

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4153607号
(P4153607)

(45) 発行日 平成20年9月24日(2008.9.24)

(24) 登録日 平成20年7月11日(2008.7.11)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 7/00 (2006.01) C 1 2 N 7/00
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 48/00 (2006.01) A 6 1 K 48/00

請求項の数 5 (全 14 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平10-328566 (22) 出願日 平成10年11月18日(1998.11.18) (65) 公開番号 特開2000-152781(P2000-152781A) (43) 公開日 平成12年6月6日(2000.6.6) 審査請求日 平成17年11月8日(2005.11.8)</p> <p>特許法第30条第1項適用 平成10年10月13日国立教育会館において開催された第46回日本ウイルス学会学術集會に文書をもって発表</p>	<p>(73) 特許権者 000002912 大日本住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号 (74) 代理人 100095832 弁理士 細田 芳徳 (72) 発明者 齋藤 泉 東京都渋谷区代々木2丁目37番15-4 12号 (72) 発明者 鐘ヶ江 裕美 東京都品川区西五反田8丁目10番14- 1405号 審査官 三原 健治</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な組換えアデノウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記配列：

- (1) 左端逆方向反復配列、
- (2) パッケージング配列、
- (3) 前記左端逆方向反復配列と前記パッケージング配列の中間領域であって、ヒトアデノウイルス5型の143 ~ 148位のいずれかに位置するリコンビナーゼ認識配列、および
- (4) 前記パッケージング配列の下流領域に位置する、前記リコンビナーゼ認識配列を認識するリコンビナーゼにより認識される少なくとももう1つのリコンビナーゼ認識配列、をゲノム中に含有してなる、ヒトアデノウイルス5型の組換えアデノウイルス。

10

【請求項2】

リコンビナーゼ認識配列がバクテリオファージP1由来のリコンビナーゼCreの基質である、請求項1記載の組換えアデノウイルス。

【請求項3】

リコンビナーゼ認識配列がloxP配列である、請求項2記載の組換えアデノウイルス。

【請求項4】

リコンビナーゼ認識配列が酵母由来のリコンビナーゼFLPの基質である、請求項1記載の組換えアデノウイルス。

【請求項5】

リコンビナーゼ認識配列がFRT配列である、請求項4記載の組換えアデノウイルス。

20

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、組換えアデノウイルスに関する。

【0002】**【従来の技術】**

アデノウイルスベクターは、遺伝子導入効率の高さ、高力価ウイルス液の調製の容易さ、非増殖細胞にも遺伝子導入可能などの利点から、遺伝子治療用のベクターとして有望視されている。現在汎用されているアデノウイルスベクターは、アデノウイルスの増殖に必須なE1遺伝子を欠失させた非増殖型アデノウイルスベクターであるが、ヒトや動物個体に投与した場合、アデノウイルス蛋白質が発現することが知られており、安全性の観点から、ウイルスにコードされる蛋白質がなるべく発現しない構造のベクターが望まれている。

10

【0003】

そのベクターの構造とは、治療用遺伝子など目的の外来遺伝子を挿入し、かつアデノウイルス由来の蛋白質をコードする遺伝子の一部もしくは全てを除いたものである。しかし、かかる性質を保持するウイルス（目的ベクターウイルス）は単独では増殖できないため、もう一つのアデノウイルス（ヘルパーウイルス）とともに宿主細胞に感染させ、ヘルパーウイルスから供給されたアデノウイルスの増殖に必須の蛋白質により、ヘルパーウイルスとともに目的ベクターウイルスも増殖させるという方法が取られている（Mitani, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.92, 3854-3858 (1995)）。このヘルパーウイルスを用いた組換えアデノウイルス作製法においては、目的ベクターウイルスに対しヘルパーウイルスの量が少ない、すなわちヘルパーウイルスの増殖が抑制されているほど望ましい。

20

【0004】

そのための方策の一つとして、ヘルパーウイルスゲノムのパッケージング配列の両側にリコンビナーゼCreの認識配列であるloxP配列を挿入したヘルパーウイルスを目的ベクターウイルスとともにリコンビナーゼCreを発現する宿主細胞に感染させて、パッケージング配列を除き、ヘルパーウイルスのゲノムDNAがウイルス粒子にパッケージングされなくなることにより、ヘルパーウイルスの増殖を抑制する工夫（Parks, R. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 13565-13570 (1996)）がなされている。

【0005】

パッケージング配列の両側にloxP配列を挿入したヘルパーウイルスは、それ単独で増殖させる場合は、増殖が抑制されないことおよび挿入したloxP配列が欠落しないことが重要であり、特にパッケージング配列の左側、すなわちアデノウイルス左端逆方向反復配列（inverted terminal repeat: ITR）とパッケージング配列との間のloxP配列の挿入部位は重要である。なぜならば、左端ITRとパッケージング配列との間に外来遺伝子を挿入可能な領域は、わずか100塩基足らずの範囲しかないからである。前述したヘルパーウイルスのloxP配列挿入部位は、アデノウイルス5型の塩基配列188位である（Parks, R. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 13565-13570 (1996)）。また、他のloxP配列の挿入例として、アデノウイルス5型の塩基配列193位と194位との間が報告されている（Hardy, S. et al., J. Virol. Vol.71, 1842-1849 (1997)）が、これらの挿入部位はいずれもパッケージング配列の直前であり、これらの部位がリコンビナーゼ認識配列の挿入部位として最善がどうかは明らかでない。

30

40

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、遺伝子治療の分野において一層安全性の高い遺伝子治療用ベクターの作製のための材料として、アデノウイルス左端ITRとパッケージング配列との間の新たな位置にリコンビナーゼ認識配列を挿入した組換えアデノウイルスを提供することにある。

【0007】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、ヒトアデノウイルス5型を用いて、左端ITRとパッケージング配列との間

50

で、リコンビナーゼ認識配列の挿入可能な部位を検索し、新たなリコンビナーゼ認識配列の挿入部位を発見した。かかる知見に基づき、当該部位にリコンビナーゼ認識配列の一つであるloxP配列を挿入した新たな組換えアデノウイルスを作製し、かつ当該アデノウイルスを、当該部位にloxP配列が挿入されていない他の組換えアデノウイルスと同等のウイルス力価を保持させることに成功した。

【0008】

すなわち、本発明の要旨は、

下記配列：

(1) 左端逆方向反復配列、
 (2) パッケージング配列、
 (3) 前記左端逆方向反復配列と前記パッケージング配列の中間領域であって、ヒトアデノウイルス5型の143 ~ 148 位のいずれかに位置するリコンビナーゼ認識配列、および
 (4) 前記パッケージング配列の下流領域に位置する、前記リコンビナーゼ認識配列を認識するリコンビナーゼにより認識される少なくとももう1つのリコンビナーゼ認識配列、をゲノム中に含有してなる、ヒトアデノウイルス5型の組換えアデノウイルス、に関する。

10

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明において、「組換えアデノウイルス」とは、アデノウイルス固有の塩基配列以外の塩基配列をそのゲノム中に含有するアデノウイルスのことをいう。アデノウイルス固有の塩基配列以外の塩基配列には特に制限はなく、蛋白質をコードする遺伝子やプロモーターやポリA配列などの調節遺伝子であってもよいし、また何ら機能を有さない塩基配列であってもよい。

20

【0010】

本発明において、「左端逆方向反復配列」（以下、左端ITRと略す）とは、アデノウイルスゲノムの複製開始に必須なゲノム両端の塩基配列のうち、左端（即ち、E1遺伝子の上流側）に存在する塩基配列のことをいう。その具体例として、ヒトアデノウイルス5型においては、塩基配列1位~103位が挙げられる。

【0011】

本発明において、「パッケージング配列」とは、アデノウイルスゲノムDNAがアデノウイルス粒子に挿入されるために必須の塩基配列をいう。その具体例として、ヒトアデノウイルス5型においては、塩基配列195位~358位が挙げられる。

30

【0012】

本発明において、「リコンビナーゼ認識配列」とは、特異的DNA組換え酵素である「リコンビナーゼ」により認識される塩基配列であって、「リコンビナーゼ」存在下に二つの「リコンビナーゼ認識配列」間で、DNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が可能となる塩基配列のことをいう。

【0013】

「リコンビナーゼ」の例としては、バクテリオファージP1由来のリコンビナーゼ Cre (Sternberg et al., J. Mol. Biol. Vol.150, 467-486 (1981))、酵母(Saccharomyces cerevisiae)の2ミクロンDNAによりコードされるFLP (Babineau et al., J. Biol. Chem. Vol.260, 12313-12319 (1985))、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のR (Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol.8, 955-962 (1988))などが挙げられる。

40

【0014】

本発明において、「パッケージング配列の下流領域」とは、パッケージング配列から右端（即ち、E1遺伝子の下流側）ITRの間の領域をいう。その具体例として、ヒトアデノウイルス5型においては、塩基配列359位以降が挙げられる。

【0015】

本発明において、「リコンビナーゼ認識配列がバクテリオファージP1由来のリコンビナ

50

ーゼCreの基質となる」とは、リコンビナーゼCreにより、二つの「リコンビナーゼ認識配列」間で、DNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が起きることをいう。「リコンビナーゼ認識配列」の典型的な例としては、バクテリオファージP1内の34塩基からなるloxP配列 (Abremski et al., J. Biol. Chem., 1509 - 1514 (1984) および Hoess et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.81, 1026 - 1029 (1984))が挙げられる。loxP配列は下記の塩基配列からなるDNA配列であり、以後この配列のことを野生型loxP配列という。

【0016】

5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3' (配列番号: 1)

3'-TATTGAAGCATAT TACATACG ATATGCTTCAATA-5' (配列番号: 2)

(前記配列中、下線部はスペーサー領域を示す)

【0017】

本発明において、「リコンビナーゼCreの基質となる『リコンビナーゼ認識配列』」とは前記野生型loxP配列に限定される必要はなく、二つの「リコンビナーゼ認識配列」がリコンビナーゼCre基質となる限りは、野生型loxP配列の一部が他の塩基に置換されていてもよい。さらに、野生型loxP配列の塩基の置換により、野生型loxP配列との組合せではリコンビナーゼCreの基質とならないloxP配列(変異型loxP配列)であっても、二つの同じ配列の変異型loxP配列どおしではリコンビナーゼCreの基質となる、すなわちDNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が起きる配列は、リコンビナーゼCreの認識配列に含まれる。そのような変異型loxP配列の例として、野生型loxP配列のスペーサー領域の一つの塩基を置換したloxP配列 (Hoess et al., Nucleic Acids Res. Vol.14, 2287-2300 (1986)) やスペーサー領域の二つの塩基を置換したloxP配列 (Lee, G. et al., Gene Vol. 14, 55-65 (1998)) が挙げられる。

【0018】

本発明において、「リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼFLPの基質となる」とは、リコンビナーゼFLPにより、二つの「リコンビナーゼ認識配列」間で、DNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が起きることをいう。「リコンビナーゼ認識配列」の典型的な例としては、酵母由来のFRT配列 (Babineau et al., J. Biol. Chem. Vol.260, 12313-12319 (1985))が挙げられる。FRT配列は34塩基からなるDNA配列で、本来の配列(野生型FRT配列)は野生型loxP配列と同様に一義的に規定されているが、本発明において、「リコンビナーゼFLPの基質となる『リコンビナーゼ認識配列』」とは前記野生型FRT配列に限定される必要はなく、二つの「リコンビナーゼ認識配列」がリコンビナーゼFLP基質となる限りは、野生型FRT配列の一部が他の塩基に置換されていてもよい。さらに、野生型FRT配列の塩基の置換により、野生型FRT配列との組合せではリコンビナーゼFLPの基質とならないFRT配列(変異型FRT配列)であっても、二つの同じ配列の変異型FRT配列どおしではリコンビナーゼFLPの基質となる、すなわちDNA鎖の切断、DNA鎖の交換と結合の全行程の反応が起きる配列は、リコンビナーゼFLPの認識配列に含まれる。

【0019】

本発明の組換えアデノウイルスは、さらに外来遺伝子を含有していてもよく、外来遺伝子としてはヒトの治療用遺伝子や、LacZ遺伝子等のいわゆるレポーター遺伝子、リコンビナーゼ等が挙げられる。外来遺伝子の挿入位置としては、E1遺伝子欠失部位、E3遺伝子欠失部位等が挙げられる。

【0020】

本発明に用いる組換えアデノウイルスの由来は特に限定されないが、ヒト由来のアデノウイルスであることが好ましい。ヒト由来のアデノウイルスにおいては、C型に分類される2型または5型がより好ましい。以下、ヒトアデノウイルス5型を例として、また「リコンビナーゼ認識配列」の例としてloxP配列(野生型)を用いて、本発明をさらに詳細に説明する。

【0021】

組換えアデノウイルスの作製法としては、アデノウイルスゲノムDNAに目的DNAを直接連

10

20

30

40

50

結する方法や、アデノウイルスゲノムを分割して二つのプラスミドに挿入したプラスミドの一方に、目的DNAを挿入後相同組換えにより組換えアデノウイルスを作製する方法などが知られている。しかし、本発明では、アデノウイルスゲノムの大部分を含むコスミドベクターに目的遺伝子を挿入後、このコスミドベクターと制限酵素消化したアデノウイルスDNA - 末端蛋白質複合体との相同組換えによる方法 (COS-TPC 法: Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996)、および特開平7-298877号公報) により組換えアデノウイルスを作製することが好ましい。その理由は、かかる方法では非常に効率よく目的の組換えアデノウイルスが得られるからである。

【0022】

まず、アデノウイルスE1及びE3遺伝子以外のアデノウイルス5型ゲノムの大部分を含むコスミドベクターpAxcw (図1、特開平8-308585号公報、15頁のpAdex1cwはpAxcwと同一である)の左端ITRとパッケージング配列との間に位置する、塩基配列147位と148位との間にloxP配列を挿入したコスミドベクターpAxcw15Lを作製する。その際、塩基配列143位~148位に認識配列が存在する制限酵素AflIIIでアデノウイルスゲノムを含むDNAを切断し、さらにKlenow酵素による平滑化処理後loxP配列を含む65塩基の合成DNAを連結する。この操作によりAflIII消化により突出した4塩基が重複してloxP挿入部位に存在することになる。従って、塩基配列147位と148位との間への挿入とは、実際には143位~148位のいずれかの位置にloxP配列を挿入したことになる。

【0023】

また、従来知られている挿入部位 (塩基配列188位または193位)と比較するため、これらの挿入部位の間に位置する塩基配列191位と192位との間にloxP配列を挿入したコスミドベクターpAxcw19Lも作製する。この場合も、塩基配列186位~193位に認識配列が存在する制限酵素SgrAIでアデノウイルスゲノムを含むDNAを切断し、さらにKlenow酵素による平滑化処理後loxP配列を含む65塩基の合成DNAを連結するため、SgrAI消化により突出した4塩基が重複してloxP挿入部位に存在することになる。従って、塩基配列191位と192位との間への挿入とは、実際には187位~192位のいずれかの位置にloxP配列を挿入したことになる。

【0024】

次いで、コスミドベクターpAxcw15LのE1遺伝子欠失部位に、loxP配列/EF1プロモーター/LacZ/ポリA配列を挿入したコスミドベクターpAxLEFLacZ15Lを作製する。同様に、コスミドベクターpAxcw19にloxP配列/EF1プロモーター/LacZ/ポリA配列を挿入したコスミドベクターpAxLEFLacZ19Lも作製する。これらのコスミドベクターを用い、前述したCOS-TPC法により目的の組換えアデノウイルスAxLEFLacZ15LおよびAxLEFLacZ19L (図4)を作製する。本発明者らが開発したCOS-TPC法は非常に効率よく目的の組換えアデノウイルスが得られる方法であり、制限酵素消化したアデノウイルスDNA - 末端蛋白質複合体と目的ウイルスの構造を有するコスミドベクターとで形質転換した細胞をクローン化後、任意のクローンを選ぶとその半数以上が目的組換えウイルスである (Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996))。

【0025】

組換えアデノウイルスAxLEFLacZ15L作製時の目的クローンの出現頻度は、例えば、6クローン中4クローンであり、本発明者らによる組換えアデノウイルス作製時に通常得られる目的クローンの出現頻度とほぼ同じである。一方、AxLEFLacZ19L作製時の目的クローンの出現頻度は、例えば、12クローン中3クローンと明らかに低い。さらに、AxLEFLacZ15Lは通常の組換えアデノウイルスとほぼ同程度の力価を保持している。この目的組換えウイルスの出現頻度の差は、ITRとパッケージング配列との間に挿入したloxP配列が、アデノウイルスの増殖に及ぼす影響を反映するものである。すなわち、塩基配列143位~148位への挿入 (AxLEFLacZ15L)は、アデノウイルスの増殖にほとんど影響しないが、塩基配列187位~192位への挿入は、アデノウイルスDNAのウイルス粒子へのパッケージング過程を含めたウイルスの増殖サイクルに負の影響を及ぼすことが明らかとなった。従って、本発明者らが新たに発見した塩基配列143位~148位への挿入部位は、従来知られていた挿入

10

20

30

40

50

部位（塩基配列188位または193位）よりも、アデノウイルスの増殖に好適な挿入部位であることが判明した。

【0026】

このようにして得られた塩基配列143位～148位へloxP配列を挿入した組換えアデノウイルスは、パッケージング配列より右側の任意に位置にもう一つのloxPを挿入することにより、ヘルパーウイルスとして作用させることができる。その方法は、前記したように、ヘルパーウイルスゲノムのパッケージング配列の両側にリコンビナーゼCreの認識配列であるloxP配列を挿入したヘルパーウイルスを目的ベクターウイルスとともにリコンビナーゼCreを発現する宿主細胞に感染させて、パッケージング配列を除き、ヘルパーウイルスのゲノムDNAがウイルス粒子にパッケージングされなくなることにより、ヘルパーウイルスの増殖を抑制する方法である（Parks, R.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 13565-13570 (1996)）。その際、パッケージング配列右側のもう一つのloxP配列の挿入位置に制限はなく、その例の一つとしてアデノウイルスE1A遺伝子の欠失部位が挙げられる。本発明の組換えアデノウイルスAxLEFLacZ15Lは、その一例である。

10

【0027】

さらに、本発明の組換えアデノウイルスは前述した変異型loxP配列と組み合わせることにより、遺伝子置換型組換えアデノウイルスの作製にも応用できる。ここにいう「遺伝子置換型組換えアデノウイルスの作製」とは、例えば外来遺伝子Aを有する組換えアデノウイルスの遺伝子Aを、リコンビナーゼCreの存在下にプラスミドなど他のDNA分子に存在する遺伝子Bに置換する方法のことである。その方法の一例を以下に説明する。

20

【0028】

遺伝子Aを有する遺伝子置換用組換えアデノウイルスとして、左端ITR / 野生型loxP配列（塩基配列143位～148位に挿入） / パッケージング配列 / 野生型loxP配列 / 遺伝子A / 変異型loxP配列、の順に野生型loxP配列および変異型loxP配列を挿入した組換えアデノウイルスを作製する。ここに野生型loxP配列 / 遺伝子Aの断片はE1欠失部位に挿入される。遺伝子Bを有するプラスミドとしては、野生型loxP配列（塩基配列143位～148位に挿入） / パッケージング配列 / 遺伝子B / 変異型loxP配列の構造を有するプラスミドが挙げられる。遺伝子Aを有する組換えアデノウイルスと遺伝子Bを有するプラスミドを同時にまたは順次、Cre蛋白質を発現する293細胞などの細胞に導入すると、遺伝子導入用組換えアデノウイルスでは2つの野生型loxP配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、野生型loxP配列 / 遺伝子A / 変異型loxP配列の部分がプラスミド由来の野生型loxP配列 / パッケージング配列 / 遺伝子B / 変異型loxP配列に置換された組換えアデノウイルスが生成する。遺伝子置換されなかった遺伝子導入用組換えアデノウイルスは、2つの野生型loxP配列に挟まれたパッケージング配列が除去されるため、ウイルスDNAは複製するものの感染粒子にパッケージングされずウイルスとしては増殖しない。一方、遺伝子置換されたアデノウイルスはプラスミドから導入されたパッケージング配列を有するため、感染粒子にパッケージングされて増殖し、「遺伝子A」が「遺伝子B」に置換された組換えアデノウイルスが高頻度に得られる。

30

【0029】

さらに、遺伝子導入用組換えアデノウイルスの変異型loxP配列の挿入位置を変えることにより、アデノウイルス由来の蛋白質をコードする遺伝子の一部または全てを除いた組換えアデノウイルスを作製することもできる。この場合の変異型loxP配列の挿入位置の例として、アデノウイルスL3遺伝子とE2A遺伝子との間の非翻訳領域、E3遺伝子の欠失部位、E4遺伝子の上流域と右端ITRとの間などが挙げられる。これらの位置に変異型loxP配列を挿入して遺伝子置換を行う場合、生成するアデノウイルスDNAが感染粒子に効率よくパッケージングされるように、遺伝子Bを有するプラスミドの野生型loxP配列 - 変異型loxP配列間のDNAのサイズを調節する必要があるが、生成した組換えアデノウイルスは遺伝子置換「遺伝子A」が「遺伝子B」に置換されるだけでなく、野生型loxP配列 / 遺伝子A / 変異型loxP配列間のDNAがプラスミドの野生型loxP配列 - （遺伝子B） - 変異型loxP配列間のDNAに置換されるため、遺伝子A / 変異型loxP配列間に存在するアデノウイルス遺伝子を

40

50

欠失した組換えアデノウイルスを作製することができる。

【0030】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞等を取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis 編、第2版(1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

【0031】

実施例1

アデノウイルス5型ゲノムの塩基配列147位と148位との間にloxP配列を挿入した組換えアデノウイルス作製用のコスミドベクターの作製

1 アデノウイルスE1及びE3遺伝子以外のアデノウイルス5型ゲノムの大部分を含み、かつE1遺伝子欠失部位にポリリンカーのみが挿入されたコスミドベクターpAxcw (図1、特開平8-308585号公報、15頁のpAdex1cwはpAxcwと同一である)をSalIで消化後自己ライゲーションさせ、アデノウイルスゲノム左端約0.4kbを含むプラスミドpxcw(3.1kb)を得た。

【0032】

次にプラスミドpxcwをAflIIIで消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、loxP配列を含む66塩基の合成DNA(塩基配列:5'-GCTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATACGCTTCGCTCGGTACCCGCCATG-3'(配列番号:3)およびその相補鎖、図2参照)を連結し、アデノウイルスゲノムの147位と148位との間にloxP配列が挿入されたプラスミドpycw15L(3.2kb)を得た。プラスミドpycw15L中のアデノウイルス5型ゲノムの左端から521bpまでの塩基配列を図2と配列番号:4に示す。

【0033】

2 コスミドベクターpAxcwをSwaIおよびCsp45Iで同時に消化し、アデノウイルスゲノムの大部分を含む約28kbの断片(a)を得た。また、コスミドベクターpAxcwをCsp45IおよびPstIで同時に消化し、アデノウイルスゲノムを含まない約13kbの断片(b)を得た。さらに、プラスミドpycw15LをSwaIおよびPstIで同時に消化し、アデノウイルスゲノム左端を含む約1.2kbの断片(c)を得た。次いで、(a)(b)(c)の3断片をライゲーションし、アデノウイルスゲノムの大部分を含み、かつ147位と148位との間にloxP配列が挿入されたコスミドベクターpAxcw15Lを得た。

【0034】

3 プラスミドpUC119の制限酵素Ecl136II部位に、野生型loxP配列/制限酵素SwaI部位/野生型loxP配列が挿入されたプラスミドpuLwL(Lee G. et. al. Gene Vol.14, 55-65(1998))を制限酵素XhoIで消化後、変異型loxP配列および制限酵素NheI部位を含む60塩基の合成DNA(配列番号:5および配列番号:6)を連結し、SwaI部位とアンピシリン耐性遺伝子との間に位置する野生型loxP配列を変異型loxP配列に置換したプラスミドpuLwMを得た。

5'-TCGAGTCCGGAATAACTTCGTATAACGTATACTATACGAAGTTATGCTAGCATTAAATG-3'(配列番号:5)

3'-CAGGCCTTATTGAAGCATATTGCATATGATATGCTTCAATACGATCGTAAATTTACAGCT-5'(配列番号:6)

【0035】

4 EF1 プロモーターからLacZ遺伝子を発現するプラスミドpEFLacZ(特開平7-298877号公報、11頁)をHindIIIで消化後末端を平滑化し、プロモーター/LacZ/ポリA配列を含む断片を得た。この断片を、プラスミドpUC119のEcl136II部位にloxP配列/SwaI部位/変異型loxP配列が挿入された前記3で得られたプラスミドpuLwMのSwaI部位に挿入し、プラスミドpULEFLacZM(9.1kb、図3)を得た。次いで、プラスミドpULEFLacZMを

10

20

30

40

50

NheIおよびAsp718で同時に消化後末端を平滑化し、loxP配列 / プロモーター / LacZ / ポリ A 配列を含む断片を得た。さらに、この断片をコスミドpAxcw15LのSwaI部位に挿入したコスミドpAxLEFLacZ15L を得た。

【 0 0 3 6 】

実施例 2

アデノウイルス 5 型ゲノムの塩基配列191 位と192 位との間にloxP配列を挿入した組換えアデノウイルス作製用のコスミドベクターの作製

1 実施例 1 の 1 で作製したプラスミドpxcwをSgrAI で消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、loxP配列を含む68塩基の合成DNA (塩基配列: 5'-GTACTCG AGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATACGCGTTCGCTCGGTACCCGGCCGG-3'、(配列番号: 7) およびその相補鎖、図 2 参照) を挿入し、アデノウイルスゲノムの191 位と192 位との間にloxP配列が挿入されたプラスミドpycw19L (3.2kb) を得た。プラスミドpycw19L 中のアデノウイルス 5 型ゲノムの左端から523 bpまでの塩基配列を図 2 と配列番号: 8 に示す。

【 0 0 3 7 】

2 プラスミドpycw19L をSwaIおよびPstIで同時に消化して得たアデノウイルスゲノム左端を含む約1.2kb の断片と、実施例 1 2 で調製したpAxcw をSwaIおよびCsp45Iで同時に消化した断片(a)、ならびにpAxcw をCsp45IおよびPstIで同時に消化した断片(b)の3断片をライゲーションし、アデノウイルスゲノムの大部分を含み、かつ191 位と192 位との間にloxP配列が挿入されたコスミドベクターpAxcw19Lを得た。

【 0 0 3 8 】

3 実施例 1 4 で調製したプラスミドpULEFLacZMより得たloxP配列 / プロモーター / LacZ / ポリ A 配列を含む断片を、コスミドpAxcw19LのSwaI部位に挿入し、コスミドpAxLEFLacZ19L を得た。

【 0 0 3 9 】

実施例 3

アデノウイルス 5 型ゲノムの塩基配列147 位と148 位との間、または191 位と192 位との間にloxP配列を挿入し、かつLacZ遺伝子の発現単位を有する組換えアデノウイルスの作製

1 組換えアデノウイルスの作製

実施例 1、2 で作製したコスミドベクター (pAxLEFLacZ15L、pAxLEFLacZ19L) を用い、アデノウイルス 5 型由来の非増殖型アデノウイルスベクター (E1及びE3遺伝子を欠失) の ITR とパッケージング配列との間にloxP配列を挿入し、かつE1遺伝子欠失部位にloxP配列 / EF1 プロモーター / LacZ / ポリ A 配列を挿入した組換えアデノウイルスを作製した。組換えアデノウイルスの作製法、ならびにウイルスDNA の制限酵素消化による目的組換えアデノウイルスの同定法は既存の方法 (Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996)、及び特開平7-298877号公報) に従った。

【 0 0 4 0 】

E3遺伝子を欠失したヒトアデノウイルス 5 型由来株であるAd5-dIX (Saito, I. et al., J. Virol. Vol.54, 711-719 (1985)) のウイルスDNA - 末端蛋白質複合体を制限酵素EcoT 22I で消化した。このウイルスDNA - 末端蛋白質複合体と、コスミドベクターpAxLEFLacZ 15L (実施例 1 で作製) もしくはコスミドベクターpAxLEFLacZ19L (実施例 2 で作製) とで、リン酸カルシウム共沈法により6cm シャーレで培養した293 細胞を形質転換した。翌日、形質転換した細胞を希釈後、96穴マイクロプレートにまき直し、2 ~ 3 週間培養した。ウイルスの増殖により細胞変成が起こった任意のウェルを選びウイルス液 (一次ウイルス液) を調製し、24穴マイクロプレートで培養した293 細胞に2ウェルずつ感染させ、細胞変成が生じた後に片方のウェルから既存の方法によりウイルスDNA を調製した。ウイルスDNA をXhoI消化後、電気泳動によりウイルスのゲノム構造を解析し、目的組換えアデノウイルス (AxLEFLacZ15LまたはAxLEFLacZ19L、図 4) クローンを同定した。

【 0 0 4 1 】

通常、この方法で作製した組換えアデノウイルスは、任意に選んだウイルスクローンの半

10

20

30

40

50

数以上が目的ウイルスクローンである。AxLEFLacZ15Lの場合は6クローン中4クローンが目的クローンであり、その出現頻度は、本発明者らによる組換えアデノウイルス作製時に通常得られる目的クローンの出現頻度とほぼ同じであった。一方、AxLEFLacZ19Lの場合は12クローン中3クローンが目的クローンであり、その出現頻度はAxLEFLacZ15Lの場合よりも低かった。

【0042】

ウイルスDNAの解析に用いなかったウェルより、AxLEFLacZ15Lは#3クローンの、AxLEFLacZ19Lは#3クローンのウイルス液(二次ウイルス液)を調製し、さらに順次スケールアップしてウイルスを継代し、最終的に四次ウイルス液を得た。

【0043】

2 AxLEFLacZ15LならびにAxLEFLacZ19Lの力価測定

AxLEFLacZ15LならびにAxLEFLacZ19Lの四次ウイルス液の力価を293細胞を用いて測定した。力価測定は、既存の方法(特開平7-298877号公報)に従い、96穴マイクロプレートを用いた限界希釈法にて行った。

【0044】

その結果、AxLEFLacZ15Lの力価は 3.4×10^8 PFU/ml、AxLEFLacZ19Lの力価は 3.4×10^8 PFU/mlであり、両ウイルスとも通常の非増殖型組換えアデノウイルスとほぼ同等の力価を有していた。すなわち、ITRとパッケージ配列との間へのloxP配列を含む外来遺伝子の挿入は、アデノウイルスの増殖に致命的な欠陥を与えるものではないことが判明した。

【0045】

【発明の効果】

本発明により、遺伝子治療の分野において一層安全性の高い遺伝子治療用ベクターを作製するための材料となる、組換えアデノウイルスが提供される。本発明により、アデノウイルスの増殖に必須の遺伝子を欠失した組換えアデノウイルスベクターの製造、および遺伝子置換型組換えアデノウイルスベクターの製造が効率的に行なわれ、遺伝子治療の分野で利用可能な組換えアデノウイルスベクターの供給が容易になる。

【0046】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Novel Recombinant Adenovirus

<130> SP-10-004

<160> 8

【0047】

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Bacteriophage P1

<400> 1

ataacttcgt ataatgtaig ctatacgaag ttat

【0048】

34

10

20

30

40

<210> 2
<211> 34
<212> DNA

<213> Bacteriophage P1

<400> 2

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 34

[0 0 4 9]

10

<210> 3
<211> 66
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gctcgagata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta tacgcgttcg ctcggtiacc 60

gccatg 66

20

[0 0 5 0]

<210> 4
<211> 521
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgig gcggaagtgt 120

gatgttgcaa gtgtggcgga acacatggct cgagataact tcgtataatg tatgctatac 180

gaagttatac gcgttcgctc ggtaccgcc atgtaagcga cggatgtggc aaaagtgacg 240

tttttggigt gcgccggigt acacaggaag tgacaatttt cgcgcggitt taggcggatg 300

ttgtagtaaa ttggggcgta accgagtaag atttggccat tttcgcggga aaactgaata 360

agaggaagtg aaatctgaat aatttttgtt tactcatagc gcgtaatatt tgtctagggc 420

cgccgggact ttgaccgttt acgtggagac tcgccagggt gtttttctca ggtgttttcc 480

gcgttcggg tcaaagttag cgttttatta ttatagtcag c 521

30

40

[0 0 5 1]

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

tcgagtcgg aataacttc gtataacgta tactatacga gttatgctag catttaaag 60

[0 0 5 2]

10

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

tcgacatta aatgctagca taacttcgta tagtatacgt tatacgaagt tattccggac 60

[0 0 5 3]

20

<210> 7

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

gtactcgaga taacttcgta taatgtatgc tatacgaagt tatacgcggt cgctcggtac 60

ccggccgg 68

30

[0 0 5 4]

<210> 8

<211> 523

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

```

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt   60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtggt gcggaagtgt   120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgttttig   180
gtgtgcgccg ggtactcgag ataacttctg ataatgtaig ctatacgaag ttatacgcgt   240
tcgctcggta cccggccggt gtacacagga agtgacaatt ttcgcgcggt ttagggcgga   300
tgttgiagta aatttgggcg taaccgagta agatttggcc attttcgcgg gaaaacigaa   360
taagaggaag tgaaatctga ataattttgt gttactcata gcgcgtaata ttgtctagg   420
gccgcgggga cttigaccgt ttacgtggag actcggccag ggtttttct cagggttttt   480
ccgcgttccg ggtcaaagtt ggcgttttat tattatagtc agc                       523

```

【図面の簡単な説明】

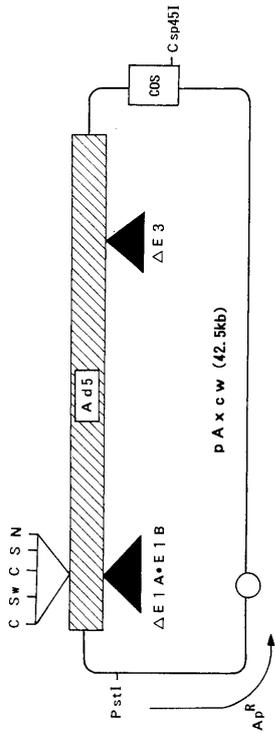
【図 1】図 1 は、コスミドベクター pAxcw の構造を示す模式図である。図中、斜線部分はアデノウイルスゲノムを、C、Sw、S、N はそれぞれ、制限酵素 ClaI、SwaI、Sall、NruI 部位を示す。また、A p^R はアンピシリン耐性遺伝子、丸印はプラスミドの複製起点を示す。

【図 2】図 2 は、ヒトアデノウイルス 5 型の 1 番目から 455 番目までの塩基配列、ならびに ITR とパッケージング配列との間に挿入した loxP 配列を含む合成 DNA（66bp および 68bp）の塩基配列を示す。図中、上向きおよび下向きの三角は loxP 配列を含む DNA の挿入位置を示し、下線を引いた塩基は制限酵素の認識配列を示す。また、挿入 DNA 中の太字の塩基配列は 34 塩基の loxP 配列を、小文字の塩基配列は制限酵素の認識配列を示す。

【図 3】図 3 は、プラスミド pULEFLacZM の構造を示す模式図である。図中、EF は EF1 プロモーター、LacZ は大腸菌 LacZ 遺伝子、pA はポリ A 配列、斜線を引いた部分は loxP 配列、黒塗り部分は変異型 loxP 配列を示す。A p^R はアンピシリン耐性遺伝子、ori はプラスミドの複製起点を示す。

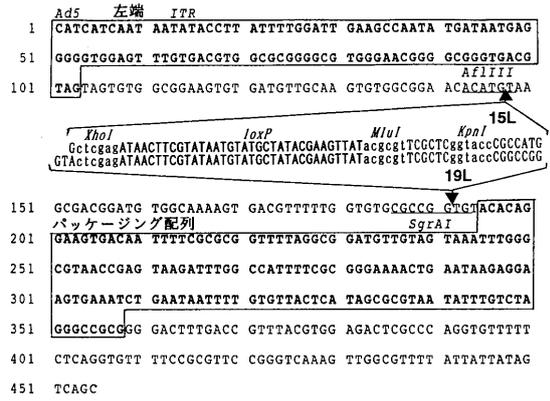
【図 4】図 4 は、組換えアデノウイルス（AxLEFLacZ15L ならびに AxLEFLacZ19L）の構造を示す模式図である。図中、太線部分はアデノウイルスゲノム、黒塗り三角は、欠失したアデノウイルス遺伝子、白抜き三角は loxP 配列、EF は EF1 プロモーター、LacZ は大腸菌 LacZ 遺伝子、pA はポリ A 配列、 はアデノウイルスのパッケージング配列を示す。

【 図 1 】

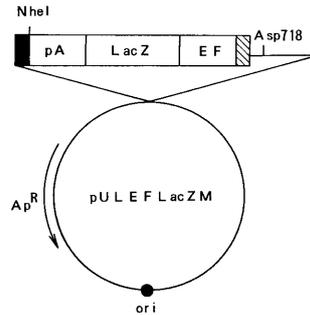


【 図 2 】

パッケージング配列に隣接するloxP配列の挿入部位

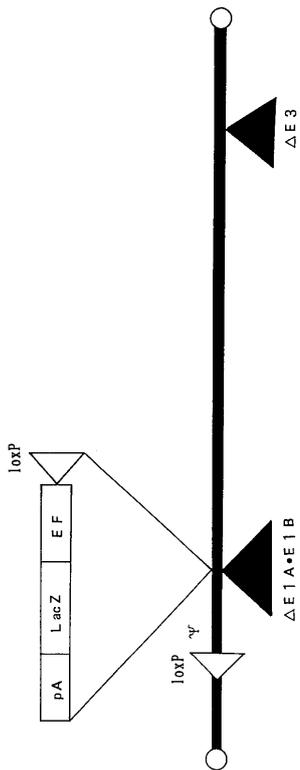


【 図 3 】



【 図 4 】

AxLEFLacZ15LまたはAxLEFLacZ19L



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平08-308585(JP,A)
特開平10-033175(JP,A)
特表平05-503626(JP,A)
J.Virol.,Vol.71,No.3(1997)p.1842-1849
PNAS,Vol.93(1996)p.13565-13570
J.Biol.Chem.,Vol.260,No.22(1985)p.12313-12319
- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
G-Search