

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4383530号
(P4383530)

(45) 発行日 平成21年12月16日(2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

B

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/00

請求項の数 16 (全 167 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-536512
 (86) (22) 出願日 平成9年4月4日(1997.4.4)
 (65) 公表番号 特表2001-521369(P2001-521369A)
 (43) 公表日 平成13年11月6日(2001.11.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/006010
 (87) 国際公開番号 W01997/038087
 (87) 国際公開日 平成9年10月16日(1997.10.16)
 審査請求日 平成16年3月12日(2004.3.12)
 (31) 優先権主張番号 08/628,594
 (32) 優先日 平成8年4月5日(1996.4.5)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/668,953
 (32) 優先日 平成8年6月24日(1996.6.24)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

ノバルティス バクシンズ アンド ダイ
 アグノスティックス、 インコーポレーテ
 ッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 08, エミリービル, ホートン ストリー
 ト 4560

(73) 特許権者

ワシントン ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 ミズーリ 63130,
 セント ルイス, ワン ブルッキングス
 ドライブ (番地なし)

(74) 代理人

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞巨大分子合成の阻害が減少したアルファウイルスベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルファウイルスベクターであって、

改変されたアルファウイルス非構造タンパク質2 (nsP2) 遺伝子

を含み、

該ベクターは、宿主細胞中に導入された場合に、野生型アルファウイルスnsP2遺伝子を有するベクターと比較して、宿主細胞に指向される巨大分子合成の50%阻害に到達するのに必要な時間を増加させ、かつ

該ベクターは、野生型アルファウイルスnsP2遺伝子を有するベクターの発現レベルと比較して同等またはそれよりも高い異種遺伝子発現レベルを生じ、

該改変されたアルファウイルス非構造タンパク質2 (nsP2) 遺伝子は、該野生型アルファウイルスnsP2遺伝子に由来するヌクレオチド配列を改変する1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入を有し、

該改変されたアルファウイルス非構造タンパク質2 (nsP2) 遺伝子は、生物学的に活性なnsP2タンパク質を提供する、

アルファウイルスベクター。

【請求項2】

アルファウイルスベクター構築物であって、

改変されたアルファウイルス非構造タンパク質2 (nsP2) 遺伝子

を含み、

該ベクター構築物は、宿主細胞中に導入された場合に、野生型アルファウイルス n s P 2 遺伝子を有するベクターと比較して、宿主細胞に指向される巨大分子合成の 5 0 % 阻害に到達するのに必要な時間を増加させ、かつ

該ベクター構築物は、野生型アルファウイルス n s P 2 遺伝子を有するベクターの発現レベルと比較して同等またはそれよりも高い異種遺伝子発現レベルを生じ、

該改変されたアルファウイルス非構造タンパク質 2 (n s P 2) 遺伝子は、該野生型アルファウイルス n s P 2 遺伝子に由来するヌクレオチド配列を改変する 1 つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入を有し、

該改変されたアルファウイルス非構造タンパク質 2 (n s P 2) 遺伝子は、生物学的に活性な n s P 2 タンパク質を提供し、

10

該ベクター構築物は、

c D N A からのインビトロでのウイルス R N A の合成を開始する 5 ' プロモーター、

該 5 ' プロモーターに続く、アルファウイルス R N A の転写を開始する 5 ' 配列、

改変されたアルファウイルス非構造タンパク質 2 (n s P 2) 遺伝子を含む、4 つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質を作動可能にコードする核酸分子、

アルファウイルス R N A ポリメラーゼ認識配列、

3 ' ポリアデニレート域、および

ウイルス連結領域の下流にありかつ該ウイルス連結領域に作動可能に連結された、選択された異種配列、

をさらに含む、アルファウイルスベクター構築物。

20

【請求項 3】

真核生物系において翻訳可能なアルファウイルス R N A ベクターレプリコンであって、

改変されたアルファウイルス非構造タンパク質 2 (n s P 2) 遺伝子

を含み、

該ベクターレプリコンは、宿主細胞中に導入された場合に、野生型アルファウイルス n s P 2 遺伝子を有するベクターと比較して、宿主細胞に指向される巨大分子合成の 5 0 % 阻害に到達するのに必要な時間を増加させ、かつ

該ベクターレプリコンは、野生型アルファウイルス n s P 2 遺伝子を有するベクターの発現レベルと比較して同等またはそれよりも高い異種遺伝子発現レベルを生じ、

30

該改変されたアルファウイルス非構造タンパク質 2 (n s P 2) 遺伝子は、該野生型アルファウイルス n s P 2 遺伝子に由来するヌクレオチド配列を改変する 1 つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入を有し、

該改変されたアルファウイルス非構造タンパク質 2 (n s P 2) 遺伝子は、生物学的に活性な n s P 2 タンパク質を提供し、

該ベクターレプリコンは、

アルファウイルス R N A の転写を開始する 5 ' 配列、

改変されたアルファウイルス非構造タンパク質 2 (n s P 2) 遺伝子を含む、4 つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質を作動可能にコードする核酸分子、

アルファウイルス R N A ポリメラーゼ認識配列、

3 ' ポリアデニレート域、および

40

ウイルス連結領域の下流にありかつ該ウイルス連結領域に作動可能に連結された、選択された異種配列、

をさらに含む、アルファウイルス R N A ベクターレプリコン。

【請求項 4】

薬学的組成物であって、

請求項 3 に記載のアルファウイルス R N A ベクターレプリコンおよび

薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤

を含む、薬学的組成物。

【請求項 5】

組換えアルファウイルス粒子であって、

50

1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質、
脂質エンベロープ、および
請求項3に記載のRNAベクターレプリコン
を含む、組換えアルファウイルス粒子。

【請求項6】

前記アルファウイルス構造タンパク質のうちの1つ以上は、前記RNAベクターレプリコンが由来するアルファウイルスとは異なるアルファウイルスに由来する、請求項5に記載の組換えアルファウイルス粒子。

【請求項7】

請求項5または6に記載の組換えアルファウイルス粒子および
薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤
を含む、薬学的組成物。

10

【請求項8】

請求項5または6に記載の組換えアルファウイルス粒子に感染させた、宿主細胞。

【請求項9】

真核生物重層ベクター開始系であって、
cDNAからのアルファウイルスRNAのインビボでの5'合成を開始し得る5'プロモーター、

アルファウイルスRNAの転写を開始する、該5'プロモーターに続く配列、
改変されたアルファウイルス非構造タンパク質2 (nsP2) 遺伝子を含む、4つ全ての
アルファウイルス非構造タンパク質を作動可能にコードする核酸分子であって、該改変されたアルファウイルス非構造タンパク質2 (nsP2) 遺伝子は、野生型アルファウイルスnsP2遺伝子に由来するヌクレオチド配列を改変する1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入を有し、該改変されたアルファウイルス非構造タンパク質2 (nsP2) 遺伝子は、生物学的に活性なnsP2タンパク質を提供する、核酸分子、
アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、
3'ポリアデニレート域；および

20

ウイルス連結領域に作動可能に連結された、異種配列、
を含む、

該真核生物重層ベクター開始系の転写から生じるアルファウイルスRNAレプリコン分子
は、野生型アルファウイルスnsP2遺伝子を有するアルファウイルスRNAレプリコン
分子と比較して、宿主細胞に指向される巨大分子合成の50%阻害に到達するのに必要な
時間を増加させる、
真核生物重層ベクター開始系。

30

【請求項10】

請求項9に記載の真核生物重層ベクター開始系を含む、宿主細胞。

【請求項11】

アルファウイルスプロデューサー細胞株であって、該細胞株は、
安定に形質転換されたアルファウイルス構造タンパク質発現カセットと、
請求項3に記載のRNAベクターレプリコン、請求項2に記載のアルファウイルスベクター
構築物、および請求項9に記載の真核生物重層ベクター開始系からなる群より選択される、
ベクターと、
を含む細胞

40

を含む、アルファウイルスプロデューサー細胞株。

【請求項12】

請求項9に記載の真核生物重層ベクター開始系および
薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤
を含む、薬学的組成物。

【請求項13】

組換えアルファウイルス粒子を作製する方法であって、以下の工程：

50

(a) 請求項 9 に記載の真核生物重層ベクター開始系、請求項 3 に記載の RNA ベクターレプリコン、および請求項 5 に記載の組換えアルファウイルスベクター粒子からなる群より選択されるベクターを、組換えアルファウイルス粒子の生成を可能にするに十分な条件下および時間で、アルファウイルスパッケージング細胞の集団に導入する工程であって、該アルファウイルスパッケージング細胞は、アルファウイルス構造タンパク質発現カセットを含み、該発現カセットは、DNA からの RNA の合成を開始する 5' プロモーター、1 つ以上の機能的なアルファウイルス構造タンパク質をコードする核酸分子、該発現カセットに作動可能に連結された選択マーカー、および転写終結を制御する 3' 配列を含む、工程；ならびに

(b) 組換えアルファウイルス粒子を収集する工程、
を包含する、方法。

10

【請求項 14】

選択されたタンパク質を作製する方法であって、以下の工程：

(a) 選択された異種タンパク質をコードし、そして、請求項 9 に記載の真核生物重層ベクター開始系、請求項 3 に記載のアルファウイルス RNA ベクターレプリコン、および請求項 5 に記載の組換えアルファウイルスベクター粒子からなる群より選択されるベクターを、該選択されたタンパク質の生成を可能にするに十分な条件下および時間で、アルファウイルスパッケージング細胞の集団に導入する工程であって、該アルファウイルスパッケージング細胞は、アルファウイルス構造タンパク質発現カセットを含み、該発現カセットは、DNA からの RNA の合成を開始する 5' プロモーター、1 つ以上の機能的なアルファウイルス構造タンパク質をコードする核酸分子、該発現カセットに作動可能に連結された選択マーカー、および転写終結を制御する 3' 配列を含む、工程；ならびに

20

(b) 該パッケージング細胞により生成されるタンパク質を収集する工程、
を包含する、方法。

【請求項 15】

選択されたタンパク質を作製する方法であって、

請求項 9 に記載の真核生物重層ベクター開始系を、該選択されたタンパク質の発現を可能にするに十分な条件下および時間で、宿主細胞に導入する工程
を包含する、方法。

【請求項 16】

請求項 3 に記載のアルファウイルス RNA ベクターレプリコンを含む、宿主細胞株。

30

【発明の詳細な説明】

政府の利権の記載

本発明は、部分的に、国立衛生研究所により認可された助成金番号 AI 17377 の下での政府の援助でなされた。政府は、本発明において一定の権利を有し得る。

発明の技術分野

本発明は、一般的に組換え DNA 技術に関する；さらに詳細には、1 つ以上の異種遺伝子産物の発現を指向するために有用な組換えベクターの開発に関する。

発明の背景

アルファウイルスは、トガウイルス科の一群の血清学的に関連した、節足動物に運搬されるウイルスを含む。これらのウイルスは全世界に分布しており、そして自然界では蚊から脊椎動物へのサイクルを介して存続する。鳥、齧歯類、馬、霊長類およびヒトは、アルファウイルス脊椎動物病原性物質保有者 (reservoir) / 宿主として規定されるものの仲間である。

40

赤血球凝集阻害 (HI) アッセイを利用して、アルファウイルス属内で、26 の公知のウイルスおよびウイルスサブタイプが分類されている。このアッセイは 26 のアルファウイルスを 3 つの大きな複合種 (complex) に分ける：ヴェネズエラウマ脳炎 (Venezuelan equine encephalitis) (VEE) 複合種、セムリキ森林 (Semliki Forest) (SF) 複合種、そして西部ウマ脳炎 (western equine encephalitis) (WEE) 複合種。さらに、HI 血清学的アッセイに基づき、4 つの他のウイルス、東部ウマ脳炎 (eastern equine encephalitis) (EEE

50

）、バーマー森林（Barmah Forest）、ミッデルブルグ（Middelburg）、およびヌヅム（Ndumu）が、個々に分類されている。

アルファウイルス属のメンバーはまた、ヒトにおけるそれらの相対的な臨床的特徴に基づき分類される：主に脳炎に関連するアルファウイルス、および主に発熱、発疹そして多発性関節炎に関連するアルファウイルス。前者の群に含まれるのは、VEEおよびWEE複合種、ならびにEEEである。一般的にこの群による感染は、永続的な後遺症（行動変化および学習障害を含む）、または死に至り得る。後者の群ではSF複合種であり、個々のアルファウイルスであるセムリキ森林、シンドビス、ロスリバー、チクングンヤ（Chikungunya）、オニオニオン（O'nyong-nyong）、およびマヤロ（Mayaro）よりなる。この群に関しては、重大な流行が報告されているが、感染は一般的に自己制限型（self-limiting）であり、永続的な後遺症はない。

10

シンドビスウイルスは、トガウイルス科のアルファウイルス属の原型のメンバーである。細胞の感染後のその複製ストラテジー（図1を参照のこと）は、ニワトリ胚線維芽細胞（CEF）およびベビーハムスター腎臓（BHK）細胞により十分に特徴付けられている。ここで、シンドビスウイルスは迅速に成長して高力価になり、そして他のアルファウイルスのモデルとして作用する。簡潔には、シンドビスウイルス由来のゲノムは、（他のアルファウイルスと同様に）約12kbの一本鎖ポジティブセンスRNA分子であり、これはキャップされポリアデニル化され、そしてウイルスコードキャプシドタンパク質殻内に含まれる。ヌクレオキャプシドは、さらに宿主由来脂質エンベロープにより囲まれる。2つのウイルス特異的糖タンパク質であるE1およびE2は、このエンベロープに挿入され、そしてヌクレオキャプシドに固着される。特定のアルファウイルス（例えばSF）はまた、さらなるタンパク質であるE3（これはE2前駆体タンパク質であるPE2の切断産物である）を維持する。標的細胞へのウイルス粒子の吸収、浸透、およびウイルスゲノムRNAを細胞質へ放出するためのヌクレオキャプシドの脱コートの後、複製プロセスが、ウイルスゲノムの5'側の3分の2からの非構造タンパク質（nsP）の翻訳により開始される。4つのnsP（nsP1～nsP4）は、ゲノムRNAテンプレートから、2つのポリタンパク質（nsP123またはnsP1234）の1つとして直接翻訳され、そしてC末端ドメインnsP2において活性プロテアーゼによりモノマー単位に翻訳後プロセッシングされる。大部分のアルファウイルスのnsP3とnsP4との間に存在するリーキーオパール（leaky opal）（UGA）コドンは、nsP123ポリタンパク質と比較してnsP1234ポリタンパク質の10～20%の量を占める。両方の非構造ポリタンパク質およびそれら由来のモノマー単位は、RNA複製プロセスに関与し得る。このプロセスは、5'および3'末端に存在する保存されたヌクレオチド配列エレメント（CSE）、ならびにゲノムの内部に配置される連結領域サブゲノムプロモーターへの結合を含む（以下でさらに議論される）。

20

30

ポジティブ鎖ゲノムRNAは、全長の相補的なネガティブ鎖のnsP触媒合成のためのテンプレートとして作用する。相補的なネガティブ鎖の合成は、ポジティブ鎖ゲノムRNAの3'末端CSEへのnsP複合体の結合の後に触媒される。次には、ネガティブ鎖は、順番に、さらなるポジティブ鎖ゲノムRNAおよび大量に発現される26SサブゲノムRNA（連結領域プロモーターで内部に開始される）の合成のためのテンプレートとして作用する。さらなるポジティブ鎖ゲノムRNAの合成は、相補的なネガティブ鎖ゲノムRNAテンプレートの3'末端CSEへのnsP複合体の結合の後に生じる。ネガティブ鎖ゲノムRNAテンプレートからのサブゲノムmRNAの合成は、連結領域プロモーターから開始される。従って、ポジティブ鎖ゲノムRNAの5'末端および連結領域CSEは、それらがネガティブ鎖ゲノムRNA相補体に転写された後のみ機能的である（すなわち、5'末端CSEは、それがゲノムネガティブ鎖相補体の3'末端である場合に機能的である）。構造タンパク質（sP）は、サブゲノム26S RNAから翻訳される。これは、ゲノムの3'側の3分の1を示し、そしてnsPと同様に、個々のタンパク質に翻訳後プロセッシングされる。

40

いくつかのグループは、アルファウイルス属の特定のメンバーを発現ベクターとして利用することを示唆している。これには、例えば、シンドビスウイルス（Xiongら、Science 243:1188-1191,1989;Hahnら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:2679-2683,1992;Dubenskyら、J

50

.Virol 70:508-519,1996)、セムリキ森林ウイルス (Liljestrom、Bio/Technology 9:135 6-1361,1991)、およびヴェネズエラウマ脳炎ウイルス (Davisら、J.Cell.Biochem.Suppl .19A:10,1995) が挙げられる。さらに、1つのグループは、インビボでの治療的遺伝子の送達のためにアルファウイルス由来ベクターを使用することを示唆している。しかし、上述のベクターに伴う一つの問題点は、宿主細胞に指向される巨大分子合成 (すなわち、タンパク質またはRNA合成) の障害が感染後数時間以内に始まり、そして細胞変性効果 (CPE) が12~16時間の感染後時間 (hpi) 以内に生じることである。宿主細胞タンパク質合成の障害および遮断は、構造タンパク質発現の存在下または非存在下において、組換えウイルス粒子で感染されたBHK細胞において2 hpi以内に始まる。このことは、ウイルス感染後の初期事象 (例えば、nsPおよび一鎖RNAの合成) が、宿主細胞タンパク質合成の障害およびそれに続くCPEの発達および細胞死に直接的に影響し得ることを示唆する。

SIN-1は、野生型シンドビスに由来する改変体株であり、そして1ヶ月の期間にわたりシンドビスウイルスで持続的に感染させたBHK細胞の培養物から単離された (Weissら、J.Virol.33:463-474,1980)。単一のプラークからの拡大により得られた純粋なSIN-1ウイルスのストックは、それが感染するBHK細胞を殺傷しない。重要なことには、ウイルス収率 ($>10^3$ PFU/細胞) は、野生型シンドビスウイルスまたは改変体SIN-1ウイルスで感染させたBHK細胞において同一である。従って、感染させたBHK細胞におけるSIN-1の主な表現型は、ウイルス誘導細胞死の非存在下における野生型レベルの感染性ウイルスの生成により特徴付けられる。

本発明は、種々の適用 (例えば、遺伝子療法および組換えタンパク質生成を含む) における使用のための選択された所望の表現型を有する組換えベクターを提供し、そして他の関連した利点をさらに提供する。

発明の要旨

簡潔に述べると、本発明は、RNAベクターレプリコン、アルファウイルスベクター構築物、真核生物重層ベクター開始系、および組換えアルファウイルス粒子を提供する。これらは、細胞巨大分子合成 (例えば、タンパク質またはRNA合成) の障害の減少、遅延、または非存在を示し、それによってCPEの発達または細胞死が減少して、遅延して、または存在せずに、タンパク質発現、遺伝子療法などのためのこれらのベクターの使用を可能にする。このようなベクターは、広範な種々のアルファウイルス (例えば、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、ヴェネズエラウマ脳炎ウイルス、またはシンドビスウイルス) から構築され得、そして多数の異種配列 (例えば、タンパク質に対応する配列、アンチセンスRNAに対応する配列、非コードセンスRNA配列に対応する配列、またはリボザイムに対応する配列) を発現するように設計され得る。

本発明の1つの局面において、単離された核酸分子が提供される。この分子は、組換えアルファウイルスに作動可能に組み込まれた場合、野生型アルファウイルスと比較して、哺乳動物細胞における発現後の宿主細胞に指向される巨大分子合成の50%障害に到達するのに必要な時間を増加させる、改変されたアルファウイルス非構造タンパク質遺伝子を含む。本発明の文脈内において利用される「改変されたアルファウイルス非構造タンパク質遺伝子」は、アルファウイルスRNAベクターレプリコン、組換えアルファウイルス粒子、または真核生物重層ベクター開始系に作動可能に組み込まれた場合に、所望の表現型 (例えば、細胞巨大分子合成の障害の減少、遅延、または非存在) を生じる遺伝子をいう。このような改変されたアルファウイルス非構造タンパク質遺伝子は、野生型アルファウイルス遺伝子のヌクレオチド配列からの配列を改変する1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入を有する。遺伝子は、人工的な (例えば、指示された選択手順から; 以下の実施例2を参照のこと) または天然に存在するウイルス改変体 (以下の実施例1を参照のこと) のいずれかに由来し得る。さらに、単離された本発明の核酸分子が、上記のアルファウイルスRNAベクターレプリコン、組換えアルファウイルス粒子、または真核生物重層ベクター開始系へ組み込まれた場合、特定の実施態様において、それらは宿主細胞に指向される巨大分子合成の50%障害に到達するのに必要な時間を、宿主細胞に指向される巨大分子合成の検出可能な障害が実質的に存在しない程度まで実質的に増加させることは理解さ

れるはずである。宿主細胞に指向される巨大分子合成の阻害パーセントを検出するために適切なアッセイとしては、例えば、実施例1において記載されるアッセイが挙げられる。本発明の他の局面において、単離された核酸分子が提供される。この核酸分子は、改変されたアルファウイルス非構造タンパク質遺伝子を含む。この遺伝子は、組換えアルファウイルス粒子、真核生物重層ベクター開始系、またはRNAベクターレプリコンに作動可能に組み込まれた場合、野生型と比較して減少したレベル（例えば、2倍、5倍、10倍、50倍、または100倍より多い）のベクター特異的RNA合成を生じ、そして野生型組換えアルファウイルス粒子、野生型真核生物重層ベクター開始系、または野生型RNAベクターレプリコンと比較して、同一のまたはより大きいレベルの、ウイルス連結領域プロモーターから転写されたRNAによりコードされるタンパク質を生じる。RNAレベルを定量するための代表的なアッセイとしては、実施例1に記載されるような $[^3\text{H}]$ ウリジン取り込み、またはノーザンブロット分析により検出されるようなRNA蓄積（実施例4を参照のこと）が挙げられる。タンパク質レベルを定量するための代表的なアッセイとしては、スキャンニングデンストメトリー（実施例4を参照のこと）および種々の酵素アッセイ（実施例3～5を参照のこと）が挙げられる。

10

上記の実施態様の1つにおいて、単離された核酸分子は、非構造タンパク質2（nsP2）をコードする。さらなる実施態様において、単離された核酸分子は、nsP2のLXPGGモチーフにおいて変異を有する。

本発明の別の局面において、上記の核酸分子の1つに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターが提供される。1つの実施態様において、発現ベクターはさらに、ポリアデニル化配列または核酸分子の3'側に転写終結配列を含む。

20

本発明のさらに別の局面において、アルファウイルスベクター構築物が提供される。この構築物は、cDNAからのインビトロでのウイルスRNA合成を開始する5'プロモーター、アルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、4つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質を作動可能にコードする核酸分子（上記のような単離された核酸分子を含む）、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、および3'ポリアデニル化域（polyadenylate tract）を含む。1つの実施態様において、このような構築物はさらに、ウイルス連結領域の下流の、そしてその領域に作動可能に連結された、選択された異種配列を含む。

本発明のさらに他の局面において、真核生物系において翻訳し得るRNAベクターレプリコンが提供される。このレプリコンは、アルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、4つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質を作動可能にコードする核酸分子（上記の単離された核酸分子を含む）、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、および3'ポリアデニル化域を含む。別の実施態様において、このようなRNAベクターレプリコンはさらに、ウイルス連結領域の下流の、そしてその領域に作動可能に連結された、選択された異種配列を含む。本発明のさらなる局面において、本明細書中に記載されるRNAベクターレプリコンの1つを含む宿主細胞が提供される。本発明のさらなる局面において、上記のRNAベクターレプリコンおよび薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物が提供される。

30

本発明の他の局面において、組換えアルファウイルス粒子が提供される。この粒子は、本明細書中に記載のように、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質、脂質エンベロップ、およびRNAベクターレプリコンを含む。1つの実施態様において、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質は、RNAベクターレプリコンが由来するアルファウイルスとは異なるアルファウイルスに由来する。他の実施態様において、アルファウイルス構造タンパク質および脂質エンベロップは異なる種に由来する。さらなる局面において、薬学的組成物が提供される。この組成物は、上記のような組換えアルファウイルス粒子および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む。さらに、このような組換えアルファウイルス粒子に感染させた哺乳動物細胞もまた、提供される。

40

本発明の特定の実施態様において、上記のベクターまたは粒子はさらに、異種配列とインフレームで融合された耐性マーカーを含み得る。このような耐性マーカーの代表的な例としては、ハイグロマイシンホストランスフェラーゼおよびネオマイシンが挙げられる。

50

本発明の他の局面において、アルファウイルスまたは組換えアルファウイルスベクター改変体を選択するための方法が提供される。これらの改変体は、本明細書中に記載の、宿主細胞に指向される巨大分子合成の阻害が減少したか、遅延したか、または存在しない表現型を示す。このような方法の代表的な例としては選択薬物または抗原性マーカーの使用が挙げられ、そして以下の実施例2においてより詳細に提供される。

本発明の他の局面において、ゲノム（すなわち、野生型ウイルスゲノム）またはRNAベクターレプリコン核酸を実質的に含まないトガウイルスキャプシド粒子が提供される。トガウイルスの代表的な例としては、例えば、アルファウイルスおよびルビウイルス（例えば、風疹）が挙げられる。特定の実施態様において、キャプシド粒子はさらに、1つ以上のアルファウイルス糖タンパク質を含む脂質エンベロープを含む。他の実施態様において、キャプシド粒子はさらに、アルファウイルスエンベロープ（すなわち、脂質二重層および糖タンパク質相補体）を含む。本発明に関連する局面において、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤と共に、上述のキャプシド粒子（脂質二重層（例えば、アルファウイルス糖タンパク質を含むウイルスエンベロープ）を有するかまたは有しない）を含む薬学的組成物が提供される。さらなる局面において、このようなキャプシド粒子（脂質二重層（例えば、アルファウイルス糖タンパク質を含むウイルスエンベロープ）を有するかまたは有しない）または薬学的組成物は、所望のトガウイルスに対する免疫応答を誘導するために、ワクチン接種薬剤として利用され得る。

本発明のさらなる局面において、誘導性プロモーターが提供される。このプロモーターは、コアRNAポリメラーゼプロモーター配列、コアプロモーター配列からの転写を活性化するタンパク質のDNA結合を指向する作動可能に連結された核酸配列、およびコアプロモーター配列からの転写を抑制するタンパク質のDNA結合を指向する作動可能に連結された核酸配列を含む。このようなプロモーターは、本明細書中に記載される遺伝子送達ビヒクルにおいて、ならびに当業者に公知の広範な種々の他のベクターにおいて利用され得る。

他の局面において、アルファウイルス構造タンパク質発現カセットが提供される。このカセットは、DNAからのウイルスRNAの合成を開始する5'プロモーター、1つ以上の機能的なアルファウイルス構造タンパク質をコードする核酸分子、発現カセットの転写に作動可能に連結された選択マーカー、および必要に応じて、転写終結を制御する3'配列を含む。1つの実施態様において、このような発現カセットはさらに、アルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、ウイルス連結領域プロモーター、およびアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含む。別の実施態様において、発現カセットはさらに、触媒リボザイムプロセシング配列、核からのRNAの輸送を容易にする翻訳後転写調節エレメント、および／または複数シストロン性の（multicistronic）mRNAの翻訳を可能にするエレメント（内部リボゾーム進入部位（Internal Ribosome Entry Site）エレメント、リボソームの読み通し（read through）を促進するエレメント、およびBiP配列からなる群より選択される）を含む。他の実施態様において、選択マーカーは、cDNAからのアルファウイルスRNAの合成を開始し得る5'プロモーターに作動可能に連結される。さらなる実施態様において、選択マーカーは、連結領域プロモーターよりおよびアルファウイルス構造タンパク質をコードする核酸分子より下流に配置される。なお他の実施態様において、5'プロモーターは、本明細書中に記載されるように誘導性プロモーターである。別の実施態様において、アルファウイルス構造タンパク質発現カセットはさらに、アルファウイルスキャプシドタンパク質遺伝子またはエンハンサー配列の3'側に位置する1つ以上の機能的なアルファウイルス構造タンパク質遺伝子の翻訳を増強し得る他の配列（例えば、タバコエッチウイルス（tobacco etch virus）または「TEV」リーダー）を含む。好ましくは、キャプシドタンパク質遺伝子配列は、アルファウイルス構造遺伝子をコードする配列が得られたアルファウイルスとは異なるアルファウイルスに由来する。

本発明のなお他の局面において、上記のようなアルファウイルス構造タンパク質発現カセットを含む細胞を含むアルファウイルスパッケージング細胞株が提供される。特定の実施態様において、アルファウイルスパッケージング細胞株は、本明細書中に提供されるアルファウイルス構造タンパク質発現カセットで安定に形質転換される。関連する局面におい

10

20

30

40

50

て、アルファウイルスプロデューサー細胞株が提供される。この細胞株は、安定に形質転換されたアルファウイルス構造タンパク質発現カセット、ならびにRNAベクターレプリコン、アルファウイルスベクター構築物、および真核生物重層ベクター開始系からなる群より選択されたベクターを含む細胞を含む。

含む。

本発明のなお他の局面において、真核生物重層ベクター開始系が提供される。この系は、cDNAからのRNAのインビボでの5'合成を開始し得る5'プロモーター、アルファウイルスRNAの転写を開始するこの5'プロモーターに続く配列；4つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質を作動可能にコードする核酸分子（上記のような単離された核酸分子を含む）、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、および3'ポリアデニル域を含む。適切な5'プロモーターの代表的な例としては、RNAポリメラーゼIプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、HSV-TKプロモーター、RSVプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター、MoMLVプロモーター、SV40プロモーター、およびCMVプロモーターが挙げられる。好ましい実施態様において、5'プロモーターは、本明細書中に記載されるような誘導性プロモーターである。

特定の実施態様において、ウイルス連結領域に作動可能に連結された異種配列、および／または核からのRNA輸送を容易にする転写後調節エレメントをさらに含む真核生物重層ベクター開始系が提供される。さらなる実施態様において、本明細書中で提供される真核生物重層ベクター開始系はさらに、転写終結シグナルを含み得る。

関連する実施態様において、本発明はまた、上記のような安定に形質転換された真核生物重層ベクター開始系を含む宿主細胞（例えば、脊椎動物または昆虫）を提供する。本発明のさらなる局面において、選択された異種配列を脊椎動物または昆虫に送達するための方法が提供される。この方法は、本明細書中に記載のような、アルファウイルスベクター構築物、RNAベクターレプリコン、組換えアルファウイルス粒子、または真核生物重層ベクター開始系を脊椎動物または昆虫に投与する工程を含む。特定の実施態様において、アルファウイルスベクター構築物RNAベクターレプリコン、組換えアルファウイルス粒子、または真核生物重層ベクター開始系は脊椎動物の細胞にエクスピボで投与され、続いてベクターまたは粒子を含む細胞が温血動物に投与される。

他の局面において、上記のような真核生物重層ベクター開始系および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物が提供される。特定の実施態様において、薬学的組成物はリポソーム製剤として提供される。

さらなる局面において、組換えアルファウイルス粒子を作製する方法が提供される。この方法は、（a）ベクター（例えば、上記のような真核生物重層ベクター開始系、RNAベクターレプリコン、またはアルファウイルスベクター粒子）を、組換えアルファウイルス粒子の生成を可能にするに十分な条件下および時間でパッケージング細胞の集団に導入する工程、ならびに（b）組換えアルファウイルス粒子を収集する工程を含む。関連する局面において、選択されたタンパク質を作製する方法が提供される。この方法は、（a）選択された異種タンパク質をコードするベクター（例えば、上記の真核生物重層ベクター開始系、RNAベクターレプリコン、またはアルファウイルスベクター粒子）を、選択されたタンパク質の生成を可能にするに十分な条件下および時間でパッケージング細胞または他の細胞の集団に導入する工程、ならびに（b）ベクター含有細胞により生成されるタンパク質を収集する工程を包含する。なお他の局面において、選択されたタンパク質を作製する方法が提供される。この方法は、選択された異種タンパク質を生成し得る真核生物重層ベクター開始系を、選択されたタンパク質の発現を可能にするに十分な条件下および時間で宿主細胞に導入する工程を含む。さらなる局面において、本明細書中に記載されるようなRNAベクターレプリコンを含む宿主細胞株が提供される。

本発明のなお他の局面において、アルファウイルスワクチンが提供される。このワクチンは、上記のアルファウイルスベクター構築物、RNAベクターレプリコン、真核生物ベクター開始系、または組換えアルファウイルス粒子の一つを含む。これらは、本明細書中で提供される異種配列の1つを発現するかもしれないし、発現しないかもしれない（例えば、

それらは、アルファウイルス疾患を処置または予防するためのワクチンとして単独で利用され得る)。例えば、本発明の1つの実施態様において、核酸またはRNAベクターレプリコン核酸を実質的に全く有しない組換えトガウイルス粒子が提供される。さらなる実施態様において、異種ウイルス核酸(すなわち、トガウイルス粒子とは異なるウイルス由来)を含む組換えトガウイルス粒子が提供される。なお別の実施態様において、組換えトガウイルス粒子はT=3以上である。

本発明のさらなる局面において、組換えキメラトガウイルス粒子(空かまたは核酸を含むかのいずれか)が提供される。ここで、ウイルス粒子は、異なるトガウイルス科から得られたかまたは由来するウイルス構成成分を有する(例えば、キャプシドタンパク質および糖タンパク質が異なるアルファウイルス供給源から得られる)。

本発明のこれらのおよび他の局面および実施態様は、以下の詳細な説明および添付された図面を参照すれば明白となる。さらに、より詳細に特定の手順または組成物(例えば、プラスミド、配列など)を記載する種々の参考文献が本明細書中に記載され、従って、各々が援用について個々に記述されたかのように、それらの全体が参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

図1は、シンドビスゲノムの編成および複製ストラテジーの模式図である。

図2は、SIN-1、SIN-1/nsP1-4、Toto1101、またはSin-1/nsP2ウイルスでMOI 10で感染されたBHK細胞からのウイルス放出のグラフである。培養上清は、感染の3、6、9および12時間後に採集した。ウイルス力価は、プラークアッセイにより決定した。

図3は、Toto1101、SIN-1/nsP2、SIN-1/nsP1-4、またはSIN-1ウイルスによる感染後のBHK細胞におけるウイルスRNA合成を示すグラフである。細胞はMOI 10で感染させ、そして感染1時間後、アクチノマイシンDおよび³Hウリジンを添加した。3、6、9、および12h piで、³Hウリジン取り込みの量を決定した。

図4は、SIN-1/nsP1、SIN-1/nsP2、SIN-1/nsP3、SIN-1/nsP3-4、SIN-1/nsP4、SIN-1/nsP2-C、SIN-1/nsP2-N、Toto1101、SIN-1またはSin-1/nsP1-4により感染されたBHK細胞におけるウイルスRNA合成を示すグラフである。³Hウリジン取り込みのレベルを野生型(Toto1101)感染に対して表す。

図5は、SIN-1/nsP1-4、SIN-1、SIN-1/nsP2、またはToto1101ウイルスにより感染されたBHK細胞における宿主細胞タンパク質合成の遮断を示すグラフである。

図6は、SIN-1ウイルスの8000塩基のcDNA配列である(配列番号101)。

図7は、SINCGウイルスの8000塩基のcDNA配列である(配列番号102)。

図8は、Toto1101ウイルスのcDNA配列である(配列番号103)。

図9Aは、pBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAPまたはpBG/wt ELVS 1.5-SEAPプラスミドDNAでトランスフェクトされたBHK-21細胞から単離され、そして放射性標識ウイルスRNAプローブとハイブリダイズしたRNAのノーザンブロットである。図9Bは、pBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAPまたはpBG/wt ELVS 1.5-SEAPプラスミドDNAでトランスフェクトされたBHK細胞におけるアルカリホスファターゼ発現の7日の時間経過を示すグラフである。

図10は、pBG/SIN-1 ELVS 1.5-lucまたはpBG/wt ELVS 1.5-lucプラスミドDNAでトランスフェクトされたBHK細胞におけるルシフェラーゼ発現の4日の時間経過を示すグラフである。

図11Aは、pBG/SIN-1 ELVS-1.5-β-galまたはpBG/wt ELVS 1.5-β-galプラスミドDNAでトランスフェクトされたBHK-21細胞から単離され、そして放射性標識ウイルスRNAプローブとハイブリダイズしたRNAのノーザンブロットである。図11Bは、pBG/SIN-1 ELVS-1.5-β-galまたはpBG/wt ELVS 1.5-β-galプラスミドDNAのいずれかでトランスフェクトされたBHK-21細胞におけるβ-gal発現を検出しているウエスタンブロットである。図11Cは、pBG/SIN-1 ELVS-1.5-β-galまたはpBG/wt ELVS 1.5-β-galプラスミドDNAでトランスフェクトされたBHK細胞におけるアルカリホスファターゼ発現の5日の時間経過を示すグラフである。

図12AおよびBは、RLU(相対的光単位)により測定した、HBV PRE配列を有するまたは有さないELVS β-galベクターでトランスフェクトされたHT1080およびBHK-21細胞にお

10

20

30

40

50

る β -gal 発現を示すグラフである。

図 1 3 は、ベクター誘導性アルファウイルスパッケージング細胞株による RNA 増幅、構造タンパク質発現、およびベクターパッケージングの模式図である。

図 1 4 は、アルファウイルスパッケージング細胞株の生成において用いられるベクター誘導性構造タンパク質発現カセットの模式図である。

図 1 5 は、異なるアルファウイルスパッケージング細胞株によるルシフェラーゼベクターパッケージング（発現の移行）を示すグラフである。

図 1 6 は、アルファウイルスパッケージング細胞株によるベクター誘導性構造タンパク質発現を示すウエスタンブロットである。

図 1 7 A は、pDCMV-intSINrbz 構造タンパク質発現カセットを含む C6/36 蚊細胞によるルシフェラーゼベクターパッケージングを示すグラフである。図 1 7 B は、プラスミド pBGSVC MVdlneo で安定に形質転換されたヒト 293 パッケージング細胞によるルシフェラーゼベクターパッケージングを示すグラフである。

図 1 8 は、異なるアルファウイルスパッケージング細胞株によるルシフェラーゼベクターパッケージングを示すグラフである。

図 1 9 は、アルファウイルスパッケージング細胞株から生成された SINrep/LacZ ベクター粒子で感染された BHK 細胞からの ^3H ウリジン標識 RNA を示す RNA ゲルオートラジオグラフである。

図 2 0 は、アルファウイルスパッケージング細胞株から生成された SINrep/LacZ ベクター粒子で感染された BHK 細胞からの ^{35}S メチオニン標識タンパク質を示すタンパク質ゲルオートラジオグラフである。

図 2 1 は、キャプシド細胞株の β -gal または糖タンパク質ベクタートランスフェクション後のベクター誘導性キャプシドタンパク質発現を示すウエスタンブロットである。

図 2 2 は、野生型または欠失変異体ロスリバーウイルスキャプシドタンパク質遺伝子を含む構造タンパク質発現カセットの領域の模式図である。

図 2 3 は、野生型または欠失変異体ロスリバーウイルスキャプシドタンパク質遺伝子を含むベクター誘導性構造タンパク質発現カセットの模式図である。

図 2 4 は、シンドビスウイルス糖タンパク質遺伝子の上流にロスリバーウイルスキャプシドタンパク質遺伝子配列を含む「分割 (split)」構造タンパク質遺伝子発現カセットによるベクターパッケージングの模式図である。

図 2 5 は、1 つのカセットにおいてシンドビスウイルス糖タンパク質遺伝子の上流にロスリバーウイルスキャプシドタンパク質遺伝子配列、そして別のカセットにおいてシンドビスウイルスキャプシドタンパク質遺伝子を含む「分割」構造タンパク質遺伝子発現カセットによるベクターパッケージングの模式図である。

図 2 6 は、上記「分割」構造タンパク質遺伝子発現カセットを用いるベクター粒子パッケージングの結果を示す表である。

図 2 7 は、パッケージング化ベクター粒子調製物の増幅および組換えタンパク質の大規模生成のためのアルファウイルスパッケージング細胞株の使用の模式図である。

図 2 8 は、アルファウイルスパッケージング細胞株を用いる経時的な β -gal タンパク質の増幅および生成を示すグラフである。

図 2 9 は、インビボにおける cDNA からのアルファウイルスベクター RNA の発現を制御するためのテトラサイクリン調節プロモーター系の使用の模式図である。

図 3 0 は、インビボにおける cDNA からのアルファウイルスベクター RNA の発現を制御するための連結転写リプレッサーおよび転写インデューサー／アクチベーター調節プロモーター系の使用の模式図である。

図 3 1 A および B は、SINrep/LacZ レプリコン、および DH 構築物を含む種々の RRV キャプシド由来の DH RNA でエレクトロポレートされた BHK 細胞から、およびエレクトロポレーションの 18 時間後の培養液に存在するベクター粒子から単離された変性グリオキサルゲル上で電気泳動された [^3H] ウリジン標識 RNA のオートラジオグラフである。

図 3 2 A および B は、SINrep/LacZ レプリコン、および DH 構築物を含む種々の RRV キャプシ

10

20

30

40

50

ド由来のDH RNAでエレクトロポレートされたBHK細胞から、およびエレクトロポレーションの18時間後の培養液に存在するベクター粒子からの ^{35}S メチオニン標識タンパク質を示すタンパク質ゲルオートラジオグラフである。

図3 3 A～Dは、野生型遺伝子(A)および3つの欠失変異体C Δ 1rrv、C Δ 2rrv、およびC Δ 3rrv(それぞれB～D)から発現された種々のロスリバーウイルス(RRV)キャプシドタンパク質のKyte-Doolittle疎水性プロットである。

図3 4は、野生型遺伝子(配列番号114)および3つの欠失変異体C Δ 1rrv(配列番号115)、C Δ 2rrv(配列番号116)、およびC Δ 3rrv(配列番号117)から発現されたアミノ末端RRVキャプシドタンパク質を示す模式図である。RRVキャプシド遺伝子変異体において欠失されたリジン残基が示される。

図3 5は、Toto1101野生型ウイルスで高いMOIで感染されたBHK細胞においてウイルス粒子に取り込まれた ^{35}S メチオニンおよび ^3H ウリジンの相対的レベルを示すグラフである。

図3 6は、SINrep/lacZおよびDH-BB(5' tRNA) Crrv DH RNAでエレクトロポレートされたBHK細胞においてウイルス粒子に取り込まれた ^{35}S メチオニンおよび ^3H ウリジンの相対的レベルを示すグラフである。

図3 7は、SINrep/lacZおよびRRVキャプシド欠失変異体DH-BB(5' tRNA) C Δ 3rrv DH RNAでエレクトロポレートされたBHK細胞においてウイルス粒子に取り込まれた ^{35}S メチオニンおよび ^3H ウリジンの相対的レベルを示すグラフである。

図3 8は、SINrep/lacZおよびDH RNAでエレクトロポレートされた、またはToto1101野生型ウイルスで感染されたBHK細胞においてウイルス粒子に取り込まれた ^{35}S メチオニンおよび ^3H ウリジンの相対的レベルを示す、図3 5～3 7に示す結果をまとめるグラフである。

図3 9は、pBGSVCMVd1hygで安定に形質転換されたBHK細胞によるルシフェラーゼベクターパッケージングを示すグラフである。

用語の定義

以下の用語を明細書を通して使用する。他に示されていないならば、これらの用語を以下のように定義する：

「ゲノムRNA」とは、標的細胞内でインビボにおけるそれ自身の増幅または自己複製を指向するのに必要な遺伝情報の全てを含むRNAをいう。それ自身の複製を指向するために、RNA分子は、1) 1つ以上のポリメラーゼ、レプリカーゼ、あるいはウイルスもしくは宿主細胞由来タンパク質、核酸、またはリボヌクレオタンパク質と相互作用し、RNA増幅過程を触媒し得る他のタンパク質をコードし得；そして2) 複製に必要なシスRNA配列(これは、その自己コード化タンパク質、または非自己コード化細胞由来タンパク質、核酸もしくはリボヌクレオタンパク質、あるいはこれらの任意の成分間の複合体により、複製過程で結合され得る)を含み得る。アルファウイルス由来ゲノムRNA分子は、以下の順でのエレメントを含むべきである：複製のためにシスで必要な5' ウイルスまたは欠陥干渉性RNA配列(単数または複数)、発現されたとき生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質(例えば、nsP1、nsP2、nsP3、nsP4)をコードする配列、複製のためにシスで必要な3' ウイルス配列、およびポリアデニル化域。アルファウイルス由来ゲノムRNAベクターレプリコンはまた、特定の実施態様において、サブゲノムフラグメントのウイルス転写を防ぐか、増大させるか、または減少させるように改変され得るウイルスサブゲノム「連結領域」プロモーター、および発現されたとき生物学的に活性なアルファウイルス構造タンパク質(例えば、C、E3、E2、6K、E1)をコードする配列を含み得る。一般に、用語ゲノムRNAは、+極の分子、または「メッセージ」センスをいい、そしてゲノムRNAは、任意の公知の天然に存在するアルファウイルスとは異なる長さであり得る。好ましい実施態様において、ゲノムRNAは、任意のアルファウイルス構造タンパク質(単数または複数)をコードする配列を含まず、むしろそれらの配列は、異種配列と置換される。ゲノムRNAが組換えアルファウイルス粒子中にパッケージングされる場合、これは、アルファウイルス構造タンパク質と相互作用を開始させるように作用して粒子形成に至る1つ以上の配列を含

10

20

30

40

50

まなければならず、好ましくは、用いられるパッケージング系により効率的にパッケージングされる長さである。

「サブゲノムRNA」（または「26S」RNA）とは、それが由来するゲノムRNAより小さい長さまたはサイズのRNA分子をいう。サブゲノムRNAは、配列がゲノムRNAまたはその相補体内に位置する内部プロモーターから転写されるべきである。サブゲノムRNAの転写は、ウィルスコード化ポリメラーゼ（単数または複数）、宿主細胞コード化ポリメラーゼ（単数または複数）、転写因子（単数または複数）、リボヌクレオタンパク質（単数または複数）、またはそれらの組み合わせにより媒介され得る。好ましい実施態様では、サブゲノムRNAは、本発明に従ってベクターから生成され、そして目的の遺伝子（単数または複数）または配列（単数または複数）をコードするか、または発現させる。サブゲノムRNAは、必ずしも26の沈降係数を有するわけではない。

「アルファウイルスベクター構築物」とは、目的の配列（単数または複数）または遺伝子（単数または複数）の発現を指向し得るアセンブリをいう。このようなベクター構築物は、アルファウイルスRNAの転写を開始させ得る5'配列（背景では、5' CSEとも称される）、ならびに発現されたとき生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質（例えば、nsP1、nsP2、nsP3、nsP4）をコードする配列、およびアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列（背景では、3' CSEとも称される）で構成される。さらに、ベクター構築物は、特定の実施態様において、サブゲノムフラグメントのウイルス転写を防ぐか、増大させるか、または減少させるように改変され得るウイルスサブゲノム「連結領域」プロモーター、およびまたポリアデニル化域を含むべきである。ベクターはまた、1つ以上の構造タンパク質遺伝子由来の配列またはその部分、生存可能なウイルスの生成を可能にするのに十分なサイズである外来性核酸分子（単数または複数）、cDNAからのインビトロでのウイルスRNAの合成を開始させ得る5'プロモーター、発現されるべき異種配列、ならびに異種配列の挿入のための1つ以上の制限部位を含み得る。

「アルファウイルスRNAベクターレプリコン」、「RNAベクターレプリコン」および「レプリコン」とは、標的細胞内でインビボにおけるそれ自身の増幅または自己複製を指向し得るRNA分子をいう。それ自身の増幅を指向するために、RNA分子は、1) 1つ以上のポリメラーゼ、レプリカーゼ、あるいはウイルスもしくは宿主細胞由来タンパク質、核酸、またはリボヌクレオタンパク質と相互作用し、RNA増幅を触媒し得る他のタンパク質をコードし得；そして2) 複製に必要なシスRNA配列（これは、その自己コード化タンパク質、または非自己コード化細胞由来タンパク質、核酸もしくはリボヌクレオタンパク質、あるいはこれらの任意の成分間の複合体により、複製過程で結合され得る）を含み得る。特定の実施態様では、増幅はまた、インビトロで生じ得る。アルファウイルス由来RNAベクターレプリコン分子は、以下の順でのエレメントを含むべきである：複製のためにシスで必要な5'ウイルス配列（背景では、5' CSEとも称される）、発現されたとき生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質（例えば、nsP1、nsP2、nsP3、nsP4）をコードする配列、複製のためにシスで必要な3'ウイルス配列（背景では、3' CSEとも称される）、およびポリアデニル化域。アルファウイルス由来RNAベクターレプリコンはまた、特定の実施態様において、サブゲノムフラグメントのウイルス転写を防ぐか、増大させるか、または減少させるように改変され得るウイルスサブゲノム「連結領域」プロモーター、1つ以上の構造タンパク質遺伝子由来の配列またはその部分、生存可能なウイルスの生成を可能にするのに十分なサイズである外来性核酸分子（単数または複数）、ならびに発現されるべき異種配列（単数または複数）を含み得る。細胞におけるRNAベクターレプリコンの供給源は、ウイルスまたは組換えアルファウイルス粒子での感染、あるいはプラスミドDNAまたはインビトロ転写RNAのトランスフェクションに由来し得る。

「組換えアルファウイルス粒子」とは、アルファウイルスRNAベクターレプリコンを含むビリオン単位をいう。一般に、組換えアルファウイルス粒子は、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質、脂質エンベロープ、およびRNAベクターレプリコンを含む。好ましくは、組換えアルファウイルス粒子は、宿主細胞由来脂質二重層（例えば、原形質膜）内に含まれるヌクレオキャプシド構造を含み、ここには、アルファウイルスコード化エンベ

ローブ糖タンパク質が包埋されている。粒子はまた、アルファウイルスが由来する粒子の指向性を指向する他の成分（例えば、ビオチンのような標的化エレメント、他のウイルス構造タンパク質、または他のレセプター結合リガンド）、または他のRNA分子を含み得る。

「構造タンパク質発現カセット」とは、1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質の合成を指向し得る核酸分子をいう。発現カセットは、cDNAからのRNAの合成をインビボで開始させ得る5'プロモーター、ならびに発現されたとき1つ以上の生物学的に活性なアルファウイルス構造タンパク質（例えば、C、E3、E2、6K、E1）をコードする配列、および転写終結を制御する3'配列を含むべきである。発現カセットはまた、アルファウイルスRNAの転写を開始させ得る5'配列（背景では、5' CSEとも称される）、ウイルスサブゲノム「連結領域」プロモーター、およびアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列（背景では、3' CSEとも称される）を含み得る。特定の実施態様において、発現カセットはまた、スプライス認識配列、触媒リボザイムプロセッシング配列、選択マーカーをコードする配列、核輸送シグナル、ならびにポリアデニル化配列を含み得る。さらに、アルファウイルス構造タンパク質（単数または複数）の発現は、特定の実施態様において、誘導性プロモーターの使用により調節され得る。

「安定な形質転換」とは、生細胞への核酸分子の導入、および連続周期の細胞分裂を通じた子孫細胞におけるその核酸分子の長期または恒久的な維持をいう。核酸分子は、任意の細胞区画に維持され得、このような区画には、核、ミトコンドリア、または細胞質が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、核酸分子は、核において維持され得る。維持は、染色体内（組み込み）または染色体外（エピソーム事象として）であり得る。

「アルファウイルスパッケージング細胞株」とは、アルファウイルス構造タンパク質発現カセットを含み、かつアルファウイルスベクター構築物、RNAベクターレプリコン、真核生物重層ベクター開始系、または組換えアルファウイルス粒子の導入後、組換えアルファウイルス粒子を生成する細胞をいう。親細胞は、哺乳動物起源であるか、または哺乳動物起源でなくてもよい。好ましい実施態様では、パッケージング細胞株は、構造タンパク質発現カセットで安定に形質転換されている。

「アルファウイルスプロデューサー細胞株」とは、組換えアルファウイルス粒子を生成し得る細胞株をいう。この細胞株は、アルファウイルスパッケージング細胞株を含み、この中にはまた、アルファウイルスベクター構築物、RNAベクターレプリコン、真核生物重層ベクター開始系、または組換えアルファウイルス粒子が含まれる。好ましくは、アルファウイルスベクター構築物は真核生物重層ベクター開始系であり、そしてプロデューサー細胞株はそのベクター構築物で安定に形質転換される。好ましい実施態様では、アルファウイルスベクター構築物の転写および続く組換えアルファウイルス粒子の生成は、1つ以上の因子またはアルファウイルスプロデューサー細胞株の分化状態に応じてのみ生じる。

「欠陥ヘルパー構築物」とは、トランスで供給された生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質に応じて、RNA増幅または複製、および1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質の発現を行い得るアセンブリをいう。欠陥ヘルパー構築物は、以下の順でのエレメントを含むべきである：複製のためにシスで必要な5'ウイルスまたは欠陥干渉性RNA配列、ウイルスサブゲノム連結領域プロモーター、発現されたとき1つ以上の生物学的に活性なアルファウイルス構造タンパク質（例えば、C、E3、E2、6K、E1）をコードする配列、複製のためにシスで必要な3'ウイルス配列、およびポリアデニル化域。欠陥ヘルパー構築物はまた、cDNAからのウイルスRNAの合成を開始させ得る5'プロモーター、転写終結を制御する3'配列、スプライス認識配列、触媒リボザイムプロセッシング配列、選択マーカーをコードする配列、および核輸送シグナルを含み得る。

「真核生物重層ベクター開始系」とは、目的の配列（単数または複数）または遺伝子（単数または複数）の発現を指向し得るアセンブリをいう。真核生物重層ベクター開始系は、cDNAからのインビボ（即ち、細胞内）でのRNAの合成を開始させ得る5'プロモーター、および真核生物細胞におけるそれ自身の複製を指向し、かつ異種配列を発現させ得る核酸ベ

クター配列を含むべきである。それ自身の増幅を指向し得る核酸配列は、ウイルス起源であってもなくてもよい。特定の実施態様では、核酸ベクター配列はアルファウイルス由来配列であり、そして、アルファウイルスRNAの転写を開始させ得る5'配列（背景では、5' CSEとも称される）、ならびに発現されたとき生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質（例えば、nsP1、nsP2、nsP3、nsP4）をコードする配列、およびアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列（背景では、3' CSEとも称される）で構成される。さらに、ベクター配列は、特定の実施態様において、サブゲノムフラグメントのウイルス転写を防ぐか、増大させるか、または減少させるように改変され得るウイルスサブゲノム「連結領域」プロモーター、1つ以上の構造タンパク質遺伝子由来の配列またはその部分、至適な増幅を可能にするのに十分なサイズである外来性核酸分子（単数または複数）、発現されるべき異種配列、異種配列の挿入のための1つ以上の制限部位、ならびにポリアデニル化配列を含み得る。真核生物重層ベクター開始系はまた、スプライス認識配列、触媒リボザイムプロセシング配列、核輸送シグナル、および転写終結配列を含み得る。特定の実施態様では、cDNAからのベクター核酸配列のインビボ合成は、誘導性プロモーターの使用によって調節され得る。

「アルファウイルスcDNAベクター構築物」とは、目的の配列（単数または複数）または遺伝子（単数または複数）の発現を指向し得るアセンブリをいう。ベクター構築物は、アルファウイルスRNAの転写を開始させ得る5'配列（背景では、5' CSEとも称される）、ならびに発現されたとき生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質（例えば、nsP1、nsP2、nsP3、nsP4）をコードする配列、およびアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列（背景では、3' CSEとも称される）で構成される。さらに、ベクター構築物は、cDNAからのウイルスRNAの合成をインビボで開始させ得る5'プロモーター、および転写終結を制御する3'配列を含むべきである。特定の実施態様では、ベクター構築物は、特定の実施態様において、サブゲノムフラグメントのウイルス転写を防ぐか、増大させるか、または減少させるように改変され得るウイルスサブゲノム「連結領域」プロモーターをさらに含み得る。ベクターはまた、1つ以上の構造タンパク質遺伝子由来の配列またはその部分、生存可能なウイルスの生成を可能にするのに十分なサイズである外来性核酸分子（単数または複数）、発現されるべき異種配列、異種配列の挿入のための1つ以上の制限部位、スプライス認識配列、触媒リボザイムプロセシング配列、核輸送シグナル、ならびにポリアデニル化配列を含み得る。特定の実施態様では、cDNAからのウイルスRNAのインビボ合成は、誘導性プロモーターの使用によって調節され得る。

「遺伝子送達ビヒクル」とは、目的の遺伝子または配列を送達するために利用され得る構築物をいう。代表例は、アルファウイルスRNAベクターレプリコン、アルファウイルスベクター構築物、真核生物重層ベクター開始系、および組換えアルファウイルス粒子を含む。

本発明の多数の局面および利点は、以下の詳細な説明を考慮すると当業者に明らかである。この詳細な説明により、本発明の実施の啓発が提供される。

発明の詳細な説明

上記のように、本発明は、例えば、RNAベクターレプリコン、アルファウイルスベクター構築物、真核生物重層ベクター開始系、および組換えアルファウイルス粒子を含む、新規な遺伝子送達ビヒクルを提供する。簡略には、プラスミドDNA、インビトロで転写されたRNA、または粒子に基づく、本発明のベクターの細胞への導入は、野生型由来アルファウイルスベクターの発現レベルと比較して等価であるかまたは高いレベルの異種遺伝子発現をもたらす。しかし、予想外に、合成されるベクター特異的RNAのレベルは、本発明の遺伝子送達ビヒクルを含む培養細胞においては、野生型由来ベクターと比較して少なくとも約5~10倍低い。さらに、このような遺伝子送達ビヒクルは、宿主細胞中への導入の後に、野生型由来ベクターと比較して阻害が減少した、遅延した、または存在しない、宿主細胞に指向される巨大分子合成を示す。

以下でより詳細に議論するように、本発明は、以下を提供する：(A) 本発明の遺伝子送達ビヒクルの構築のために適切な野生型アルファウイルスの供給源；(B) 所望の表現型

を有するアルファウイルスを選択するための方法；(C) アルファウイルスベクター構築物およびアルファウイルスRNAベクターレプリコンの構築；(D) 真核生物重層ベクター開始系の構築；(E) 組換えアルファウイルス粒子の構築；(F) 本発明の遺伝子送達ビヒクルにより発現され得る異種配列；(G) アルファウイルスパッケージング細胞株またはプロデューサー細胞株の構築；(H) 薬学的組成物；および (I) アルファウイルスに基づくベクターを利用するための方法。

A. 野生型アルファウイルスの供給源

上記のように、本発明は、アルファウイルスに基づく広範囲な種々のベクター（例えば、RNAベクターレプリコン、アルファウイルスベクター構築物、真核生物重層ベクター開始系、および組換えアルファウイルス粒子）ならびにこのようなベクター構築物および粒子を利用するための方法を提供する。簡略には、上記のベクターの調製における使用のために適切な野生型アルファウイルスをコードする配列は、本明細書中に提供される開示が与えられれば、天然に存在する供給源または寄託所（例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, Maryland）から容易に入手され得る。さらに、野生型アルファウイルスは、野生型アルファウイルスに感染した細胞における宿主細胞に指向される巨大分子合成のレベルと、本発明の遺伝子送達ビヒクルを含む細胞における宿主細胞に指向される巨大分子合成のレベルとを比較するために利用され得る。

適切なアルファウイルスの代表例は、アウラウイルス (ATCC VR-368)、ペバルウイルス (ATCC VR-600、ATCC VR-1240)、キャバソウ (Cabassou) ウイルス (ATCC VR-922)、チクングンヤウイルス (ATCC VR-64、ATCC VR-1241)、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス (ATCC VR-65、ATCC VR-1242)、フォートモルガン (Fort Morgan) ウイルス (ATCC VR-924)、ゲタウイルス (ATCC VR-369、ATCC VR-1243)、キジルアガハ (Kyzylagach) ウイルス (ATCC VR-927)、マヤロウイルス (ACTT VR-66、ATCC VR-1277)、ミッデルブルグウイルス (ATCC VR-370)、ムカンボウイルス (ATCC VR-580、ATCC VR-1244)、ヌヅムウイルス (ATCC VR-371)、ピクスナウイルス (ATCC VR-372、ATCC VR-1245)、ロスリバーウイルス (ATCC VR-373、ATCC VR-1246)、セムリキ森林ウイルス (ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、シンドビスウイルス (ATCC VR-68、ATCC VR-1248；以下に記載されるCMCC番号4640もまた参照のこと)、トナテ (Tonate) ウイルス (ATCC VR-925)、トリニティウイルス (ATCC VR-469)、ウナウイルス (ATCC VR-374)、ヴェネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス (ATCC VR-69、ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR-1249、ATCC VR-532)、西部ウマ脳脊髄炎ウイルス (ATCC VR-70、ATCC VR-1251、ATCC VR-622、ATCC VR-1252)、ワタロアウイルス (ATCC VR-926)、およびY-62-33ウイルス (ATCC VR-375) を含む。

細胞巨大分子合成のレベルを比較する目的のために、以下のプラスミドもまた、野生型アルファウイルスストックの標準的な供給源として利用され得る。これらのプラスミドは、以下を含む：セムリキ森林ウイルスのためには、pSP6-SFV4 (Liljestromら, J.Virol.65:4107-4113,1991)；ヴェネズエラウマ脳炎ウイルスのためには、pV2000 (Davisら, Vir.183:20-31,1991)；ロスリバーウイルスのためには、pRR64 (Kuhnら, Vir.182:430-441,1991)。簡略には、これらのプラスミドのためには、プラスミド由来のインビトロで転写されたゲノムRNAでトランスフェクトされたBHK細胞からウイルスが入手され得る。シンドビスウイルスのためには、感染性ウイルスは、pVGELVIS (ATCC番号75891) プラスミドDNAでトランスフェクトされたBHK細胞から直接単離され得るか、あるいは野生型ウイルスストックとして入手され得る (ATCC番号VR-2526に関して以下に提供される寄託情報を参照のこと)。

B. 所望の表現型を有するアルファウイルスの選択

アルファウイルスに基づくベクターからのインビボ異種遺伝子発現の持続は、いくつかの機構（宿主細胞に指向される巨大分子合成の阻害を含む）により影響される。しかし、本発明の前には、非細胞変性表現型をもたらす、コードまたは非コードベクターウイルス特異的配列の変化を選択するかまたは同定するための明白な方法は存在しなかった。従って、本発明の1つの局面では、宿主細胞に指向される巨大分子合成の阻害が減少しているかまたは存在しない、アルファウイルス由来遺伝子送達ビヒクルを単離および／または構築

するための方法が提供される。

1. ウイルス改変体の生物学的選択

a. DI粒子を含むウイルスストックからの選択

非細胞変性性アルファウイルス改変体を単離するための1つのアプローチは、野生型ウイルス調製物における欠陥妨害(DI)粒子の存在を利用する。簡略には、特定のRNAウイルス(例えば、ラブドウイルス(例えば、水疱性口内炎ウイルス)およびアルファウイルス(例えば、シンドビスウイルスおよびセムリキ森林ウイルス))は高度に細胞変性性であるが、これらはそれにもかかわらずDI粒子の存在下で培養細胞において長期間持続した感染を確立する。定義によれば、DI粒子は、野生型ウイルスに由来し、そしてDIによる自律的複製を防ぐ野生型ゲノムからの1つ以上の変異(例えば、欠失、再編、ヌクレオチド置換など)を含む。一般に、DI粒子のゲノムは、野生型ウイルスと比較して小さく、かつ複雑度が低く、そしてタンパク質をコードする領域を欠失しているが、複製のためにシスで必要とされる領域は維持している。このようなシス配列は、しばしば重複および/または再編されている。特定のアルファウイルス(例えば、シンドビスウイルス)の場合、DI RNAゲノムの配列および編成は分析されており、そして野生型ウイルスゲノムの一番端の3'末端由来の最小限50ntを含み、そしてその5'末端では、野生型配列または細胞tRNA(例えば、tRNA^{Asp})配列のいずれかをウイルス配列に加えて含むことが見出されている。全ての場合において、変異DIゲノムの増殖および維持は、感染細胞において親のヘルペスウイルスの同時存在を必要とする。しかし、それらの遺伝構造の結果として、DIゲノム複製は、その野生型対応物に対して非常に優れており、そして比較して豊富である。この特徴は、野生型ゲノム複製の妨害、感染性ウイルスの非存在または低レベルの生成、および細胞の長期間存続する感染の確立をもたらす。

従って、以下で実施例1および2に記載のように、DI粒子の集団を含む混合アルファウイルスストックでの感染により許容細胞(例えば、ヒト起源の細胞を含む、哺乳動物細胞)において長期間存続する感染を確立する能力は、DI粒子の非存在下でさえも存続する感染を確立し得る完全にインタクトなウイルス改変体を経時的に単離するための機構を提供する。このような感染性ウイルス改変体は、長期間存続する感染性培養物から、複数回のプラーク精製により単離され得、そして宿主細胞において増殖性(productive)、存続性、および非細胞変性性の感染を開始することが見出されている。さらに、このような増殖性、存続性、および非細胞変性性の感染から生成される改変体ウイルスのレベルは、野生型ウイルス感染と区別できない。この観察は、DI粒子の混合物を含むウイルスストックでの存続性感染の確立の以前の必要要件とは明らかに対照的である。

b. DI粒子を含まないウイルスストックからの選択

欠陥妨害粒子を含むウイルスストックからの選択に加えて、本発明での使用に適切なウイルス改変体は、精製ウイルスストック(DI粒子を含まない)から入手され得る。このウイルスストックは、感受性培養細胞の感染の前にランダム変異誘発に供されるか、または培養細胞でのRNA複製の間に非特異的変異を作製させるかのいずれかである。簡略には、最初のウイルスストックは、天然の単離株またはそれに由来する生物学的改変体として入手され得るか、または培養細胞を、ゲノムcDNAクローンまたはインビトロで転写されたRNAを含む感染性核酸分子でトランスフェクトすることにより作製され得る。所望の場合、次いで、ウイルスストックは、物理的または化学的変異誘発に供され得る(好ましいとはいえ、このような変異誘発は必要ではない)。化学的変異誘発の場合、好ましい実施態様は、容易に利用され得る変異誘発剤(例えば、亜硝酸、5-アザシチジン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、またはエチルメタンスルホン酸(Sigma, St. Louis, MO))をウイルス感染の前に利用する。ランダム変異誘発の後に、特異的選択手順を適用して、以下の実施例2により詳細に記載するような所望の表現型を有するウイルス改変体が単離される。

2. ウイルス改変体の遺伝的選択

関連するアプローチにおいて、変異は、ウイルスストックを用いずに、むしろウイルスのクローン化ゲノムcDNAを用いて入手され得る。このウイルスは、その後、感染性ウイルス

RNAをインビトロで（例えば、シンドビスウイルス（Riceら, J.Virol.61:3809-3819,1987 ;Dubenskyら, J.Virol.70:508-519,1996）、SFV

(Liljeströmら, J.Virol. 65: 4107-4113, 1991),

VEE (Davisら, Virology 183:20-31,1991)、ロスリバーウイルス (Kuhnら, Virology 182:430-441,1991)、ポリオウイルス (Van Der Werfら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:2330-2334,1986)) またはインビボで (シンドビスウイルス (Dubenskyら、同書)、ポリオウイルス (RacanielloおよびBaltimore, Science 214:916-919,1981)) 転写するために使用され得る。簡略には、感染性核酸は、直接に、または上記の方法の1つを用いて行った変異誘発の後のいずれかに、感受性培養細胞 (例えば、ヒト起源の細胞を含む、哺乳動物細胞) 中に導入される。あるいは、ベクター核酸は、粒子中に最初にパッケージングされ得、そして粒子は選択のために標的細胞集団にベクターを送達するために使用され得る。続いて、所望の表現型を有するウイルス改変体を単離するための特異的選択手順が適用され、そして以下に記載される。

特定の実施態様において、ランダム変異誘発は、E.coliのXL1-Red株 (Stratagene, San Diego, CA) においてウイルスcDNAを含むプラスミドの増殖により最初に実施され得る。この株は、mutS、mutD、およびmutT変異に起因して、3つの主要なDNA修復経路を欠損している。しかし、他の変異誘発手順 (リンカースキャニング変異誘発 (Haltinerら, Nucleic Acids Res.13:1015,1985;Barany, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:4202,1985)、ランダムオリゴヌクレオチド特異的変異誘発 (Kunkelら, Methods Enzymol.155:166,1987;ZollerおよびSmith, Methods Enzymol.154:329,1987;Hillら, Methods Enzymol.155:558,1987;Hermesら, Gene 84:143,1989)、およびPCR変異誘発 (HerlitzeおよびKoenen, Gene 91:143,1990)) を含むがこれらに限定されない) が、公開されたプロトコルを利用して容易に置換され得る。得られる変異cDNAクローンの混合集団は、感受性培養細胞中に、直接的にまたはインビトロでの転写の後に導入される。所望の表現型の変異ウイルスを含むトランスフェクト細胞についての富化は、以下のように、野生型ウイルスに感染した細胞を越える増加した生存時間に基づいて達成される。

3. ウイルス由来ベクターを用いる改変体の遺伝的選択

別のアプローチにおいて、変異は、ウイルス由来発現ベクターの任意の領域 (調節領域、非翻訳領域、またはタンパク質コード遺伝子領域を含む) において作製され得る。例えば、本発明の1つの局面において、宿主細胞に指向される巨大分子合成の障害が低減しているかまたは存在しないウイルス改変体を選択するための方法が提供される。この方法は、

(a) 細胞に真核生物重層ベクター開始系、RNAベクターレプリコン、または免疫原性細胞表面タンパク質の発現を行う (ベクター含有細胞の検出に適切な) 組換えアルファウイルス粒子、あるいは選択マーカー (薬物または非薬物マーカーのいずれかであって、ここで、非ベクター含有細胞は、例えば、ネオマイシン、ハイグロマイシン、フレオマイシン、gpt、ピューロマイシン、またはヒスチジノールのような薬物の添加の際に殺傷される) を導入する工程; (b) 所望の表現型を示すベクター含有細胞を選択する条件下でそしてそれに十分な時間で細胞をインキュベートまたは培養する工程; その後、(c) 所望の表現型のベクターを含む細胞を単離する工程、および (d) 原因の変異についてベクターを分析する工程を含む。

上記のように、本発明のウイルスベクターは、広範囲な種々のウイルス (例えば、シンドビスウイルス (Xiongら, Science 243:1188-1191,1989;Hahnら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:2679-2683,1992;Schlesinger, Trends Biotechnol.11:18-22,1993;Dubenskyら、同書)、セムリキ森林ウイルス (LiljeströmおよびGaroff, Bio/Technology 9:1356-1361,1991)、ヴェネズエラウマ脳炎ウイルス (Davisら, J.Cell.Biochem.Suppl.19A:310,1995)、ポリオウイルス (Choiら, J.Virol.65:2875-2883,1991;Ansardiら, Cancer Res.54:6359-6364,1994;およびAndinoら, Science 265:1448-1451,1994)) に由来し得る。上記の方法の代表例は、以下の実施例2により詳細に議論される。

4. ウイルス改変体の使用

本明細書中でより詳細に議論するように、本明細書中に提供される方法を利用して選択ま

10

20

30

40

50

たは作製されたウイルス改変体は、所望の表現型を示す広範囲な種々の組換え遺伝子送達ビヒクルを構築するために利用され得る。特定の実施態様では、遺伝子送達ビヒクルは、nsP2遺伝子のLeu-Xaa-Pro-Gly-Gly (「LXPGG」) モチーフ内に変異を含む。簡略には、nsP2遺伝子の公開された配列が利用可能であるアルファウイルスについては、高度に保存されたアミノ酸モチーフ-Leu-Xaa-Pro-Gly-Gly- (「LXPGG」) が観察される。標準的なタンパク質モデリングアルゴリズム (ChouおよびFasman, Adv. Enzym. 47:45-148, 1978) により推定されたように、このモチーフの残基は、構造中におそらくβターンを含む。シンドビスウイルスにおけるnsP2のプロリン726は、このモチーフの中心の残基である。他のアルファウイルスにおける対応するモチーフを以下の表に例示する。

<u>アルファウイルス株*</u>	<u>Pro-Gly-Gly領域</u>	<u>nsP2アミノ酸の (P-G-G)</u>	10
1. シンドビスウイルス	Leu-Asn-Pro-Gly-Gly-Thr	a. a. =726-728	
2. S. A. AR86ウイルス	Leu-Asn-Pro-Gly-Gly-Thr	a. a. =726-728	
3. オッケルボウイルス (Ockelbo virus)	Leu-Asn-Pro-Gly-Gly-Thr	a. a. =726-728	
4. アウラウイルス	Leu-Lys-Pro-Gly-Gly-Thr	a. a. =725-727	
5. セムリキ森林ウイルス	Leu-Lys-Pro-Gly-Gly-Ile	a. a. =718-720	20
6. VEEウイルス	Leu-Asn-Pro-Gly-Gly-Thr	a. a. =713-715	
7. ロスリバーウイルス	Leu-Xaa-Pro-Gly-Gly-Ser	a. a. =717-719	

*公開されたnsP2配列を有するアルファウイルス株：(1) Straussら, Virology 133: 92-110, 1984; (2) Simpsonら, Virology 222: 464-469 1996; (3) Shirakoら, Virology 182: 753-764, 1991; (4) Rumenapfら, Virology 208: 621-633, 1995; (5) Takkinen, Nucleic Acids Res. 14: 5667-5682, 1986; (6) Kinneyら, Virology 170: 19-30, 1989; および(7) Faragherら, Virology 163: 509-526, 1988.

それ故、本発明の種々の実施態様においては、遺伝子送達ビヒクルが提供される。ここで、遺伝子送達ビヒクルは、LXPGGモチーフに変異を有するnsP2遺伝子を含む。1つの実施態様では、Leuコドンは、Ala、Arg、Asn、Asp、Asx、Cys、Gln、Glu、Glx、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、または別の稀なもしくは非タンパク質性のアミノ酸 (例えば、Lehninger, Biochemistry, Worth Publishers, Inc. N.Y.N.Y., 1975を参照のこと) からなる群より選択される別のアミノ酸に変異される。別の実施態様では、Proコドンは、Ala、Arg、Asn、Asp、Asx、Cys、Gln、Glu、Glx、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、または別の稀なもしくは非タンパク質性のアミノ酸からなる群より選択される別のアミノ酸に変異される。他の実施態様では、Glyコドンのいずれかまたは両方は、Ala、Arg、Asn、Asp、Asx、Cys、Gln、Glu、Glx、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、または別の稀なもしくは非タンパク質性のアミノ酸からなる群より選択される別のアミノ酸に変異され得る。さらに他の実施態様では、Xaaアミノ酸またはLXPGGモチーフの1～3残基上流もしくは下流のアミノ酸は、得られる遺伝子送達ビヒクルの表現型に影響を与えるために、野生型アミノ酸から変異され得る。本発明の特定の実施態様では、LXPGGモチーフは、1つより多くのコドンの改変、あるいは1つ以上の挿入または欠失を含むように変異され得る。

C. アルファウイルスベクター構築物およびアルファウイルスRNAベクターレプリコン

上記のように、本発明は、アルファウイルスに由来するDNAおよびRNAの両方の構築物を提供する。簡略には、本発明の1つの局面では、cDNAからのウイルスRNAの合成をインビトロで開始する5'プロモーター、アルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、4つの全てのアルファウイルス非構造タンパク質を作用可能にコードする核酸分子（上記のような単離された核酸分子、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、および3'ポリアデニル化域を含む）を含むアルファウイルスベクター構築物が提供される。他の局面では、アルファウイルスRNAの転写を開始する5'配列、4つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質を作用可能にコードする核酸分子（上記の単離された核酸分子、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、および3'ポリアデニル化域を含む）を含むRNAベクターレプリコンが提供される。上記の好ましい実施態様では、上記の構築物はさらに、ウイルス連結領域を含む。これらの局面のそれぞれは、以下でより詳細に議論される。

10

1. ウイルスRNAの合成を開始する5'プロモーター

上記のように、本発明の特定の実施態様において、インビトロ転写のプロセスによりcDNAからのウイルスRNAの合成を開始する5'プロモーター（例えば、DNA依存性RNAポリメラーゼプロモーター）を含むアルファウイルスベクター構築物が提供される。好ましい実施態様では、このようなプロモーターは、例えば、バクテリオファージT7、T3、およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターを含む。同様に、インビボで（すなわち細胞内で）cDNAからのウイルスRNAの合成を開始する5'プロモーター（例えば、DNA依存性RNAポリメラーゼプロモーター）を含む真核生物重層ベクター開始系が提供される。特定の実施態様では、このようなRNAポリメラーゼプロモーター（アルファウイルスベクター構築物または真核生物重層ベクター開始系のいずれか）は、原核生物および真核生物の両方に由来し得、そして例えば、細菌の β -ガラクトシダーゼおよびtrpEプロモーター、ならびに真核生物ウイルスのシミアンウイルス40（SV40）（例えば、初期または後期）、サイトメガロウイルス（CMV）（例えば、即時型）、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMLV）またはラウス肉腫ウイルス（RSV）LTR、および単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）のプロモーターを含む。

20

2. 転写を開始する配列

上記のように、好ましい実施態様では、本発明のアルファウイルスベクター構築物およびRNAベクターレプリコンは、アルファウイルスRNAの転写を開始し得る5'配列（5'末端CS Eまたは5'シス複製配列ともいう）を含む。このような配列の代表例は、野生型シンドビスウイルスのヌクレオチド1~60、および塩基150~210に沿ったより少ない範囲のヌクレオチド、tRNA^{ASP}のヌクレオチド10~75（アスパラギン酸、Schlesingerら、米国特許第5,091,309号）、ならびに転写を開始する他のアルファウイルス由来の5'配列を含む。一鎖ゲノムコピーの3'末端に対応する配列、nsPレプリカーゼ複合体により結合される配列、およびおそらくさらなる宿主細胞因子（ここからポジティブ鎖ゲノムRNAの転写が開始される）は、これらの配列相補物である。

30

3. アルファウイルス非構造タンパク質

本明細書中に提供されるアルファウイルスベクター構築物およびRNAベクターレプリコンはまた、4つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質（上記の所望の表現型を提供する配列を含む）をコードする配列を必要とする。簡略には、アルファウイルス非構造タンパク質をコードする広範な種々の配列は、本明細書中に明白に提供されるものに加えて、本発明において利用され得、従って、用語「アルファウイルス非構造タンパク質」の範囲内にあると判断される。例えば、遺伝コードの縮重のために、1つより多くのコドンが、所定のアミノ酸をコードし得る。従って、アルファウイルス非構造タンパク質をコードする広範な種々の核酸配列が作製され得る。さらに、多数の任意の位置でのアミノ酸の置換、付加、または欠失は、機能的または生物学的に活性な非構造タンパク質を依然として提供し得る。本発明の状況においては、アルファウイルス非構造タンパク質は、これらがベクター構築物の自己複製（すなわち、ウイルス核酸の複製および必然的にはないが感染性ウイルスの生成）を促進する場合、生物学的に活性であると判断され、そして経時的に行

40

50

われる代謝的標識またはRNase保護アッセイにより容易に決定され得る。このような誘導体を作製するための方法は、本明細書中に提供される開示が与えられれば、当業者により容易に達成され得る。

アルファウイルスは、4つの非構造タンパク質（nsp1、nsp2、nsp3、およびnsp4と称される）を発現する。アルファウイルスに由来する本発明のベクターは、4つの非構造タンパク質をコードする配列を含むべきである。野生型シンドビスウイルスでは、非構造タンパク質1～3はヌクレオチド60～5747によりコードされるが、nsP4はヌクレオチド5769～7598によりコードされる（図1を参照のこと）。非構造タンパク質は、(i) nsP3のコード領域とnsP4のコード領域との間にオパール終結コドンが存在するか否か、および(ii)このようなオパールコドンが存在する場合、新生ポリペプチドの翻訳終結がその点に存在するか、または読み通され、それゆえP1234の生成となるかに依存して、ゲノムのポジティブ鎖RNAから、それぞれ、P123またはP1234として知られる2つの大きなポリタンパク質の1つとして翻訳される。オパール終結コドンは、アルファウイルスSIN（株AR339および本明細書中に記載されるSIN-1株）、アウラ、WEE、EEE、VEE、およびRRのnsP3/nsP4連結部に存在し、従ってP123およびP1234種は、これらのウイルスで感染した細胞において発現される。対照的に、終結コドンは、アルファウイルスSIN（株AR86、SF、およびONN）のnsP3/nsP4連結部に存在せず、従ってこれらのウイルスで感染した細胞においてはP1234種のみが発現される。ポリタンパク質およびプロセシングされたモノマー形態の非構造タンパク質は、アルファウイルスRNAゲノムの複製において機能する。アルファウイルス非構造タンパク質の切断変異体の増殖特徴を調べる実験は、ポリタンパク質は、ゲノムのネガティブ鎖RNAの合成に関与するが、個々のモノマータンパク質は、ゲノムおよびサブゲノムのポジティブ鎖RNA種の合成を触媒することを示した（ShirakoおよびStrauss, J. Virol. 68:1874-1885, 1994）。翻訳読み通しは、一般に、nsP3/nsP4連結部にオパール終結コドンを含む野生型シンドビスウイルスで感染した細胞において、1回に約10%～20%で生じる。P123およびP1234のプロセシングは、非構造タンパク質の1つによりコードされるプロテイナーゼ活性によるものであり、そして以下にさらに議論される。シスかまたはトランスかのプロセシングの順番は、種々の要因（感染段階を含む）に依存する。例えば、シンドビスウイルスおよびSFVは、P123およびnsp4を感染の初期に、そしてP12およびP34を感染の後期に生成する。次いでさらなるプロセシングが個々の非構造タンパク質を放出する。各非構造タンパク質は、いくつかの機能を有する。これらのいくつかを以下に記載する。

a. nsP1

非構造タンパク質1は、一鎖RNA合成の開始（または継続）のために必要とされる。これはまた、転写の間に、ゲノムおよびサブゲノムのアルファウイルスRNAの5'末端のキャッピングにおいて役割を果たす。なぜなら、nsP1は、メチルトランスフェラーゼ活性（MiおよびStollar, Vir. 184:423-427, 1991）およびグアニルトランスフェラーゼ活性（StraussおよびStrauss, Microbiol. Rev. 58 (3):491-562, 1994）の両方を有するからである。nsP1はまた、nsP2のプロテイナーゼ活性を調節する。なぜなら、nsP1含有ポリタンパク質は、nsP2とnsP3との間で非効率的に切断されるからである（de Grootら, EMBO J. 9:2631-2638, 1990）。

b. nsP2

非構造タンパク質2は、ウイルスRNAの複製および非構造ポリタンパク質のプロセシングに関与する多機能性タンパク質である。このタンパク質のN末端ドメイン（最初の460アミノ酸にはばまたがる）は、RNA複製および転写の間に二重鎖のねじれを戻すのに活性であるヘリカーゼであると考えられる。本発明によるベクターにおける26SサブゲノムmRNA（目的の遺伝子（単数または複数）をコードする）の合成は、機能的nsP2を必要とする。シンドビスウイルスのアミノ酸残基460～807の間のnsP2のC末端ドメインは、非構造ポリタンパク質を、nsP1/nsP2、nsP2/nsP3、およびnsP3/nsP4連結部の間でトランスおよびシスでタンパク質分解により切断する。アルファウイルスnsP2 C末端ドメインの一次配列のアラインメントは、nsP2がパパイン様プロテイナーゼであることを示唆する（HardyおよびStrauss, J. Virol. 63:4653-4664, 1988）。

nsP2の他の観察された特徴は、アルファウイルスの増殖に直接関連する機能に未だに割り当てられていない。例えば、nsP2が、SFV感染細胞においてリボソームと密接に関連し、そしてUV照射によりrRNAに架橋され得ることが示されている(Rankiら, FEBS Lett.108:299-302,1979)。さらに、50%のnsP2は、SFV感染BHK細胞の核マトリックス、特に核小体の領域に局在する

(Peränenら, J.Virol. 64: 1888-1896, 1990)。

核へのnsP2の局在は、おそらく活性な輸送により進行される。なぜなら、これは核コア複合体を通しての拡散により核に侵入し得る小タンパク質および代謝産物のサイズ(約20~60kD)を越えるからである(Paineら, Nature 254:109-114,1975)。推定のNLS配列は、

10

c. nsP3

非構造タンパク質nsP3は、ウイルス複製におけるそれらの正確な役割は十分には理解されていないとはいえ、2つの異なるドメインを含む。種々のアルファウイルスにおいてN末端ドメインは、322~329残基長の範囲であり、そして任意の2つのアルファウイルス間で最小51%のアミノ酸配列同一性を示す。しかし、C末端ドメインは、公知のアルファウイルス間で長さも配列も保存されておらず、そして複数の変化が許容される(Liら, Virology,179:416-427)。タンパク質は、高度にリン酸化された状態で複製複合体と会合して見出される。そのゲノム中にnsP3/nsP4連結部の間でオパール終結コドンを含むアルファウイルスにおいて、オパール終結シグナルの読み通しが存在するか否かに依存して、2つの異なるタンパク質が生成される。読み通しは、ポリタンパク質の切断後に7個のさらなるカルボキシ末端アミノ酸を含むnsP3タンパク質を生じる。nsP3がウイルスRNA合成の何らかの能力に必要とされることは明白である。なぜなら、このタンパク質の特定の変異体はRNAネガティブであり、そしてP123ポリタンパク質は一鎖RNA合成に必要とされるからである。

20

d. nsP4

nsP4は、ウイルスにコードされるRNAポリメラーゼであり、そしてこのような酵素に特有のGDDモチーフを含む(KamerおよびArgos,Nucleic Acids Res.12:7269-7282,1984)。従って、nsP4は、アルファウイルスRNA複製に不可欠である。nsP4の濃度は、感染細胞において厳密に調節される。ほとんどのアルファウイルスにおいて、nsP4の翻訳は、nsP3コード領域とnsP4コード領域との間のオパールコドンの読み通しを必要とし、他の非構造タンパク質と比較して細胞内レベルが低い。さらに、nsP4の大半は、N末端規則経路(Gondaraら, J.Biol.Chem.264:16700-16712,1989)による分解を通して代謝的に不安定である。しかし、分解シグナルを隠す複製複合体とのその会合に起因して、いくらかのnsP4は安定である。従って、アミノ末端残基を改変することによる酵素の安定化は、本明細書中に記載されるベクターによりコードされるタンパク質のより長期間の発現を促進するのに有用であることを証明し得る。安定化アミノ末端残基は、メチオニン、アラニン、およびチロシンを含む。

30

4. ウイルス連結領域

40

アルファウイルスウイルス連結領域は、通常、サブゲノムmRNAの転写開始を制御する；従って、このエレメントはまた、サブゲノムmRNAプロモーターとも呼ばれる。シンドビスウイルスの場合、通常のウイルス連結領域は、代表的には、ほぼヌクレオチド数7579で始まり、そして少なくともヌクレオチド数7612を通して連続する(そしておそらくそれを越える)。最小では、ヌクレオチド7579~7602(5'-ATC TCT ACG GTG GTC CTA AAT AGT-配列番号1)が、サブゲノムフラグメントの転写に必要であると考えられる。この領域(ヌクレオチド7579~7602)を、本明細書中以下で「最小の連結領域コア」という。

本発明の特定の局面では、ウイルス連結領域は、サブゲノムフラグメントの合成を防ぐために不活化される。本発明の状況において利用されるように、「不活化」は、記載されたように(FrolovおよびSchlesinger,J.Virol.68:1721-1727,1994)、サブゲノムmRNAに対

50

応する種が、これらのベクターを含む細胞から精製され、そして1 µg/mlダクチノマイシンで処理され、そして [³H] -ウリジンで標識され、電気泳動されたRNAの変性ゲルからのオートラジオグラムにおいて観察されないことを意味する。

本発明の1つの実施態様では、遺伝子送達ビヒクルは、リボゾームの読み通しまたは無能力化された連結領域プロモーターのすぐ下流の内部リボゾーム侵入のいずれかを促進するシグナルの置換により構築され得る。このベクター構成において、サブゲノムメッセージの合成は起こり得ない；しかし、異種タンパク質はリボゾームの読み通し（スキニング）または内部リボゾーム侵入のいずれかにより、ゲノム長のmRNAから発現される。

本明細書中に記載される遺伝子送達ビヒクルの特定の適用において、1つより多くの異種遺伝子の発現が所望される。例えば、ゴシェ症候群（Gaucher's syndrome）のような代謝性疾患の処置のためには、治療用緩和剤の持続が限定され得るため、遺伝子送達ビヒクルまたは粒子の複数回投与が必要であり得る。従って、本発明の特定の実施態様においては、グルコセレブロシダーゼ遺伝子のような治療用緩和剤とともに、標的細胞においてアデノウイルス2 E3遺伝子を同時発現することが所望され得る。野生型ウイルスでは、構造タンパク質（「sP」）ポリシストロン性メッセージは単一のポリタンパク質に翻訳され、これは次に部分的にsPキャプシドプロテイナーゼにより切断されて個々のタンパク質にプロセッシングされる。従って、キャプシドsPのプロテアーゼ活性、または切断のために認識されるペプチドがアルファウイルスベクターの置換領域内に存在しないため、ポリシストロン性メッセージからの複数の異種遺伝子の発現は、野生型ウイルスとは異なる機構を必要とする。従って、本発明のさらなる実施態様では、複数の独立の異種配列の翻訳を可能にする機能的エレメント（リボゾームの読み通し、キャップとは独立の翻訳、内部リボゾーム侵入、または最小連結領域コア配列を含む）が利用され得る。

5. アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列およびポリ（A）域

上記のように、本発明のアルファウイルスベクター構築物またはRNAベクターレプリコンはまた、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列（「アルファウイルスレプリカーゼ認識配列」、「3'末端CSE」、または「3'シス複製配列」ともいう）を含むべきである。簡略には、ポジティブ鎖ゲノムRNAの3'末端領域に位置するアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列は、このウイルスがネガティブ鎖の合成によって複製を始める認識部位を提供する。アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列として、広範な種々の配列が利用され得る。例えば、1つの実施態様において、ポリメラーゼ認識が、認識配列としてなお機能し得る最小の領域（例えば、ヌクレオチド11,684~11,703）まで端が切断されているシンドビスウイルスベクター構築物が利用され得る。本発明の別の実施態様において、E1 sP遺伝子の下流の非翻訳領域全体からウイルスゲノムの3'末端までがポリメラーゼ認識部位を含む（例えば、ヌクレオチド11,382~11,703）、シンドビスウイルスベクター構築物が利用され得る。

本発明の好ましい実施態様において、アルファウイルスベクター構築物またはRNAベクターレプリコンはさらにポリ（A）域を含み得る。これは、アルファウイルス由来ベクターでトランスフェクトした細胞における異種遺伝子発現の観察レベルを劇的に増加させる（例えば、Dubenskyら、前出を参照のこと）。簡略には、ポリ（A）域は、細胞質中での安定性を促進し、それにより、ウイルスの生活環の開始効率を上昇させるに十分な任意のサイズであり得る。本発明の種々の実施態様において、ポリ（A）配列は少なくとも10アデノシンヌクレオチド、そして最も好ましくは、少なくとも25アデノシンヌクレオチドを含む。1つの実施態様において、ポリ（A）配列は、シンドビスウイルスヌクレオチド11,703に直接結合される。

D. 真核生物重層ベクター開始系

全長ゲノムアルファウイルスcDNAクローンのサイズのため、インビトロでの全長のキャップされたRNA分子の転写は、むしろ効率が悪い。これは、トランスフェクトされたRNAのインビトロ転写量に対して、ウイルスの感染中心に関して低いトランスフェクション効率をもたらす（プラーク形成により測定される）。このような効率の悪さはまた、インビトロでのアルファウイルス発現ベクターの転写に関連する。従って、感染サイクルを開始する

10

20

30

40

50

能力または異種配列の発現を指向する能力について候補cDNAクローンおよび他のアルファウイルスcDNA発現ベクターを試験することは、cDNAクローンが、DNA分子として感受性細胞にトランスフェクトされ、これが次いでインビボでウイルスRNAの合成を指向する場合、非常に促進され得る。

従って、本発明の1つの局面において、インビボでのウイルスRNA（ゲノムまたはベクター）の合成を指向し得る、DNAに基づくベクター（「真核生物重層ベクター開始系」という）が提供される。一般に、真核生物重層ベクター開始系は、インビボ（すなわち、細胞内）でcDNAからのRNAの5'合成を開始し得る5'プロモーター、細胞中でのそれ自身の複製を指向し得る構築物（この構築物はまた、異種核酸配列を発現し得る）、および転写終結を制御する3'配列（例えばポリアデニル化域）を含む。このような真核生物重層ベクター開始系は、異種ヌクレオチド配列の発現を制御する、2段階または「重層」機構を提供する。簡略には、第1の層は第2の層の転写を開始し、そしてインビボでcDNAからのRNAの5'から3'への合成を開始し得るプロモーター（例えば、5'真核生物プロモーター）を含み、そしてさらに他のエレメント（3'転写終結／ポリアデニル化部位、1つ以上のスプライス部位を含む）、ならびに他のRNA核輸送エレメント（例えば、B型肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（PRE）（Huangら、Mol.Cell.Biol.13:7476,1993;Huangら、J.Virol.68:3193,1994;HuangらMol.Cell.Biol.15:3864-3869,1995）、メイソン-ファイザーサルウイルスの構成性輸送エレメント（CTE）（Brayら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:1256-1260,1994）、HIV Rev応答性エレメント（Malimら、Nature 338:254-257,1989;Cullenら、Trends Biochem.Sci.16:346,1991）を含む）、および、所望であれば、他の同様のエレメントを含み得る。本発明での使用に適切な代表的なプロモーターは、真核生物性（例えば、pol I、II、またはIII）および原核生物性プロモーター、ならびに誘導性または非誘導性（すなわち、構成性）プロモーター（例えば、モロニーマウス白血病ウイルスプロモーター、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、Drosophila アクチン5 C 遠位プロモーター、SV40プロモーター、熱ショックタンパク質65プロモーター、熱ショックタンパク質70プロモーター、免疫グロブリンプロモーター、マウスポリオーマウイルスプロモーター（Py）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）プロモーター、BKウイルスおよびJCウイルスのプロモーター、マウス乳ガンウイルス（MMTV）プロモーター、アルファウイルス連結領域、CMVプロモーター、アデノウイルスE1またはVA1RNAのプロモーター、rRNAプロモーター、tRNAメチオニンプロモーター、CaMV 35Sプロモーター、ノバリンシンセターゼプロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター、およびlacプロモーターを含む。

本発明のなお他の実施態様では、誘導性プロモーターが利用され得る。例えば、1つの実施態様において、DNAからのRNAの合成を開始する誘導性プロモーターが提供される。誘導性プロモーターは、コアRNAポリメラーゼプロモーター配列、および転写アクチベータータンパク質のDNA結合を指向する作動可能に連結された核酸配列、および転写リプレッサータンパク質のDNA結合を指向する作動可能に連結された核酸配列を含む。さらなる実施態様において、転写アクチベータータンパク質のDNA結合を指向する核酸配列は、テトラサイクリンリプレッサー／VP16トランスアクチベーター融合タンパク質を結合する配列である。さらに別の実施態様において、転写リプレッサータンパク質のDNA結合を指向する核酸配列は、ラクトースリプレッサー／Kruppelドメイン融合タンパク質を結合する配列である。

第2の層は、1つ以上の異種ヌクレオチド配列を発現し得、そして自律的にまたは1つ以上の因子（例えば、誘導性である）に応答してのいずれかで細胞中でそれ自身の複製を指向し得る、自己触媒ベクター構築物を含む。第2の層は、ウイルス起源または非ウイルス起源であり得る。本発明の1つの実施態様において、第2の層の構築物は、上記のアルファウイルスベクター構築物であり得る。

真核生物重層ベクター開始系の第1の層として広範な種々のベクター系が使用され得、以下のDNAウイルスから開発されるウイルスベクター構築物を含む：例えば、カナリアボックスウイルスまたはワクシニアウイルスを含むボックスウイルス科（例えば、Fisher-Hoc

10

20

30

40

50

hら、PNAS 86:317-321、1989;Flexnerら、Ann.N.Y.Acad.Sci.569:86-103、1989;Flexnerら、Vaccine 8:17-21、1990;米国特許第4,603,112号、同第4,769,330号、および同第5,017,487号;WO 89/01973);BKV、JCVまたはSV40のようなパポーパウイルス科(例えば、Mulliganら、Nature 277:108-114、1979);アデノウイルスのようなアデノウイルス科(例えば、Berknerら、Biotechniques 6:616-627、1988;Rosenfeldら、Science 252:431-434、1991);アデノ関連ウイルスのようなパルポウイルス科(例えば、Samulskiら、J.Vir. 63:3822-3828、1989;Mendelsonら、Virol.166:154-165、1988;PA 7/222,684);単純ヘルペスウイルスのようなヘルペスウイルス科(例えば、Kit,Adv.Exp.Med.Biol.215:219-236、1989);およびヘパドナウイルス科(例えば、HBV)、ならびにレトロウイルス科のようなDNA中間体を通して複製される特定のRNAウイルス(例えば米国特許第4,777,127号、GB 2,200,651、EP 0,345,242、およびWO91/02805;MoMLVのような白血病中のウイルスおよびHIVのような免疫不全症ウイルスを含むレトロウイルス科(例えば、Ponzansky、J.Viro 1.65:532-536、1991を参照のこと)。

同様に、広範な種々のベクター系は、真核生物重層ベクター開始系の第2の層として利用され得、例えば、以下の科のウイルス由来のベクター系を含む:ピコルナウイルス科(例えば、ポリオウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス)、カリチウイルス科、トガウイルス科(例えば、アルファウイルス、風疹)、フラビウイルス科(例えば、黄熱病、HCV)、コロナウイルス科(例えば、HCV、TGEV、IBV、MHV、BCV)、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レトロウイルス科(例えば、RSV、MoMLV、HIV、HTLV)、デルタ型肝炎ウイルス、およびアストロウイルス。さらに、非哺乳動物RNAウイルス(ならびにそれら由来の成分)もまた利用され得、それは、例えば、細菌およびバクテリオファージレプリカーゼ、ならびにポテックスウイルス(例えば、PVX)、カルラウイルス(例えば、PVM)、トブラウイルス(例えば、TRV、PEBV、PRV)、トパモウイルス(例えば、TMV、ToMV、PPMV)、ルテオウイルス(例えば、PLRV)、ポティウイルス(例えば、TEV、PPV、PVY)、トムブスウイルス(例えば、CyRSV)、ネポウイルス(例えば、GFLV)、プロモウイルス(例えば、BMV)、およびトパモウイルス(topamovirus)のような植物ウイルス由来の成分を含む。

真核生物ベクター開始系の第2の層に含まれる自己触媒ベクター構築物の複製能力は、例えば、ダクチノマイシンのような細胞RNA合成阻害剤の存在下で、トランスフェクトされた細胞中でのポジティブセンスRNAおよびネガティブセンスRNAの両方の増加を経時的に測定するリボヌクレアーゼ保護アッセイ、およびまたトランスフェクトされた細胞中のサブゲノムRNAの合成または異種レポーター遺伝子の発現を測定するアッセイを含む、当業者に公知の種々のアッセイで測定され得る。

本発明の特に好ましい実施態様において、インビボでcDNAからのアルファウイルスRNAの合成を開始し得る5'プロモーター(すなわち、RNA合成のDNAプロモーター)、続いてアルファウイルスRNAの転写を開始し得る5'配列、4つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質を作用可能にコードする核酸配列(組換えアルファウイルス粒子に作用可能に取り込まれた場合に、所望の表現型をもたらす上記の核酸分子を含む)、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、および転写終結/ポリアダニル化を制御する3'配列を含む真核生物重層ベクター開始系が提供される。さらに、発現されるべき異種配列に作用可能に連結されたウイルス連結領域が含まれ得る。種々の実施態様において、ウイルス連結領域は、不活化されるというよりむしろサブゲノムフラグメントのウイルス転写が増加または減少するように改変され得る。他の実施態様において、第2のウイルス接合領域は、第1の不活化ウイルス連結領域に続いて挿入され得、その第2のウイルス連結領域は、サブゲノムフラグメントのウイルス転写が増加または減少するように活性であるかまたは改変されているかのいずれかである。

真核生物重層ベクター開始系の転写に引き続いて、得られるアルファウイルスRNAベクターレプリコン分子は、アルファウイルスRNAの転写を開始し得る5'配列、生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、ウイルス連結領域、異種ヌクレオチド配列、アルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列、およびポリアデ

10

20

30

40

50

ニル化配列から構成される。

アルファウイルスcDNAベクター構築物の種々の局面が上記で議論されており、アルファウイルスの転写を開始し得る5'配列、アルファウイルス非構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列、ウイルス連結領域（サブゲノムフラグメントのウイルス転写を妨害するように不活化された連結領域を含む）、およびアルファウイルスRNAポリメラーゼ認識配列を含む。さらに、改変された連結領域および縦列連結領域もまた、上記で議論されている。

本発明の別の実施態様において、真核生物重層ベクター開始系は、特定の真核生物種、特に哺乳動物種（例えば、ヒト）由来の1つ以上の細胞株において複製するように適合されたアルファウイルスベクター（例えば、シンドビスベクター構築物）に由来する。例えば、発現されるべき組換えタンパク質をコードする遺伝子がヒト起源のものであり、そしてタンパク質がヒトの治療的使用を意図される場合、適切なヒト細胞株における産生は、そのタンパク質がヒトにおいて生じることが期待されるように、翻訳後に改変されるために好ましいかもしれない。このアプローチは、（以下でより詳細に議論するように）組換えタンパク質の産生をさらに増強する際に有用であり得る。ウイルスレプリカーゼの不正確さ（infidelity）に起因したアルファウイルスゲノムの全体的な可塑性を仮定すれば、選択された真核生物細胞（例えば、ヒト、マウス、イヌ、ネコなど）における高力価増殖性感染を確立する増強された能力を有する改変体株が単離され得る。さらに、真核生物細胞における高力価持続性感染を確立する増強された能力を有する改変体アルファウイルス株もまた、このアプローチを用いて単離され得る。次いで、アルファウイルス発現ベクターは、これらの改変体株のcDNAクローンから、本明細書中に提供される手順に従って構築され得る。

本発明の別の実施態様において、真核生物重層ベクター開始系は、分化した細胞型においてのみ転写時に活性がある、最初のアルファウイルスベクター転写のためのプロモーターを含む。簡略には、培養中の哺乳動物細胞（例えば、ハムスター（例えば、ベビーハムスター腎臓細胞）またはニワトリ（ニワトリ胚線維芽細胞）に由来する細胞）のアルファウイルス感染が、典型的には細胞傷害性を生じることが十分に確立されている。従って、安定的に形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞株を産生するために、真核生物重層ベクター開始系が宿主細胞中に導入され得る。ここで、最初のベクター増幅を可能にするプロモーターは転写時に不活性なプロモーターであるが、誘導性プロモーターである。特に好ましい実施態様において、このようなプロモーターは、分化状態依存性である。この構成において、プロモーターの活性化およびその後のアルファウイルスDNAベクターの活性化は、細胞分化の誘導と同時に起きる。このような安定に形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞株の特定の細胞数への増殖の際に、適切な分化刺激が提供され、それによりベクター構築物の転写、ならびに所望の遺伝子およびコードされるポリペプチド（単数または複数）の増幅された発現が開始される。多くのこのような分化状態依存性プロモーターは、特定の刺激の適用により分化するように誘導され得る細胞株と同様に当業者に公知である。代表例は、それぞれ、レチノイン酸、ウマ血清、およびDMSOにより活性化される、細胞株F9およびP19、HL60、ならびにフロイント赤白血病細胞株およびHELを含む。

好ましい実施態様において、このようなプロモーターは、2つの別々の成分により調節され得る。例えば、実施例7に記載のように、転写アクチベーターおよび翻訳リプレッサーの両方についての結合部位は、作動可能に依存した様式で「コア」プロモーターに隣接して位置する。この構成において、誘導されていない状態は、転写アクチベーターがその認識部位を見出す能力をブロックするが、転写リプレッサーが構成的に発現され、そしてその認識部位に結合することを可能にすることにより維持される。誘導は、転写リプレッサーをブロックし、そしてトランスアクチベーターブロックを除去することにより可能になる。例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター系（GossenおよびBujard, Proc. Natl. Acad. Sci. 89:5547-5551, 1992）は、アルファウイルスベクターRNAの誘導性転写のために利用され得る。この系において、テトラサイクリンリプレッサーおよびHSV-VP16トランスア

クチペータードメインの「融合」タンパク質 (rTA) としての発現は、最小「コア」プロモーター (例えば、CMV) にすぐ隣接して位置するテトラサイクリンオペレーター配列 (tetO) に特異的に結合することにより、アルファウイルスベクターRNAのインビボ転写を刺激する。結合およびトランス活性化事象は、テトラサイクリンの存在により可逆的にブロックされ、そして培養培地からテトラサイクリンを除去することにより「オン」にされ得る。転写の誘導されない基底レベルは、異なる細胞型の間で異なるので、他の異なる最小のコアプロモーター (例えば、HSV-tk) は、アルファウイルスベクターヌクレオチド1と並んでいるかまたはそのすぐ近くに位置することを可能にするためにテトラサイクリンオペレーター配列 (ただし、転写開始部位は公知である) に連結され得る。

rTAトランスアクチペーターは、同じ細胞株に安定に形質転換されてもいる、さらなる発現カセットにより提供され得る；そして特定の実施態様において、rTA発現カセットは、それ自身自己調節され得る。自己調節rTA発現カセットの使用は、rTAそれ自身が結合する同一のtetO連結プロモーターによって発現を転写制御とリンクさせることにより、rTAの構成的な高レベル発現に関連する潜在的な毒性の問題を回避する。この型の系は、テトラサイクリンの存在下ではrTAがほとんど生成されないことを保証するが、テトラサイクリンが除去された場合には高度に活性となるネガティブフィードバックサイクルを作製する。このような自己調節性rTA発現カセットは、プラスミドpTet-tTak (Shockettら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:6522-6526,1995) において提供される。

転写抑制のために、特定のジンクフィンガータンパク質のKRAB抑制ドメインもまた利用され得る。簡略には、KRAB

(Krüppel関連ボックス)

ドメインは、全ての

Krüppel

クラスのCys₂His₂ジンクフィンガータンパク質の1/3より多くのアミノ末端領域に存在する、高度に保存された配列である。このドメインは、2つの推定両親媒性 α -ヘリックスを含み、そしてDNA結合依存性RNAポリメラーゼII転写リプレッサーとして機能することが示されている (例えば、Lichtら, Nature 346:76-79,1990)。他の転写因子と同様に、活性な抑制ドメインおよびDNA結合ドメインは、別々でありそして分離し得る。従って、抑制ドメインは、融合タンパク質として、標的化のために任意の配列特異的なDNA結合タンパク質に結合され得る。従って、DNA結合タンパク質成分は、可逆的に、調節可能な様式で結合を妨げられ得、それにより転写サイレンシングを「オフ」にし得る。例えば、ヒトKox1 (Thiesen, New Biol. 2:363-374,1990) からのKRABドメインは、DNA結合ラクトース (lac) リプレッサータンパク質に融合されて、tet応答性プロモーターのすぐ近くに操作されたlacオペレーター配列への可逆的な配列特異的結合を有するハイブリッド転写サイレンサーを形成し得る。この構成において、lacリプレッサー/KRABドメイン融合物 (rKR) の構成的な発現は、lacオペレーター配列への結合および誘導されていないtet応答性プロモーターからの何らかの「漏出性の」基底転写の消去をもたらす。ベクター発現が所望され、そしてテトラサイクリンが系から除去される場合、IPTGが添加されてrKR媒介性転写サイレンシングを防ぐ。

さらに、他のジンクフィンガータンパク質からのKRABドメイン (例えば、ZNF133 (Tommerupら, Hum.Mol.Genet. 2:1571-1575,1993)、ZNF91 (Bellefroidら, EMBO J. 12:1363-1374,1993)、ZNF2 (Rosatiら, Nucleic Acids Res. 19:5661-5667,1991))、ならびに他の移入可能なリプレッサードメイン (例えば、Drosophila enまたはeve遺伝子 (JaynesおよびO'Farrell, EMBO J. 10:1427-1433,1991; HanおよびManley, Genes Dev. 7:491-503,1993)、ヒトジンクフィンガータンパク質YY1 (Shiら, Cell 67:377-388,1991)、ウィルムス腫瘍抑制タンパク質WT1 (Maddenら, Science 253:1550-1553,1991)、甲状腺ホルモンレセプター (Baniahmadら, EMBO J. 11:1015-1023,1992)、レチノイン酸レセプター (Baniahmadら, 同書)、Kid-1 (Witzgallら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:4514-4518,1994)) は、本明細書に提供される遺伝子送達ビヒクルにおいて同様に容易に使用され得る。さらに、本システムのlacリプレッサー/lacオペレーター成分は、他の供給源 (例えば、トリプト

10

20

30

40

50

ファンおよびマルトースオペロン、またはGAL4)に由来する任意の数の他の調節可能な系により置換され得る。

E. 組換えアルファウイルス粒子、ならびに「空の」トガウイルス粒子または非相同ウイルスRNAを含有するトガウイルス粒子の作製および使用

本発明の別の局面では、真核生物標的細胞に感染し得るRNAアルファウイルスベクターを含有する組換えアルファウイルス粒子の作製が記載される。簡略には、このような組換えアルファウイルス粒子は、一般に、本明細書中に記載されるような1つ以上のアルファウイルス構造タンパク質、脂質エンベロープ、およびRNAベクターレプリコンを含む。

組換えアルファウイルスベクター粒子の作製方法は、例えば、相補するベクターとインビトロで転写されたRNAに由来する欠陥ヘルパー (DH) 分子あるいはプラスミドDNAとの同時トランスフェクションにより、またはウイルスとの同時感染 (Xiongら, Science 243:1188-1191, 1989, Bredenbeekら, J. Virol. 67:6439-6446, 1993, Dubenskyら, J. Virol. 70:508-519, 1996およびDubenskyら, W/O 95/07994を参照のこと) により容易に達成され得る。

他の局面では、アルファウイルス由来パッケージング細胞株またはプロデューサー細胞株から組換えアルファウイルスベクター粒子を作製するための方法が提供される。簡略には、このようなPCLおよびそれらの安定に形質転換された構造タンパク質発現カセットは、W/O 95/07994に記載される方法を用いて、または本発明に記載される新規な方法を用いて誘導され得る。例えば、PCLによる組換えアルファウイルスベクター粒子の生成は、望ましい特性を有するアルファウイルスに基づくベクター粒子のPCLへの導入の後に達成され得る (実施例6を参照のこと)。このベクターは、インビトロで転写されたRNA、プラスミドDNA、または以前に得られた組換えアルファウイルス粒子に由来する。なおさらなる実施例において、アルファウイルスベクタープロデューサー細胞株からの組換え粒子の生成が記載される (実施例7を参照のこと)。

他の実施態様では、ゲノムRNAを含まない (すなわち、実質的にウイルスRNAを含まない) またはRNAベクターレプリコンを全く含まない、高力価の安定なトガウイルスキャプシド粒子を生成するための方法が提供される。本発明で利用されるように、ゲノムまたはRNAベクターレプリコン核酸が「実質的にない」とは、³⁵Sメチオニン対³Hウリジンのウイルス粒子への取り込みの、(野生型と比較して) 10:1より大きな、そして好ましくは15:1より大きな比をいうことが理解されるべきである (例えば、実施例8および図38を参照のこと)。例えば、1つの実施態様において、空のキャプシド粒子 (好ましくは脂質二重層および糖タンパク質相補体を有する) が、トガウイルス科から選択された病原性ウイルス (例えば、アルファウイルスまたはルビウイルス) から構築され、そして免疫原として使用されて野生型トガウイルスによる感染に対する防御免疫を確立する。空のウイルス粒子は、望ましい免疫原性代替物である。なぜなら、これらは、ウイルスを複製および生成することができないが、細胞性および体液性の両方の免疫応答を生じ得るからである。従って、実施例8により詳細に記載される方法を利用して、トガウイルスに由来する空のキャプシド粒子 (脂質二重層および糖タンパク質相補体を有するかまたは有さない) が、広範な種々のトガウイルスから作製され得る。このトガウイルスは、アルファウイルス (例えば、シンドビスウイルス (例えば、SIN-1または野生型シンドビスウイルス)、ヴェネズエラウマ脳炎ウイルス、ロスリバーウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、およびルビウイルス (例えば、風疹)) を含むがこれらに限定されない。

第2の実施態様において、ゲノムウイルスRNAに結合するペプチドをコードする異種ウイルスに由来する配列は、欠陥ヘルパー (DH) 発現カセット中に、アルファウイルスキャプシド遺伝子のアミノ末端領域で挿入され得る。この遺伝子は、相同アルファウイルスゲノムRNAに結合するタンパク質の領域をコードする配列が欠失している。例えば、BHK細胞は、アルファウイルスレプリコンRNA、相同なウイルスゲノムRNA結合ペプチドをコードする配列を含むDH RNA、および同じ異種ウイルス由来のレプリコンを用いてエレクトロポレーションされ得る。従って生成されるアルファウイルス粒子は、異種ウイルス由来のゲノムRNAを含み、そしてアルファウイルスの宿主域向性を有する。1つの可能な例として、レトロウイルスRNA結合に必要とされるタンパク質をコードするgag配列は、DH発現カセット

構築物内に含まれる。この構成において、得られるアルファウイルス粒子は、レトロウイルスベクターRNAを含む。

F. 異種配列

上記のように、本発明の遺伝子送達ビヒクルにより、広範な種々のヌクレオチド配列が担持および発現され得る。好ましくは、ヌクレオチド配列は、生存可能な(viable)ウイルスの生成を可能にするのに十分なサイズであるべきである。本発明の状況では、組換えアルファウイルス粒子による任意の測定可能な力価(例えば、プラークアッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、または β -ガラクトシダーゼアッセイによる)の感染性ウイルスの適切な感受性単層での生成またはRNAもしくはDNAベクターにより生成される異種遺伝子の検出可能なレベルの発現は、「生存可能なウイルスの生成」であると考えられる。これは最小の場合、さらなる異種配列を全く含有しないアルファウイルスベクター構築物であり得る。しかし他の実施態様において、ベクター構築物はさらなる異種配列または外来配列を含有し得る。好ましい実施態様において、異種配列は、少なくとも約100塩基、2 kb、3.5 kb、5 kb、7 kbの異種配列、または少なくとも約8 kbの異種配列さえも含み得る。

本明細書中に提供される開示が与えられれば当業者には明らかなように、組換えアルファウイルス粒子のパッケージング効率、従ってウイルス力価は、ある程度パッケージングされるべき配列のサイズに依存する。従ってパッケージングの効率および生存可能なウイルスの生成を増大させるために、さらなる非コード配列をベクター構築物に付け加え得る。さらに本発明の特定の実施態様において、ウイルスの力価を増加または減少させることが所望され得る。この増加または減少は異種配列のサイズ、従ってパッケージングの効率を増加または減少させることにより達成され得る。

上記で簡略に述べたように、本明細書中に記載される遺伝子送達ビヒクルには、例えばリンホカインまたはサイトカイン、トキシン、プロドラッグ変換酵素、免疫応答を刺激する抗原、リボザイム、増殖因子または調節因子のような治療的適用のためのタンパク質および免疫応答を補助または阻害するタンパク質のような緩和剤をコードする配列、ならびにアンチセンス配列(または「アンチセンス適用」のためのセンス配列)を含む広範な種々の異種配列が含まれ得る。さらに上記のように、本明細書中に提供される遺伝子送達ビヒクルは2つ以上の異種配列を含有(そして、特定の実施態様においては発現)し得る。

1. リンホカイン

本発明の1つの実施態様において、異種配列はリンホカインをコードする。簡略には、リンホカインは、免疫エフェクター細胞を増殖、活性化または分化するように作用する。リンホカインの代表例としては、 γ インターフェロン、腫瘍壊死因子、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、GM-CSF、CSF-1、およびG-CSFが挙げられる。

本発明の関連する実施態様において、異種配列は免疫制御性補助因子をコードする。簡略には、本発明の状況で利用される「免疫制御性補助因子」は、免疫応答に関与する1つ以上の細胞により産生される場合、または細胞に外から加えられる場合、その補助因子の非存在下で生じた免疫応答とは質または強さにおいて異なる免疫応答を引き起こす因子をいう。応答の質または強さは、当業者に公知の種々のアッセイにより測定し得、これには例えば、細胞の増殖を測定するインビトロアッセイ(例えば、 ^3H チミジンの取り込み)、およびインビトロ細胞傷害性アッセイ(例えば、 ^{51}Cr 放出を測定するもの)(Warnerら、AIDS Res. and Human Retroviruses 7:645-655,1991を参照のこと)がある。

免疫制御性補助因子の代表例は、 α インターフェロン(Finterら、Drugs 42(5):749-765,1991; 米国特許第4,892,743号; 米国特許第4,966,843号; WO 85/02862; Nagataら、Nature 284:316-320,1980; Famillettiら、Methods in Enz. 78:387-394,1981; Twuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2046-2050,1989; Faktorら、Oncogene 5:867-872,1990)、 β インターフェロン(Seifら、J. Virol. 65:664-671,1991)、 γ インターフェロン(Radfordら、American Society of Hapatology:2008-2015,1991; Watanabeら、PNAS 86:9456-9460,1989; Gansbacherら、Cancer Research 50:7820-7825,1990; Maioら、Can. Immunol. Immunother. 30:34-42,1989; 米国特許第4,762,791号および同第4,727,138号)、G-CS

F (米国特許第4,999,291号および同第4,810,643号)、GM-CSF (WO 85/04188)、TNF (Jayaramanら、J.Immunology 144:942-951,1990)、インターロイキン-2 (IL-2) (Karupiahら、J.Immunology 144:290-298,1990; Weberら、J.Exp.Med.166:1716-1733,1987; Gansbacherら、J.Exp.Med.172:1217-1224,1990; 米国特許第4,738,927号)、IL-4 (Tepperら、Cell 57:503-512,1989; Golumbekら、Science 254:713-716,1991; 米国特許第5,017,691号)、IL-6 (Brakenhofら、J.Immunol.139:4116-4121,1987; WO 90/06370)、IL-12、IL-15 (Grabsteinら、Science 264:965-968,1994; Genbank-EMBL登録番号 V03099)、ICAM-1 (Altmanら、Nature 338:512-514,1989)、ICAM-2、LFA-1、LFA-3、MHCクラス I 分子、MHCクラス II 分子、 β_2 -ミクログロブリン、シャペロン、CD3、B7/BB1、MHC結合トランスポータータンパク質またはこれらのアナログを含む。

アルファウイルスベクター構築物中にどの免疫制御性補助因子を含めるかの選択は、補助因子の公知の治療効果に基づき得るか、または実験的に決定され得る。例えば、慢性 B 型肝炎感染では、患者の免疫不全を補い、そしてそれゆえ、疾患からの回復を助けるのに、 α インターフェロンが有効であることが見出されている。あるいは適切な免疫制御性補助因子を実験的に決定し得る。簡略には、肝疾患の患者からまず血液サンプルを採取する。自己細胞または HLA 適合細胞 (例えば、EBV 形質転換細胞) でインビトロで末梢血リンパ球 (PBL) を再刺激し、そして肝炎抗原の免疫原性部分および免疫制御性補助因子の発現を指向するアルファウイルスベクター構築物で形質導入する。HLA 適合形質導入細胞を標的として用いて、刺激した PBL を CTL アッセイにおけるエフェクターとして使用する。HLA 適合刺激物質および抗原のみをコードするベクターで形質導入した標的細胞を用いて行った同じアッセイで見られる CTL 応答の増加は、有用な免疫制御性補助因子を示す。本発明の 1 つの実施態様において、免疫制御性補助因子である γ インターフェロンが特に好ましい。

免疫制御性補助因子の別の例は、B7/BB1 補助刺激因子である。簡略には、T 細胞の完全な機能活性の活性化には 2 つのシグナルが必要である。第 1 のシグナルは抗原特異的 T 細胞レセプターと主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) 分子に結合したペプチドとの相互作用により提供され、そして第 2 のシグナル (補助刺激と呼ぶ) は抗原提示細胞により T 細胞に送達される。第 2 のシグナルは T 細胞によるインターロイキン-2 (IL-2) 生成に必要であり、そして抗原提示細胞上の B7/BB1 分子と、T リンパ球上の CD28 および CTLA-4 レセプターとの相互作用に関与しているようである (Linsleyら、J.Exp.Med.173:721-730, 1991a、および J.Exp.Med.174:561-570,1991)。本発明の 1 つの実施態様において、B7/BB1 は $CD8^+$ T 細胞の補助刺激を起こすために腫瘍細胞に導入され得、その結果 $CD8^+$ T 細胞は拡張し十分活性化するために十分な IL-2 を生成する。これらの $CD8^+$ T 細胞は、さらなる CTL 機能のために補助刺激がもはや必要ではないため、B7 を発現していない腫瘍細胞を殺傷し得る。補助刺激性 B7/BB1 因子および例えば免疫原性 HBV コアタンパク質の両方を発現するベクターは、本明細書に記載した方法を利用して作製され得る。これらのベクターで形質導入された細胞は、より有効な抗原提示細胞となる。HBV コア特異的 CTL 応答は、補助刺激性リガンド B7/BB1 を介して、十分に活性化された $CD8^+$ T 細胞により増強される。

2. トキシン

本発明の別の実施態様において、異種配列はトキシンをコードする。簡略には、トキシンは細胞の増殖を直接阻害するように作用する。トキシンの代表例は、リシン (Lambら、Eur.J.Biochem.148:265-270,1985)、アブリン (Woodら、Eur.J.Biochem.198:723-732,1991; Evensenら、J.of Biol.Chem.266:6848-6852,1991; Collinsら、J.of Biol.Chem.265:8665-8669,1990; Chenら、Fed.of Eur.Biochem Soc.309:115-118,1992)、ジフテリアトキシン (Twetenら、J.Biol.Chem.260:10392-10394,1985)、コレラトキシン (Mekalanosら、Nature 306:551-557,1983; Sanchez および Holmgren, PNAS 86:481-485,1989) ゲロニン (gelonin) (Stirpeら、J.Biol.Chem.255:6947-6953,1980)、アメリカヤマゴボウ (Irvin, Pharmac. Ther. 21:371-387,1983)、抗ウイルスタンパク質 (Barbieriら、Biochem.J.203:55-59,1982; Irvinら、Arch.Biochem.& Biophys.200:418-425,1980; Irvin, Arch.Biochem.& Biophys.169:522-528,1975)、トリチン (trititin)、赤痢菌トキシン

(Calderwoodら、PNAS 84:4364-4368,1987; Jacksonら、Microb.Path.2:147-153,1987)、シュドモナス外毒素A (CarrollおよびCollier,J.Biol.Chem.262:8707-8711,1987)、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSVTK) (Fieldら、J.Gen.Virol.49:115-124,1980)、およびE.coli.グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼを含む。

3. プロドラッグ変換酵素

本発明の他の実施態様において、異種配列はプロドラッグ変換酵素をコードする。簡略には、本発明の状況で利用されるプロドラッグ変換酵素とは、ほとんどまたは全く細胞傷害性のない化合物を毒性産物（プロドラッグ）に活性化する遺伝子産物を意味する。このような遺伝子産物の代表例は、HSVTKおよびVZVTk（ならびにそれらのアナログおよび誘導体）を含み、これらは特定のプリンアラビノシドおよび置換ピリミジン化合物を選択的にモノリン酸化して、これらを細胞傷害性または細胞増殖抑制代謝物に変換する。さらに詳しくは、薬物であるガンシクロビル、アシクロビルまたはそれらの任意のアナログ（例えば、FIAU、FIAC、DHPG）のHSVTKへの曝露は、この薬物を対応する活性ヌクレオチド三リン酸形態にリン酸化する。

本発明の状況でまた使用され得る他のプロドラッグ変換酵素の代表例は：E.coliグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（これはチオキサンチンを毒性のあるチオキサンチン一リン酸に変換する）（Besnardら、Mol.Cell.Biol.7:4139-4141,1987）；アルカリホスファターゼ（これは不活性なリン酸化化合物（例えば、マイトマイシンリン酸およびドキソルビシンリン酸）を毒性の脱リン酸化化合物に変換する）；真菌性（例えば、Fusarium oxysporum）または細菌性のシトシンデアミナーゼ（これは5-フルオロシトシンを毒性の化合物5-フルオロウラシルに変換する）（Mullen,PNAS 89:33,1992）；カルボキシペプチダーゼG2（これはパラ-N-ビス（2-クロロエチル）アミノベンゾイルグルタミン酸からグルタミン酸を切断して、それにより毒性の安息香酸マスタードをつくり出す）；およびペニシリン-Vアミダーゼ（これはドキソルビシンおよびメルファランのフェノキシアセトアビド誘導体を毒性化合物に変換する）（一般的には、Vrudhulaら、J.of Med.Chem.36(7):919-923,1993; Kernら、Canc.Immun.Immunother.31(4):202-206,1990を参照のこと）を含む。

4. アンチセンス配列

本発明の別の実施態様において、異種配列はアンチセンス配列である。簡略には、アンチセンス配列はRNA転写産物に結合するように設計され、これにより特定のタンパク質の細胞性合成を防止するか、または細胞によるこのRNA配列の使用を防止する。このような配列の代表例は、アンチセンスチミジンキナーゼ、アンチセンスジヒドロ葉酸レダクターゼ（MaherおよびDolnick、Arch.Biochem.& Biophys.253:214-220,1987; Bzikら、PNAS 84:8360-8364,1987）、アンチセンスHER2（Coussensら、Science 230:1132-1139,1985）、アンチセンスABL（Fainsteinら、Oncogene 4:1477-1481,1989）、アンチセンスMyc（S tantonら、Nature 310:423-425,1984）およびアンチセンスras、ならびに任意の細胞周期シグナル伝達成分（例えば、サイクリン、サイクリン依存性キナーゼ、サイクリン依存性阻害剤）またはヌクレオチド生合成経路の任意の酵素をブロックするアンチセンス配列を含む。さらに本発明の他の実施態様において、インターフェロンおよび2ミクログロブリンに対するアンチセンス配列は、免疫応答を減少させるために利用され得る。

さらに、本発明のさらなる実施態様において、アンチセンスRNAは強力なクラスI制限応答を誘導するために抗腫瘍剤として利用され得る。簡略には、RNAへ結合すること、そしてこれにより特異的mRNAの翻訳を防止することに加え、高レベルの特異的アンチセンス配列が多量の2本鎖RNAの形成によりインターフェロン（ γ -インターフェロンを含む）の発現の増加を誘導すると考えられる。 γ -インターフェロンの発現の増加は、次いでMHCクラスI抗原の発現を増強する。これに関する使用に好ましいアンチセンス配列は、アクチンRNA、ミオシンRNA、およびヒストンRNAを含む。アクチンRNAとミスマッチを形成するアンチセンスRNAは特に好ましい。

5. リボザイム

本発明の他の局面において、宿主細胞の感染によりリボザイムを生成する遺伝子送達ビヒ

10

20

30

40

50

クルが提供される。簡略には、リボザイムは特異的RNAを切断するために使用され、そして1つの特異的RNA配列のみに作用し得るように設計される。一般的には、リボザイムの基質結合配列は10~20ヌクレオチド長である。この配列の長さは、標的RNAとハイブリダイズし、そして切断されたRNAからリボザイムを解離するのを可能にするのに十分である。

本発明の状況では、広範な種々のリボザイムが利用され得る。これらのリボザイムは、例えば、グループIイントロンリボザイム (Cechら, 米国特許第4,987,071号) ; ヘアピンリボザイム (Hampelら, Nucl.Acids Res.18:299-304,1990, 米国特許第5,254,678号および欧州特許公開第0 360 257) 、ハンマーヘッドリボザイム (Rossi,J.J.ら, Pharmac.Ther. 50:245-254,1991;ForsterおよびSymons,Cell 48:211-220,1987;HaseloffおよびGerlach,Nature 328:596-600,1988;WalbotおよびBruening,Nature 334:196,1988;HaseloffおよびGerlach,Nature 334:585,1988) 、デルタ型肝炎ウイルスリボザイム (PerrottaおよびBeen,Biochem.31:16,1992) ; RNase Pリボザイム (Takadaら, Cell 35:849,1983) ; ならびに他のタイプのリボザイム (例えば、WO 95/29241、およびWO 95/31551を参照のこと) を含む。リボザイムのさらなる例は、米国特許第5,116,742号、同第5,225,337号、および同第5,246,921号に記載されるものを含む。

6. タンパク質および他の細胞構成成分

本発明の他の局面において、広範な種々のタンパク質または他の細胞構成成分が本明細書中に提供される遺伝子送達ビヒクルに担持および／または発現され得る。このようなタンパク質の代表例は、例えばウイルス、細菌、寄生体、または真菌中に見いだされる、天然のまたは改変された細胞成分、ならびに外来タンパク質または細胞構成成分を含む。

a. 改変された細胞成分

1つの実施態様において、免疫原性で非ガン原性の、改変された細胞成分の発現を指向する遺伝子送達ビヒクルが提供される (例えば、WO 93/10814を参照のこと) 。本明細書において利用される場合、用語「免疫原性」とは、適切な条件下で免疫応答を引き起こし得る改変された細胞成分をいう。この応答は細胞媒介性でなければならず、そして体液性応答もまた含み得る。用語「非ガン原性」とは、ヌードマウスにおいて細胞形質転換を引き起こさないかまたはガン形成を誘導しない、改変された細胞成分をいう。用語「改変された細胞成分」とは、細胞をガン原性に関与することに必要でも必須でもないタンパク質および他の細胞構成成分をいう。

簡略には、改変の前に、細胞成分は、正常な細胞の増殖および調節に必須であり得、そして、例えば、細胞内タンパク質分解、転写調節、細胞周期の制御、および細胞-細胞相互作用を調節するタンパク質を含む。改変後には細胞成分はもはやそれらの調節機能を果たさず、従って細胞は調節されない増殖を経験し得る。改変された細胞成分の代表例は、ras*, p53*, Rb*, ウィルムス腫瘍遺伝子 (Wilms' tumor gene) によりコードされる改変されたタンパク質、ユビキチン*, ムチン*, DCC, APC、およびMCC遺伝子によりコードされるタンパク質、乳ガン遺伝子BRCA1*, ならびにレセプターまたはレセプター様構造 (例えば、neu、甲状腺ホルモンレセプター、血小板由来増殖因子 (PDGF) レセプター、インスリンレセプター、上皮増殖因子 (EGF) レセプター、およびコロニー刺激因子 (CSF) レセプター) を含む。

改変された細胞成分をコードする配列がいったん得られたら、この配列が非ガン原性タンパク質をコードすることを確実にすることが必要である。特定の細胞成分のガン原性を評価する種々のアッセイが公知であり、そして容易に達成され得る。代表的アッセイには、ラット線維芽細胞アッセイ、ヌードマウスまたはラットにおける腫瘍形成、軟寒天中のコロニー形成、およびトランスジェニック動物 (例えばトランスジェニックマウス) の調製が含まれる。

ヌードマウスまたはラットにおける腫瘍形成は、特定の細胞成分のガン原性を決定するのに特に重要でかつ高感度な方法である。ヌードマウスは機能的な細胞免疫系が欠如しており (すなわち、CTLを有さない) 、従って細胞のガン原性の可能性を試験するのに有用な

10

20

30

40

50

インビボのモデルを提供する。正常な非ガン原性細胞は、ヌードマウス中に感染させた場合に制御されない増殖特性を示さない。しかし形質転換した細胞はヌードマウス中で急速に増殖し、そして腫瘍を発生させる。簡略には、1つの実施態様において、アルファウイルスベクター構築物は同系のマウスの細胞に投与され、次にヌードマウスに注射される。腫瘍の増殖を決定するために注射後2～8週間の間、マウスを肉眼で観察する。また腫瘍が存在するか否かを決定するために、マウスを屠殺し剖検し得る（Giovanelloら、J.Natl.Cancer Inst.48:1531-1533,1972; Fureszら、Abnormal Cells,New Products and Risk, HoppsおよびPetricciani編、Tissue Culture Association,1985; およびLevenbookら、J. Biol.Std.13:135-141,1985）。

ガン原性はまた軟寒天中のコロニー形成を目視することによっても評価され得る（MacphersonおよびMontagnier,Virol.23:291-294,1964）。簡略には、正常な非ガン原性細胞の1つの性質は「接触阻害」である（すなわち、細胞は隣接する細胞に接触するとその増殖を止める）。細胞を半固体寒天支持培地中にプレーティングすると、正常な細胞はすぐ接触阻害を受けて増殖を止めるが、ガン原性細胞は増殖し続けて軟寒天中でコロニーを形成する。

改変された細胞成分が細胞をガン原性に関係しているならば、改変された細胞成分を非ガン原性にする必要がある。例えば1つの実施態様において、改変された細胞成分をコードする目的の配列または遺伝子は、遺伝子産物を非ガン原性にするために端が切り取られる。改変された細胞成分をコードする遺伝子は種々のサイズに切り取られ得るが、改変された細胞成分をできるだけ多く保持することが好ましい。さらに切り取りが行われても、改変された細胞成分の免疫原性配列の少なくともいくつかは無傷であることが必要である。あるいは複数の翻訳終結コドンが免疫原性領域の下流に導入され得る。終結コドンの挿入によりタンパク質発現が早期に終結され、こうしてタンパク質の形質転換部分の発現を防止する。

上記のように、適切な免疫応答を発生させるために、変化した細胞成分はまた免疫原性でなければならない。T細胞のエピトープはしばしば免疫原性で両親媒性の α -ヘリックス成分を有するが、特定の配列の免疫原性はしばしば予測することが難しい。しかし、一般に、免疫原性はアッセイにより決めることが好ましい。代表的なアッセイは、新規に導入したベクターに対する抗体の存在を検出するELISA、ならびに γ インターフェロンアッセイ、IL-2生成アッセイ、および増殖アッセイのようにTヘルパー細胞を試験するアッセイを含む。

上記のように、本発明の別の局面において、一般的な抗ガン治療物を形成するために、いくつかの異なる改変された細胞成分が同時発現され得る。一般に、種々の組合せがなされ得ることは当業者には明らかである。好適な実施態様では、この治療物は特定のタイプのガンを標的とし得る。例えば、ほとんどすべての大腸ガンは、ras、p53、DCC、APCまたはMcc遺伝子に変異を有する。これらの多数の改変された細胞成分を同時発現するアルファウイルスベクター構築物が、すべての可能な変異を処置するために大腸ガン患者に投与され得る。この方法はまた、他のガンを処置するためにも利用され得る。従って、ムチン^{*}、ras^{*}、neu、BRCA1^{*}、およびp53^{*}を同時発現するアルファウイルスベクター構築物は、乳ガンを処置するために利用され得る。

b. 外来生物または他の病原性物質からの抗原

本発明の他の局面において、外来生物または他の病原性物質からの抗原の免疫原性部分の発現を指向するベクターが提供される。このような抗原の代表例は、細菌性抗原（例えば、E.coli、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、マイコバクテリウムなど）、真菌性抗原、寄生体抗原、およびウイルス抗原（例えば、インフルエンザウイルス、ネコ白血病ウイルス（「FeLV」）、ネコ免疫不全症ウイルス（「FIV」）またはヒト免疫不全症ウイルス（「HIV」）のような免疫不全症ウイルス、A型、B型、およびC型肝炎ウイルス（それぞれ、「HAV」、「HBV」、および「HCV」）、ヒトパピローマウイルス（「HPV」）、エプスタインバーウイルス（「EBV」）、単純ヘルペスウイルス（「HSV」）、ハンタウイルス、TTLV I、HTLVIIおよびサイトメガロウイルス（「CMV」）を含む。本発明の状況

10

20

30

40

50

で利用される場合、「免疫原性部分」とは、適切な条件下で免疫応答（すなわち、細胞性または体液性）を引き起こし得る各抗原の部分という。「部分」とは種々のサイズであり得るが、好ましくは少なくとも9アミノ酸の長さであり、そして抗原全体を含み得る。細胞媒介性免疫応答は、主要組織適合性遺伝子複合体（「MHC」）クラスIの提示、MHCクラスIIの提示、またはその両方を介して媒介され得る。

本発明の1つの局面において、B型肝炎抗原の免疫原性部分（例えば、WO 93/15207を参照のこと）の発現を指向するアルファウイルスベクター構築物が提供される。簡略にはB型肝炎のゲノムは、約3.2キロベースの長さの環状DNAで構成され、そしてよく特徴付けられている（Tiollaisら、Science 213: 406-411, 1981; Tiollaisら、Nature 317: 489-495, 1985; およびGanemおよびVarmus、Ann.Rev.Biochem.56: 651-693, 1987; EP 0 278,940、EP 0 241,021、WO 88/10301、ならびに米国特許第4,696,898号および同第5,024,938号も参照のこと、これらは参考として本明細書中に援用される）。B型肝炎ウイルスは数個の異なる抗原を示し、これらは特に、3つのHB「S」抗原（HBsAg）（HBc抗原（HBcAg）、HBe抗原（HBeAg）、およびHBx抗原（HBxAg））を含む（Blumら、TIG 5（5）: 154-158, 1989を参照のこと）。簡略には、HBeAgはP22プレコア中間体のタンパク質分解切断により得られ、そして細胞から分泌される。HBeAgは血清中に17kDタンパク質として見出される。HBcAgは183アミノ酸のタンパク質であり、HBxAgはサブタイプにより異なるが、145~154アミノ酸のタンパク質である。

HBsAg（「大」、「中」、および「小」と呼ぶ）はB型肝炎ウイルスゲノムの3つの領域によりコードされる：S、プレ-S2およびプレ-S1。389~400アミノ酸の様々な長さを有する大タンパク質はプレ-S1、プレ-S2、およびS領域によりコードされ、そしてグリコシル化および非グリコシル化形態で見いだされる。中タンパク質は281アミノ酸の長さであり、そしてプレ-S2およびS領域によりコードされる。小タンパク質は226アミノ酸の長さであり、そしてS領域によりコードされる。これは2つの形態（グリコシル化（GP27^S）および非グリコシル化（P24^S））で存在する。これらのそれぞれの領域が別々に発現されると、プレ-S1領域は約119アミノ酸のタンパク質をコードし、プレ-S2領域は約55アミノ酸のタンパク質をコードし、そしてS領域は約226アミノ酸のタンパク質をコードする。

当業者には明らかなように、本明細書中に記載のアルファウイルスベクター構築物の1つにより投与された場合に免疫応答を誘導するために、上記のS抗原の種々の免疫原性部分を組合せ得る。さらに、HBVのSオープンリーディングフレームについて様々な地域で見いだされる大きな免疫学的多様性のために、特定の地域での投与のために特定の組合せの抗原が好適であり得る。

HBVにより示されるものはまた、pol（「HBV pol」）、ORF5、およびORF6抗原である。簡略には、HBVのポリメラーゼオープンリーディングフレームは、感染した肝臓のビリオンおよびコア様粒子に見いだされる逆転写酵素活性をコードする。ポリメラーゼタンパク質は少なくとも2つのドメインよりなる：逆転写を開始するタンパク質をコードするアミノ末端ドメイン、ならびに逆転写酵素およびRNase H活性をコードするカルボキシル末端ドメイン。HBV polの免疫原性部分は、本明細書に記載の方法を利用して、下記のアルファウイルスベクター構築物を利用して決定され得、そして温血動物中に免疫応答を発生させるために投与され得る。同様にORF5およびORF6（Millerら、Hepatology 9: 322-327, 1989）のような他のHBV抗原が、本明細書に記載のようなアルファウイルスベクター構築物を利用して発現され得る。

上記のように、B型肝炎抗原の少なくとも1つの免疫原性部分が、遺伝子送達ビヒクル中に取り込まれる。遺伝子送達ビヒクルに取り込まれる免疫原性部分（単数または複数）は種々の長さであり得るが、一般的にはこの部分は少なくとも9アミノ酸の長さであることが好ましく、そして抗原全体を含み得る。特定の配列の免疫原性を予測することはしばしば困難であるが、T細胞のエピトープは、潜在的なTヘルパー部位およびCTL部位のコード領域をスキャンするために、TSITES（MedImmune、Maryland）のようなコンピューターアルゴリズムを利用して予測され得る。この解析から、ペプチドが合成され、そしてイン

10

20

30

40

50

ビトロの細胞傷害性アッセイで標的として使用される。しかし、他のアッセイもまた利用され得、例えば、新規に導入したベクターに対する抗体の存在を検出するELISA、ならびに γ インターフェロンアッセイ、IL-2生成アッセイ、および増殖アッセイのようなTヘルパー細胞を試験するアッセイを含む。

免疫原性部分はまた他の方法により選択され得る。例えば、HLA A2.1トランスジェニックマウスは、ウイルス抗原のヒトT細胞認識のモデルとして有用であることが示されている。簡略にはインフルエンザウイルス系およびB型肝炎ウイルス系では、マウスのT細胞レセプターレパートリーがヒトT細胞により認識される抗原決定基と同じものを認識する。両方の系において、HLA A2.1トランスジェニックマウスにおいて生じるCTL応答は、ヒトCTLのHLA A2.1ハプロタイプにより認識されるエピトープと事実上同じエピトープを指向する (Vitielloら、J.Exp.Med.173:1007-1015,1991; Vitielloら、Abstract of Molecular Biology of Hepatitis B Virus Symposia,1992)。アルファウイルスベクター構築物への組み込みに特に好ましい免疫原性部分はHBcAg、HBsAg、およびHBxAgを含む。B型肝炎ウイルスのさらなる免疫原性部分は、コード配列を種々の位置 (例えば、以下の部位を含む: Bst UI、Ssp I、PpuMI、およびMsp I) で切り取ることにより得られ得る (Valenzuelaら、Nature 280:815-19,1979; Valenzuelaら、Animal Virus Genetics: ICN/UCLA Symp.Mol.Cell Biol.,1980,B.N.FieldsおよびR.Jaenisch (編)、57~70頁,New York: Academic)。

上記のように、遺伝子送達ビヒクルには1つより多くの免疫原性部分が組み込まれ得る。例えば、遺伝子送達ビヒクルは、HBcAg、HBsAg、HBxAgのすべてまたは免疫原性部分、ならびにHCV抗原の免疫原性部分を (別々に、または1つの構築物として) 発現し得る。

7. 異種配列の供給源

上記のタンパク質をコードする配列は、種々の供給源 (例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC、Rockville, MD) のような寄託機関、またはBritish Bio-Technology Limited (Cowley, Oxford, England) のような商業的供給源を含む) から容易に得られ得る。代表例は、BBG12 (127アミノ酸の成熟タンパク質をコードするGM-CSF遺伝子を含む) ; BBG6 (γ インターフェロンをコードする配列を含む) ; ATCC No.39656 (TNFをコードする配列を含む) ; ATCC No.20663 (α インターフェロンをコードする配列を含む) ; ATCC No.31902およびNo.39517 (β インターフェロンをコードする配列を含む) ; ATCC No.67024 (インターロイキン-1bをコードする配列を含む) ; ATCC No.39405、No.39452、No.39516、No.39626、およびNo.39673 (インターロイキン-2をコードする配列を含む) ; ATCC No.59399、No.59398、およびNo.67326 (インターロイキン-3をコードする配列を含む) ; ATCC No.57592 (インターロイキン-4をコードする配列を含む) ; ATCC No.59394およびNo.59395 (インターロイキン-5をコードする配列を含む) ; ならびにATCC No.67153 (インターロイキン-6をコードする配列を含む) を含む。

上記のような改変された細胞成分をコードする配列は、種々の供給源から容易に得られ得る。例えば、改変された細胞産物をコードする配列を含むプラスミドは、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC、Rockville, MD) のような寄託機関、またはAdvanced Biotechnologies (Columbia, Maryland) のような商業的供給源から得られ得る。上記の配列のいくつかを含むプラスミドの代表例は、ATCC No.41000 (rasの12番目のコドンにGからTへの変異を含む)、およびATCC No.41049 (12番目のコドンにGからAへの変異を含む) を含む。

あるいは、正常な細胞成分をコードするプラスミドはまた、ATCCのような寄託機関から得られ得 (例えば、ATCC No.41001 (正常なrasタンパク質をコードする配列を含む) ; ATCC No.57103 (ablをコードする) ; およびATCC No.59120またはNo.59121 (bcr遺伝子座をコードする) を参照のこと)、そして改変された細胞成分を形成するために変異され得る。特定の部位を変異誘発する方法は、当該分野で公知の方法 (例えば、Sambrookら、前出、15.3以下を参照のこと) を用いて容易に達成され得る。特に、rasのような正常な細胞成

分の点変異は、特定のコドン（例えば、コドン12、13、または61）の部位特異的変異誘発により容易に達成され得る。

上記のウイルス抗原をコードする配列も同様に種々の供給源から得られ得る。例えば、B型肝炎ウイルスをコードする分子的にクローン化したゲノムは、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC、Rockville、MD）のような供給源から得られ得る。例えば、ATCC No.45020は、pBR322（Moriartyら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2606-2610,1981）のBamH I 部位にB型肝炎の全ゲノムDNA（精製したDane粒子から抽出された）（Blumら、TIG 5（5）:154-158,1989の図3を参照のこと）を含む。

あるいは、上記の異種配列をコードするcDNA配列は、配列を発現または含有する細胞から得られ得る。簡略には、1つの実施態様において、目的の遺伝子を発現する細胞由来のmRNAは、オリゴヌクレオチドdTまたはランダムプライマーを用いて逆転写酵素により逆転写される。次いでこの1本鎖cDNAを、所望の配列のいずれかの側の配列に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを利用してPCR（米国特許第4,683,202号；同第4,683,195号および同第4,800,159号を参照のこと。PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich（編）、Stockton Press, 1989も参照のこと）により増幅し得る。特に、2本鎖DNAは、熱安定性Taqポリメラーゼ、配列特異的DNAプライマー、dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPの存在下で加熱することにより変性される。合成が完了すると2本鎖DNAが生成される。このサイクルは何回も繰り返し得、所望のDNAの何乗倍もの増幅がもたらされる。

上記のタンパク質をコードする配列はまた、例えばApplied Biosystems Inc.のDNA合成機（例えば、APB DNA合成機モデル392（Foster City、CA））で合成され得る。

G. アルファウイルスパッケージング細胞株／プロデューサー細胞株

本発明のさらなる局面では、アルファウイルスパッケージング細胞株およびプロデューサー細胞株が提供される。詳細には、本発明の1つの局面において、アルファウイルスパッケージング細胞株を提供する。ここで、ウイルス構造タンパク質は1つ以上の安定に形質転換された発現ベクターからトランスで供給され、そしてトランスフェクトされ、形質導入され、または細胞内に生成されたベクターRNA転写産物を細胞質においてキャプシド化し得、そして細胞膜を通して感染性パッケージ化ベクター粒子を放出し得る。好ましい実施態様において、パッケージングに必要な構造タンパク質は、RNAベクターレプリコン自身または提供される他の何らかの刺激により誘導された後にのみ高レベルで合成され、そしてこれらの構造タンパク質をコードする転写産物は、天然のウイルス感染の発現レベルを模倣するに十分な発現レベルを可能にする様式で細胞質で増幅し得る。さらに、他の実施態様において、選択マーカーの発現は、構造タンパク質発現カセットに作動可能に連結される。このような連結された選択マーカーは、機能的で安定に形質転換されたPCLの効率的な生成を可能にする。

例えば、パッケージングされる所望の表現型のアルファウイルスRNAベクターレプリコン分子は、それ自身細胞の細胞質において自己触媒複製し得、インビトロ転写されたRNA、組換えアルファウイルス粒子、またはアルファウイルスcDNAベクター構築物としてパッケージング細胞中に導入され得る。次いで、RNAベクター転写産物は、高レベルまで複製して、構造タンパク質遺伝子転写産物（単数または複数）の増幅およびその後のタンパク質発現を刺激し、続いてウイルス構造タンパク質によりパッケージングされて感染性ベクター粒子を生じる。特定のレベルより上のレベルのアルファウイルスタンパク質および／またはベクターRNAの細胞内発現は、パッケージング細胞株またはプロデューサー細胞株において細胞傷害効果をもたらし得る。従って、本発明の特定の実施態様では、これらのエレメントが、それらの発現される構造タンパク質の細胞傷害性の減少、宿主巨大分子合成の減少した阻害、および／または存続した感染を確立する能力について選択されるウイルス改変体に由来することが、望ましいとされ得る。

ベクターパッケージング細胞株の能力および最終ベクター力価を最適化するために、遺伝子移入およびベクターパッケージングの連続的なサイクルを実行し得る。例えば、パッケージング細胞株のベクタートランスフェクションに由来する感染性のパッケージングされ

たベクター粒子を含む上清を用いて、新鮮な単層のアルファウイルスパッケージング細胞を感染または「形質導入」し得る。パッケージングされたベクター粒子および新鮮なパッケージング細胞での連続的な形質導入は、核酸トランスフェクションよりも好ましいとされ得る。なぜなら、これは、細胞へのそのより高いRNA移入効率は、細胞におけるベクターの生物学的置換の最適化、および増大する多数のパッケージング細胞からのベクター生成のためにプロセスを「スケールアップ」する能力のためである。これは、より高い発現およびより高い力価のパッケージングされた感染性組換えアルファウイルスベクターをもたらす。

本発明の他の局面では、安定に組み込まれたかまたはエピソームに維持されたDNA発現ベクターを用いて、アルファウイルスベクターRNA分子を細胞中で生成させ得る。簡略には、このようなDNA発現ベクターは、好ましい実施態様において、アルファウイルスベクターRNAの転写が、細胞が所望の密度まで増殖したときにのみ生じ、その後誘導されるように、誘導性であるように構成され得る。一旦転写されると、アルファウイルスベクターは、自己触媒的に自己複製する能力を維持し、そしてパッケージングされたベクター粒子生成における最高点に達する事象のカスケードを誘発する。このアプローチは、延長された培養期間にわたる連続したベクター発現を可能にする。なぜなら、組み込まれたDNAベクター発現系は、薬物または他の選択マーカーを通して維持され、そしてDNA系は、一旦誘導されると、欠陥RNAコピーにより希釈され得ない改変されていないRNAベクターレプリコンを構成的に発現するからである。大規模で高力価のパッケージングされたアルファウイルスベクターの生成は、このアルファウイルス「プロデューサー細胞株」の構成において可能であり、DNAに基づくアルファウイルスベクターは、最初にパッケージング細胞株にトランスフェクションにより導入される。なぜなら、サイズ制限は、形質導入のためのウイルスベクター粒子中への発現ベクターのパッケージングを防ぎ得るからである。

H. 薬学的組成物

上記のように、本発明はまた、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤と組み合わせた、本明細書中に記載の遺伝子送達ビヒクルを含む薬学的組成物を提供する。例えば、1つの実施態様では、本発明のRNAまたはDNAベクター構築物は、長期間の保存および輸送のために凍結乾燥され得、そして種々の物質を用いて投与の前に再構成され得るが、好ましくは水を用いて再構成される。特定の例において、最終製剤を等張にする希釈塩溶液もまた使用され得る。さらに、再構成された核酸調製物の活性または物理的保護を増強する成分を含む水溶液を使用することも有利であり得る。このような成分は、サイトカイン（例えば、IL-2）、ポリカチオン（例えば、硫酸プロタミン）、脂質製剤、または他の成分を含む。凍結乾燥または脱水された組換えベクターは、任意の便利な容量の水または、凍結乾燥または脱水されたサンプルの実質的な、そして好ましくは完全な可溶化を可能にする、上記の再構成物質により再構成され得る。

組換えアルファウイルス粒子または感染性組換えウイルス（以下で両方をウイルスという）は、粗製形態または精製形態のいずれかで保存され得る。ウイルスを粗製形態で生成するためには、増殖性細胞は、バイオリアクターまたはフラットストック培養において最初に培養され得、ここで、ウイルス粒子は細胞から培養培地中に放出される。次いで、ウイルスは、最初に十分な量の処方緩衝液を組換えウイルスを含む培養培地中に添加して水性懸濁液を形成することにより、粗製形態で保存され得る。特定の実施態様では、処方緩衝液は、糖、高分子量構造添加物、および緩衝化成分を水中に含む水溶液である。水溶液はまた、1つ以上のアミノ酸を含み得る。

組換えウイルスはまた、精製形態で保存され得る。より詳細には、処方緩衝液の添加前に、上記の粗製組換えウイルスをフィルターに通すことにより澄清化し、次いで、例えば、向流濃縮システム（Filtron Technology Corp., Northborough, MA）により濃縮し得る。

1つの実施態様では、DNaseを濃縮物に加えて、外来DNAを消化する。次いで、過剰の培地成分を除去し、消化物をダイアフィルトレートして、より望ましい緩衝化溶液中に組換えウイルスを樹立させる。次いで、ダイアフィルトレートした物をSephadex S-500ゲルカラムに通し、そして精製組換えウイルスを溶出させる。次に所望の最終成分濃度を得、そし

て組換えウイルスを最小限で希釈するためにこの溶出液に十分量の処方緩衝液を加える。次いで、水性懸濁液を、好ましくは -70°C で保存し得るか、または直ちに乾燥し得る。上記のように、処方緩衝液は、糖、高分子量構造添加物、および緩衝化成分を水中に含む水溶液であり得る。この水溶液はまた、1つ以上のアミノ酸を含み得る。

粗製組換えウイルスはまた、イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製され得る。簡略には、粗製組換えウイルスをまずフィルターに通すことにより澄清化し、次に濾液を高度にスルホン酸化されたセルロースマトリックスを含有するカラムにのせ得る。次いで、高塩緩衝液を用いることにより組換えウイルスを精製形態でカラムから溶出させ、そして溶出液を分子排除カラムに通すことにより、高塩緩衝液をより所望される緩衝液に交換し得る。次いで、上記のように、精製組換えウイルスに十分量の処方緩衝液を加え、そして水性懸濁液を、直ちに乾燥させるかまたは好ましくは -70°C で保存するかのいずれかである。

粗製形態または精製形態の水性懸濁液は、凍結乾燥または雰囲気温度での蒸発により乾燥され得る。簡略には、凍結乾燥は、水性懸濁液をガス転移温度より低くまたは水性懸濁液の共晶点温度より低くに冷却する工程、および昇華により冷却した懸濁液から水分を除去して凍結乾燥ウイルスを形成する工程を含む。1つの実施態様では、処方された組換えウイルスのアリコート凍結乾燥機 (Supermodulyo 12K) に取り付けられた Edwards Refrigerated Chamber (3 shelf RC3S unit) に入れる。Phillipsら (Cryobiology, 18:414, 1981) に記載されるような多段階凍結乾燥手順を用いて、処方された組換えウイルスを、好ましくは -40°C 〜 -45°C の温度で凍結乾燥する。得られる組成物は、凍結乾燥ウイルスの10重量%未満の水を含む。以下により詳細に議論されるように、一旦凍結乾燥されると、組換えウイルスは安定であり、そして -20°C 〜 25°C で保存され得る。

蒸発法では、水分は雰囲気温度で蒸発により水性懸濁液から除去される。1つの実施態様において、水分は噴霧乾燥により除去される (EP 520,748)。噴霧乾燥プロセスでは、水性懸濁液は予め加熱された気体流 (通常は空気) の中に送達され、この際懸濁液の液滴から水分は急速に蒸発する。噴霧乾燥装置は、多くの製造業者から入手可能である (例えば、Drytec Ltd., Tonbridge, England; Lab-Plant, Ltd., Huddersfield, England)。一旦脱水されると、組換えウイルスは安定であり、そして、 -20°C 〜 25°C で保存され得る。本明細書に記載した方法では、乾燥または凍結乾燥ウイルスの得られる水分含量は、カールーフィッシャー装置 (EM, Science Aquastar 'VIB容積滴定機, Cherry Hill, NJ)、または重量法の使用により測定され得る。

上記のように、処方に使用される水溶液は、好ましくは、糖、高分子量構造添加物、および緩衝化成分および水から構成される。この溶液はまた、1つ以上のアミノ酸を含み得る。これらの成分の組合せは、凍結および凍結乾燥または蒸発による乾燥に際して組換えウイルスの活性を保護するように作用する。利用され得る糖の1つはラクトースであるが、他の糖 (例えば、スクロース、マンニトール、グルコース、トレハロース、イノシトール、フルクトース、マルトースまたはガラクトースを含む) も同様に利用され得る。さらに、糖の組合せ (例えば、ラクトースとマンニトール、またはスクロースとマンニトール) が使用され得る。特に好ましいラクトースの濃度は3重量%〜4重量%である。好ましくは、糖の濃度は、1重量%〜12重量%の範囲にわたる。

高分子量構造添加物は、凍結の間のウイルスの凝集の防止を助け、凍結乾燥または乾燥状態での構造的サポートを提供する。本発明の状況において、構造添加物は、これらが5000m.w.より大きい場合は「高分子量」であると考えられる。好ましい高分子量構造添加物は、ヒト血清アルブミンである。しかし、他の物質 (例えば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、デキストラン、セルロース、ゼラチン、またはポビドン) もまた使用し得る。ヒト血清アルブミンの特に好ましい濃度は、0.1重量%である。好ましくは、高分子量構造添加物の濃度は、0.1重量%〜10重量%の範囲である。

アミノ酸は (存在する場合は)、水性懸濁液の冷却および融解に際して、ウイルス感染性をさらに保護するように機能する。さらに、アミノ酸は、冷却された水性懸濁液の昇華の間および凍結乾燥状態にある間にウイルスの感染性をさらに保護するように機能する。好

10

20

30

40

50

ましいアミノ酸はアルギニンであるが、他のアミノ酸（例えば、リジン、オルニチン、セリン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸またはアスパラギン酸）もまた使用し得る。特に好ましいアルギニン濃度は、0.1重量%である。好ましくは、アミノ酸濃度は、0.1重量%～10重量%の範囲である。

緩衝化成分は、比較的一定のpHを維持することにより、溶液を緩衝化するように作用する。所望のpHの範囲（好ましくは7.0と7.8との間）に応じて種々の緩衝液が使用され得る。適切な緩衝液には、リン酸緩衝液およびクエン酸緩衝液が含まれる。組換えウイルス製剤の特に好ましいpHは7.4であり、そして好ましい緩衝液はトロメタミンである。

さらに、水溶液が、最終的に処方された組換えアルファウイルスを適切な等浸透圧塩濃度に調整するために使用される中性の塩を含有することが好ましい。適切な中性の塩には、塩化ナトリウム、塩化カリウムまたは塩化マグネシウムが含まれる。好ましい塩は塩化ナトリウムである。

上記の、所望の濃度の成分を含有する水溶液は、濃縮されたストック溶液として調製され得る。

本明細書中に提供される開示を考慮すれば、凍結乾燥ウイルスを室温で保存することを意図する場合は、水溶液中に特定の糖を利用することが好ましいとされ得ることが当業者には明らかである。より詳細には、特に室温での保存には、二糖（例えば、ラクトースまたはトレハロース）を利用することが好ましい。

本発明の凍結乾燥または脱水されたウイルスは、種々の物質を用いて再構成され得るが、好ましくは水を使用して再構成される。特定の場合には、最終製剤を等張にする希塩溶液もまた使用され得る。さらに、再構成されたウイルスの活性を増強することが公知の成分を含有する水溶液を使用することが有利であり得る。このような成分には、サイトカイン（例えば、IL-2）、ポリカチオン（例えば、硫酸プロタミン）または再構成されたウイルスの形質導入効率を増強する他の成分が含まれる。凍結乾燥または脱水された組換えウイルスは、任意の便利な容量の水、または凍結乾燥または脱水されたサンプルの実質的な、そして好ましくは完全な可溶化を可能にする上記の再構成物質により再構成され得る。

I. 遺伝子送達ビヒクルを利用するための方法

上記のように、本発明はまた、選択された異種配列を脊椎動物（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）または他の温血動物（例えば、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラット、またはマウス））または昆虫に送達するための方法を提供する。この方法は、脊椎動物または昆虫に、選択された異種配列を発現し得る、本明細書に記載されたような遺伝子送達ビヒクルを投与する工程を含む。このような遺伝子送達ビヒクルは、直接（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経口、直腸、眼内、鼻腔内）または種々の物理的方法（例えば、リポフェクション（Felgnerら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7147,1989）、直接的DNA注入（Fungら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:353-357,1983;Seegerら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:5849-5852;Acsadiら, Nature 352:815-818,1991）；マイクロプロジェクタイルボンバードメント（Williamsら, PNAS 88:2726-2730,1991）；いくつかのタイプのリボソーム（例えば、Wangら, PNAS 84:7851-7855,1987を参照のこと）；CaPO₄（Dubenskyら, PNAS 81:7529-7533,1984）；DNAリガンド（Wuら, J.Biol.Chem.264:16985-16987,1989）；核酸単独の投与（WO 90/11092）；または殺傷されたアデノウイルスに結合されたDNAの投与（Curielら, Hum.Gene Ther.3:147-154,1992）；レセプター特異的リガンドを利用して、ポリリジンのようなポリカチオン化合物を介して；ならびにソラレン不活化ウイルス（例えば、センダイウイルスまたはアデノウイルス）を用いて）のいずれかにより投与され得る。さらに、遺伝子送達ビヒクルは、直接（すなわちインビボで）または取り出されていて（エクソビボで）続いて戻される細胞のいずれかで投与され得る。

以下でより詳細に議論するように、遺伝子送達ビヒクルは、脊椎動物または昆虫に、広範な種々の治療目的および／または他の生成的目的のために投与され得る。これらの目的は、例えば、特異的な免疫応答を刺激するため；宿主細胞レセプターとの薬剤の相互作用を阻害するため；毒性緩衝剤（例えば、条件的毒性緩衝剤を含む）を発現するため；免疫系を免疫学的に調節するため；細胞分裂を防ぐため、置換遺伝子治療のためにマーカーを発

10

20

30

40

50

現するため、創傷治癒を促進するため、および／または組換えタンパク質を生成するための目的を含む。これらおよび他の使用は、以下でより詳細に議論される。

1. 免疫刺激

本発明の1つの局面において、感染性、ガン性、自己免疫性、または免疫疾患を防止、阻害、安定化、または逆転し得る遺伝子送達ビヒクルを投与するための組成物および方法が提供される。このような疾患の代表例として、HIV、HBV、HCV、HTLV I、HTLVII、CMV、EBV、およびHPVのようなウイルス感染症、メラノーマ、糖尿病、移植片対宿主病、アルツハイマー病、および心臓疾患などが挙げられる。より具体的には、本発明の1つの局面において、病原性物質が死滅するかまたは阻害されるかのいずれかであるように、病原性物質に対する免疫応答（体液性または細胞媒介性のいずれか）を刺激するための組成物および方法が提供される。病原性物質の代表例として、細菌、真菌、寄生体、ウイルス、およびガン細胞が挙げられる。

本発明の1つの実施態様において、病原性物質はウイルスであり、そして（1）ウイルス抗原に対する免疫応答を開始させるか、または（2）ウイルスの相互作用に必要な細胞レセプターを占有することによりウイルスの拡散を防止することのいずれかが可能である感受性の標的細胞に、抗原またはその改変型の発現を指向する遺伝子送達ビヒクルを用いることにより、特異的免疫応答を刺激し、そしてウイルスの拡散を阻害するための方法が提供される。ベクターの核酸にコードされたタンパク質の発現は一時的であるか、または時間が経過しても安定なものであり得る。病原性物質抗原に対して免疫応答が刺激される場合、遺伝子送達ビヒクルは好ましくは、免疫応答を刺激しかつ天然の抗原に比較して低下した病原性を有する、改変型の抗原を発現するように設計される。この免疫応答は、細胞が正しい様式で抗原を提示する場合、すなわち、MHCクラス I および／または II 分子と、CD3、ICAM-1、ICAM-2、LFA-1、またはこれらのアナログのようなアクセサリー分子とともに抗原を提示する場合に、達成される（例えば、Altmannら、Nature 338:512,1989）。遺伝子送達ビヒクルに感染した細胞は、これらが真のウイルス感染を厳密に模倣し、そしてこれらは、（a）複製していない細胞に感染することができ、（b）宿主細胞ゲノム内に組み込まれることがなく、（c）いかなる致死性疾患にも関係がなく、そして（d）高レベルの異種タンパク質を発現するため、これを効率的に行うことが予想される。これらの差異のために、遺伝子送達ビヒクルはワクチン使用のために健常人に対して使用され得る安全なウイルスベクターとして容易に考えられ得る。

提示細胞が完全に生存しており、健康であり、そして異種遺伝子に比較して低レベルのウイルス抗原が発現されるという点で、本発明のこの局面は、同じ様式で機能すると予想され得る他の系に対してさらなる利点を有する。発現される抗原性エピトープは、抗原の遺伝子のサブフラグメントの組換えアルファウイルスへの選択的クローニングにより改変され得、このことは他の場合には免疫優勢なエピトープにより隠され得る免疫原性エピトープに対する応答を導くので、これは明確な利点を有する。このようなアプローチは多数のエピトープ（このエピトープの1つ以上は、異なるタンパク質由来である）を有するペプチドの発現に拡張し得る。さらに、本発明のこの局面は、細胞内合成およびこれらのペプチドフラグメントとMHCクラス I 分子との会合を介する、抗原性エピトープおよび遺伝子のサブフラグメントによりコードされる抗原のペプチドフラグメントに対する細胞傷害性 T リンパ球（CTL）の効率的な刺激を可能にする。このアプローチはCTL誘導について主要な免疫優勢エピトープをマッピングするために利用され得る。

免疫応答はまた、（もしも必要であるなら適切なMHC分子と関係して）目的の抗原を認識する特異的 T 細胞レセプターの遺伝子、目的の抗原を認識する免疫グロブリンの遺伝子、またはMHCの関係の非存在下でCTL応答を提供する2つのものの1つのハイブリッドの遺伝子を、適切な免疫細胞（例えば T リンパ球）に移入することによっても、達成され得る。従って、遺伝子送達ビヒクル細胞は、免疫刺激剤、免疫調節剤、またはワクチンとして使用され得る。

本発明の別の実施態様において、遺伝子送達ビヒクルが、ウイルスのアセンブリを阻害する、欠陥のある妨害性ウイルス構造タンパク質を送達および発現する、阻害剤緩和剤を生

成するための方法が提供される。このような遺伝子送達ビヒクルは、欠陥のあるgag、pol、env、または他のウイルス粒子タンパク質またはペプチドをコードし得、そしてこれらはウイルス粒子のアセンブリを優勢な様式で阻害する。これは、ウイルス粒子の正常なサブユニットの相互作用が、欠陥のあるサブユニットとの相互作用により妨害されるために発生する。

本発明の別の実施態様において、ウイルスプロテアーゼに特異的な阻害性ペプチドまたはタンパク質の発現方法が提供される。簡単に記載すると、ウイルスプロテアーゼはウイルスのgagおよびgag/polタンパク質を、多くのより小さなペプチドに切断する。この切断がないと、全ての場合に感染性レトロウイルス粒子の生成が完全に阻害される。例として、HIVプロテアーゼはアスパルチンプロテアーゼであることが公知であり、そしてこれらはタンパク質またはアナログ由来のアミノ酸から作製されるペプチドにより阻害されることが公知である。HIVを阻害するための遺伝子送達ビヒクルは、このようなペプチド阻害剤の1つまたは多数の融合したコピーを発現する。

別の実施態様は、ある細胞型で欠失、変異しているか、または発現されない場合に、その細胞型に腫瘍形成を導く、抑制遺伝子の送達に関する。遺伝子送達ビヒクルによる欠失した遺伝子の再導入は、これらの細胞における腫瘍表現型の後退を導く。このようなガンの例は網膜芽細胞腫およびウィルムス腫瘍である。悪性疾患は、細胞増殖と比較して細胞の最終分化の阻害であると考えられ得るので、アルファウイルスベクターの送達、および腫瘍の分化を導く遺伝子産物の発現はまた、一般的には後退を導くはずである。

さらに別の実施態様において、遺伝子送達ビヒクルは、病原性機能に対応するRNA分子を切断し、それゆえそれを不活化するリボザイム（RNA酵素）（HaseloffおよびGerlach, Nature 334:585, 1989）を転写することにより治療効果を提供する。リボザイムは標的RNA中の特異的配列を認識することにより機能し、そしてこの配列は通常12bp~17bpであるため、これはRNAまたはレトロウイルスゲノムのような特定のRNA種の特異的認識を可能とする。さらなる特異性が、ある場合にはこれを条件的毒性緩和剤とすることにより達成され得る（以下を参照のこと）。

阻害性緩和剤の有効性を増加させる1つの方法は、問題のウイルスによる耐性細胞の感染の可能性を増加させる遺伝子の発現とともに、ウイルス性阻害性遺伝子を発現させることである。その結果は、増殖性感染事象に競合する非生産的な「行き止まり（dead-end）」事象である。HIVの具体例では、HIV複製を（前述のように、アンチセンスtatなどを発現することにより）阻害し、そしてまたCD4のような感染に必要なタンパク質を過剰発現する遺伝子送達ビヒクルが送達され得る。こうして比較的少数のベクター感染HIV耐性細胞は、遊離のウイルスまたはウイルスの感染した細胞を用いる多数の非増殖性融合事象のための「シンク」または「マグネット」として作用する。

2. ブロック剤

多くの感染性疾患、ガン、自己免疫疾患、および他の疾患には、ウイルス粒子と細胞、細胞と細胞、または細胞とそれら自身もしくは他の細胞により生成された因子の相互作用が関与する。ウイルス感染では、ウイルスは普通、感受性細胞の表面のレセプターを介して細胞に入る。ガンまたは他の増殖状態（例えば再狭窄）では、細胞は他の細胞または因子由来のシグナルに不適切に応答し得るかまたはまったく応答し得ないか、または特定の因子は変異、過剰発現、または過少発現されて適切な細胞周期制御の損失をもたらし得る。自己免疫疾患では、「自己」マーカーが不適切に認識される。本発明においては、そのような相互作用は、相互作用におけるパートナーのいずれかに対するアナログをインビボで生成することによりブロックされ得る。あるいは、細胞周期制御は、存在しないかまたは過少発現されるブロック因子を用いて、ある期から別の期（例えば、G1期からS期への移行）を防ぐことにより回復され得る。このブロック作用は細胞内、細胞膜上、または細胞外で起こり得る。そしてブロック剤に対する遺伝子を有するアルファウイルスベクターの作用は、感受性細胞の内部から、または病原性相互作用を局所的にブロックするブロックタンパク質の一種を分泌することによるかのいずれかにより媒介され得る。

HIVの場合、相互作用の2つの物質はgp120/gp41エンベロープタンパク質およびCD4レセプター分子である。従って適切なブロッカーは、病原作用を生じずにHIVの侵入をブロックするHIV envアナログ、またはCD4レセプターアナログのいずれかを発現する遺伝子送達ビヒクルである。CD4アナログは分泌され、そして隣接する細胞を保護するように機能するが、一方gp120/gp41はベクター含有細胞のみを保護するように、分泌されるかまたは細胞内でのみ生成される。安定性または補体溶解性を強化するために、CD4にヒト免疫グロブリン重鎖かまたは他の成分を加えることが有利であり得る。そのようなハイブリッド可溶性CD4をコードする遺伝子送達ビヒクルの宿主への投与は、安定なハイブリッド分子の連続的な供給をもたらす。処置の効力は、抗体レベル、ウイルス抗原生成、感染性HIVレベル、または非特異的感染のレベルを含む、疾患進行の通常の指標を測定することによりアッセイされ得る。

10

制御されない増殖状態（例えば、ガンまたは再狭窄）の場合、細胞サイクルの進行は、サイクリンまたはサイクリン依存性キナーゼ（CDK）によるシグナル伝達に影響を与える多数の分化因子の発現により停止し得る。例えば、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、p16、p21、およびp27は、それぞれ、サイクリン：CDK媒介性細胞周期シグナル伝達を調節する。遺伝子送達ビヒクルによる細胞内でのこれらの因子の過剰発現は、細胞増殖の細胞分裂停止性の抑制をもたらす。細胞増殖を破壊するためのブロッキング剤または標的として治療的に使用され得る他の因子は、例えば、野生型または変異体のRb、p53、Myc、Fos、Jun、PCNA、GAX、レンチウイルスvpr、およびp15を含む。関連する実施態様では、心血管疾患（例えば、再狭窄またはアテローム性動脈硬化症）は、再内皮化（re-endothelialization）または血管再構築を促進する産物（例えば、VEGF、TFPI、SOD）を発現するベクターを用いて処置または予防され得る。

20

3. 緩和剤の発現

上記の技術と類似の技術が、病原性物質または遺伝子の機能を阻害し得る物質（または「緩和剤」）の発現を指令する遺伝子送達ビヒクルを生成するのに使用され得る。本発明において「機能を阻害し得る」とは、緩和剤が機能を直接阻害するか、または例えば細胞中に存在する物質を、通常は病原性物質の機能を阻害しないものから、機能を阻害するものに変換することにより、間接的に阻害するかのいずれかであることを意味する。ウイルス疾患についてのそのような機能の例として、吸着、複製、遺伝子発現、アセンブリ、および感染細胞からのウイルスの放出が挙げられる。ガン性細胞、ガン促進成長因子、または制御されない増殖条件（例えば、再狭窄）についてのこのような機能の例として、生存性（viability）、細胞複製、外部シグナルに対する感受性の改変（例えば、接触阻害）、および抗ガン遺伝子タンパク質の生成の欠如またはその変異型の生成が挙げられる。

30

a. 阻害剤緩和剤

本発明の1つの局面において、遺伝子送達ビヒクルは、例えばウイルス疾患または悪性疾患における病原性物質の機能を妨害し得る遺伝子の発現を指向する。このような発現は、本質的に連続的であるか、または病状または特定の細胞型のいずれかに関連する別の物質（「同定物質」）の細胞における存在に応答するかのいずれかであり得る。さらにベクターの送達は、上記のように、ベクターの侵入を特異的に所望の細胞型（例えば、ウイルス感染細胞または悪性細胞）に標的化することにより制御され得る。

40

投与の1つの方法は白血球伝達（leukopheresis）であり、ここでは任意の一時期に個体の約20%のPBLが取り出され、そしてインビトロで操作される。従って、約 2×10^9 個の細胞が処置および置換され得る。繰り返し処置も行われ得る。あるいは骨髄が処置され得、上記のように効果を増幅させ得る。さらにベクターを生成するパッケージング細胞株は被験体に直接注射され得、このことは組換えビリオンの連続的な産生を可能とする。

1つの実施態様において、重要な病原性遺伝子転写産物（例えば、ウイルス遺伝子産物または活性化された細胞性ガン遺伝子）に対して相補的なRNAを発現する遺伝子送達ビヒクルが、その転写産物のタンパク質への翻訳を阻害（例えば、HIV tatタンパク質の翻訳の阻害）することに使用され得る。このタンパク質の発現はウイルス複製に必須であるため、遺伝子送達ビヒクルを含む細胞はHIV複製に耐性である。

50

第2の実施態様において、病原性物質がパッケージングシグナルを有する1本鎖ウイルスである場合、ウイルスパッケージングシグナル（例えば、緩和剤がHIVに対して指向されるときはHIVパッケージングシグナル）に相補的なRNAが発現され、その結果これらの分子とウイルスパッケージングシグナルとの会合は、レトロウイルスの場合は、アルファウイルスRNAゲノムの正しいキャプシド形成（encapsidation）または複製に必要な、ステムループ形成またはtRNAプライマー結合を阻害する。

第3の実施態様において、病原性遺伝子の発現を選択的に阻害し得る緩和剤、または病原性物質により生成されるタンパク質の活性を阻害し得る緩和剤を発現する遺伝子送達ビヒクルが導入され得る。HIVの場合、1つの例は、HIV LTRからの発現をトランス活性化する能力が欠如しており、そしてtatタンパク質が正常に機能することを（トランスドミナントな様式で）妨害する変異体tatタンパク質である。このような変異体はHTLV II tatタンパク質について同定されている（「XII^{Leu}」変異体；Wachsmanら、Science 235：674,1987を参照のこと）。変異体トランスリプレッサーtatは、HSV-1において類似の変異体リプレッサーについて示されたように複製を大いに阻害するはずである（Friedmannら、Nature 335：452,1988）。

このような転写リプレッサータンパク質は、その発現がウイルス特異的トランス活性化タンパク質（上記）により刺激される、任意のウイルス特異的転写プロモーターを用いて組織培養において選択され得る。HIVの具体的な場合において、HIV tatタンパク質およびHIVプロモーターにより駆動されるHSVTK遺伝子が発現する細胞株は、ACVの存在下で死滅する。しかし、もし一連の変異したtat遺伝子がこの系に導入されるなら、適切な特性（すなわち、野生型tatの存在下でHIVプロモーターからの転写を抑制する）を有する変異体が増殖しそして選択される。次にこの変異遺伝子は、これらの細胞から再び単離され得る。条件的致死ベクター／tat系の多数のコピーを含む細胞株は、生存している細胞クローンはこれらの遺伝子内の内因性変異により引き起こされるのではないことを確認するために、使用され得る。次に、「回収可能な（rescuable）」アルファウイルスベクター（すなわち、変異体tatタンパク質を発現し、そして細菌内での増殖および選択のために細菌の複製起点および薬物耐性マーカーを含むベクター）を用いて、一組のランダムに変異誘発したtat遺伝子がこれらの細胞に導入される。これにより多数のランダム変異を評価することができ、そして所望の変異体細胞株のその後の容易な分子クローニングが可能になる。この手順は、潜在的な抗ウイルス療法のための種々のウイルス性転写アクチベーター／ウイルスプロモーター系における変異を同定および利用するために使用され得る。

b. 条件的毒性緩和剤

病原性物質を阻害するための別のアプローチは、病原性条件を発現する細胞にとって毒性である緩和剤を発現することである。この場合、遺伝子送達ビヒクルからの緩和剤の発現は、非病原性細胞の破壊を避けるために、病原性物質に関連した物質（例えば、病原性状態を同定する特異的ウイルスRNA配列）の存在により制限されるべきである。

この方法の1つの実施態様において、遺伝子送達ビヒクルは、細胞特異的応答性ベクターから毒性遺伝子（上で議論されたように）を発現するために利用され得る。この様式で、細胞特異的応答性ベクターを活性化し得るRNA配列を含む、急速に複製している細胞は、遺伝子送達ビヒクルにより生成される細胞傷害性物質により優先的に破壊される。

上記の実施態様と同様の様式で、遺伝子送達ビヒクルは、リン酸化、ホスホリボシル化、リボシル化、またはプリンもしくはピリミジンに基づく薬物の他の代謝のための遺伝子を有し得る。この遺伝子は哺乳動物細胞に等価物がない場合があり、そしてウイルス、細菌、真菌、または原生動物のような生物由来であり得る。この1つの例は、チオキサンチンの存在下で致死的である、E.coliのグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子産物である（Besnardら、Mol.Cell.Biol.7：4139-4141,1987を参照のこと）。この型の条件的致死遺伝子産物（上記のように「プロドラッグ変換酵素」とも呼ぶ）は、多くの現在公知のプリンまたはピリミジンに基づく抗ガン薬への適用を有し、これは、有効な細胞傷害性物質となるために、しばしば細胞内リボシル化またはリン酸化を必要とする。この条件的致死遺伝子産物はまた、プリンまたはピリミジンのアナログではない非毒性薬物を細

10

20

30

40

50

胞傷害性形態に代謝し得る (Searleら、Brit.J.Cancer 53:377-384,1986を参照のこと)。

一般的に哺乳動物ウイルスは、他のウイルスプロモーターエレメントからのその後の転写活性化に必要な「即時型 (immediate early)」遺伝子を有する傾向がある。この性質を有するRNA配列は、ウイルス感染のアルファウイルスベクター細胞内シグナル (または「同定物質」) を活性化するための優れた候補である。従って、これらのウイルス「即時型」遺伝子産物に応答するアルファウイルス細胞特異的ベクターから発現される条件的致死遺伝子は、任意の特定のウイルスに感染された細胞を特異的に死滅させ得る。さらに、ヒトおよびインターフェロンプロモーターエレメントは、広範な種々の非関連ウイルスによる感染に応答して転写的に活性化されるため、例えばインターフェロン生成に応答して、

10

HSVTKのような条件的致死遺伝子産物を発現するベクターの導入により、種々の異なるウイルスに感染した細胞の破壊がもたらされ得る。

本発明の別の局面において、他の場合には不活性な前駆体を病原性物質の活性な阻害剤に活性化し得る、遺伝子産物の発現を指向する、遺伝子送達ビヒクルが提供される。例えば HSVTK遺伝子産物は、AZTまたはddCのような潜在的に抗ウイルス性のヌクレオシドアナログをより効果的に代謝するために使用され得る。HSVTK遺伝子は細胞特異的応答性ベクターの制御下で発現され得、そしてこれらの細胞型の中に導入され得る。AZT (および他のヌクレオシド抗ウイルス剤) は、レトロウイルス逆転写酵素、従って、HIV複製を特異的に阻害するために、細胞性機構によりヌクレオチド三リン酸の形態に代謝されなければならない (Furmanら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8333-8337,1986)。HSVTK (非常に広範な基質特異性を有するヌクレオシドおよびヌクレオチドキナーゼ) の構成的発現により、それらの生物学的に活性なヌクレオチド三リン酸形態へのこれらの薬物のより効果的な代謝がもたらされる。従って、AZTまたはddC治療は、より効果的であり、投与量はより少なく、全身性毒性はより低く、そして増殖性感染に対するより高い効力を可能にする。そのヌクレオチド三リン酸の形態がレトロウイルス逆転写酵素に対して選択性を示すが、細胞性ヌクレオシドおよびヌクレオチドキナーゼの基質特異性の結果リン酸化されないさらなるヌクレオシドアナログは、より効果的になる。

20

これらの遺伝子送達ビヒクルのヒトT細胞およびマクロファージ/単球細胞株への投与は、レトロウイルスベクター処理のない同じ細胞に比べて、AZTおよびddCの存在下で、HIVに対するこれらの耐性を増加させ得る。AZTでの処理は毒性の副作用を避けるため通常レベルより低いですが、それでもHIVの蔓延を有効に阻害する。処理の経路はブロッカーについて記載したものと同様である。

30

1つの実施態様において、遺伝子送達ビヒクルは、それ自身毒性はないが、ウイルスまたは他の病原体に特異的なプロテアーゼのようなタンパク質によりプロセシングまたは改変された場合、毒性の形態に変換される産物を特定する遺伝子を有する。例えば、遺伝子送達ビヒクルは、リシンA鎖のプロタンパク質をコードする遺伝子を有し得、これはHIVプロテアーゼによるプロセシングにより毒性になる。より詳しくは、毒素リシンまたはジフテリアA鎖の合成の不活性なプロタンパク質形態は、HIVウイルスによりコードされたプロテアーゼが適切な「プロ」エレメントを認識し、そしてそれを切り離すように配置することにより、活性形態に切断され得る。

40

別の実施態様において、遺伝子送達ビヒクルは、細胞内の同定物質の存在 (例えば、ウイルス遺伝子の発現) に応答して標的細胞の表面に「レポーティング産物」を発現し得る。この表面タンパク質は、レポーティングタンパク質に対する抗体のような細胞傷害性物質または細胞傷害性T細胞により認識され得る。同様の様式で、このような系は、同定タンパク質を発現する特定の遺伝子を有するこれらの細胞を簡単に同定するための検出系 (下記を参照のこと) として使用され得る。

同様に、別の実施態様において、それ自身が治療的に有益である表面タンパク質が発現され得る。HIVの特定の場合に、HIV感染細胞において特異的なヒトCD4タンパク質の発現は、2つの点で有益であり得る：

1. 可溶性CD4が遊離のウイルスを阻害することが示されているが、細胞内でのHIV envへ

50

のCD4の結合は、生存可能なウイルス粒子の形成を阻害し得る。しかし、このタンパク質は膜に結合したままであり、そして構造的に内因性CD4（患者はこれに対して免疫学的に寛容（tolerant）であるはずである）と同一であるため、全身性のクリアランスおよび可能な免疫原性の問題はない。

2. CD4/HIV env複合体は細胞死の原因に関与するため、（HIV感染細胞に存在する過剰のHIV-env存在下での）CD4のさらなる発現は、より急速な細胞死を引き起こし、従ってウイルス拡散を阻害する。これは特に、HIV誘導性細胞傷害性に対するそれらの相対的な屈折性の結果（これは次には、明らかにそれらの細胞表面上のCD4の相対的な欠乏のためである）、ウイルス生成の病原性物質保有者として働く単球およびマクロファージに適用可能であり得る。

別の実施態様において、遺伝子送達ビヒクルは、ベクターに感染した細胞の生存性に必須のRNA分子を切断し、そして不活化するリボザイムを提供し得る。リボザイム生成を病原性状態に対応する特異的なRNA配列（例えば、HIV tat）に依存させることにより、毒性は病原性状態に特異的になる。

4. マーカーの発現

特異的なRNA配列に応答して細胞中で緩和剤を発現する上記の技術はまた、同定タンパク質を発現する細胞における特定の遺伝子（例えば、特定のウイルスが有する遺伝子）の検出を可能にし、それによりそのウイルスを有する細胞の検出を可能にするように改変され得る。さらにこの技術は、ウイルスに関連する同定タンパク質を有する細胞の臨床サンプルにおけるウイルス（例えば、HIV）の検出を可能にする。

この改変は、感染細胞中における同定タンパク質の存在に応答する遺伝子送達ビヒクル中で、その存在が容易に同定され得る産物（「マーカー産物」）をコードするゲノムを提供することにより達成され得る。例えば、HIVは、それが適切な細胞に感染した場合、tatおよびrevを作る。この指示細胞は、従って、tatおよび／またはrev RNA転写産物による活性化の際に組換えアルファウイルスにより発現されるマーカー遺伝子（例えば、アルカリホスファターゼ遺伝子、β-ガラクトシダーゼ遺伝子、またはルシフェラーゼ遺伝子）をコードするゲノム（例えば、適切な組換えアルファウイルスでの感染によって）を用いて提供され得る。β-ガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼの場合、細胞を基質アナログに曝すと、サンプルがHIV陽性の場合には色または蛍光の変化がもたらされる。ルシフェラーゼの場合、サンプルをルシフェリンに曝することにより、サンプルがHIV陽性の場合、発光する。β-ガラクトシダーゼのような細胞内酵素の場合、着色細胞または蛍光細胞を計測するか、または細胞抽出物を作製して適切なアッセイを行うことにより、ウイルスの力価を直接測定し得る。また、膜結合型のアルカリホスファターゼの場合、蛍光性基質を用いて細胞表面上で酵素アッセイを行うことにより、ウイルスの力価をまた測定し得る。分泌された酵素（例えば、操作された形態のアルカリホスファターゼ）については、少量の培養上清サンプルを活性についてアッセイすることにより、単一培養物を経時的に連続的にモニターし得る。従って、異なる目的に対して異なる形態のこのマーカー系が使用され得る。これらには、活性のあるウイルスの計測、または培養物中のウイルス蔓延および種々の薬物によるこの蔓延の阻害の感度が高くかつ簡単な測定が含まれる。

ウイルスに対する中和抗体の存在下または非存在下のいずれかで、このウイルスの存在を試験することにより、上記の系にさらなる特異性を組み込み得る。例えば、試験する臨床サンプルの一部において、HIVに対する中和抗体が存在し得るが、別の部分では、中和抗体が全く存在しないこともある。抗体が存在する系においてこの試験が陰性であり、かつ抗体が全く存在しない系においてこの試験が陽性の場合、これはHIVの存在を確認することを助ける。

インビトロアッセイの類似の系で、特定の遺伝子（例えば、ウイルス遺伝子）の存在は、細胞サンプルにおいて決定され得る。この場合、サンプルの細胞を、適切なウイルスRNA転写産物の存在下でのみ発現されるレポーター遺伝子を有する適切な遺伝子送達ビヒクルで感染させる。レポーター遺伝子は、サンプル細胞に入った後、宿主細胞が適切なウイルスタンパク質を発現する場合のみ、そのレポーター産物（例えば、β-ガラクトシダーゼ

10

20

30

40

50

またはルシフェラーゼ)を発現する。

レポーター遺伝子は、存在する同定物質よりも多量のレポーター産物を発現し得、これにより増幅効果が得られるため、これらのアッセイはより迅速かつ好感度である。

5. 免疫ダウンレギュレーション

上記のように、本発明はまた、アルファウイルスに感染した標的細胞中の免疫系の1つ以上のエレメントを抑制し得る遺伝子送達ビヒクルを提供する。簡単に説明すると、不適切なまたは好ましくない免疫応答(例えば慢性肝炎、または骨髄のような異種組織の移植)の特異的ダウンレギュレーションは、移植(MHC)抗原の表面発現を抑制する免疫抑制性ウイルス遺伝子産物を用いて操作され得る。C群アデノウイルスであるAd2およびAd5は、ウイルスのE3領域にコードされる19kd糖タンパク質(gp19)を有する。このgp19分子は細胞の小胞体中のクラスI MHC分子に結合し、そしてクラスI MHCの末端グリコシル化および細胞表面へのその移動を防止する。例えば、骨髄移植の前に、ドナー骨髄細胞はgp19の発現の際に、MHCクラスI移植抗原の表面発現を阻害するgp19コード遺伝子送達ビヒクルを用いて感染され得る。これらのドナー細胞は、移植片拒絶の危険性が低く移植され得、そして移植患者は最小限の免疫抑制療法を必要とし得る。このことは、ほとんど合併症もなく、ドナーレシピエントの許容されるキメラ状態が存在するのが可能であり得る。いわゆる自己免疫疾患の部類(ループスエリテマトーデス(lupus erythromiatis)、多発性硬化症、慢性関節リウマチまたは慢性B型肝炎感染を含む)を処置するのに、同様の処置が使用され得る。

別の方法は、事実上自己反応性のT細胞クローンに特異的な、アンチセンスメッセージ、リボザイムまたは他の特異的遺伝子発現阻害剤の使用を含む。これらは、自己免疫応答の原因である特定の好ましくないクローンのT細胞レセプターの発現をブロックする。このアンチセンス、リボザイムまたは他の遺伝子は、ウイルスベクター送達系を用いて導入され得る。

6. 置換または増強遺伝子療法

本発明のさらに1つの局面は、治療用タンパク質を発現し得る遺伝子配列を供給するため遺伝子送達ビヒクルを用いて、脊椎動物または昆虫の細胞を形質転換することに関する。本発明の1つの実施態様において、遺伝子送達ビヒクルは、代謝、免疫調節、ホルモン調節、酵素的または膜関連構造機能における、遺伝性または非遺伝性の遺伝子欠陥を防止、阻害、安定化または逆転し得る治療用タンパク質を発現するように設計される。この実施態様はまた、個々の細胞を形質導入し得る遺伝子送達ビヒクルを記載し、これにより治療用タンパク質が特定の細胞または組織から全身的にまたは局所的に発現され得、これにより治療用タンパク質は、(a)存在しないかもしくは欠陥のある細胞性タンパク質もしくは酵素の置換、または(b)欠陥のある、発現量の少ない細胞性タンパク質もしくは酵素の補充生成を行い得る。このような疾患は、嚢胞性線維症、パーキンソン病、高コレステロール血症、アデノシンデアミナーゼ欠損症、β-グロビン障害、血友病AおよびB、ゴーシェ病、糖尿病および白血病を含み得る。

本発明の1つの例として、ゴーシェ病を処置するために遺伝子送達ビヒクルが構築および利用され得る。簡単に説明すると、ゴーシェ病は酵素グルコセレブロシダーゼの欠陥により特徴付けられる遺伝障害である。この型の治療は、機能的細胞性酵素を提供することによる単一の遺伝子置換療法の1つの例である。この酵素の欠陥により、体内のすべての細胞のリソゾーム中でのグルコセレブロシドの蓄積が導かれる。しかし疾患の表現型は、非常にまれな神経障害性形態のこの疾患を除いて、マクロファージにのみ現れる。この疾患では通常、肝臓および脾臓の肥大、ならびに骨の病変が導かれる(総説については、Science 256:794,1992、およびThe Metabolic Basis of Inherited Disease、第6版、Scriverら、第2巻、1677頁を参照のこと)。

遺伝子送達ビヒクルは、疾患または疾患の進行を処置、治療、予防するために、広範な種々の治療用タンパク質を送達するのに同様に利用され得る。このような遺伝子の代表例は、インスリン(米国特許第4,431,740号およびBE 885196Aを参照のこと)、ヘモグロビン(Lawnら、Cell 21:647-51,1980)、エリスロポエチン(EPO;米国特許第4,703,008号を

参照のこと）、巨核球増殖および分化因子（MGDF）、幹細胞因子（SCF）、G-CSF（Nagataら、Nature 319:415-418,1986）、GM-CSF、M-CSF（WO 8706954を参照のこと）、flt3リガンド（Lymanら（1993）、Cell 75:1157-1167）、EGF、酸性および塩基性のFGF、PDGF、インターロイキンおよびインターフェロンのファミリーのメンバー（上記）、神経向性因子（neurotropic factor）（例えば、BDNF；Rosenthalら、Endocrinology 129:1289-1294,1991、NT-3；WO 9103569を参照のこと、CNTF；WO 9104316を参照のこと、NGF；WO 9310150を参照のこと）、凝固因子（例えば、第VIII因子および第IX因子）、t-PAのような血栓溶解因子（EP 292009、AU 8653302、およびEP 174835を参照のこと）、およびストレプトキナーゼ（EP 407942を参照のこと）、ヒト成長ホルモン（JP 94030582および米国特許第4,745,069を参照のこと）および他の動物のソマトトロピン、インテグリン、および他の細胞接着分子（例えば、ICAM-1およびELAM（上記の「異種配列」もまた参照のこと））、ならびに他の増殖因子（例えば、IGF-IおよびIGF-II、TGF- β 、骨形成タンパク質-1（Ozkanakら、EMBO J.9:2085-2093,1990））、ならびに他の骨形成性タンパク質（例えば、BMP-4、Nakaseら、J.Bone Miner.Res.9:651-659,1994）を含むがこれらに限定されない。

7. リンホカインおよびリンホカインレセプター

上記のように、本発明はまた、遺伝子送達ビヒクルを提供し、この遺伝子送達ビヒクルは、他の機能の中でも、1つ以上のサイトカインまたはサイトカインレセプターの発現を指向し得る。簡単に述べれば、ガン治療剤としてのそれら役割に加え、サイトカインは、特定の病状を生じるネガティブな効果を有し得る。例えば、ほとんどの休止T細胞、B細胞、大型の顆粒状リンパ球および単球は、IL-2R（レセプター）を発現しない。正常な休止細胞におけるIL-2R発現の欠如とは対照的に、IL-2Rは、特定の白血病（ATL、毛様細胞性白血病、ホジキン病、急性および慢性の顆粒球性白血病）、自己免疫疾患を患う患者の異常細胞によって発現され、そして同種移植片拒絶に関連する。興味深いことに、これらの患者のほとんどにおいて、IL-2Rの可溶性形態の血清濃度が上昇する。従って、本発明の特定の実施態様では、可溶性形態のサイトカインレセプターの血清濃度を増大することによって、治療が達成され得る。例えば、IL-2Rの場合には、遺伝子送達ビヒクルが、可溶性のIL-2RおよびIL-2Rの両方を生成するために操作され得、これにより高い親和性の可溶性レセプターが作られる。この構成において、血清IL-2レベルが減少し、パラクリンループを阻害する。この同じストラテジーはまた、自己免疫疾患に対しても有効であり得る。特に、いくつかの自己免疫疾患（例えば、慢性関節リウマチSLE）はまた、IL-2の異常発現に関係するので、レセプターの血清レベルを増加させることによってIL-2の作用をブロックすることもまた、このような自己免疫疾患を処置するために利用され得る。他の場合においても、IL-1のレベルを阻害することが有益であり得る。簡単に述べれば、IL-1は、2つのポリペプチドIL-1およびIL-1からなり、これらは各々多面発現効果を有する。IL-1は、微生物産物または炎症による刺激に応答して、主として単核食細胞により合成される。IL-1Rの天然に存在するアンタゴニストが存在し、IL-1レセプターアンタゴニスト（「IL-1Ra」）と呼ばれる。このIL-1Rアンタゴニストは、成熟IL-1と同じ分子サイズを有し、そしてそれと構造的に関係がある。しかし、IL-1RaのIL-1Rへの結合は、任意のレセプターのシグナル伝達を開始しない。従って、この分子は、可溶性レセプターとは異なる作用機構を有し、これはサイトカインと複合体化し、それゆえレセプターとの相互作用を防げる。IL-1は、正常なホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしていないようである。動物においては、IL-1レセプターに対する抗体は、内毒素および他の炎症誘発剤による、炎症および食欲不振を弱める。

敗血症ショックの場合において、IL-1は、強力な血管拡張剤である2次化合物を誘導する。動物においては、外部から供給されたIL-1は平均動脈圧を減少させ、そして白血球減少症を誘発する。IL-1に対する中和抗体は、動物において、内毒素誘発熱を下げる。IL-1Rの3日間連続的な注入治療を受けた敗血症ショック患者の研究において、28日の死亡率は16%であり、これに対してプラシーボ注入を受けた患者は44%であった。自己免疫疾患の場合には、IL-1活性の減少が、炎症を減少させる。同様に、組換えレセプターを用いたIL-1活性のブロックは、さらに、おそらく炎症を減少させることにより、動物における同種

10

20

30

40

50

移植の生存性の増加をもたらし得る。

これらの疾患は、遺伝子送達ビヒクルを操作して、可溶性レセプターまたはより詳細には、IL-1Ra分子を生成し得るさらなる例を提供する。例えば、敗血症ショックを受けた患者において、IL-1Ra生成ベクター粒子の単一の注射が、組換えIL-1Rの連続的注入を必要とする現行のアプローチに取って代わり得る。

サイトカイン応答性、またはより詳細には、不正確なサイトカイン応答性はまた、感染性疾患の制御または消散の不全に関与し得る。おそらく、最も良く研究された例は、強力で、しかし逆効果の T_H2 優勢応答を有するマウスおよびヒトのリーシュマニア症の非回復形態である。同様に、癩腫癩が、優勢で、しかし不適切な T_H2 応答に関与する。これらの症状において、遺伝子送達ビヒクルは、固形腫瘍の治療について提案される部位特異的アプローチとは反対に、 $IFN\gamma$ の循環レベルを増加させるために有用であり得る。 $IFN\gamma$ は、 T_H-1 T細胞により生成され、そして T_H-2 サブタイプ増殖のネガティブレギュレーターとして機能する。 $IFN\gamma$ はまた、IgEへのアイソタイプスイッチングを含む、B細胞に対する多くのIL-4媒介効果を拮抗する。

IgE、肥満細胞、および好酸球は、アレルギー反応の媒介に関与する。IL-4は、T細胞の分化に作用して T_H-2 の発達を刺激する一方、 T_H-1 応答を阻害する。従って、アルファウイルスに基づく遺伝子治療はまた、伝統的なアレルギー治療と共に達成され得る。1つの可能性は、少量の攻撃アレルゲン（すなわち、伝統的なアレルギー注射）と共に、IL4Rを生成する遺伝子送達ビヒクルを送達することである。可溶性IL-4Rは、IL-4の活性を防げ、そしてそれゆえ、強力な T_H-2 応答の誘導を防げる。

8. 自殺ベクター

本発明の1つのさらなる局面は、パッケージング/プロデューサー細胞株における野生型アルファウイルスの蔓延を制限するための、遺伝子送達ビヒクル自殺ベクターの使用に関する。簡略には、1つの実施態様において、遺伝子送達ビヒクルは、ベクターの連結領域の3'配列、およびパッケージング細胞株発現ベクターの5'アルファウイルス構造配列との間のRNA組換え事象から生じる、野生型アルファウイルス配列に特異的な、アンチセンスまたはリボザイム配列から構成される。アンチセンスまたはリボザイム分子は、特異的組換え配列の存在下においてのみ、温度安定性であり、そしてアルファウイルスパッケージング/プロデューサー細胞株においては、その他の効果を何も有さない。あるいは、毒性分子（例えば、本明細書中以下で開示される分子）はまた、野生型アルファウイルスの存在下のみで発現するベクターに関して発現され得る。

9. 転移性腫瘍の蔓延を妨げるための遺伝子送達ビヒクル

本発明の1つのさらなる局面は、悪性新生物の侵襲性を阻害または低減するための、遺伝子送達ビヒクルの使用に関する。簡略には、特に悪性疾患の程度は、代表的には腫瘍の血管新生に関係する。腫瘍の血管新生の1つの原因は、いくつかの腫瘍により発現される可溶性腫瘍血管新生因子（TAF）（Pawelitzら、Crit.Rev.Oncol.Hematol.9:197,1989）の生成である。本発明の1つの局面において、腫瘍血管新生は、TAFに特異的なアンチセンスまたはリボザイムRNA分子を発現するために遺伝子送達ビヒクルを利用することによって遅らされ得る。あるいは、抗血管新生因子（Mosesら、Science 248:1408,1990;Shapiroら、PNAS 84:2238,1987）が、単独または上記のリボザイムもしくはアンチセンス配列との組み合わせのいずれかで、腫瘍の血管新生を遅らせるかまたは阻害する目的で、発現され得る。あるいは、遺伝子送達ビヒクルはまた、周辺組織上のTAFレセプターに対して特異的な抗体を発現するために用いられ得る。

10. 遺伝子送達ビヒクルの投与

本発明の他の局面において、脊椎動物または昆虫に遺伝子送達ビヒクルを投与するための方法が提供される。簡略には、遺伝子送達ビヒクルの最終的な投与様式は、通常特定の治療適用、ベクターの効力を増加させる最良の様式、および最も便利な投与経路に依存する。一般的に、この実施態様は、例えば（1）血流への直接注入；（2）特定の組織または腫瘍への直接注入；（3）経口投与；（4）鼻内吸入；（5）粘膜組織への直接塗付；または（6）脊椎動物もしくは昆虫への形質導入自己細胞のエキスポ投与により、送達さ

れるように設計され得る遺伝子送達ビヒクルを含む。本発明の特定の実施態様において、エクソビポ適用のためには、細胞はまず宿主から取り出され、少なくとも部分的に精製された細胞集団（例えば、CD34⁺幹細胞、T細胞など）を生じるためにポジティブおよび／またはネガティブに選択され、本発明の遺伝子送達ビヒクルの1つを用いて形質導入、トランスフェクトもしくは感染され、そして同じ宿主または別の個体のいずれかに再導入され得る。

従って、治療用遺伝子送達ビヒクルは、ベクターが（a）正常な健常細胞を形質導入し、かつ細胞を形質転換して、全身的または局所的に分泌される治療用タンパク質または物質のプロデューサーにする、（b）異常または欠陥のある細胞を形質転換して細胞を正常な機能性表現型に転換する、（c）異常な細胞をそれが破壊されるように形質転換する、および／または（d）細胞を形質導入して免疫応答を操作する、ことができるような様式で、投与され得る。

11. 転写因子活性の調節

さらに別の実施態様において、遺伝子送達ビヒクルは、感染細胞中の転写因子の増殖制御活性を調節するために利用され得る。簡略には、転写因子は、配列特異的トランス活性化または抑制を介して、遺伝子発現のパターンに直接的に影響を与える（Karin, New Biologist 21:126-131, 1990）。従って、変異された転写因子がガン遺伝子のファミリーを表すことは驚くべきことではない。遺伝子送達ビヒクルは、例えば、その調節されない増殖が腫瘍形成性転写因子により活性化される腫瘍細胞、ならびにホモダイマーおよびヘテロダイマーのトランス活性化または抑制性の転写因子複合体の形成において共同して結合を促進または阻害するタンパク質に対する制御を復帰させるために使用され得る。

細胞増殖を逆転させる1つの方法は、c-myc/Maxヘテロダイマー転写因子複合体のトランス活性化の潜在能力を阻害することである。簡略には、核ガン遺伝子c-mycは、細胞を増殖させることにより発現され、そしていくつかの異なる機構（レトロウイルス挿入、増幅、および染色体転座を含む）により活性化され得る。Maxタンパク質は静止細胞中で発現され、そしてc-mycとは独立して、単独でまたは未同定の因子とともにのいずれかで発現され、myc/Maxヘテロダイマーにより活性化されるものと同じ遺伝子の発現を抑制するように機能する（Cole, Cell 65:715-716, 1991）。

腫瘍細胞のc-mycまたはc-myc/Max増殖の阻害は、遺伝子送達ビヒクルにより制御される標的細胞中でのMaxの過剰発現により達成され得る。Maxタンパク質はわずか160アミノ酸（480ヌクレオチドのRNA長に相当する）であり、そして独立してまたは細胞の増殖制御を放出する因子に標的化された他の遺伝子および／もしくはアンチセンス／リボザイム部分とともにのいずれかで、遺伝子送達ビヒクルに容易に組み込まれる。

ホモ／ヘテロ複合体の調節は、転写因子活性化遺伝子発現を制御するための別のアプローチである。例えば、トランス活性化転写因子NF- κ Bの細胞質から核への輸送は、阻害剤タンパク質IBとともにヘテロダイマー複合体中にある間は防止される。種々の物質（特定のサイトカインを含む）による誘導に際して、IBはリン酸化され、そしてNF- κ Bは放出され、そして核に輸送され、ここでこれはその配列特異的トランス活性化機能を発揮し得る（BaeuerleおよびBaltimore, Science 242:540-546, 1988）。NF- κ B/IB複合体の解離は、IBのリン酸化部位を抗体でマスクすることにより防止され得る。このアプローチは、NF- κ B転写因子の核への移行を防止することにより、NF- κ B転写因子のトランス活性化活性を有効に阻害する。標的細胞におけるIBリン酸化部位特異的抗体またはタンパク質の発現は、アルファウイルス遺伝子移入ベクターを用いて達成され得る。本明細書に記載したアプローチと類似のアプローチは、junタンパク質とfosタンパク質との間の会合を阻害することにより、トランス活性化転写ヘテロダイマー因子AP-1（TurnerおよびTjian, Science 243:1689-1694, 1989）の形成を防止するために使用され得る。

12. 組換えタンパク質の生成

本発明の別の局面において、トガウイルス（アルファウイルスを含む）遺伝子送達ビヒクルが、真核生物細胞中（エクソビポ、インビポ、または確立された細胞株）で1つ以上の組換えタンパク質の発現を指向するために利用され得る。本明細書中で使用される「組換

えタンパク質」は、タンパク質、ポリペプチド、酵素、またはそれらのフラグメントをいう。このアプローチを使用して、治療用または他の商業的実用性を有するタンパク質が、費用に関してさらに効率よく生成され得る。さらに、真核生物細胞中で生成されたタンパク質は、原核生物細胞中で発現されたタンパク質と比較して翻訳後により確実に修飾（例えば、グリコシル化、硫酸化、アセチル化など）され得る。さらに、このような系は種々の化学的化合物（例えば、精製化学薬品または特別な化学薬品）のインビボ生成に使用され得る。

この局面において、所望のタンパク質、酵素、または酵素経路（所望の化学薬品の生成に必要とされ得るような）をコードする遺伝子送達ビヒクルは、適切な真核生物細胞に形質転換、トランスフェクト、形質導入、またはそれ以外の方法で導入される。このような系を使用して生成され得るタンパク質の代表例として以下が挙げられるが、これらに限定されない：インスリン（U.S.4,431,740およびBE 885196Aを参照）、ヘモグロビン（Lawnら、Cell 21:647-51,1980）、エリスロポエチン（EPO；U.S.4,730,008を参照）、巨核球成長および分化因子（MGDF）、幹細胞因子（SCF）、G-CSF（Nagataら、Nature 319:415-418,1986）、GM-CSF、M-CSF（WO 8706954を参照）、flt3リガンド（Lymanら（1993）cell 75:1157-1167）、EGF、酸性および塩基性FGF、PDGF、インターロイキンまたはインターフェロンファミリーのメンバー（前出）、神経向性因子（例えば、BDNF；Rosenthalら、Endocrinology 129:1289-1294,1991、NT-3；WO 9103569を参照、CNTF；WO 9104316を参照、NGF；WO 9310150を参照）、凝固因子（例えば、第VIII因子および第IX因子）、t-PAのような血栓崩壊因子（EP 292009、AU 8653302、およびEP 174835を参照）およびストレプトキナーゼ（EP 407942を参照）、ヒト成長ホルモン（JP 94030582およびU.S.4,745,069を参照）および他の動物のソマトトロピン、インテグリン、および他の細胞接着分子（例えば、ICAM-1およびELAM）（上記の他の「異質配列」もまた参照）、ならびに他の成長因子（例えば、IGF-IおよびIGF-II、TGF- β 、骨形成タンパク質-1（Ozkaynakら、EMBO J.9:2085-2093,1990）、ならびに他の骨形態発生タンパク質（例えば、BMP-4、Nakaseら、J.Bone Miner.Res.9:651-659,1994））。当業者に明らかなように、一旦特徴づけられると、任意の遺伝子が、本発明に従って遺伝子送達ビヒクル中に容易にクローニングされ、続いて適切な宿主細胞中に導入され、そして所望の遺伝子を発現し得る。

本明細書中に記載されるベクターおよびアルファウイルスパッケージング細胞株を使用する組換えタンパク質の生成方法が、提供される（実施例6および7を参照）。簡潔には、組換えタンパク質をコードする遺伝子送達ビヒクル（インビトロで転写されたRNAの形態、プラスミドDNAの形態、または組換えベクター粒子の形態）は、アルファウイルスパッケージング細胞株（PCL）中に（トランスフェクションまたは感染を介して）導入され得、その結果培養細胞の小さい画分（ $\leq 1\%$ ）のみがベクター分子を含む。ベクターレプリコンは、ベクターRNAの増幅後に、PCLからトランスで供給されるsPによってパッケージされる。これは、シンドビスウイルス複製ストラテジーに従って生じる。ついで、生成された組換えベクター粒子が培養物の残存している細胞に感染する。従って、組換えタンパク質発現の発生は、経時的に、組換えベクター粒子が生成され、続いてPCL培養物中の全細胞を感染させるという結果を生じる。同様に、PCLを有するベクター粒子の増幅は、他の適用のための大量の高力価の粒子ストックを生成するために使用され得る。本発明のな別の局面において、プロデューサー細胞株からの組換えタンパク質の発現が記載される（実施例7を参照）。簡潔には、培養物への細胞外刺激因子の添加によってベクター粒子の生成が誘導され得る全ての遺伝子エレメント（ベクターレプリコン、および欠陥ヘルパー発現カセットを含む）を含む細胞株が誘導される。従って、ベクターコードされる組換えタンパク質の発現は、アルファウイルスベクター粒子プロデューサー細胞株の誘導の結果として生じる。本発明のなおさらに別の局面において、真核生物重層ベクター開始系で安定に形質転換された細胞株からの組換えタンパク質の発現が記載される（実施例7を参照）。簡潔には、目的の組換えタンパク質をコードする誘導性真核生物重層ベクター開始系カセットで安定に形質転換された細胞株が誘導される。従って、ベクターでコードされた組換えタンパク質の発現は、真核生物重層ベクター開始系カセットの誘導の結果として生

10

20

30

40

50

じる。

本明細書中に提供される開示を考慮すれば容易に理解されるように、RNAベクターレプリコン、真核生物重層ベクター開始系、または組換えベクター粒子を利用するタンパク質生成がまた、パッケージング細胞株またはプロデューサー細胞株への導入以外の方法によっても達成され得る。例えば、所望のタンパク質を生成するために、そのようなベクターが広範な種々の他の真核生物宿主細胞株（例えば、COS、BHK、CHO、293、またはHeLa細胞）に導入、およびインビボまたはエキシビボで細胞に直接投与され得る。

J. 寄託情報

以下の物質がアメリカンタイプカルチャーコレクションに寄託された：

<u>寄託</u>	<u>名称</u>	<u>寄託日</u>	<u>受託番号</u>
野生型シンドビスウイルス	CMCC #4639	1996年4月2日	VR-2526
SIN-1シンドビスウイルス	CMCC #4640	1996年4月2日	VR-2527
pBG-SIN1 ELVS1.5 SEAP	CMCC #4641	1996年4月2日	97502

上記の物質は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約によって、カイロン コーポレイションによってアメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）（12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland）に寄託された。受託番号は、電話番号（301）881-2600でATCCから入手可能である。

これらの寄託物は、当業者に対する便宜として提供されるに過ぎず、そして米国特許法第112条の下で寄託が必要とされることの承認ではない。これらの寄託物の核酸配列、ならびにそれによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書中に参考として援用され、そして本明細書中に記載の配列に誤りのある場合には参照されるべきである。寄託物を製造し、使用し、または販売するためには実施許諾が必要とされ得、そしてそのような実施許諾は本明細書によって与えられるわけではない。

以下の実施例は、本発明をより完全に説明するために含まれる。さらに、これらの実施例は本発明の好ましい実施態様を提供し、そしてその範囲を制限することを意図しない。以下の実施例において記載される多くの手順または適切な変更手順の標準的な方法は、例えば、「Molecular Cloning」第2版（Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987）および「Current Protocols in Molecular Biology」（Ausubelら編、Greene Associates/Wiley Interscience, NY, 1990）のような分子生物学のマニュアルに広範に改編されて提供される。

実施例

実施例 1

SIN1の単離および特徴付け

以下には、宿主の巨大分子合成の減少した阻害を示し、そして同じウイルスの溶解性、細胞病原性野生型株と比較して、脊椎動物細胞中での持続感染を確立し得るポジティブ鎖RNAウイルスの同定および分子の特徴付けが記載される。例えば、シンドビスウイルスが、アルファウイルス属の代表的な原型として使用される。

A. 野生型シンドビスウイルスストックからのSIN-1の単離、プラーク精製、および特徴付け

シンドビスウイルス改変体株の単離、分子クローニング、および特徴付けを記載する。この株は、細胞変性性の非存在下で生産的な持続感染を確立し得るが、野生型ウイルスと同等のウイルスのレベルを生成する。

高力価（ $>10^8$ PFU/ml）野生型ストックを、低MOI（ ≤ 0.1 ）でシンドビスウイルス（CMCC #4639）でのBHK細胞（ATCC番号CCL-10）の感染によって得た。感染を容易にするために、ウイルス接種物は、細胞に添加された場合に単層を覆うにちょうど十分な容量を含んだ。BHK細胞を維持し、そして全てのウイルス希釈を、10%ウシ胎児血清を補充したEagle最少必須培地中で行った。細胞を37°Cで5%CO₂大気中で培養した。「ラウンディングアップ（rounding up）」で示される大量のCPE、接着の欠失、および単層中の個々の細胞の増大

10

20

30

40

50

した光屈折、さらに単層の減少した全細胞密度を、感染後48時間(hpi)以内に観察した。細胞培養液を採集し、細胞の残骸を低速遠心分離(室温にて4,000rpmで10分間)によって除去し、そしてウイルスストックを等分して-70℃で保存した。シンドビスウイルスストックの力価を、以前に記載された(Straussら、Virology 74:154-168,1976)ようなブランクアッセイによって決定した。簡潔には、ニワトリ胚線維芽細胞(CEF)単層を、ウイルスストックの種々の希釈物で感染させ、そして単層を0.75%のアガロースを補充した培地で重層した。24~48hpiで、細胞溶解によるブランクを可視化し、そして直接あるいはアガロースの重層を除去した後にクリスタルバイオレットで染色するかのいずれかによって定量した。ウイルス力価を、ブランクを正確に定量したウイルス希釈物で感染させたサンプルから決定した。

10

DI粒子を富化させたシンドビスウイルスストックを、BHK細胞について高MOI継代(≥ 5)を繰り返すことによって得た。BHK単層を、MOI=5でシンドビスウイルスシードストックで最初に感染させた。培養培地を採集し、そして感染させた培地の完全な細胞溶解を観察した後(通常は24hpi以内)、低速遠心分離によって清澄化した。次いで、感染させた培養物から採集した清澄化した培地を、新鮮なBHK単層を感染させるために使用した。例えば、2mlのウイルス接種物を、10cmのペトリ皿中の新鮮なBHK単層に添加した。1hpi後、8mlの新鮮な培地をウイルス感染培養物に添加した。上記のように、培養培地を採集し、培養物の完全な細胞溶解の観察の後に清澄化した。このプロセスを、感染後に発生するBHK単層細胞病原性が少なくとも4日目まで遅延される速度で繰り返した。感染後の細胞病原性の開始の遅延は、ウイルス調製物中の高レベルのDI粒子の存在を示す。

20

感染させた細胞培地の複数の連続的な未希釈の継代物に由来するウイルス調製物中の高レベルのDI粒子の存在を、干渉アッセイまたはBHK感染細胞のRNA分析によって決定した。第1の方法において、相同干渉アッセイを、DI粒子の存在の測定として行った。簡潔には、BHK細胞を、上記のように調製した高力価($>10^8$ PFU/ml)の野生型ストックでMOI=10で単独で感染させた。16hpiで、ウイルス収量を、上記のようなブランクアッセイによって決定した。この実験によるウイルス収量は、代表的には $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ PFU/mlであった。別の実験群において、BHK細胞を、野生型ストック(MOI=10)および感染させた細胞培地の複数の連続的な未希釈の継代物によって調製したウイルスストック(MOI=5)で同時に共感染させた。上記のように、ブランクアッセイによって16hpiでウイルス収量を決定した。第2の実験群由来のウイルスストックが高レベルのDI粒子を含む場合、ウイルス収量は、第1の実験よりも少なくとも2~3桁少ない量(例えば、 $\leq 1 \times 10^7$ PFU/ml)である。

30

ウイルス調製物中のDI粒子の存在を示すさらに決定的な方法として、16hpiでBHK感染細胞中のウイルス特異的RNAを分析した。簡潔には、BHK細胞を、高力価($>10^8$ PFU/ml)の野生型ストック、またはDI粒子を含有するウイルスストックで感染(MOI=10)させた。偽感染コントロールおよび感染細胞をダクチノマイシン(1mg/ml)で処理し、そして1~16hpiまで $[^3\text{H}]$ ウリジン(20mCi/ml)で標識した。RNAを、感染させた細胞およびコントロール細胞から、製造業者(Tel-Test, Inc., Friendswood, Texas)に記載されるようにRN Azol Bを使用することによって単離した。あるいは、Tri-Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio)を用いるか、またはWeissら(J. Virol. 14:1189-1198, 1974)に記載されるように0.5%のTritonおよび0.5%の再結晶ナフタレンジスルホン酸を含有する緩衝液(0.05M Tris、0.1M NaCl、0.001M EDTA、pH7.5)中で溶解させた細胞のフェノール抽出を使用する従来の方法によって、RNAを単離した。RNAをグリオキサールで変性させ、そして0.01Mのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で調製した1.1%の水平なアガロースゲルを通して5V/cmで電気泳動し得る(McMasterおよびCarmichael, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:4835-4838, 1977)。あるいは、RNAを、ホルムアルデヒドゲルを通して電気泳動し得る。電気泳動後、ゲル乾燥機を用いて減圧下でゲルから全ての水分を除去し、そして乾燥させたゲルを蛍光間接撮影法で処理しそしてフィルムに曝した。ゲノムおよびサブゲノム種に対応する2つのRNA(それぞれ42Sおよび26S)を、野生型ウイルスストックで感染させたBHK細胞由来のサンプル中で観察した。対照的に、標準的な42Sおよび26S

40

50

ウイルスRNAとは異なる多数のRNA種が、DI粒子を含有するウイルスストックで感染させたBHK細胞由来のサンプル中で観察された。DI RNAに対応する複数のRNAが、野生型ウイルス由来の26S RNA種よりも小さい分子量で優先的に移動した。DI粒子を含有するウイルスストックで感染させたBHK細胞において観察される42Sおよび26S種に加えて、複数のRNAの一例が、Weissら (J.Virol.33:463-473,1980) の図3 レーン3に見られ得る。

減少された細胞病原性を有する持続感染生成性を確立し得るシンドビスウイルス改変体株を単離し、そしてDI粒子を富化されたウイルスストックから分子クローニングした。BHK細胞をDI粒子を富化させたシンドビスウイルスストックで高多重度 (MOI=5) で感染させた。細胞病原性は、野生型ウイルスでのBHK細胞の感染と比較して遅く生じるが、ほとんどの細胞は最終的に溶解し、そしてプレートから分離した。細胞の残骸および非接着性細胞を、培地の交換によって2日おきに取り除いた。最初の感染後2週間以内に、別個の異なるコロニーが観察された。これらのコロニーを成長させ、そしてこれらは、未感染のBHK細胞コントロールと比較してCPEの形態学的証拠を示さなかった。3~4週間以内で、細胞コロニーは大きくなり、そして裸眼で識別可能であった。コロニーをクローニングリングで単離し、そして細胞を3mMのEDTAまたはトリプシンのいずれかで分散させた。各コロニー由来の分散された細胞を、希釈せずに再度プレーティングした。その後、コンフルエントに到達したとき (一般に、4日以内) に細胞を1:10希釈でサブクローニングした。BHK (SIN-1) と命名した細胞のアリコート、を、長期間の貯蔵のために液体窒素中での5回の継代後に低温チューブ中に調製した。BHK (SIN-1) 細胞は、増殖速度に関しておよび形態学的に、元の未感染のBHK細胞から区別できなかった。

B. SIN-1の分子クローニング

SIN-1の実質的に低減された細胞病原性の発達に関連する、シンドビスゲノムの変異 (単数または複数) を特徴づけるために、SIN-1ピリオンからゲノムRNAを単離し、逆転写させ、そして非構造タンパク質遺伝子を含む得られたcDNAを、以下にさらに完全に記載するように配列決定した。

簡潔には、SIN-1ウイルスを、RNAの単離に使用するストックの調製の前に3回プラーク精製した。BHK (SIN-1) 細胞を上記のように増殖させ、培養液を採集し、そして種々の希釈を使用して初代ニワトリ胚線維芽細胞単層 (CEF、3%ウシ胎児血清を補充した最少必須培地中で増殖させた) を感染させた。感染後、0.5%の不活性な寒天を含有する培地を単層に添加した。さらに、DEAE-デキストラン (100 µg/mL) を、寒天重層培地中に含ませて SIN-1プラークの大きさを拡大し得る。個々の分離したプラークを、BHK (SIN-1) 培養液の適切に希釈した接種物を用いて感染させたプレート中での30°Cで3日間のインキュベーション後に観察した。3回の精製後、クローニングしたSIN-1ウイルスを、MOI=0.1で感染させたCEF細胞中に、30°Cで1回継代した。プラーク精製したSIN-1ウイルス調製物を、上記のような、干渉アッセイおよびBHK感染細胞中でのRNA分析によってDI粒子を含まないことを決定した。

BHK細胞を、プラーク精製したSIN-1ストックで感染させ (MOI=10)、持続性を確立するこの野生型シンドビスウイルス改変体株の能力を決定した。上記のように、野生型シンドビスウイルスを有するBHK細胞中での持続感染の確立は、ウイルス調製物中のDI粒子の存在、および僅かな生存細胞の増殖を可能にするための相当な時間を必要とする。対照的に、持続感染は、DI粒子がウイルス接種物中に存在するかどうかに関わらず、SIN-1改変体で37°Cで感染させたBHK細胞中で容易に確立された。SIN-1での感染後6日目に、BHK細胞は、野生型シンドビスウイルスでの重感染に完全に耐性であり、このことは、持続感染の確立を示す。しかし、これらの細胞は、異種ウイルスVSVによる感染に敏感であり、このことは、インターフェロンがSIN-1持続感染の確立に関与しないことを示す。

CEF細胞を、プラーク精製したSIN-1ストックで感染させ (MOI=10)、RNAの単離のために高力価のウイルスストックを生成した。90mlの培養液 (2×10^{10} PFU/ml) を、Sorvall GSAローター中で2,500rpmで5分間の遠心分離によって清澄化した。SIN-1ウイルスを、SW27.1ローター中で2時間、24,000rpm、4°Cでの遠心分離によって清澄化した培養液からペレット化した。次いで、ウイルスペレットを3mlの培養培地中に再懸濁し、ピペティング

を繰り返すことによってホモジナイズし、そして25～40% (w/w) のスクロース勾配の上に重層した。次いでこれを、SW27.1ローター中で4時間、24,000rpmで4℃で遠心分離した。ウイルスのバンドを白熱光の照射で可視化し、そして22ゲージ針／シリンジで採集した。RNAをProteinase K (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) 消化 (56℃、1時間)、続いてH₂O-飽和フェノール：クロロホルム (1:1v/v、pH7.0) の等容量での抽出、続く2容量のエタノールおよび0.3M酢酸ナトリウム (pH5.2) での沈澱によってさらに精製した。

あるいは、SIN-1ウイルスを、感染させたBHK細胞培養培地のポリエチレングリコール沈澱 (Straussら、Virology 133:154-168,1976)、あるいはスクロースクッションを通してピペッティングすること (Poloら、J.Virol.62:2124-2133,1988) によってさらに精製し得る。

2回の第1鎖cDNAの合成を、モロニーマウス白血病ウイルスまたはSuperScript II逆転写酵素 (Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland) を使用して製造者によって推奨される条件に従って、精製したウイルスRNAを用いて行った。6回の別々の反応を、以下に示すポジティブ鎖に相補的なシンドビスウイルス特異的プライマー (Rで示されるプライマー) を用いて行った。Rで示される全てのプライマーは、クローニングを容易にするために、第1鎖の合成反応の前にポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs) を用いてそれらの5'末端でリン酸化されていた。

プライマー	位置	配列番号	配列 (5'→3')	酵素配列	
T7/1F	<i>Sac</i> I/T7/1-20	2	GGTGGAGCTCTAATACGACT CACTATAGATTGACGGCGTA GTACACAC	<i>Sac</i> I	20
1465R	1465-1451	3	AATTTCTGCCTCAGC	<i>Eco</i> 47 III	
1003F	1003-1019	4	TATGCAAAGTTACTGAC	<i>Eco</i> 47 III	
2823R	2823-2806	5	CTGTCATTACTTCATGTC	<i>Bsp</i> HI	
1003F	1003-1019	4	TATGCAAAGTTACTGAC	<i>Eco</i> 47 III	30
4303R	4303-4289	6	GCGTGGATCACTTTC	<i>Avr</i> II	
4051F	4051-4069	7	ATTGCGTGATTTCGTCCGT	<i>Avr</i> II	
8115R	8115-8101	8	TAAATTTGAGCTTTG	<i>Pml</i> I	
1680F	1680-1689	9	GGCATATGGCATTAGTTG	<i>Bsp</i> HI	
8115R	8115-8101	8	TAAATTTGAGCTTTG	<i>Pml</i> I	
8034F	8034-8052	10	CTGGCCATGGAAGGAAAGG	<i>Pml</i> I	40
11,703R	<i>Xho</i> I/dT ₂₁ / 11703-11677	11	CCCCTCGAGGGT(21)GAAATG TTAAAAACAAAATTTTGTTG	<i>Xho</i> I	

上記のcDNAテンプレート由来の第2鎖の合成を、製造者により推奨される条件に従ってDNAポリメラーゼ I のKlenowフラグメント (New England Biolabs, Beverly, MA) を用いて、6つの別々の反応において達成した。ネガティブ鎖に相補的なシンドビスウイルス特異的プライマー (上記でFで示されるプライマー) を使用した。二本鎖DNA産物を、全長のシンドビスウイルスゲノムを含有するプラスミドTotol101 (Riceら、J.Virol, 61:3809-3819, 1987) 中の対応する領域と段階的に置換した。例えば、T7/1F-1465R産物を*Sac*IおよびEc

10

20

30

40

50

o47IIIで消化し、SacI/Eco47III消化しそしてCIAP処理したToto1101プラスミド（これは、1%アガロース/TAE（50×/リットル：242g Tris base/57.1ml氷酢酸/100ml 0.5M EDTA pH8.0）電気泳動およびGENECLEAN IIによりSacI/Eco47III小フラグメント（SP6プロモーター、シンドビスウイルスnt 1-1407）から精製した）中に挿入した。次いで、この構築物をEco47IIIおよびAvrII（それぞれ、シンドビスウイルスnt番号1407および4281）で消化し、CIAPで処理し、続いてEco47IIIおよびAvrIIで消化した1003F-4303R産物から単離した3300bpのフラグメントを挿入した。完全に組み立てたクローンを、pRSIN-1g（gは、全長のゲノムクローンを意味する）と命名し、これは11,703bpのウイルスゲノム全体を含む。先の表に列挙したプライマーのサブセットは、SIN-1ゲノム中の重複する二本鎖DNA反応産物を生成した。例えば、4051F/8115R産物中の配列は、1680F/8115R産物中に存在する。これらの重複する産物を、SIN-1ゲノムクローンのための別の構築物として提供する。すなわち一般に、cDNAクローニングの効率は所望のフラグメントの長さと反比例する。

10

上記の方法によって得られなかったウイルスゲノムの一部をクローニングするために、SIN-1 RNAウイルスゲノムを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によってクローニングした。第1鎖の合成を上記のように達成した。上記のプライマー対を使用するシンドビスcDNAのPCR増幅を、Klentaq1酵素およびBarnes（Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:2216-2220,1994）に記載されるような反応条件を使用して、別々の反応として行った。あるいは、サーマラーゼ（Thermalase）熱安定性DNAポリメラーゼ（Amresco Inc., Solon, OH）を、供給者によって提供される1.5mM MgCl₂を含有する緩衝液を使用してKlentaq1酵素について置換した。あるいは、Vent_R熱安定性DNAポリメラーゼ（New England Biolabs, Beverly, MA）を増幅反応に使用した。さらに、反応は、5%DMSOおよび「HOT START WAX」ビーズ（Perkin-Elmer）を含んだ。使用したPCR増幅プロトコールを以下に示す（72°Cでの伸長インキュベーション期間を、テンプレートDNAの1 kbあたり1分に調節した）：

20

	温度 (°C)	時間 (分)	サイクル数
(a)	95	2	1
(b)	95	0.5	
	55	0.5	35
	72	3.5	
(c)	72	10	1

30

あるいは、全長のSIN-1 RNAゲノムのクローニングを、以前に記載された（Dubenskyら、J.Virol.70:508-519,1996）方法に類似の方法で行い得る。簡潔には、第1鎖cDNAの合成を、ランダムヘキサマープライマー（50ng/mlの反応濃度）（Invitrogen, San Diego, California）および配列が以下の表に示されるプライマー4Bの混合物を用いて達成する。次いで、ゲノム長シンドビスウイルスSIN-1改変体cDNAを、PCRによって増幅する。重複するプライマーの6つの対を使用する6つの異なるセグメントが、全ゲノムをクローニングするために十分である。ウイルス相補配列に加えて、SIN-1の5'末端正方向プライマーは、細菌のSP6 RNAポリメラーゼプロモーターおよびその5'末端に連結されたApaI制限エンドヌクレアーゼ認識配列に対応する19ヌクレオチド配列を含む。細菌のSP6 RNAポリメラーゼは維持されて、その結果、インビトロの転写は、真正のシンドビスウイルスの5'末端に対応するAリボヌクレオチドに連結された単一の非ウイルス性Gリボヌクレオチドのみの封入を生じる。ApaI認識配列の封入は、プラスミドベクターpKSII⁺（Stratagene, La Jolla, California）ポリリンカー配列中へのPCRアンプリコンの挿入を容易にする。5ヌクレオチドの「緩衝配列」伸長がまた、効率的な酵素消化を容易にするためにApaI認識配列の上流に連結される。SP6-5' SIN-1正方向プライマーおよび全体のSIN-1ゲノムの増幅に必要な全てのプライマー対の配列が、以下の表に示される（本明細書中以後利用される「nt」および「nts」が、それぞれ「ヌクレオチド（単数）」および「ヌクレオチド（複数）」

40

50

を意味することに注意」)。参考配列 (GenBank登録番号J02363、遺伝子座：SINCG) は、Straussら、Virology 133:92-110,1984による。

プライマー 位置		配列番号	配列 (5'→3')	認識配列
SP6-1A	<i>Apa</i> I/SP6/ SIN nts.1-18	12	TATATGGGCCCCGATTAGGTGAC ACTATAGATTGACGGCGTAGTAC AC	<i>Apa</i> I
1B	3182-3160	13	CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC	<i>Age</i> I
2A	3144-3164	14	ATACTAGCCACGGCCGGTATC	<i>Age</i> I
2B	5905-5885	15	TCCTCTTTCGACGTGTCGAGC	<i>Eco</i> RI
3A	5844-5864	16	ACCTTGAGCGCAATGTCCTG	<i>Eco</i> RI
7349R	7349-7328	17	CCTTTTCAGGGGATCCGCCAC	<i>Bam</i> HI
7328F	7328-7349	18	GTGGCGGATCCCCTGAAAAGG	<i>Bam</i> HI
3B	9385-9366	19	TGGGCCGTGTGGTCGTCATG	<i>Bcl</i> I
4A	9336-9356	20	TGGGTCTTCAACTCACCGGAC	<i>Bcl</i> I
10394R	10394-10372	21	CAATTCGACGTACGCCTCACTC	<i>Bsi</i> WI
10373F	10373-10394	22	GAGTGAGGCGTACGTCGAATTG	<i>Bsi</i> WI
4B	Xba I/T ₃₅ / 11703-11698	23	TATATTCTAGA(T ₃₅)GAAATG	<i>Xba</i> I

上記のプライマー対を用いるシンドビスcDNAのPCR増幅を、ThermalaseまたはVent_RDNAポリメラーゼ (上記)、上記のような反応条件およびPCR増幅条件を使用して別々の反応として行う。

増幅産物間の配列重複の領域は、PCRアンプリコン内の単一の酵素認識部位に対応する。PCR産物を精製し (QIAquick PCR精製キット、Qiagen,Chatsworth,California)、pKSII⁺ベクターの*Apa*Iおよび*Xba*I部位の間に段階的に挿入した。完全に組み立てたクローンをpKSRSIN-1g (gは全長のゲノムクローンを意味する) と命名し、そしてこれは、11,703bpのウイルスゲノム全体を含む。

C. SIN-1表現型の配列

pRSIN-1gクローンのSIN-1特異的ヌクレオチド配列を、ジデオキシ鎖終結法によって決定した。ウイルス配列の8,000bpの配列比較は、本明細書中に記載のSIN-1クローンとGenBank (GenBank受託番号第J02363号、遺伝子座：SINCG) において提供されるシンドビスウイルス (HRsp株) 配列との間の複数の差異を明らかにした。SIN-1 (図6)、SINCG (図7)、およびToto1101 (図8) の間の配列における差異を以下に示す。

nt. 位置	遺伝子	SINCG		Toto 1101		SIN-1	
		nt	aa	nt	aa	nt	aa
45	5' NTR	T	--	T	--	C	--
120	nsP1	C	Gln	C	Gln	A	Lys
1775	nsP2	G	ヌル	G	ヌル	A	ヌル
1971	nsP2	T	Phe	T	Phe	C	Leu
2992	nsP2	C	Pro	T	Leu	T	Leu
3579	nsP2	A	Lys	G	Glu	G	Glu
3855	nsP2	C	Pro	C	Pro	T	Ser
3866	nsP2	C	ヌル	C	ヌル	T	ヌル
4339	nsP3	A	Glu	A	Glu	T	Val
4864	nsP3	C	Ser	C	Ser	T	Phe
5702	nsP3	A	ヌル	T	ヌル	T	ヌル
5854*	nsP4	G	Arg	G	Arg	A	His
7612	連結	A	--	A	--	T	--
7837	キャプシド	C	Arg	C	Arg	T	Cys

*この変異は1つのcDNAクローンにおいて見出された。これはSIN-1ウイルスRNAが配列決定された場合には検出されなかった。これはRNA集団におけるマイナーな種を表しているようである。

配列変化が本明細書中に記載のクローンに独特である（そしてクローン化人工産物の結果ではない）という証明を、上記のRT-PCRによりSIN-1ビリオンRNAを増幅し、問題のヌクレオチドを含む配列をRT-PCRアンプリコン産物の直接の配列決定によって確立し、そしてその配列を対応するSIN-1配列と比較することによって決定した。

D. 分子クローンを用いるSIN-1表現型の特徴付けおよび遺伝子マッピング：

SIN-1ゲノムの種々の領域によって、存続性の確立のための表現型の位置をマッピングするために、Toto1101プラスミドの対応する野生型シンドビスウイルス領域を置換した（Riceら, J. Virol. 61:3809-3819, 1987）。以下の表に例示するように、種々のSIN nsP遺伝子によって、pRSIN-1gから精製した制限酵素フラグメントを使用して、Toto1101野生型シンドビスウイルスバックグラウンドを置換した。

nsP 遺伝子	制限フラグメント	ヌクレオチド座標	クローン名
nsP1	<i>Ple</i> I/ <i>Eco</i> 47III	98-1407	pRSIN-1nsP1
nsP2	<i>Eco</i> 47III/ <i>Avr</i> II	1407-4281	pRSIN-1nsP2
nsP2-N 末端	<i>Eco</i> 47III/ <i>Bgl</i> II	1407-2289	pRSIN-1nsP2-N
nsP2-C 末端	<i>Bgl</i> II/ <i>Avr</i> II	2289-4281	pRSIN-1nsP2-C
nsP3-4	<i>Avr</i> II/ <i>Eco</i> RI	4281-5870	pRSIN-1nsP3
nsP3	<i>Avr</i> II/ <i>Spe</i> I	4281-5262	pRSIN-1nsP3
nsP4	<i>Spe</i> I/ <i>Aat</i> II	5263-5870	pRSIN-1nsP4
nsP1-4	<i>Ple</i> I/ <i>Aat</i> II	98-8000	pRSIN-1nsP1-4

10

非構造遺伝子コード領域の座標を以下の表に提供する：

nsP 遺伝子	シンドビスウイルスゲノムの座標 (nt. 番号)
---------	-----------------------------

nsP1	60-1680
nsP2	1680-4101
nsP3	4101-5769
nsP4	5769-7597
nsP1-4	60-7597

20

種々の SIN-1、Toto、およびキメラ SIN-1/Toto クローン、pRSIN-1g、Toto、pRSIN-1nsP1、pRSIN-1nsP2、pRSIN-1nsP2-N、pRSIN-1nsP2-C、pRSIN-1nsP3、pRSIN-1nsP4、および pRSIN-1nsP1-4 を、*Xho* I での消化によって直線化した。これによって、シンドビスウイルス 3' 末端（ウイルス nt.11703）に続くポリ dA:dT トラクトに直ちに隣接し、そしてその 21 ヌクレオチド下流にある cDNA クローン中の単一のカットが作製された。直線化クローンを GENE CLEAN II (BIO 101, La Jolla, California) で精製し、そして 0.5 µg/µl の濃度に調整した。直線化クローンの転写を、以下の反応条件に従って、40°C にて 90 分間、インビトロで実施した：2 µl DNA/4.25 µl H₂O；10 µl 2.5mM NTP (UTP、ATP、GTP、CTP)；1.25 µl 20mM Me7G (5') ppp (5') G キャップアナログ；1.25 µl 100mM DTT；5 µl 5×転写緩衝液 (Promega, Madison Wisconsin)；0.5 µl RNasin (Promega)；0.25 µl 10 µg/µl ウシ血清アルブミン；および 0.5 µl T7 RNA ポリメラーゼ (Promega)。インビトロ転写反応産物を DNase I (Promega) で消化し、連続的なフェノール:CHCl₃ およびエーテル抽出、ならびに続くエタノール沈澱によって精製した。あるいは、インビトロ転写反応産物を、トランスフェクションのために直接使用し得る。インビトロ転写反応産物または精製 RNA を、市販の陽イオン性脂質化合物 (LIPOFECTIN, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) と複合体化し、そして 75% のコンフルエンスで 60mm ペトリ皿中に維持された Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21) 細胞に適用した。あるいは、BHK 細胞をインビトロ転写反応産物または精製 RNA と共に、以前に記載されたように (Liljestrom, Bio/Technology 9:1356-1361, 1991) 正確にエレクトロポレートした。トランスフェクトした細胞を 37°C でインキュベートした。トランスフェクト後 48 時間にて培養培地を収集し、そして各ウイルスの力価を、上記のようにプラークアッセイによって決定した。これらのインビトロ転写反応に由来する、力価測定したウイルスストックを、以下の表に示すように命名した。

30

40

クローン名	ウイルス名
pRSIN-1nsP1	SIN-1nsP1
pRSIN-1nsP2	SIN-1nsP2
pRSIN-1nsP2-N	SIN-1nsP2-N
pRSIN-1nsP2-C	SIN-1nsP2-C
pRSIN-1nsP3-4	SIN-1nsP3-4
pRSIN-1nsP3	SIN-1nsP3
pRSIN-1nsP4	SIN-1nsP4
pRSIN-1nsP1-4	SIN-1nsP1-4
Toto 1101	Toto

SIN-1存続性表現型をマッピングするために、 8×10^5 のBHK細胞を上記で調製したウイルスストックの各々で感染させた（MOI = 5）。感染後3日にて、培養の生存性をトリパンブルー色素排除によって決定した。この実験の結果（以下に示す）は、存続性非細胞破壊感染を確立するSIN-1表現型が、非構造遺伝子をマッピングし、そして特にnsP2遺伝子をマッピングすることを実証した。偽感染培養における細胞の数は、これらの細胞が定常期に達するまでの継続した増殖を表す。3dpiにて、SIN-1nsP1、SIN-1nsP3、SIN-1nsP3-4、およびSIN-1nsP4に感染した細胞は全て死滅した。SIN-1nsP2およびSIN-1nsP4での感染を生き抜いた細胞は増殖し続け、そしてこれをシンドビスウイルスに特異的な抗体での染色に基づいて持続的に感染させた。

ウイルス	3dpiにおける細胞数
SIN-1nsP1	0
SIN-1nsP2	3×10^5
SIN-1nsP3-4	0
SIN-1nsP3	0
SIN-1nsP4	0
SIN-1nsP1-4	5×10^5
Toto	0
偽感染	1×10^7

上記のように、非細胞破壊存続性感染を確立する観察されたSIN-1表現型は、sPとは反対にnsPをマッピングする。この結論は、TotoまたはSIN-1nsP1-4ウイルスストックに感染した培養間での細胞生存レベルの比較によって明確に実証された。TotoおよびSIN-1nsP1-4ウイルスの両方が、野生型sPを含有する；しかし、SIN-1クローンに由来するnsPを含有するウイルス（SIN-1nsP1-4）に感染したそれらの培養においてのみ、細胞生存が観察された。これらの実験において、細胞生存はシンドビスウイルスsPの供給源に依存しない。重要なことに、SIN-1表現型は、さらにnsP2にマッピングされた。細胞生存のレベルは、SIN-1nsP1-4またはSIN-1nsP2ウイルスに感染した培養間で匹敵していた。さらに、SIN-1nsP2遺伝子中のヌクレオチド3855におけるC→T転位は、SIN-1ウイルス感染細胞における存続性感染の確立の特徴的な表現型を担っている。キメラウイルスSIN-1nsP2-C感染細胞中で産生されたnsP2タンパク質における単一のプロリンからセリンの変化が、感染細胞の全てを死滅させたウイルス由来の野生型シンドビスウイルス（Toto 1101）を、感染細胞の多

くが生存しそしてウイルスを産生し続けるのを可能にするウイルスに転換するのに必要な全てであった。TotoバックグラウンドへのSIN-1 nsP1、nsP3、またはnsP4遺伝子の挿入に由来するキメラウイルスの表現型は、野生型から区別不可能であり、そして完全な溶解が、これらのウイルスに感染した培養において観察された。

SIN-1 nsPにおけるアミノ酸変化の、BHK細胞における増殖性感染のレベルに対する可能な効果を、種々のSIN-1、野生型 (Toto)、またはSIN-1/Totoキメラ株で接種したBHK細胞における、一定期間にわたるウイルス収量を比較することによって決定した。簡潔には、BHK細胞を、SIN-1 (上記のプラーク精製したストック)、Toto、SIN-1nsP1-4、またはSIN-1 nsP2ウイルスで感染させ (MOI=20)、そして培養液を感染後3、6、9、および12時間にて収集した。次いで、培養液中のウイルスの力価を、上記のようにプラークアッセイによって決定した。この研究の結果 (図2に示す) は、等価なレベルのウイルスが、野生型またはSIN-1株に感染したBHK細胞において産生されたことを実証した。12hpiの時点における実際のウイルス力価を、以下の表に示す。BHK細胞の半分より多くが、野生株と等価なウイルス産生のレベルと組み合わせたSIN-1ウイルス (およびSIN-1nsP1-4、またはSIN-1 nsP2を含有するキメラウイルス) での感染を生き抜いた。

ウイルス 12hpi($\times 10^9$)における力価(PFU/ml)

SIN-1	3.6
Toto	2.7
SIN-1nsP1-4	1.8
SIN-1nsP2	2.6

SIN-1 nsPにおけるアミノ酸変化の、ウイルス特異的RNA合成のレベルに対する可能な効果を、種々のSIN-1、野生型 (Toto)、またはSIN-1/Totoキメラ株で接種したBHK細胞における、一定期間にわたる [^3H] -ウリジン取り込みのレベルを比較することによって決定した。BHK細胞 (3×10^5 細胞/35mm皿) を、本明細書中に記載の条件に従って37°Cで増殖させた。細胞を、SIN-1、Toto1101、SIN-1nsP1-4、またはSIN-1nsP2ウイルスで感染させた (MOI=20)。感染後30分にて、培養培地を1 $\mu\text{g/ml}$ アクチノマイシンDに調整した。さらなる30分のインキュベーションの後、培養培地を10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] -ウリジンに調整した。3、6、9、および12hpiにて、処理した細胞をPBSで洗浄し、そして200 μl のTTE緩衝液 (0.2% Triton X-100、10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA) の添加によって溶解させた。このRNAを、200 μl の25% トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液の添加によって4°Cで沈澱させた。このRNAを、14,000rpmで5分間の微小遠心分離 (microcentrifugation) によってペレット化し、5% TCAで1回リンスし、そして50mM NaOH/0.1% SDSからなる溶液に55°Cで溶解させた。溶解したRNAを含有する溶液を、シンチレーションバイアルに移し、そして取り込まれた [^3H] -ウリジンのレベルを、EcoLume (ICN, Irvine, CA) シンチレーション液を使用して決定した。この研究の結果 (図3に示す) は、ウイルス特異的RNAのレベルが、SIN-1感染BHK細胞において野生型と比較して劇的に低いことを実証した。この低レベルのウイルス特異的RNA合成の表現型は、SIN-1またはSIN-1nsP1-4株に感染したBHK細胞において産生される、野生型と比較して同等に低いレベルのRNAによって示されるように、nsPにマッピングする。

ウイルス $[^3\text{H}]$ ウリジン取り込み ($\times 10^3$ cpm)

SIN-1	22
Toto1101	86
SIN-1nsP1-4	28
SIN-1nsP2	62
偽感染	8

感染したBHK細胞におけるウイルス特異的RNA合成もまた、SIN-1株、Toto株、およびSIN-1/Totoキメラ株の全てを使用して決定した。9 hpiでの野生型感染 (Toto) と比較しての $[^3\text{H}]$ -ウリジン取り込みのレベルを、図4に示し、そして以下の表に提供する。

ウイルス	実験回数	相対的RNA 合成レベル	標準偏差
Toto1101	9	1.0	
SIN-1	9	0.1	± 0.1
SIN-1nsP1-4	8	0.2	± 0.1
SIN-1nsP1	7	1.0	± 0.2
SIN-1nsP2	8	0.6	± 0.1
SIN-1nsP3	4	1.0	± 0.0
SIN-1nsP3-4	7	0.4	± 0.1
SIN-1nsP4	6	0.8	± 0.1
SIN-1nsP2-N	1	0.9	
SIN-1nsP2-C	3	0.6	± 0.2
偽感染	9	0.0	

従って、BHK細胞はSIN-1ウイルス（およびSIN-1 nsP1-4、またはSIN-1 nsP2を含有するキメラウイルス）での感染を生き抜き、野生型株と同等のSIN-1ウイルスレベルがBHK細胞において産生され、そして合成されたウイルス特異的RNAのレベルは、野生型ウイルスと比較して10倍低かった。

SIN-1 nsPにおけるアミノ酸変化の、宿主細胞タンパク質合成の阻害のレベルに対する可能な効果を、種々のSIN-1、野生型 (Toto)、またはSIN-1/Totoキメラ株で接種したBHK細胞における一定期間にわたるタンパク質合成のレベルを、非感染細胞に対して比較することによって決定した。簡潔には、 2×10^5 BHK細胞で播種した35mm皿を、PBS/ 1 % ウシ胎児血清からなる緩衝液中0.5mlウイルス接種材料中の種々のシンドビスウイルス株で感染させた (MOI=20)。プレートを4℃で1時間、穏やかに振盪させながらインキュベートした。接種材料を、上記のように、10%ウシ胎児血清を含有する2mlの培地（前記）で置換し、そして皿をCO₂インキュベーター中に37℃で配置した。5、8、および11時間後に、培地を2%のウシ胎児血清を有する2mlのメチオニン欠乏MEM (Met-) で置換し、そして30分間インキュベートした。次いで培地を2%ウシ胎児血清および10 $\mu\text{Ci/ml}$ の $[^3\text{S}]$ メチオニンを含有する1mlのMEM (Met-) で置換した。37℃で30分間のインキュベーションに続いて、10%のウシ胎児血清を含有する1mlの培地を各ウェルに添加し、そして皿を37℃でさらに30分間インキュベートした。この希釈は、タンパク質への放射活性標識のさらなる取り込みを阻害するのに十分であり、そしてポリアクリルアミドゲル中で検出される遊離の $[^3\text{S}]$ メチオニンのバックグラウンドを有意に減少させる。次いで、培地をウェルから取り出した。細胞をPBSで3回洗浄し、皿からPBSへと削ぎ落とし、遠心分離によ

ってペレット化し、そして25 μ lのローディング緩衝液 (0.06M Tris-HCl (pH6.7)、2 % SDS、5 % β -メルカプトエタノール、5 % グリセロール、0.05% プロモフェノールブルー) 中に溶解させた。サンプルの5分の1をゲル上で分析した。電気泳動の後、ゲルをCoomassieブリリアントブルーRで染色し、乾燥させ、そしてオートラジオグラフした。宿主細胞タンパク質合成の障害の速度を、宿主タンパク質のみを含有するゲルの切片における放射活性の量を定量化することによって比較した。この研究の結果 (図5に示す) は、宿主細胞タンパク質合成の障害のレベルが、SIN-1ウイルス感染細胞において、野生型ウイルス感染細胞と比較して有意に低く、特に、より早期である感染後6時間および9時間の時点において低いことを実証する。

要約すると、BHK細胞はSIN-1感染を生き抜き、野生型株と等価なウイルスレベルがBHK細胞において産生され、合成されるウイルス特異的RNAのレベルは野生型ウイルスよりも10倍低く、そしてSIN-1ウイルス感染細胞における宿主細胞タンパク質合成の障害のレベルは、野生型ウイルス感染細胞と比較して有意に低い。本明細書中に記載のSIN-1ウイルスの表現型は、ウイルスnsP遺伝子にマッピングする。

実施例 2

宿主巨大分子合成の減少した障害を示すポジティブ鎖RNAウイルスの単離および特徴付け
宿主細胞巨大分子合成の減少した障害、遅延した障害、または障害なしの所望の表現型を示すウイルス改変体の誘導は、野生型ウイルスの配列と異なる配列の生成、特徴付け、および単離に依存する。しかし、実施例1を除いて、このウイルスに基づく巨大分子合成の障害の改変、または溶解性ではなく持続性の感染を導くウイルスの生成の改変を生じるコードまたは非コードウイルス配列変化を選択または同定するための、明白な方法または以前に開示された方法は全く存在しない。この実施例は、特異的な方法を提供し、そしてこれらの障害を克服することを可能にする。

A. ウイルス改変体の生物学的選択

宿主巨大分子合成の減少した障害、遅延した障害、または障害なしを生じるか、あるいは持続性感染を確立するウイルス改変体の生物学的誘導を、細胞内での自然突然変異を可能にするか、あるいは最初に所望のウイルスストックを物理的、化学的、または他の人工的な変異誘発に供した後に感受性細胞を感染させ、そして変異したウイルスを有するこれらの細胞集団について連続的に富化することにより、実施し得る。事前の変異誘発は、必要ではないが、適切な変異の発生を促進することが可能である。選択は、所望の改変体に感染した細胞が、野生型ウイルス感染細胞よりも有意に長い期間生存する能力に基づく。以下の実施例は、例としてシンドビスウイルスを使用して、詳細な方法を提供する；しかし、詳細な説明において記載したように、他のウイルスが容易に代用される。

具体的には、化学的変異誘発の場合には、 10^9 pfu/ml以上の力価を有するシンドビスウイルスストック懸濁物を、最終濃度100 μ g/mlのニトロソグアニジンで処理する。室温にて15分の後、ニトロソグアニジンを4 $^{\circ}$ Cでの透析によって除去し、そして変異誘発されたストックを引き続いて感染に使用する。フラットストック培養中で増殖させた約 5×10^6 の所望のタイプの細胞 (例えばBHK-21) を、全ての細胞が感染することを保証するために、約5の感染多重度 (M.O.I.) で変異誘発したウイルスで感染させる。感染後12、24、36、および48時間にて、細胞単層を新たな培地で2回洗浄して死滅細胞を除去し、そして50%の新たな培地と50%の馴化培地との混合物からなる培地に置換する。感染後の所望の時間 (例えば72時間) の後、残存する細胞を穏やかにトリプシン消化してそれらを培養皿から脱着させ、そして細胞に付随する細胞外ウイルスを剥ぎ落とし、次いでこれを分画遠心分離によって細胞から分離する。次いで、残存する細胞を、セミコンフルエントな非感染細胞単層を含有する組織培養皿中に、 10^3 の非感染細胞毎に1つの感染細胞の比で直接再播種する。さらなる回数を選択を、増幅のために非感染細胞上に播種し、続いて上記の洗浄および採取工程を行うことによって実施した。あるいは、初期感染を、野生型ウイルスストックを使用して低M.O.I.で実施し、細胞内での複製の間の自然突然変異を可能にし得る。このアプローチを使用して、変異体ウイルスの異種集団を、感染細胞によって産生する。トリプシン消化後に回収された感染細胞の集団が、有意な数の非生存細胞または重大な

損傷を受けた細胞を含むような例においては、17mM Tris (pH7.65、HClによる) 中の0.75 %NH₄Clでの簡単な処理 (室温で5分間)、またはPercoll™による遠心分離が、非感染細胞単層上への再播種に先立っての残存する死滅細胞または損傷細胞の除去に含まれる。最小の連続する2回の選択の後、所望の表現型を示すウイルス改変体を、限界希釈またはプラーク精製によって単離し、そして実施例1に記載のようにcDNAクローニングに供する。改変体表現型を担う特異的配列の単離および特徴付けを、実施例において概説するように、ゲノムクローンまたは発現ベクター内をcDNAの規定の領域で置換し、そしてそれに伴う表現型変化を試験することによって達成する。

B. ウイルス改変体の遺伝的選択

関連するアプローチにおいて、自然変異またはランダム変異誘発を、ウイルスストック上ではなく、むしろインビトロまたはインビボで感染性ウイルスRNAへと転写され得るウイルスのクローン化されたゲノムcDNAを使用して、実行した。例えば、事前の変異誘発において、プラスミド、pRSING (バクテリオファージSP6プロモーター (Dubenskyら, J.Virol. 70:508-519, 1996) に機能的に連結した全長のゲノムシンドビスcDNAを含有する) を、コンピテントなE.coli XL1-Redミューテーター細胞中に形質転換し、そしてアンピシリンプレート上にプレーティングしてコロニーを得る。少なくとも200のコロニーをランダムに選択し、プールし、そして一晩の増殖のためにアンピシリンを含有する10mlのブロス培養物中に接種する。プラスミドDNAを培養から調製し、種々の変異を有するpRSINGの異種集団を得る。DNAをXba Iを用いて直線化し、そして以前に記載されたようにSP6ポリメラーゼを使用してインビトロで転写した (Riceら, J.Virol. 61:3809-3819, 1987)。RNA転写物を、シンドウイルス感染サイクルの開始のために、エレクトロポレーション (Liljestrom およびGaroff, Bio/Technology 9:1356-1361, 1991) によって所望の細胞タイプ (例えば、BHK細胞) 中へ引き続きトランスフェクトした。あるいは、変異誘発されていないテンプレートからインビトロ転写されたRNAもまた、トランスフェクトし得る。持続性感染を確立するか、あるいは宿主巨大分子合成の減少した阻害、遅延した阻害、または阻害なしを示すウイルス変異体の選択を、上記のように実施する。所望の表現型を有する選択されたウイルス改変体を、限界希釈またはプラーク精製によって単離し、cDNAクローニングに供し、そして改変体表現型を担う配列を上記のように単離および特徴付けする。

C. ウイルス由来ベクターを使用する改変体の遺伝子選択

1. 免疫原性タンパク質を発現するベクター

別のアプローチにおいて、自然細胞内変異またはランダム変異誘発を、ウイルスに基づく発現ベクターのウイルス由来配列上で実施する。これらの配列は、非コード領域および調節領域、ならびに非構造タンパク質コード領域を含む。特定の例においては、構造タンパク質コード配列もまた含まれる。このようなランダム変異誘発または自然細胞内変異を、インビトロまたはインビボでRNAへと転写され得るウイルス由来ベクターのクローン化cDNAと共に、本発明に記載される任意の技術を使用して実施し得る。例えば、複製にコンピテントなシンドビスウイルス発現ベクターを使用して、感染細胞に添加された特異的抗体によって結合され得る免疫原性細胞表面タンパク質または他のペプチドを発現させ得る。機能性ベクターを有する細胞を、ベクターにコードされる異種抗原の発現、およびコードされる抗原に特異的な抗体によって結合される能力によって同定する。選択プロセスを長期間にわたって生存する細胞 (上記を参照のこと) に限定することにより、所望の表現型を示すベクター改変体を有する細胞のみを富化する。

具体的には、異種遺伝子の発現のための複製されたサブゲノムプロモーターを有する全長のゲノムシンドビスcDNAに作動可能に連結されたSP6プロモーターを含む、プラスミドpTE3' 2J (Hahnら, J.Virol. 89:2679-2683, 1992) を、上記のようにランダム変異誘発に供する。このプロセスは、ランダム変異誘発を含有する異種プラスミドの集団の単離を生じる。並行して、所望の異種細胞表面タンパク質またはマーカーペプチド遺伝子を、変異誘発したpTE3' 2Jベクターへの挿入のためのシャトルベクター中にクローン化する。マーカーとしての使用に好ましい細胞表面タンパク質は、ヒトB7.1 (Freemanら, J.Immunol. 143:2714-2722, 1989) およびマウスH-2K^bクラスI分子 (Songら, J.Biol.Chem. 269:7024-7029, 1

10

20

30

40

50

994)を含む。ヒトB7.1遺伝子を、隣接するXbaIおよびBamHI部位を含有するように設計された以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、全長のcDNA配列を含有するpCDM8ベクター (Freemanら, 同書) から、1.5分間の伸長での標準的な3サイクルPCRによって増幅する。

正方向プライマー : hB7.1FX (5'-制限部位/B7.1配列) (配列番号24)

5'-ATATATCTAGA/GCCATGGGCCACACACGGAGGCAG-3'

逆方向プライマー : hB7.1RB (5'-制限部位/B7.1配列) (配列番号25)

5'-ATATAGGATCC/CTGTTATACAGGGCGTACACTTTC-3'

増幅に続いて、約875bpのDNAフラグメントを、QIAquick-spin PCR精製キット (Qiagen, Chatsworth, CA) を使用して精製し、XbaIおよびBamHIで消化し、そしてシンドビスシャトルベクター-pH3' 2J1 (Hahnら, 同書) (これもまたXbaIおよびBamHIで消化されており、仔ウシ腸アルカリホスファターゼで処理されている) 中に連結し、構築物pH3' B7.1を作製した。

pTE3' 2J二重サブゲノムベクターのランダム変異誘発に続いて、上記のように、プラスミドpH3' B7.1およびプラスミドpTE3' 2Jの変異した集団を、ApaIおよびXhoIで消化し、GENE CLEAN II IITM (Bio101, Vista, CA) を使用して0.7%アガロースゲルから精製し、そしてB7.1発現ベクターの異種集団 (pTE3' B7.1と称する) を形成するように連結した。E.coliの形質転換および個々のクローンの単離なしに、連結されたベクターの完全な集団をXhoIで直線化し、そして上記のようなインビトロSP6転写反応のためのテンプレートとして使用する。次いで、ランダム変異誘発したB7.1ベクター転写物の異種集団を、シンドビス複製サイクルの開始のために、所望の細胞タイプ (例えば、BHK細胞) 中にエレクトロポレートする。持続性感染を確立するか、あるいは宿主巨大分子合成の減少した阻害、遅延した阻害、または阻害なしを示すウイルス変異体の選択を、B7.1に特異的なモノクローナル抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) 、および磁気細胞選別または蛍光活性化細胞選別のいずれかのプロトコルを使用して実施する。好ましい二次抗体タグは、磁気細胞選別のための磁気マイクロビーズと結合したラット抗マウスIgG (miniMACS Magnetic Separation System, Miltenyi Biotec, Auburn, CA; Miltenyiら, Cytometry 11:231-238, 1990) 、および蛍光活性化細胞選別のためのFITC結合ラット抗マウスIgG (Pharmingen, San Diego, CA) を含む。このようなアプローチを使用し、そして長時間 (上記を参照のこと) の後に細胞を収集して、機能性ウイルス由来ベクター (B7.1発現によって証明されるような) を含有する生存可能な細胞 (所望の表現型を示す) のみを富化する。

具体的には、ランダム変異誘発したB7.1ベクター転写物の異種集団を、LiljestromおよびGaroff (1991, 同書) の手順に従って 5×10^7 細胞中にエレクトロポレートし、そしてフラットストック培養としてプレティングした。感染後12、24、36、および48時間にて、細胞単層を新たな培地で2回洗浄して死滅細胞を除去し、そして50%の新たな培地と50%の馴化培地との混合物からなる培地に置換する。感染後の所望の時間 (例えば72時間) の後、残存する細胞を穏やかにトリプシン消化してそれらを培養皿から脱着させ、そして1000rpm、4℃での遠心分離によってペレット化する。細胞を2mlのブロッキング溶液 (PBS+10%ウシ胎児血清+1%BSA) 中に再懸濁し、氷上で10分間インキュベートし、そして再ペレット化した。次に、細胞を200μlの一次抗B7.1抗体溶液 (PBS+0.5%BSA中で希釈) 中に再懸濁し、そして氷上で30分間インキュベートする。細胞をPBS+0.5%BSAで2回洗浄し、ペレット化し、そして200μlの磁気ビーズ溶液 (200μlのPBS+0.5%BSA+5mM EDTA中で洗浄した、ラット抗マウスでコートされた磁気ビーズ) 中に再懸濁する。4℃で30分間のインキュベーションに続いて、ビーズに結合した細胞をPBS+0.5%BSA+5mM EDTAで2回洗浄し、そして1mlの同じ緩衝液中に再懸濁する。次いで、ビーズに結合した細胞を、製造者の指示に従ってMiniMacs磁気カラムを使用して精製する。次いで、溶出したポ

10

20

30

40

50

ジティブ細胞を、セミコンフルエントな非感染細胞単層を含有する組織培養皿中に、 10^4 の非感染細胞毎に1つの感染細胞の比で直接再播種する。さらなる回数を選択を、増幅/富化について上記のように実施する。所望の表現型を有する選択されたベクター改変体を、限界希釈またはプラーク精製によって単離し、cDNAクローニングに供し、そして改変体表現型を担う配列を、前記のように単離および特徴付けする。

あるいは、B7.1発現ベクターであるpTE3' B7.1を、事前の変異誘発なしにインビトロ転写に直接使用し得る。これらのRNA転写産物のトランスフェクションに続いて、所望の表現型の変異体の選択を上記のように実施する。

2. 選択マーカーを発現するベクター

あるいは、抗生物質耐性マーカーは、所望の表現型を示すウイルスベクター改変体の選択のために使用され得る。例えば、シンドビスベクターpRSIN-luc (Dubenskyら、同書)を、上記のランダム変異誘発に供し、そしてランダム変異を含む異種プラスミドの集団を単離する。さらに、ネオマイシン (G418) 耐性をコードする遺伝子を、隣接するXhoIおよびNotI制限部位を含むように設計される以下のオリゴヌクレオチドプラスミドを使用して、標準的な3サイクルのPCR増幅によって、1.5分間の伸長で、プラスミドpcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) から単離する：

正方向プライマー：NeoFX (5'-制限部位/neo 配列) (配列番号26)

5'-ATATACTCGAG/ACCAUGATTGAACAAGATGGATTG-3'

逆方向プライマー：NeoRN (5'-制限部位/neo 配列) (配列番号27)

5'-TATATAGCGGCCGC/TCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'

増幅に続いて、DNAフラグメントを、QIAquick-spinで精製し、XhoIおよびNotIで消化し、そしてXhoIおよびNotIで同じく消化し、仔ウシ腸管アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルからその以前のルシフェラーゼ挿入物と離して精製したpRSIN-lucベクターの変異した集団に連結する。ネオマイシン耐性マーカーの変異したpRSINベクターへの連結は、neo^r発現ベクター (pRSIN-neoと称される) の異種集団を作製する。E.coliを形質転換せずそして個々のクローンを単離せずに、連結したベクターの全体の集団をSacIで直線化し、そして上記のように、インビトロでのSP6転写反応のためのテンプレートとして使用する。ランダムに変異誘発したneo^rベクター転写物の異種集団を、シンドビス複製サイクルの開始および異種遺伝子発現のために所望の細胞型 (例えば、BHK細胞) にエレクトロポレーションする。トランスフェクションの約12~24時間後、細胞をトリプシン処理し、そしてG418を含む培地に再プレーティングする。続いて、培地を、死滅細胞を除去するために約24時間間隔で交換し、そして50%の新たな培地と50%の馴化培地との混合物からなるG418含有培地で置き換える。培地交換を、大部分の死滅細胞が洗い流された後に低減させ、そして細胞増殖巣が形成し始める。この選択を使用して、機能的なウイルス由来ベクターを含み、所望の表現型 (ネオマイシン耐性によって実証されるような) を示す生細胞のみを、富化する。所望の表現型を表示する変異体ベクター改変体ゲノムを、RNAzol B (Tel-Test, Friendswood, TX) を使用して、細胞溶解物から直接RNAを収集することによって単離する。あるいは、細胞を、欠陥ヘルプシンドビスRNA (pR-dInsPSIN, Dubenskyら、同書) でトランスフェクトし、これは、細胞上清において、パッケージングされたpRSIN-neoベクター含有粒子の産生を生じ、続くベクターRNA単離 (上記) のために遠心分離によって濃縮され得る。各場合において、ベクターRNAを、cDNAクローニングに供し、そして先に記載のように、改変体表現型を担う配列を単離および特徴付けする。

あるいは、ネオマイシン耐性マーカーを有するpRSINベクターを、先の変異誘発を含まないインビトロでの転写に直接使用し得る。これらのRNA転写物のトランスフェクションに続いて、所望の表現型の変異体についての選択を、上記のように実行する。

別の実施態様において、セムリキ森林ウイルス由来ベクターpSFV-1 (GIBCO/BRL) を、抗生物質耐性マーカーの挿入および続く所望の表現型の選択のために使用する。ネオマイシン (G418) 耐性をコードする遺伝子を、隣接するBamHI制限部位を含むように設計される以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、標準的な3サイクルのPCR増幅によって、1.5分間の伸長で、プラスミドpcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) から単離する：

正方向プライマー：5' BAMHI-Neo (配列番号118)

5'-ATATAGGATCCTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGC-3'

逆方向プライマー：3' BAMHI-Neo (配列番号57)

5'-ATATAGGATCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCCGA-3'

増幅に続いて、DNAフラグメントを、QIAquick-spinで精製し、BamHIで消化し、そしてBamHIで消化し、ウシ腸アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して、0.7%アガロースゲルから精製した、SPV-1の野生型または予め変異した集団に連結する。RNAベクターの転写および所望の表現型の変異体のための選択を、本質的にシンドビスウイルスの選択について上記のように行う。

実施例 3

SINIに基づくRNAベクターレプリコンの調製

A. SIN-1基本ベクターの構築

SIN-1由来ベクター骨格を構築し、そしてバクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターを含むプラスミドDNAに挿入した。その結果、インビトロでの転写は、感受性細胞への導入に際して自己複製分子 (レプリコン) として作用するRNA分子を産生した。基本SIN-1 RNAベクターレプリコンは、以下の順序のエレメントから構成された：SIN-1 nsPs遺伝子、サブゲノム性RNAプロモーター領域、ポリリンカー配列 (異種配列挿入物を含み得る)、SIN-1 3' 非翻訳領域 (NTR)、およびポリアデニル化配列。感受性細胞へのトランスフェクションに続いて、RNAベクターレプリコンの自律複製は、ウイルスについて生じ、そして異種配列は、非常に豊富なサブゲノム性mRNA分子として合成され、次いで、異種遺伝子産物のための翻訳テンプレートとして役割を果たす。

ベクターの5' 領域 (SIN-1 nsP遺伝子およびサブゲノム性プロモーターから構成される) は、キャプシド遺伝子翻訳開始点の2つのヌクレオチド内で伸長する。この領域を、pKSI I+プラスミド (Stratagene) のApaIとXhoI部位との間に最初に挿入した。ベクター5' 領域を、PCRによって、2つの重複フラグメント中のpRSIN-1gプラスミドから、増幅した。

第1のフラグメントを、以下のプライマー対とのPCR反応において生成した：

10

20

30

正方向プライマー：SP6-1F (ApaI部位／SP6プロモーター／SIN nt 1-18) ： (配列番号12)

5'-TATATGGGCCCCGATTAGGTGACACTATAGATTGACGGCGTAGTACAC

逆方向プライマー：SIN5160R (SIN nt 5160-5140) ： (配列番号28)

5'-CTGTAGATGGTGACGGTGTCG

10

第2のフラグメントを、以下のプライマー対とのPCR反応において生成した：

正方向プライマー：5079F (SIN nt 5079-5100) ： (配列番号29)

5'-GAAGTGCCAGAACAGCCTACCG

逆方向プライマー：SIN7643R (緩衝配列／XhoI部位／SIN nt 7643-7621) ： (配列番号30)

20

5'-TATATCTCGAGGGTGGTGTGTAGTATTAGTCAG

上記に示されるプライマー対との2つのPCR反応を、Thermalase (Amresco, Solon, OH)、Vent (New England Biolabs, Beverly, MA)、またはKlenTaq熱安定性DNAポリメラーゼを使用して実施した。さらに、反応は、5 % DMSOおよび「HOT START WAX」ビーズ (Perkin-Elmer, Foster City, CA) を含んだ。以下に示すPCR増幅プロトコルを使用した。伸長期間は、SP6-1F/SIN5160Rまたは5079F/SIN7643Rプライマー対との反応について、それぞれ5分または2.5分であった。

温度 (°C)	時間 (分)	サイクル回数
95	2	1
95	0.5	
55	0.5	35
72	5.0または2.5	
72	10	10

30

PCRに続いて、5142bp (S6-1F/SIN5160Rプライマー対) および2532bp (5079F/SIN7643Rプライマー対) の二つの増幅産物を精製し (PCR精製キット、Qiagen, Chatsworth, CA)、そしてApaIおよびSfiI (5142bpアンプリコン産物) またはSfiIおよびXhoI (2532bpアンプリコン産物) で消化した。消化した産物を、GENECLEAN II (Bio 101, Vista, CA) を用いて精製し、そしてApaIおよびXhoIでの消化によって調製し、CIAPでホスファターゼ処理したpKS+プラスミド (Stratagene, La Jolla, CA) とともに連結した。この構築物は、pKSSIN-1-BV5' として公知である。

40

ベクターの3' 領域 (ウイルス3' 末端、ポリアデニル化域、および独自の制限認識配列からなる) を、プラスミドpKSSIN-1-BV' 5のNotIとSacI部位との間に挿入した。ベクターの3' 領域を、PCRによって、pRSIN-1gプラスミドから、以下のプライマー対を含む反応において増幅した：

正方向プライマー：SIN11386F（緩衝配列／NotI部位／SIN nt 11386-11407）：
（配列番号31）

5'-TATATATATATGCGGCCGCGCTACGCCCCAATGATCCGAC

逆方向プライマー：SIN11703R（緩衝配列／SacIおよびPmeI部位／T40／SIN nt 1
1703-11698）：（配列番号32）

5'-CTATAGAGCT CGTTTAAACT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
 G AAATG

上に示したプライマー対に加えて、PCR反応は、Thermalase、Vent、またはKlenTaq熱安定性DNAポリメラーゼ、5%DMSO、および「Hot Start Wax」ビーズ（Perkin-Elmer）を含んだ。増幅プロトコルは、72°Cで30秒間の伸長期間を除いては、上に示した通りであった。3'ベクター末端に対応する377bpの増幅産物を精製し、NotIおよびSacIで消化し、精製し、そしてpKSSIN-1-BV5'（NotIおよびSacIでの消化およびCIAPでの処理によって調製した）に連結した。このプラスミドは、pKSSIN-1-BVとして公知である。

上記の技術を使用して、β-ガラクトシダーゼレポータータンパク質をコードするlacZ遺伝子を、BamHIおよびHindIIIを用いて、プラスミドpSV-β-ガラクトシダーゼ（Promega Corp., Madison, WI）から遊離させ、そして対応する酵素制限部位でpKS+に挿入した。lacZ遺伝子を。このプラスミド（pKS-β-gal）から、XhoIおよびNotIで消化し、そしてpKSSIN-1-BVに、XhoIとNotI部位との間で挿入した。このプラスミドは、SINrep/SIN-1 nsP1-4/lacZとして公知である。

あるいは、ルシフェラーゼレポータータンパク質をコードするホタルルシフェラーゼ遺伝子を、HindIIIでの消化によってプラスミドpT3/T7-LUC（Clontech, Palo Alto, CA）から遊離させ、複数のクローニング配列に含まれる対応する酵素認識部位でpKS+（Stratagene, La Jolla, CA）に挿入し、pKS-lucを作製した。ルシフェラーゼ遺伝子を、XhoIおよびNotIでの消化によってpKS-lucから遊離させ、そしてXhoI/NotI消化pKSSIN-1-BVに挿入した。このプラスミドは、SINrep/SIN-1 nsP1-4/lucとして公知である。

さらに、アルカリホスファターゼの分泌形態（SEAP）をコードする遺伝子を、pKSSIN-1-BVに挿入した。簡潔には、SEAP遺伝子を、HindIIIおよびXbaIでの消化によってプラスミドpCMV/SEAP（Tropix, Bedford, MA）から遊離させ、複数のクローニング配列に含まれる対応する認識部位でpSK+（Stratagene, La Jolla, CA）に挿入し、pSK-SEAPを作製した。次いで、SEAP遺伝子を、XhoIおよびNotIでの消化によってpSK-SEAPから遊離させ、pKSSIN-1-BVの対応する酵素認識部位に挿入した。このプラスミドは、SINrep/SIN-1 nsP1-4/SEAPとして公知である。

個々のSIN-Insp遺伝子を、SIN-1および野生型発現ベクターの発現特性を比較するために、以前に記載のシンドビスウイルスに基づくlacZレプリコンの対応する野生型ウイルス領域（Bredenbeekら、J.Virol.67:6439-6446,1993）に置換した。SIN-1 nsP遺伝子のToto1101由来lacZレプリコンへの置換を、実施例1に記載のように達成した。これらのベクターを、以下の表に示すように命名した。

10

20

30

40

nsP遺伝子起源

レプリコン命名	Totol101	SIN-1
SINrep/lacZ	nsP 1-4	
SINrep/SIN-1 nsP2/lacZ	nsP 1, 3-4	nsP2
SINrep/SIN-1 nsP3/lacZ	nsP 1-2, 4	nsP3
SINrep/SIN-1 nsP1-4/lacZ		nsP1-4

SP6転写物を、XhoIで直線化した後、実施例1に記載のように、上記の表に示すレプリコンから調製した。RNA転写物は、シンドビスウイルスの転写を開始し得る5'配列、シンドビスウイルス非構造タンパク質遺伝子1-4、パッケージングに必要なRNA配列、シンドビスウイルス接合領域、lacZ遺伝子、およびマイナス鎖RNAの合成に必要なシンドビスウイルス3'末端近位配列を含んだ。

インビトロでの転写反応産物または精製RNAを、以前に記載のように（LiljestromおよびGaroff, Bio/Technology 9:1356-1361, 1991）ベビーハムスター腎臓-21（BHK-21）細胞にエレクトロポレートした。あるいは、BHK-21細胞を、実施例1に記載のように、市販のカチオン性脂質化合物と複合体化し、そして75%のコンフルエンスに維持したBHK-21細胞に適用した。トランスフェクトした細胞を、35mm皿の中で増殖させ、そして37°Cでインキュベートした。

SINrep/lacZ RNAを用いるBHK-21細胞のトランスフェクションの9時間後の効率を、2つの二者択一の方法によって測定した。第1の方法において、β-ガラクトシダーゼを発現するトランスフェクトした細胞を、以前に記載のように（MacGregorら, Cell Mol. Genet. 13:253-265, 1987）2%の冷メタノールで細胞を最初に固定した後、X-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-b-D-ガラクトピラノシド）で直接染色することによって測定した。第2の方法において、β-ガラクトシダーゼを発現を、ウサギ抗β-ガラクトシダーゼ抗体を使用して、免疫蛍光によって測定した。上記のいずれかの方法によってトランスフェクトされた細胞の一部を、35mm皿に含まれた、円形ガラスカバースリップ上で増殖させた。トランスフェクション（hpt）の9時間後、培地を吸引によって除去し、そして細胞をPBS Dで2回リンスし、そして-20°Cで一晩インキュベーションすることによってメタノールで固定した。メタノールを吸引によって除去し、細胞をPBSで3回リンスし、次いで、2% BSA（画分V, Sigma, St. Louis, MO）と室温で30分間インキュベートした。非特異的抗体結合を防ぐためのBSAとのインキュベーションに続いて、細胞を、一次抗β-ガラクトシダーゼ抗体（0.1% BSA/PBS中の1:800希釈）と室温で1時間インキュベートした。次いで、過剰の一次抗体を、吸引およびPBS中の0.1% BSAで3回リンスすることによって除去した。PBS中の2% BSA中の1:100希釈に続いて、100mlのヤギ抗ウサギFITC結合二次抗体（Sigma, St. Louis, MO）を、カバースリップに添加し、そして室温で45分間、暗所にてインキュベートした。過剰の二次抗体を、カバースリップをPBS中の0.1% BSAで2回、およびPBSで1回リンスすることによって除去した。次いで、カバースリップを、1滴のCytoseal 60マウンティング（mounting）培地（Stephens Scientific, Riverdale, NJ）の下側の細胞にマウントし、顕微鏡スライド上に置いた。蛍光顕微鏡を使用して、トランスフェクション効率を測定するために、β-ガラクトシダーゼを発現する細胞の頻度を測定した。

全体のトランスフェクトされた細胞溶解物におけるβ-ガラクトシダーゼのレベルを、2つの二者択一の方法によって、9 hptで測定した。第1の方法において、トランスフェクトした細胞を、培地を吸引した後、PBSでリンスし、そして10⁶細胞あたり250 μlのレポーター溶解緩衝液（Promega, Madison, WI）を各皿に添加した。β-ガラクトシダーゼの発現レベルを、細胞溶解物からの上清画分を混合することによって測定し、市販の基質検出系（Lumi-gal, ClonTech, Palo Alto, CA）を用いて、14,000 r.p.m.で室温で1分間の微量遠心分離によってプロセスし、その後、照度測定（luminometry）を行った。（Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA）。第2の方法において、β-ガラクトシダーゼの

活性を、SambrookおよびManiatis (1989,第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) によって以前に記載されたように、測定した。簡潔には、トランスフェクトした細胞を、培地を吸引した後に、PBSでリンスし、そして 10^6 細胞あたり $200\mu\text{l}$ のTTE溶解緩衝液 (10mM Tris-HCl ($\text{pH}8.0$) / 1mM EDTA/ 0.2% Triton X-100) を各皿に添加した。細胞溶解物からの細胞片を、 $14,000\text{r.p.m.}$ で室温で1分間微量遠心分離することによってペレット化した後に、 $50\mu\text{l}$ の上清を 0.5ml のZ緩衝液 ($\text{pH}7.0$) (60mM Na_2HPO_4 / 40mM NaH_2PO_4 / 10mM KCl/ 10mM MgSO_4 / 50mM 2-メルカプトエタノール) に添加し、そして 37°C で5分間インキュベートした。次いで、試料中の β -ガラクトシダーゼ活性を、Z緩衝液中に 4mg/ml の色素基質o-ニトロフェニル-b-D-ガラクトピラノシド (ONPG;SIGMA,St.Louis,MO) を含む溶液 0.2ml を添加した後、分光光度測定 (420nm) によって決定した。試料を、黄色が発色するまで (約5分間) 37°C でインキュベートし、そして反応を 0.5ml の 0.5M Na_2CO_3 の添加によって停止させた。

トランスフェクトしたBHK-21細胞中の β -ガラクトシダーゼの発現のレベルを、上記の方法に従って測定した。これを以下に示す表に表す。示したデータは、上記のように変動するトランスフェクション効率について正規化されている。

トランスフェクトした レプリコン	SINrep/lacZに対する β -galの発現	標準偏差
SINrep/lacZ	1.0	
SINrep/SIN-1 nsP2/lacZ	3.2	± 0.4
SINrep/SIN-1 nsP3/lacZ	0.2	± 0.0
SINrep/SIN-1 nsP1-4/lacZ	5.2	± 1.3

この結果は、SIN-1改変体株由来のレプリコンベクターが実際は機能的であることを示す。BHK-21細胞にトランスフェクトした場合、発現されるレポータータンパク質のレベルは、野生型ウイルス由来ベクターでトランスフェクトした細胞において得られるレベルよりも高かった。さらに、増殖性の存続性感染の確立のための表現型を有するため、SIN-1由来レプリコンベクターでトランスフェクトしたBHK-21細胞における高レベルの β -ガラクトシダーゼの発現は、主にnsP2遺伝子にマップした。

実施例 4

SIN1に基づくDNAベクターの調製

A. プラスミドDNA SIN-1由来発現ベクターの構築

シンドビスウイルス感染性周期の効率的な開始は、RNAポリメラーゼIIの発現カセット内に含まれるゲノムcDNAクローンから、インビボで生じ得る。(Dubenskyら、J.Virol 70:508-519,1996)。DNAフォーマットから機能的なアルファウイルス遺伝子を発現する能力は、2つの新規なアルファウイルスに基づく遺伝子発現系が開発されることを可能にする：(1) 遺伝的な免疫に適用される、プラスミドDNAに基づくベクター、および(2) ベクターレプリコンおよびDHプラスミドDNAで同時トランスフェクトした細胞における、パッケージングされたアルファウイルス粒子の産生。以前に、感染シンドビスウイルスRNAおよびそれに由来する相補体ベクターを産生するための分子的アプローチは、バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターからのcDNAクロンのインビトロでの転写、続いての許容細胞へのトランスフェクションに主に限定された。

プラスミドDNAに基づくアルファウイルス由来発現ベクターは、ELVSTM (真核生物重層ベクター系) として公知である。ELVSTM プラスミドDNAベクターは、自己複製ベクターRNA (レプリコン) の重層DNAに基づく発現系への転換を含む。特定の実施態様内において、最初の層は、第2の層の転写を開始する真核生物の (例えば、RNAポリメラーゼII) 発現カセットを有し、これはRNAベクターレプリコンに対応する。最初の層から発現されるレプリコンの核から細胞質への輸送に続いて、ベクターの自己触媒性増幅は、ウイルス (例えば、アルファウイルス) 複製周期に従って進行し、異種遺伝子の発現を生じる。

SIN-1ウイルス由来プラスミドDNA発現ベクターの構築を、以前に記載の方法（Dubenskyら、J.Virol 70:508-519,1996）を改良して行った。発現ベクターを、pUC9（Sprattら、Gene 41:337-342,1986）のカナマイシン耐性アナログであるプラスミドベクターpBGS131（ATCC番号37443）上で構築した。pBGS131およびそれに由来するプラスミドを、20 µg/mlのカナマイシンを含むLB培地において増殖させた。

異種配列の発現ベクターへの挿入を促進するために、XhoI認識配列（pBGS131中のカナマイシン遺伝子の翻訳リーディングフレーム内に位置する）を、XhoI付着末端を含む部分的に相補な12マーのオリゴヌクレオチドを挿入することによって、取り除いた。XhoI認識部位を、以下に示すように、挿入の結果として消失させた：

オリゴヌクレオチド1：（配列番号33）

5'-TCGATCCTAGGA

10

元のpBGS131の配列	対のオリゴヌクレオチド	12マーの挿入後の pBGS131の配列
SerArg		SerIleLeuGlySerArg
<u>CTCGAGGC</u>	TCGATCCTAGGA	CTCGATCCTAGGATCGAGGC
<u>GAGCTCCG</u>	AGGATCCTAGT	GAGCTAGGATCCTAGCTCCG

20

（XhoI部位：CTCGAG）（配列番号33～36および104）

オリゴヌクレオチドを、10mM MgCl₂の存在下の等モル濃度でゲルアニールし、100℃で5分間加熱し、室温までゆっくりと冷却し、そしてポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化する。オリゴヌクレオチドを、200：1の挿入物：プラスミドベクターの比で、pBGS131に連結し、これを、XhoI消化およびCIAP処理によって調製した。得られるプラスミドを、pBGS131 dIXhoIと呼ぶ。pBGS131またはpBGS131 dIXhoIプラスミドで形質転換したXL1-Blue（Stratagene）の、20 µg/mlのカナマイシンを含むLB培地における増殖速度は、1.5～8時間の時間経過では区別できなかった。

30

ウシ成長ホルモン（BGH）転写終結／ポリアデニル化シグナルを、pBGS131 dIXhoIのSacIとEcoRI部位との間に挿入した。BGH転写終結配列を、以下に示すプライマー対およびpCDNA3プラスミド（Invitrogen, San Diego, CA）をテンプレートとして使用して、PCR増幅によって単離した。

正方向プライマー-BGHTTF（緩衝配列／SacI部位／pCDNA3 nt 1132-1161）：

（配列番号37）

5'-TATATATGAGCTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC

40

逆方向プライマー-BGHTTR（緩衝配列／EcoRI部位／pCDNA3 nt 1180-1154）：

（配列番号38）

5'-TATATGAATTCATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGC

上に示したプライマーを、30秒の伸長期間を使用して、3温度サイクルプログラムでのPCR反応に使用した。58bpの増幅産物を、PCR精製キット（Qiagen Chatsworth, CA）を用いて精製し、SacIおよびEcoRIで消化し、GENECLEAN IIを用いて精製し、そしてSacI/EcoRI消化し、CIAP処理したpBGS131に連結した。このプラスミドは、pBGS131 dIXhoI-BGHTTとし

50

て公知である。

次いで、シンドビスウイルス由来プラスミドDNA発現ベクターの3'末端を、pBGS131 d1XhoI-BGHTT構築物に挿入した。このベクターの領域は、以下の順序の要素を含む：シンドビスウイルス3'末端非翻訳領域(3' NTR)；40マーのポリ(A)配列；D型肝炎ウイルス(HDV)アンチゲノム性リボザイム；およびSacI認識配列。これらの順序の要素の構築を、以下に示すプライマーおよびpKSSIN-1-BVプラスミド(実施例4)をテンプレートとして使用して、ネステッドなPCRによって達成した。

正方向プライマー：SIN11386F(緩衝配列/Not I部位/SIN nts 11386-11407)：
(配列番号31)

5'-TATATATATATGCGGCCGCCGCTACGCCCCAATGATCCGAC

10

ネステッドプライマー：pAHDV1F(ポリ(A)/HDV RBZ nts 1-46)： (配列番号39)

5'-AAAAAAAAA GGGTCGGCAT GGCATCTCCA CCTCCTCGCG GTCCGACCTG GGCATC

逆方向プライマー：SacHDV77R(緩衝配列/Sac I 部位/HDV RBZ nts 77-27)：
(配列番号40)

5'-TATATGAGCTCCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTGCGTCCTCCTTCGGATGCCCAGGTCCGACCGCG

上記のプライマーを、実施例4に記載の反応条件および3つの温度サイクルプログラムに従い、30秒間の伸長時間を伴うPCR増幅において使用した。422bpの増幅産物をPCR精製キット(Qiagen Chatsworth, CA)で精製し、NotIおよびSacIで消化し、GENECLEAN IIで精製し、そしてNotI/SacI消化しCIAP処理したpKSSIN-1-BVに連結した。この構築物は、pKSSIN-1BV/HDVRBZとして識別され、そしてHDVリボザイム配列を含むベクターの3'末端を通して延伸するシンドビスnt 2289におけるBgl II部位からのシンドビスウイルス由来のプラスミドDNA発現ベクター配列を含む。

20

30

次いで、プラスミドpKSSIN-1BV/HDVRBZを、Bgl IIおよびSac Iで消化し、5815bpフラグメントを1%アガロース/TBEゲル電気泳動により単離し、GENECLEAN IIにより精製し、そしてBgl II/Sac Iで消化しCIAPで処理したpBGS131 d1Xho I-BGHTTに挿入して、pBG/SIN-1Bgl IILFして識別されるプラスミド構築物を生成した。この構築物は、pBGS131 d1Xho Iプラスミド上のBGH転写終結配列に融合した3'末端を有する上記のプラスミドpKSSIN-1BV/HDVRBZからのシンドビスウイルス発現ベクターの領域を含む。

シンドビスウイルスプラスミドDNAベクターのアセンブリを、シンドビスウイルスゲノム(5'ウイルス末端およびnsP遺伝子の一部を含む)の最初の2289ntsと隣接して並べたCMVプロモーターのpBG/SIN-1Bgl IILFプラスミドへの挿入により達成した。重複PCRアプローチを使用することにより、CMVプロモーターを5'ウイルス末端に配置し、その結果転写開始により一個の非ウイルスヌクレオチドのシンドビスウイルスベクターレプリコンRNAの5'末端への付加を生じた。CMVプロモーターを最初のPCR反応においてpCDNA3(Invitrogen, San Diego, CA)から以下のプライマー対を使用して増幅した：

40

正方向プライマー：pCBgl233F (緩衝配列/Bgl II認識配列/CMVプロモーター nts 1-22) : (配列番号41)

5'-TATATATAGATCTTTGACATTGATTATTGACTAG

逆方向プライマー：SNCMV1142R (SIN nts 8-1/CMV プロモーター nts 1142-1108) : (配列番号42)

5'-CCGTC AATACGGTTC ACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGACC

上記のプライマーを実施例4に記載の反応条件および3つの温度サイクルプログラムに従って、1分間の伸長時間を伴うPCR反応において使用した。

SIN-1 5'末端を、pKSRSIN-1gクローン(実施例1)から以下のプライマー対を用いて第二のPCR反応において増幅した：

正方向プライマー：CMVSIN1F (CMV プロモーター nts 1124-1142/SIN nts 1-20) : (配列番号43)

5'-GCTCGTTTAGTGAACCGTATTGACGGCGTAGTACACAC

逆方向プライマー：SIN 3182R (SIN nts 3182-3160) : (配列番号44)

5'-CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC

上記のプライマーを3つの温度サイクルプログラムで3分間の伸長時間を用いたPCR反応において使用した。

930bpおよび3200bpの増幅された産物をPCR精製キット(Qiagen)で精製し、そして共に以下のプライマー対を用いたPCR反応において使用した：

正方向プライマー：pCBgl233F : (配列番号41)

5'-TATATATAGATCTTTGACATTGATTATTGACTAG

逆方向プライマー：(SIN nts 2300-2278) : (配列番号45)

5'-GGTAACAAGATCTCGTGCCGTG

上記のプライマーを3つの温度サイクルプログラムで3.5分間の伸長時間を用いたPCR反応において使用した。

第一のPCR増幅産物の3'末端の26塩基は、第二のPCR増幅産物の5'末端の26塩基と重複した；得られた3200bpの重複する二次PCR増幅産物を1%アガロース/TBE電気泳動により精製し、BglIIIで消化し、そしてBglIIIで消化しCIAP処理したpBG/SIN-1Bg1LFに連結した。この構築物を、pBG/SIN-1 ELVS 1.5と呼ぶ。

実施例1において議論したように、野生型シンドビスウイルスのnsP遺伝子配列における比較的少ないヌクレオチド点変化がSIN-1の表現型特徴を生じる。これらのヌクレオチド変化の結果として、野生型およびSIN-1遺伝子型に由来するクローンを簡便に識別するのを促進する新たな制限酵素認識部位は生成しない。それゆえ、PCRに基づく診断アッセイをSIN-1由来のクローンの同定のための迅速な方法として考案した。手短に言うと、正方向プライマーをSIN-1と野生型との間の特定の塩基変化がプライマーの3'末端塩基に配置されるように設計した。1つのプライマーはSIN-1ヌクレオチドを含み、一方、別のプライマーは野生型ヌクレオチドを含んでいた。両方の遺伝子型間で保存されている下流領域にお

10

20

30

40

50

ける逆方向プライマーを、各正方向プライマーと組み合わせて使用した。正確なアニーリング温度において、SIN-IテンプレートのみがSIN-1正方向プライマーを含む反応において増幅された。野生型およびSIN-1遺伝子型を識別するために使用したプライマー配列を以下に与える。反応条件は、本明細書中に含まれる実施例のすべてにわたって記載される通りであった。

プライマーセット1:

正方向プライマー:

WT100F 5'-GTC CGT TTG TCG TGC AAC TGC

(配列番号105)

10

SIN-1100F: 5'-GTC CGT TTG TCG TGC AAC TGA

(配列番号106)

逆方向プライマー:

SIN2300R

PCRプログラム: (95°C-30秒、72°C-2分) 20サイクル

プライマーセット2:

正方向プライマー:

WT3524F 5'-CAA TCT TCC TCA CGC CTT AGC

(配列番号107)

20

SIN-13524F 5'-CAA TCT TCC TCA CGC CTT AGT

(配列番号108)

逆方向プライマー:

SIN5448R

PCRプログラム: (95°C-30秒、60°C-30秒、72°C-2分) 20サイクル

プライマーセット3:

正方向プライマー:

WT7592F 5'TCC TAA ATA GTC AGC ATA GTA

(配列番号109)

30

SIN-17592F 5'TCC TAA ATA GTC AGC ATA GTT

(配列番号110)

40

逆方向プライマー:

SIN7643R 5'-TATATCTCGAGGGTGGTGTGTAGTATTAGTCAG

(配列番号111)

PCRプログラム: (95°C-30秒、60°C-30秒、72°C-2分) 20サイクル

レポータータンパク質発現ベクターを、lacZ、SEAP、またはルシフェラーゼレポーター遺伝子をpBG/SIN-1 ELVS 1.5ベクター骨格に挿入することにより構築した。別の反応において、pKS-β-gal、pKS-SEAP、およびpKS-lucプラスミド(実施例4)を、XhoIおよびNotIで消化した。lacZ、SEAP、またはルシフェラーゼ遺伝子を含むフラグメントを、1%アガ

50

ロース/TBEゲル電気泳動により単離し、そして続いてGENECLEAN IIで精製した。次いで、これらのレポーター遺伝子を、XhoI/NotI消化しCIAP処理したpBG/SIN-1 ELVS 1.5プラスミドに別の反応において連結した。これらの構築物は、pBS/SIN-1 ELVS 1.5-β-gal、pBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAP、およびpBG/SIN-1 ELVS 1.5-lucとして識別される。

B. pBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAP、pBG/SIN-1 ELVS 1.5-lucまたはpBG/SIN-1 ELVS 1.5-β-gal発現ベクターでトランスフェクトした細胞における異種タンパク質の発現

pBG/SIN-1 ELVS 1.5またはpBG/wt ELVS 1.5ベクターを、トランスフェクトしたBHK細胞において、分泌されたアルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、およびβ-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子発現のパターンを比較した。pBG/wt ELVS 1.5プラスミドは、SIN-1改変体というよりは野生型シンドビスウイルス由来の配列を含む。pBG/wt ELVS 1.5発現ベクターの構築は、pBG/SIN-1 ELVS 1.5発現ベクターについての本明細書中の記載と、ベクター構築のためのテンプレートとして野生型シンドビスウイルス (Dubenskyら、WO 95/07994) 由来の全長のゲノムcDNAを用いたこと以外は全く同じであった。pBG/wt ELVS 1.5発現ベクターの構築は以前に (Dubenskyら、前出) 記載されており、従って、株 (および、それゆえ配列) は異なっているが、pBG/wt ELVS 1.5発現ベクターおよびpBG/SIN-1 ELVS 1.5発現ベクターに含まれるシンドビスウイルス特異的領域は同じである。

12mmディッシュ中で75%のコンフルエンスで維持したベビーハムスター腎臓-21 (BHK-21) 細胞を、1.0 μgのpBG/SIN-1 ELVS 1.5発現ベクタープラスミドDNAまたはpBG/wt ELVS 1.5発現ベクタープラスミドDNA (これらのDNAは4.0 μlの市販の脂質 (Lipofectamine、GIBCO-BRL) で複合化した) でトランスフェクトした。他方で、トランスフェクション条件は脂質の製造者により示唆されるとおりであった。5%のウシ胎児血清を補充したEagle最小必須培地を、別に指示しない限りトランスフェクション後4時間 (hpt) で細胞に添加した。トランスフェクトした細胞を、37℃にてインキュベートした。トランスフェクション後種々の時間において以下に示すように、いくつかのアッセイを実施して、pBG/SIN-1 ELVS 1.5プラスミドDNAまたはpBG/wt ELVS 1.5プラスミドDNAでトランスフェクトした細胞における、ベクター特異的RNA合成、および分泌されたアルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、またはβ-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子の発現を比較した。

pBG/SIN-1 ELVS-1 1.5-SEAPプラスミドDNAまたはpBG/wt ELVS 1.5-SEAPプラスミドDNAでトランスフェクトしたBHK細胞の培養培地へ分泌されたアルカリホスファターゼのレベルを比較した。細胞培養培地を、Phospha-LightTM化学発光レポーター遺伝子アッセイを用いて製造者 (Tropix, Inc., Bedford, MA) の指示に従ってアルカリホスファターゼの存在についてアッセイした。手短に言うと、10 μlの細胞培養上清を30 μlの希釈緩衝液と混合し、そして65℃にて30分間インキュベートした。サンプルを室温まで放冷し、その後40 μlのアッセイ緩衝液と混合した。サンプルを室温にて5分間インキュベートし、続いて40 μlの反応緩衝液を添加した。サンプルを室温にて20分間インキュベートした。全発光をML3000マイクロタイタープレート照度計 (Dynatech, Inc., Chantilly, VA) 上でサイクルモードで測定した。そしてpBG/SIN-1 ELVS-1 1.5-SEAPプラスミドDNAまたはpBG/wt ELVS 1.5-SEAPプラスミドDNAでトランスフェクトしたBHK細胞の培養培地のアルカリホスファターゼ (AP) を48hptにおいて決定し、そして結果を以下の表に示す。

トランスフェクトしたプラスミド 48hptにおけるRLU

pBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAP	18±1.7
pBG/wt ELVS 1.5-SEAP	94±10.7
pCDNA3	0.13±0.04

さらに、pBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAPプラスミドまたはpBG/wt ELVS 1.5-SEAPプラスミドでトランスフェクトしたBHK-21細胞において合成されたベクター特異的RNAのレベルをノーザンブロット分析により、以前に記載されたものと全く同様に (Dubensky、前出)、トランスフェクション後48時間で決定した。この実験の結果を図9Aに示す。総細胞性RNAを、トランスフェクトしたBHK細胞からTri-Reagentを用いて製造者 (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) により記載されるように単離した。トランスフェクトしたBHK細胞からのサンプル中に存在する総細胞性RNA濃度を分光光学的に決定した。さらに、ト

ランスフェクトした細胞から単離された物質が、10 μ l/mlのエチジウムブロミドにより染色した0.5 μ gの総細胞性RNAの0.7%アガロース/TBEミニゲルによる電気泳動によりインタクトであることを決定した。ノーザンブロット分析をSambrookおよびManiatis (1989, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) に従って実施した。すべてのランスフェクトしたサンプル由来のRNAを単一のノーザンブロット分析からのオートラジオグラムにおいて可視化され得るために、1レーン当たり、pBG/wt ELVS 1.5-SEAPでランスフェクトした細胞およびpBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAPでランスフェクトした細胞由来のそれぞれ、2.5 μ gおよび30 μ gのRNAをロードした。試験した両方のプラスミドを有する別々のランスフェクション由来の4つのRNAサンプルを0.7%ホルムアルデヒドアガロースゲルで電気泳動し、そしてZeta-probeメンブレン (Bio-Rad, Richmond, CA) に移した。ブロットをアルカリホスファターゼ遺伝子に対応するランダムプライムしたプローブとハイブリダイズさせた。ランスフェクトされたBHK細胞におけるベクター特異的RNA合成のレベルおよびAP発現のレベルを48hptにて比較したこの実験の結果は、pBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAP DNAでランスフェクトした細胞において合成されるベクター特異的RNAのレベルが、pBG/wt ELVS 1.5-SEAPランスフェクト細胞におけるより少なくとも100倍低い、一方APのレベルはpBG/wt ELVS 1.5-SEAP DNAと比較してpBG/SIN-1 ELVS 1.5-SEAP DNAでランスフェクトした細胞において、5倍低いだけであったことを実証する。

pBG/SIN-1 ELVS-1 1.5-SEAPまたはpBG/wt ELVS 1.5-SEAPのプラスミドDNAでランスフェクトしたBHK細胞の培養培地へ分泌されるアルカリホスファターゼのレベルをまた、7日間にわたって経時的に比較した。この研究の結果を図9Bに示し、これは、初期の時点で培養培地中に存在するAPのレベルが、pBG/wt ELVS 1.5-SEAPプラスミドと比較してpBG/SIN-1 ELVS-1 1.5-SEAPプラスミドでランスフェクトした細胞においてはるかに低かったことを実証する。しかし、SIN-1シンドビスウイルス改変体株由来ベクターでランスフェクトした細胞において発現されるAPのレベルは迅速に増大し、そして96hptの時点まで、野生型ウイルス由来ベクターでランスフェクトした細胞におけるよりも高かった。

pBG/SIN-1 ELVS-1 1.5-lucプラスミドDNAまたはpBG/wt ELVS 1.5-lucプラスミドDNAでランスフェクトしたBHK細胞に存在するルシフェラーゼレベルを、24、48、および72hptにおいて比較した。ルシフェラーゼ発現レベルを、 10^6 のランスフェクト細胞当たり250 μ lのレポーター溶解緩衝液 (Promega, Madison WI) を添加し、14,000rpmにて1分間溶解物を遠心分離し、次いで細胞溶解物由来の上清画分を市販の基質検出系 (Promega, Madison WI) と混合し、続いて照度計測定 (Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA) することにより定量した。この実験の結果 (以下の表に示す) および図10において図式的に示される結果は、アルカリホスファターゼ発現ベクターで観察した結果と同様であった。ランスフェクション後の初期の時間において、ルシフェラーゼ発現レベルは、pBG/wt ELVS 1.5-lucプラスミドと比較してpBG/SIN-1 ELVS 1.5-lucプラスミドでランスフェクトしたBHK細胞において、低かった。しかし、48および72hpt時点において、ルシフェラーゼレベルは、シンドビスウイルスSIN-1改変体株由来発現ベクターおよび野生型由来発現ベクターでランスフェクトしたBHK細胞と類似していた。

10

20

30

トランスフェクトした プラスミド	トランスフェクト後時間	相対的光単位 (平均±SD)
pBG/SIN-1 ELVS 1.5-luc	24	1.2×10^9
pBG/wt ELVS 1.5-luc		2.1×10^8
pBG/SIN-1 ELVS 1.5-luc	48	3.3×10^9
pBG/wt ELVS 1.5-luc		4.1×10^9
pBG/SIN-1 ELVS 1.5-luc	72	1.8×10^9
pBG/wt ELVS 1.5-luc		5.8×10^9

pCDNA3

48

482

48hptでのBHK細胞におけるpBG/SIN-1 ELVS 1.5-β-galプラスミドおよびpBG/wt ELVS 1.5-β-galプラスミドのトランスフェクション効率を、β-ガラクトシダーゼを発現する細胞数を直接測定するために、細胞単層 (MacGregor, Cell Mol. Genet. 13:253-265, 1987) の直接X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-b-D-ガラクトピラノシド) 染色により決定した。トランスフェクション効率は同等であった。そして以下の表に示す。

トランスフェクトしたプラスミド 青色細胞数/100×視野

pBG/SIN-1 ELVS 1.5-β-gal 24±3

pBG/wt ELVS 1.5-β-gal 26±7

pBG/SIN-1 ELVS 1.5-β-galプラスミドまたはpBG/wt ELVS 1.5-β-galプラスミドでトランスフェクトしたBHK-21細胞中で合成されたベクター特異的RNAのレベルを、トランスフェクション後48および72時間後において、以前に記載された (Dubensky, 前出) ものと同様にノーザンブロット分析により決定した。総細胞性RNAをトランスフェクトしたBHK細胞から製造者 (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) によって記載される通りにTri-Reagentを用いて単離した。pBG/SIN-1 ELVS 1.5-β-galプラスミドまたはpBG/wt ELVS 1.5-β-galプラスミドでトランスフェクトしたBHK細胞由来のサンプル中に存在する総細胞毒性RNA濃度を、分光光学的に決定した。さらに、トランスフェクトした細胞から単離した物質が、10 μl/mlのエチジウムブロミドにより染色した、0.7%アガロース/TBEミニゲルによる0.5 μgの総細胞性RNAの電気泳動によりインタクトであることを決定した。ノーザンブロット分析は、SambrookおよびManiatis (1989, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) に従って実施した。すべてのトランスフェクトしたサンプル由来のRNAを単一のノーザンブロット分析からのオートラジオグラムにて可視化され得るために、1レーン当たり、pBG/wt ELVS 1.5-β-galでトランスフェクトした細胞およびpBG/SIN-1 ELVS 1.5-β-galでトランスフェクトした細胞由来のそれぞれ、2.5 μgおよび5 μgのRNAをロードした。試験した両方のプラスミドを有する別々のトランスフェクション由来の2つのRNAサンプルを、48および72hptにおいて、0.7%ホルムアルデヒドアガロースゲルで電気泳動し、そしてZeta-probeメンブレン (Bio-Rad, Richmond, CA) に移した。プロットをβ-ガラクトシダーゼ遺伝子に対応するランダムプライムしたプローブでハイブリダイズした。この実験の結果を図11Aに示し、これはpBG/SIN-1 ELVS 1.5-β-gal DNAでトランスフェクトした細胞において、トランスフェクション後48および72時間で合成されたベクター特異的RNAのレベルが、pBG/wt ELVS 1.5-β-galトランスフェクト細胞において検出されたRNAのレベルより少なくとも100倍低かったことを実証する。

10

20

30

40

50

さらに、 β -ガラクトシダーゼ発現レベルを、 10^6 トランスフェクト細胞当たり250 μ lのレポーター溶解緩衝液 (Promega, Madison WI) を添加し、14,000rpmにて1分間溶解物を遠心分離し、次いで細胞溶解物由来の上清画分を市販の基質検出系 (Clontech, Palo Alto, CA) と混合し、続いて照度計測定 (Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA) することより、トランスフェクトした全細胞溶解物中で定量した。この実験の結果 (以下の表に示し、そして図9Cにおいて図式的に示す) は、トランスフェクション後初期の時点において、 β -ガラクトシダーゼ発現レベルが、pBG/wt ELVS 1.5- β -galプラスミドと比較して、pBG/SIN-1 ELVS 1.5- β -galプラスミドでトランスフェクトしたBHK細胞において、顕著に低かったことを実証する。しかし、レポーター発現は、pBG/SIN-1 ELVS 1.5- β -galトランスフェクト細胞において経時的に迅速に増大し、その結果 β -ガラクトシダーゼレベルは、最後の120時間の時点において野生型ウイルスでトランスフェクトした細胞におけるよりも高かった。

トランスフェクトした プラスミド	トランスフェクト後時間	相対的光単位 (平均 $\pm$ SD)
pBG/SIN-1 ELVS 1.5- β -gal	24	54030 $\pm$ 7348
pBG/wt ELVS 1.5- β -gal		4801590 $\pm$ 74, 425
pBG/SIN-1 ELVS 1.5- β -gal	48	310830 $\pm$ 31083
pBG/wt ELVS 1.5- β -gal		2214921 $\pm$ 248071
pBG/SIN-1 ELVS 1.5- β -gal	72	1443474 $\pm$ 98156
pBG/wt ELVS 1.5- β -gal		3793524 $\pm$ 857336
pBG/SIN-1 ELVS 1.5- β -gal	96	2232585 $\pm$ 299166
pBG/wt ELVS 1.5- β -gal		3514262 $\pm$ 548225
pBG/SIN-1 ELVS 1.5- β -gal	120	3200910 $\pm$ 128036
pBG/wt ELVS 1.5- β -gal		1986537 $\pm$ 166869

pCDNA3

3637

pBG/SIN-1 ELVS-1 1.5- β -galプラスミドDNAまたはpBG/wt ELVS 1.5- β -galプラスミドDNAでトランスフェクトした細胞における β -ガラクトシダーゼの発現をまた、最後の120hpt時点において、レポータータンパク質に特異的なモノクローナル抗体 (Boehringer Mannheim) を用いるウェスタンブロット分析により直接測定した。120hptで決定したレポータータンパク質の活性と類似して、 β -ガラクトシダーゼタンパク質のレベルは、pBG/SIN-1 ELVS-1 1.5- β -galトランスフェクトBHK細胞において、pBG/wt ELVS 1.5- β -galと比較して、同レベルであるかそれ以上であり、そして図11Cに示す。

これらを総合すると、本明細書中に記載の結果は、pBG/SIN-1 ELVSトランスフェクト細胞において合成されるベクター特異的RNAのレベルは、pBG/wt ELVSトランスフェクト細胞と比較して、少なくとも100倍少ないことを示す。しかし重要なことに、48~72時間のラグ

の後、pBG/SIN-1 ELVSトランスフェクト細胞におけるレポーター遺伝子発現のレベルは、pBG/wt ELVSトランスフェクト細胞と比較して同等またはそれ以上である。トランスフェクト細胞における低いベクター特異的RNA合成との組合せの高発現レベルで特徴付けられるpBG/SIN-1 ELVSの表現型は、おそらく宿主細胞タンパク質合成が低減しているか、または存在しないことに起因する。従って、このpBG/SIN-1 ELVSの特性は、トランスフェクト細胞におけるサブゲノムmRNA翻訳テンプレート当たりの発現されるレポータータンパク質を、pBG/wt ELVSと比較してはるかに高いレベルで生じる。要約すれば、SIN-1改変体株由来のプラスミドDNA発現ベクターの表現型は、野生型ウイルス由来ベクターと比較して、比較的低レベルのRNA合成と組み合わせた同等の発現レベルという点で、親ウイルスに追随している。ベクターは、シンドビスウイルス構造タンパク質を含有していないので、この表現型は、SIN-1ウイルス改変体の非構造遺伝子にマップされるはずである。

10

実施例 5

プラスミドDNA SIN-1由来発現ベクターの改変

アルファウイルスに基づくベクターからの標的細胞における異種遺伝子の発現レベルは、宿主の属およびベクター構成を含むいくつかの要素によって影響される。例えば、BHK細胞におけるβ-ガラクトシダーゼ発現レベルは、いくつかのヒト細胞（例えば、pBG/ELVSベクターでトランスフェクトされたHT1080）と比較して、10～100倍高い。pBG/wt ELVS 1.5-βgalプラスミドDNAでトランスフェクトしたBHKおよびいくつかのヒト細胞株におけるレポーター遺伝子発現のレベル（実施例4を参照のこと）を、意図されるインビボ標的属由来の細胞型におけるベクター特異的発現の相対的レベルを樹立するために比較した。pBG/wt ELVS 1.5-βgalプラスミド、または従来のプラスミド発現ベクターでトランスフェクトしたBHK細胞およびヒト線維肉腫株のHT1080（ATCC CCL 121）細胞における、β-ガラクトシダーゼ発現のレベルを決定した。CMVプロモーター駆動pUC由来発現プラスミドマルチクローニング部位（Invitrogen, San Diego, CA）へのlac Z遺伝子（Promega, Madison, WI）の挿入により、従来のプラスミドベクターを構築した。そしてこれはpCMV-β-galとして識別される。図12Aに示す本研究の結果は、pBG/wt ELVS 1.5-βgalプラスミドDNAでトランスフェクトしたHT1080細胞におけるβ-ガラクトシダーゼ発現のレベルは、BHK細胞と比較しておおよそ100倍低いことを実証する。RNAポリメラーゼII発現をシンドビスウイルスベクターレプリコン発現から分離するために、細胞をまた、pCMV-β-galでトランスフェクトした。この実験において、BHK細胞と比較して、pCMV-β-galプラスミドでトランスフェクトしたHT1080細胞における発現は5～10倍減少したが、pBG/wt ELVS 1.5-βgalプラスミドDNAでトランスフェクトしたHT1080細胞における発現はおおよそ100倍減少した。従って、この結果は、pBG/wt ELVS 1.5-βgalプラスミドDNAでトランスフェクトしたHT1080細胞におけるレポーター遺伝子発現の劇的な減少は、部分的に、これらのヒト細胞におけるシンドビスウイルスベクターレプリコンの減少された活性によることを示す。

20

30

RNAアルファウイルスゲノムおよびBHK細胞におけるウイルスの増殖の全体的な柔軟性を考慮すると、異種遺伝子の発現レベルがベクターが由来する宿主細胞株において最も高いことは、驚くべきことではない。従って、比較的低いウイルスRNAレベルおよび同等なウイルス生成レベルと、宿主細胞タンパク質合成の阻害の遅延または非存在を伴うことによって特徴付けられるSIN-1表現型（実施例1および2に記載）を有するアルファウイルスの選択は、任意のヒト初代細胞、または二倍体もしくは倍数体ヒト細胞において実施され得る。

40

最も密接にインビボで標的細胞に類似する細胞（例えば、ヒト）において所望の表現型を有するアルファウイルスの選択に加えて、原型プラスミドDNA発現カセット成分のいくつかの代替の改変が実施され得る。例えば、強力なCMV即時型（IE）プロモーターでのMoMLV RNAポリメラーゼIIプロモーターの置換は、トランスフェクト細胞における異種遺伝子発現のレベルを有意に増強する（Dubenskyら、J.Virol.70:508-519,1996、およびDubenskyら、W/O 95/07994）。さらに、異種遺伝子の上流または下流のいずれかでのイントロン（例えば、SV40スモールt抗原またはCMVイントロンA）の並列は、いくつかのトランスフェクト細胞型において異種遺伝子発現のレベルを増大し得る（Dubenskyら、前出）。

50

インビトロまたはインビボで、トランスフェクト細胞における発現全体を増強するために、原型プラスミドDNA発現カセット成分のいくつかのさらなる代替の改変もまた利用され得る。1つの改変において、B型肝炎ウイルス（HBV）転写後調節エレメント（PRE）をpBG/wt ELVS 1.5-βgalプラスミドDNAに挿入した。PRE配列は、HBV S転写産物の核から細胞質への輸送をシスで活性化する。PRE配列は、スプライスドナーおよびアクセプター部位とは独立して機能するようであり、そしてイントロンを含まないβ-グロブリン転写産物の細胞質発現を活性化することが示されている。シスにおけるPRE機能は、スプライシング経路と効率的に相互作用しないために、核から十分に輸送されない核転写産物の輸送を可能にすると提案されている（Huangら、Molecular and Cellular Biology 15:3864-3869, 1995）。

10

PRE配列を、最初にPCR生成されたHBVの564bpフラグメントをADWウイルス株のpAM6（ATCC No.39630）全長ゲノムクローンから単離することにより、pBG/SIN-1 ELVS 1.5-βgalにクローン化した。増幅フラグメントは、HBVゲノムの塩基1238～1802にわたる。プライマー配列を以下に示す。

正方向プライマー：NTPRE1238F（配列番号46）

5'-CCTATGCGGCGGCGTGGAACCTTTGTGGCTCCTC

逆方向プライマー：EAPRE1802R（配列番号47）

20

5'-CCTATTGGCCAGCAGACCAATTTATGCCTAC

プライマーは、フラグメントの5'末端にNot I認識部位および3'末端にEae I認識部位を導入する。Not IおよびEae Iは、適合性の粘着末端を有する。Eae I認識部位はNot I部位に内在するので、Eae Iは、両方の部位を切断する。

PCRフラグメントをEae Iで消化し、そしてNot I消化/CIAP処理pBG/wt ELVS 1.5-βgalにクローン化した。正確なクローンはPREの5'末端にNot I部位を保有し、そしてこれをpBG/wt ELVS/PRE 1.5-βgalと呼ぶ。

ELVSプラスミドに含まれるPRE配列の、トランスフェクト細胞における異種遺伝子発現への可能な効果を決定した。簡潔には、BHKおよびHT1080細胞を12mmディッシュ中で75%コンフルエンスまで培養し、そしてLipofectamine（GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD）で複合体化した500ngのpCMV-β-gal、pBG/wt ELVS 1.5-βgal、またはpBG/wt ELVS/PRE 1.5-βgalプラスミドDNAでトランスフェクトし、そしてβ-ガラクトシダーゼ発現のレベルを48時間後に決定した。トランスフェクション効率を、実施例4に記載のように、トランスフェクト単層の直接的なXgal染色によって決定した。そして以下の表に示す。

30

青色細胞数/12mmディッシュ

<u>構築物</u>	<u>BHK</u>	<u>HT1080</u>
pCMV-β-gal	549	42
pBG/wt ELVS 1.5-βgal	146	1
pBG/wt ELVS/PRE 1.5-βgal	334	33
偽感染	0	0

40

この結果は、ELVSプラスミドでトランスフェクトされ、βガラクトシダーゼを発現するBHKまたはHT1080細胞の数が、ベクター中にRNA輸送PRE配列を含ませることにより、劇的に増大したことを明らかに実証する。さらに、これらの結果は、ELVISプラスミドDNAでトランスフェクトしたBHK細胞に比較して、HT1080細胞において減少された異種遺伝子発現レベルの1つの原因が、1次転写産物の核からの非効率的な輸送であることを示す。

PRE配列を含むELVSプラスミドでトランスフェクトされ、レポータータンパク質を発現す

50

るHT1080細胞のより高い頻度に類似して、PRE配列を含むELVSベクターでトランスフェクトされたHT1080細胞からの溶解物において、 β -ガラクトシダーゼのレベルは劇的により高かった。これらの結果を図12Bに示し、そして上の表に示した結果と一緒に、ELVSプラスミドでトランスフェクトされたヒト細胞において、機能的ベクターレプリコンが核から非効率的に輸送されることを実証する。さらに、ELVSプラスミド構築にPRE配列を含ませることにより、試験した全ての細胞において異種遺伝子発現のレベルが増大する。これは、細胞質ベクターレプリコン輸送の効率と、全体の異種遺伝子発現レベルとの間の明らかな相関を実証する。

非スプライシングRNAの輸送にシスで作動する、いくつかの他のウイルス配列エレメントもまた同定した。例えば、メイソン-パイプサーウイルス (MPMV) ゲノムの3'末端の近くのnts8022と8240との間に位置する219bp配列が、Rev非依存性ヒト免疫不全症ウイルス1型 (HIV-1) 複製を可能にすることを示した (Brayら、PNAS 91:1256-1260,1994)。全長ゲノムクローンテンプレート (Sonigoら、Cell 45:375-385,1986) またはMPSVサブゲノムクローンpGEM7FZ (-) MPSV 8007-8240 (D.Rekosh,Ham-Rek Laboratories,SUNY at Buffalo,304 Foster Hall,Buffalo,New York) からPCR生成されたMPSVの219bpフラグメントを最初に単離することにより、構成的輸送エレメント (CTE) として知られるMPMV RNA輸送エレメントを、pBG/SIN-1 ELVS 1.5- β galプラスミドに挿入する。増幅されたフラグメントは、MPSVゲノムの塩基8022~8240にわたる。プライマー配列を以下に示す。

正方向プライマー: NMPVM8021F (配列番号48)

5'-CCTATGCGGCCGCTAGACTGGACAGCCAATGACG

逆方向プライマー: EMPMV8241R (配列番号49)

5'-CCTATTGGCCAGCCAAGACATCATCCGGGCAG

プライマーは、フラグメントの5'末端にNot I認識部位および3'末端にEae I認識部位を導入する。Not IおよびEae Iは、適合性の粘着末端を有する。Eae I認識部位はNot I部位に内在するので、Eae Iは、両方の部位を切断する。

PCRフラグメントをEae Iで消化し、そしてNot I消化/CIAP処理pBG/wt ELVS 1.5 β -galにクローン化した。正確なクローンはPREの5'末端にNot I部位を保有し、そしてこれをpBG/wt ELVS/CTE 1.5- β galと呼ぶ。

HBV PREおよびMPSV CTE配列に加えて、他のウイルスまたは細胞供給源由来のいくつかのRNA輸送エレメントがELVSプラスミド構築物に上記のように挿入され得る。例えば、これらのいくつかのエレメントは、HIV Rec応答エレメント (Malimら、Nature,338:254-257,1989)、HTLV 1 Rexエレメント (Ahmedら、Genes Dev.4:1014-1022,1990)、およびサルレトロウイルス1型由来の別のシス作用配列 (Zolotukhinら、J.Virol.,68:7944-7952,1994)を含む。さらに、上記のRNA輸送エレメントの各々はまた、実施例6および7に記載される構造タンパク質発現カセット、パッケージング細胞株、またはプロデューサー細胞株に組込まれ得る。

原型ELVSベクターのなお別の改変において、アルファウイルスレプリコンの発現を、RNAポリメラーゼIプロモーターから駆動させ得る。簡潔には、RNAポリメラーゼIプロモーターは組織特異性ではなく、そして本質的に身体の全てのヒト細胞において発現されるので、これらはトランスフェクト細胞におけるプラスミドDNA指向アルファウイルスレプリコン発現のための魅力的な代替物を提供する。例えば、ヒトrDNAプロモーター (プラスミドprHU3、LearnedおよびTjian,J.Mol.Appl.Gen.,1:575-584,1982) は、異種遺伝子発現のためのベクターを構築するために使用されている (Palmerら、Nuc.Acids Res.21:3451-3457,1993)。

従って、本発明の1つの実施態様において、トランスフェクトされた細胞において転写される最初のヌクレオチドが、真のアルファウイルス5'末端に対応するように、RNAポリメ

ラーゼIプロモーターをレプリコンcDNAの5'末端に並列させ得る。転写開始が生じるRNAポリメラーゼIプロモーター（例えば、プラスミドprHU3）ヌクレオチドの同定は、以前記載されたように決定される（Dubenskyら、W/O 95/07994）。

シンドビスウイルス野生型またはSIN-1 nsP、または任意のアルファウイルス由来のnsP遺伝子を含むELVS構築物を用いて、本明細書中に記載される全ての改変を実施し得る。例えば、実施例5において提供された全ての構築物もまた、実施例4に構築が記載されるプラスミドpBG/SIN-1 ELVS 1.5-βgalを用いて実施し得る。

実施例 6

アルファウイルスパッケージング細胞株の構築

本発明において、アルファウイルスパッケージング細胞株（PCL）が提供される。これにより、RNAパッケージングおよび組換えアルファウイルスベクター粒子の形成に必要なウイルス由来構造タンパク質が、1つ以上の安定に形質転換される構造タンパク質発現カセット（単数または複数）によりコードされる。これらのタンパク質の合成は、好ましくは誘導様式で生じ、そして特に好ましい実施態様において、それらのネイティブな「連結領域」プロモーターからのサブゲノムmRNAの転写を介して生じる。誘導性サブゲノム転写は、導入アルファウイルスベクターRNA自体により媒介される（図13）。構造タンパク質発現カセット（単数または複数）からの1次転写に続き、ベクターにコードされた非構造タンパク質によりRNA転写産物の細胞質性増幅が開始され、そして最終的に連結領域プロモーターからの転写および高レベル構造タンパク質発現に導く。構造タンパク質発現カセットは、本発明において以前記載された任意の要素を含み、RNA輸送要素（例えば、HBV PREおよびMPMV CTE）およびスプライシング配列を含み得る。PCT出願WO 95/07994に記載される方法を用いて、または本発明に記載される新規なアプローチを用いて、このようなPCLおよびこれらの安定に形質転換される構造タンパク質発現カセットを誘導し得る。PCLは、哺乳動物および非哺乳動物の両方の細胞を含む、現存するほとんどのいかなる親の細胞株に由来し得る。PCLの誘導のために好ましい実施態様は、ヒト起源の細胞株である。

A. ベクター誘導性アルファウイルスPCLの構築

例えば、アルファウイルス構造タンパク質発現カセットを構築した。これにより、CMV即時型プロモーターからの1次転写は、効率的な細胞質性増幅、およびベクターRNAからの非構造レプリカーゼタンパク質の翻訳後のみの構造タンパク質発現を可能にするRNA分子を生成する。詳細には、DNAに基づくシンドビス欠陥ヘルパー（DH）ベクターのプラスミドpDCMV-dl_{ns}PSIN（Dubenskyら、J. Virol. 70:508-519, 1996）を、3'末端RNAプロセシングのためにδ型肝炎ウイルス（HDV）抗ゲノムリボザイム配列（PerottaおよびBeen, Nature 350:434-436, 1991）、および非構造タンパク質遺伝子欠失の領域中に挿入されたSV40スモールt抗原イントロンの両方を含むように改変した。HDVリボザイム配列の挿入に伴う制限部位の重複により、Dubenskyら（同書）からのさらなるプラスミドpDLTRSINGHDVを出発物質として用いて、改変CMVに基づくDH構築物を再構築した。プラスミドpDLTRSINGHDVはHDVリボザイムを含むLTRに基づくシンドビスゲノムクローンであり、これをBgl IIで消化して、存在するLTRプロモーターおよびシンドビスヌクレオチド1~2289（Straussら、Virology 133:92-110, 1984に従う番号づけ）を除去し、ウシ腸アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IITM（Bio101, San Diego, CA）を用いて0.7%アガロースゲルから精製した。シンドビスゲノムクローンpDCMV_{SING}（Dubenskyら、同書）のBgl II消化およびGENECLEAN IIを用いる1%アガロースゲルからの精製により、CMVプロモーターを有する対応する5'末端フラグメントを得、次いでBgl II欠失pDLTRSINGHDVベクターに連結して、構築物pDCMV_{SING}HDVを生成した。HDVリボザイムを有するこのCMVに基づくゲノムプラスミドは、感染性シンドビスウイルスを生成し、そしてBHK細胞へのトランスフェクト後の24時間以内に細胞変性効果を生じることを示した。次いで、HDVリボザイムを含む欠陥ヘルパープラスミドpDCMV_{dl}_{ns}PSINGHDVを、BspE I消化および希釈条件下での再連結により構築し、ヌクレオチド422と7054との間の非構造遺伝子配列を除去した。同時に、SV40イントロンをPCRにより合成し、非構造タンパク質遺伝子欠失の領域に挿入した。SV40イ

ントロン配列の増幅を、テンプレートとしてプラスミドpBR322/SV40 (776株、ATCC #45019) および隣接BspE IまたはBamH I部位を含むように設計した以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、30秒間の伸長時間を有する標準的な3サイクルPCRにより達成した。

正方向プライマー：BspSVSDF (5'-制限部位/SV40イントロン配列) (配列番号50)

5'-TATATATCCGGA/AAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTT-3'

10

逆方向プライマー：BamSVSAR (5'-制限部位/SV40イントロン配列) (配列番号51)

5'-TATATAGGATCC/TAGGTTAGGTTGGAATCTAAAATACACAAAC-3'

増幅に続いて、DNAフラグメントをQIAquick-spin PCR精製キット (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて精製し、BspE IおよびBam HIで消化し、Mermaid™ (Bio101, San Diego, CA) を用いて1.2%アガロースゲルから精製し、そして欠陥ヘルパープラスミドpDCMV-dlnsPSIN (これもまたBspE IおよびBam HIで消化し、ウシ腸アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%アガロースゲルから精製した) に連結し、構築物pDCMV-intSINrbz (図14) を生じた。プラスミドの別の部分にSV40プロモーター駆動ネオマイシン耐性選択マーカーをまた含むプラスミドpDCMV-intSINrbzを、Lipofectamine™ (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) を用いて、製造者によって記載されるようにBHK細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトの約24時間後、細胞をトリプシン処理し、そして600 µg/ml G418 (ネオマイシン) を含む培地に再プレートした。培地を定期的に新鮮なG418含有培地に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させた。細胞をトリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュへの限界希釈によりクローン化し、そして個々の細胞クローンを増殖させそしてスクリーニングのために拡大した。

20

個々のクローンについてのポジティブなパッケージング活性を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (Dubenskyら、同書に記載) を発現するシンドビスベクターRNAでのLipofectin™ (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) トランスフェクション、トランスフェクションの約24時間後の培養上清を採取すること、およびパッケージ化シンドビスールシフェラーゼベクター粒子の存在についてアッセイすることにより同定した。さらに、最初のトランスフェクションレベルを、レポーター溶解緩衝液 (Promega, Madison, WI) を用いてトランスフェクト細胞溶解物を採取すること、および製造者によって記載されるようにルシフェリン基質 (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性の存在について試験することにより決定した。

30

培養上清におけるパッケージ化ベクター粒子についてアッセイするために、1mlの希釈していない、明澄化上清を使用して新鮮なBHK細胞単層を約18時間感染させた。次いで、細胞を上記のように溶解し、そしてルシフェラーゼ活性を決定した。感染BHK細胞におけるルシフェラーゼ活性の存在は、トランスフェクト細胞上清におけるパッケージ化ベクター粒子を確認した。pDCMV-intSINrbz構造タンパク質発現カセットの組み込まれたコピーを保有し、そしてPCLとして機能するいくつかのポジティブ細胞クローンを同定した。群の代表的な2つの個々のPCLクローン (#10s-19および#10s-22) のパッケージ化データを図15に示す。さらに、生成されたパッケージ化ベクター粒子の力価を、個々のPCLクローン (#10s-22) をSIN-β-galベクターRNA (Dubenskyら、同書に記載) でトランスフェクトすることにより決定した。培養上清をトランスフェクションの48時間後に回収し、0.45 mmフィルターの通過により明澄化し、そして新鮮なBHK単層を上清の10倍希釈で感染させた。トランスフェクションの約14時間後、細胞をPBSで洗浄し、2%ホルムアルデヒドで固定し、PBSで再び洗浄し、そしてX-galで染色した。次いで、ベクター粒子ユニットを、個々の青色染色細胞の計数により決定した。このPCLクローンからのパッケージ化β-gal

40

50

ベクター力価は、上清の約 10^6 感染ユニット/mlであった。シンドビス構造タンパク質発現のベクター制御誘導性を、構造タンパク質に対して特異的なポリクローナルウサギ抗血清を用いて、ウェスタンブロット分析により実証した。ポジティブ10s-22 PCLおよびネガティブコントロールBHK細胞溶解物を、SIN- β -galベクターRNAでのトランスフェクションの前(U; 非誘導)か、または後(I; 誘導)のいずれかでLameliサンプル緩衝液中で作製した。図16に示すように、ベクターRNAでのトランスフェクションの後に、シンドビス構造タンパク質の発現を示した細胞溶解物は、10s-22 PCLクローンのみであった。キャプシドタンパク質とエンベロープ糖タンパク質との間の発現の見かけ上のレベルの差異は、作製された実際のタンパク質の量か、またはこの特定の実験のために使用した細胞溶解手順におけるエンベロープ糖タンパク質のより低い安定性のいずれをも反映しない。

CMVに基づくDH構築物のパッケージング活性はまた、非哺乳動物細胞(例えば、C6/36蚊細胞)においても高い効率であった。PCLの誘導のためのこのような非哺乳動物の親の細胞型の使用は、PCLがベクタープロデューサー細胞株の生成のための出発物質としての後の使用のために意図される場合に、特に有利であり得る。この細胞型の利点は、宿主巨大分子合成の阻害、および細胞変性効果(CPE)を生じる、哺乳動物細胞に伴う表現型を有せずに、アルファウイルスの持続感染を樹立する天然の能力である。従って、適切な選択マーカを有するDNAに基づくアルファウイルスベクター(実施例4および5)が、蚊または他の非哺乳動物細胞由来のPCLに安定に形質転換され得る。図17Aは、CMVプロモーターの制御下でDNAに基づくルシフェラーゼレポーターベクターおよびシンドビス構造タンパク質を発現するDHヘルパーベクターの両方が、ルシフェラーゼベクターパッケージングにより実証されるように、C6/36細胞において完全に機能性であったことを示す。

B. 作動可能に連結された選択マーカを有するPCLの構築

本発明の他の実施態様において、選択マーカをアルファウイルス構造タンパク質発現カセットの転写に作動可能に連結した。好ましい実施態様において、この作動可能な連結を、残りのnsP1アミノ酸との融合物としてのマーカの非構造タンパク質遺伝子欠失の領域への挿入、または内部リボソーム侵入部位(IRES)配列の翻訳制御下での構造タンパク質遺伝子の下流への挿入のいずれかによって達成する。再び、一次構造タンパク質遺伝子mRNA転写産物の増幅および構造タンパク質発現の誘導を、インプットベクターRNA分子および合成されたその非構造タンパク質により制御する。

詳細には、構造タンパク質発現カセットの構築のために、プラスミドpBGS131 (Sprattら、Gene 41:337-342, 1986; ATCC #37443)を改変して外来性配列を除去し、そしてカナマイシン耐性遺伝子中に存在するXho I部位を非機能性にした。プラスミドpBGS131をXho Iで消化し、そしてXho I適合性末端を有する合成2本鎖オリゴヌクレオチドリンカーをこの部位に連結した。以下に示す合成12マーオリゴヌクレオチドを、それ自体にアニールして連結のためのXho I粘着末端を生じる部分的パンドロームとして設計し、そして4つのインフレームのアミノ酸を挿入することにより、カナマイシン耐性遺伝子オープンリーディングフレームを維持した。

dlXhoリンカー (配列番号52)

5'-TCGATCCTAGGA

このオリゴヌクレオチドの挿入は、Xho I部位欠失プラスミドを生じ、これをpBGS131dlXhoIと命名した。次に、このプラスミドをBspH Iで消化し、希釈条件下で自己に連結し、CoIE1レプリコンとカナマイシン耐性マーカとの間の829bpの外来性配列を除去し、プラスミドpBGS131dlBを生成した。次に、pBGS131dlBをBspH Iで消化することによりBspH I部位をPac I部位に変換し、Klenow酵素およびdNTPで末端を平滑にし、そして過剰のPac Iリンカーと連結した。

Pac Iリンカー (配列番号53)

5'-GCTCTTAATTAAGAGC

pBGS131dlB-Pと呼ばれるこの新しい構築物を、Fsp IおよびPvu IIで消化することにより

、マルチクローニング部位 (MCS) を含むさらなる472bpを除去し、そしてGENECLEAN IIを用いて残りのベクターを1%アガロースゲルから精製することにより、さらに改変した。置換MCSを、2つの相補的オリゴヌクレオチドPME.MCSIおよびPME.MCSIIをアニーリングし、そして線状化プラスミドと連結することにより、改変ベクターに挿入した。

PME.MCSI (配列番号54)

5'-CTGTTTAAACAGATCTTATCTCGAGTATGCGGCCGCTATGAATTCGTTTAAACGA-3'

PME.MCSII (配列番号55)

10

5'-TCGTTTAAACGAATTCATAGCGGCCGCATACTCGAGATAAGATCTGTTTAAACAG-3'

約2475bpの新しいクローニングベクターをpBGSVGと命名し、そしてこれは以下のマルチクローニング部位を含んでいた：<Pme I-Bgl II-Xho I-Not I-EcoR I-Pme I>。作動可能に連結された選択マーカーを含む構造タンパク質発現カセットの挿入を、段階的に、以下のように行った。シンドビスウイルスの3'末端、合成A₄₀路、抗ゲノムHDVリボザイム、およびBGH転写終結シグナルを含むDNAフラグメントを、Not IおよびEcoR Iでの消化およびGENECLEAN IIを用いる1%アガロースゲルからの精製により、プラスミドpBG/SIN-1 EL VS 1.5 (実施例5) から取り出した。プラスミドpBGSVGもまた、Not IおよびEcoR Iで消化し、GENECLEAN IIを用いて1%アガロースゲルから精製し、そして精製3'末端/A40/HD 20 V/BGHフラグメントと連結し、構築物pBGSV3'を生成した。次に、構造タンパク質遺伝子および非構造タンパク質をコードする領域の大部分を含む約9250bpのシンドビスcDNAフラグメントを、Bgl IIおよびFsp Iでの消化により、プラスミドpDLTRSING (Dubenskyら、同書) から取り出し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%アガロースゲルから精製した。次いで、シンドビスcDNAフラグメントを、プラスミドpBGSV3' (これもまた、Bgl IIおよびFsp Iで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%アガロースゲルから精製した) に連結した。新たな構築物をpBGSV3' BFと命名した。続いて、この構築物をBgl IIで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIで残りの5'末端および非構造遺伝子配列ならびにCMV IEプロモーターの挿入のために精製した。残りの配列を、Bgl IIでのプラスミドpDCMVISING (Dubenskyら、同書) の消化、G 30 ENECLEAN IIを用いる1%アガロースゲルからのフラグメントの精製、および線状pBGSV3' BFベクターとの連結により得、CMV駆動シンドビスゲノム構築物であるpBGSVCMVgenを作製した。この構築物のシンドビスウイルス複製サイクルの開始についての機能性を、pBGSVCMVgenプラスミドのBHK細胞へのLipofectamine媒介トランスフェクションおよびトランスフェクト後24時間以内のCPEの観察により決定した。

続いて、プラスミドpBGSVCMVgenを使用し、ほとんどの非構造タンパク質遺伝子を欠失させ、そしてnsP1オープンリーディングフレームの残りのコドンとのインフレーム融合物としてネオマイシン耐性遺伝子を挿入することにより、DH構造タンパク質発現カセットを構築した。簡潔には、隣接するBspE IおよびBamH I部位を含むように設計した以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ネオマイシン耐性遺伝子をpcDNA3ベクター (Invitro 40 gen, San Diego, CA) から標準的な3サイクルPCRにより増幅した。

正方向プライマー：NEO5' FUSE (5'-制限部位/neo遺伝子) (配列番号56)

5'-ATATATCCGGA/GTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTA

逆方向プライマー：NEO3' BAM (5'-制限部位/neo遺伝子) (配列番号57)

5'-ATATAGGATCC/TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCCA

増幅後、DNAフラグメントをQIAquick-spinを用いて精製し、BspEIおよびBamHIで消化し、

50

GENECLEAN IIを使用して精製し、そしてプラスミドpBGSCMVgen (BspEIおよびBamHIで同様に消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルから精製した) に連結した。生じた構築物をpBGSCMVdneoと命名した。そしてこれを図14において模式的に示す。pBGSCMVdneoの構成は、構造タンパク質発現カセットの一部として、そして同じCMVプロモーターによって制御される、開始メチオニンおよびnsP1のアミノ末端の121アミノ酸ならびにメチオニン開始コドンおよび次の10のアミノ酸を欠失するネオマイシン耐性遺伝子を含む融合タンパク質を含む。

プラスミドpBGSCMVdneoを、製造者によって記載されるようにLipofectaminを使用して、BHK細胞へトランスフェクトした。トランスフェクション約24時間後、細胞をトリプシン処理し、そして600 μ g/mlの薬物G418 (ネオマイシン) を含有する培地中に再びプレートした。培地を、新たなG418含有培地で定期的に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させた。細胞をトリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュ中で限界希釈によってクローニングし、そしてスクリーニングのために個々の細胞クローンを増殖させ、そして拡大させた。個々のクローンについて、ポジティブパッケージング活性について、シンドビスルシフェラーゼベクターRNAをトランスフェクトし、そして先の節において記載されたようにパッケージングされたシンドビスルシフェラーゼベクター粒子の存在についてアッセイすることによって同定した。組み込まれたpBGSCMVdneo構造タンパク質遺伝子発現カセットのコピーを有し、そしてPCLとして機能するいくつかのポジティブ細胞クローンを同定した。群を代表する個々のクローン (F11、F13、F15) についての、ならびに上記の10s-22 PCL株のSNBSTM-ルシフェラーゼベクターパッケージングデータを図18に示す。

シンドビスルシフェラーゼベクターを用いた機能的なパッケージング活性を実証することに加えて、同じPCLを使用して行ったさらなる実験もまた、他のアルファウイルス由来のベクターもまた、パッケージングされ得ることを示した。例えば、 β -ガラクトシダーゼを発現するシンドビス (Dubenskyら、同書) およびセムリキ森林 (pSFV3-lacZ; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) ベクターRNAの両方を、F15パッケージング細胞株へトランスフェクトした。トランスフェクションの約48時間後、培養上清を採取し、明澄化し、連続的に希釈し、そしてベクター粒子力価の測定のために、新鮮なBHK細胞単層に感染するために使用した。感染18時間後、上記のようにBHK細胞を固定し、X-galで染色し、そして青色染色細胞を数えた。シンドビス β -galについて得たベクター力価は、約 5×10^6 IU/mlであったが、SFV β -galについての力価は約 4×10^6 IU/mlであった。これらのデータは、2つの異なるアルファウイルスおよびそれらに対応するベクターが、類似のパッケージングシグナルを有すること、および本明細書中で記載されるシンドビス系のために誘導したPCLが別のアルファウイルスとともに使用された場合、十分に機能的であることを実証する。

pBGSCMVdneo構築物のパッケージング活性もまた、ヒト起源の細胞 (例えば、293細胞) において非常に効率的であった。PCLの誘導のために、このようなヒトの親細胞型の使用は、相補的な耐性組換えアルファウイルス粒子の生成において特に有利であり得る。図17Bは、RNAに基づくルシフェラーゼリポーターベクターおよびDNAに基づくルシフェラーゼベクターの両方が、BHK細胞へのルシフェラーゼ発現の上清移入によって示されたように、G418耐性pBGSCMVdneo形質転換293PCL中へのトランスフェクション後、効率的にパッケージングされたことを示す。

別の選択可能な薬物耐性マーカーもまた、そのN末端で残りのnsP1アミノ酸を有する融合タンパク質として、類似のPCL構成において機能することが示された。簡略には、ハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子 (ハイグロマイシン耐性マーカー、hygro^r) を、存在するネオマイシン耐性マーカーの代わりに、プラスミドpBGSCMVdneo中に置換した。hygro^r 遺伝子を、隣接するEcoRVおよびBamHI部位を含むように設計された以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プラスミドp3' SS (Stratagene, La Jolla, CA) から標準的な3サイクルPCRによって増幅した。

正方向プライマー：5' HYGROEV (5' 制限部位/hygro遺伝子) (配列番号112)

5' -TATATGATATC/AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG

逆方向プライマー：3' HYGROBA (5' 制限部位/hygro遺伝子) (配列番号113)

5' -ATATAGGATCC/TCAGTTAGCCTCCCCCATCTCCCG

増幅後、DNAフラグメントをQIAquick-spinで精製し、EcoRVおよびBamHIで消化し、GENECL
EANを使用して精製し、そしてプラスミドpBGSVCMVdIneo (BspEIで消化し、Klenowで平滑
末端化し、さらにBamHIで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGenecleanを
使用して0.7%ゲルから精製した) に連結した。生じた構築物をpBGSVCMVdIhygと命名した

10

。プラスミドpBGSVCMVdIhygを、製造者によって記載されるようにLipofectamineを使用して
、BHK細胞へトランスフェクトした。トランスフェクトの約24時間後、細胞をトリプシン
処理し、そして1.2mg/mlの薬物ハイグロマイシン (Boehringer Mannheim) を含有する培
地中に再びプレートした。培地を、新鮮なハイグロマイシン含有培地で定期的に交換し、そ
して耐性細胞のフォーカスをプールに増殖させた。選択されたパッケージング細胞の機能
性を、シンドビスルシフェラーゼベクターRNAでトランスフェクトし、そして先の節で記
載されたように、パッケージングされたシンドビスルシフェラーゼベクター粒子の存在
についてアッセイすることによって実証した。これらのパッケージング実験からのポジ
ティブな結果を図39において示す。

20

代替のパッケージング細胞株において、構造タンパク質発現カセット、選択マーカー (こ
の場合ではネオマイシン耐性) を、シンドビス構造タンパク質遺伝子の下流に、内部リボ
ソーム侵入部位 (IRES) の翻訳制御下で挿入した。従って、ネオマイシン耐性をコードす
るmRNAの転写は、ゲノムレベル (RSVプロモーターから) およびまたサブゲノム連結領域
プロモーターからの両方で生じる。この構築物にとって独特なさらなる特徴は、一次転写
のためのラウス肉腫ウイルス (RSV) LTRプロモーターおよびシンドビス欠陥干渉RNAクロ
ーンDI25 (MonroeおよびSchlesinger, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:3279-3283, 1983) 由
来のtRNA^{Asp}5'末端配列を含む。この特定のPCL発現カセット構成は、987DHBBNeoと命名
された。そしてこれを図14において模式的に示す。詳細には、プラスミド987DHBBNeoを、
開始物質として、改変されたプラスミドベクターpBGS131dIB-P (上記) を使用して段階的
に構築する。連結領域プロモーター、構造タンパク質遺伝子配列、および3' 非翻訳領域
+ポリAを含むcDNAフラグメントを、全長シンドビスcDNAクローンpRSING (Dubenskyら、同
書) のBamHIおよびXbaIでの消化、ならびにGENECLEAN IIを使用する0.7%アガロースゲル
からの精製によって得る。シンドビスcDNA DNAフラグメントを、プラスミドベクターpBGS
131dIB-P (これはまたBamHIおよびXbaIで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そ
してGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルから精製した) で連結し、構築物pBGS
INspを生成した。

30

次いで、SV40初期領域由来の転写終結シグナルを、pBGSINspのSacI部位とEcoRI部位との
間、シンドビス配列の直ぐ下流に挿入する。初期領域転写終結配列を含む、SV40ウイルス
ヌクレオチド2643~2563を、以下に示すプライマー対およびテンプレートとしてpBR322/S
V40プラスミド (ATCC#45019) を使用するPCR増幅によって単離する。

40

正方向プライマー：FSVTT2643 (5'-制限部位/SV40nts2643~2613) (配列番号58)

5'-TATATATGAGCTCTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTC

逆方向プライマー：RSVTT2563 (制限部位/SV40nts2563~2588) (配列番号59)

5'-TATATGAATTCGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATG

プライマーを、30秒間の伸長時間を有する標準的な3サイクルPCRで使用する。増幅産物をQIAquick-spinで精製し、SacIおよびEcoRIで消化し、Mermaid kitで再び精製し、そして90bpフラグメントを、プラスミドpBGSINsp (同様にSacIおよびEcoRIで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルから精製した) に連結する。この構築物は、pBGSINspSVとして識別される。

次いで、DI tRNA^{ASP}構造を含むRSVプロモーターおよびシンドビス5'末端配列を重複PCRによって構築し、そして完全なフラグメントを構造タンパク質遺伝子ベクターpBGSINspSV中へ挿入する。PCR反応#1において、RSVプロモーターフラグメントを、一方のプライマー中に隣接BglIII部位および他方のプライマー中にtRNA5'末端に重複する配列もまた含むように設計された、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、1分間の伸長を有する標準的な3サイクルPCRによって増幅する。シンドビスtRNA 5'末端をRSVプロモーター転写開始部位にすぐに隣接して配置する。

正方向プライマー：5' RSVpro (5'-制限部位/RSV配列) (配列番号60)

5'-TATATAGATCT/AGTCTTATGCAATACTCTTGTAGT

逆方向プライマー：3' RSVtR (5'-Sin tRNA配列/RSV配列) (配列番号61)

5'-GGGATACTCACCCTATATCTCGACGGTATCGAGGTAGGGCACT

PCR反応#2において、一方のプライマー中に隣接するBamHI部位および他方のプライマー中に3' RSVtRプライマーに重複する配列もまた含むように設計された以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、1分間伸長を有する標準的な3サイクルPCRによって、テンプレートプラスミドTotol101 (5' tRNA^{ASP}) (Bredenbeekら、J.Virol.67:6439-6446,1993) からシンドビス5'末端ならびにtRNA配列を増幅する。

正方向プライマー：5' tRNASin (5'-シンドビス+tRNA配列のみ) (配列番号62)

5'-GATATAGTGCTGAGTATCCCCG

逆方向プライマー：3' SinBam (3'-制限部位/シンドビス配列) (配列番号63)

5'-TATATGGATCC/CGGAGATCCTTAATCTTCTCATG

増幅後、DNAフラグメントをQIAquick-spinで精製し、そしてさらなる5' RSVproおよび3' SinBamプライマーを使用して2分間伸長を有する後続の3サイクルPCR反応中でテンプレートと一緒に使用する。生じる重複PCRアンプリコンをGENECLEAN IIを使用して精製し、BglIIIおよびBamHIで消化し、そしてプラスミドpBGSINspSV (またBglIIIおよびBamHIで同様に消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルから精製した) 中へ連結した。生じる構造タンパク質発現性の、欠陥ヘルパーを987DHBBと命名する。

次いで、脳心筋炎ウイルス (EMCV) 由来のIRES配列を、選択マーカーとしてのネオマイシ

10

20

30

40

50

ンホストランスフェラーゼ遺伝子の直ぐ上流に重複PCRによって配置し、そして完全なアンプリコンを987DHBBのNsiI部位中に挿入する。NsiI部位での挿入は、選択マーカーを構造タンパク質ORFの直ぐ下流に配置する。PCR反応#1において、EMCV IRESフラグメント（ヌクレオチド260～827）を、一方のプライマーに隣接NsiI部位および他方にneo遺伝子に重複する配列もまた含むように設計された以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、30秒間の伸長を有する標準的な3サイクルPCRによって、テンプレートプラスミドpBS-ECAT（Jangら、J.Virol 63:1651,1989）から増幅する。

正方向プライマー：5' EMCVIRE5（5'-制限部位/EMCV配列）（配列番号64）

5'-TATATATGCAT/CCCCCCCCCCCCCAACG

10

逆方向プライマー：3' EMCVIRE5（5'-pcDNA+neo配列/EMCV配列）（配列番号65）

5'-CATGCCAAACGATCCTCATC/CTTACAATCGTGGTTTTCAAAGG

PCR反応#2において、neo耐性マーカーを、一方のプライマーに隣接NsiI部位および他方に3' EMCVIRE5プライマーに重複する配列もまた含むように設計された以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、1.5分間の伸長を有する標準的な3サイクルPCRによって、テンプレートプラスミドpcDNA3（Invitrogen, San Diego, CA）から増幅する。

正方向プライマー：5' Neo/pcDNA（5'-pcDNA+neo配列のみ）（配列番号66）

20

5'-GATGAGGATCGTTTCGCATGATTGA

逆方向プライマー：3' Neo/pcDNA（3' 制限部位/neo配列）（配列番号67）

5'-TATATATGCAT/TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCCGA

増幅後、DNAフラグメントをQIAquick-spinを用いて精製し、そしてさらなる5' EMCVIRE5および3' Neo/pcDNAプライマーを使用する、2分間の伸長を有する後続の3サイクルPCR反応中でテンプレートとして一緒に使用する。生じる重複PCRアンプリコンをGENECLEAN Iを使用して精製し、NsiIで消化し、そしてプラスミド987DHBB（同様にNsiIで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して、0.7%アガロースゲルから精製した）に連結する。シンドビス3' 非翻訳領域にIRESneo挿入物を有する、生じる構造タンパク質発現構築物を987DHBBNeoと命名する。

30

安定なパッケージング細胞株を作製するために、BHK細胞を10 μgのプラスミド987DHBBNeoで、標準的なリン酸カルシウム沈澱プロトコルを使用してトランスフェクトした。トランスフェクションの約24時間後、培地を、1 mg/mlの薬物G418を含有する新鮮な培地で置換した。さらに1日後、細胞をトリプシン処理し、そして500 μg/ml G418を含有する培地中で1/10密度で再びプレートした。さらに数回の継代の後、細胞を希釈クローニングに供し、そして個々のクローンを拡張した。個々のクローンのパッケージング細胞株として機能する能力を、プラスミドRSV/Sinrep/LacZ、β-galを発現するシンドビスDNAベクターでリン酸カルシウムトランスフェクションし、そして48時間後上清中でパッケージングされたベクター粒子の存在についてアッセイすることによって測定した。パッケージングされたベクターレプリコンをFrolovおよびSchlesinger（J.Virol.68:1721-1727,1994）に記載されるCPEアッセイによって力価測定し、そして987DH-BBNeoと命名されたパッケージングされた高い力価の粒子を与えるレプリコンをさらなる特徴づけに使用した。パッケージングされたベクター力価を、いくつかの異なるトランスフェクション技術を使用してRNAに基づくβgal発現シンドビスベクターまたはDNAに基づくβ-gal発現シンドビスベクターのいずれかのトランスフェクション後48時間目に測定した。結果は以下のようであった：

40

<u>トランスフェクション手順</u>	<u>添加した核酸</u>	<u>力価（感性感単位／ml）</u>
エレクトロポレーション	RSVSINrep/LacZ DNA (2.5 μ g)	1.5×10^9 /ml
エレクトロポレーション	SINrep/LacZ RNA (2.5 μ g)	6×10^9 /ml
Lipofectamin	RSVSINrep/LacZ DNA (2 μ g)	パーケージン グされた粒子なし
Lipofectin	SINrep/LacZ RNA (2 μ g)	$5 \sim 6 \times 10^7$ /ml

10

<u>トランスフェクション手順</u>	<u>添加した核酸</u>	<u>力価（感性感単位／ml）</u>
リン酸カルシウム	RSVSINrep/LacZ DNA (10 μ g)	1.5×10^9 /ml

さらに、987DH-BB細胞株を用いてパッケージングされたSINrep/LacZ粒子を使用して、続いて、新鮮なBHK細胞単層に感染させ、そしてRNAおよびタンパク質の発現パターンを評価した。図19は、BHK細胞を1細胞当たり150感染性単位のMOIでのSINrep/LacZ粒子（レーン1および2）またはコントロールとして野生型シンドビスウイルス（レーン3）の2つの異なる調製物で感染させた後のRNAパターンを示す。感染から7時間後、ダクチノマイシン（1 μ g/ml）および [^{3} H] ウリジン（20 μ Ci/ml）を添加し、続いて4時間後、Bredenb 20
 eekら（J.Virol.67:6439-6446,1993）に従ってRNAを採取し、そして分析した。高いMOIを、可能性のある組換え体を検出するために使用した。ゲルレーンの右側の横線は、シンドビスおよび目的の β -gal RNAを示す。最も高い分子量バンドは、レプリコンまたはウイルスのゲノムRNAを示す（レーン1および2、SINrep/LacZ；レーン3シンドビスウイルス）。次の2つの示されているRNAは、987DH-BBNeo PCL発現カセットのゲノムRNAおよび同一の987DH-BBNeo PCLカセット由来の誘導性サブゲノム構造タンパク質mRNAである。後者の2つのバンドの存在は、パッケージング細胞株由来のヘルパーゲノムRNAもまた同時パッケージングされることを実証する。次のRNAバンド（それらは、最も多量に存在する）は、SINrep/LacZ（レーン1および2）またはシンドビスウイルスゲノム（レーン3）のいずれか由来のサブゲノムRNAである。 30

タンパク質分析を、パッケージングされたSINrep/LacZレプリコンを用いた20感染性単位／細胞のMOIでのBHK21細胞の感染後に行った。感染から15時間後、細胞を [^{35} S] メチオニンで30分間標識し、溶解物を作製し、そしてタンパク質をSDS-PAGEによって分析した。図20（レーン2および3）に示すように、 β -ガラクトシダーゼおよびシンドビスウイルスキャプシドタンパク質の両方が、ベクター粒子感染細胞において標識されるが、非感染細胞においては標識されていない（レーン1）。キャプシドの存在は、パッケージングされた粒子のいくつかもまた、PCL由来の構造タンパク質遺伝子RNA転写産物を含むことを示す。

C. 「分割構造遺伝子」PCL構成の構築

本発明の他の実施態様において、PCLが提供される。ここで、アルファウイルス構造タンパク質は、その天然の翻訳後プロセッシングを有する単一のmRNA由来のポリタンパク質として発現されず、むしろ複数のカセットを介して転写される独立したmRNA由来の分離したタンパク質として発現される。このような構成は、複製可能なまたは感染性ウイルスの形成を導く組換えまたは同時パッケージング事象の可能性を非常に少なくする。好ましい実施態様において、キャプシドタンパク質は一つの安定に形質転換されたカセットから発現され、そしてエンベロープ糖タンパク質は、第2の安定に形質転換されたカセットから一緒に発現され、そして各々は、連結領域プロモーターからベクター誘導性様式で発現される（上記）。 40

例えば、シンドビスウイルスキャプシドタンパク質遺伝子を、隣接XhoI部位およびキャプシドタンパク質遺伝子開始コドンまたは隣接NotI部位および翻訳停止コドンを含むように 50

設計された以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、1.5分間の伸長を有する標準的な3サイクルPCRによって、プラスミドpDLTRSING (Dubenskyら、同書) から増幅した。

正方向プライマー：SIN5' CXho (5'-制限部位/キャプシド配列) (配列番号68)

5'-ATATACTCGAG/ACCACCACCATGAATAGAGGATTC

逆方向プライマー：SIN3' CNot (5'-制限部位/停止コドン/キャプシド配列)
(配列番号69)

5'-TATATGCGGCCGC/TATTA/CCACTCTTCTGTCCCTTCCGGGGT

増幅後、キャプシドDNAフラグメントをQIAquick-spinで精製し、XhoIおよびNotIで消化し、GENECLEAN IIで精製し、そしてDNAに基づくシンドビス発現ベクターpDCMVSIN-luc (Dubenskyら、同書) (ルシフェラーゼレポーター遺伝子挿入物を除去するためにXhoIおよびNotIで同様に消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルから精製した) に連結した。生じたキャプシドタンパク質発現構築物を、pDCMVSIN-Cと命名した。プラスミドpDCMVSIN-Cを続いてBspEIで消化し、ほとんどの非構造タンパク質遺伝子配列を除去し、そして希釈条件下で自己に再び連結させて、DHベクター構築物のpDCMVSINd1-Cを作製した。

プラスミドpDCMVSINd1-C (これはまた、ネオマイシン耐性カセットを含む) を、製造者によって記載されるように、Lipfectaminを使用して、BHK細胞中へトランスフェクトした。トランスフェクションから約24時間後、細胞をトリプシン処理し、そして600 µg/mlの薬物G418 (ネオマイシン) 含有培地中へ再びプレートした。培地を新鮮なG418含有培地で定期的に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させた。細胞をトリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュ中に限界希釈することによってクローン化し、そして個々の細胞クローンを増殖させ、そしてスクリーニングのために拡張させた。ベクターの投入に応答して誘導性にキャプシドタンパク質を発現した細胞を、シンドビスルシフェラーゼベクターRNAをトランスフェクトし、トランスフェクション後の約15時間に細胞溶解物を作製し、そしてウサギ抗シンドビスポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロット分析を行うことによって同定した。組み込まれたキャプシドタンパク質遺伝子発現カセットのコピーを有し、そして誘導性にタンパク質を発現するを有するいくつかのポジティブ細胞クローンを同定した。

「分割構造遺伝子」カセットの状況において、発現されたキャプシドの誘導性および機能性の両方を実証するために、シンドビスウイルスエンベロープ糖タンパク質を発現したさらなる構築物、pDCMVSIN-lucから生成した。簡潔には、シンドビスエンベロープ糖タンパク質遺伝子を、隣接XhoI部位および良好なKozak状況における翻訳開始コドン、または隣接NotI部位および翻訳停止コドンを含むように設計された以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、2.5分間の伸長を有する標準的な3サイクルPCRによってプラスミドpDLTRSINGから増幅した。

10

20

30

40

正方向プライマー：5' GLYC0-X (5'-制限部位／開始コドン／糖タンパク質配列)
(配列番号70)

5'-ATATACTCGAG/AGCAATG/TCCGCAGCACCCTGGTCACGGCA

逆方向プライマー：3' GLYC0-N (5'-制限部位／糖タンパク質配列) (配列番号71)

5'-ATATAGGCGGCCGC/TCATCTTCGTGTGCTAGTCAGCATC

10

増幅後、糖タンパク質遺伝子DNAフラグメントを、QIAquick-spinで精製し、XhoIおよびNotIで消化し、GENECLEAN IIを使用して精製し、そしてDNAに基づくシンドビス発現ベクター-pDCMVSIN-luc (ルシフェラーゼレポーター遺伝子挿入物を除去するためにXhoIおよびNotIで同様に消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルから精製した) に連結した。生じた糖タンパク質発現構築物を、pDCMVSIN1.5PEと命名した。

図21は、2つの異なるクローン性のキャプシド株 (9-3および9-9) 細胞株のベクター制御された誘導性を実証するウェスタンブロットである。これらをLipofectaminを使用して、エンベロープ糖タンパク質 (1.5PEレーン) またはβ-ガラクトシダーゼレポーター、pDCMVSIN-β-gal (Dubenskyら、同書; 1.5β-galレーン) を発現するシンドビスDNAベクターでトランスフェクトしたか、または「偽」トランスフェクトした (Mレーン)。細胞溶解物をトランスフェクションから48時間後に作製し、SDS-PAGEによって分離し、そしてメンブレンに移した。ここで、メンブレンを、シンドビス構造タンパク質およびβ-ガラクトシダーゼについて特異的である抗体の組合せでプローブした。ブロットは、明らかに、いずれかのベクターによって供給される非構造タンパク質に応答するキャプシドタンパク質の誘導性ならびにβ-ガラクトシダーゼおよびエンベロープ糖タンパク質の発現を示す。

20

「分割構造遺伝子」キャプシド細胞株の機能性 (相補性およびベクター粒子パッケージングによる) をLipofectamineを使用してβ-ガラクトシダーゼおよびエンベロープ糖タンパク質ベクターをキャプシド細胞株中へ同時トランスフェクトし、そして培養上清中のパッケージングされた粒子についてアッセイすることによって実証した。トランスフェクションの約48時間後に、上清を採取し、そしてパッケージングアッセイおよびベクター力価の測定のために明澄化した。さらに、細胞を、Lameliサンプル緩衝液を使用して溶解し、そしてポリクローナルな抗シンドビス抗体を用いてウェスタンブロット分析によって調べた。これは、キャプシドタンパク質およびベクター供給エンベロープタンパク質の両方の発現を実証した。次いで、上清を、約18時間天然のBHK細胞に感染させ、そして本実施例において上記のようにβ-galレポーター遺伝子発現のために染色することによって、パッケージングされたベクター粒子の存在について試験した。細胞株の相補性およびパッケージングについての機能性を、青色に染色されたβ-gal発現細胞の観察によって実証した。

30

キャプシドタンパク質およびエンベロープ糖タンパク質の両方について別々のベクター誘導性発現カセットを有する安定な「分割構造遺伝子 (split structural gene)」PCLを生成するために、上記のキャプシド細胞株を、異なる選択マーカーを含む (例えば、ハイグロマイシンB耐性) さらにエンベロープ糖タンパク質発現構築物とともに使用する。簡潔に記載すると、プラスミドpBG/SIN-1 ELVS 1.5-β-gal (実施例5) をBamHIおよびFspIで消化して、連結領域プロモーター、β-galレポーター遺伝子、およびいくつかの3'末端配列を含む配列を単離する。所望のフラグメントをGENECLEAN IIを使用して1%アガロースゲルから精製し、そしてこれもまたBamHIおよびFspIで消化して、全ての構造タンパク質遺伝子配列を除去し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルから精製したプラスミドpBGSVCMVdIneo (上記を参照のこと) 中に連結する。得られる構築物をpBGSVCMVdIsP-lucと称する。次に、プラスミドpBGSVCMVdI

40

50

sP-lucをXhoIおよびNotIで消化して、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を除去し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して0.7%アガロースゲルから精製し、そしてその後上記からのXhoIおよびNotI消化したエンベロープ糖タンパク質PCRアンプリコンを、消化したpBGSVCMVdlsP-lucベクター中に連結して、エンベロープ糖タンパク質発現DH構築物pBGSVCMVd1-Gを生成する。このプラスミド中へのハイグロマイシン耐性マーカーカセット、ならびに隣接するHSV TKプロモーターおよびポリアデニル化配列の挿入は、2.5分間伸長での標準的な3サイクルプロトコル、テンプレートとしてのプラスミドpDR2 (Clontech, Palo Alto, CA)、および隣接するPac I部位を含むように設計されている以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、PCR増幅により達成される。

正方向プライマー：5' HYGR0/Pro-P (5'-制限部位/pDR2配列) (配列番号72)

5'-ACACATTAATTAA/CGATGCCGCCGAAGCGAGAA

10

逆方向プライマー：3' HYGR0/pA-P (5'-制限部位/pDR2配列) (配列番号73)

5'-ACACATTAATTAA/GTATTGGCCCCAATGGGGTCT

増幅後、DNAフラグメントをQIAquick-spinで精製し、Pac Iで消化し、GENECLEAN IIを使用して精製し、そしてこれもまたPacIで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを使用して精製したプラスミドpBGSVCMVd1-G中に連結する。得られる構築物をpBGSVhygro-Gと称する。

20

プラスミドpBGSVhygro-G (これはまた今やハイグロマイシン耐性カセットを含む) を製造業者により記載されるようにLipofectamineを使用してキャプシド細胞株中にトランスフェクトする。トランスフェクション後約24時間で、細胞をトリプシン処理し、そして1200 ug/mlのハイグロマイシン (Calbiochem, La Jolla, CA) を含有する培地中に再プレーティングする。この培地を定期的に新鮮なハイグロマイシン含有培地に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させる。細胞をトリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュ中での限界希釈によりクローン化し、そして個々の細胞クローンを増殖させそしてスクリーニングのために拡大する。投入ベクターに応答して生物学的に活性なキャプシドタンパク質およびエンベロープ糖タンパク質を誘導的に発現する細胞を、2つの方法で同定する：第1に、上記のように、シンドビスルシフェラーゼベクターRNAでのLipofectin媒介性トランスフェクション、およびトランスフェクション後15時間の溶解物をウエスタンブロットにおいてプローブすることによる；そして第2に、同様なシンドビスルシフェラーゼベクタートランスフェクションであるが、上清をトランスフェクション後24時間に回収し、そして上清での感染による新鮮なBHK細胞へのルシフェラーゼ発現の移行について試験することによる (上記を参照のこと)。このようにして誘導した分割構造遺伝子PCLをC/GLYCO PCLと称する。

30

D. 「ハイブリッド」構造タンパク質を有するPCLの構築

同時パッケージングまたはDHとベクターRNA分子との間の組換えのレベルを減少させて、糖タンパク質遺伝子の翻訳を増強するため、またはパッケージングされた組換えアルファウイルスベクター粒子の細胞もしくは組織特異性を変化させるために利用され得るさらなるアプローチは、他のアルファウイルスまたはトガウイルス由来の構造タンパク質遺伝子を使用する。より詳細には、シンドビスウイルスまたは異なるアルファウイルスベクターとの使用のための、アルファウイルスまたはトガウイルス構造タンパク質遺伝子の多数の組み合わせが意図され得る。例えば、ロスリバーウイルス (RRV) のキャプシドタンパク質遺伝子を、シンドビスウイルスのエンベロープ糖タンパク質遺伝子 (同一のまたは異なる構築物から発現される) とともに使用して、実施例3、4、または5に記載のシンドビスウイルス由来ベクターをパッケージングし得る。さらに、RRVキャプシドタンパク質遺伝子の欠失形態を、シンドビス糖タンパク質遺伝子配列の直ぐ上流に配置して、翻訳エンハンサーエレメントとして作用させ得る。別の例として、シンドビスウイルスの構造タン

40

50

パク質を使用して、セムリキ森林ウイルスRNAベクターをパッケージングし得る。
詳細には、インタクトなまたは欠失した形態のRRVキャプシド遺伝子（図22）+シンドビス糖タンパク質遺伝子を含む欠陥ヘルパー（DH）構造タンパク質構築物を、それぞれプラスミドテンプレートTotol101（Riceら、J.Virol.61:3809-3819,1987）およびRR6415（Kuhnら、Virology 182:430-441,1991）由来のシンドビスウイルスまたはロスリバーウイルス配列のPCR増幅、ならびにSP6ポリメラーゼでのインビトロにおける転写のための、以前に記載のDH構築物DH-BBまたはDH-BB（5' SIN）（Bredenbeekら、J.Virol.67:6439-6446,1993）中へのこれらの配列の組み込みにより構築した。DH構築物DH-BBまたはDH-BB（5' SIN）は、シンドビス5'末端におけるDI由来tRNA^{ASP}配列の存在（DH-BB）または非存在（DH-BB（5' SIN））で異なる。以下の表は、特異的PCRプライマー配列およびそれらの対応するシンドビスまたはロスリバーヌクレオチド位置を示し、大文字はウイルスヌクレオチドを示し、そして小文字はクローニング工程において使用する制限部位または特異的点変異のさらなるヌクレオチドを示す。プライマー6（RRV Bsp）中の点変異は、生じるアミノ酸配列を変化させなかった。

10

PCRのために使用するプライマー：

1. RRV Ava：（nt.7510～7525）（配列番号74）

5'-ccacgaattcGGTCCTAAATAGATGC

2. RRV Nci1：（nt.7606～7620）（配列番号75）

5'-ccacaagcttCCGGGCGAGGCCGCC

20

3. RRV Nci2：（nt.7616～7630）（配列番号76）

5'-ccacggatCCCGGCGTTCCGTCC

4. RRV Apa1：（nt.8088～8102）（配列番号77）

5'-ccacaagcttGTGCACTGGGATCTG

30

5. RRV Apa2：（nt.8097～8111）（配列番号78）

5'-ccacggatccGTGCACATGAAGTCC

6. RRV Bsp : (nt.8339~8361) (配列番号79)

5'-ccacaagCTTCcGGaGTTACCCGAGTGACC

7. RRV Afl1 : (nt.7820~7836) (配列番号80)

5'-ccaccttaaGCGTCGGCTTTTCTTC

8. RRV Afl2 : (nt.7892~7907) (配列番号81)

5'-ccaccttaaGAGAAGAGAAAGAATG

10

9. SIN Ava : (nt.7591~7594) (配列番号82)

5'-ccacaagcttGGACCACCGTAGAG

10. SIN Bam : (nt.7325~7343) (配列番号83)

5'-CCGCGTGGCGGATCCCCCTG

20

11. SIN Bsp : (nt.8418~8433) (配列番号84)

5'-ccacggatCCGGAAGGGACAGAAG

12. SIN Bsu : (nt.8887~8902) (配列番号85)

5'-CACGGTCCTGAGGTGC

30

PCR反応を、以下に示すプライマー対を使用して、標準的な3サイクルプロトコルで、30秒間の伸長およびVentポリメラーゼを用いて実施して、対応するDNAフラグメント（これもまた以下に示す）を生成した。

PCRフラグメント：プライマー対、プラスミドテンプレート

フラグメント1：pr1+pr2、RRV6415プラスミド

フラグメント2：pr3+pr4、RRV6415プラスミド

フラグメント3：pr5+pr6、RRV6415プラスミド

フラグメント4：pr3+pr7、RRV6415プラスミド

フラグメント5：pr4+pr8、RRV6415プラスミド

フラグメント6：pr9+pr10、Toto1101プラスミド

フラグメント7：pr11+pr12、Toto1101プラスミド

40

増幅後、PCR産物を示す酵素で消化し、そしてpUC18プラスミドアナログであるpRS2（これは、さらなるポリリンカー部位を含み、そしてこれもまた同じ酵素の組み合わせで消化した）中に連結した：フラグメント1をEcoR I+Hind IIIで；フラグメント2をBamH I+Hind IIIで；フラグメント3をBamH I+Hind IIIで；フラグメント4をBamH I+Afl IIで；フラグメント5をHind II+Afl IIで；フラグメント6をBamH I+Hind IIIで；そしてフラグメント7をBamH I+Bsu 36Iで切断した。全ての挿入物を配列決定して、PCRの間に人工物が獲得されていないことを確認した。

その後、フラグメントをpRS2プラスミドから以下に示す酵素を使用して遊離させ、そして正確に示すように連結して、次の組の構築物を生成した。FR8を生成するために、フラグ

50

メント6 (Bam HIおよびAva IIにより切断) をフラグメント1 (Ava IIおよびNci Iにより切断)、フラグメント2 (Nci IおよびHind IIIにより切断)、ならびにプラスミドpRS2 (Bam HIおよびHind IIIにより切断) と連結した。FR9を生成するために、フラグメント6 (BamHIおよびAva IIにより切断) を、フラグメント1 (Ava IIおよびNci Iにより切断)、フラグメント4 (Nci IおよびAfl IIにより切断)、ならびにプラスミドpRS2 (BamH IおよびAfl IIにより切断) と連結した。FR10を切断するために、フラグメント5 (Afl I IおよびApaL Iにより切断) を、フラグメント3 (ApaL IおよびHind IIIにより切断)、ならびにプラスミドpRS2 (Afl IIおよびHind IIIにより切断) と連結した。E.coliの形質転換の後、プラスミドを制限分析により分析し、そしてそれらのインサートを消化により再度単離し、そしてクローニングの次の工程のために使用した。

FR8インサート (BamHIおよびApaL Iにより切断) を、フラグメント3 (ApaL IおよびBspM IIにより切断)、フラグメント7 (BspM IIおよびBsu36 Iにより切断)、ならびにプラスミドDH-BB (BamH IおよびBsu36 Iにより切断) と連結した。また同じフラグメントを使用して、プラスミドDH-BB (5' SIN) のBamH I-Bsu36 Iフラグメントを置換した。得られたプラスミドは、それぞれDH-BB CrrvおよびDH-BB (5' SIN) Crrvと称した (図23を参照のこと)。FR9インサート (BamHIおよびAfl IIにより切断) を、FR10インサート (Afl IIおよびBspM IIにより切断)、フラグメント7 (BspM IIおよびBsu36 Iにより切断)、ならびにプラスミドDH-BB (BamHIおよびBsu36 Iにより切断) と連結した。また同じフラグメントを使用して、プラスミドDH-BB (5' SIN) のBamH I-Bsu36 Iフラグメントを置換した。得られたプラスミドは、DH-BB CΔrrvおよびDH-BB (5' SIN) CΔrrvと称した (図23を参照のこと)。

キメラ構造タンパク質遺伝子を含むDH構築物についての複数の使用が可能であり、そして2つのそのようなアプローチを図24および25に例証する。図24において、インタクトなロスリバーキャプシドタンパク質遺伝子を、欠陥ヘルパー構築物の一部として、シンドビス糖タンパク質遺伝子配列に連結し (DH-BB CrrvまたはDH-BB (5' SIN) Crrv)、そしてシンドビスレポーターRNAベクターレプリコンとともに同時トランスフェクトして、組換えアルファウイルス粒子中へのパッケージングを実証する (図26)。図25において、欠失形態のロスリバーキャプシドタンパク質遺伝子を、翻訳エンハンサーおよびDH構築物の一部として、シンドビス糖タンパク質遺伝子配列と連結し (DH-BB CΔrrvおよびDH-BB (5' SIN) CΔrrv)、一方シンドビスキャプシドタンパク質遺伝子を第2のDH構築物から発現させる。両方のDH構築物をシンドビスレポーターRNAベクターレプリコンとともに同時トランスフェクトして、組換えアルファウイルス粒子中へのパッケージングを実証する (図26)。さらに、ロスリバーキャプシドタンパク質遺伝子を単独でDH構築物から発現させ得、一方シンドビス糖タンパク質をパッケージングにおける使用のために別の構築物から発現させる。この知見および構造タンパク質遺伝子配列が由来するいくつかの他のアルファウイルスの利用可能性を使用して、多数の異なるタンパク質の組み合わせを同様なアプローチで生成し得る。

あるいは、上でSFVベクターおよびシンドビス構造タンパク質について示したように、1つのアルファウイルスまたは他のTogaviridaeのメンバー (例えば、風疹ウイルス) 由来の構造タンパク質遺伝子の全体の相補物を、別のウイルス由来のRNAベクターをパッケージングするために使用し得る。別の実施態様において、ベネズエラウマ脳脊髄炎 (VEE) ウイルス由来の構造タンパク質遺伝子を、シンドビスウイルス由来ベクター (野生型または実施例4もしくは5に記載の表現型を示す) をパッケージングするために使用し得る。そのような方法は、本発明の所望の特性 (例えば、宿主巨大分子合成の遅延、減少、または阻害なし) を示すベクターRNA+組換え粒子の向性を再指向する構造タンパク質を含む組換えアルファウイルス粒子を提供する。ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス (VEE) は、そのシンドビスウイルス相当物とは異なり、リンパ系起源の細胞に対する向性を示すアルファウイルスである。それゆえ、VEE構造タンパク質を発現する細胞株によりパッケージングされたシンドビス由来ベクター構築物は、そこからパッケージング細胞構造タンパク質遺伝子カセットを得た親VEEウイルスと同一のリンパ向性 (lymphotropic) 特性を示す

。詳細には、VEEウイルスのトリニダードロバ株（ATCC#VR-69）をBHK-21細胞中で増殖させ、そしてビリオンRNAを実施例1に記載の手順と同様の手順を使用して抽出する。全体の構造タンパク質コード領域を、その5'末端がそれぞれオーセンティックなAUG翻訳開始部位（周囲のKozakコンセンサス配列を含む）およびUGA翻訳終始部位をマップするプライマー対を用いるPCRにより増幅する。正方向プライマーはVEEヌクレオチド7553-7579に相補的であり、そして逆方向プライマーはVEEヌクレオチド11206～11186に相補的である（Kinneyら、Virology 170:19-30,1989由来の配列）。構造タンパク質遺伝子に対応するVEE cDNAのPCR増幅を、上記のような2工程逆転写酵素-PCRプロトコル、テンプレートとしてのVEEゲノムRNA、および以下の隣接するXho IおよびNot I部位を含むオリゴヌクレオチド対

10

正方向プライマー：VEE 7553F (5'制限部位/VEEキャプシド配列) (配列番号86)

5'-TATATATATCTCGAGACCGCCAAGATGTTCCCGTTCAGCCA-3'

逆方向プライマー：VEE 11206R (5'制限部位/VEE E1糖配列) (配列番号87)

5'-TATATATATGCGGCCGCTCAATTATGTTTCTGGTTGGT-3'

20

PCR増幅後、約3800bpのフラグメントを0.7%アガロースゲルからGENECLEAN IIを使用して精製し、そしてXho IおよびNot Iで消化する。次いで、得られるフラグメントをDNAベースのシンドビス発現ベクターpDCMVSIN-luc（上記を参照のこと）（これもまたXho IおよびNot Iで消化して、そのルシフェラーゼレポーター遺伝子インサートを除去し、アルカリホスファターゼで処理し、そして0.7%アガロースゲルからGENECLEAN IIを使用して精製した）中に連結する。得られるVEE構造タンパク質発現構築物をpDCMV-VEEspと称する。次に、プラスミドpDCMV-VEEspを限定部分消化条件下でBspEIで消化して、大部分の非構造タンパク質遺伝子配列を除去し、そして再連結して、構造タンパク質発現DHベクター構築物であるpDCMV-VEEd1を作製する。

プラスミドpDCMV-VEEd1（これはまた、ネオマイシン耐性マーカを含む）を、製造業者により記載されるようにLipofectamineを使用してBHK細胞中にトランスフェクトする。トランスフェクション後約24時間に、細胞をトリプシン処理し、そして600 μg/mlの薬物G418を含有する培地中に再プレーティングする。培地を定期的に新鮮なG418含有培地に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させた。細胞をトリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュ中での限界希釈によりクローン化し、そして個々の細胞クローンを増殖させそしてスクリーニングのために拡大する。投入ベクターに応答してVEE構造タンパク質を誘導的に発現する細胞を、以前に記載のように、シンドビスルシフェラーゼベクターRNAをトランスフェクトし、そして細胞溶解物または上清中のパッケージングされたルシフェラーゼベクターにおけるVEE構造タンパク質発現についてアッセイすることにより同定する。VEEの改変体または組織向性が異なる他のアルファウイルスおよびその改変体から得られる構造タンパク質遺伝子もまた、このアプローチに従って有用である。さらに、本実施例に記載の種々の構造タンパク質遺伝子発現カセット構造の各々を使用し得る

30

40

E. PCLからのパッケージングされたアルファウイルスベクターの産生

本実施例を通して記載のアルファウイルス由来PCLを、組換えアルファウイルス粒子ストックを産生する、そしてRNAまたはDNA分子のいずれかのトランスフェクションによるベクターの導入、以前に産生したパッケージングされたベクター含有粒子での感染、または安定に形質転換された発現カセットからのベクターの細胞内産生を含む多数の異なる方法で使用し得る。ベクター粒子の産生のためのアルファウイルスPCLの有用性を、まずレポーターベクター構築物を用いて実証し、そして後に所望の異種配列を発現する任意の他のベ

50

クター構築物に適用し得る。例えば、パッケージングされたシンドビス- β -galベクター粒子のストックを、記載の手頂を使用して（LiljestromおよびGaroff、Bio/Technology 9:1356-1361,1991）、約 10^7 のアルファウイルスC/GLYCOまたは他のPCL細胞（上記、ならびに例えば図15、17、および18を参照のこと）の、50ugのpKSSIN-1-BV- β -galもしくは-luciferase RNA（実施例4）またはpBG/SIN-1 ELVS 1.5- β -galもしくは-luciferase DNA（実施例5）でのエレクトロポレーションにより得る。トランスフェクトされたPCLを所望の温度（例えば、37℃）でインキュベートし、そしてトランスフェクション後約48時間に、上清を回収し、そして0.45ミクロンフィルターの通過により澄清化する。さらなる処方を、本発明の詳細な説明に例証するパラメーターを使用して実施し得る。

あるいは、パッケージングされた組換えアルファウイルス粒子のストック（上記のようにPCLを使用して、またはベクターおよびDH構築物の同時トランスフェクションにより得る）を使用して、さらなる増幅のためにPCLの天然培養物を感染する。例えば、 5×10^7 のアルファウイルスC/GLYCOまたは他のPCL細胞をパッケージングされたpKSSIN-1-BV- β -galベクターのストックで、約1感染単位／細胞の感染多重度（MOI）で感染させる。細胞質への到達に際して、粒子送達RNAベクターは自己触媒的に増幅され、そしてさらなる子孫粒子中にパッケージングされる。所望の温度（例えば、37℃）での約48時間のインキュベーション後、培養上清を回収し、0.45ミクロンフィルターの通過により澄清化し、そして所望のように処方する。

パッケージングされた組換えアルファウイルスベクター粒子をさらに増幅するPCLの能力を利用するな別の方法において、パッケージングされた粒子のストックを使用して、PCLの天然培養物を感染させ、ベクター含有PCL（ベクター産生細胞、図27）の作業細胞バンクを作製する。次に、これを使用して、PCLの別の天然培養物を播種し得る。例えば、そのような作業細胞バンクを、アルファウイルスC/GLYCOまたは他のPCL細胞のパッケージングされたベクターストックでのM.O.I.=5での感染により得る。感染後約2～3時間に、ベクター含有PCLを穏やかに剥がし、そして細胞数を測定する。ベクター含有PCLを、今や、直接使用し得るか、または小分けし、そしてベクター産生細胞バンクとして液体N₂中で貯蔵し得る。所望の場合は、細胞を、天然のアルファウイルスC/GLYCOまたは他のPCLの以前に増殖させた培養物中に、1000新鮮PCL当たり約1ベクター産生細胞の割合で、多量の高力価のパッケージングされたベクター粒子の産生のために、直接播種する。同時培養後種々の時点で培養上清のアリコート回収して、最大組換えアルファウイルス粒子産生の時間を決定し、そしてその時間を、上記のような、さらなる回収、精製、および処方のために選択する。ベクター産生細胞を使用する同じ一連の増幅方法はまた、任意の所望の組換えタンパク質の大規模産生のために有用である（図27）。組換えタンパク質の産生のために、組換えタンパク質の性質に依存して、上清または細胞溶解物を回収し得る。

パッケージングされた組換えアルファウイルス粒子の高力価または大規模ストックを産生するためのな別の方法において、本明細書中に記載のように、一般的に受容される試薬または方法（例えば、それぞれLipofectinもしくはLipofectamine、または低MOI [≤ 0.1]でのベクター粒子での感染）を使用する、インビトロ転写RNAまたはプラスミドDNAベクターのトランスフェクションにより、所望の発現ベクターを1～5%の天然アルファウイルスPCL培養物中に導入する。その中にベクターを導入した最初の細胞により産生された組換えベクター粒子は、次に、培養物中の他の天然パッケージング細胞を感染し、次にこれはさらにより多くのパッケージングされた粒子を産生する。一時的増幅のこのプロセスは、パッケージングされた組換えアルファウイルス粒子がPCL培養物の全ての細胞において産生されるまで継続する。この増幅プロセスを図28に示す。ELVS 1.5- β -galプラスミドDNAを987DHBBNeoパッケージング細胞またはBHK-21細胞中にトランスフェクトし、そして細胞溶解物中に存在する β -ガラクトシダーゼのレベルを、以前に記載のように、トランスフェクション後の示す時点に測定した。BHK-21細胞において、 β -ガラクトシダーゼ発現のレベルは、約48hptまでに最大に達し、そしてプラトーになった。対照的に、 β -ガラクトシダーゼ発現のレベルは、ELVS 1.5- β -galトランスフェクト987DHBBNeo PCL培養物において、より長い期間にわたって増加し続けた。これは、組換えベクター粒子増幅プ

ロセス、および培養物の全ての細胞における β -ガラクトシダーゼの最終的な発現を反映する。全ての場合において、組換えアルファウイルスベクター粒子のストックを今や、本明細書に記載の任意の方法を使用して、薬学的に受容可能であるように処方し得る。

実施例 7

アルファウイルスプロデューサー細胞株の構築

宿主細胞巨大分子合成の減少、遅延、または阻害なしを示すDNAベースのアルファウイルスベクターの構築と結びつけられた、上記のようなアルファウイルスPCLの生成（実施例 1、2、4、および5）は、アルファウイルスベクタープロデューサー細胞株を誘導するための比較的直線的な機構を提供する。本発明の特定の実施態様において、ベクタープロデューサー細胞株は、1つ以上の安定に形質転換された構造タンパク質遺伝子発現カセット、およびまた上記の表現型を有するアルファウイルスRNA発現ベクター分子を含み、これはトランスフェクトされるか、形質導入されるか、または細胞内で産生され、パッケージングされたベクター粒子の産生を導く。好ましい実施態様において、RNAベクターレプリコンを、安定に形質転換されたDNA分子（真核生物重層ベクター開始系）から細胞内で産生する。このDNA分子は、組み込まれた形態でまたはエピソームDNAとしてのいずれかで存在し、ベクターRNAの転写は所望の時点で提供される1つ以上の刺激により誘導的に制御される。この型のアルファウイルスプロデューサー細胞株構造は、本質的に、以下を含む事象のカスケードを提供する：ベクターRNAの誘導性産生および結果として生じるRNAの自己触媒性細胞質増幅、ベクター供給非構造タンパク質による高レベルの構造タンパク質発現の誘導、発現された構造タンパク質によるベクターRNAのパッケージング、およびパッケージングされたベクター粒子の放出。一旦プロデューサー細胞集団が所望の数に達すると、ベクター複製の低レベル細胞傷害性の潜在力、または非構造タンパク質合成を制御する必要性のために、DNA分子からのベクターRNAの強固に調節された、誘導性の発現は好ましい。なぜなら、それは正鎖対負鎖ベクターRNA比の調節に関連するからである。

A. 単一レベル調節を有するアルファウイルスDNAベクター

本発明の特定の実施態様において、DNAに基づくアルファウイルスベクターが提供される。ここで、自己触媒的増幅が可能であるアルファウイルスベクターRNA分子のインビボ転写は、所望の時点で刺激を適用することによって調節可能であるプロモーターから生じる。このようなDNAに基づくアルファウイルスベクターを、引き続いて、アルファウイルスパッケージング細胞株（PCL）に安定に形質転換して、誘導性アルファウイルスプロデューサー細胞株を作製し得る。それゆえ、本明細書中に記載されるプロデューサー細胞株構成は、「フィードフォワード（feed-forward）」系であり、ここで：1）刺激が細胞に適用され、アルファウイルスベクターRNAの効率的な転写が生じる；2）ベクターRNAは、自己触媒的に複製し、そして非構造タンパク質を生成する；3）非構造タンパク質は、構造タンパク質発現カセットmRNAの増幅および高レベルの構造タンパク質発現を刺激する；そして4）構造タンパク質はベクターRNAと相互作用し、そして培養培地に放出される組換えアルファウイルス粒子の引き続くパッケージングを生じる。任意の以前に記載されたアルファウイルスPCL（1以上の誘導性アルファウイルス構造タンパク質発現カセットで安定に形質転換されている）が、プロデューサー細胞株を派生させるための親株として働き得る。

例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター系（GossenおよびBujard, Proc. Natl. Acad. Sci. 89:5547-5551, 1992）は、図29に記載されるような、アルファウイルスベクターRNAの誘導性転写のために利用され得る。この系において、「融合」タンパク質（rTA）としての、テトラサイクリンリプレッサーおよびHSV-VP16トランスアクチベータードメインの発現は、最小「コア」プロモーター（例えば、CMV）にすぐに近接して位置したテトラサイクリンオペレーター配列（tetO）への特異的な結合によって、アルファウイルスベクターRNAのインビボ転写を刺激する。結合およびトランス活性化事象は、テトラサイクリンの存在によって可逆的にブロックされ、そして培養培地からテトラサイクリンを除去することによって「オン」にされ得る。転写の非誘導の基底レベルは、異なる細胞型間で変化するので、転写開始部位が既知であり、アルファウイルスベクターヌクレオチド1との並置

またはすぐ近傍を許容する場合には、他の異なる最小コアプロモーター（例えば、HSV-tk）を、テトラサイクリンオペレーター配列に連結し得る。

rTAトランスアクチベーターは、それもまた同一の細胞株に安定に形質転換されるさらなる発現カセットにより提供され；そして特定の実施態様では、rTA発現カセットは、それ自体で自己調節的であり得る。自己調節的rTA発現カセットの使用は、rTA自体が結合する同一のtet0-連結プロモーターによる転写制御に発現をリンクさせることにより、rTAの構成的な高レベル発現に関連する潜在的な毒性問題を回避する。このタイプの系は、テトラサイクリンの存在下では非常に少ないrTAが生成されることを確実にするが、テトラサイクリンが除去されると、高度に活性になる負のフィードバックサイクルを作製する（図29）。このような自己調節的rTA発現カセットは、プラスミドpTet-tTak（Shockettら、Proc .Natl.Acad.Sci.USA 92:6522-6526,1995）中に提供される。

このようなテトラサイクリン調節性のDNAに基づくアルファウイルスベクターの機能性は、改変SIN-1-由来ルシフェラーゼプラスミドベクターを構築することによって実証され、これはテトラサイクリンオペレーター/CMV最小プロモーターによって駆動される。出発材料としてプラスミドpBG/SIN-1 ELVS1.5-luc（実施例4）およびpBGSV3'（実施例6）を用いて、SIN-1非構造コード領域の多く、連結領域プロモーターおよびルシフェラーゼレポーター遺伝子、ならびに3'-UTRの一部を含む、約7200bpのフラグメントを、Bgl IIおよびFsp IでのpBG/SIN-1 ELVS1.5-lucの消化、およびGENECLEAN IIを用いる0.7%アガロースゲルからの精製によって単離する。この7200bpフラグメントを、引き続いて、同様にBgl IIおよびFsp Iで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%アガロースゲルから精製したプラスミドpBGSV3'に連結する。得られる構築物をpBGSVd1B/SIN1-lucと命名する。残りの配列（転写がシンドビスヌクレオチド1の5'側の1つのさらなる非ウイルスヌクレオチドから開始するように、シンドビスヌクレオチド1~2289に連結された7量体化テトラサイクリンオペレーターおよび最小のCMVプロモーター（tet0/CMV）を含む）の挿入を、オーバーラップPCRによって達成する。PCR反応#1において、この配列の約370bpのtet0/CMV部分を、30秒伸長を用いる標準的な3サイクルPCRによって、テンプレートプラスミドpUHC13-3（GossenおよびBujard, 同書）から、以下のオリゴヌクレオチドプライマー（一方のプライマー上において隣接するBgl IIおよびAsc I部位を、そして他方において5'-シンドビスヌクレオチドにオーバーラップする配列をさらに含むように設計されている）を用いて、増幅する。

正方向プライマー：5' BA_{tet0F} (5'-制限部位/tet0 nts.) (配列番号88)

5'-TATATAGATCTGGCGCGCC/TTTACCACTCCCTATCAGTGATAG-3'

逆方向プライマー：3' CMVpro/SINR (5'-シンドビスnts./CMV nts.) (配列番号89)

5'-TACGCCGTCAAT/ACGGTTCACTAAACGAGCTCTGC-3'

PCR反応#2において、この配列の2289bpのシンドビス5'-末端部分を、3分伸長を用いる標準的な3サイクルPCRによって、テンプレートプラスミドpKRSIN-1（実施例1）から、一方のプライマー上でCMVプロモーターヌクレオチドにオーバーラップする配列をさらに含むように設計した以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、増幅する。

正方向プライマー：CMVSIN5'endF (5'-CMV nts./シンドビスnts.) (配列番号90)

5'-TAGTGAACCGT/ATTGACGGCGTAGTACACACTATT

逆方向プライマー：SIN2400R (全てのシンドビスnts.) (配列番号91)

5'-CGTTGAGCATAACCGAATCTAC

増幅に続いて、DNAフラグメントを、QIAquick-spinで精製し、そして、さらなる5' BATet OFおよびSIN2400Rプライマーを用いて、3.5分伸長を用いる引き続く3サイクルPCR反応において、テンプレートとして一緒に用いる。得られる約2660bpのオーバーラップPCRアンプリコンを、GENECLEAN IIを用いて精製し、Bgl IIで消化し、そして同様にBgl IIで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%アガロースゲルから精製したプラスミドpBGSVd1B/SIN1-lucに連結する。得られる構築物をptetSIN1-lucと命名する。他の異種の目的の配列を含有するベクター構築物を、同様のアプローチを用いて、またはXho Iおよび/またはNot I部位への直接クローニングによって生成する。引き続き、選択可能なE.coli gpt遺伝子（キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）発現カセットを、生成し、そしてプラスミドptetSIN1-lucの唯一のPac I部位に挿入して、さらなる選択マーカーを提供する。最初に、gpt遺伝子オープンリーディングフレームに連結したSV40プロモーターを含むフラグメントを、プラスミドpMAM (Clontech, Palo Alto, CA) から、2分伸長を用いる標準的な3サイクルPCRによって、そして上流の隣接するSacIおよびPacI部位ならびに下流のSacI部位を含むように設計した以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅する。

正方向プライマー：SV40proSPF (5'-制限部位/SV40 プロモーター配列) (配列番号92)

5'-ATATAGAGCTCTTAATTAA/TCTTTGTGAAGGAACCTTACTTC

逆方向プライマー：3' ECgptR (5'-制限部位/gpt遺伝子配列) (配列番号93)

5'-ATATAGAGCTC/AGGCGTTGAAAAGATTAGCGACCG

増幅に続いて、SV40プロモーター/gpt遺伝子DNAフラグメントを、QIAquick-spinで精製し、Sac Iで消化し、GENECLEAN IIを用いて精製し、そして同様にSac Iで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%アガロースゲルから精製したプラスミドpBGS131 d1XhoI-BGHTT（実施例5）に連結する。正しい方向の挿入物を有するクローンを、制限分析によって同定する。この構成は、プロモーターおよびgpt遺伝子をウシ成長ホルモン転写終結シグナルのすぐ近傍に配置する。得られるgpt発現構築物をpBGS131 d1XhoI-gptと命名する。次に、全体の発現カセットを、プラスミドpBGS131 d1XhoI-gptから、2分伸長を用いる標準的な3サイクルPCRによって、そして隣接するPac I部位を含むように設計した以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅する。

正方向プライマー：上記に示した、SV40proSPF (配列番号92)逆方向プライマー：BGHTTpacR (5'-制限部位/BGH配列) (配列番号94)

5'-TATATATTAATTAA/ATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGC

増幅に続いて、gpt遺伝子発現カセットフラグメントを、QIAquick-spinで精製し、Pac Iで消化し、GENECLEAN IIを用いて精製し、そして同様にPac Iで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%アガロースゲルから精製したtet誘

導性アルファウイルスベクター構築物ptetSIN1-lucに連結する。得られる構築物をptetSIN1gpt-lucと命名する。

最初のテトラサイクリン誘導性アルファウイルスベクタープロデューサー細胞株の構築のために、ptetSIN1gpt-luc構築物およびテトラサイクリンリプレッサー/VP16トランスアクチベーター (rTA) 発現カセットを、所望のアルファウイルスPCLに安定に形質転換する。例えば、アルファウイルスC/GLYCO PCL細胞 (上記由来) を、選択マーカーをコードする別のプラスミドとの同時トランスフェクションによってプラスミドpTet-tTak (上記を参照のこと) で安定に形質転換する。プラスミドpTet-tTakおよびヒスチジノールデヒドロゲナーゼマーカーをコードするpSV2-His (Schatzら、1989, Cell 59:1035-1048) を、それぞれ、40:1のモル比で、製造業者によって記載されるようにLipofectamineを用いて、C/GLYCO PCL細胞 (または他のPCL) に同時トランスフェクトする。トランスフェクションの約24時間後、細胞を、トリプシン処理し、そしてヒスチジノールおよび0.5 µg/mlテトラサイクリンを含む培地に再プレートする。培地を、新鮮な薬物含有培地に定期的に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させる。細胞を、トリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュにおける限界希釈によってクローン化し、そして個々の細胞クローンを、スクリーニングのために増殖させ、そして拡大する。ポジティブpTet-tTak含有パッケージング細胞クローン (C/GLYCO/Tak細胞と称される) を、テトラサイクリンの存在下または非存在下の両方で、tetO/プロモーターの制御下のルシフェラーゼレポータープラスミドpUHC13-3 (GossenおよびBujard, 同書) をトランスフェクトすることによって同定する。テトラサイクリンの非存在下では、ポジティブC/GLYCO/Tak PCL細胞は、tetO/プロモーターからの誘導、および誘導性の高レベルのルシフェラーゼを提供する。

引き続いて、DNAに基づくアルファウイルスベクター構築物ptetSIN1gpt-lucを、製造業者によって記載されるようにLipofectamineを用いて、C/GLYCO/Tak細胞に安定にトランスフェクトする。トランスフェクションの約24時間後、細胞を、トリプシン処理し、そして特定の細胞型に至適化しそして0.5 µg/mlテトラサイクリンを含む選択培地 (DMEM+10%透析ウシ胎仔血清; 250 µg/mlキサンチン; 15 µg/mlヒポキサンチン; 10 µg/mlチミジン; 2 µg/mlアミノプテリン; 25 µg/mlミコフェノール酸) に再プレートする。培地を、新鮮な選択培地に定期的に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させる。細胞を、トリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュにおける限界希釈によってクローン化し、そして個々の細胞クローンを、スクリーニングのために増殖させ、そして拡大する。ptetSIN1gpt-lucで安定に形質転換したポジティブプロデューサー細胞株を、以前に記載されるように、少なくとも24時間培地からテトラサイクリンを除去し、そして細胞溶解物中のルシフェラーゼについて試験し、そしてさらに培養上清中のパッケージングされたルシフェラーゼベクターについて試験することによって、同定する。

B. 2つのレベル調節を有するアルファウイルスDNAベクター

好ましい実施態様において、DNAに基づくアルファウイルスベクター (野生型または宿主巨大分子合成の減少した阻害、遅延した阻害もしくは阻害なしの所望の表現型を有する) を構築することが望ましくあり得る。ここで、RNAベクター分子の転写 (自己触媒性増幅が可能である) は、全ての基底レベルの転写を除去する2つのレベルの調節によって非常に厳密に制御されるプロモーターから生じる。このようなアプローチは、1つの誘導性成分 (例えば、上記由来のtet系) と可逆的な転写のサイレンシング成分とを組み合わせ得る。例えば、特定のジンクフィンガータンパク質のKRAB抑制ドメインを使用し得る。

手短には、KRAB

(Krüppel関連ボックス)

ドメインは、全ての

Krüppel

クラスCys₂His₂ジンクフィンガータンパク質の1/3より多くのアミノ末端領域に存在する高度に保存された配列である。これらのドメインは、2つの推定上の両親媒性α-ヘリックスを含み、そしてDNA結合依存性RNAポリメラーゼII転写リプレッサーとして機能することが示されている (例えば、Lichtら、Nature 346:76-79, 1990)。他の転写因子と同様に

、活性抑制ドメインとDNA結合ドメインとは、異なり、そして分離可能である。それゆえ、抑制ドメインを、融合タンパク質として、標的化のために任意の配列特異的DNA結合タンパク質に連結し得る。理想的には、DNA結合タンパク質成分は、調節可能様式で結合を可逆的に妨げられ得、従って転写サイレンシングを「オフ」にする。例えば、1つの実施態様において、ヒトKox1 (Thiesen, New Biol. 2:363-374, 1990) 由来のKRABドメインを、DNA結合ラクトース (lac) リプレッサータンパク質に融合して、tet応答性プロモーターのすぐ近傍に操作したlacオペレーター配列への可逆性の配列特異的結合を有するハイブリッド転写サイレンサーを形成させる (図30)。この構成では、lacリプレッサー/KRABドメイン融合体 (rKR) の構成的発現は、lacオペレーター配列への結合および誘導されていないtet応答性プロモーターからの何らかの「漏出性の」基底の転写の除去を生じる。ベクター発現が所望であり、そしてテトラサイクリンがこの系から除去される場合には、IPTGを、rKR媒介転写サイレンシングを妨げるために添加する。

さらに、他のジンクフィンガータンパク質由来のKRABドメイン (例えば、ZNF133 (Tommerupら, Hum. Mol. Genet. 2:1571-1575, 1993)、ZNF91 (Bellefroidら, EMBO J. 12:1363-1374, 1993)、ZNF2 (Rosatiら, Nucleic Acids Res. 19:5661-5667, 1991) など) ならびに他の移動させ得るリプレッサードメイン (例えば、Drosophila enまたはeve遺伝子 (JaynesおよびO' Farrell, EMBO J. 10:1427-1433, 1991; HanおよびManley, Genes Dev. 7:491-503, 1993)、ヒトジンクフィンガータンパク質YY1 (Shiら, Cell 67:377-388, 1991)、ウィルムス腫瘍抑制タンパク質WT1 (Maddenら, Science 253:1550-1553, 1991)、甲状腺ホルモンレセプター (Banahmadら, EMBO J. 11:1015-1023, 1992)、レチノイン酸レセプター (Banahmadら, 同書)、Kid-1 (Witzgallら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4514-4518, 1994)) がこのような系で容易に用いられる。さらに、この系のlacリプレッサー/lacオペレーター成分を、他の供給源に由来する多数の任意の他の調節可能な系 (例えば、トリプトファンおよびマルトースオペロン、GAL4など) によって置換し得る。

詳細には、タンパク質を核に戻るようにより効率的に方向付けるために、連結された核局在化配列 (NLS; Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys (配列番号100); Kalderonら, Cell 39:499-509, 1984) を有する、ヒトKox1のKRABドメインに融合したlacリプレッサー (lacI) タンパク質を含有する発現カセットを、オーバーラップPCRによって構築する。PCR反応#1において、約1100bpのlacI配列を、1.5分伸長を用いる標準的な3サイクルPCRによって、テンプレートプラスミドp3' SS (Stratagene, La Jolla, CA) から、以下のオリゴヌクレオチドプライマー (上流プライマーに隣接するXhoI部位および良好な翻訳開始状況にあるAUG開始コドン) を、そして他方にSV40ラージT抗原核局在化配列をさらに含むように設計されている) を用いて増幅する。

正方向プライマー: LacI5' F (5'-制限部位/AUG+lacI配列) (配列番号95)

5'-ATATACTCGAGTAGCA/ATGGTGAAACCAGTAACGTTATAC

逆方向プライマー: LacI3' NLSR (5'-NLS/lacI配列) (配列番号96)

5'-GCCCTTTCTCTTCTTTTTTGG/CTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAAC

PCR反応#2において、ヒトKox1のアミノ末端121残基KRABドメインを含む、約400bpのアンプリコンを、1分伸長を用いる標準的な3サイクルPCRによって、テンプレートプラスミドpKox1 (Thiesen, New Biol. 2:363-374, 1990) から、以下のオリゴヌクレオチドプライマー (一方のプライマーにおいてNLSおよびLacIにオーバーラップする配列を、そして他方においてSacI制限部位および停止コドンをさらに含むように設計されている) を用いて増幅する。

10

20

30

40

正方向プライマー：KRAB5' F (5'-NLS+lacIオーバーラップ配列/KRAB配列) (配列番号97)

5'-CCAAAAAAGAAGAGAAAG/GGCGGTGGTGCTTTGTCTCCT

逆方向プライマー：KRAB3' R (5'-制限部位+停止コドン/KRAB配列) (配列番号98)

5'-ATATAGAGCTCTTA/AAGTATGATTTGATTTCAAATGC

増幅に続いて、DNAフラグメントを、QIAquick-spinで精製し、そして、さらなるLacI 5' F およびKRAB3' Rプライマーを用いて、2.5分伸長を用いる引き続く3サイクルPCR反応においてテンプレートとして一緒に用いる。得られる約1500bpのオーバーラップするPCRアンプリコンを、GENECLEAN IIを用いて精製し、Xho IおよびSac Iで消化し、そして同様にXho IおよびSac Iで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%アガロースゲルから精製した真核生物発現ベクタープラスミドpEUK-C1 (Clontech, Palo Alto, CA) に連結する。得られるlacI/KRAB発現構築物をpEUK-rKRと命名する。

lacI/KRAB発現カセットを含有する安定なPCL形質転換体を生成するために、rTA tet/トランスアクチベーター融合タンパク質カセットでの形質転換について既に選択されているアルファウイルスPCLを、出発材料として用いる。例えば、アルファウイルスC/GLYCO/Tak PCL細胞（上記由来）を、選択マーカーをコードする別のプラスミドとの同時トランスフェクションによってプラスミドpEUK-rKRで安定に形質転換する。プラスミドpEUK-rKRおよびピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ選択マーカー（Clontech）をコードするpPURを、それぞれ、40:1のモル比で、製造業者によって記載されるようにLipofectamineを用いて、C/GLYCO/Tak PCL細胞（または他のPCL）に同時トランスフェクトする。トランスフェクションの約24時間後、細胞を、トリプシン処理し、そして5 µg/mlピューロマイシンおよび0.5 µg/mlテトラサイクリンを含有する培地に再プレートする。培地を、新鮮な薬物含有培地に定期的に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させる。細胞を、トリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュにおける限界希釈によってクローン化し、そして個々の細胞クローンをスクリーニングのために増殖させ、そして拡大する。ポジティブpEUK-rKR含有パッケージング細胞クローン（C/G/Tak/rKR細胞と称される）を、lacIに特異的なポリクローナル抗血清（Stratagene, La Jolla, CA）で免疫染色することによって同定する。

次に、特異的なlacオペレーター（lacO）配列を、所望のptetに基づくアルファウイルスベクター（上記を参照のこと）に挿入しなければならない。例えば、ベクター構築物ptetSINlgpt-lucを、合成オリゴヌクレオチドリンカーを用いることによって、多コピーのlacOを含有するように改変する。LacOオリゴヌクレオチドを、対称のlacO配列を含有するように設計する。これは、全長の22bpパリンドロームのオペレーター配列（Simonsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1624-1628, 1984; Sadlerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6785-6789, 1983）を含み、そして二本鎖分子に自己アニールした場合には隣接するAsc I部位を含む。

LacOsymA (配列番号99)

5'-CGCGCCGAATTGTGAGCGCTCACAATTCGG

LacOsymA oligoを、自己アニールさせてAscI「粘着末端」DNAフラグメントを形成させ、次いでAscIで消化し、アルカリホスファターゼで処理し、そしてGENECLEAN IIを用いて0.7%ゲルから精製したプラスミドptetSINlgpt-lucに連結する。lacO配列の1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のタンデムコピーを含むクローンを配列分析によって同定し、そしてそれらに名称p0ItetSINlgpt-luc、p0IItetSINlgpt-luc、p0IIItetSINlgpt-lucなどを与え

る。次いで、異なるlacOコピー数を有する個々のクローンを、以下に記述するようにトランスフェクトし、そして転写調節の最も厳密なレベルについて試験する。

アルファウイルスベクタープロデューサー細胞株を生成するために、DNAに基づくp0tetSINlgpt-lucベクター構築物を、製造業者によって記載されるようにLipofectamineを用いてC/G/TAK/rKR細胞に安定にトランスフェクトする。トランスフェクションの約24時間後、細胞を、トリプシン処理し、そして特定の細胞型に至適化されそして0.5 µg/mlテトラサイクリンを含む選択培地（DMEM+10%透析ウシ胎仔血清；250 µg/mlキサンチン；15 µg/mlヒポキサンチン；10 µg/mlチミジン；2 µg/mlアミノプテリン；25 µg/mlミコフェノール酸）に再プレートする。培地を、新鮮な選択培地に定期的に交換し、そして耐性細胞のフォーカスを増殖させる。細胞を、トリプシン処理し、そして96ウェル組織培養ディッシュにおける限界希釈によってクローン化し、そして個々の細胞クローンを、スクリーニングのために増殖させ、そして拡大する。p0tetSINlgpt-luc構築物で安定に形質転換されたポジティブプロデューサー細胞株を、培地からのテトラサイクリンの除去、および誘導のための20mM IPTGの添加の少なくとも24時間後のルシフェラーゼの発現（以前に記載される）によって同定する。ルシフェラーゼ活性を、プロデューサー細胞溶解物に対して、およびさらに培養上清を用いる発現の伝達（transfer-of-expression）実験の両方で測定する。

さらなるレベルの制御を、第3の、またはさらに第4のレベルの調節をアルファウイルスベクター分子の転写を担うプロモーターに付加することによって取り込ませ得る。このような付加的なレベルの調節は、最小のプロモーターに取り込まれ得、そして他の誘導性系および/または細胞分化制御を含み得る。上記の場合の各々において、安定な形質転換が、宿主細胞染色体への組み込みとして、または例えば、EBVエピソームに基づくベクタープロモーター（非組み込みのための）を用いて染色体外エピソームとして、達成され得る。

実施例 8

アルファウイルス由来の空のまたはキメラのウイルス粒子の生成方法

実施例6に示したように、個々の欠陥ヘルパー（DH）発現カセットを、複数のアルファウイルスまたはそれらの改変体由来のエレメントを含むように構築し得る。従って、実施例6に記載のように、ウイルス糖タンパク質の発現のための分割（split）構造遺伝子DHカセットを、異なるアルファウイルス種由来のキャプシド遺伝子および糖タンパク質遺伝子を含むように構築し得る。例えば、このような異種アルファウイルス糖タンパク質DHカセットは、ロスリバーウイルス（RRV）由来のキャプシド遺伝子、およびシンドビスウイルス由来の糖タンパク質遺伝子を含み得る。この構成（configuration）において、RRVキャプシド遺伝子は、糖タンパク質遺伝子の翻訳のレベルを増強するように働く。

本明細書中に記載される異種アルファウイルス糖タンパク質DHカセットの構成は、アルファウイルス粒子へのベクターレプリコンのパッケージングを改善するが、なお組換えの可能性を減少させ、その結果、複製コンピテントなアルファウイルスを形成するように設計される。異種アルファウイルス糖タンパク質DH発現カセットは、実施例6に記載のDH発現カセットにおけるシンドビスウイルスキャプシド遺伝子の置換物として（「ゲノム」構造タンパク質遺伝子PCL）、異種アルファウイルスキャプシド遺伝子（例えば、RRV）を含むものである。分割構造遺伝子PCLにおける第2のDH発現カセットは、例えば、シンドビスウイルスキャプシド遺伝子を含む。従って、シンドビスウイルス構造タンパク質を有する組換えアルファウイルスベクター粒子の生成のための分割構造遺伝子PCLは、例えば、個々のDH発現カセット上のシンドビスウイルス糖タンパク質遺伝子およびキャプシド遺伝子を伴って誘導され得る。

RRVの遺伝子の全てを含むが、シンドビスウイルス由来のキャプシド遺伝子を有するキメラウイルス、または相反するキメラウイルスは、感染性ウイルス粒子へアセンブリしないことが以前に示されている（Lopezら、J.Virol.68:1316-1323,1994）。その著者らは、この報告においてウイルスアセンブリにおける糖タンパク質E2のカルボキシ末端とキャプシドタンパク質との相互作用が、異種アルファウイルスの構造タンパク質の間では起こり得

ないと結論した。従って、実施例6に記載の分割構造遺伝子アルファウイルスPCLに起こる組換えゲノムであって、シンドビスウイルスの非構造タンパク質遺伝子（ベクターレプリコン起源）、RRVキャプシド遺伝子、およびシンドビスウイルス糖タンパク質遺伝子からなるゲノムは、複製コンピテントであるべきではなく、ウイルス（複製コンピテントなシンドビスウイルス、RCSV）の増殖を生じる。異種アルファウイルス種間のパッケージング制限は、キャプシド遺伝子（1つのアルファウイルス由来の翻訳増強エレメントおよび異なるアルファウイルス由来の糖タンパク質遺伝子を含む）で構成されるDHカセットの構築を可能にする。

しかし、図31に例示されるように、異種アルファウイルスの構造タンパク質間ではアセンブリは起こり得ないというLopezら（同書）の観察は、正確ではない。実際、RRVキャプシド遺伝子、およびシンドビスウイルス糖タンパク質遺伝子からなるDHカセットは、感染性ウイルス粒子を生成する。簡単に述べれば、BHK細胞を、SINrep/Lac Zレプリコン（Brederbeekら、J.Virol.,67:6439-6446,1993）およびDH-BB（5' tRNA/SIN）Crrv（実施例6および図24；RRVキャプシド/シンドビスウイルス糖タンパク質）でインビトロで転写したRNA Aと同時にエレクトロポレートした。エレクトロポレーションおよびインビトロ転写を、実施例1に記載のように行った。エレクトロポレーションの後、BHK細胞を、実施例1に記載と全く同様に、ダクチノマイシンで処理し、そして³H ウリジンで標識した。エレクトロポレーションの18時間後、培養培地を回収し、そして6,000rpmで10分間の遠心分離によって明澄化した。上清に残ったベクター粒子を、超遠心分離によって、スクロースクッション上に最初に重層したあとにペレット化した。RNAを、実施例1に記載と全く同様に、エレクトロポレーションの18時間後にBHK細胞から、およびウイルスペレットから単離し、変性グリオキサールアガロースゲル上で電気泳動し、そしてオートラジオグラフィーによって可視化した。SINrep/LacZおよびDH-BB Crrv RNAでエレクトロポレートしたBHK細胞およびウイルス粒子に存在するウイルスRNAを、図31（レーン1、パネルA、およびレーン1、パネルB）に示す。SINrep/LacZおよびDH-BB Crrv RNAについてのゲノムおよびサブゲノム複製種に対応するRNAは、エレクトロポレートしたBHK細胞および生成されたウイルス粒子の両方に存在した。結果は、Lopezら（同書）とは対照的に、RRVキャプシドタンパク質およびシンドビスウイルス糖タンパク質からなるキメラアルファウイルス粒子の形成を実証する。さらに、キメラアルファウイルス粒子中のゲノムおよびサブゲノムSINrep/LacZおよびDH-BB Crrv RNAの無差別パッケージングは、ロスリバーキャプシドタンパク質が、シンドビスウイルスパッケージング配列（これは、SINrep/LacZベクターレプリコンのnsP1遺伝子中に存在する）を特異的に認識し得ないことを示す。

エレクトロポレーションの18時間後にSINrep/LacZおよびDH-BB Crrv RNAでエレクトロポレートしたBHK細胞中に存在するウイルスタンパク質、および生成されたウイルス粒子を、図32（レーン1、パネルA、およびレーン1、パネルB）に示す。エレクトロポレートした細胞中のウイルス特異的構造タンパク質と生成されたキメラアルファウイルス粒子とを、区別できなかった。つまり、図32は、SINrep/LacZおよびDH-BB Crrv RNAでエレクトロポレートしたBHK細胞から生成されたウイルス粒子が、RRVキャプシドならびにシンドビスウイルス糖タンパク質E1およびE2を含んでいたことを明確に示す。この結果は、Lopezら（同書）とは対照的に、異種アルファウイルスキャプシドと糖タンパク質との間にはアセンブリにおける制限（これは、キメラウイルス粒子の形成を防止する）が存在しないという疑う余地のない証拠を提供する。

従って、Lopezらの結果および考察とは明確に対照的に、RRVキャプシドタンパク質のアミノ末端は、異種シンドビスウイルスゲノムに結合し、そして感染性キメラアルファウイルス粒子を形成し得る。重要なことに、異種アルファウイルスキャプシドタンパク質と糖タンパク質との間にはウイルスアセンブリの制限が存在するという以前の結論は、不正確である。次いで、本明細書中に記載されるキメラアルファウイルス粒子の生成はまた、上記の分割構造遺伝子PCLにおいてRCSVの形成を生じる。なぜなら、シンドビスウイルス非構造タンパク質遺伝子（ベクターレプリコン由来）、RRVキャプシド遺伝子、およびシンドビスウイルス糖タンパク質遺伝子からなる組換えゲノムは、感染性ウイルスを生成するか

10

20

30

40

50

らである。あるいは、個々のアルファウイルス構造タンパク質とベクターレプリコンとの間のこのパッケージングの制限の欠如は、ベクター粒子の指向性が改変されることを可能にする。例えば、シンドビスウイルスレプリコンは、リンパ指向性の組換えベクター粒子を生成するために、ヴェネズエラウマ脳炎ウイルス構造タンパク質とともにパッケージングされ得る。

2つの別々の以前の研究において記載された結果は、キャプシドタンパク質と、三角測量数 (triangulation number) (T) = 3 を有する2つの正十二面体ウイルスポジティブRNA鎖ゲノム、turnip crinkleウイルス (TCV) およびsouthern beanmosaicウイルス (SBMV)、との間の相互作用のインビトロでの消失が、ウイルス粒子の解離、および核酸を含まない $T = 1$ 粒子の形成を生じたことを示している (Sorgerら、J.Mol.Biol., 191:639-656, 1986、およびEricksonおよびRossmann, Virology 116:128-136, 1982)。核酸の非存在下では、野生型ウイルスに類似の $T = 3$ 粒子は、インビトロで形成されなかった。OwenおよびKuhn (J.Virol., 70:2757-2763, 1996) は、インビボでのキャプシド形成反応の特異性を指示するのに必要であるキャプシドタンパク質の領域を同定するために、キャプシドに欠失を含むシンドビスウイルスゲノムのパッケージング特性を調査した。キャプシドの残基97-106に対応する欠失を含む1つの変異体ウイルス [CD (97-106)] は、ゲノムRNAおよびサブゲノムRNAの両方をキャプシド形成し、このことは、キャプシドタンパク質のドメインが、ゲノムRNAパッケージングシグナルの特異的認識のために必要とされることを示す。なお別の報告において、アウラアルファウイルスのパッケージング特性が調査された (Rumenapfら、J.Virol., 69:1741-1746, 1995)。この研究において、キャプシドタンパク質キャプシド形成配列相互作用開始複合体を含むアルファウイルスパッケージングのための機構が提唱された。この提唱された機構は、その筆者らおよび他者 (OwenおよびKuhn、同書を含む) の観察 (そこでは、26Sおよび49SアルファウイルスRNAが $T = 1$ 、 $T = 3$ 、 $T = 4$ 、および $T = 7$ ウイルス粒子にパッケージングされる) に基づいており、アルファウイルスでの感染の間に生じる空のキャプシドは報告されていない。

上記の文献およびそれに含まれる議論に基づいて、キャプシド形成反応の特異性を指示するために必要とされるキャプシドタンパク質ドメインに対応する領域を欠失するRRVキャプシド遺伝子、およびさらにウイルスRNAと静電的に結合するそのまわりの塩基性残基は、ウイルスRNAを含む安定なキャプシド粒子を形成し得るべきではない。従って、この欠失したRRVキャプシド遺伝子およびシンドビスウイルス糖タンパク質遺伝子からなる異種アルファウイルスDHカセットから発現されたアルファウイルス構造タンパク質は、アセンブリして安定なキメラウイルス粒子にならないはずである。従って、上記および実施例6において考察された分割構造遺伝子PCLにおいて、シンドビスウイルス非構造タンパク質遺伝子、RRVキャプシド遺伝子 (パッケージング特異性に対応する領域およびそのまわりの塩基性残基を欠失する)、およびシンドビスウイルス糖タンパク質遺伝子からなる組換えゲノムは、感染性ウイルスを生成し得なかった。実施例6において記載したように、シンドビスウイルスキャプシドタンパク質は、別々のDH発現カセットから発現される; 従って、3つのシンドビスウイルス構造タンパク質は、全体として発現され、その結果、組換えベクター粒子を生成する。

シンドビスウイルスパッケージング配列に結合する発現されるタンパク質の予想される領域に対応するRRVキャプシド遺伝子のヌクレオチド (Weissら、Nuc.Acids.Res., 22:780-786, 1994、およびLopezら、同書) (ウイルスRNAに静電的に結合する塩基性残基を含む) を、異種アルファウイルスキャプシド糖タンパク質DHを構築するために欠失させた。これは、翻訳増強および翻訳後切断による正確なpE2-6K-E1ポリタンパク質プロセッシングを提供したが、安定なキメラRRV/シンドビスウイルス粒子をアセンブリし得なかった。図33は、RRVキャプシドタンパク質、および3つの個々のRRVキャプシド遺伝子変異体 (CΔ1rrv、CΔ2rrv、およびCΔ3rrv) から発現されるキャプシドタンパク質の疎水性プロフィール (Kyte-Doolittle) を例示する。ここで、ウイルスパッケージング配列RNAと相互作用するリジンリッチタンパク質をコードする種々の量のキャプシド遺伝子が欠失していた。RRVキャプシドタンパク質のリジンリッチ塩基性領域を図33に示す。さらに、疎水性プロフィー

10

20

30

40

50

ルは、このリジンリッチ塩基性領域が、3つの個々のRRVキャプシド遺伝子変異体CΔ1rrv、CΔ2rrv、およびCΔ3rrvにおいて段階的に排除されていることを実証する。図34は、変異体CΔ1rrv、CΔ2rrv、およびCΔ3rrvにおける欠失の結果として、発現されたRRVキャプシドタンパク質において排除されているリジン残基を示す。以下に示す表は、構築物CΔ1rrv、CΔ2rrv、およびCΔ3rrvのRRVゲノムにおいて欠失したヌクレオチドを示す。

構築物	欠失したRRVゲノムnt
CΔ1rrv	7841～7891
CΔ2rrv	7796～7891
CΔ3rrv	7760～7891

RRVキャプシド遺伝子欠失を、図23に示し、そして実施例6で記載したDH-BB CrrvプラスミドDNA上で構築した。指示されたRRVキャプシド遺伝子配列を、実施例6に示すプライマーおよび他のクローニング工程を用いてPCRによって欠失させた。

上記で考察した図31および32は、SINrep/LacZおよびDH-BB CΔ1rrv、CΔ2rrv、またはCΔ3rrv RNAでエレクトロポレートされたBHK細胞において合成され、これらの細胞の培養液に含まれるウイルス粒子中に存在するウイルス特異的RNA（図31）およびタンパク質（図32）を図示する。ゲノムおよびサブゲノム種を、エレクトロポレートした細胞において、SINrep/LacZレプリコンおよび3つ全てのDH-BB CΔ1rrv、CΔ2rrv、またはCΔ3rrv DH RNAの両方について検出した（図31、パネルA）。しかし、SINrep/lacZレプリコンは、ウイルス粒子中のレプリコンゲノムRNAの不在によって示されるように、RRVキャプシド遺伝子に欠失を含むDH RNAでエレクトロポレートした細胞においてベクター粒子にパッケージングされなかった（図31、パネルB）。さらに、細胞をRRVキャプシドのより大きな欠失（CΔ2rrvまたはCΔ3rrv）を含むDH分子でエレクトロポレートした場合、ヘルパーゲノムRNAおよびサブゲノムRNAは、非常に非効率的にパッケージングされ、そして変性ゲルのオートラジオグラムにおいてほとんど不可視であった（図31、パネルB、レーン3および4）。対照的に、SINrep/lacZゲノムRNA（およびCΔ2rrvまたはCΔ3rrvでのエレクトロポレーションにおけるDH RNA）を、RRVキャプシド遺伝子に欠失を含むDHでエレクトロポレートしたBHK細胞由来のウイルス粒子において検出しなかったのに対し、等価なRRVキャプシドタンパク質およびシンドビスウイルス糖タンパク質レベルを、全てのDH RNAでエレクトロポレートした細胞由来のウイルス粒子において、RRVキャプシド遺伝子が欠失を含むか否かに関わらず、観察した（図32、パネルAおよびB）。この結果は、ベクターレプリコンを含んでいない安定なキメラウイルス粒子、または他のウイルス特異的RNAが、SINrep/lacZゲノムRNAおよびDH RNAでエレクトロポレートされたBHK細胞（これから、ゲノムRNAに結合し得ないキャプシドタンパク質が発現された）において形成されたことを示す。安定な空の異種アルファウイルス粒子の形成は、以前の調査の結果および議論に基づいて予期されずそして予想されない（Lopezら、J.Virol.68:1316-1323,1994,Sorgerら、J.Mol.Biol.,191:639-656,1986,EricksonおよびRossmann,Virology 116:128-136,1982、およびRumenapfら、J.Virol.,69:1741-1746,1995）。

生成されたウイルス粒子の組成を決定するために、本明細書中に記載されるように、SINrep lacZおよび種々のRRVキャプシド遺伝子構成を含むDH RNAで、BHK細胞をエレクトロポレートし、そして続いて実施例1に記載のように、ダクチノマイシンで処理し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンおよび $[^3\text{H}]$ ウリジンで標識した。生成されるウイルス粒子の構成を、明澄化した細胞培養培地を35,000rpmにて2時間、SW-41ローター中で20%～40% (w/w) スクロース勾配上で超遠心分離することによって決定した。この研究の結果は、図35～37に示され、そして安定な空の異種アルファウイルス粒子の形成を再び示す。図35は、高MOI (5) で野生型ウイルス、Totol101に感染したBHK細胞において合成された粒子中に取り込まれた $[^{35}\text{S}]$ メチオニンおよび $[^3\text{H}]$ ウリジンの相対的レベルを示す。図36は、SINrep/LacZおよびDH-BB (5' tRNA) Crrv (図23) RNAでエレクトロポレートしたBHK細胞において合成された粒子中に取り込まれた $[^{35}\text{S}]$ メチオニンおよび $[^3\text{H}]$ ウリジンの相対的レベルが、野生型ウイルスに感染した細胞におけるレベルと同様であったことを示す。対照的に、図37は、SINrep/LacZおよびDH-BB (5' tRNA) CΔ3rrvでエレクトロポレートしたBHK細胞

10

20

30

40

50

において生成された粒子が、非常に低レベルの取り込まれた $[^3\text{H}]$ ウリジンを含んでいたことを示す。図38は、図35～37を編集したものであり、粒子に取り込まれた $[^{35}\text{S}]$ メチオニンおよび $[^3\text{H}]$ ウリジンの相対的レベルが、野生型アルファウイルスキャプシド遺伝子を含むRNAで感染またはエレクトロポレートしたBHK細胞におけるレベルと類似であったのに対し、RRVキャプシド遺伝子のnt7760～7891の欠失を含むDH RNAでエレクトロポレートしたBHK細胞が、SINrep/LacZ RNAを欠失する安定なキメラの空のアルファウイルス粒子を形成したことを明らかに示す。SINrep/LacZ RNAおよびDH-BB CD3rrvでインビトロで転写されたRNAでエレクトロポレートした細胞株において生成され、そして $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識された空のアルファウイルス粒子の力価を、Toto 1101野生型ウイルスで感染し、そして $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識したBHK細胞との比較によって決定した。Toto1101感染細胞由来のウイルス含有スクロース勾配画分に存在する放射能のレベルを定量し、そして実施例1に記載した方法に従うプラークアッセイによって決定されるこれらの同一の画分に存在するウイルス力価に関連付けた。空のアルファウイルス粒子力価決定のために、SINrep/LacZ RNAおよびDH-BB CD3rrvでインビトロ転写されたRNAでエレクトロポレートしたBHK細胞由来のウイルス粒子含有スクロース勾配画分に存在する放射能のレベルを定量し、そしてToto 1101感染細胞からの $[^{35}\text{S}]$ メチオニン/ウイルス力価に関連付けた。欠失ロスリバーウイルスキャプシドおよびシンドビスウイルス糖タンパク質を含み、SINrep/LacZ RNAおよびDH-BB CD3rrvでインビトロ転写されたRNAでエレクトロポレートした細胞において生成された空のキメラウイルス粒子の力価は、 1×10^9 粒子/mlであった。

本発明は、先に、一般的におよび好ましい実施態様に関しての両方で記載されたが、前述の記載を考慮して、変化および改変が当業者に想到されることが理解される。それゆえ、添付の請求の範囲は、請求される本発明の範囲内にある全てのこのような改変を含むことが意図される。

さらに、本発明の背景を明らかにするため、そして特に詳細な説明および実施例において記載したような本発明の実施に関するさらなる詳細を提供するために引用された刊行物および他の資料は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

配列表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：カイロン バイアジーン、インコーポレイテッド
ワシントン ユニバーシティ

(ii) 発明の名称：細胞巨大分子合成の阻害が減少した組換えアルファウイルスに基づくベクター

(iii) 配列数：118

(iv) 連絡住所：

(A) 名称：シード アンド ベリー エル エル ピー

(B) 番地：コロンビア センター 6300, フィフス アベニュー 701

(C) 市：シアトル

(D) 州：ワシントン

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：98104-7092

(v) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピー ディスク

(B) コンピューター：IBM PC 互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.30

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：1997年4月4日

(C) 分類：

(viii) 代理人／事務所情報：

- (A) 氏名：マックマスターズ，ディビッド デー．
- (B) 登録番号：33,963
- (C) 照会／記録番号：930049.457PC
- (ix) 電話回線情報：

- (A) 電話：(206) 622-4900
- (B) テレファックス：(206) 682-6031

(2) 配列番号 1 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：24塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

10

(xi) 配列：配列番号 1：

ATCTCTACGG TGCTCCTAAA TAGT

24

(2) 配列番号 2 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：48塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

20

(xi) 配列：配列番号 2：

GGTGGAGCTC TAATACGACT CACTATAGAT TGACGGGGTA GTACACAC

48

(2) 配列番号 3 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：15塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 3：

AATTCTGCCC TCAGC

15

30

(2) 配列番号 4 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：17塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 4：

TATGCAAAGT TACTGAC

17

(2) 配列番号 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：18塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

40

(xi) 配列：配列番号 5：

CTGTCATTAC TTCATGTC

18

(2) 配列番号 6 の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：15塩基対

50

(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列：配列番号 6：		
GCGTGGATCA CTTTC	15	
(2) 配列番号 7 の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 長さ：19塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		10
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列：配列番号 7：		
ATTGCGTGAT TTOGTCCGT	19	
(2) 配列番号 8 の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 長さ：15塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列：配列番号 8：		20
TAAATTGAG CTTTG	15	
(2) 配列番号 9 の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 長さ：18塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列：配列番号 9：		
GGCATATGCC ATTAGTTG	18	
(2) 配列番号10の情報：		30
(i) 配列の特徴：		
(A) 長さ：19塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列：配列番号10：		
CTGGCCATGG AAGGAAAGG	19	
(2) 配列番号11の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 長さ：58塩基対		40
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(xi) 配列：配列番号11：		
CCCGTCGAGG GTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGAAATGTT AAAAACAAAA TTTTGTG	58	
(2) 配列番号12の情報：		
(i) 配列の特徴：		
(A) 長さ：48塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号12：

TATATGGGCG CGATTTAGGT GACACTATAG ATTGAOGGCG TAGTACAC

48

(2) 配列番号13の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：23塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号13：

CTGGCAACCG GTAAGTACGA TAC

23

(2) 配列番号14の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号14：

ATACTAGCCA CGGCCGGTAT C

21

(2) 配列番号15の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号15：

TCCTCTTTGG ACGTGTGAG C

21

(2) 配列番号16の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号16：

ACCTTGGAGC GCAATGTCT G

21

(2) 配列番号17の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号17：

CCTTTTGAGG GGATCCGCCA C

21

(2) 配列番号18の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

10

20

30

40

50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号18：

GTGGCGGATC CCCTGAAAAG G

21

(2) 配列番号19の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号19：

TGGGCGGTGT GGTGTCATG

20

10

(2) 配列番号20の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号20：

TGGGTCTTCA ACTCACCGGA C

21

20

(2) 配列番号21の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：22塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号21：

CAATTGACG TAGGCCTCAC TC

22

(2) 配列番号22の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：22塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号22：

GAGTGAGGCG TAGTGAAT TG

22

(2) 配列番号23の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：52塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号23：

TATATCTAG ATTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT TTTTGAAG TG

52

(2) 配列番号24の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

40

50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号24：

ATATATCTAG AGCCATGGGC CACACACGGA GGCAG

35

(2) 配列番号25の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号25：

ATATAGGATC CCTGTTATAC AGGGCGTACA CTTTC

35

(2) 配列番号26の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号26：

ATATACTCGA GACCATGATT GAACAAGATG GATTG

35

(2) 配列番号27の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号27：

TATATAGCGG CCGCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAG

35

(2) 配列番号28の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号28：

CTGTAGATGG TGACGGTGTC G

21

(2) 配列番号29の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：22塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号29：

GAAGTGCCAG AACAGCCTAC CG

22

(2) 配列番号30の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：34塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

10

20

30

40

50

(xi) 配列：配列番号30：

TATATCTCGA GGGTGGTGT GTAGTATTAG TCAG

34

(2) 配列番号31の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：41塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号31：

TATATATATA TCGGGCGGCC GCTACGCCCC AATGATCGA C

41

10

(2) 配列番号32の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：65塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号32：

CTATAGAGCT CGTTAACT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTTTTTT

60

AAATG

65

(2) 配列番号33の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：12塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号33：

TCGATCCTAG GA

12

(2) 配列番号34の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：11塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号34：

AGGATCCTAG T

11

(2) 配列番号35の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号35：

CTCGATCCTA GGATCGAGGC

20

(2) 配列番号36の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号36：

50

GAGCTAGGAT CCTAGCTCOG

20

(2) 配列番号37の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：44塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号37：

TATATATGAG CTCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATGCGAT TGTC

44

10

(2) 配列番号38の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：43塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号38：

TATATGAATT CATAGAATGA CACCTACTCA GACAATGOGA TGC

43

(2) 配列番号39の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：56塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号39：

AAAAAAAA GGGTCGGCAT GGCATCTCCA CCTCCTCGCG GTCGACCTG GGCATC

56

(2) 配列番号40の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：69塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号40：

TATATGAGCT CCTCCCTTAG CCATCCGAGT GGAAGTGCGT CCTCCTTCGG ATGCCAGGT
CGGACCGCG

60

69

(2) 配列番号41の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：34塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号41：

TATATATAGA TCTTTGACAT TGATTATTGA CTAG

34

(2) 配列番号42の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：42塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

50

- (D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号42：
CCGTCAATAC GGTTCATAA ACGAGCTCTG CTTATATAGA CC 42
(2) 配列番号43の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：38塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号43： 10
GCTCGTTTAG TGAACGSTAT TGACGGCGTA GTACACAC 38
(2) 配列番号44の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：23塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号44：
CTGGCAACCG GTAAGTACGA TAC 23
(2) 配列番号45の情報： 20
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：22塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号45：
GGTAACAAGA TCTGTGCGG TG 22
(2) 配列番号46の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：34塩基対 30
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号46：
CCTATGCGGC CGCGTGAAC CTTTGTGGCT CCTC 34
(2) 配列番号47の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：31塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖 40
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号47：
CCTATTGGCC AGCAGACCAA TTTATGCCA C 31
(2) 配列番号48の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：34塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号48： 50

CCTATGGGGC CGCTAGACTG GACAGCCAAT GACG

34

(2) 配列番号49の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 32塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号49:

CCTATTGGGC AGCCAAGACA TCATCGGGC AG

32

(2) 配列番号50の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 39塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号50:

TATATATCG GAAAGCTCTA AGGTAAATAT AAAATTTT

39

(2) 配列番号51の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 43塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号51:

TATATAGGAT CCTAGGTTAG GTTGAATCT AAAATACACA AAC

43

(2) 配列番号52の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 12塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号52:

TCGATCCTAG GA

12

(2) 配列番号53の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 16塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号53:

GCTCTTAATT AAGAGC

16

(2) 配列番号54の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 55塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号54:

10

20

30

40

CTGTTTAAAC AGATCTTATC TCGAGTATGC GGCCGCTATG AATTGTTTA AACGA 55

(2) 配列番号55の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：55塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号55：

TCGTTTAAAC GAATTCATAG CGGCCGCATA CTCGAGATAA GATCTGTTTA AACAG 55 10

(2) 配列番号56の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：37塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号56：

ATATATCCGG AGTCCGGCCG CTTCGGTGGG GAGGCTA 37

(2) 配列番号57の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：36塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号57：

ATATAGGATC CTCAGAAGAA CTGTCAGA AGGCGA 36

(2) 配列番号58の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：44塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号58：

TATATATGAG CTCTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTC 44 30

(2) 配列番号59の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：36塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号59：

TATATGAATT CGTTTGACA AACCACAACT AGAATG 36

(2) 配列番号60の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

50

(xi) 配列：配列番号60：

TATATAGATC TAGTCTTATG CAATACTCTT GTAGT

35

(2) 配列番号61の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：44塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号61：

GGGATACTCA CCACTATATC TCGACGGTAT CGAGGTAGGG CACT

44

10

(2) 配列番号62の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：22塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号62：

GATATAGTGG TGAGTATCCC CG

22

(2) 配列番号63の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：34塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号63：

TATATGGATC CCGGAGATCC TTAATCTTCT CATG

34

(2) 配列番号64の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：28塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号64：

TATATATGCA TCCCCCCCCC CCCCCAAG

28

(2) 配列番号65の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：43塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号65：

CATGCGAAAC GATCCTCATC CTTACAATCG TGGTTTTCAG AGG

43

(2) 配列番号66の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：25塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号66：

20

30

40

GATGAGGATC GTTTCGCATG ATTGA

25

(2) 配列番号67の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 36塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号67:

TATATATGCA TTCAGAAGAA CTGTCAGA AGGCGA

36

10

(2) 配列番号68の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 35塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号68:

ATATACTCGA GACCACCACC ATGAATAGAG GATTC

35

20

(2) 配列番号69の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 42塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号69:

TATATGCGGC CGCTATTACC ACTCTTCTGT CCCTTCGCGG GT

42

(2) 配列番号70の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 42塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号70:

ATATACTCGA GAGCAATGTC CGCAGCACCA CTGGTCACGG CA

42

(2) 配列番号71の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 39塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号71:

ATATAGCGCG CGGTCATCT TGGTGTGCTA GTCAGCATC

39

(2) 配列番号72の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 34塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号72:

50

ACACATTAAT TAACGATGCC GCCGGAAGCG AGAA

34

(2) 配列番号73の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：34塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号73：

ACACATTAAT TAAGTATTGG CCCCAATGGG GTCT

34

10

(2) 配列番号74の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：26塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号74：

CCACGAATTC GGTCCTAAAT AGATGC

26

(2) 配列番号75の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：25塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号75：

CCACAAGCTT CCGGGCGAGG CCGCC

25

(2) 配列番号76の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：23塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号76：

CCACGGATCC CCGCGTTCCG TCC

23

(2) 配列番号77の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：25塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号77：

CCACAAGCTT GTGCACTGGG ATCTG

25

(2) 配列番号78の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：25塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号78：

50

CCACGGATCC GTGCACATGA AGTCC

25

(2) 配列番号79の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号79：

CCACAAGCTT CCGAGTTAC CCGAGTGACC

30

10

(2) 配列番号80の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：26塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号80：

CCACCTTAAG CGTGGCTTT TTCTTC

26

(2) 配列番号81の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：25塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号81：

CCACCTTAAG AGAAGAGAAA GAATG

25

(2) 配列番号82の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：24塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号82：

CCACAAGCTT GGACCACGT AGAG

24

(2) 配列番号83の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：19塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号83：

CCGGTGGCG GATCCCTG

19

(2) 配列番号84の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：24塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号84：

CCACGGATCC GGAAGGACA GAAG

24

50

(2) 配列番号85の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：16塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号85：

CACGGTCCTG AGGTGC

16

(2) 配列番号86の情報：

(i) 配列の特徴：

10

(A) 長さ：42塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号86：

TATATATAATC-TCGAGACCGC CAAGATGTTT CCGTTCCAGC CA

42

(2) 配列番号87の情報：

(i) 配列の特徴：

20

(A) 長さ：38塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号87：

TATATATATG CCGCCGCTCA ATTATGTTTC TGGTTGGT

38

(2) 配列番号88の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：42塩基対

(B) 型：核酸

30

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号88：

TATATAGATC TGGGCGGCCT TTACCACTCC TATCAGTGAT AG

42

(2) 配列番号89の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

40

(xi) 配列：配列番号89：

TACGCGTCA ATACGGTTCA CTAAACGAGC TCTGC

35

(2) 配列番号90の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号90：

TAGTGAACCG TATTGACGGC GTAGTACACA CTATT

35

50

(2) 配列番号91の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：22塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号91：

CGTTGAGCAT AACCGAATCT AC

22

(2) 配列番号92の情報：

(i) 配列の特徴：

10

(A) 長さ：42塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号92：

ATATAGAGCT CTTAATTAAT CTTTGTGAAG GAACCTTACT TC

42

(2) 配列番号93の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：35塩基対

20

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号93：

ATATAGAGCT CAGGCGTTGA AAAGATTAGC GACCG

35

(2) 配列番号94の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：46塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

30

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号94：

TATATATTAA TTAAATAGAA TGACACCTAC TCAGACAATG CGATGC

46

(2) 配列番号95の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：40塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号95：

40

ATATACTCGA GTAGCAATGG TGAACCCAGT AACGTTATAC

40

(2) 配列番号96の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：45塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号96：

GCCCTTTCTC TTCTTTTITG GCTGCCCGCT TTCCAGTCGG GAAAC

45

(2) 配列番号97の情報：

50

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：39塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号97：

CCAAAAAGA AGAGAAAGGG CGGTGGTGCT TTGTCTCCT 39

(2) 配列番号98の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：38塩基対

10

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号98：

ATATAGAGCT CTTAAACTGA TGATTGATT TCAAATGC 38

(2) 配列番号99の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

20

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号99：

CGCGCCGAAT TGTGAGGCT CACAATTGG 30

(2) 配列番号100の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：7 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号100：

30

Pro Lys Lys Lys Lys Arg Lys
1 5

(2) 配列番号101の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：8000塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号101：

ATTGACGGCG TAGTACACAC TATTGAATCA AACAGCCGAC CAATGCACT ACCATCACAA	60
TGGAGAAGCC AGTAGTAAAC GTAGACGTAG ACCCCCAGAG TCCGTTTGTC GTGCAACTGA	120
AAAAAAGCTT CCGCAATTT GAGGTAGTAG CACAGCAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA	180
ATGCCAGAGC ATTTTGGCAT CTGGCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CCTACCACAG	240
CGACGATCTT GGACATAGGC AGCGACCGG CTGCTAGAAT GTTTTCCGAG CACCAGTATC	300
ATTGTGTCTG CCCCATGGT AGTCCAGAAG ACCCGGACCG CATGATGAAA TACGCCAGTA	360
AACTGGGGGA AAAAGGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT GCATGAGAAG ATTAAGGATC	420
TCGGACCGT ACTTGATAAG CCGGATGCTG AAACACCATC GCTCTGCTTT CACAAGATG	480
TTACCTGCAA CATGGGTGCC GAATATTCGG TCATGCAGGA CGTGTATATC AACGCTCCCG	540
GAACTATCTA TCATCAGGCT ATGAAAGGCG TGGGGACCCT GTACTGGATT GGCTTCGACA	600
CCACCCAGTT CATGTTCTGG GCTATGGCAG GTTCGTACCC TGGTACAAC ACCAACTGGG	660
CGACGAGAA AGTCCTTGAA GCGGTAAACA TGGACTTTG CAGCACAAAG CTGAGTGAAG	720
GTAGGACAGG AAAATTGTGG ATAATGAGGA AGAAGGAGTT GAAGCCCGGG TGGCGGTTT	780
ATTTCTCGT AGGATCGACA CTTTATCCAG AACACAGAGC CAGCTTGCG AGCTGGCATC	840
TTCCATCGGT GTTCCACTTG AATGGAAAGC AGTGTACAC TTGCGCTGT GATACAGTGG	900
TGAGTTGCGA AGGCTACGTA GTGAAGAAAA TCACCATCAG TCCCGGATC ACGGGAGAAA	960
CGTGGGATA CGCGTTACA CACAATAGCG AGGGCTTCTT GCTATGCAA GTTACTGACA	1020
CAGTAAAGG AGAAGGGTA TCGTTCCCTG TGTGCAAGTA CATCCGGCC ACCATATGCG	1080
ATCAGATGAC TGGTATAATG GCCACGGATA TATCACCTGA CGATGCACAA AAATTCTGG	1140
TTGGGCTCAA CCAGCGAATT GTCATTAACG GTAGGACTAA CAGGAACACC AACACCATGC	1200
AAAATTACCT TCTGCGATC ATAGCACAAG GGTTCAGCAA ATGGGCTAAG GAGCGCAAGG	1260
ATGATCTTGA TAACGAGAAA ATGCTGGGTA CTAGAGAAG CAAGCTTACG TATGGCTGCT	1320

10

20

30

40

TGTGGGCGTT TCGCACTAAG AAAGTACATT CGTTTTATCG CCCACCTGGA ACGCAGACCT	1380
GCGTAAAAGT CCCAGCCTCT TTAGCGCTT TTCCCATGTC GTCCGTATGG ACGACCTCTT	1440
TGCCCATGTC GCTGAGGCAG AAATTGAAAC TGGCATTGCA ACCAAAGAAG GAGGAAAAAC	1500
TGCTGCAGGT CTOGGAGGAA TTAGTCATGG AGGCCAAGGC TGCTTTTGAG GATGCTCAGG	1560
AGGAAGCCAG AGCGGAGAAG CTCOGAGAAG CACTTCCACC ATTAGTGGCA GACAAAGGCA	1620
TCGAGGCAGC CGCAGAAGTT GTCTGCGAAG TGGAGGGGCT CCAGGCGGAC ATCGGAGCAG	1680
CATTAGTTGA AACCCGCGC GGTCAAGTAA GGATAATACC TCAAGCAAAT GACCGTATGA	1740
TOGGACAGTA TATOGTTGTC TCGCCAACT CTGTACTGAA GAATGCCAAA CTCGCACCAG	1800
CGCACCGCT AGCAGATCAG GTTAAGATCA TAACACACTC CGGAAGATCA GGAAGGTACG	1860
CGGTGGAACC ATACGAGCT AAAGTACTGA TGCCAGCAGG AGGTGCGTA CCATGGCCAG	1920
AATTCCTAGC ACTGAGTGAG AGCGCCACGT TAGTGTACAA CGAAAGAGAG CTTGTGAACC	1980
GCAAACTATA CCACATTGCC ATGCATGGCC CGCCAAGAA TACAGAAGAG GAGCAGTACA	2040
AGGTTACAAA GGCAGAGCTT GCAGAAACAG AGTAAGTGTG TGACGTGGAC AAGAAGCGTT	2100
GCGTTAAGAA GGAAGAAGCC TCAGGTCTGG TCCTCTCGG AGAACTGACC AACCTCCCT	2160
ATCATGAGCT AGCTCTGGAG GGAAGTGAAGA CCGACCTGC GGTCCCGTAC AAGGTGAAA	2220
CAATAGGAGT GATAGGCACA CCGGGGTGG GCAAGTCAGC TATTATCAAG TCAACTGTCA	2280
CGGCACGAGA TCTTGTACC AGCGGAAAGA AAGAAAATTG TCGGAAATT GAGGCGACG	2340
TGCTAAGACT GAGGGGTATG CAGATTACGT CGAAGACAGT AGATTGCGTT ATGCTCAACG	2400
GATGCCACAA AGCGTAGAA GTGCTGTACG TTGACGAAGC GTTCGGTGC CAGCAGGAG	2460
CACTACTTGC CTTGATTGCT ATGTCAGGC CCGCAAGAA GGTAGTACTA TCGGAGACC	2520
CCATGCAATG CGGATTCTTC AACATGATGC AACTAAAGGT ACATTCAAT CACCCTGAAA	2580
AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCG GCGTTGCACA CAGCCAGTTA	2640
CAGCTATTGT ATCGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACCACGAAC CGTGCAAGA	2700

10

20

30

40

AGAACATTGA AATCGATATT ACAGGGGCCA CAAAGCCGAA GCCAGGGGAT ATCATCCTGA	2760
CATGTTTCCG CCGGTGGGTT AAGCAATTGC AAATCGACTA TCCCGGACAT GAAGTAATGA	2820
CAGCCGGGGC CTCACAAGGG CTAACCAGAA AAGGAGTGTA TGCCGTCCGG CAAAAAGTCA	2880
ATGAAAAACC ACTGTACGG ATCACATCAG AGCATGTGAA CGTGTGCTC ACCCGCACTG	2940
AGGACAGGCT AGTGTGGAAA ACCTTGCAGG GCGACCCATG GATTAAGCAG CTCACTAACA	3000
TACCTAAAGG AAACTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGGA AGCTGAACAC AAGGAATAA	3060
TTGCTGCAAT AAACAGCCCC ACTCCCGTG CCAATCCGTT CAGCTGCAAG ACCAAGTTT	3120
GCTGGGGGAA AGCATTGGAA CGATACTAG CCAAGGCCGG TATCGTACTT ACCGGTTGCC	3180
AGTGGAGCGA ACTGTTCCCA CAGTTTGCGG ATGACAAACC ACATTGGGC ATTTACGCCT	3240
TAGACGTAAT TTGCATTAAG TTTTTCGGCA TGGACTTGAC AAGCGGACTG TTTTCTAAAC	3300
AGAGCATCCC ACTAAGGTAC CATCCCGCCG ATTCAGCGAG GCCGGTAGCT CATTEGGACA	3360
ACAGCCAGG AACCGCAAG TATGGGTACG ATCAGCCAT TGCCGCGAA CTCTCCGTA	3420
GATTTCCGGT GTTCCAGCTA GCTGGGAAGG GCACACAACT TGATTTGCAG ACGGGGAGAA	3480
CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTGG TCCCGGTGAA CGCAATCTT CCTCAGCCT	3540
TAGTCCCGA GTACAAGGAG AAGCAACCG GCCCGGTGAA AAAATTCTTG AACCAGTTCA	3600
AACACCACTC AGTACTTGTG GTATCAGAGG AAAAAATTGA AGCTCCCGT AAGAGAATG	3660
AATGGATGC CCGATTGGC ATAGCCGGTG CAGATAAGAA CTACAACCTG GCTTTGGGT	3720
TTCGCGGCA GGCAGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGGAATAAA TACAGAAACC	3780
ACCACTTTCA GCAGTGCGAA GACCATGCGG CGACCTTAAA AACCTTTG CGTTGGGCC	3840
TGAATTGCCT TAACTCAGGA GGCACCTCG TGGTGAAGTC CTATGGCTAC GCGACCGCA	3900
ACAGTGAGGA CGTAGTACC GCTCTTGCCA GAAAGTTTGT CAGGGTGTCT GCAGCGAGAC	3960
CAGATTGTGT CTCAAGCAAT ACAGAAATGT ACCTGATTTT CCGACAATA GACAACAGCC	4020

10

20

30

40

GTACAGGGCA ATTCACCCCG CACCATCTGA ATTGCGTGAT TTCGTCCGTG TATGAGGGTA	4080
CAAGAGATGG AGTTGGAGCC GCGCGTCAT ACGCACCAA AAGGGAGAAT ATTGCTGACT	4140
GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AAGGCAGCCA ATCGCTGGG TAGACCAGGC GAAGGAGTCT	4200
GCGTGCCAT CTATAAAGT TGGCGACCA GTTTTACCGA TTCAGCCAG GAGACAGGCA	4260
CGCAAGAAT GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTGATCCA CGCGGTGGC CCTGATTTCC	4320
GGAAGCACC AGAAGCAGTA GCCTTGAAAT TGCTACAAA CGCCTACCAT GCAGTGGCAG	4380
ACTTAGTAAA TGAACATAAC ATCAAGTCTG TCGCCATTCC ACTGCTATCT ACAGGCATTT	4440
ACGCAGCCGG AAAAGACCGC CTTGAAGTAT CACTTAACTG CTTGACAACC GCGCTAGACA	4500
GAACTGAAGC GGAAGTAACC ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGACG	4560
CGGCACTCCA ACTTAAGGAG TCTGTAACAG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATCGACG	4620
ATGAGTTAGT ATGGATCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGGG AAGAAAGGA TTCAGTACTA	4680
CAAAAGGAAA ATTGTATTGG TACTTCGAAG GCACCAAATT CCATCAAGCA GCAAAAGACA	4740
TGGGGAGAT AAAGGTCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAAG TAATGAACAA CTGTGTGCCT	4800
ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCGGTCGAC CATAACCGT	4860
CGTTTAGCCC GCCCAAAAGC TTGCGTGCC TTTGCATGTA TGCCATGACG CCAGAAAGGG	4920
TCCACAGACT -TAGAAGCAAT AAGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCCTCC ACCCCCCCTC	4980
CTAAGCACA AATTAAGAAT GTTCAGAAGG TTCAGTGAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC	5040
CGCACTCC CGCATTGGT CCGCCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG	5100
CTCCTCTGC ACAGGCGAG GAGGCCCCG AAGTTGTAGC GACACGTCA CCATCTACAG	5160
CTGATAACAC CTGCTTGAT GTCACAGACA TCTCACTGA TATGGATGAC AGTAGCGAAG	5220
GCTCACTTTT TCGAGCTTT AGCGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTTGGT	5280
CGTCAGGACC TAGTTCATA GAGATAGTAG ACGAAGGCA GGTGGTGGTG GCTGACGTTT	5340
ATGCGTCCA AGAGCCTGCC CCTATTCCAC CGCCAAGGCT AAAGAAGATG GCCCGCCTGG	5400

10

20

30

40

CAGGGCAAG AAAAGAGCCC ACTCCACCGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCCACCTCT	5460
CTTTTGGTGG GGTATCCATG TCCTCGGAT CAATTTTGA CCGAGAGACG GCCCGCCAGG	5520
CAGCGGTACA ACCCCTGGCA ACAGGCCCCA CGSATGTGCC TATGTCTTTC GGATCGTTTT	5580
CGAOGGAGA GATTGATGAG CTGAGCCGCA GAGTAACTGA GTCOGAAGCC GTCCTGTTTG	5640
GATCATTTGA ACCGGGCGAA GTGAACTCAA TTATATGTC CCGATCAGCC GTATCTTTTC	5700
CTCTACGAA GCAGAGACGT AGACGCAGGA GCAGGAGGAC TGAATACTGA CTAACCGGGG	5760
TAGGTGGTA CATATTTTCG ACGGACACAG GCCCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCGGTTC	5820
TGCAGAACCA GCTTACAGAA CCGACCTTGG AGCACAATGT CCTGGAAAGA ATTCATGCCC	5880
CGGTGCTGA CAGGTGAAA GAGGAACAAC TCAAATCAG GTACCAGATG ATGCCACCG	5940
AAGCCAACAA AAGTAGGTAC CAGTCTCGTA AAGTAGAAAA TCAGAAAGCC ATAACCACTG	6000
AGOGACTACT GTCAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA	6060
AGATCACTA TCGAAACCA TTGTACTCCA GTAGGTACC GCGAACTAC TCGATCCAC	6120
AGTTOGCTGT AGCTGTCTGT AACAACTATC TGCATGAGAA CTATCGACA GTAGCATCTT	6180
ATCAGATTAC TGAAGGTAC GATGCTTACT TGGATATGGT AGACGGGACA GTCGCCTGCC	6240
TGGATACTGC AACCTTCTGC CCGCTAAGC TTAGAAGTTA CCGAAAAAA CATGAGTATA	6300
GAGCCCGAA TATCGCAGT GCGTTCCAT CAGGATGCA GAACAGCTA CAAAATGTGC	6360
TCATTGCCG AACTAAAAGA AATTGCAACG TCAGCAGAT GGTGAACTG CCAACACTGG	6420
ACTCAGGAC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAAATATGC ATGTAATGAC GAGTATTGGG	6480
AGGAGTTGTC TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT TGTCACGCA TATGTAGCTA	6540
GACTGAAAGG CCCTAAGGCC GCGCACTAT TTGCAAAGAC GTATAATTG GTCCATTGC	6600
AAGAAGTGC TATGGATAGA TTGTCATGG ACATGAAAG AGAGTGAAA GTTACACCAG	6660
GCACGAAACA CACAGAAGAA AGACGAAAG TACAAGTAT ACAAGCCGCA GAACCCCTGG	6720

10

20

30

40

CGACTGCTTA CTTATGCGGG ATTCACCGGG AATTAGTGCG TAGGCTTACG GCCGTCTTGC 6780
 TTCCAAACAT TCACAAGCTT TTTGACATGT CGGCGGAGGA TTTTGATGCA ATCATAGCAG 6840
 AACACTTCAA GCAAGGCGAC CCGGTACTGG AGACGGATAT CGCATCATTC GACAAAAGCC 6900
 AAGACGACGC TATGGCGTTA ACOGGTCTGA TGATCTTGA GGACCTGGGT GTGGATCAAC 6960
 CACTACTCGA CTGATCGAG TGGCCCTTTG GAGAAATATC ATCCACCCAT CTACCTAAGG 7020
 GTACTGTTT TAAATTGCGG GCGATGATGA AATCOGGAAT GTTCCTCACA CTTTTTGTCA 7080
 ACACAGTTTT GAATGTCGT ATCGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGCGGCTT AAAACGTCCA 7140
 GATGTGCAGC GTTCATTGGC GACGACAACA TCATACATGG AGTAGTATCT GACAAAGAAA 7200
 TGGCTGAGAG GTGCGCCACC TGGCTCAACA TGGAGGTTAA GATCATCGAC GCAGTCATCG 7260
 GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGGGCGGAT TTATCTTGCA AGATTGCGTT ACTTCCACAG 7320
 CGTGCGCGT GCGGATCCC CTGAAAAGGC TGTTTAAGTT GGGTAAACCG CTCCAGCCG 7380
 ACGACGAGCA AGACGAAGAC AGAAGACGCG CTCTGCTAGA TGAAACAAAG GCGTGGTTTA 7440
 GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCAGTGG CGTGACGAC CCGSTATGAG GTAGACAATA 7500
 TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAACTT TTGCCAGAG CAAAAGAGCA TTCCAAGCCA 7560
 TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTAAGGTG GTCCTAAATA GTCAGCATAG TTCATTTTCA 7620
 CTGACTAATA CTACAACACC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTCGGCCGCC 7680
 GCCCCTTCCC GGGCCCCACT GCCATGTGGA GCGCGGGAG AAGGAGGCAG GCGGCCCGA 7740
 TGCTTGCCCG CAACGGGCTG GCTTCTCAA TCCAGCAACT GACCACAGCC GTCAGTGCCC 7800
 TAGTCATTGG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCATGTCC ACGCCCGCCA CCGCGCCAGA 7860
 AGAAGCAGGC GCCAAGCAA CCACCGAAGC CGAAGAAACC AAAAAGCAG GAGAAGAAGA 7920
 AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCGGAA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGAGG 7980
 CCGACAGATT GTTCGACGTC 8000

(2) 配列番号102の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：8000塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号102：

10

20

30

40

50

ATTGACGGGG TAGTACACAC TATTGAATCA AACAGCCGAC CAATTGCACT ACCATCACAA	60
TGGAGAAGCC AGTAGTAAAC GTAGACGTAG ACCCCCAGAG TCCGTTTGTC GTGCAACTGC	120
AAAAAAGCTT CCGCAATTT GAGGTAGTAG CACAGCAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA	180
ATGCCAGAGC ATTTTCGCAT CTGSCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CCTACCACAG	240
CGACGATCTT GSACATAGGC AGGCGACCGG CTGCTAGAAT GTTTTCGAG CACCAGTATC	300
ATTGTGTCTG CCCCATGGT AGTCCAGAAG ACCCGGACCG CATGATGAAA TACGCCAGTA	360
AACTGGCGGA AAAAGGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT GCATGAGAAG ATTAAGGATC	420
TCCGGACCGT ACTTGATAAG CCGGATGCTG AAACACCATC GCTCTGCTTT CACAACGATG	480
TTACCTGCAA CATGGGTGCC GAATATTCG TCATGCAGGA CGTGTATATC AACGCTCCCG	540
GAACATCTA TCATCAGGCT ATGAAAGGCG TCGGACCCCT GACTGGATT GGCTTCGACA	600
CCACCCAGTT CATGTTCTCG GCTATGGCAG GTTCGTACCC TGCTACAAC ACCAACTGGG	660
CCGACGAGAA AGTCCTTGAA GCGGTAAACA TCGGACTTTG CAGCACAAAG CTGAGTGAAG	720
GTAGGACAGG AAAATTGTG ATAATGAGGA AGAAGGAGTT GAAGCCCGGG TCGGGGTTT	780
ATTTCTCGT AGGATCGACA CTTTATCCAG AACACAGAGC CAGCTTGCAG AGCTGGCATC	840
TTCCATCGT GTTCCACTTG AATGGAAAGC AGTCGTACAC TTGCGCTGT GATACAGTGG	900
TGAGTTGGA AGGCTACGTA GTGAAGAAAA TCACCATCAG TCCCGGATC ACGGAGAAAA	960

10

20

30

COGTGGGATA CGCGGTTACA CACAATAGCG AGGGCTTCTT GCTATGCAAA GTTACTGACA	1020
CAGTAAAAGG AGAAGGGSTA TGGTTCCTG TGTGCAGTA CATCCCGGCC ACCATATGCG	1080
ATCAGATGAC TGGTATAATG* GCCACGGATA TATCACCTGA CGATGCACAA AAACCTTCTGG	1140
TTGGGCTCAA CCAGCGAATT GTCATTAACG GTAGGACTAA CAGGAACACC AACACCATGC	1200
AAAATTACCT TCTGCCGATC ATAGCACAAAG GGTTCAGCAA ATGGGCTAAG GAGCGCAAGG	1260
ATGATCTTGA TAACGAGAAA ATGCTGGGTA CTAGAGAACG CAAGCTTAAG TATGGCTGCT	1320
TGTGGGCGTT TCGCACTAAG AAAGTACATT CGTTTTATCG CCCACCTGGA ACGCAGACCT	1380
GCGTAAAAGT CCCAGCCTCT TTTAGCGCTT TTCCCATGTC GTCCGTATGG ACGACCTCTT	1440
TGCCCATGTC GCTGAGGCAG AAATTGAAAC TGGCATTGCA ACCAAAGAAG GAGGAAAAAC	1500
TGCTGCAGGT CTCGGAGGAA TTAGTCATGG AGGCCAAGGC TGCTTTTGAG GATGCTCAGG	1560
AGGAAGCCAG AGCGGAGAAG CTCGAGAAG CACTTCCACC ATTAGTGGCA GACAAAGGCA	1620
TCGAGGCAGC CGCAGAAGTT GTCTGCGAAG TGGAGGGGCT CCAGGCGGAC ATCGGAGCAG	1680
CATTAGTTGA AACCCCGGCG GGTCACGTAA GGATAATACC TCAAGCAAAT GACCGTATGA	1740
TCGGACAGTA TATGTTTGTC TGCCAAACT CTGTGCTGAA GAATGCCAAA CTGCGACCAG	1800
CGCACCGGCT AGCAGATCAG GTTAAGATCA TAACACACTC CGGAAGATCA GGAAGGTAAG	1860
CGGTGAACC ATACGAGCT AAAGTACTGA TGCCAGCAGG AGGTGCCGTA CCATGGCCAG	1920
AATTCCTAGC ACTGAGTGAG AGCGCCACGT TAGTGTACAA CGAAAGAGAG TTTGTGAACC	1980
GCAAACATA CCACATTGCC ATGCATGGCC CGGCCAAGAA TACAGAAGAG GAGCAGTACA	2040
AGGTTACAAA GGCAGAGCTT GCAGAAACAG AGTAAGTGTT TGACGTGGAC AAGAAGCGTT	2100
GCGTTAAGAA GGAAGAAGCC TCAGGTCTGG TCCTCTGGG AGAACTGACC AACCTCCCT	2160
ATCATGAGCT AGCTCTGGAG GGAAGTGAAGA CCGACCTGC GGTCCGTAC AAGGTGAAA	2220
CAATAGGAGT GATAGGCACA CCGGGGTGG GCAAGTCAGC TATTATCAAG TCAACTGTCA	2280
CGGCAGAGA TCTTGTTACC AGCGGAAAGA AAGAAAATTG TCGCGAAATT GAGGCGAGC	2340

10

20

30

40

TGCTAAGACT GAGGGGTATG CAGATTACGT CGAAGACAGT AGATTGGTT ATGCTCAAG	2400
GATGCCACAA AGCGTAGAA GTGCTGTAGC TTGAAGAAAGC GTTCGGTGC CAGCAGGAG	2460
CACTACTTGC CTTGATTGCT ATGTGAGGC CCGCAAGAA GGAGTACTA TCGGAGACC	2520
CCATGCAATG CGGATTCTC AACATGATGC AACTAAAGT ACATTTCAT CACCTGAAA	2580
AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCG GCGTGCACA CAGCCAGTTA	2640
CAGCTATTGT ATGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACCAGAAC CGTGCAAGA	2700
AGAACATTGA AATGATATT ACAGGGGCCA CAAAGCGAA GCCAGGGAT ATCATCCTGA	2760
CATGTTTCG CGGTGGTT AAGCAATTGC AAATGACTA TCCGGACAT GAAGTAATGA	2820
CAGCCGGGC CTCACAAGG CTAACCAGAA AAGAGTGTA TGCGTCGG CAAAAAGTCA	2880
ATGAAAACC ACTGTACGG ATCACATCAG AGCATGTGAA CGTGTGCTC ACCCGCACTG	2940
AGGACAGGCT AGTGTGAAA ACCTTGACG GAGACCATG GATTAAGCAG CCCACTAACA	3000
TACCTAAAG AACTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGA AGCTGAACAC AAGGAATAA	3060
TTGCTGCAAT AACAGCCCC ACTCCCGTG CCAATCGTT CAGCTGCAAG ACCAAGTTT	3120
GCTGGGCGAA AGCATTGGAA CGATACTAG CCACGGCGG TATCGTACTT ACCGGTTGCC	3180
AGTGGAGGA ACTGTTCCA CAGTTTGGG ATGACAAACC ACATTGGCC ATTTAGCCT	3240
TAGACGTAAT TTGCATTAAG TTTTTCGGC TGGACTTGAC AAGGGACTG TTTTCTAAC	3300
AGAGCATCC ACTAAGTAC CATCCCGCG ATTCAGCGAG GCGGTAGCT CATTGGGACA	3360
ACAGCCAGG AACCGCAAG TATGGGTAC ATCAGCCAT TGCGCGAA CTCTCCGTA	3420
GATTTCCGT GTTCAGCTA GCTGGGAAG GCACACAACT TGATTTGCAG ACGGGAGAA	3480
CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTGG TCCGGTGAA CCGCAATCTT CCTCAGCCT	3540
TAGTCCCGA GTACAAGGAG AAGCAACCG GCCCGTCAA AAAATTCTG AACCAGTTCA	3600
AACACCACTC AGTACTTGTG GTATCAGAGG AAAAAATTGA AGCTCCCGT AAGAGAATCG	3660

10

20

30

40

AATGGATGGC CCGATTGGC ATAGCCGGTG CAGATAAGAA CTACAACCTG GCTTTGGGGT	3720
TTCGCGCGCA GGCACGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGGAACTAAA TACAGAAACC	3780
ACCACTTTCA GCAGTGCGAA GACCATGCGG CGACCTTAAA AACCTTTTG CGTTGGGCCC	3840
TGAATTGCCT TAACCCAGGA GGCACCCCTG TGGTGAAGTC CTATGGCTAC GCGACCGCA	3900
ACAGTGAGGA CGTAGTCACC GCTCTTGCCA GAAAGTTTGT CAGGGTGTCT GCAGCGAGAC	3960
CAGATTGTGT CTCAAGCAAT ACAGAAATGT ACCTGATTTT CCGACAATA GACAACAGCC	4020
GTACACGGCA ATTCACCCCG CACCATCTGA ATTGCGTGAT TTGTCGGTG TATGAGGGTA	4080
CAAGAGATGG AGTTGGAGCC GCGCGTCAT ACGCACCAA AAGGAGAAT ATTGCTGACT	4140
GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AAGCAGCCA ATCOGCTGGG TAGACCAGG GAAGGAGTCT	4200
GCCGTGCCAT CTATAAACGT TGGCGACCA GTTTTACCGA TTCAGCCAGG GAGACAGGCA	4260
CCGCAAGAAT GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTGATCCA CGCGTCGGC CCTGATTTC	4320
GGAAGCACC AGAAGCAGAA GCCTTGAAAT TGCTACAAA CGCCTACCAT GCAGTGGCAG	4380
ACTTAGTAAA TGAACATAAC ATCAAGTCTG TGCCATTCC ACTGCTATCT ACAGGCATTT	4440
ACGCAGCCGG AAAAGACGC CTTGAAGTAT CACTTAACTG CTTGACAACC GCGCTAGACA	4500
GAACTGACGC GGACGTAACC ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGACG	4560
CGGCACTCCA ACTTAAGGAG TCTGTAACAG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATCGACG	4620
ATGAGTTAGT ATGGATCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGGG AAGAAAGGGA TTCAGTACTA	4680
CAAAAGGAAA ATTGTATTGG TACTTGAAG GCACCAAATT CCATCAAGCA GCAAAAGACA	4740
TGGCGGAGAT AAAGTCTCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAAG TAATGAACAA CTGTGTGCCT	4800
ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCGGTGAC CATAACCGT	4860
CGTCTAGCCC GCCCAAAAG TTGCGTGCC TTTGCATGTA TGCCATGACG CCAGAAAGGG	4920
TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCCTCC ACCCCCCTTC	4980
CTAAGCACA AATTAAGAAT GTTCAGAAGG TTCAGTGAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC	5040

10

20

30

40

CGCACACTCC CGCATTGGTT CCGGCCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG	5100
CTCCTCCTGC ACAGGCCGAG GAGGCCCGG AAGTTGTAGC GACACCGTCA CCATCTACAG	5160
CTGATAACAC CTGGCTTGAT GTCACAGACA TCTCACTGSA TATGGATGAC AGTAGCGAAG	5220
GCTCACTTTT TTGAGCTTT AGGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTTGGT	5280
CGTCAGGACC TAGTTCACTA GAGATAGTAG ACCGAAGGCA GGTGGTGGTG GCTGAAGTTC	5340
ATGCGGTCCA AGAGCCTGCC CCTATTCCAC CGCCAAGGCT AAAGAAGATG GCCCGCCTGG	5400
CAGCGCAAG AAAAGAGCCC ACTCCACGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCCACCTCT	5460
CTTTTGGTGG GGTATCCATG TCCCTCGSAT CAATTTTGA CGGAGAGAGG GCCCGCCAGG	5520
CAGGGTACA ACCCCTGGCA ACAGGCCCA CGGATGTGCC TATGTCTTTC GGATCGTTTT	5580
CGACGGAGA GATTGATGAG CTGAGCGCA GAGTAACTGA GTCGAAACC GTCTGTTTG	5640
GATCATTGA ACGGGCGAA GTGAACTCAA TTATATCGTC CCGATCAGCC GTATCTTTTC	5700
CACTACGCAA GCAGAGAGT AGAGCAGGA GCAGGAGSAC TGAATACTGA CTAACGGGG	5760
TAGGTGGTA CATATTTTGG AGGACACAG GCCCTGGCA CTTGCAAAAG AAGTCGGTTC	5820
TGCAGACCA GCTTACAGAA CGACCTTGG AGGCAATGT CCTGSAAGA ATTATGCCC	5880
CGGTGCTGA CAGTGGAAA GAGGAACAAC TCAAACCTAG GTACCAGATG ATGCCACCG	5940
AAGCCAACA AAGTAGGTAC CAGTCTGTA AAGTAGAAAA TCAGAAAGCC ATAACCACTG	6000
AGCGACTACT GTCAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA	6060
AGATCACCTA TCGAAACCA TTGTACTCCA GTAGGTACC GCGAACTAC TCGATCCAC	6120
AGTTGGCTGT AGCTGTCTGT AACAACTATC TGCATGAGAA CTATCGACA GTAGCATCTT	6180
ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGGT AGACGGGACA GTGGCCTGCC	6240
TGGATACTGC AACCTTCTGC CCGCTAAGC TTAGAAGTTA CCGAAAAAA CATGAGTATA	6300
GAGCCCGAA TATCGCAGT GGGTTCCAT CAGCGATGCA GAACAGCTA CAAAATGTGC	6360

10

20

30

40

TCATTGCGC AACTAAAAGA AATTGCAACG TCACGCAGAT GCGTGAAGT CCAACACTGG	6420
ACTCAGCGAC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAAATATGC ATGTAATGAC GAGTATTGGG	6480
AGGAGTTGCG TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT TGTACCGCA TATGTAGCTA	6540
GACTGAAAGG CCCTAAGGCC GCGGCACTAT TTGCAAAGAC GTATAATTG GTCCCATTCG	6600
AAGAAGTGCC TATGGATAGA TTGTCATGG ACATGAAAAG AGACGTGAAA GTTACACCAG	6660
GCACGAAACA CACAGAAGAA AGACGAAAG TACAAGTGAT ACAAGCGCA GAACCCCTGG	6720
CGACTGCTTA CTTATGCGGG ATTCACCGGG AATTAGTGCG TAGGCTTAGG GCGTCTTGC	6780
TTCCAAACAT TCACACGCTT TTTGACATGT CGGCGGAGGA TTTTGATGCA ATCATAGCAG	6840
AACACTTCAA GCAAGGCGAC CCGGTACTGG AGACGGATAT CGCATCATTC GACAAAAGCC	6900
AAGACGAGC TATGGCGTTA ACGGTCTGA TGATCTTGA GGACCTGGT GTGGATCAAC	6960
CACTACTGGA CTTGATCGAG TCGCCTTTG GAGAAATATC ATCCACCAT CTACCTACGG	7020
GTACTGTTT TAAATTGGG GCGATGATGA AATCGGAAT GTTCCTCACA CTTTTGTCA	7080
ACACAGTTTT GAATGTGTT ATGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGCGGCTT AAAACGTCCA	7140
GATGTGCAGC GTTCATTGGC GACGACAACA TCATACATGG AGTAGTATCT GACAAAGAAA	7200
TGGCTGAGAG GTGCGCCACC TGGCTCAACA TGGAGGTAA GATCATGAC GCAGTCATCG	7260
GTGAGAGACC-ACCTTACTTC TCGGGGGAT TTATCTTGCA AGATTGCGT ACTTCCACAG	7320
CGTGCCGGT GCGGATCCC CTGAAAAGGC TGTTTAAGTT GGTAAACCG CTCCAGCCG	7380
ACGACGAGCA AGACGAAGAC AGAAGACGG CTCTGCTAGA TGAAACAAG GCGTGGTTTA	7440
GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCAGTGG CGTGACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA	7500
TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAACTT TTGCCAGAG CAAAAGAGCA TTCCAAGCCA	7560
TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTACGGTG GTCCTAAATA GTCAGCATAG TACATTTAT	7620
CTGACTAATA CTACAACACC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTGGCGGCC	7680
GCCCCCTCCC GGCCCCACT GCCATGTGGA GGCGCGGAG AAGGAGGCAG GCGCCCCGA	7740

10

20

30

40

TGCCTGCCCG CAACGGGCTG GCTTCTCAAA TCCAGCAACT GACCACAGCC GTCAGTGCCC	7800
TAGTCATTGG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCCACGTCC AGCCCGCCA CCGCGCCAGA	7860
AGAAGCAGGC GCCCAAGCAA CCACCGAAGC CGAAGAAACC AAAACGCAG GAGAAGAAGA	7920
AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCCGSA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG	7980
CEGACAGATT GTTCGACGTC	8000

10

(2) 配列番号103の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 11740塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号103:

ATTGACGGCG TAGTACACAC TATTGAATCA AACAGCGAC CAATTGCACT ACCATCACA	60
TGGAGAAGCC AGTAGTAAC GTAGACGTAG ACCCCCAGAG TCGTTTGTC GTGCAACTGC	120
AAAAAGCTT CCGCAATTT GAGGTAGTAG CACAGCAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA	180
ATGCCAGAGC ATTTTCGCAT CTGGCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CCTACCACAG	240
CGACGATCTT GGACATAGGC AGCGACCCG CTGTAGAAT GTTTTCGAG CACCAGTATC	300
ATTGTGTCTG CCCCATGCGT AGTCCAGAAG ACCCGGACCG CATGATGAAA TAGGCCAGTA	360
AACTGGGCGA AAAAGCGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT GCATGAGAAG ATTAAGGATC	420
TCCGGACCGT ACTTGATAAG CCGGATGCTG AAACACCATC GCTCTGCTTT CACAACGATG	480
TTACCTGCAA CATGGTGCC GAATATTCCG TCATGCAGGA CGTGTATATC AACGCTCCCG	540
GAACATCTA TCATCAGGCT ATGAAAGGCG TGGCGACCTT GTACTGGATT GGCTTCGACA	600

20

30

CCACCCAGTT CATGTTCTCG GCTATGGCAG GTTGTACCC TGGTACAAC ACCAACTGGG	660
CCGACGAGAA AGTCCTTGAA GCGCGTAACA TGGGACTTTG CAGCACAAAG CTGAGTGAAG	720
GTAGGACAGG AAAATTGTCTG ATAATGAGGA AGAAGGAGTT GAAGCCCGGG TCGCGGGTTT	780
ATTTCTCGT AGGATCGACA CTTTATCCAG AACACAGAGC CAGCTTGACAG AGCTGGCATC	840
TTCCATCGGT GTTCCACTTG AATGGAAAGC AGTGTACAC TTGCGGCTGT GATACAGTGG	900
TGAGTTGCGA AGGCTACGTA GTGAAGAAAA TCACCATCAG TCCCGGGATC ACGGGAGAAA	960
CGTGGGATA CGCGTTTACA CACAATAGCG AGGGCTTCTT GCTATGCAA GTTACTGACA	1020
CAGTAAAGG AGAAGGGTA TCGTTCCCTG TGTGCACGTA CATCCCGGCC ACCATATGCG	1080
ATCAGATGAC TGGTATAATG GCCACGGATA TATCACTGA CGATGCACAA AAACCTCTGG	1140
TTGGGCTCAA CCAGCGAATT GTCATTAACG GTAGGACTAA CAGGAACACC AACACCATGC	1200
AAAATTACCT TCTGCGATC ATAGCACAAG GGTTCAGCAA ATGGGCTAAG GAGCGCAAGG	1260
ATGATCTTGA TAACGAGAAA ATGCTGGGTA CTAGAGAAAG CAAGCTTACG TATGGCTGCT	1320
TGTGGGGGTT TCGCACTAAG AAAGTACATT CGTTTTATCG CCCAGCTGGA ACGCAGACCT	1380
GCGTAAAGT CCCAGCCTCT TTTAGCGCTT TTCCCATGTC GTCGTATGG ACGACCTCTT	1440
TGCCCATGTC GCTGAGGCAG AAATTGAAAC TGGCATTGCA ACCAAGAAG GAGGAAAAAC	1500
TGCTGCAGGT CTGCGAGGAA TTAGTCATGG AGGCCAAGGC TGCTTTTGAG GATGCTCAGG	1560
AGGAAGCCAG AGCGGAGAAG CTCGAGAAG CACTTCCACC ATTAGTGGCA GACAAAGGCA	1620
TGAGGCAGC CGCAGAAGTT GTCTGCGAAG TGGAGGGGCT CCAGGCGAC ATCGGAGCAG	1680
CATTAGTTGA AACCCGGGCG GGTCAAGTAA GGATAATACC TCAAGCAAAT GACCGTATGA	1740
TGGACAGTA TATCGTTGTC TCGCCAAACT CTGTGCTGAA GAATGCCAAA CTGCGACCAG	1800
CGCACCCTCT AGCAGATCAG GTTAAGATCA TAACACACTC CGGAAGATCA GGAAGGTACG	1860
CGGTGAACC ATACGACGCT AAAGTACTGA TGCCAGCAGG AGGTGCGTA CCATGGCCAG	1920
AATTCCTAGC ACTGAGTGAG AGCGCCACGT TAGTGTACAA CGAAAGAGAG TTTGTGAACC	1980

10

20

30

40

GCAAACTATA CCACATTGCC ATGCATGGCC CCGCCAAGAA TACAGAAGAG GAGCAGTACA	2040
AGGTTACAAA GGCAGAGCTT GCAGAAACAG AGTAAGTGTG TGAAGTGGAC AAGAAGCGTT	2100
GCGTTAAGAA GGAAGAAGCC TCAGGTCTGG TCCTCTGGG AGAACTGACC AACCTCCCT	2160
ATCATGAGCT AGCTCTGGAG GGAAGTGAAGA CCGACCTGC GGTCCCGTAC AAGGTGAAA	2220
CAATAGGAGT GATAGGCACA CCGGGGTGG GCAAGTCAGC TATTATCAAG TCAACTGTCA	2280
CGGCAAGAGA TCTTGTACC AGGGGAAAGA AAGAAAATTG TGGGAAATT GAGGCGAGC	2340
TGCTAAGACT GAGGGTATG CAGATTACGT CGAAGACAGT AGATTGGTT ATGCTCAAG	2400
GATGCCACAA AGCGTAGAA GTGCTGTACG TTGAAGAAGC GTTCGGTGC CAGCAGGAG	2460
CACTACTTGC CTGATTGCT ATGTCAGGC CCGCAAGAA GGTAGTACTA TGGGAGACC	2520
CCATGCAATG CGGATTCTC AACATGATGC AACTAAAGT ACATTTCAT CACCTGAAA	2580
AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCG GGGTTGCACA CAGCAGTTA	2640
CAGCTATTGT ATGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACCACGAAC CCGTCAAGA	2700
AGAACATTGA AATGATATT ACAGGGGCCA CAAAGCCGAA GCCAGGGAT ATCATCCTGA	2760
CATGTTTCCG CCGGTGGTT AAGCAATTGC AAATGACTA TCCCGGACAT GAAGTAATGA	2820
CAGCGGGGC CTCACAAGG CTAACCAGAA AAGSAGTGA TGGCGTCCG CAAAAGTCA	2880
ATGAAAACCC ACTGTACGG ATCAGATCAG AGCATGTGA CTTGTTGCTC ACCCGACTG	2940
AGGACAGGCT AGTGTGAAA ACCTTGAGG GCGACCATG GATTAAGCAG CCACTAACA	3000
TACCTAAAGG AAACTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGG AGCTGAACAC AAGGAATAA	3060
TTGCTGCAAT AAACAGCCC ACTCCCGTG CCAATCGTT CAGCTGCAAG ACCAAGTTT	3120
GCTGGGCGAA AGCATTGGAA CCGATACTAG CCACGGCGG TATGTTACTT ACCGGTTGC	3180
AGTGAGOGA ACTGTTCCA CAGTTTGCG ATGACAAACC ACATTGGCC ATTTAGGCT	3240
TAGAGTAAT TTGATTAAG TTTTTCGGC TGGACTTGAC AAGGGACTG TTTTCTAAAC	3300

10

20

30

40

AGAGCATCCC ACTAAGTAC CATCCCGCG ATTCAAGCGAG GCGGTAGCT CATTGGGACA	3360
ACAGCCCAGG AACCGCAAG TATGGGTACG ATCAAGCCAT TGCGCCGAA CTCTCCGTA	3420
GATTTCCGGT GTTCCAGCTA GCTGGGAAGG GCACACAAC TGAATTTGCAG ACGGGGAGAA	3480
CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTGG TCCCGGTGAA CCGCAATCTT CCTCAGGCT	3540
TAGTCCCGA GTACAAGGAG AAGCAACCG GCCCGGTCAA AAAATTCTTG AACAGTTCA	3600
AACACCACTC AGTACTTGTG GTATCAGAGG AAAAAATTGA AGCTCCCGT AAGAGAATCG	3660
AATGGATGC CCGATTGGC ATAGCCGGTG CAGATAAGAA CTACAACCTG GCTTTGGGT	3720
TTCGCGCA GGCACGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGGAACTAAA TACAGAAACC	3780
ACCACTTTCA GCAGTGGAA GACCATGCGG CGACCTTAAA AACCTTTTG CGTTGGGCC	3840
TGAATTGCT TAACCCAGGA GGCACCTCG TGGTGAAGTC CTATGGCTAC GCGACGCA	3900
ACAGTGAGGA CGTAGTACC GCTCTTGCCA GAAAGTTTGT CAGGTGTCT GCAGGAGAC	3960
CAGATTGTGT CTCAAGCAAT ACAGAAATGT ACCTGATTTT CGACAACTA GACAACAGCC	4020
GTACAAGGCA ATTCACCCG CACCATCTGA ATTGGTGAT TTGGTCCGTG TATGAGGGTA	4080
CAAGAGATGG AGTTGGAGCC GCGCGTCAT ACCGCACCA AAGGGAGAAT ATTGCTGACT	4140
GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AACGCAGCCA ATCCGCTGGG TAGACCAGGC GAAGGAGTCT	4200
GCGTGCCAT -CTATAAACGT TGGCGACCA GTTTTACGA TTCAGCCAG GAGACAGCA	4260
CGCAAGAAT GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTGATCCA CGGGTGGC CCTGATTTC	4320
GGAAGCACC AGAAGCAGAA GCCTTGAAT TGCTACAAA CGCTACCAT GCAGTGGCAG	4380
ACTTAGTAAA TGAACATAAC ATCAAGTCTG TGCCATTCC ACTGCTATCT ACAGGCATTT	4440
ACGCAGCCG AAAAGACCG CTGAAGTAT CACTTAACTG CTTGACAACC GCGTAGACA	4500
GAAGTACGC GGACGTAACC ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGACG	4560
CGGCACTCCA ACTTAAGGAG TCTGTAACAG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATOGAG	4620
ATGAGTTAGT ATGATCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGG AAGAAAGGA TTCAGTACTA	4680

10

20

30

40

CAAAAGGAAA ATTGTATTCG TACTTCGAAG GCACCAAATT CCATCAAGCA GCAAAAGACA	4740
TGGCGGAGAT AAAGGTCCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAAG TAATGAACAA CTGTGTGCCT	4800
ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCGGGTCGAC CATAACCCGT	4860
CGTCTAGCCC GCGCAAAACG TTGCGGTGCC TTTGCATGTA TGCCATGACG CCAGAAAGGG	4920
TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCCTCC ACCCCCCTTC	4980
CTAAGCACAA AATTAAGAAT GTTCAGAAGG TTCAGTGAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC	5040
CGCACACTCC CGCATTCGTT CCGGCCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG	5100
CTCCTCCTGC ACAGGCGAG GAGGCCCGG AAGTTGTAGC GACACGTCA CCATCTACAG	5160
CTGATAACAC CTGCTTGAT GTCACAGACA TCTCACTGGA TATGGATGAC AGTAGCGAAG	5220
GCTCACTTTT TTCGAGCTTT AGCGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTTGGT	5280
CGTCAGGACC TAGTTCATA GAGATAGTAG ACCGAAGGCA GGTGGTGGTG GCTGAGTTC	5340
ATGCGGTCCA AGAGCCTGCC CCTATTCCAC CGCCAAGGCT AAAGAAGATG GCGCGCCTGG	5400
CAGCGGCAAG AAAAGAGCCC ACTCCACGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCCACCTCT	5460
CTTTTGGTGG GGTATCCATG TCCCTGGAT CAATTTTCGA CGGAGAGACG GCGCGCAGG	5520
CAGCGGTACA ACCCCTGGCA ACAGGCCCA CGGATGTGCC TATGTCTTTC GGATCGTTTT	5580
CCGACGGAGA GATTGATGAG CTGAGCCGCA GAGTAACTGA GTCGAACCC GTCCTGTTTG	5640
GATCATTTGA ACCGGGGGAA GTGAACTCAA TTATATCGTC CGATCAGCC GTATCTTTTC	5700
CACTACGCAA GCAGAGACGT AGAGCAGGA GCAGGAGGAC TGAATACTGA CTAACCGGGG	5760
TAGGTGGSTA CATATTTTGG ACGGACACAG GCGCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCGGTTC	5820
TGCAGAACCA GCTTACAGAA CGACCTTGG AGGCAATGT CCTGGAAAGA ATTCATGCCC	5880
CGGTGCTCGA CAGTCGAAA GAGGAACAAC TCAAACCTAG GTACCAGATG ATGCCACCG	5940
AAGCCAACAA AAGTAGGTAC CAGTCTCGTA AAGTAGAAAA TCAGAAAGCC ATAACCACTG	6000

10

20

30

40

AGCGACTACT GTCAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA	6060
AGATCACCTA TCGAAACCA TTGTA CTCCA GTAGOGTACC GCGAACTAC TCGATCCAC	6120
AGTTGCTGT AGCTGTCTGT AACAACTATC TGCATGAGAA CTATCGACA GTAGCATCTT	6180
ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGGT AGACGGGACA GTGCGCTGCC	6240
TGGATACTGC AACCTTCTGC CCGCTAAGC TTAGAAGTTA CCGAAAAAA CATGAGTATA	6300
GAGCCCGAA TATCGCAGT GCGGTTCCAT CAGCGATGCA GAACACGCTA CAAAATGTGC	6360
TCATTGCGC AACTAAAAGA AATTGCAACG TCACGCAGAT GCGTGAAGTG CCAACACTGG	6420
ACTCAGGAC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAAATATGC ATGTAATGAC GAGTATTGGG	6480
AGGAGTTGCG TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT TGTCACCGCA TATGTAGCTA	6540
GACTGAAAGG CCCTAAGGCC GCGCACTAT TTGCAAAGAC GTATAATTTG GTCCATTGC	6600
AAGAAGTGCC TATGGATAGA TTCGTCATGG ACATGAAAAG AGACGTGAAA GTTACACCAG	6660
GCAAGAAACA CACAGAAGAA AGACGAAAAG TACAAGTGAT ACAAGCGCA GAACCCCTGG	6720
CGACTGCTTA CTTATGCGGG ATTCACGGG AATTAGTGCG TAGGCTTACG GCGTCTTGC	6780
TTCCAAACAT TCACAGCTT TTTGACATGT CGGCGGAGGA TTTTGATGCA ATCATAGCAG	6840
AACACTTCAA GCAAGGCGAC CCGTACTGG AGACGGATAT CGCATCATTC GACAAAAGCC	6900
AAGACGAGC TATGGGTTA ACCGGTCTGA TGATCTTGA GACCTGGGT GTGGATCAAC	6960
CACTACTGTA CTTGATGAG TCGGCTTTG GAGAAATATC ATCCACCAT CTACCTAGG	7020
GTACTGTTT TAAATTGCG GCGATGATGA AATCCGAAT GTTCTCACA CTTTTGTCA	7080
ACACAGTTT GAATGTGTT ATGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGGGCTT AAAAGTCCA	7140
GATGTGCAGC GTTCATTGGC GACGACAACA TCATACATGG AGTAGTATCT GACAAAGAAA	7200
TGGCTGAGAG GTGCGCCACC TGGCTCAACA TGGAGGTAA GATCATCGAC GCAGTCATCG	7260
GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGGGGGGAT TTATCTTGCA AGATTGGTT ACTTCCACAG	7320
CGTGCGGCT GCGGATCCC CTGAAAAGC TGTTTAAGTT GGGTAAACG CTCCAGCG	7380

10

20

30

40

ACGACGAGCA AGACGAAGAC AGAAGACGCG CTCTGCTAGA TGAAACAAAG GCGTGGTTTA	7440
GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCAGTGG CCGTGACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA	7500
TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAACTT TTGCCAGAG CAAAAGAGCA TTCCAAGCCA	7560
TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTACGGTG GTCCTAAATA GTCAGCATAG TACATTTTAT	7620
CTGACTAATA CTACAACACC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTCGGCCGCC	7680
GCCCCTTCCC GGGCCCCACT GCCATGTGGA GGCOCGGAG AAGGAGGCAG GCGGCCCGA	7740
TGCCTGCCCG CAACGGGCTG GCTTCTCAA TCCAGCAACT GACCACAGCC GTCAGTGCCC	7800
TAGTCATTGG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCCAGTCC ACGCCCGCCA CCGGCCAGA	7860
AGAAGCAGGC GCCCAAGCAA CCACCGAAGC CGAAGAAACC AAAAAGCAG GAGAAGAAGA	7920
AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCCGAA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG	7980
CGACAGATT GTTCAGCTC AAGAAGAGG ACGGAGATGT CATCGGCAC GCACTGGCCA	8040
TGGAAGGAAA GGTAAATGAAA CCTCTGCACG TGAAAGSAAC CATGACCAC CCTGTGCTAT	8100
CAAAGCTCAA ATTTACCAAG TCGTCAGCAT ACGACATGGA GTTCGCACAG TTGCCAGTCA	8160
ACATGAGAAG TGAGGCATTG ACCTACACCA GTGAACACCC CGAAGGATTG TATAACTGGC	8220
ACCACGAGC GGTGCAGTAT AGTGGAGGTA GATTTACCAT CCCTGGCGGA GTAGGAGGCA	8280
GAGGAGACAG CGGTGCTCG ATCATGGATA ACTCCGGTCG GGTGTGCGG ATAGTCCTCG	8340
GTGGGCTGA TGAAGGAACA CGAACTGCCC TTTCGGTCGT CACCTGGAAT AGTAAAGGGA	8400
AGACAATTAA GAGGACCCCG GAAGGACAG AAGAGTGGTC CGCAGCACCA CTGGTCACGG	8460
CAATGTGTTT GCTCGGAAAT GTGAGCTTCC CATGCGACCG CCGGCCACA TGCTATACCC	8520
GCGAACCTTC CAGAGCCCTC GACATCCTTG AAGAGAAAGT GAACCATGAG GCCTACGATA	8580
CCCTGCTCAA TGCCATATTG CCGTGCGGAT CGTCTGGCAG AAGCAAAAGA AGCGTCATTG	8640
ACGACTTTAC CCTGACCAGC CCTACTTGG GCACATGCTC GTACTGCCAC CATACTGTAC	8700

10

20

30

40

CGTGCTTCAG CCCTGTTAAG ATGAGCAGG TCTGGGACGA AGGGACGAT AACACCATAC	8760
GCATACAGAC TTCGCCCAG TTTGGATACG ACCAAAGCGG AGCAGCAAGC GCAAACAAGT	8820
ACCGCTACAT GTGCTTAAG CAGGATCACA CGTTAAAGA AGGCACCATG GATGACATCA	8880
AGATTAGCAC CTCAGGACCG TGTAGAAGGC TTAGCTACAA AGGATACTTT CTCCTGCGAA	8940
AATGCCCTCC AGGGGACAGC GTAACGGTTA GCATAGTGAG TAGCAACTCA GCAACGTCAT	9000
GTACACTGGC CGCAAGATA AAACCAAAAT TCGTGGGACG GGAAAAATAT GATCTACCTC	9060
CGGTTACGG TAAAAAATT CCTTGACAG TGTACGACCG TCTGAAAGAA ACAACTGCAG	9120
GCTACATCAC TATGCACAGG CCGAGACCGC ACGCTTATAC ATCCTACCTG GAAGAATCAT	9180
CAGGGAAAGT TTACGCAAAG CGGCATCTG GGAAGAACAT TAGTATGAG TGCAAGTGCG	9240
GCGACTACAA GACCGGAACC GTTTCGACCC GCACCGAAAT CACTGGTTGC ACCGCCATCA	9300
AGCAGTGCGT CGCTATAAG AGGACCAAA CGAAGTGGGT CTTCAACTCA CCGGACTTGA	9360
TCAGACATGA CGACCACAG GCCCAAGGGA AATTGCATTT GCCTTTCAAG TTGATCCCGA	9420
GTACCTGCAT GGTCCCTGTT GCCCAGCGC CGAATGTAAT ACATGGCTTT AAACACATCA	9480
GCCTCCAATT AGATACAGAC CACTTGACAT TGCTCACCAC CAGGAGACTA GGGGCAAACC	9540
CGGAACCAAC CACTGAATGG ATGTCGGAA AGACGGTCAG AACTTCACC GTCGACCGAG	9600
ATGGCCTGGA ATACATATGG GGAAATCATG AGCCAGTGAG GGTCTATGCC CAAGAGTCAG	9660
CACCAGGAGA CCTCAAGGA TGGCCACAG AAATAGTACA GCATTACTAC CATGCCATC	9720
CTGTGTACAC CATCTTAGCC GTGCGATCAG CTACCGTGGC GATGATGATT GGGTAACTG	9780
TTGCAGTGT ATGTGCTGT AAAGCGGCGC GTGAGTGCCT GACGCCATAC GCCCTGGCCC	9840
CAAACGCGT AATCCCAACT TCGCTGGCAC TCTTGTGCTG CGTTAGGTG GCCAATGCTG	9900
AAACGTTAC CGAGACCATG AGTTACTTGT GGTGSAACAG TCAGCCGTTT TTCTGGGTCC	9960
AGTTGTGCAT ACCTTTGGCC GCTTTCATCG TTCTAATGCG CTGCTGCTCC TGCTGCCTGC	10020
CTTTTTAGT GGTGCGCGC GCCTACCTGG CGAAGSTAGA CGCTACGAA CATGCGACCA	10080

10

20

30

40

CTGTTCCAAA TGTGCCACAG ATACCGTATA AGGCACTTGT TGAAAGGGCA GGGTATGCC 10140
 CGCTCAATTT GGAGATCACT GTCATGTCCT CGGAGGTTTT GCCTTCCACC AACCAAGAGT 10200
 ACATTACCTG CAAATTACAC ACTGTGGTCC CCTCCCCAAA AATCAAATGC TGGGGCTCCT 10260
 TGAATGTCA GCGGGCCGCT CATGCAGACT ATACCTGCAA GGTCTTGGGA GGGGTCTACC 10320
 CCTTTATGTG GGGAGGAGCG CAATGTTTTT GCGACAGTGA GAACAGCCAG ATGAGTGAGG 10380
 CGTACGTGA ATTGTCAGCA GATTGCGCGT CTGACCAAGC GCAGGGGATT AAGGTGCACA 10440
 CTGCCGGGAT GAAAGTAGGA CTGCGTATTG TGTACGGGAA CACTACCAGT TTCCTAGATG 10500
 TGTACGTGAA CGGAGTCACA CCAGGAACGT CTAAAGACTT GAAAGTCATA GCTGGACCAA 10560
 TTTCAGCATC GTTTACGCCA TTAGATCATA AGGTGGTTAT CCATCGCGGC CTGGTGTACA 10620
 ACTATGACTT CCGGAATAT GGAGCGATGA AACCAGGAGC GTTTGGAGAC ATTCAAGCTA 10680
 CCTCCTTGAC TAGCAAGGAT CTCATCGCCA GCACAGACAT TAGGCTACTC AAGCCTTCGG 10740
 CCAAGAAGGT GCATGTCCCG TACAGCAGG CCTCATCAGG ATTTGAGATG TGGAAAAACA 10800
 ACTCAGGCG CGCACTGCAG GAAACCGCAC CTTTCGGGTG TAAGATTGCA GTAAATCGGC 10860
 TCGAGCGGT GGA CTGTTCA TACGGGAACA TTCCATTTC TATTGACATC CCGAAGCTG 10920
 CCTTTATCAG GACATCAGAT GCACCACTGG TCTCAACAGT CAAATGTGAA GTCAGTGAGT 10980
 GCACTTATTC AGCAGACTTC GGGGGGATGG CCACCCCTGCA GTATGTATCC GACCGGAAG 11040
 GTCAATGCC CGTACATTGG CATTGGAGCA CAGCAACTCT CCAAGAGTGG ACAGTACATG 11100
 TCCTGGAGAA AGGAGCGGTG ACAGTACACT TTAGCACCGC GAGTCCACAG GCGAACTTTA 11160
 TCGTATCGCT GTGTGGGAAG AAGACAACAT GCAATGCAGA ATGTAAACCA CCAGCTGACC 11220
 ATATGTGAG CACCCCGCAC AAAAATGACC AAGAATTTCA AGCGGCCATC TCAAAAACAT 11280
 CATGGAGTTG GCTGTTTGCC CTTTTCGGCG GCGCCTGTC GCTATTAATT ATAGGACTTA 11340
 TGATTTTTC TTGCAGCATG ATGCTGACTA GCACACGAAG ATGACCGCTA CGCCCCAATG 11400

10

20

30

40

ATCCGACCAG CAAAACTCGA TGTACTTCCG AGGAACTGAT GTGCATAATG CATCAGGCTG 11460
 GTACATTAGA TCCCGGCTTA CGCGGGGCAA TATAGCAACA CTAAAACTC GATGTACTTC 11520
 CGAGGAAGCG CAGTGCATAA TGCTGCGCAG TGTTGCCACA TAACCACTAT ATTAACCATT 11580
 TATCTAGCGG ACGCCAAAAA CTCAATGTAT TTCTGAGGAA GCGTGGTGCA TAATGCCACG 11640
 CAGCGTCTGC ATAACTTTTA TTATTTCTTT TATTAATCAA CAAAATTTTG TTTTAAACAT 11700
 TTCAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 11740

10

(2) 配列番号104の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：6アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号104：

Ser Ile Leu Gly Ser Arg

1

5

20

(2) 配列番号105の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号105：

GTCGGTTTGT CGTGCAACTG C

21

(2) 配列番号106の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号106：

GTCGGTTTGT CGTGCAACTG A

21

(2) 配列番号107の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号107：

CAATCTTCT-CACGCCTTAG C

21

(2) 配列番号108の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

50

- (D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号108：
CAATCTTCCT CACGCTTAG T 21
- (2) 配列番号109の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：21塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状 10
(xi) 配列：配列番号109：
TCCTAAATAG TCAGCATAGT A 21
- (2) 配列番号110の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：21塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号110： 20
TCCTAAATAG TCAGCATAGT T 21
- (2) 配列番号111の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：34塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号111：
TATATCTCGA GGGTGGTGT GTAGTATTAG TCAG 34 30
- (2) 配列番号112の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：35塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号112：
TATATGATAT CAAAAAGCCT GAACTCACCG CGACG 35
- (2) 配列番号113の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：35塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(xi) 配列：配列番号113：
ATATAGGATC CTCAGTTAGC CTCCCCATC TCCCG 35
- (2) 配列番号114の情報：
(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：120アミノ酸
(B) 型：アミノ酸 50

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号114：

Met Asn Tyr Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Gly Arg Arg Trp Arg Pro
 1 5 10 15

Arg Pro Ala Phe Arg Pro Trp Gln Val Ser Met Gln Pro Thr Pro Thr
 20 25 30

Met Val Thr Pro Met Leu Gln Ala Pro Asp Leu Gln Ala Gln Gln Met
 35 40 45

10

Gln Gln Leu Ile Ser Ala Val Ser Ala Leu Thr Thr Lys Gln Asn Val
 50 55 60

Lys Ala Pro Lys Gly Gln Arg Gln Lys Lys Gln Gln Lys Pro Lys Glu
 65 70 75 80

Lys Lys Glu Asn Gln Lys Lys Lys Pro Thr Gln Lys Lys Lys Gln Gln
 85 90 95

20

Gln Lys Pro Lys Pro Gln Ala Lys Lys Lys Lys Pro Gly Arg Arg Glu
 100 105 110

Arg Met Cys Met Lys Ile Glu Asn
 115 120

(2) 配列番号115の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：103アミノ酸

30

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号115：

Met Asn Tyr Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Gly Arg Arg Trp Arg Pro
 1 5 10 15

Arg Pro Ala Phe Arg Pro Trp Gln Val Ser Met Gln Pro Thr Pro Thr
 20 25 30

Met Val Thr Pro Met Leu Gln Ala Pro Asp Leu Gln Ala Gln Gln Met
 35 40 45

Gln Gln Leu Ile Ser Ala Val Ser Ala Leu Thr Thr Lys Gln Asn Val
 50 55 60

Lys Ala Pro Lys Gly Gln Arg Gln Lys Lys Gln Gln Lys Pro Lys Glu
 65 70 75 80

Lys Lys Glu Asn Gln Lys Lys Lys Pro Thr Leu Lys Arg Arg Glu Arg
 85 90 95

Met Cys Met Lys Ile Glu Asn
 100

(2) 配列番号116の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：88アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号116：

Met Asn Tyr Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Gly Arg Arg Trp Arg Pro
 1 5 10 15

Arg Pro Ala Phe Arg Pro Trp Gln Val Ser Met Gln Pro Thr Pro Thr
 20 25 30

Met Val Thr Pro Met Leu Gln Ala Pro Asp Leu Gln Ala Gln Gln Met
 35 40 45

Gln Gln Leu Ile Ser Ala Val Ser Ala Leu Thr Thr Lys Gln Asn Val
 50 55 60

Lys Ala Pro Lys Gly Gln Arg Gln Lys Lys Gln Leu Lys Arg Arg Glu
 65 70 75 80

Arg Met Cys Met Lys Ile Glu Asn
 85

(2) 配列番号117の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：76アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号117：

Met Asn Tyr Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Gly Arg Arg Trp Arg Pro
1 5 10 15

Arg Pro Ala Phe Arg Pro Trp Gln Val Ser Met Gln Pro Thr Pro Thr
20 25 30

Met Val Thr Pro Met Leu Gln Ala Pro Asp Leu Gln Ala Gln Gln Met
35 40 45

Gln Gln Leu Ile Ser Ala Val Ser Ala Leu Thr Thr Lys Gln Asn Leu
50 55 60

Lys Arg Arg Glu Arg Met Cys Met Lys Ile Glu Asn
65 70 75

(2) 配列番号118の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：38塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号118：

ATATAGGATC CTTCGCATGA TTGAACAAGA TGGATTGC

38

【図1】

シンドビスゲルムの編成および複製のストラテジー

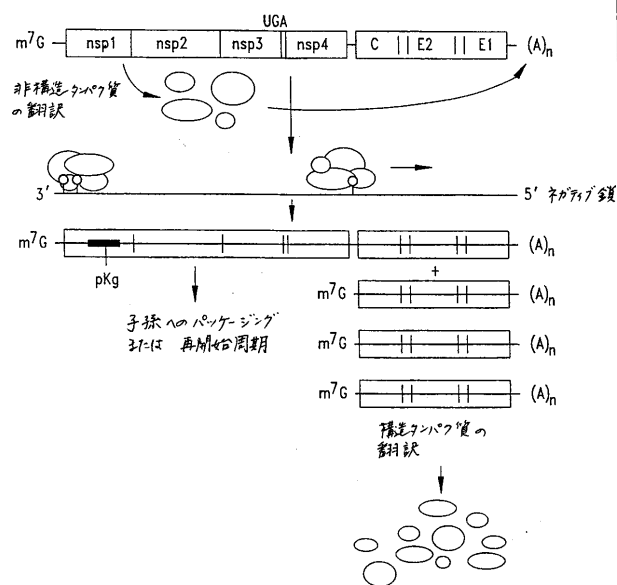


Fig. 1

【図2】

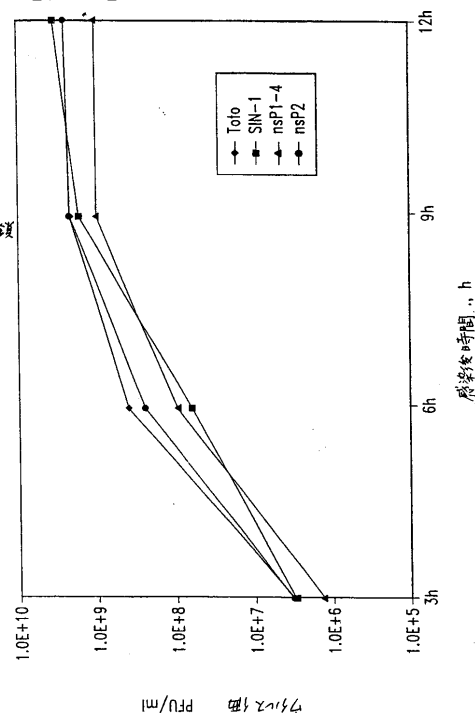


Fig. 2

【図 3】

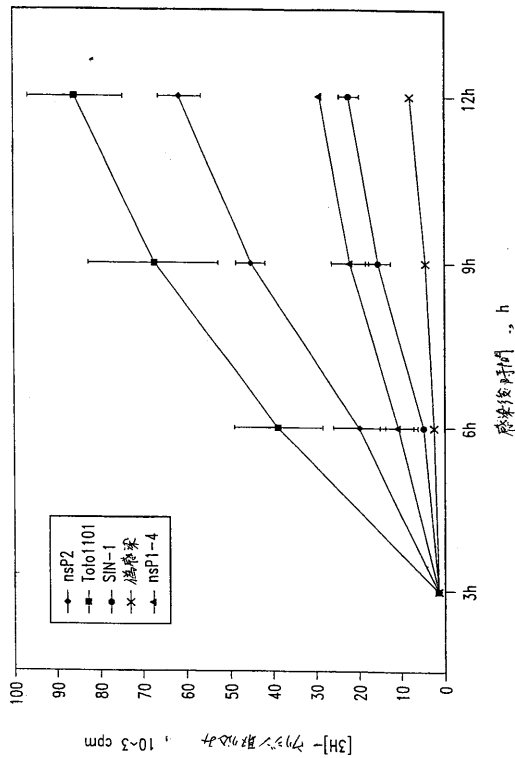


Fig. 3

【図 4】

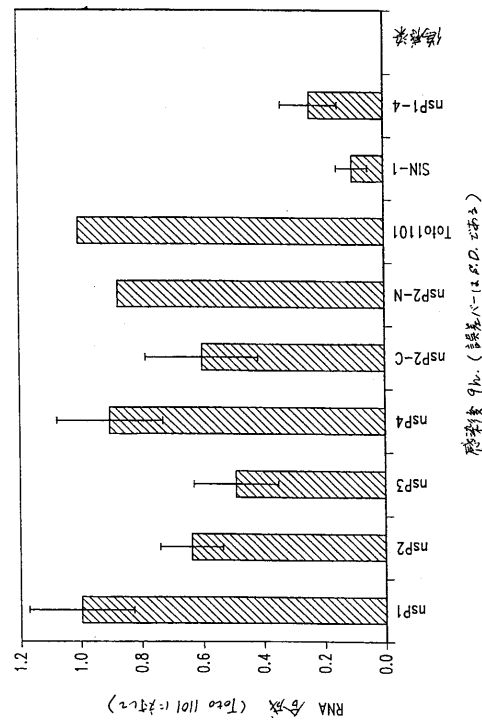


Fig. 4

【図 5】

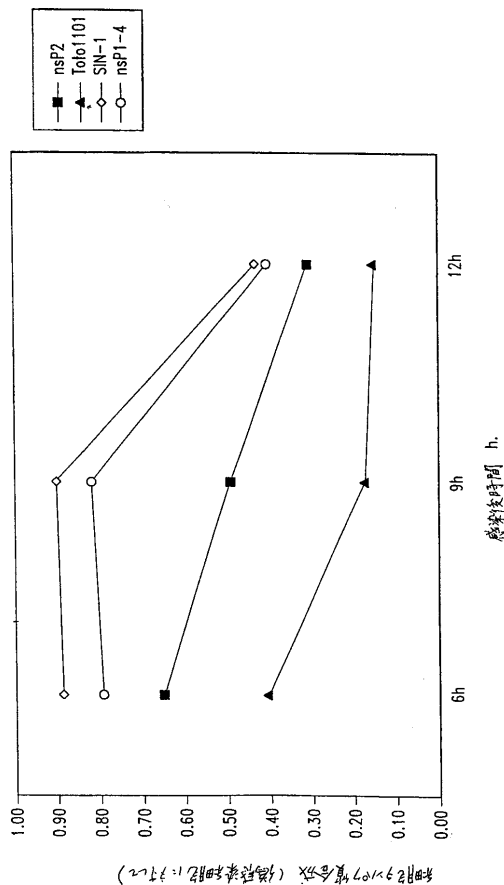


Fig. 5

【図 6 A】

ATTGACGGCG	TAGTACACAC	TATTGAATCA	AACAGCCGAC	CAATCGCACT	ACCATCACAA	60
TGGAGAGGCC	AGTAGTAAC	GTAGACGTAG	ACCCCGAGAG	TCCGTTTGT	GTGCAACTGA	120
AAAAAAGCTT	CCCGCAATTT	GAGGTAGTAG	CACACGAGGT	CACTCCAAAT	GACCATGCTA	180
ATGCCAGAGC	ATTTTCGCAT	CTGGCCAGTA	AACATATCGA	GCTGGAGGTT	CCTACACAGC	240
CGACGATCTT	GGACATAGCC	AGCCGACCGG	CTCGTAGAAT	GTTTTCGAG	CACCATATC	300
ATTGTGCTG	CCCCATGCGT	AGTCCAGAA	ACCCGAGCCG	CATGATGAAA	TACGCCAGTA	360
AACCTGGCGA	AAAAGCGTGC	AAGATTACAA	ACAAGAAGTT	GCATGAGAA	ATTAAGGATC	420
TCCGGACCGT	ACTTGATACG	CCGGATGCTG	AAACACCATC	GCTCTGTTT	CACAACGATG	480
TTACCTGCAA	CATGCGTGCC	GAATATTCCG	TCATGCAGGA	CGTGATATC	AACGCTCCCG	540
GAACTATCTA	TCATCAGGCT	ATGAAAGGCG	TCCGGACCC	GTACTGGATT	GGCTTCGACA	600
CCACCCAGTT	CATGTTCTCG	GCTATGGCAG	GTTCTGACCC	TGCGTACAA	ACCAACTGGG	660
CCGACGAGAA	AGTCTTGA	GCGGTAACA	TCCGACTTTG	CAGCACAAG	CTGAGTGAA	720
GTAGGACAGG	AAAATTGTCG	ATAATGAGGA	AGAAGGAGTT	GAAGCCCGGG	TCCGGGTTTT	780
ATTTCTCCGT	AGGATGACA	CTTTATCCAG	AACACAGAGC	CAGCTTGCA	AGCTGGCATC	840
TCCATCGGT	GTTCACCTTG	AATGGAAGC	AGTGGTACG	TTGCCGCTG	GATACAGTGG	900
TGAGTTGCGA	AGGCTACGTA	GTGAAGAAA	TCACCATCAG	TCCCGGATC	ACGGGAGAAA	960
CCGTGGGATA	CCGGTTACA	CACAATAGCG	AGGGCTCTT	GCTATGCAA	GTTACTGACA	1020
CAGTAAAGG	AGAAGCGGTA	TGTTCCCTG	TGTGCACGTA	CATCCCGCC	ACCATATGCC	1080
ATCAGATGAC	TGTTAATG	GCCACGGATA	TATCACCTGA	CGATGCACAA	AACTCTTGG	1140
TTGGGCTCAA	CCAGCGAATT	GTCAATTAAC	GTAGGACTAA	CAGGAACACC	AACACCATGC	1200
AAAATTACCT	TCTGCCGATC	ATAGCACAAG	GGTTACGAA	ATGGGCTAAG	GAGCCGAAGG	1260
ATGATCTTGA	TAACGAGAAA	ATGCTGGTA	CTAGAGAAAG	CAAGCTTACG	TATGGCTGCT	1320
TGTGGCGGTT	TCCGACTAAG	AAAGTACATT	CGTTTATCG	CCCACCTGGA	ACGCAGACCT	1380
GCGTAAAGT	CCGAGCCTCT	TTTAGCGCTT	TTCCTATGTC	GTCGGATGG	ACGACCTCTT	1440
TGCCATGTC	GCTGAGGCAG	AAATTGAAAC	TGGCATTGCA	ACCAAGAAAG	GAGGAAAAAC	1500
TGCTGCAGGT	CTCGAGGAA	TTAGTCAATG	AGGCCAAGCG	TGCTTTTGA	GATGCTCAGG	1560
AGGAAGCCAG	AGCGGAGAA	CTCCGAGAAG	CACCTCCACC	ATTAGTGGA	GACAAAGGCA	1620
TCGAGGCAGC	CGCAGAAGTT	GTCTGCGAAG	TGGAGGGGCT	CCAGCGGAC	ATCGGAGCAG	1680
CATTAGTTGA	AACCCCGCGC	GGTCACGTAA	GGATAATACC	TCAAGCAAT	GACCGTATGA	1740
TCGGACAGTA	TATCGTTGTC	TCGCCAACT	CTGTACTGAA	GAATGCCAAA	CTCGCACCAG	1800
CGCACCCGCT	AGCAGATGAC	GTTAAGATCA	TAACACATC	CGGAAGATCA	GGAAAGTACG	1860
CGGTGGAACC	ATACGACGCT	AAAGTACTGA	TGCCAGCAGG	AGGTGCCGTA	CCATGGCCAG	1920
AATTCCTAGC	ACTGAGTGAG	AGCGCCACGT	TAGTGTACAA	CGAAAGAGAG	CTTGTAAGC	1980
GCAAACTATA	CCACATTGCC	ATCATGGCC	CCGCCAAGAA	TACAGAAGAG	GAGCAGTACA	2040
AGGTTACAAA	GGCAGAGCTT	GCAGAAACAG	AGTACGTGTT	TGACGTGGAC	AAGAAGCGTT	2100
GCGTTAAGAA	GGAAAGAGC	TCAGGTCCTG	TCCTCTCGGG	AGAAGTACG	AACCTCTCC	2160
ATCATGAGCT	AGCTCTGGAG	GGACTGAAGA	CCCGACCTCG	GGTCCCGTAC	AAGGTCGAAA	2220
CAATAGGAGT	GATAGGCACA	CCGGGCTCGG	GCAAGTCAGC	TATTATCAAG	TCAAGTGTCA	2280
CGGCACGAGA	TCCTGTATCC	AGCGGAAAGA	AAGAAAATTG	TCGCGAATT	GAGGCCGACG	2340
TGCTAAGACT	GAGGGGTATG	CAGATTACGT	CGAAGACAGT	AGATTGCGTT	ATGCTCAACG	2400
GATGCCACAA	AGCGTAGAA	GTGCTGTACG	TTGACGAGC	GTTCCGTTGC	CACGACGAGG	2460
CACACTTGCT	CTTGATTGCT	ATGCTCAGGC	CCCGCAAGAA	GGTAGTACTA	TCCGGAGACC	2520

Fig. 6A

【図 6 B】

CCATGCAATG CGGATTCCTT AACATGATGC AACTAAAGGT ACATTTCAT CACCCTGAAA
 AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCCG GCGTTGCACA CAGCCAGTTA
 CAGCTATTGT ATCGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACCACGAA CCGTGCAGAA
 AGACATTTGA AATCGATATT ACAGGGGCCA CAAGCCGAA GCGAGGGAT ATCATCTGTA
 CATGTTTCCG CGGGTGGTGT AAGCAATTGC AAATCGACTA TCCCGGACAT CAGTAATGA
 CAGCCGGCGG CTCACAAGGG CTAACCAAGAA AAGGATGTGA TGCCGTCCGG CAAAAGTCA
 ATGAAAACCC ACTGTACGGC ATCACAATAG AGCATGTGAA CGTGTGTGCT ACCCGCACTG
 AGGACAGGCT AGTGTGGAAA ACCTTGCAGG GCGACCCATG GATTAAGCAG CTCATAACA
 TACCTAAAGG AAACCTTTCG GCTACTATAG AGGACTGGGA AGCTGAACAC AAGGGAATAA
 TTGCTGCAAT AAACAGCCCC ACTCCCGCTT CCAATCCGTT CAGCTGCAAG ACCAACGTTT
 GCTGGCGGAA AGCATTTGAA CCGATACTAG CCACGGCCGG TATCGTACTT ACCGTTTGCC
 AGTGGAGCGA ACTGTTCCCA CAGTTTCCGG ATGACAACCC ACATTCCGCC ATTTACGCTT
 TAGACGTAAT TTGCATTAA GTTTTCCGCA TGGACTTGAC AAGCGGACTG TTTTCTAAAC
 AGAGCATCCC ACTAACGTAC CATCCCGCCG ATTACGGAG GCGGTGAGCT CATTTGGACA
 ACAGCCCAAG AACCCGCAAG TATGGGTAGC ATCAGCCAT TGCCGCGGAA CTCTCCCGTA
 GATTTCGGGT GTTCCGACTA CTGGGGAAGG GCACACAAC TGAATTGACG ACCGGGAGAA
 CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTGG GCGCTGTGAA CCGCAATCTT CCTCACGCTT
 TAGTCCCGCA GTACAAGAGG AAGCAACCCG GCGCGTGA AAAATCTTGT AACCACTTCA
 AACACCACTC AGTACTTTGT GTATCAGAGG AAAAATTTGA AGCTCCCGT AAGAGAATCG
 AATGGATCGC CCGCATTTGG ATAGCGAAGT ACAGTATGAA CTACAACCTG GCTTTCGGGT
 TTCCCGCGCA GGCACGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGAACATAA TACAGAAACC
 ACCACTTTCA CGAGTGGCAA GACCATCTGG CGACCTTAAA ACCCTTTCCG CTTTCCGCC
 TGAATTGCC TAACTCAGGA GGCACCTCG TGGTGAAGTC CTATGGCTAC GCGACCGCA
 ACAGTGAGGA CGTAGTCACC GCTCTTGCCA GAAAGTTTGT CAGGGTGTCT GCAGCGAGAC
 CAGATTGTGT CTAAGCAAGT ACAGAAATGT ACCTGATTTT CCGACAATA GACAACAGCC
 GTACACGGCA ATTACCCCG CACCATCTGA ATTGGTGTAT TTGCTCCGTG TATGAGGTA
 CAAGAGTTAT AGTTGGAGCC GCGCGTCTAT ACCCGACCAA AAGGAGAAAT ATTGCTGACT
 GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AACCAAGCCA ATCCGTGGG TAGACAGGC GAAGAGTCT
 GCGGTGCCAT CTATAACGT TGGCCGACCA GTTTTACCGA TTACGACCG GAGACAGGA
 CCGCAAGAA GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTATCCA CCGGTCCGG CTTGATTTC
 GGAAGCACC AGAAGCAGTA GCCTTGAAT TGTACAAAA GCGCTACCAT GCAGTGGCAG
 ACTTAGTAAA TACTGATTCG TACTTGAAG GCACCAAAAT CCATCAAGA GCAAAAGACA
 ACCGACCGCG AAAAGACCCG CTTGAAGTAT CACTTAAGTC CTTGACAACC GCGCTAGACA
 GAACTGACCG GGCAGTAACC ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGAC
 CCGCACTCCA ACTTAAGGAG TCTGTAAAG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATCGAGC
 ATGAGTTAGT ATGAGTCCAT CCAGACAGTT GCCTGAAGGG AAGAAAGGGA TTCACTACTA
 CAAAAGGAAA ATTGTATTCC TACTTGAAG GCACCAAAAT CCATCAAGA GCAAAAGACA
 TGGCGGAGAT AAAGTCTCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAAG TAATGAACAA CTGTGTGCC
 ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCGGTGCGAC CATAACCGCT
 CGTTTAGGCC GCCCAAAACG TTGCGGTGCC TTTCATGTA TGCCATGAGC CCAGAAAGGG
 TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCTCC ACCCCCTTC
 CTAAGCACAA AATTAAGAA GTTCAGAAAG TACGTGACG GAAAGTAGTC CTGTTTAATC

Fig. 6B

【図 6 D】

TCAGAGGGGA AATAAGCAT CTCTACGGT GTCTTAATA GTCAGCATG TTCATTTCAT
 CTGACTAATA CTACACACCC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTCGGCCGCC
 GCGCCCTTCC GCGCCCACT GGCATTGGA GCGCGGGAG AAGGAGGAG GCGGCCCGGA
 TGCCGTCCCG CAACGGGCTG GCTTCTCAA TCCAGCACT GACCACAGCC GTACGTGCC
 TAGTCAATTG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCATGTCC ACGCCGCCCA CCGCGCCAGA
 AGAAGCAGGC GCCCAAGCAA CCACCGAAGC CGAAGAAACC AAAAACCGAG GAGAAGAGA
 AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCCGGAA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG
 CCGACAGATT GTTCGAGCTC

Fig. 6D

【図 6 C】

2580 CGCACACTCC CGCATTCTGT CCGCGCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG 5100
 2640 CTCTCTCTCG ACAGGCCGAG GAGGCCCCCG AAGTTGTAGC GACACCGTCA CCATCTACAG 5160
 2700 CTGATAACAC CTGCTTGTAT GTACACAGACA TCTCATGGA TATGATGAC AGTAGCGAAG 5220
 2760 GTCACCTTTT TCGAGCTTTT AGCGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTGGT 5280
 2820 CGTCAGGAGC TAGTTCACTA GAGATAGTAG ACCGAAGGCA GTCCGTTGGT GCTGAGCTTC 5340
 2880 ATGCCGTCCA AGAGCCTGCC CCTATTCCAC CGCCAAGGCT AAGAAGATG GCCCGCTCT 5400
 2940 CAGCGCCAGG AAAAGAGCCC ACTCCACCGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCACCTCT 5460
 3000 CTTTGGTGG GTATTCCATG TCCCTCGGAT CAATTTTCCA CGGAGAGACG GCCCGCAGG 5520
 3060 CAGCGGTACA ACCCTCGGCA ACAGGCCCA CGGATGTGCC TATGCTTTT GGTATCGTTT 5580
 3120 CGTCAGGAGA GATTGATGAG CTGAGCCGCA GAGTAACCTG GTCCGAACCC GTCTGTTTG 5640
 3180 GATCATTTGA ACCGGCGCAA GTGAACCTAA TTATATCTCT CGGATCAGCC GTATCTTTT 5700
 3240 CTCTACGCA CAGAGAGCT AGACGACGGA CGAGGAGGAC TGAATCTGA CTAACCGGG 5760
 3300 TAGTGGGTGA CATATTTTCG ACAGGACACAG GCGCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCGTT 5820
 3360 TGCAGAACCA GCTTACAGAA CCGACCTTGG AGCAACATG CTTGGAAGA ATTATGCCC 5880
 3420 CGTGCTCTGA CAGTCCGAAA GAGGAACAACT TCAAACTCAG GTACCAATG GTCCCGCCG 5940
 3480 AAGCAACCAA AAGTAGGTAC CAGTCTCTGA AAGTAGAAAA TCAGAAAGCC ATAACCACT 6000
 3540 AGGCACTACT CTGAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA CTAACCTATA 6060
 3600 AGATCACCTA TCCGAAACCA TTGTAATCCA GTAGCTTACC GCGCAACTCA TGGATCCAC 6120
 3660 AGTTCGCTGT AGCTGTCTGT AACAACTATC TGCAATGAGA CTATCCGACA GTAGCATCTT 6180
 3720 ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGTG AGACGGGACA GTCCCGTCCC 6240
 3780 TGGATATGCG AACCTTCTCG CCGCTAAGC TTAGAAGTTA CCGCAAAAAA CATGAGTATA 6300
 3840 GAGCCCGCAA TATCCGAGT GCGGTTCAT CAGCATGCA GAACACGCTA CAAAATGTG 6360
 3900 TCATTGCCCG AACATAAAGA AATTGCAACG TCACGAGAT GCGTGAAGTC CCAACACTGG 6420
 3960 ACTCAGGAGC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAATATGCT ATGTAATGAC GAGTATTGG 6480
 4020 AGGAGTTCCG TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT GTACACCGCA TATGATGCT 6540
 4080 GATGAAAGG CCGTAAGGCC GCGCAGTAT TTGCAAGAC GTATAATTTG GTCCCATTTG 6600
 4140 AAGTAGGTCC TATGATAGA TTGCTATGGA ACATGTAAAG AGACGTGAAA GTTACCACTG 6660
 4200 GCACGAACCA CACAGAAGAA AGACCGAAGG TACAAGTAT ACAAGCCGCA GAACCCCTGG 6720
 4260 CCGACTGCTA CTTATGCGGG ATTACCCGGG AATTAGTGGC TAGGCTTAGC GCGCTTCCG 6780
 4320 TTCTCAAACT TCACACGCT TTTGACATG CCGCGGAGCA GTTGTGCTT AAACTAGGAC 6840
 4380 AACACTTCAA GCAAGCCGAC CCGGTACTGG AGACGAGTAT CGCATCTAT GACAAAAAGC 6900
 4440 AAGACGAGCC TATGCGGCTA ACCGCTCTGA TGATCTGGA GACACTGGGT GTTACCACTG 6960
 4500 CACTACTCGA CTTGATCGAG TGCGCTTTG GAGAAATATC ATCCACCAT CTACTACCG 7020
 4560 GACTCTGTT TAAATTCGG GCGATGATGA AATCCGGAAT GTTCTCACA CTTTGTGTA 7080
 4620 ATGAGTCTTT GAATGCTGT ATCGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGCGGCTT AAAACGCTCA 7140
 4680 GATGTGAGCG GTTCATTGGC GACGACAACA TCATCATGAG AGTAGTATCT GACAAAGAAA 7200
 4740 TGCTGACAGC TTGCGCCACC TGCTCAACA TGGAGGTTAA GACAGTGGGT GTTACCACTG 7260
 4800 GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGCGCGGAT TTATCTTGA AGATTCCGTT ACTTCCACAG 7320
 4860 CGTCCCGCT GCGGATCCG CTGAAAAGCG TGTTAAGTT GGGTAAACCG CTCGCCGCT 7380
 4920 ACAGGAGACA AGACGAGAGC ATGCTGTAGA TGAAGCAAAAG CTCTGCTGTA GTTACGTTA 7440
 4980 GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCATGG CCGTGACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA 7500
 5040 TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAATCT TTGCGAAGCA CAAAAGGACA TTCAAGGCCA 7560

Fig. 6C

【図 7 A】

7620 ATTGACGGCG TAGTACACAC TATTGAATCA AACAGCCGAC CAATTGCACT ACCATCACAA 60
 7680 TGGAGAAGCC AGTAGTAAAC GTAGACGTAG ACCCCAGAG TCCGTTTGTG GTGCAACTGT 120
 7740 AAAAAAGCTT CCGCAATTT GAGGTAGTAG CACAGCAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA 180
 7800 ATGCCAGAGC ATTTTGCAT CTGGCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CCTACCACAG 240
 7860 CGACGATCTT GGACATAGGC AGCGACCGG CTCGTAGAA GTTTTCCGAG CACCAGTATG 300
 7920 ATTGTGTCTG CCGCATCGGT AGTCAGAGAG ACCCGGACCG ATGATGAGAA TAGCCAGTCA 360
 7980 AACTGGCGGA AAAAGCGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT GCATGAGAG ATTAGGATCA 420
 8000 TCCGAGCCGT ACTGATACG CCGGATGCTG AAACACCATC GCTCTGCTT CCAACGATG 480
 TTAATGCAA CATGCTGCG GAATATTCG TCATGACGGA CGTGTATATC AAGCTCCCG 540
 GAACTATCTA TCATCAGGCT ATGAAAGGCG TGCGGACCTT GTACTGGATT GCGTTCGACA 600
 CCACCAAGTT CATGTTCTCG GCTATGGCAG GTTCTGATCC TGCTGATCC ACCCACTGGG 660
 CCGAGCGAGAA AGTCTTGAAG GCGGTAACA TCGGACTTTG CAGCACAAG CTGATGTAAG 720
 GTAGGACAGG AAAATGTGCT ATAATGAGGA AGAAGGAGTT GAAGCCGGG TCGCGGCTTT 780
 ATTCTCCGT AGGATCGACA CTTTATCCAG AACACAGAGC CAGCTTGCAG AGCTTGCAATC 840
 TTCCATCGGT GTTCCACTTG AATGGAAGCG AGTCTGACAT TTGCGCTGT GATACAGTGT 900
 TGAGTTGCGA AGGCTAGTA GTGAAGAAAA TCACCATCAG TCCCGGATC ACAGGAGAAA 960
 CCGTGGGATA CCGGCTTACA CACAATAGCG AGGGCTTCTT GCTATGCAAA GTTACTGACA 1020
 CAGTAAAAAG AGAACCGGTA TCGTTCCCTG TTGTCACGTA CATCCCGGCC ACCATATGCG 1080
 ATCAGATGAC TGGTATAAT GCCACGGATA TATCACCCTG CAGTGCACAA AACTTCTGG 1140
 TTGGCTCAA CCAGCGAATT GTCATTAACG GTAGGACTAA CAGGAACACC AACACCATGT 1200
 AAAATTACTT TCTGCCGATC ATAGCACAGG GTTTCAGCAA ATGGGCTAAG GAGCGCAAGG 1260
 ATGATCTTGA TAACGAGAAA ATGCTGGTGA CTAGAGACCG CAAGCTTACG TATGGCTGCT 1320
 TGTGGGCGTT TCCGACTAAG AAAGTACATT CGTTTTATCG CCCACCTTGA ACAGCAGACT 1380
 GCGTAAAGT CCCAGCCTCT TTAGCGCTT TTCCATGTC GTCCGATGAG ACAGCTCTT 1440
 TGCCCATGTC GCTGAGGCG AAATTGAAC TGCCATTGCA ACCAAGAAAG GAGGAAAAAC 1500
 TGCTGAGGT CTGGAGGAA TTAGTATGG AGGCCAAGCG TCGTTTTGAG GATGCTCAGG 1560
 AGGAAGCCAG AGCGGAGGAG CTCCGAGAG CACTTCCACC ATTAGTGGA GACAAGGAG 1620
 TCGAGGACAG CCGAGAAGTT GTCTGCGAAG TGGAGGGGCT CAGCGGGAGC ATCGGAGGAG 1680
 CATTAGTTGA AACCCCGCG GGTACGTAAG GGTAAATACC TCAAGCAAAAT GACCGTATGA 1740
 TCGACAGATA TATCGTTGTC TCGCAAACT CTGTGCTGAA GAATGCCAAA CTCGCCACG 1800
 CGCACCGCT AGCAGATCAG GTTAAGATCA TAACACACT CCGAAGATCA GGAAGATACG 1860
 CGGTGCAACC ATACGAGCT AAAGTACTGA TGCCAGCAGG AGGTGCCGTA CCATGGCCAG 1920
 AATTCTAGC ACTGAGTGAG AGCGCCACGT TAGTGTACAA CCAAGAGAGG TTTGTGAACC 1980
 GCAACTATA CCACATGGC ATGCATGGCC CCGCAAGAA TACAAGAGAG GAGCAGTACT 2040
 AGTTTACAAA GCGAGAGCT GCAGAAACAG AGTACGTGTT TGACGTGGAC AAGAAGCTT 2100
 CGGTTAAGAA GGAAGAGGCC TCAGTCTGG TCTCTCGG AGAAGTACG AACCTTCCCT 2160
 ATCATGAGCT AGCTCTGGAG GGACTGAAGA CCGACCTGCG GTTCCGATC AAGGTGCAAA 2220
 CAATAGGAGT GATAGGCACA CCGGGTCTCG CCAAGTACAG TATTATCAAG TCAACTGTCA 2280
 CGGCAGGAGA TCTTGTATG ACCGGAAGA AAGAAATTTG TCGCGAAAT GAGGCGGAGC 2340
 TGCTAAGACT GAGGGTATG CAGATTACGT CGAAGACAGT AGATTCCGTT ATGCTCAACG 2400
 GATGCCACAA AGCCGTAGAA GTGCTGTACG TTGACGAGG GTCCGCTCG CACGACGAG 2460
 CACTACTTGC CTTGATTGCT ATGCTACGCG CCGCAAGAA GGTAGTACTA TCGGAGAGC 2520

Fig. 7A

【図 7 B】

CCATGCAATG CGGATCTCTT AACATGATGC AACTAAAGGT ACATTTCAAT CACCCTGAAA
 AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCCG GCGTTGCACA CAGCCAGTTA
 CAGCTATTGT ATCGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACCACGAA CCGTGCAAGA
 AGACATTTGA AATCGATATT ACAGGGGCGA CAAGGCGGAA GCCAGGGGAT ATCATCTCGA
 CATGTTTTCG CCGGTGGGTT AAGCAATTGC AAATCGACTA TCCCGGACAT GAAGTAATGA
 CAGCGCGGCG CTCACAAAGG CTAACCAAGAA AAGGATGTGA TGCCGTCCGG CAAAAGTCA
 ATGAAAACCC ACTGTACGCG ATCAGATCAG AGCATGTGAA CGTGTGTCTC ACCCGCACTG
 AGGACAGGCT AGTGTGGAAA ACCTTGACGG GCGACCCATG GATTAAAGCAG CCGACTAACA
 TACCTAAAGG AAACCTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGGA AGCTGAACAC AAGGGAATAA
 TTGCTGCAAT AAACAGGCCC ACTCCCGCTG CCAATCCGTT CAGCTGCAAG ACCAACCTTT
 GCTGGGCGAA AGCATTTGGA CCGATACTAG CCACGGCGGG TATCGTACTT ACCGGTTGCC
 AGTGGAGCGA ACTGTTCGCA CAGTTTGGCG ATGACAACCC ACATTCCGCC ATTTACGCTT
 TAGACGTAAT TTGCTAATAG TTTTTCGGCA TGGACTTGAC AAGCGGACTG TTTTCTAAAC
 AGACATCTCC ACTAACGTAC CATCCCGCGG ATTCAGCGAG GCCGTAGCTT CATTGGGACA
 ACAGCCCAAG AACCCGCAAG TATGGGTACG ATCAGCCCAT TGCCCGCGAA CTCTCCGTA
 GATTTCCGGT GTTCCGACTA GCTGGGAGG GCACACACAT TGATTTCAG ACGGGGAGAA
 CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTTG CCGCGGTGAA CCGCAACTTT CCTCACGCTT
 TAGTCCCGCA GTACAAAGAG AAGCAACCCG GCCCGGTCAA AAAATCTCTG AACCACTTCA
 AACACCACCT AGTACTTTGT GTATCAGAGG AAAAATTTGA AGCTCCCGGT AAGAGAATCG
 AATGGATCGC CCGGATTGGC ATAGCGGATG ACCTGATTTT CCGCAACCTG GCTTTCCGGT
 TTCCCGCGCA GGCACGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGGAACTAAA TACAGAAACC
 ACCACTTTCA CGAGTGGCAA GACCATTCGG GACCTTAAAC AACCTTTTCG CTTTCCGGCT
 TGAATTTGCT TAACCCAGGA GGCACCTCCG TGGTGAAGTC CTATGCTAC GCGGACCGCA
 ACAGTGAGGA CGTAGTACC GCTCTTGCCA GAAAGTTTGT CAGGCTGTCT GCAGCGAGAC
 CAGATTGTGT CTCAAGCAAT ACAGAAATG ACCTGATTTT CCGCAACCTG GACCAACCCG
 GTACACGGGA ATTCACCCCG CACCATCTGA ATTGCTGTAT TTGCTCCGTT TATGAGGTA
 CAAGAGCTGG AGTTGGAGCC GCGCGCTCAT CCGCAACCAA AAGGGAGAA ATTTGCTGAT
 GTCAAGAGGA AGCATTTGCT AACCGACCCA ATCCGCTGGG TAGACCAAGG GAAGGATCT
 CCGGTGCCAT CTATAACGT TGGCCGACCA GTTTTACCGA TTCAGCCAGG GAGACAGGGA
 CCGCAAGAAAT GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTAAGCAA CCGCGTCCGG CCGTATTTC
 GGAAGCACC AGAAGCAGAA GCCTTGAAT TGCTACAAAC CGCTTACAT CAGTGGGAC
 ACTTAGTAAA TGAACATAAC ATCAAGTCTG TCGCAATTTC ACTGCTATCT ACAGGCTATT
 ACCGACCGCG AAAAGCAGCC CTGAGATAT CACTTAACCT CTTGACAACC GCGCTAGACA
 GAACTGACCG GGACGTAACT ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGACG
 CCGCACTCCA ACTTAAGGAG TCTGTAAACG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATCGACG
 ATGAGTTAGT ATGAGTCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGGG AAGAAAGGGA TTCAGTACTA
 CAAAAGGAAA ATTGTATTGC TACTTCGAAG GCACCAAAAT CCATCAAGCA GCAAAAGACA
 TGGCGAGAT AAAGTCTCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAG TAATGAACAA CTGTGTGCTT
 ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCGGTGAC CATAACCGCT
 CGTCTAGCCC GCCCAAAACG TTGCGTGGT TTTGCATGTA TGCCATGACG CCAGAAAGGG
 TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAGG AAGTTACAGT ATGCTCTCC ACCCCCTTC
 CTAAGCACAA AATTAAGAAAT GTTCAGAGG TTAGCTGCAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC

Fig. 7B

【図 7 D】

TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTACGGTG GTCTAAATA GTCAGCATAG TACATTTTAT
 CTGACTAATA CTACAAACACC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTCGGCCCGC
 GCCCTTTCCC GGGCCCCACT GCCATGTGGA GCGCGCGGAG AAGGAGGCGAG CGCGCCCGCA
 TGCTTGCCCG CAACGGGCTG GCTTCTCAAA TCCAGCAACT GACCACAGCC GTACGTGCCC
 TAGTCAATTG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCACGCTCC AGCCCCGCCA CCGCGCCAGA
 AGAAGCAGGC GCCCAAGCAA ACCCCGAAGC CGAAGAAACC AAAAACCGAG GAGAAGAAGA
 AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCCGGAA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG
 CCGACAGATT GTTCGAGCTC

Fig. 7D

【図 7 C】

2580 CGCACACTCC CGCATCTGTT CCGCGCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG 5100
 2640 CTCTCTCTCG ACAGGCGGAG GAGGCCCCCG AAGTTGTAGC GACACCGTCA CCATCTACAG 5160
 2700 CTGATAACAC CTCCTTGTAT GTACAGACGA TCTCAGTGA TATGGCAAG GATGGCAAG 5220
 2760 GCTCATTTT TTCGAGCTTT AGCGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTTGGT 5280
 2820 CGTCAGGACG TAGTTCACTA GAGATAGTAG ACCGAAGGCA GGTGGTGGTG GCTGAGCTTC 5340
 2880 ATGCGCTCCA AGAGCTGCG CCTATTCCAC CGCCAAGGCT AAAGAAGATG CCGCGCTCG 5400
 2940 CAGCGGCAAG AAAGAAGGCC ACTCCACCGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCCACCTCT 5460
 3000 CTTTGGTGG GGTATCCATG TCCCTCGGAT CAATTTTCGA CGGAGAGACG GCCCGCAGG 5520
 3060 CAGCGGTACA ACCCTCGGCA ACAGGCCCCA CGGATGTGCC TATGCTTTTC GGATCGTTTT 5580
 3120 CGTCAGGAGA GATTGATGAG CTGAGCCGCA GAGTAACCTGA GTCCGAACCC GTCTGTTTG 5640
 3180 GATCATTTGA ACCGGCGGAA GTGAACCTCA TTATATCGTC CCGATCAGCC GTATCTTTTC 5700
 3240 CACTACGCA CAGAGACGCT AGACGACGGA CGAGGAGGAC TGAATACTGA CTAACCGGGG 5760
 3300 TAGTGGGTA CATATTTTCG ACGGACACAG GCCCTGGGCA CTTCGAAAAG AAGTCGTTT 5820
 3360 TGCAGAACCA GCTTACAGAA CCGACCTTGG AGCGCAATGT CCGGAAAGA ATTATCGCC 5880
 3420 CGTGCTCGCA CAGTCCGAAA GAGGAACAACT TCAACTCAG GTACAGATG GTCCACCG 5940
 3480 AAGCAACAA AAGTAGGTAC CAGTCTCGTA AAGTAGAAA TCAAGAAAGC ATACCACTG 6000
 3540 ACCGCTACT CTCAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA 6060
 3600 AGATCACCTA TCCGAAACCA TTGTACTCCA GTAGCTTACC GCGCAACTAC TCCGATCCAC 6120
 3660 AGTTCGCTGT AGCTGCTGT AACAACATC TGATGAGAA CTATCCGACA GTAGCATCTT 6180
 3720 ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGT AGACGGGACA GTCCGCTGCC 6240
 3780 TGGATACTGC AACCTCTCTG CCGCTAAGC TTAGAGTTA CCGCAAAAA CATGAGTATA 6300
 3840 GAGCCCCGAA TATCCGAGT GCGGTTCCAT CAGCAGTTGA GAACACCTA CAAAATGTG 6360
 3900 TCATTGCCG AACATAAAGA AATTGCAACG TCACGAGAT GCGTGAAGT CCAACACTGG 6420
 3960 ACTCAGCAGC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAAATATGC ATGTAATGAC GAGTATTGGG 6480
 4020 AGGAGTTCCG TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT GTATGAGCA TATCATAGCA 6540
 4080 GAGTAAAGG CCTAAGGCC GCGGCACTAT TTGCAAGAG GATAAATTT GTCCCATTCG 6600
 4140 AAGACGTGCT TATGATAGA TTGCTCATGA ACATGAAGG ACATGCTGAAA GTTACACCA 6660
 4200 GCACGAACCA CACGAAGAA AGACCGAAGG TACAAGTAT ACAAGCCGA GAACCCCTGG 6720
 4260 CCGCTGCTTA CTATGCGGG ATTACCCGGG AATTAGTGG TAGGCTTACG CCGCTTCTG 6780
 4320 TTCAACACTT TCACACGCT TTTGACATG CCGCGGAGGA TTTTGTAGCA TATCATAGCA 6840
 4380 AACACTTCAA GCAAGCGCAG CCGGTACTGG AGACGGATAT CCGATCATCT GACAAAAGCC 6900
 4440 AAGACGACGC TATGCGCTTA ACCGCTGTA TGTCTTGGG GACCTGGGT GTTACACCA 6960
 4500 CACTACTCGA CTGTGCGAG TGCGCTTTG GAGAAATATC ATCCACCAT CTACTACCG 7020
 4560 GTACTCGTT TAAATTCGG GCGATGATGA AATCCGGAAT GTTCTCTACA CTTTGTGTA 7080
 4620 ACACAGTTTT GAATGCTGT ATCGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGCGGCTT AAAACGCTCA 7140
 4680 GATGTGACAG GTTCAATGG GACGCAACCA TCATCATGAG AGTAGTATCT GACAAAGAAA 7200
 4740 TGGCTGAGG TGCGGCCACC TGCGTCAACA TGGAGGTTAA GACCTGGGT CAGCATCATG 7260
 4800 GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGCGCGGAT TTATCTTGA AGATTCCGTT ACTTCCACAG 7320
 4860 CGTCCCGCT GCGGATCCC CTGAAAAGC TGTTTAAAGT GGGTAAACCG CTCCAGCCG 7380
 4920 ACAGCAGGCA AGACGAAGC AGAAGACGCG CTCTGCTAGA TGAAGCGTGA GCGTGGTTA 7440
 4980 GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCAGTG CCGTGACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA 7500
 5040 TTACACCTGT CCTACTTGCA TTGAGAACCT TTGCGCCAG CAAAAGAGCA TTCCAAGCCA 7560

Fig. 7C

【図 8 A】

7620 ATTGACGGCG TAGTACACAT TATTGAATCA AACAGCCGAC CAATTGCACT ACCATCACAA 60
 7680 TGGAGGAAGC AGTAGTAAC GTAGACGTAG ACCCCAGAG CCGTTTGTG GTGCAACTGT 120
 7740 AAAAAAGCTT CCGCAATTT GAGGTAGTAG CACAGGAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA 180
 7800 ATGCGAGAGC ATTTTGCAT CTGGCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CTAACACAG 240
 7860 CGAGCATCTT GGACATAGCG AGCGACCGG CTCGTAGAAT GTTTTCCGAG CACCATATC 300
 7920 ATTGTGCTTG CCGCATCGT AGTCAGAGG ACCCGGACCG CATGATGAGA TACCCAGTA 360
 7980 AACTGGCGGA AAAAGCGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT GCTGTAGAGG ATTAAGGATC 420
 8000 TCCGAGCCGT ACTTGATACG CCGGATGCTG AAACACCATC CCATCTCTTT CACACAGATG 480
 TTAACCTCAA CATGGTCCG GAATATTCCG TCATGACGGA CGTGTATATC AACCTCCCG 540
 GAACTACTA TCATCAGCT ATGAAAAGCG TGCGGACCTT GTACTGGATT GGCTTCGACA 600
 CCACCCAGTT CATGTCTCG GCTATGGCAG GTTCTGATCC TGCGTACAC ACCACATGGG 660
 CCGACGAGAA AGTCTTGAA GCGGTAAACA TCGGACTTTG CAGCACAAG CTGATGAG 720
 GTAGGACAG AAAATTGTGC ATAATGAGGA AGAAGGATTA GAAGCCCGGG TCGCGGTTTT 780
 ATTTCTCCGT AGGATGACCA CTTTATCCAG AACACAGAGC GAGCTTGCAG AGCTGGCATC 840
 TTCCATCGGT GTTCACTTG AATGGAAGC AGTCTGACAT TTGCGCTGT GATACAGTGG 900
 TGAGTTGCGA AGGCTACGTA GTGAAGAAA TCACCATCAG TCCCGGATC ACGGAGAGAA 960
 CCGTGGGATA CCGGTTTACA CACAATAGCG AGGGCTTCTT GCTATGCAAA GTTACTGACA 1020
 CAGTAAAAGG AGAAGCGGTA TCGTTCCCTG TTGTCACGTA CATCCCGGCC ACCATATGCG 1080
 ATCAGATGAC TGGTATAATG GCCACGGATA TATCACCCTG CAGTGCACAA AAATCTCTGG 1140
 TTGGGCTCAA CCGCGAATTT GTCAATTAAC GTAGGACTAA CAGGAACACC AACACCATG 1200
 AAAATTACCT TCTGCCGATC ATAGCACAAG GGTTCAGCAA ATGGGCTAAG GAGGCAAGG 1260
 ATGATCTTGA TAACGAGAAA ATGCTGGGTA CTAGAGAAGC CAAGCTTACG TATGGCTGCT 1320
 TGTGGGCGTT TCGCACTAAG AAAGTACATT CGTTTATGTC CCCACCTTGA ACGCAGACCT 1380
 GCGTAAAGT CCGACGCTCT TTAGCGCTT TTCCATGTC GTCCGATGG ACGACCTCTT 1440
 TGCCCATGTC GCTGAGGCG AAATTTGAAC TGGCATTTGA ACCAAGAGG GAGGAAAAAC 1500
 TGCTGCAGGT CTGGAGGAA TTAGTCTATG AGGCCAAGG TGCTTTTGA GAGTCTGAG 1560
 AGGAAGCCAG AGCGGAGAG CTCCGAGAG CACTTCCACC ATATTGGCA GACAAAGGCA 1620
 TCGAGGCGC CGCAGAAATT GTCTGCGAAG TGGAGGGCT CACGCGGAC ATCGGAGCAG 1680
 CATTAGTTGA AACCCCGCG GGTCACTGAA GGATAATACC TCAAGCAAT GACCTGATGA 1740
 TCGGACAGTA TATCTGTGTC TCGCAAACT CTGTGCTGAA GAATGCCAAA CTCGACCAAG 1800
 CGCACCCTGCT AGCAGTACG GTTAAGATCA TAACACACTC CGGAAGATCA GGAAGATACG 1860
 CCGTCCGAAC ATACAGGCTT AAAGTACTGA TGCCACAGG AGGTGCGCTA CCATGGCCAG 1920
 AATTCTTAGC ACTGAGTAC AGCCGACCT TAGTGTACAA CCGGAAGAG TTTGTGAACC 1980
 GCAACTATA CCACATTGCC ATGATGGCC CCGCAAGAA TACAGAGAG GAGCAGTACA 2040
 AGGTTACAAA GCGAGAGCTT GCAGAAACAG AGTACGTGTT TGACGTGGAC AAGAAGCGTT 2100
 CGGTTAAGAA GGAAGAAGCC TCAAGTCTG TCCTCTCGG AGAAGTACG AACCTTCCCT 2160
 ATCATGAGCT AGCTCTGGAG GGAAGTGAAG CCGGACCTG GTTCCGCTG AAGTCTGAAA 2220
 CAATAGGAGT GATAGGACCA CCGGGTTCG GCAAGTACG TATTATCAAG TCACTGTGCA 2280
 CGGCACGAGA TCTTGTATC AGCGGAAGA AAGAAATTTG TCGGAAATTT GAGGCGCAG 2340
 TCGTAAAGCT GAGGGGTATG CAGATTACGT AGATTCCGTT ATGCTCAACG 2400
 GATGCCACAA AGCGTAGAA GTGCTGTACG TTGACGAGC CCGTCCGTC CAGCAGAGG 2460
 CACTACTTGC CTGATTGCT ATGCTCAGG CCGCGAAGAA GGTAGTACTA TGCGGAGACC 2520

Fig. 8A

【図 8 B】

CCATGCAATG CGGATTCCTT AACATGATGC AACTAAAGGT ACATTTCAAT CACCCTGAAA
 AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAGT ATATCTCCCG GCGTTGCACA CAGCCAGTAT
 CAGCTATTGT AGTGTGGAAG ACCTTGACAG GCGACCATG GATTAAGCAG CCCACTAACA
 AGAACATTGA AATCGATATT ACAGGGGCGA CAAGCCGCGA GCCAGGGGAT ATCATCTCTGA
 CATGTTTCCG CGGGTGGGTT AAGCAATTGC AAATCGACTA TCCCGGACAT GAAGTAAATGA
 CAGCCGCGCG CTCACAAGGG CTAACCAAGAA AAGGAGTGTA TGCCGTCGCG CAAAAGTCA
 ATGAAACCC ACTGTACGCG ATACATACAG AGCATGTGAA CGTGTGCTC ACCCGCACTG
 AGGACAGGCT AGTGTGGAAG ACCTTGACAG GCGACCATG GATTAAGCAG CCCACTAACA
 TACCTAAAGG AAACCTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGGA AGCTGAACAC AAGGGAATAA
 ACAGCCGAGG AACCCGCGAG ACTCCCGCTG CCAATCCGTT CAGCTGCAAG ACCAACGTTT
 GCTGGGCGAA AGCATGTGAA CCGATACAGT CCACGCGCGG TATCGTACTT ACCGGTGGCC
 AGTGGAGCGA ACTGTTCCTA CAGTGTGCGG TGACATAAACC ACATTCGGCC ATTTACGCTT
 TAGCGTAAT TTGATTAAAG TTTTTCGGCA TGACCTTGAC AAGCGGACTG TTTTCTAAAC
 AAGGACTCCC ACTAACGTAC CATCCGCGCG ATTACGGGAG GCCGGTAGCT CATTTGGGCA
 ACAGCCGAGG AACCCGCGAG TATGGGTAGT ATCAGGCCAT TGCCGCGCGA CTCTCCGCTA
 GATTTCCGGT GTTCCGACTA GCTGGGAGG GCACACAACT TGATTTGCAAG ACCGGGAGAA
 CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACGTG TCCCGGTGAA CCGCAATCTT CCTCACGCTT
 TAGTCCCGGA GTACAAAGGAG AAGCAACCCG GCGCGCTCAA AAAATTTCTT AACCGATTCA
 AACACCACTC AGCATTTGTG GTATCAGAGG AAAAATTTGA AGCTCCCGGT AAGAGAAATCG
 ATAGGATGCG CCTAGATTGG ATAGCGGAGT ATCAGGCCAT TGCCGCGCGA CTCTCCGCTA
 TTCCGCGCGA GGCACGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGAACATAAA TACAGAAACC
 ACCACTTTCA CAGTGGCGAA GACCATGCGG GCACCTTAAA AACCTTTTCG CGTTCGGGCC
 TGAATTCGCT TAACCCAGGA GGCACCCCTG TGGTGAAGTC CTATGGCTAC GCCGACCGCA
 ACAGTGAGGA CGTATGACCC GCTCTTGCCA GAAAGTTGT CAGGGTGTCT GCAGCGAGAC
 CAGATTGTGT CTAAGGATG ACAGAAATGA AGCTGATTTT CCGCAACCTG GACCAACCGC
 GTACACGGGA ATTACCGCG CACCATCTGA ATTGGTGTAT TTGCTCGCTG TATGAGGTA
 CAAGAGATGG AGTTCGAGCC GCGCGCTCAT ACCGCAACAA AAGGGAAGAT ATTGCTGACT
 GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AACCGACCCA ATCCGCTGGG TAGACGAGCG GAAGGAGTCT
 GCGGTGCCAT CTATAAAGCT TGCGGAGCCA GTTTTACCGA TTTACGCGCG GAGACAGGGA
 CCGCAAGAAAT GACTGTGTCG CTAGGAAAGG AAGTGAACGA CGCGGTCGCG CCTGATTTCC
 GGAAGCAGCC AGAAGCAGAA GCGTTGAAAT TGCTACAAAC CGCCTACCAT GCAGTGGGAC
 ACTTAGTAAA TATTGATTCG ATCAAGTCTG TGCCCATTTCC ACTGCTATCT ACAGGCTATT
 ACCGACGCGG AAAAGACCCG CTGAGATAT CACTTAAGTC CTTGACAACC GCGCTAGACA
 GAACGTAGCG GGCATTAAGC ATCTATTGCC TGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGAGC
 CGGCACCTCA CTCTAAGGAG TCTGTAAAGG TGAAGATATG GAGATCGAGC
 ATGAGTTAGT ATGAGTCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGG AAGAAAGGGA TTAGTACTA
 CAAAAGGAAA TTTGATTCG TACTTGAAG GCACCAAAAT CATCAAGCA GCAAAAGACA
 TGGCGGAGAT AAGGTCCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAG TAATGAACAA CTGTGTGCTT
 ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAGTG CCGGTCGAC CATAACCCGT
 CGTCTAGCCC GCCCAAAAGC TTTGATGTA TGCCATGAG CCGAAGAAAGG
 TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCCTCC ACCCCCTTTC
 CTAAGCACAA AATTAAGAAAT GTTCAGAGG TTAGGTGAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC

Fig. 8B

【図 8 D】

TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTACGGTG GTCCTAAATA GTCAGCATAG TACATTTTAT
 CTGACTAATA CTACACACCC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAAACATG CTCGGGCGCC
 GCGCCTTTCC GCGCCCCACT GCGATGTGGA GCGCCGCGAG AAGGAGGCGAG GCGGCGCGGA
 TGCTTGCCCG CAACCGGCTG GCTTCTCAAA TCCAGCAACT GACCACAGCC GTACGTGCCC
 TAGCTATTGG ACAGCGCACT AGACCTTCAAC CCCACGCTCC AGCCCGCGCA CCGCGCGAGA
 AGAAGCAGCG GCGCAAGCAA ACCCGGAGAG CAGAGAAACG AAAAACGCGAG GAGAGAGAGA
 AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCCGCGA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG
 CCGACAGATT GTTCGACGTC AAGACAGAGG ACCGAGATGT CATCGGCGAC GCACCTGGCCA
 TGAAGGAAA GGTATGAAA CCTCTGACAG TGAAGGAAC CATCGACCAC CCTGTGCTAT
 CAAAGCTCAA ATTTACCAAG TGCTTACAGT ACCGATATGGA GTTCGACAGT TTGCGAGTCA
 ACATGAGAAG TAGGACATCT ACCTACAGCA GTAGACAGATC TATACCTGGC
 ACCACGGAGC GGTGCGATAT AGTGAAGGTA GATTTACCAT CCGTTCGCGA GTAGAGAGCG
 GAGGAGACAG CCGTCTGCTG AAGACAGAGG CCGTCTGCTG ATAGTCTGCG ACATGCTTGC
 GTGGCGCTGA TGAAGGAACA CGAAGTCCCG TTTCCGCTGT CACCTGGAAT AGTAAAGGGA
 AGACAATTA GAGCAGCCCG GAGGGGACAG AAGAGTGGTC CCGAGCACCA CTGGTCAGCG
 CAATGTGTTT GCTGGAAAT GTGAGTCTTC CATGGACCG CCGCGCCACA TGCTATACCC
 GCGAACCCTC CAGAGCCCTC GACATCTGTT AAGAGAACGT GAACCATAGG GCCTACGATA
 CCTGTCTCAA TGCAATATTG CCGTGGGATG CGTCTGGCAG AAGCAAAAGA AGCGTCAATTG
 ACAGCTTTAC CCGTACGACC CCGTACTTGG GCACATGCTC GTACTGCCAC CATACTGTAC
 CGTGTCTTAC CCGTGTAAAG ATCGAGCAGG TCTGGGACGA AGCGGACGAT AACACCATAT
 GCATACAGAC TTTCCGCCAG TTTGGATAG ACCAAAGCGG AGCAGCAAGC GCAAAACAAGT
 ACCGCTACAT CTCGCTTAAAG CAGGATACCA CCGTTAAAGA AGGCACCATG GATGACATCA
 AGATTAGCAC CTGACGAGCG TGTAAGAAGG GCATAGTGA TAGCACTCA GCAACGTCAT
 AATGCCCTCC AGGGGACAGC GTAACGGTTA GCATAGTGA TAGCACTCA GCAACGTCAT
 GTACACTGCG CCGCAAGATA AAACCAAAAT TCGTGGGAGC GGAATAATAT GATCTACCTC
 CCGTTCACCG TAAAAAAATTT CTTGTACACG GTAGCAGCCG TCTGAAAGAA ACAACTTGAG
 GCTACATCAC TATGACAGCG CCGAGACCGC ACCTTATAC ATCCTACCTG GAAGAATCAT
 CAGGGAAGAT TTACGCAAAAG CGCCCATCTG GGAAGAACAT TACGTATGAG TGAAGTGGC
 GCGACTACAA GACCGGAACC GTTTCGACCC GCACGGAAT CACTGGTTCG ACCGCCATCA
 AGCAGTGGCT CCGCTATAAG AGCGACAAA CGAAGTGGGT CTTCAACTCA CCGGACTTGA
 TCAGACATGA GCACACACAG GCCCAAGGGA AATTGCATTT GCTTTTCAAG TTGATCCCGA
 GTACCTGCTT GTTCCGCTGT GCCACGCGCG CGAATGTAAT ACATGGCTTT AAACACATCA
 GCTTCAATAT AGATACAGAC CACTTGACAT TGCTCACCA CAGGAGACTA GGGGCAAAAC
 CCGAACCAAC CACTGAATGG ATCTGCGGAA AGACGGTCAG AAACCTCACC GTGACCGGAG
 ATGGCCTGGA ATACATATGG GGAATCATG AGCCAGTGAG GTGTATGCG CAAGAGTCAG
 CACCAGGAGA CCTCAGCGA TGCCACACG AAATAGTACA GCAATCTAC CATCGCCATC
 CTGTGTACAC CATCTAGCC GTGCGATCAG CTACCGTGGC GATGATGATT GCGCTAAGTC
 TTGCACTGTT ATGTGCGCTT AAAGCGCGCC GTGAGTGGCT GACGCCATAC GCGCTGGCCC
 CAAACGCGCT AATCCCAAT TCGTGGGAC TCTTGTGCTG CGTATAGCTG GCGAATGCTG
 AAACGTTTAC CGAGACCATG AGTTACTTGT GGTGCAACG TCAGCGGCTG TTTGTTGGTC
 AGTTTGGCTG ACCTTTGGCC GCTTTATCAG TTTAATGCG CTGCTGCTCC TGCTGCTGCG
 CTTTTTATG GTTTCGCGCG GCTTACTGCG CGAAGTAGA CGCTACGAA CATGCGGACA

Fig. 8D

【図 8 C】

2580 CGCACACTCC CCGATTCGTT CCGCGCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG 5100
 2640 CTCTCTCTGC ACAGGCGGAG GAGGCGCCCG AAGTGTAGC GACACCGTCA CCACTACAG 5160
 2700 CTGATAACAC CTCCTTGAT GTACAGACA TCTCACTGGA TATGGATGAC AGTAGCGAAG 5220
 2760 GCTCACTTTT TCGAGCTTT AGCGGATCGG ACACTCTAT TACTAGTATG GACAGTGGT 5280
 2820 CCGACGAGCA TAGTTCATA GAGATAGTAG ACCGAGGGA GGTGGTGGT GCTGAGTTC 5340
 2880 ATGCGCTCCA AGAGCTGCC CTTATTCAC CGCCAGGCT AAAGAAGATG GCCCGCTGG 5400
 2940 CAGCGGCAAG AAAAGAGGCC ACTCCACCG CAAGCAATAG CTCTAGTCC CTCCACCTCT 5460
 3000 CTTTGTGGTG GGTATTCATG TCCCTCGGAT CAATTTTCCA CGGAGAGAC GCCCGCAGG 5520
 3060 CAGCGGTACA ACCCTGGCA ACAGGCGCCA CGGATGTGCC TATGCTTTT GGTGCTGTTT 5580
 3120 CCGACGAGCA GATTGATGAG CTGAGCGGCA GAGTAACTGA GTCCGAACCC GTCCGTTT 5640
 3180 GATCATTTGA ACCGCGCGAA GTGAACCTAA TTATATGCT CCGATCAGCC GTATCTTTT 5700
 3240 CACTACGCAA GCAGAGACGT AGACGAGGA GCAGGAGAC TGAATCTGA CTAACCGGG 5760
 3300 TAGTGGGTA CATATTTTTC ACAGGACAGC GCGCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCTGTC 5820
 3360 TGCAGAACCA GCTTACAGAA CCGACCTTGG AGCGCAATG CCGGAAAGA ATTCATGCC 5880
 3420 CGGTGCTCGA CAGCTCGAAA GAGGAAACAA TCAAACTGAG GTACCCAGG 5940
 3480 AAGCAACAA AAGTAGGTAC CAGTCTGTA AAGTAGAAA TCAGAAAGCC ATAACCACTG 6000
 3540 AGCGACTACT GTCAGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA 6060
 3600 AGATCACCCT TCGAAACCA TTGACTCCA GTAGCTACC GGCAGTCC TCCGATCCAC 6120
 3660 AGTTCGCTGT AGCTGCTGT AACAACTATC TGATGAGAA ATACCCGCA GTAGCATCT 6180
 3720 ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGT CAGCAGGGA GTCCGCTGCC 6240
 3780 TGGATATGCG AACCTCTGCG CCGCTAAGC TTAGAAGTA CCGGAAAAA CATGATATA 6300
 3840 GAGCGCGGAA TATCCCGAGT GCGGTTCAT CAGCGATGA GAACAGGCTA CAAAATGTC 6360
 3900 TAGTGGGTA CATATTTTTC ACAGGACAGC GCGCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCTGTC 6420
 3960 ACTCAGGACG ATTCATGTC GAATGCTTTC GAAATATGT ATGTAATGAG GAGTATTGG 6480
 4020 AGGAGTTCCG TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGATGT TGTGATGGA TATGATGCT 6540
 4080 GACTGAAAGG CCTAAGGCC GCGCATAT TTGCAAGAC GTATAATTTG GTCCCATTCG 6600
 4140 AAGAGTGCC TATGATAGA TTTGCTATG ACATGAAAG AGACGTGAAA GTTACACCG 6660
 4200 GCAGCAACCA CACAGAGAA AGACCGGAGG TACAAGTGA ACAGCCGCA GAACCCCTGG 6720
 4260 CGACTGCTTA CTTATCGGGG ATTCACCGGG AATTAGTGG TAGGCTTACG GCGCTCTGCG 6780
 4320 TTCAAAACT TACACGCTT TTTGACATGT CCGCGGAGGA TTTTGTGGA TATAGGACG 6840
 4380 AACACTTCAA GCAAGCGGAC CCGTACTGAG AGACGATAT CCGATCATTG GACAAAGGCC 6900
 4440 AAGACAGCG TATGGCTTA ACCGCTGTA TGATCTTGA GACCTGGGT GTGATCAAC 6960
 4500 CACTACTGCA TTTGATCGAG TGCGCTTTG GAGAAATATC ATCCACTAGC ATCCCTACGG 7020
 4560 CTACTGCTTT TAAATTCGGG GCGATGATGA AATCCGGAAT GTTCTCACA CTTTGTGTC 7080
 4620 ACAGAGTTT TAAATGCTGT ATCGCGAGCA AGAGCGGATG AGAGCGGATG ATTAGGCTCA 7140
 4680 GATGTGAGC GTTACTGGG GACGACACA TCATACATG AGTAGTATC GACAAAGAAA 7200
 4740 TGGTGAGAG GTGCGCCAC TGCTCAACA TGAAGTTAA GATCATCGAC GCGATCATC 7260
 4800 GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGCGCGGAT TTTTCTGCA AGATTGCTG ACTTCCACAG 7320
 4860 CGTGGCGGT GCGGCTGCC CTGAAAGGC TGTTTAAGT GGGTAAACCG CTCCAGGCTG 7380
 4920 ACAGCAGCA AGACGAGAC AGAAGACGCG CTCTGCTGA TGAACAAAG GCGTGTGTTA 7440
 4980 GAGTAGGTAT AACAGCAC TTAGCAGTGG CCGTACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA 7500
 5040 TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAACT TTGCGCAG CAAAAGAGCA TTCAAGGCA 7560

Fig. 8C

【図 8 E】

7620 CTGTCCAAA TGTGCCACAG ATACCGTATA AGGCACTTGT TGAAGGGCA GGGTATGCC 10140
 7680 CGCTCAATTT GAGAGTCACT GTACGTCTT CCGAGGTTTT GCGTTCACC AACCAAGAGT 10200
 7740 ACATTACTCT CAAATTCACC ACTGTGTTCC CTTCCCAAAA AATCAATGTG TCGGCTGCT 10260
 7800 TGGAGTGTCA GCGCGCGCT CATGAGACT ATACCTGCAA GGTCTTCGGA GGGGTCTACC 10320
 7860 CCTTATGTG GGGAGAGCG CAATGTTTTT CCGACAGTGA GAACAGCCAG ATGAGTGAG 10380
 7920 GGTACGTGCA ATTTCAGCA GTATGCGGT CTGACACCG CAGGCGGATT AAGGTGACA 10440
 7980 CTGCGCGGAT GAAAGTAGA CTGCGTATTG GTTACGGGAA CACTACCACT TTTCTAGAT 10500
 8040 GTACGTGAA CCGAGTCACA CCAGGAACGT CTAAGACTA GAAAGTCA GCTGGACCA 10560
 8100 TTTACGACT GTTACGCCA TTGATCATA AGGTCGTTAT CATTCGCGCG CTGTGTGATA 10620
 8160 ACTATGACTT CCGGAATAT GAGCGGATGA AACAGGAGC TTTTGGAGC ATTCAGGCTA 10680
 8220 CCTCTTGAC TAGCAAGAT CTACCTGCGA GCACAGACAT GAGGTACTC AGGCTTCCG 10740
 8280 CCAAGACGT GATGTCCCG TACACGAGG CCTCATCAGG ATTTGAGATG TGAAGAACCA 10800
 8340 ACTCAGCGCG CCGCATGCG GAAACCGCAC CTTTCCGGTG TAAGATTGCA GTAAATCCG 10860
 8400 TCCGAGCGT GGAATGTTA TACGGGAACT TTTCCATTTT TATGACATC CCGAGCGCTG 10920
 8460 CTTTATCATG GACATCAGAT GCACCACTG TCTCAACAGT CAATGTGAA GTGCTGAGT 10980
 8520 GCACCTATTC AGCAGACTC GCGGGATGG CCACCTGCA GTATGTATCC GACCGGAG 11040
 8580 GTCAATGCC CGTACATTG CATTCGAGCA CAGCAACTCT CCAAGAGTGC ACAGTACAT 11100
 8640 TCTGGAGAA AGGAGCGGTG ACAGTACAT TTAGCAGCG GAGTCCACAG GCGAAGCTTA 11160
 8700 ATGTATGCT GTGTGGGAG AAGACAACAT GCAATGCGA AGTAAACCA CCGACTGACC 11220
 8760 CATGCTGAG CACCCCGCAC AAAAATGACC AAGAAATTTA AGCCGCTATC TCAAAAACAT 11280
 8820 CATGGAGTG GCTGTTTGG CTTTTCGCG GCGCTCTGC GTATTAAAT ATAGGACTTA 11340
 8880 TGATTTTTG TTGAGCATG ATGCTGACTA GCACAGAG ATGACCGCTA CCGCCCAATG 11400
 8940 GTCCAGCAC CAAAACCTGA TGTACTTCC AGGAACCTGAT GTGCAATAT CATCAGGCT 11460
 9000 GTACATTAGA TCCCGCTTA CCGCGGCAA TATAGCAACA TAAAAAATC GATGACTCT 11520
 9060 CGAGGAAGCG CAGTGCATAA TGCTGCGCAG TGTGCGACA TAACCACTAT ATTAACCAT 11580
 9120 TATCTAGCG ACCCCAAAAA CTAATGTAT TTTGAGGAA GCGTGGTGA TAAAGCCAG 11640
 9180 CAGCGCTCG ATAACCTTTA TTTTCTTT TATTAATCAA CAAAATTTG TTTTAACT 11700
 9240 TTTAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA 11740

Fig. 8E

【図 9 A】

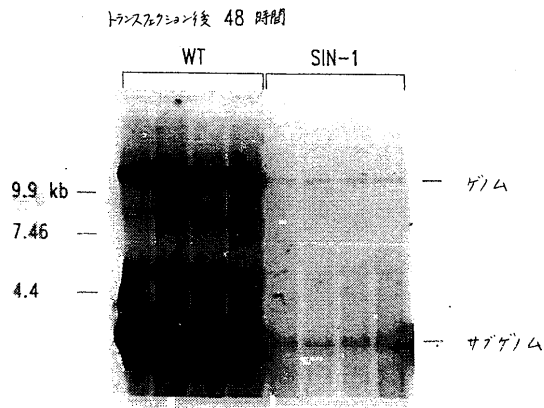


Fig. 9A

【図 9 B】

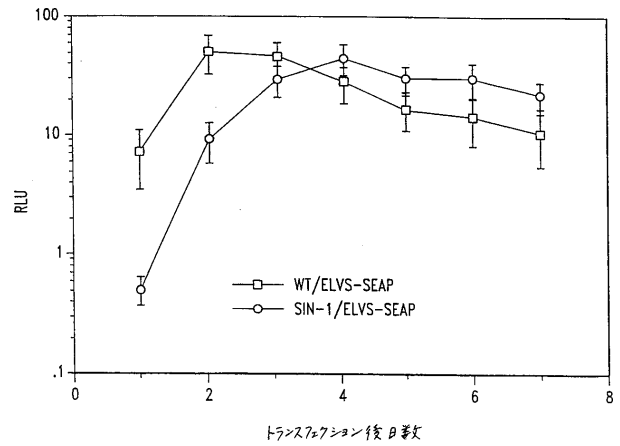


Fig. 9B

【図 10】

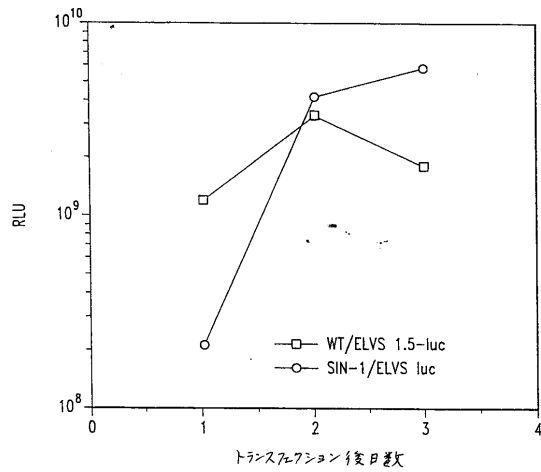


Fig. 10

【図 11 A】

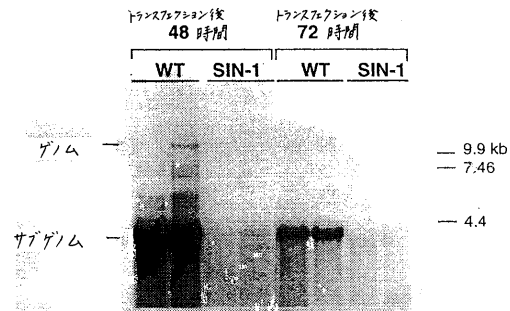
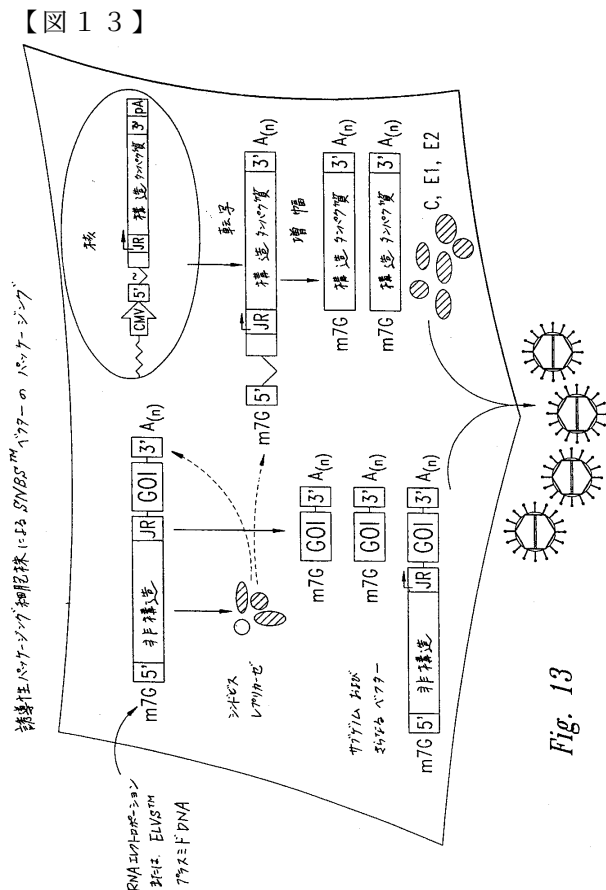
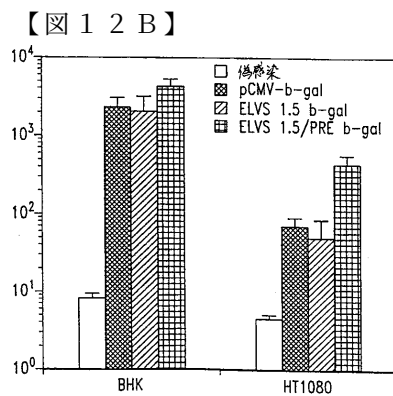
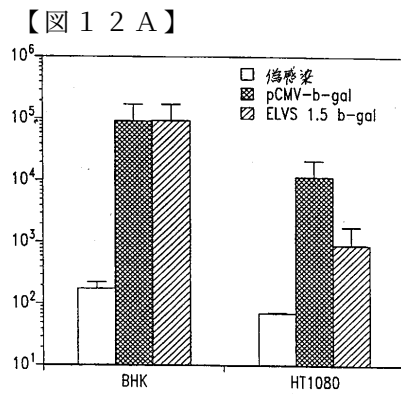
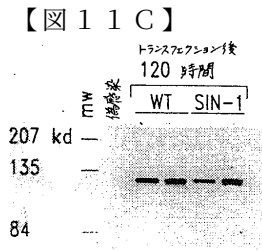
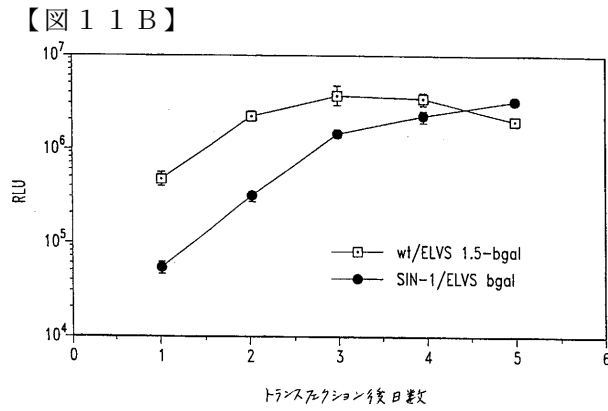


Fig. 11A



【図 14】

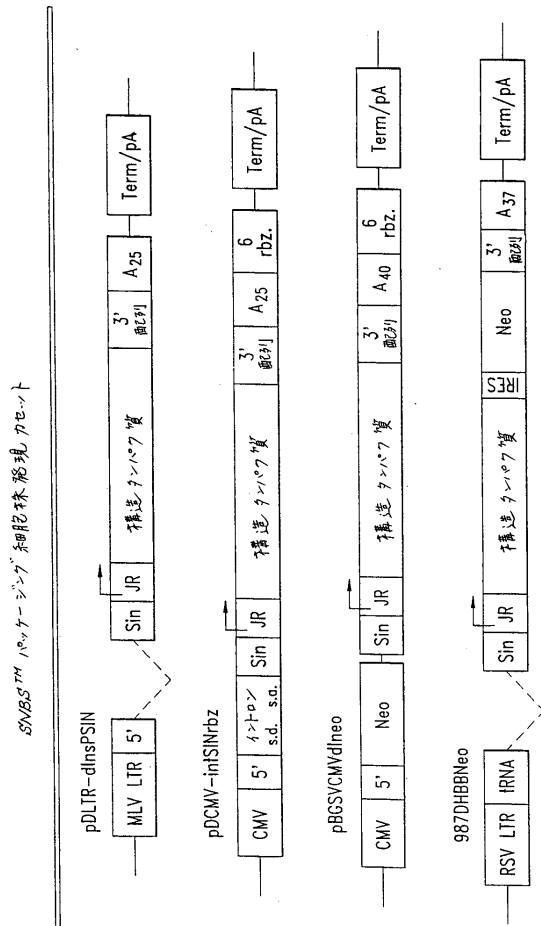


Fig. 14

【図 15】

pDCMV-intSINrbz および 987BB 由来 PCL による
SNBS™-ルシフェラーゼ ベクターパッケージング

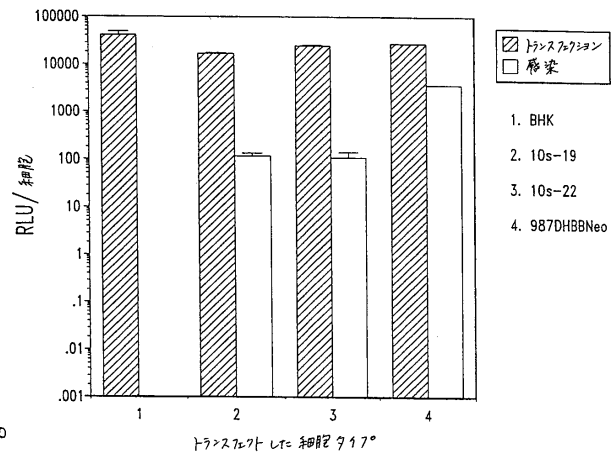


Fig. 15

【図 16】

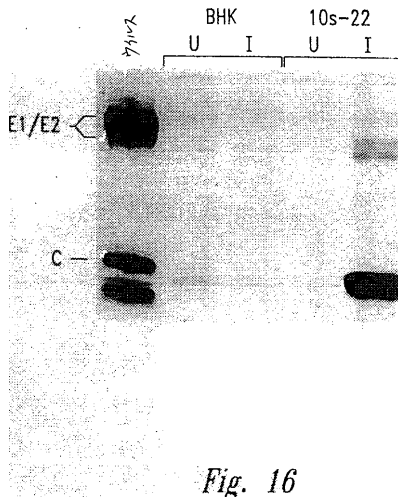


Fig. 16

【図 17A】

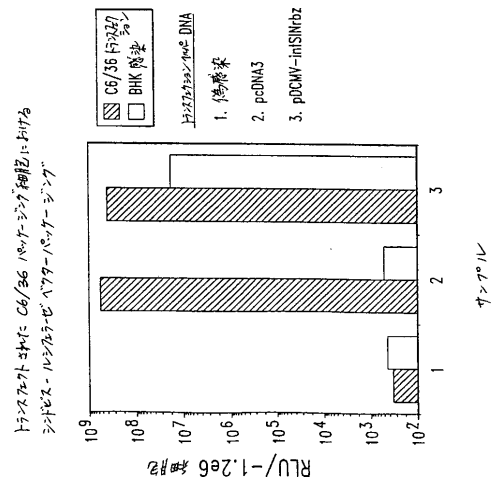
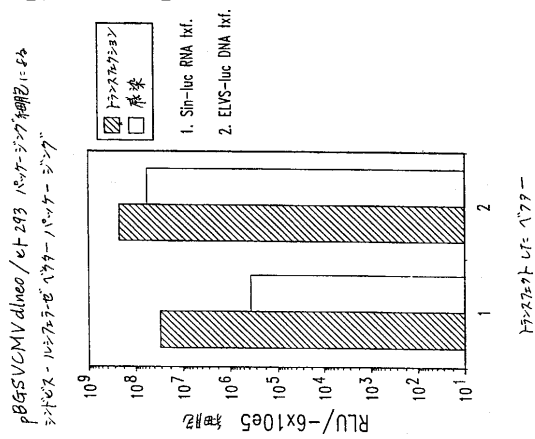


Fig. 17A

【图 17 B】



【図 18】

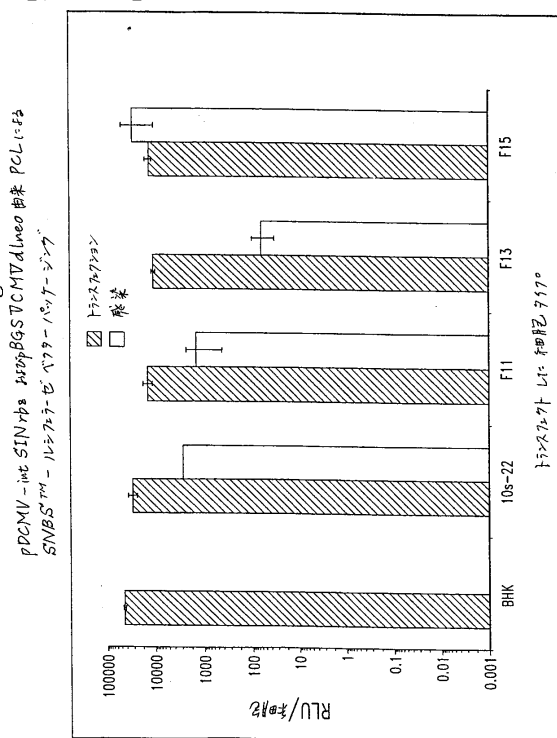


Fig. 18

【図 19】

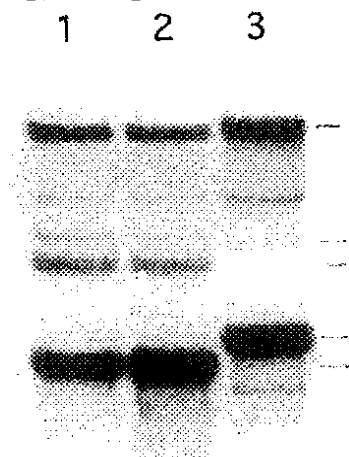


Fig. 19

【図 20】

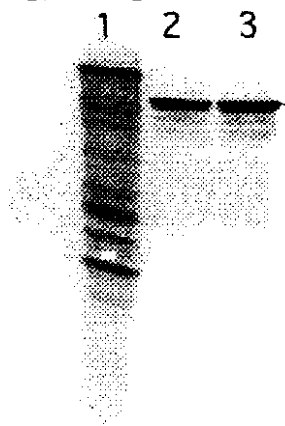


Fig. 20

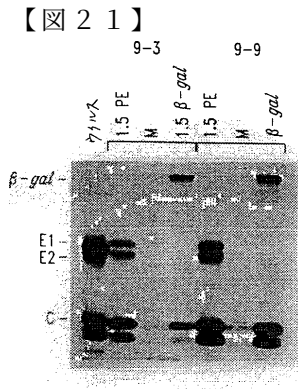


Fig. 21

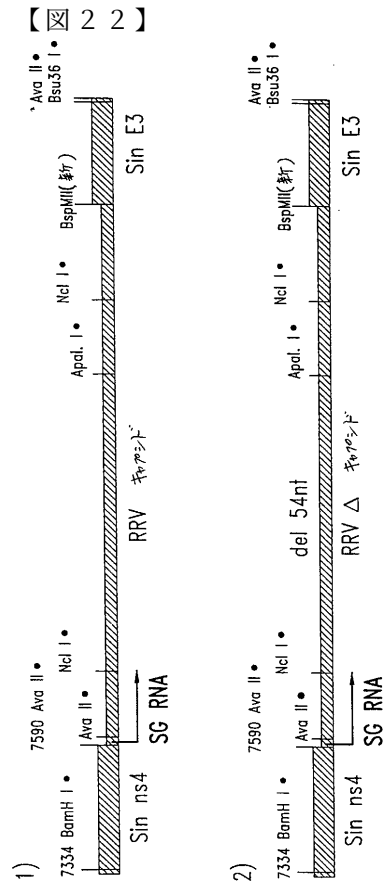


Fig. 22

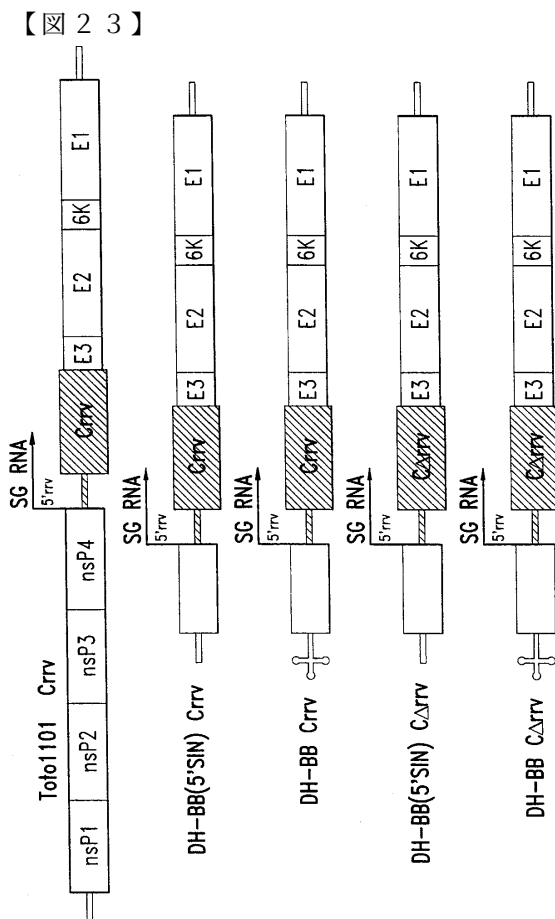


Fig. 23

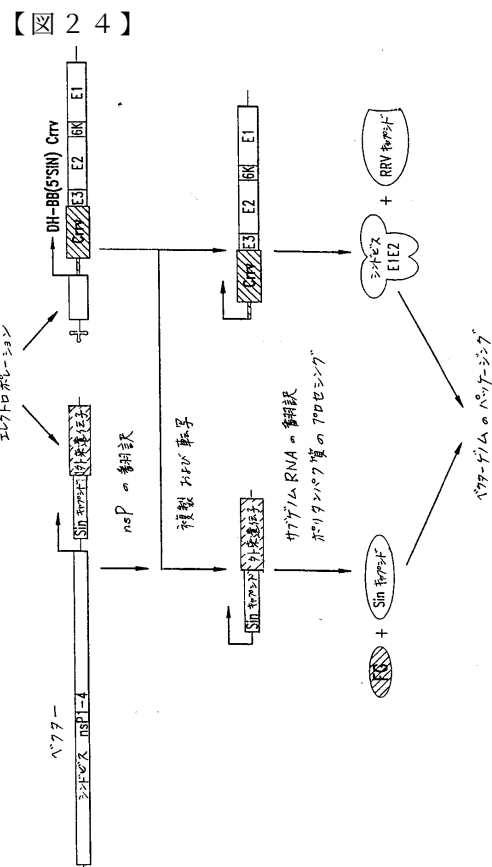
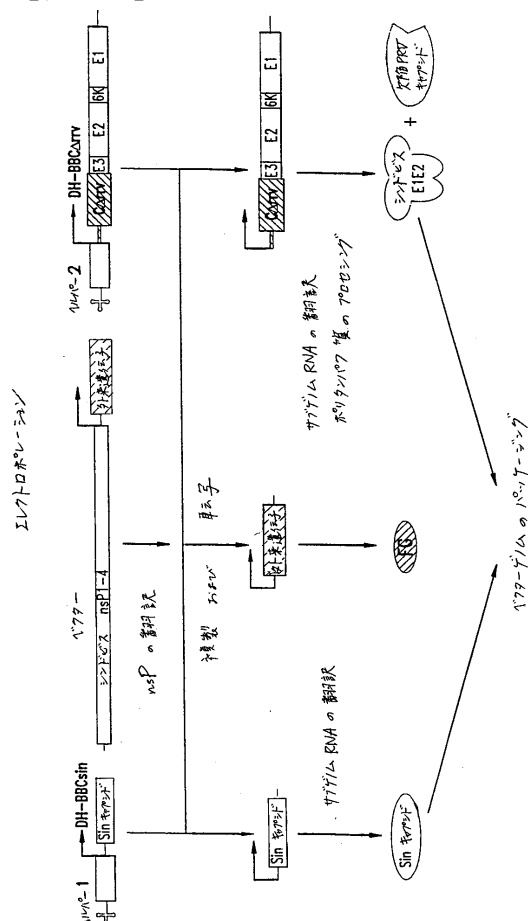


Fig. 24

【図 25】



【図 27】

SNBSTM ベクター および PCL を用いる連続増幅および組換えクローニングの発見

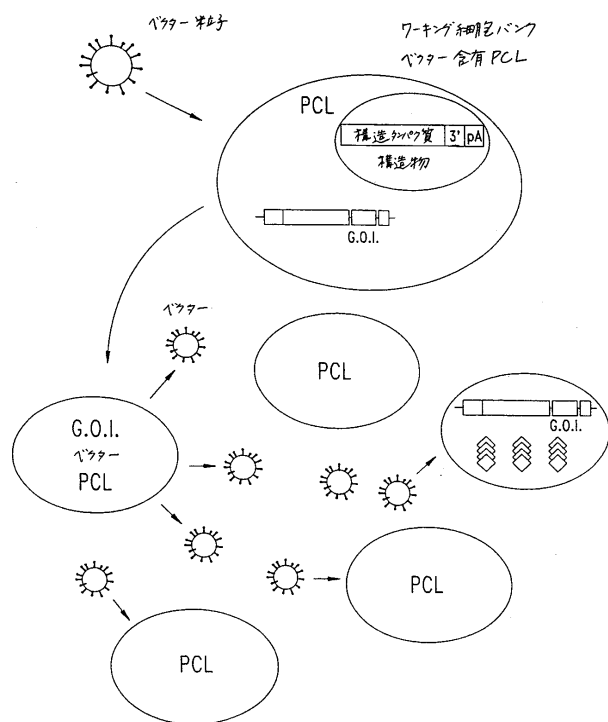


Fig. 27

【图 2 6】

<u>データー</u> <u>レプリコン (バクター)</u>	<u>ヘルパー (全RNA 5')</u>	<u>感染量 1μl/ml</u>	<u>pfu/ml</u>
1. SINrep/LacZ	DHBBrrvSin-gps	5x10 ⁻⁸	1.5x10 ⁻⁶ 数個ハ
2. " "	DHBBcSin + DHBB(C 欠失 RRVSin-gps)	5-10x10 ⁻⁹	1.5x10 ⁻⁷ ハ
3. Sinrep/キャプソド	DHBB(C 欠失 RRVSin-gps)		6x10 ⁻⁷

後者(おびゲル)は、シトメグマウイルスキャリアのみが、両者バトランスフェクト細胞に感染したとき細胞外粒子を取り込むようになることを示す。

III 構築物

A Toto1101 - RRV キャパシト遺伝子の挿入のための部位

B RRV - RRVキャプシド遺伝子のクローニングのために用いた部位

C キメラ

- 1) 完全 RRV キャロシド遺伝子
- 2) nt 7835-7888 バス失した RRV キャロシド遺伝子

Fig. 25

Fig. 26

【图 28】

ELVS-lac Z での PCL のトランスフェクションによる
レポーター遺伝子発現の増幅

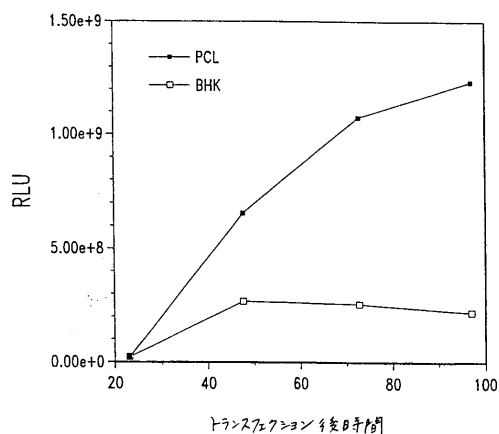
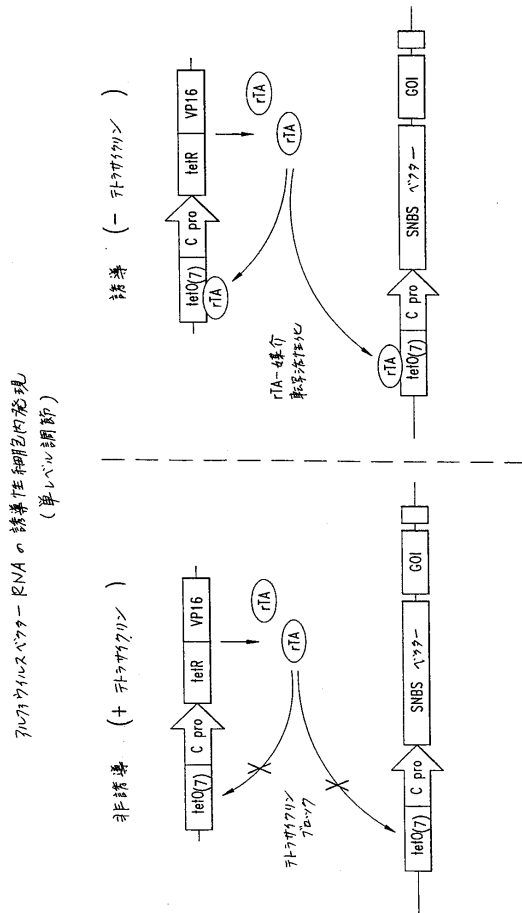
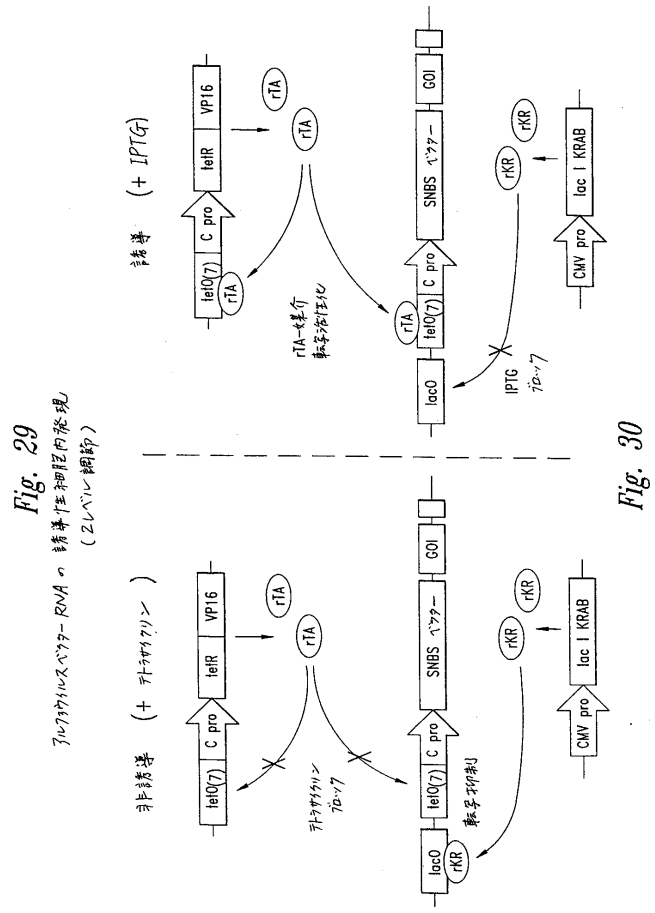


Fig. 28

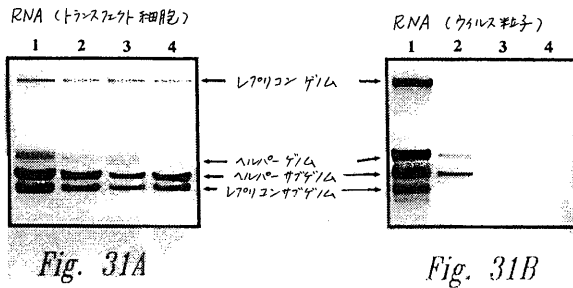
【図 29】



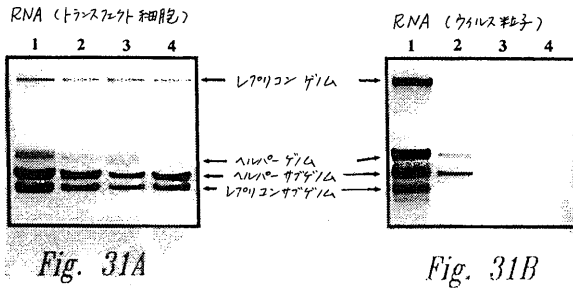
【図 30】



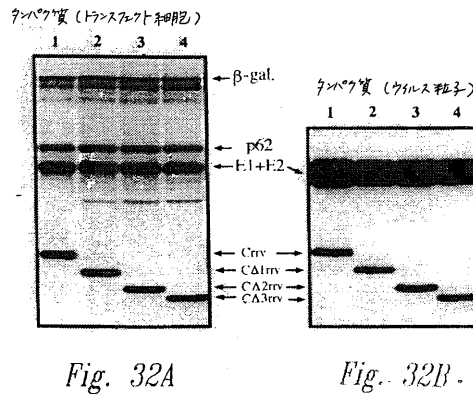
【図 31 A】



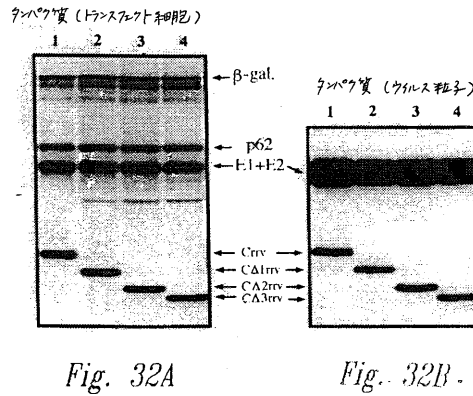
【図 31 B】



【図 32 A】



【図 32 B】



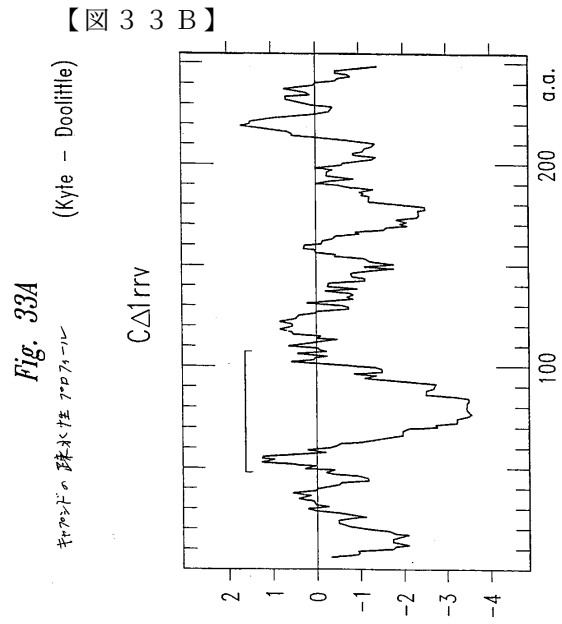
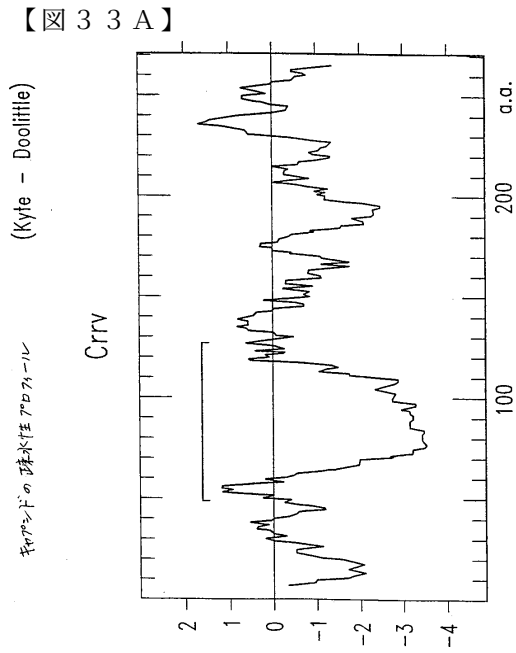


Fig. 33B

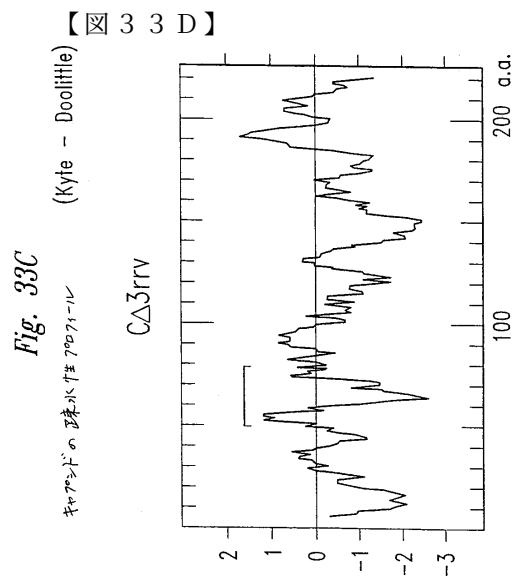
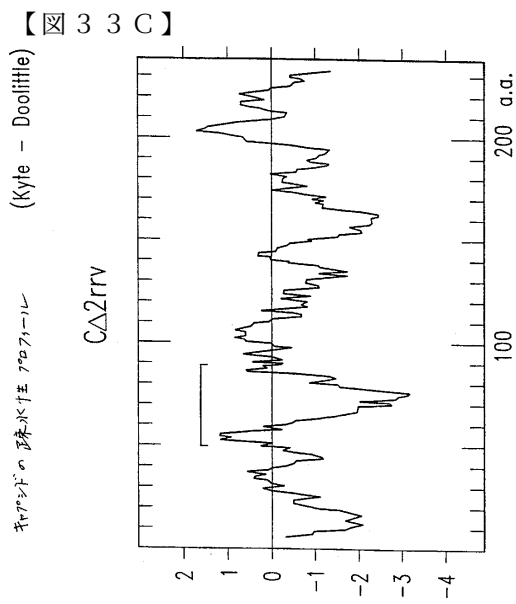


Fig. 33D

Fig. 33A

【図 3 4】

$\begin{matrix} + & + & + & + & + \\ \text{Crrv} & \text{MNYIPTQIFYGRVRPRPAFRRQVNSMQPTPTWVTPMLQAPDLQAGDMQDLISAVSALTT} & 60 \\ \text{Crrv}\Delta 1 & \text{MNYIPTQIFYGRVRPRPAFRRQVNSMQPTPTWVTPMLQAPDLQAGDMQDLISAVSALTT} & \\ \text{Crrv}\Delta 2 & \text{MNYIPTQIFYGRVRPRPAFRRQVNSMQPTPTWVTPMLQAPDLQAGDMQDLISAVSALTT} & \\ \text{Crrv}\Delta 3 & \text{MNYIPTQIFYGRVRPRPAFRRQVNSMQPTPTWVTPMLQAPDLQAGDMQDLISAVSALTT} & \end{matrix}$

$\begin{matrix} + & + & + & + & + & + & + & + & + & + & + & + & + & + & + \\ \text{Crrv} & \text{KGNVAPKGGRRKKQDKPKKKKKPTDKKKQDQKKPKPAKKKKPKRRRMCKKIE} & 120 \\ \text{Crrv}\Delta 1 & \text{KGNVAPKGGRRKKQDKPKKKKKPTDKKKQDQKKPKPAKKKKPKRRRMCKKIE} & \\ \text{Crrv}\Delta 2 & \text{KGNVAPKGGRRKKQDKPKKKKKPTDKKKQDQKKPKPAKKKKPKRRRMCKKIE} & \\ \text{Crrv}\Delta 3 & \text{KGNVAPKGGRRKKQDKPKKKKKPTDKKKQDQKKPKPAKKKKPKRRRMCKKIE} & \end{matrix}$

$\Delta 1$ rrv - del 8 Lys
 $\Delta 2$ rrv - del 15 Lys
 $\Delta 3$ rrv - del 19 Lys

Fig. 34

【図 3 5】

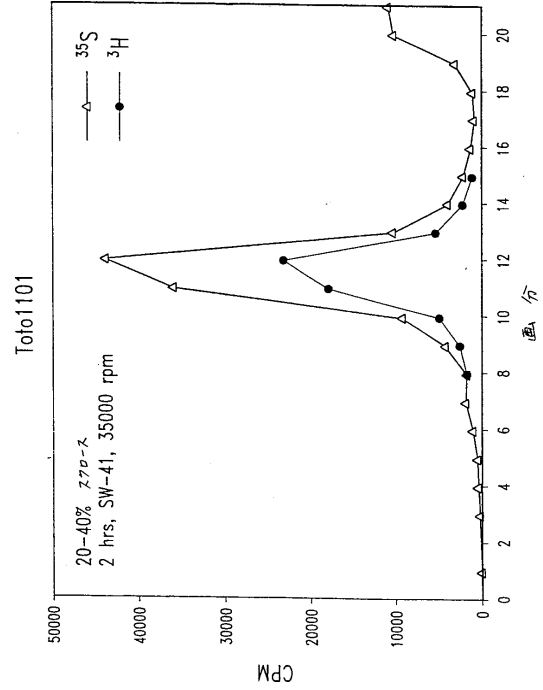


Fig. 35

【図 3 6】

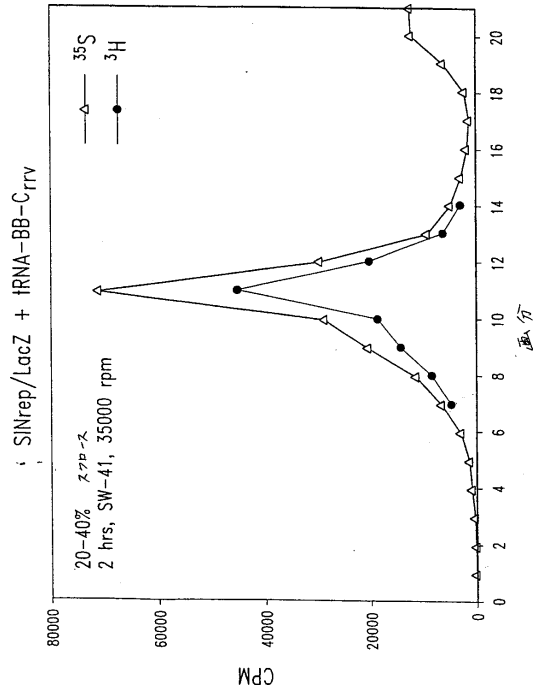


Fig. 36

【図 3 7】

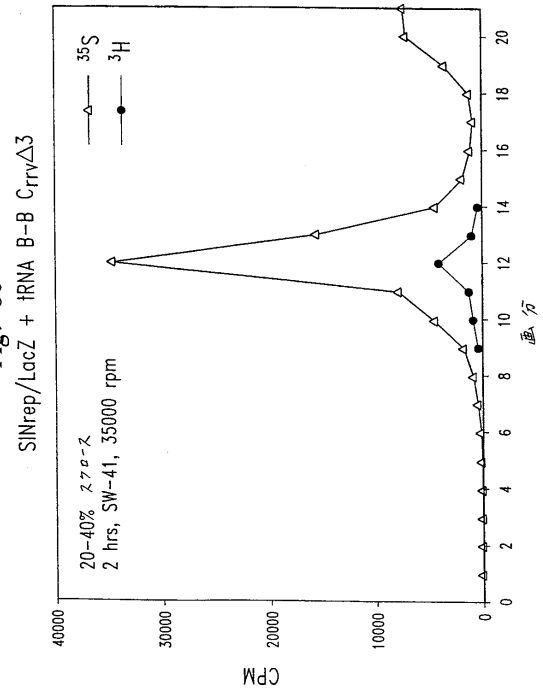
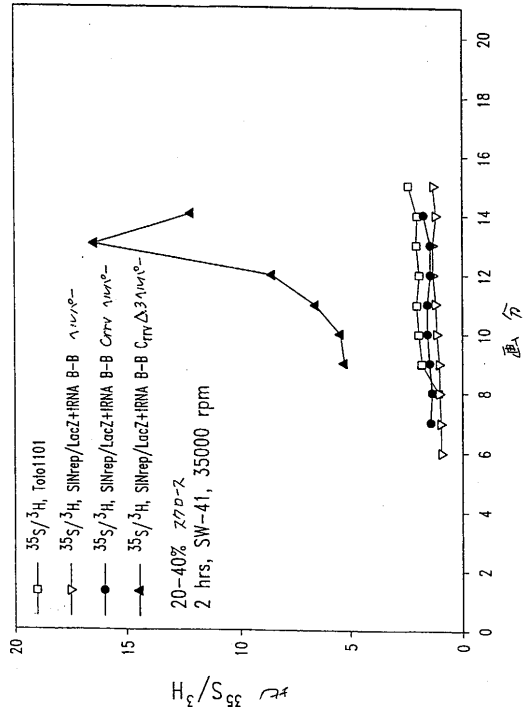


Fig. 37

【図 38】



【図 39】

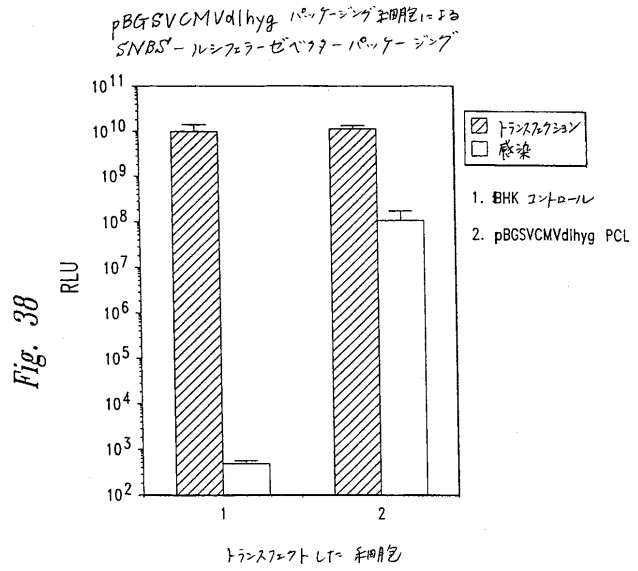


Fig. 39

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C

(31)優先権主張番号 08/679,640

(32)優先日 平成8年7月12日(1996.7.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC 97502

微生物の受託番号 ATCC VR-2526

微生物の受託番号 ATCC VR-2527

(72)発明者 デュベンスキー, トーマス ダブリュー. ジュニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067, ランチョ サンタフェ, ピー. オー. ボックス
675205 (番地なし)

(72)発明者 ポロ, ジョン エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92024, エンシニタス, ウィサム ロード 221

(72)発明者 ベリー, バーバラ エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92124, サンディエゴ, デスベジョ プレイス 5850

(72)発明者 シュレシnger, ソンドラ
アメリカ合衆国 ミズーリ 63105, セント ルイス, マクファーソン ストリート 6320

(72)発明者 ドライガ, サーゲイ エイ.
アメリカ合衆国 ミズーリ 63105, セント ルイス, サウスウッド アベニュー ナンバー
3 6334

(72)発明者 フロロブ, イリヤ
アメリカ合衆国 ミズーリ 63105, セント ルイス, クロムウェル ドライブ ナンバー2
エスイー 7515

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表平07-506370 (JP, A)
特表平06-501161 (JP, A)
特表平05-504681 (JP, A)
J.Virol., Vol.33, No.1(1980)p.463-474
Virology, Vol.228, No.1(1997.Feb.)p.74-83
The EMBO Journal, (1994), 13(12), p2925-2934
Virology, (1992), 191, p932-940
Journal of Virology, (1996-1), 70(1), p508-519
Journal of Virology, (1993), 67(6), p3605-3610
Virology, (1990), 177, p199-208

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)