55Kのマップである。
- 【図 13】 一次細胞の形質転換に適切な大分子の設計の例である。
- 【図 14】 pIG.EIA.EIBのマップである。
- 【図 15】 pCC200のマップである。
- 【図 16】 pCC205のマップである。
- 【図 17】 pdys44のマップである。
- 【図 18】 p44-l.ccEIAのマップである。
- 【図 19】 生じる株細胞からの蛋白質溶解物のウエスタンブロットである。
- 【図 20】 E1-欠失アデノウイルスベクターの相補性の例示である。
- 【図 21】 形質移入のために用いるAd5.E1構築物の例3における図式的概観である。
- 【図 22】 本発明の若干の具体例の図式的な提示である。

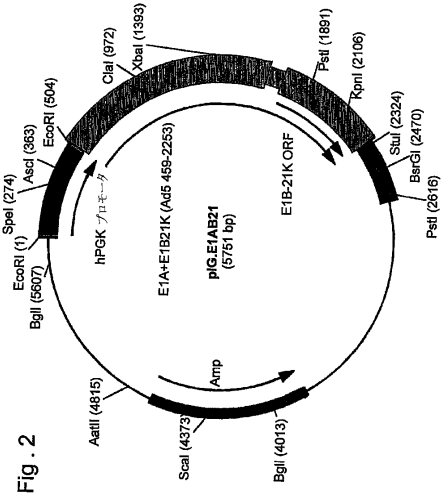
20

30

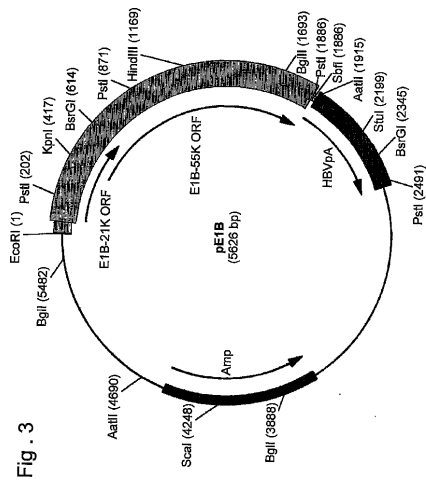
【 図 1 】



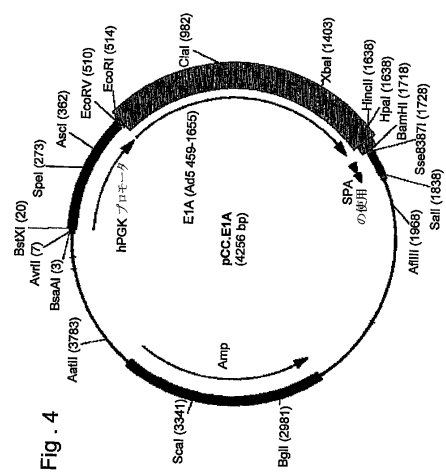
【 図 2 】



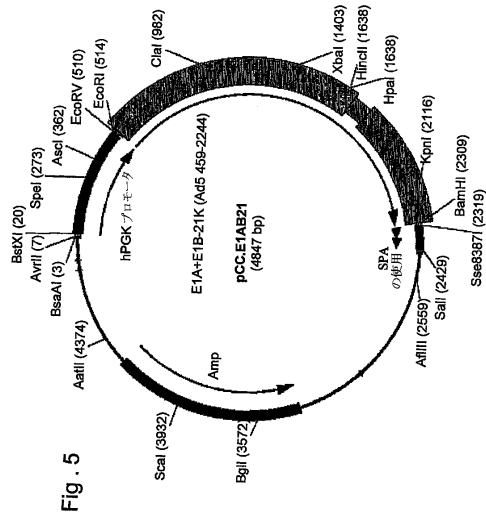
【 図 3 】



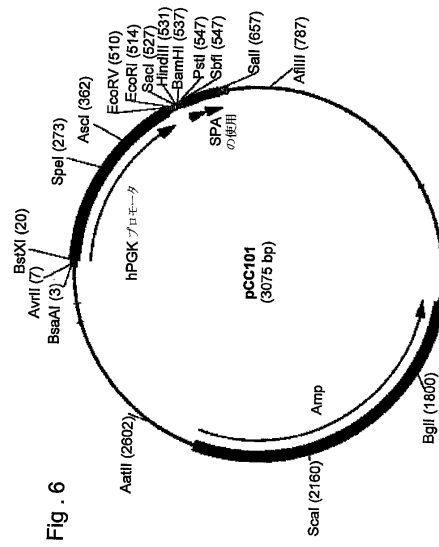
【 図 4 】



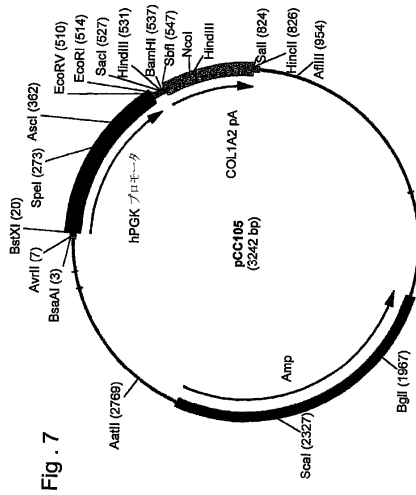
【 図 5 】



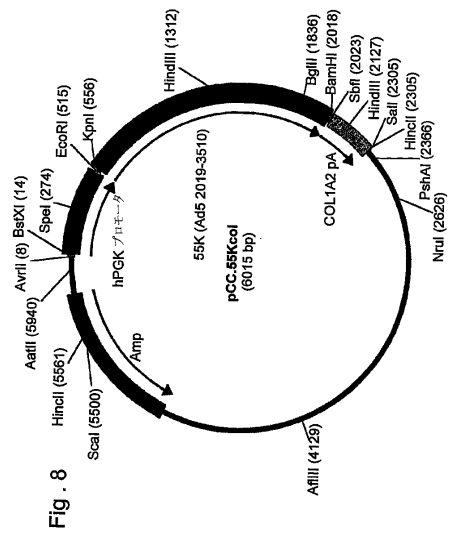
【 図 6 】



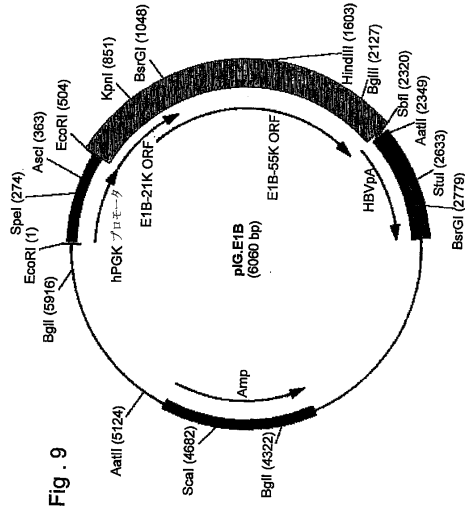
【 図 7 】



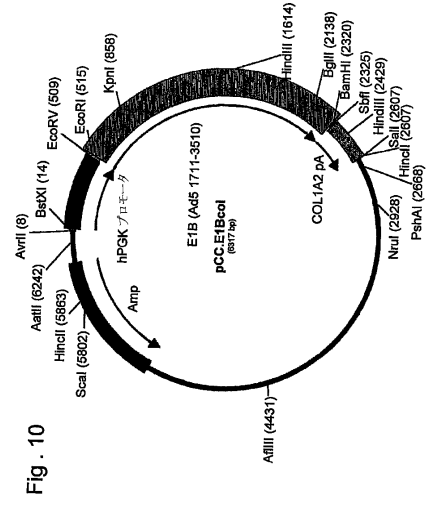
【 図 8 】



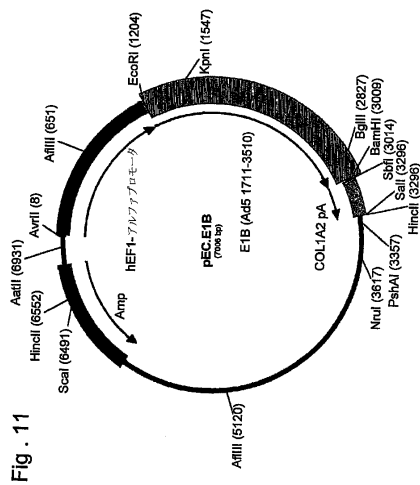
【 図 9 】



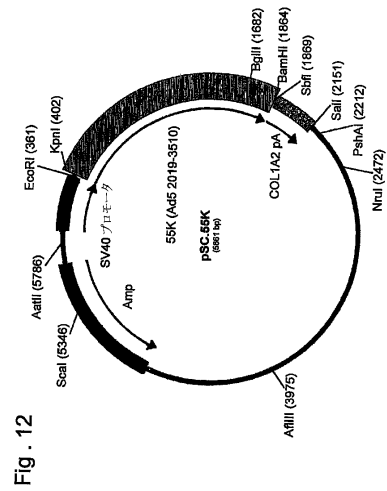
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【図 13】

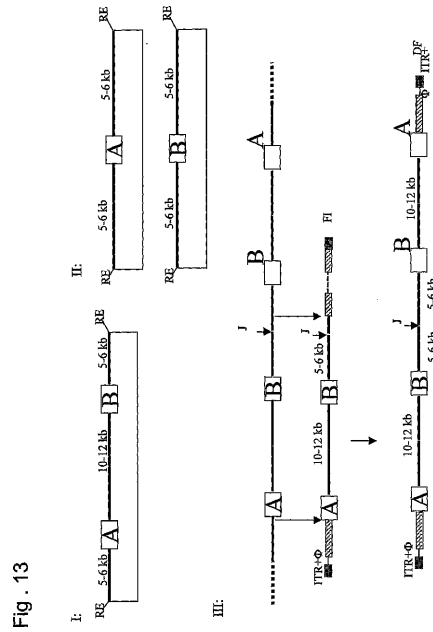


Fig. 13

【図 15】

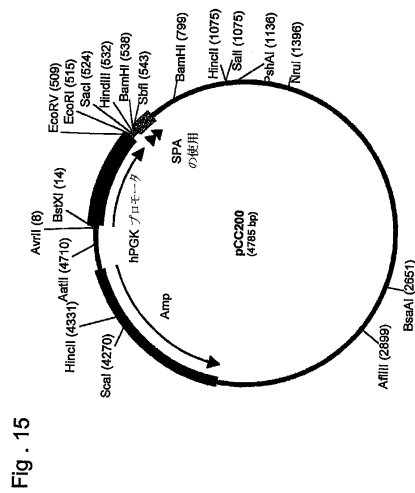


Fig. 15

【図 14】

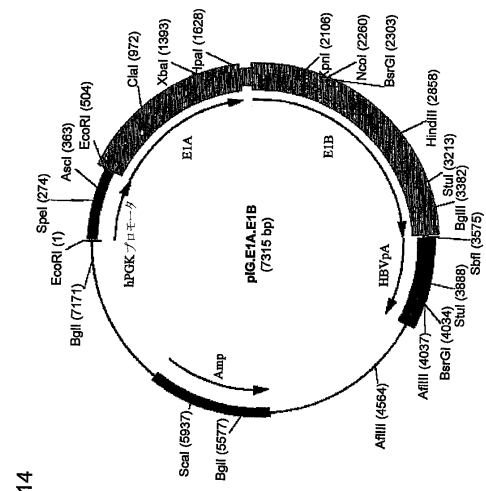


Fig. 14

【図 16】

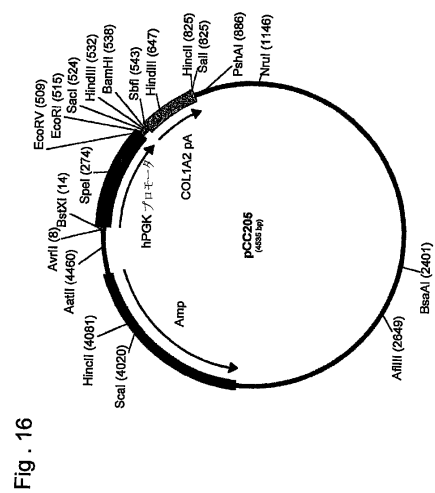


Fig. 16

【 図 1 7 】

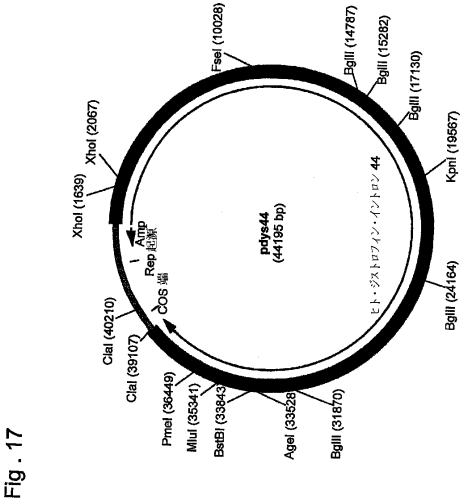


Fig . 17

【 図 1 8 】

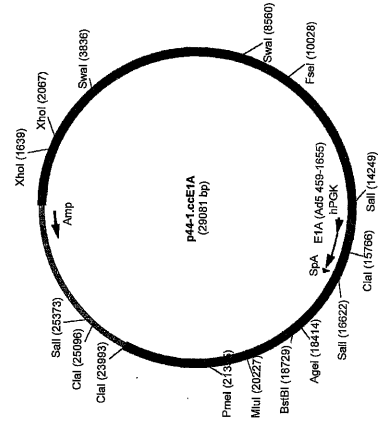


Fig . 18

【 図 1 9 】

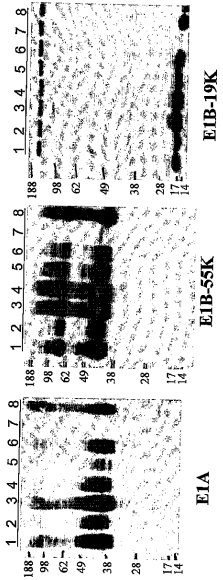


Fig . 19

【 図 2 0 】

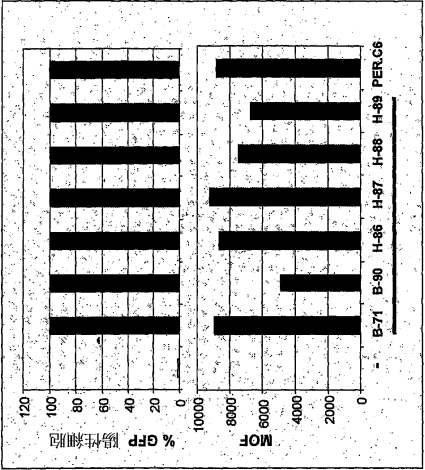
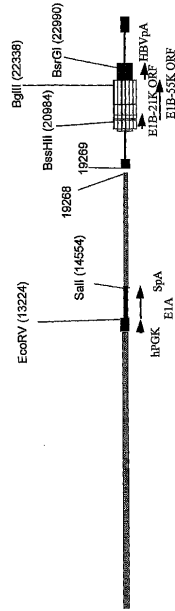


Fig . 20

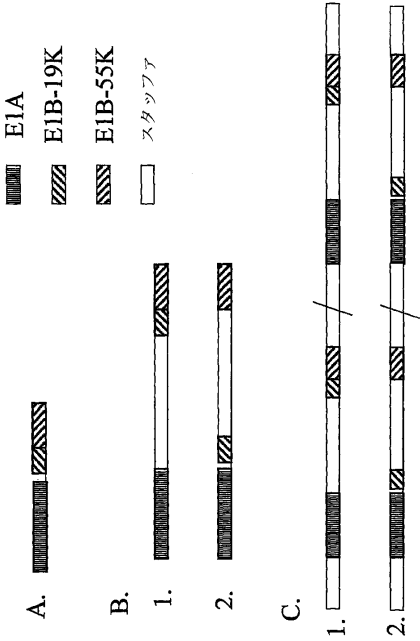
Fig .21

【 図 2 1 】



【 図 2 2 】

Fig .22



フロントページの続き

(72)発明者 ロナルド ボーゲルズ

オランダ国 3 4 6 1 ハーウェー リンスホーテン ヴァン リートラーン 4

(72)発明者 メンゾ ジャンス エムコ ハヴェンガ

オランダ国 2 4 0 1 カーヘー アルフェン アーン デン ライン ウィルヘルミナ ドラッ
カーストラート 6 6

(72)発明者 デイヴィッド アドリアヌス セオドラス マリア ズエイドジースト

オランダ国 2 5 6 5 フェーハー デン ハーグ クリモプストラート 8 5

審査官 鶴 剛史

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 0 1 4 6 (WO , A 1)

国際公開第 0 3 / 0 3 1 6 3 3 (WO , A 1)

国際公開第 0 2 / 0 4 0 6 6 5 (WO , A 1)

Gene, 18[2](1982) p.175-185

Hum. Gene Ther., 13[8] (2002) p.909-920

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 5/10

C12N 7/00

C12N 15/09

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)