

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-510412

(P2007-510412A)

(43) 公表日 平成19年4月26日(2007.4.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-537414 (P2006-537414)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月28日 (2004.10.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年6月28日 (2006.6.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2004/004553
 (87) 国際公開番号 W02005/052171
 (87) 国際公開日 平成17年6月9日 (2005.6.9)
 (31) 優先権主張番号 0325379.6
 (32) 優先日 平成15年10月30日 (2003.10.30)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 504237935
 オックスフォード バイオメディカ (ユ
 ーケー) リミテッド
 イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ
 オックスフォード ザ オックスフォ
 ド サイエンスパーク ロバート ロビン
 ソン アベニュー メドワー センター
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクター

(57) 【要約】

目的ヌクレオチド (NOI) を所望の標的部位に送達する能力を有し、NOIは第VIIII因子をコードし、NOIを所望の標的部位に送達した後に第VIIII因子が発現される、レンチウイルスベクター。

Condon Usage Table for Factor VIII Genes

Ala	Hu	WT	CO	Gln	Hu	WT	CO	Leu	Hu	WT	CO	Ser	Hu	WT	CO			
C	53	27	54	A	12	37	12	C	26	16	27	C	28	16	34			
U	17	44	17	CA	88	83	88	U	5	19	5	U	13	23	8			
GC	15	25	13	G	75	40	74	A	3	12	2	A	5	22	5			
G	17	3	16	Glu	A	25	60	22	G	59	29	60	G	9	2	9		
Arg	C	37	14	GA	G	75	40	74	UU	A	2	8	1	AG	C	34	19	35
CG	U	7	10	Gly	C	50	24	50	G	6	16	5	U	10	19	9		
A	6	15	6	GG	U	12	20	11	Lys	A	18	81	20	Thr	C	57	28	56
G	21	8	22	A	14	41	15	AA	G	82	39	80	U	14	43	13		
AG	A	10	30	G	24	15	24	U	20	58	19	A	14	28	15			
G	18	23	18	His	C	79	45	80	Pha	C	80	43	81	G	15	1	16	
Asn	C	78	41	CA	U	21	55	23	UU	U	20	58	19	Tyr	C	74	40	74
AA	U	22	59	U	18	33	17	Pho	C	48	20	48	UA	U	26	80	26	
Asp	C	75	33	AU	C	77	48	79	CC	U	19	35	18	Val	C	25	28	23
GA	U	25	87	A	5	19	4	A	15	43	16	GU	U	7	19	6		
Cys	C	68	88	U	18	33	17	G	17	1	18	A	5	22	6			
UG	U	32	32	U	18	33	17	U	18	33	17	G	64	33	66			

Hu = highly expressed human, WT = Factor VIII
 CO = codon optimised

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

目的ヌクレオチド（NOI）を所望の標的部位に送達する能力を有するレンチウイルスベクターであって、NOIは第VIII因子又はその誘導体をコードし、NOIを所望の標的部位に送達した後に第VIII因子が発現される、レンチウイルスベクター。

【請求項 2】

第VIII因子又はその誘導体をコードするNOIであって、組織特異的なプロモーターに作動可能に連結しているNOIを含むレンチウイルスベクター。

【請求項 3】

組織特異的なプロモーターが肝臓又は内皮組織に特異的なプロモーターである、請求項 2 に記載のレンチウイルスベクター。 10

【請求項 4】

NOIが哺乳動物細胞における発現のためにコドンが最適化されている、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 5】

NOIがB-ドメインが欠失した第VIII因子の遺伝子である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 6】

第VIII因子又はその誘導体をコードするNOIであって、哺乳動物細胞における発現のためにコドンが最適化されているNOIを含むレトロウイルスベクター。 20

【請求項 7】

NOIが組織特異的なプロモーターに作動可能に連結している、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

組織特異的なプロモーターが肝臓又は内皮組織に特異的なプロモーターである、請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 9】

第1の目的ヌクレオチド（NOI）を送達する能力を有し、レトロウイルスプロベクターから誘導可能なレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスプロベクターは内部プロモーターに作動可能に連結している第1のNOI、及び第2のNOIがスプライシングされて除去されることができるよう第1のNOIと内部プロモーターとの間に第2のNOIを含み、さらにプロモーター、第1のNOI及び第2のNOIは逆相補的配向にあり、任意選択で第2のNOIは任意選択で第1のNOIに対してフレーム外にあるレトロウイルスベクター。 30

【請求項 10】

第2のNOIがオープンリーディングフレーム（ORF）の少なくとも一部を任意選択で含むイントロンである、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 11】

レトロウイルスプロベクターが機能的なスプライドナー部位を与えることができる第1のヌクレオチド配列（NS）と第2のNOIに隣接する機能的なスプライドナー部位とを与えることができる第2のNSとを含み、機能的なスプライドナー部位は機能的なスプライドナー部位の上流にある、請求項 9 又は 10 に記載のベクター。 40

【請求項 12】

第1のNOI又はその発現産物が治療剤若しくは診断剤である、又はそれを含む、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 13】

第1のNOIの発現産物が第VIII因子である、請求項 12 に記載のベクター。

【請求項 14】

第VIII因子は哺乳動物細胞における発現のためにコドンが最適化されている、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 15】

第1のNOIが組織特異的なプロモーターに作動可能に連結している、請求項9から14のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 16】

組織特異的なプロモーターが肝臓又は内皮組織に特異的なプロモーターである、請求項15に記載のベクター。

【請求項 17】

第2のNOI又はその発現産物が、選択性を与える任意の1つ又は複数の薬剤（例えばマーカー要素）、ウイルスの必須要素若しくはその一部、又はその組合せである、或いはそれを含む、請求項9から16のいずれか一項に記載のベクター。

10

【請求項 18】

第2のNOIがポリアデニル化シグナルを含む、請求項9から17のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 19】

ベクター又はプロベクターがレンチウイルスから誘導可能である、請求項1から18のいずれかに記載のベクター。

【請求項 20】

レンチウイルスがHIV-1又はEIAVである、請求項1から19のいずれかに記載のベクター。

【請求項 21】

ベクターのシュードタイプを作製する、請求項1から20のいずれかに記載のベクター。

20

【請求項 22】

VSV-G、ロスリパーウイルスエンベロープ又はGP64を用いてベクターのシュードタイプを作製する、請求項1から21のいずれかに記載のベクター。

【請求項 23】

ウッドチャック肝炎転写後要素(WPRE)をさらに含む、請求項1から22のいずれかに記載のベクター。

【請求項 24】

主要なスプライドナーが存在しない、又は破壊されているレトロウイルスベクター。

30

【請求項 25】

レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項24に記載のレトロウイルスベクター。

【請求項 26】

主要なスプライドナーが存在しない、又は破壊されている、請求項21から23のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 27】

Tatエクソンの開始コドンが破壊されている、レトロウイルスベクター。

【請求項 28】

レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項27に記載のレトロウイルスベクター。

40

【請求項 29】

Tatエクソンの開始コドンが破壊されている、請求項21から26のいずれか一項に記載のレトロウイルスベクター。

【請求項 30】

HIV-1又はEIAVから誘導可能であるレンチウイルスベクターであって、ロスリパーウイルスのエンベロープを用いてシュードタイプとしたレンチウイルスベクター。

【請求項 31】

Tatタンパク質の少なくとも一部が標的細胞中で発現されないようにレンチウイルスプロベクターのTatエクソンが欠失しているか、又は破壊されている、レンチウイルス

50

プロベクターから誘導可能なレンチウイルスベクター。

【請求項 3 2】

主要なスプライドナーが存在しない、又は破壊されている、レトロウイルスプロベクターから誘導可能なレトロウイルスベクター。

【請求項 3 3】

レトロウイルスベクターが組み込まれたプロウイルスである、請求項 1 から 3 2 のいずれか一項に記載のレトロウイルスベクター。

【請求項 3 4】

請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載のレトロウイルスベクターから得ることができるレトロウイルス粒子。

10

【請求項 3 5】

請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載のレトロウイルスベクター又は請求項 3 4 に記載のレトロウイルス粒子を用いて形質移入又は形質導入した細胞。

【請求項 3 6】

医薬で用いるための、請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載のレトロウイルスベクター又は請求項 3 4 に記載のウイルス粒子又は請求項 3 5 に記載の細胞。

【請求項 3 7】

1 つ又は複数の NOI を、それを必要としている標的部位に送達する医薬品を調製するための、請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載のレトロウイルスベクター又は請求項 3 4 に記載のウイルス粒子又は請求項 3 5 に記載の細胞の使用。

20

【請求項 3 8】

請求項 1 から 3 3 のいずれか一項に記載のレトロウイルスベクター若しくは請求項 3 4 に記載のウイルス粒子を用いて、又は請求項 3 5 に記載の細胞を使用して、細胞の形質移入又は形質導入を行うことを含む方法。

【請求項 3 9】

請求項 3 5 に記載の細胞を作製すること、前記細胞を培地中で継代すること、前記培地を除去すること、及び第 VIII 因子を単離することを含む、第 VIII 因子を *in vitro* で産生する方法。

【請求項 4 0】

本発明による第 VIII 因子をコードするコドン最適化された核酸を含む細胞を作製すること、前記細胞を培地中で継代すること、前記培地を除去すること、及び第 VIII 因子を単離することを含む、第 VIII 因子を *in vitro* で産生する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はベクターに関する。

【0002】

詳細には、本発明は、レトロウイルス粒子中で遺伝物質をパッケージングして発現させる新規の系に関する。

【背景技術】

40

【0003】

レトロウイルスとは、溶解性ウイルスとは異なる生活環を有する RNA ウイルスである。この点において、レトロウイルスは、DNA 中間体を介して複製される感染性のもの (entity) である。レトロウイルスが細胞に感染すると、そのゲノムは逆転写酵素によって DNA の形態に変換される。DNA のコピーは、新しい RNA ゲノム、及び感染性ウイルス粒子の組立てに必要な、ウイルスにコードされたタンパク質を産生するための鋳型として役割を果たす。

【0004】

感染過程の間、レトロウイルスは最初に特異的な細胞表面受容体に付着する。感受性のある宿主細胞内の進入に際し、レトロウイルス RNA ゲノムは、親ウイルスの内部に保有

50

されている、ウイルスにコードされた逆転写酵素によってDNAへと複製される。このDNAは宿主細胞の核に輸送され、次いでそこで宿主ゲノム内に組み込まれる。この段階では、これは一般的にプロウイルスと呼ばれる。プロウイルスは細胞分裂の間宿主の染色体内で安定しており、他の細胞性遺伝子と同様に転写される。プロウイルスはタンパク質及び追加のウイルスを作製するために必要なパッケージング機構をコードし、時折「出芽」と呼ばれる過程によって、細胞から出ることができる。

【0005】

それぞれのウイルスは、ウイルス粒子タンパク質及び酵素をコードする、gag、pol及びenvと呼ばれる遺伝子を含む。プロウイルス内では、レトロウイルスのゲノムの両端には末端反復配列(LTR、long terminal repeats)と呼ばれる領域が隣接している。LTRはプロウイルスの組み込み及び転写を司っている。また、これらはエンハンサー-プロモーター配列としての役割も果たす。言い換えれば、LTRはウイルス遺伝子の発現を制御することができる。レトロウイルスRNAのキャプシド形成は、ウイルスゲノムの5'末端に位置するpsi配列に基づいて起こる。

10

【0006】

LTR自体は、U3、R及びU5と呼ばれる3つの要素に分割することができる同一の配列である。U3は、RNAの3'末端に独特な配列に由来する。RはRNAの両末端で繰り返される配列に由来し、U5はRNAの5'末端に独特な配列に由来する。3つの要素の大きさは、様々なレトロウイルス間で大幅に変化することができる。

【0007】

プロウイルスの転写の制御は、概ねウイルスのLTRの非コード配列に任される。転写開始部位は左側のLTR中のU3とRとの境界にあり、ポリ(A)付加(停止)部位は右側のLTR中のRとU5との境界にある。U3は、細胞性及び一部の場合はウイルス性の転写活性化タンパク質に応答性のあるプロモーター配列並びに複数のエンハンサー配列を含めた、プロウイルスの転写制御要素のほとんどを含む。一部のレトロウイルスは、遺伝子発現の調節に関与するタンパク質をコードするtat、rev、tax及びrexなどの遺伝子のうち、任意の1つ又は複数を含む。

20

【0008】

プロウイルスDNAの転写により、RNAプロセッシングによって生じる完全長のウイルスRNAのゲノム及びサブゲノムの大きさのRNA分子が再作製される。典型的には、すべてのRNA産物が、ウイルスタンパク質産生の鋳型として役割を果たす。RNA産物の発現は、RNA転写物のスプライシング及び翻訳中におけるリボソームのフレームシフトの組合せによって果たされる。

30

【0009】

RNAスプライシングとは、介在性、すなわち「イントロン」のRNA配列が除去されて、残った「エクソン」配列がライゲーションされて翻訳の連続的な読み枠が提供される過程である。レトロウイルスDNAの一次転写物はいくつかの方法で改変され、細胞性mRNAに酷似している。しかし、すべてのイントロンが効率的にスプライシングされるほとんどの細胞性mRNAとは異なり、新しく合成されたレトロウイルスRNAは2つの集団に転じられる。一方の集団はスプライシングされずにゲノムRNAとして役割を果たし、他方の集団はスプライシングされてサブゲノムRNAを提供する。

40

【0010】

1回及び複数回スプライシングされたRNAのどちらについてもその合成を指示する複合レトロウイルスは、RNA上の配列と、HIV-1中のrevなどのアクセサリ遺伝子の1つのタンパク質産物との相互作用によって、様々なゲノム及びサブゲノムの大きさのRNA種の輸送及びスプライシングを調節する。

【0011】

レトロウイルスは、とりわけNOI又は複数のNOIを1つ若しくは複数の目的部位へ移動させるための送達系(送達ベヒクル若しくは送達ベクターとも表現される)としてしばしば用いられる。移動は、in vitro、ex vivo、in vivo、又は

50

その組合せで行うことができる。このように用いた場合、レトロウイルスは一般にレトロウイルスベクター又は組換えレトロウイルスベクターと呼ばれる。レトロウイルスベクターは、受容体の用法、逆転写及びRNAパッケージングを含めたレトロウイルスの生活環の様々な側面を研究するために活用されてきた (Miller, 1992 Curr Top Microbiol Immunol 158:1-24に総説されている)。

【0012】

遺伝子治療で用いるための典型的な組換えレトロウイルスベクターでは、gag、pol及びenvのタンパク質コード領域の1つ又は複数の少なくとも一部をウイルスから取り除き得る。これにより、レトロウイルスベクターは複製に欠陥をもつこととなる。そのゲノムを宿主ゲノム内に組み込む能力を有するが、改変されたウイルスゲノムは構造タンパク質を欠くために自身を増殖させることができないウイルスを作製するために、取り除いた部分はさらにNOIで置き換えてもよい。宿主ゲノム内に組み込まれると、NOIの発現が起こり、例えば治療効果及び/又は診断的効果をもたらされる。したがって、NOIの目的部位への移動は、典型的には、NOIを組換えウイルスベクター内に組み込ませること；改変したウイルスベクターをウイルス粒子コーティング内へパッケージングすること；及び標的とした細胞又は標的とした細胞集団などの目的部位の形質導入によって果たされる。

10

【0013】

パッケージング又はヘルパー細胞系と組換えベクターとの組合せを用いることによって、例えば後に目的部位の形質導入を行うために多量のレトロウイルスベクター (例えば適切なレトロウイルスベクターの力価を調製するため) を増殖及び単離することが可能である。

20

【0014】

一部の 경우에는、増殖及び単離により、レトロウイルスのgag、pol及びenv遺伝子が単離され、それらが個別に宿主細胞内に導入されて「パッケージング細胞系」が生じることが起こり得る。パッケージング細胞系は、レトロウイルスDNAのパッケージングに必要なタンパク質を産生するが、psi領域を欠くためにキャプシド形成をもたらすことはできない。しかし、NOI及びpsi領域を保有する組換えベクターをパッケージング細胞系内に導入した場合、ヘルパータンパク質がpsi陽性の組換えベクターをパッケージングして、組換えウイルスのストックを産生することができる。このことを用いて、NOIを細胞のゲノム内に導入するために細胞の形質導入を行うことができる。そのゲノムがウイルスタンパク質の作製に必要な遺伝子をすべて欠いている組換えウイルスは、1回のみ形質導入することができ、増殖することができない。標的細胞の形質導入が1回のみ可能なこのようなウイルスベクターは、複製欠陥ベクターとして知られている。したがって、NOIは、潜在的に有害なレトロウイルスが生じることなしに宿主/標的細胞のゲノム内に導入される。利用可能なパッケージング系の概要は、"Retroviruses" (1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 449) に示されている。

30

【0015】

レンチウイルスベクター系の開発に相当な関心がもたれている。この関心は、第1に、HIVに感受性のある細胞を抗HIV治療遺伝子の標的とするためにHIVに基づいたベクターを用いるという概念、及び第2に、レンチウイルスは非分裂細胞に感染することができるので (Lewis & Emerman 1993 J.Virol. 68, 510)、これらのウイルスに基づいたベクター系は非分裂細胞に形質導入することができるであろうという予測 (例えばVile & Russel 1995 Brit. Med. Bull. 51, 12) から生じている。HIVに基づいたベクター系は産生されており (Buchsacher & Panganiban 1992 J.Virol. 66, 2731)、CD4+細胞、及び予測どおり、非分裂細胞に形質導入するために用いられている (Naldini et al, 1996 Science 272, 263)。さらに、レンチウイルスベクターは、目的遺伝子の非常に安定した長期的な発現を可能にする。その期間は、in vivoにおいて、形質導入したラット神経細胞で少なくとも1年間であることが示されている (Biennemann et al,

40

50

2003 Mol. Ther. 5, 588)。M L Vに基づいたベクターは、目的遺伝子を6週間の間しか発現させることができなかった。

【0016】

場合によっては、レンチウイルスベクターの産生において、治療遺伝子を産生 (producer) 細胞内で発現させないことが望ましく、これは、いくつかの機構によってウイルス力価の低下が生じ得るからである。これを防ぐためには、本発明者らの国際公開公報 W O 9 9 / 1 5 6 8 3 号及び国際公開公報 W O 0 0 / 5 6 9 1 0 号に記載のスプリットイントロン構成のベクターを採用することが可能である。しかし、LTRプロモーターからの発現レベルは一般に内部プロモーターからの発現レベルよりも低い。

【0017】

血友病 A は 5 , 0 0 0 人に 1 人の男性を冒し、血漿中の第 VIII 因子タンパク質の欠乏によって引き起こされる。血液中の第 VIII 因子の活性レベルに基づいて、血友病 A は軽度、中程度、及び重篤の型に分類される。血友病 A 患者の 5 0 % はこの疾患の重篤な型に罹患しており、これは自発性且つ長引く出血症状を特徴とする。

【0018】

第 VIII 因子とは、凝血経路の補因子である。第 VIII 因子は血液中に循環しており、その担体タンパク質であるフォンウィルブランド因子と非共有結合で複合している。この相互作用は第 VIII 因子を安定化し、第 VIII 因子と膜表面との会合を防ぐ。第 VIII 因子からその活性状態である第 VIII a 因子への変換は、トロンビン又は第 X a 因子による第 VIII 因子のタンパク質分解を介して起こる。ヒト第 VIII 因子は単鎖ポリペプチドとして合成され、予想される分子量は 2 6 5 k D a である。第 VIII 因子の遺伝子は 2 3 5 1 個のアミノ酸をコードし、タンパク質が細胞内でプロセッシングされて、主に A 1、A 2、及び B ドメインを含む 2 0 0 k D a の重鎖並びに A 3、C 1、及び C 2 ドメインを含む 8 0 k D a の軽鎖からなるヘテロ二量体が得られる (Kaufman et al., J. Biol. Chem., 263:6352-6362 [1988])。単鎖ポリペプチド及びヘテロ二量体はいずれも不活性の前駆体として血漿中を循環する (Ganz et al., Eur. J. Biochem., 170:521-528 [1988])。血漿中における第 VIII 因子の活性化は A 2 ドメインと B ドメインとの間のトロンビンの切断によって開始され、これにより B ドメインが放出され、その結果 A 1 及び A 2 ドメインからなる重鎖が生じる。タンパク質分解された第 VIII a 因子はフォンウィルブランド因子から解離する。第 VIII a 因子及び第 IX a 因子を含む膜結合複合体が形成され、これが次いで凝血カスケード中の第 X 因子を活性化させる。血友病は、点突然変異、欠失、又はストップコドンを生じる突然変異から起こり得る (Antonarakis et al., Mol. Biol. Med., 4:81 [1987]を参照されたい)。

【0019】

現在、血友病 A は精製した第 VIII 因子を血液中に頻繁に注入することによって治療されている。血友病 A を治療するこの方法は出血の頻度及び重篤度を軽減させるが、この治療は精製した第 VIII 因子の入手可能性及び費用、in vivo における第 VIII 因子の半減期が短いこと、並びに汚染 A I D S ウイルス及び肝炎ウイルスを除去する必要性によって制限されている。現在では組換え第 VIII 因子が利用可能であるが、この第 VIII 因子維持療法の形態は高価且つ慢性的である。

【0020】

遺伝子治療は、血友病 A のタンパク質注入治療に代わる魅力的な代替方法である。2 つの遺伝子治療手法を用い得る。In vivo 遺伝子治療では、第 VIII 因子タンパク質をコードするヌクレオチド患者の細胞内に導入する。Ex vivo 遺伝子治療技法では、第 VIII 因子タンパク質をコードするヌクレオチドを、in vitro で培養した細胞内に導入する。その後、形質転換して培養細胞を患者に再移植する。

【0021】

第 VIII 因子の生物発生及び分泌の研究は、有意な量の第 VIII 因子を発現するヒト細胞系の不足により制限されている。分泌の分析は自己遺伝子の発現に限定されている。一般に、これらの研究では第 VIII 因子の発現レベルが低いことが示されている。例えば、Lentin

10

20

30

40

50

g et al. (1998) Blood 92:3983-3996、Connelly et al. (1996) Human Gene Therapy 7: 183-195、Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 1233、Dorner et al. (1987) J. Cell Biol. 105:2665及びそれ中に引用される参考文献を参照されたい。

【0022】

ヒト及びイヌ科動物の研究では、肝臓移植後に第VIII因子レベルが正常値まで上昇し、この間、第VIII因子は肝外合成されることができないことが示されている。これは、肝臓が臨床的に有意な量の第VIII因子タンパク質を合成することを示している。肝細胞が第VIII因子を発現することは当分野で周知であるが、他の種類の肝細胞が第VIII因子を合成しているかどうかは依然として議論の余地がある。総説には、いずれも本明細書中に参考として組み込まれているBloom et al. (1979) Clin. Haematol. 8:53-77及びLenting (1998) Blood 92:3983-3996を参照されたい。

【0023】

血友病Aを治療するための数多くの様々な遺伝子治療手法が現在研究されている。Ex vivo 遺伝子治療技法により、第VIII因子タンパク質の発現は、形質導入した in vitro で培養した細胞で低く、in vivo では検出不可能であることが判明している(すべて本明細書中に参考として組み込まれている、Lynch et al. (1993) Hum. Gene Therapy 4:259; Chuah et al. (1995) Hum. Gene Ther. 6:1363; Hoeben et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:7318; Hoeben et al. (1993) Hum. Gene Ther. 4:179; Israel et al. (1990) Blood 75:1074及びvan der Eb (1996) J. Clin. Biochem. Nutr. 21: 78-80を参照されたい)。これは、より高いレベルの第VIII因子の発現を可能にする構築体を開発する必要性が存在することを示唆している。

【0024】

米国特許第6221349号及び第6200560号はいずれも、アデノ関連ウイルスベクター中に第VIII因子を含む遺伝子治療用の構築体を開示している。

【0025】

第VIII因子の遺伝子をレトロウイルスベクター内に含めることによりしばしば低いベクター力価が生じることが文献で知られているが、これは一般に遺伝子中に転写サイレンサーが存在すること及び/又は遺伝子の5'にイントロンを欠くことに起因するとされてきた。産生細胞内で第VIII因子タンパク質が発現された結果、機能的ウイルス粒子の産生が妨害されたということは報告されていない。この分野における多数の研究を考えると、このことが以前に発見されていないことは驚くべきである。

【特許文献1】国際公開公報WO99/15683号

【特許文献2】国際公開公報WO00/56910号

【特許文献3】米国特許第6221349号

【特許文献4】米国特許第6200560号

【非特許文献1】Miller, 1992 Curr Top Microbiol Immunol 158:1-24

【非特許文献2】"Retroviruses"(1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 449)

【非特許文献3】Lewis & Emerman 1993 J.Virol. 68, 510

【非特許文献4】Vile & Russel 1995 Brit. Med. Bull. 51, 12

【非特許文献5】Buchsacher & Panganiban 1992 J.Virol. 66, 2731

【非特許文献6】Naldini et al, 1996 Science 272, 263

【非特許文献7】Biennemann et al, 2003 Mol. Ther. 5, 588

【非特許文献8】Kaufman et al., J. Biol. Chem., 263:6352-6362 [1988]

【非特許文献9】Ganz et al., Eur. J. Biochem., 170:521-528 [1988]

【非特許文献10】Antonarakis et al., Mol. Biol. Med., 4:81 [1987]

【非特許文献11】Lenting et al. (1998) Blood 92:3983-3996

【非特許文献12】Connelly et al. (1996) Human Gene Therapy 7:183-195

【非特許文献13】Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 1233

【非特許文献14】Dorner et al. (1987) J. Cell Biol. 105:2665

10

20

30

40

50

【非特許文献 15】 Bloom et al. (1979) Clin. Haematol. 8:53-77

【非特許文献 16】 Lenting (1998) Blood 92:3983-3996

【非特許文献 17】 Lynch et al. (1993) Hum. Gene Therapy 4:259

【非特許文献 18】 Chuah et al. (1995) Hum. Gene Ther. 6:1363

【非特許文献 19】 Hoeben et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:7318

【非特許文献 20】 Hoeben et al. (1993) Hum. Gene Ther. 4:179

【非特許文献 21】 Israel et al. (1990) Blood 75:1074

【非特許文献 22】 van der Eb (1996) J. Clin. Biochem. Nutr. 21: 78-80

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0026】

本発明は、1つの目的ヌクレオチド (NOI、nucleotide of interest)、さらには複数の NOI の効率的な発現を、1つ若しくは複数の標的部位においてもたすことができる新規レトロウイルスベクターを提供することを目的とする。

【0027】

本発明はまた、*in vivo*での使用の安全機能を組み入れており、1つの NOI、さらには複数の NOI の効率的な発現を、1つ若しくは複数の標的部位においてもたすことができる、ウイルス粒子ベクターの力価を効率的に調製する新規の系を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

20

【0028】

一実施形態では、本発明のベクターは血友病を治療するために用いることができる。詳細には、本発明は、レンチウイルスに基づいた第VIII因子の発現ベクターを、有効な遺伝子治療のために十分高い力価で産生することができるような方法を提供する。別の態様では、本発明は、組織特異的なプロモーター (例えば肝臓に特異的なプロモーター) の下で第VIII因子が発現されることを可能にする。

【0029】

本発明の一態様によれば、本発明は、目的ヌクレオチド (NOI) を所望の標的部位へ送達することができるレンチウイルスベクターを提供し、NOI は第VIII因子をコードし、第VIII因子は所望の標的部位でのみ発現される。

30

【0030】

本発明の別の態様によれば、本発明は、第VIII因子をコードし、且つそれを発現させることができるヌクレオチド配列を含むレトロウイルスベクターを提供し、ヌクレオチド配列は組織特異的なプロモーターに作動可能に連結している。

【0031】

cDNA を哺乳動物細胞内に形質移入した後の第VIII因子の発現は、一般に他の遺伝子で得られるものよりも 2 ~ 3 桁少ないと報告されている。Kaufman et al (1989 Mol. Cell Biol. 9: 1233-42) は、これについて 3 つの異なる理由を報告している：

1. 第VIII因子の mRNA の発現が非効率的であること。

【0032】

40

2. 小胞体からゴルジ体への一次翻訳産物の輸送が非効率的であること。

【0033】

3. タンパク質の安定した蓄積を促進するために高レベルのフォンウィルブランド因子 (vWF、von Willebrands' Factor) が必要であること。

【0034】

形質移入した細胞における第VIII因子の mRNA の蓄積を制限し得る、転写の減衰を含めた様々な要因が提案されている (Hoeben et al 1995 Blood 85: 2447-54; Koeberl et al 1995 Human Gene Ther. 6: 469-79; Fallaux et al 1996 Mol. Cell Biol. 16: 4264-72)。しかし、Kaufman et al (1989、同書) は、速度を制限する主要な工程は転写後のレベルであることを提案した。第VIII因子の上流にイントロンを含めることは、発現を顕著

50

に向上させることが判明している (Chuah et al 1995 Human Gene Ther. 6: 1363-77; Dworkin et al 1995 Proc Natl Acad Sci. USA 92: 1023-7; Chuah et al 1998 Human Gene Ther. 9: 353-65; VandenDriessche et al 1999 Proc Natl Acad Sci. USA 96: 10379-84)。

【0035】

本発明の別の態様によれば、本発明は、哺乳動物細胞における効率的な発現のためにコドンが最適化されている、第VIII因子をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。

【0036】

第VIII因子の遺伝子のコドンを最適化する理論的根拠は、翻訳効率を向上させることであつた。阻害要素の排除による第VIII因子mRNAの蓄積の顕著な増強は、この戦略は以前に試みられ、成功しなかつたことから可能性が低いと考えられていた：推定上の1.2 kbの阻害領域の保存的突然変異誘発では、第VIII因子の発現を顕著に増加させることに成功しなかつた (Chuah et al 1995、同書)。実際、転写阻害要素の存在自体が疑問視されている (Kaufman, 1999 Human Gene Ther. 10: 2091-107)。コドンの最適化により、HIV-1 Gag Pol (Kotsopoulou et al 2000 J. Virol. 74: 4839-52) 及びCreリコンビナーゼ (Koresawa 2000 Transplant Proc. 32: 2516-7) などのウイルス、細菌、例えばテトラサイクリンリプレッサー (Wells 1999 Transgenic Res. 8: 371-81)、並びにオワンクラゲ (Aequorea Victoria) 由来の緑色蛍光タンパク質 (Haas et al 1996 Curr Biol. 6: 315-24) から遺伝子の発現を向上させることに非常に成功している。これらの生物は哺乳動物から高度に分岐しているため、高度に発現されるヒトタンパク質のコドンの偏りに同調するようにこれらの遺伝子を再操作することにより、相当な発現の向上が生じることが期待され得る。哺乳動物の遺伝子は、例えば大腸菌由来の遺伝子ほど重大なコドンの偏りを示さない。

【0037】

それでもやはり、発現が乏しい遺伝子であるため、本発明者らは第VIII因子の遺伝子のコドンを再操作することを決定した。第VIII因子のmRNAの翻訳効率は、試験した2つの別のmRNA、すなわちvWF及びジヒドロ葉酸還元酵素 (Kaufman et al, 1989、同書) の翻訳効率に匹敵することが以前に判明しているため、遺伝子発現の増強は控えめである可能性が高いと予測されていた。それにもかかわらず、この遺伝子の発現の向上はいくらであっても血友病Aの遺伝子治療法の開発に有用となるため、これは労力をかける価値がある手法であると考えた。

【0038】

驚くべきことに、本発明者らは、コドンの最適化により第VIII因子の発現が約20倍向上することを発見した。この向上の規模は、以下の観点から驚くべきである：

1. 第VIII因子はヒト遺伝子であり、利点が生じても、ウイルス若しくは細菌の遺伝子、又は異なる種由来の遺伝子の再操作と比較して控えめであると予測されていた。

【0039】

2. 以前の同様の戦略 (cDNAのほぼ四分の一の保存的突然変異誘発) では発現の向上が成功していなかつた。

【0040】

3. mRNAの翻訳が研究されており、非効率的であることは判明していなかつた。

【0041】

高度に好ましい実施形態では、コドンの最適化は、高度に発現されるヒト遺伝子のコドン使用頻度に基づく (Haas et al 1996, Curr. Biol. 6, 315)。図15に示した第VIII因子の遺伝子の表を参照されたい。コドンを最適化した第VIII因子の遺伝子の好ましい実施形態を図19及び図21に示した (塩基20~7072)。

【0042】

本発明の別の態様によれば、本発明は、第1の目的ヌクレオチド (NOI) を送達する能力を有し、且つレトロウイルスプロベクターから誘導可能なレトロウイルスベクターであつて、レトロウイルスプロベクターは、内部プロモーターに作動可能に連結している第

10

20

30

40

50

1のNOI、及び第2のNOIがスプライシングされて除去されることができるよう第1のNOIと内部プロモーターとの間に第2のNOIを含み、プロモーター、第1のNOI及び第2のNOIは逆相補的配向にあり、任意選択で第2のNOIは第1のNOIに対してフレーム外にある、レトロウイルスベクターを提供する。

【0043】

好ましい実施形態では、組織特異的なプロモーターに作動可能に連結している、コドン最適化した第VIII因子及び/又は第VIII因子と共に用いるウイルスベクターのゲノムは、以下の特徴の少なくとも1つ又は複数を有する：

1. WPREが存在する
2. 主要なスプライドナーが突然変異している
3. Tat ORFが部分的に破壊されている
4. 上流ORFからの読み過ぎの可能性を最小限にするために、第VIII因子のORFをフレーム外にクロニングし得る。

10

【0044】

本発明は、治療遺伝子を発現させずにパッケージング細胞内で組換えベクターの産生を可能にする、ベクター構築体に関する。これは、好ましくはフレーム外にある、ORF（オープンリーディングフレーム、open reading frame）又は少なくともその一部を含むイントロンを、任意選択でそれ自身のプロモーターと共に、そのプロモーターと治療遺伝子との間に挿入することによって果たす。ORFは、それだけには限定されないが、lacZ及びGFPなどのレポーター遺伝子又は抗生物質耐性遺伝子を含めた任意の遺伝子をコードしてよい。ORFも逆相補的配向にあり、これは内部プロモーターの下流で最初に遭遇するORFであるので、翻訳機構によって治療遺伝子の前に翻訳される。翻訳は、ORFの最後で、ストップシグナルの位置で停止する。治療遺伝子の発現の可能性をさらに最小限にするために、ポリアデニル化シグナル（やはりイントロン内にある）を第1のORFの後に付加し得る。これにより、翻訳停止及びこの点以降の逆相補鎖の転写の低減が補助される。

20

【0045】

第1のNOIが標的細胞内で発現されるためには、ベクターゲノム転写物中でイントロン内のORFが取り除かれている必要がある。これは、パッケージングの前にゲノム転写物のスプライシングを行うために、この領域中に隣接してスプライドナー及びスプライサクセプター部位が正しい配向で存在することによって保証される。revが存在する場合は、イントロンは位置が変わらない。revが存在しない場合は、イントロンはスプライシングされて除去され、したがってORFも取り除かれる。後者で形質導入した標的細胞では、治療遺伝子は正常どおり発現される。言い換えれば、この戦略は、revの非存在下でベクターを産生させる能力を利用している。ORFにコードされているタンパク質は産生細胞中で発現され、治療遺伝子は発現されない。しかし、ORFはパッケージングの前にゲノム転写物からスプライシングされて除去される。第1のORFがゲノム転写物からスプライシングされて除去されるので、治療遺伝子は組込み後、形質導入した細胞中で発現される。

30

【0046】

本発明によれば、それぞれのNSは任意の適切なヌクレオチド配列であることができる。例えば、それぞれの配列は、独立して、合成によって調製し得るか、組換えDNA技術を用いることによって調製し得るか、天然源から単離し得るか、又はそれらの組合せであり得る、DNA又はRNAであることができる。配列はセンス配列又はアンチセンス配列であり得る。互いに直接若しくは間接的に結合されていてもよい、又はその組合せでもよい、複数の配列が存在していてもよい。

40

【0047】

第2のNOIは、レトロウイルスベクターでの使用が成功している以下の選択マーカーのうち任意の1つ又は複数を含み得る：それぞれG418及びハイグロマイシンに対する耐性を与える細菌性ネオマイシン及びハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子

50

(Palmer et al 1987 Proc Natl Acad Sci 84: 1055-1059; Yang et al 1987 Mol Cell Biol 7: 3923-3928); メトトレキサートに対する耐性を与えるマウスジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) 突然変異体 (Miller et al 1985 Mol Cell Biol 5: 431-437); 細胞がミコフェノール酸、キサンチン及びアミノプテリンを含む培地中で増殖することを可能にする細菌性 gpt 遺伝子 (Mann et al 1983 Cell 33: 153-159); 細胞がヒスチジンを含まないがヒスチジノールを含む培地中で増殖することを可能にする細菌性 hisD 遺伝子 (Danos及びMulligan 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 6460-6464); 様々な薬物に対する耐性を与える多剤耐性遺伝子 (mdr) (Guild et al 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 1595-1599; Pastan et al 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 4486-4490) 並びにプロマイシン又はフレオマイシンに対する耐性を与える細菌性遺伝子 (Morgenstern及びLand 1990 Nucleic Acid Res 18: 3587-3596)。

【0048】

これらのマーカーはすべて優性選択マーカーであり、これらの遺伝子を発現するほとんどの細胞の化学的選択を可能にする。GFP / - ガラクトシダーゼも優性マーカーとみなすことができる。GFP / - ガラクトシダーゼを発現する細胞は、蛍光活性化細胞分取器を用いて選択することができる。実際、任意の細胞表面タンパク質が、このタンパク質を既に産生していない細胞の選択マーカーを提供することができる。このタンパク質を発現する細胞は、このタンパク質に対する蛍光抗体及び細胞分取器を用いて選択することができる。ベクターに含まれたことのある他の選択マーカーには、細胞がヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地で増殖することを可能にする hprt 及び HSV チミジンキナーゼが含まれる。

【0049】

第2のNOIは、第1のNOIがパッケージング細胞内で翻訳されないようにするが(例えばポリアデニル化シグナル)、形質導入の後それがスプライシングによって取り除かれた場合、その後第1のNOIは機能的発現のために露呈される非コード配列を含むことができる。

【0050】

第2のNOIは、産生系の複雑性を軽減することができる、Envタンパク質をコードするenvなどのウイルスの必須要素もコードしてよい。

【0051】

適切な第1のNOIのコード配列には、それだけには限定されないが、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、操作した免疫グロブリン様分子、単鎖抗体、融合タンパク質、酵素、免疫共刺激分子、免疫調節分子、抗センスRNA、標的タンパク質のトランス優性 (transdominant) 陰性突然変異体、毒素、条件付毒素、抗原、腫瘍抑制タンパク質及び成長因子、膜タンパク質、血管作用性タンパク質及びペプチド、抗ウイルスタンパク質及びリボザイム、並びにそれらの誘導體 (レポーターグループと会合しているものなど) をコードする配列などの、治療的及び/又は診断的用途のものが含まれる。

【0052】

第1のNOIのコード配列は、コード配列の融合タンパク質又はセグメントをコードしていてもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0053】

以降、本発明の様々な好ましい特徴及び実施形態を非限定的な例によって説明する。

【0054】

本発明の実施には、別段に指定しない限りは、当業者の能力範囲にある化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA学及び免疫学の慣用技術を用いる。このような技術は文献中に説明されている。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New Yo

rk, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; 並びに D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Pressを参照されたい。これら一般的な書籍のそれぞれは本明細書中に参考として組み込まれている。

【0055】

第VIII因子の遺伝子

本発明は、好ましくはヒト第VIII因子又はその相同体若しくは機能的な誘導体を生じさせる治療的NOIの使用を含む。機能的なヒト第VIII因子の配列は米国特許第5,618,788号から得られる。

【0056】

一実施形態では、本発明者らは、完全長のコドン最適化した第VIII因子の遺伝子を構築した。

【0057】

B-ドメインが欠失した第VIII因子の遺伝子の誘導体、すなわちそれに帰する必須の機能がないB-ドメイン分子が欠失しており、本発明で用い得る誘導体がいくつか存在する。

【0058】

一実施形態では、本発明者らの合成遺伝子は、生化学的によく特徴づけられている「LA」型に基づく(Pittman et al 1993)。野生型及びコドン最適化した遺伝子の比較を可能にするために、この構築体の前駆体であるpDGR-2(Toole et al 1986)をLGC(ATCC # 53100)から注文した。2つの遺伝子のコドン最適化した型及び野生型をどちらも構築した。

【0059】

別の実施形態では、本発明者らは、この合成遺伝子から重複(overlapping)PCRによってより短い「SQ」型を構築した。

【0060】

第VIII因子のB-ドメインに隣接するアミノ酸配列を図3に示した。

【0061】

コドン最適化した第VIII因子のヌクレオチド配列の例を図19及び図21に示した(塩基20~7072を参照されたい)。

【0062】

組織特異的なプロモーターを用いたゲノムの構築

肝臓に特異的なプロモーター

ヒト₁-抗トリプシン(hAAT)プロモーターは、肝臓に特異的な強力なプロモーターとみなされている。最近の研究では、アルブミン、ヒト₁-抗トリプシン及びヘモペキシンのプロモーター(単独で及びエンハンサー領域と組み合わせて)を、水力学的送達によって、in vitroで及びマウス内で試験した(Kramer et al 2003、同書)。長期的な研究(50日間)からのin vivoデータにより、ヒト₁-抗トリプシンプロモーターは安定したレベルのレポーター遺伝子の発現を生じさせることが示された。hAAT、ネズミアルブミン、ラットホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK、phosphoenolpyruvate carboxykinase)及びラット肝臓脂肪酸結合タンパク質プロモーターをレトロウイルスベクターとの関係で比較した初期の研究では、hAATプロモーターが最も高い発現をもたらすことが判明している(Hafenrichter et al 1994 Blood 84: 3394-404)。しかし、前述の肝臓プロモーターのうち任意のものを用い得る。

【0063】

試験用にhAATプロモーターを選択した。このプロモーターは、Kramer et al 2003

10

20

30

40

50

、同書に記載のプライマーに基づくが、一部改変を加えたプライマーを用いて、PCRによってHT1080ゲノムDNAからクローニングした。用いたプライマーは以下のとおりである：

(制限部位及びオーバーハングを含む)：

HAATN: TATGAGCGGCCGCGTACCCGCCACCCCCTCCACCTGG

(NotI部位を含む)

HAATP: ATCATGCACGTGTTCACTGTCCCAGGTCAGTGGTG

(PmlI部位を含む)

プロモーターの模式図を図4に示した。

【0064】

また、ヒト血清アルブミンエンハンサー、ヒトプロトロンビンエンハンサー、 α -1ミクログロブリンエンハンサー及びイントロンアルドラーゼエンハンサーなどの肝臓に特異的なエンハンサー要素も用い得る。本発明で用いる組織特異的なプロモーターには、それだけには限定されないが、アポリポタンパク質E (ApoE、apolipoprotein E)由来の肝部制御領域の遺伝子(HCR、hepatic locus control region)、肝炎Bウイルス(HBV、hepatitis B virus)エンハンサー2要素及びアルブミンエンハンサーなどの1つ又は複数のエンハンサーが含まれ得る。

【0065】

内皮に特異的なプロモーター

いくつかの出版物が、fms様チロシンキナーゼ-1(Flt-1/VEGF受容体-1)、細胞間接着分子-2(ICAM-2、intercellular adhesion molecule-2)、フォンウィルブランド因子(vWF)、VEGF受容体-2(Flk-1/KDR)、エンドグリン(Nicklin et al 2001 Hypertension 38: 65-70; Kappel et al 1999 Blood 93: 4284-92; Cowan et al 1998 J. Biol Chem. 273: 11737-44; Velasco et al 2001 Gene Ther. 8:897-904)並びにtie1及びtie2などのtieプロモーター(Korhonen et al 1 Blood 86:1828-35)を含めた、本発明で用い得る内皮に特異的なプロモーターの分析について記載している。

【0066】

ICAM-2プロモーターは、Nicklin et al 2001、同書に記載のものに基づいたプライマーを用いて、293TゲノムDNAから増幅し得る。

【0067】

産生細胞における導入遺伝子の発現の防止

高度に好ましい実施形態では、B-ドメインが欠失した第VIII因子の遺伝子を、本発明の第1の態様のベクター内に、ヒト α 1抗トリプシン(hAAT、human alpha one antitrypsin)肝臓特異的なプロモーターの制御下で挿入した。これにより、血友病緩和させるための遺伝子治療で使用するのに十分に高い力価でベクターを産生させることが可能となった。産生細胞中における第VIII因子の発現によって引き起こされるベクター産生の問題を迂回すること。

【0068】

産生細胞中での第VIII因子の発現は力価を低下させていると思われるので、これらの細胞中での発現を妨げる代替戦略が考案された。この戦略では、Revの非存在下で新しい世代のEIAVベクターを産生させる能力を活用する。オープンリーディングフレーム(ORF)を内部プロモーターと治療遺伝子との間に挿入する。これらはすべて逆配向にある。したがって、このORFにコードされているタンパク質は産生細胞中で発現され、治療タンパク質は発現されない。ORF及びそのポリアデニル化シグナルは、(Revの非存在下で)パッケージングの前にゲノム転写物からスプライシングされて除去されるようにイントロン内に含まれている。これを図1に示した。

【0069】

第1のORFはゲノム転写物からスプライシングされて除去されているので、組込み後には形質導入した細胞中で治療遺伝子が発現される(図2)。

10

20

30

40

50

【0070】

この戦略を試験するために、図1に示す、LacZ及びGFPレポーター遺伝子を含むベクターを構築した。これらのベクターを用いることで、LacZタンパク質の発現は産生細胞中では最小限であるが、形質導入後には高レベルの発現が得られる。

【0071】

レトロウイルス

当分野では周知のように、ベクターとは、実体が1つの環境から別の環境へと移動することを可能にする又は容易にするツールである。本発明によれば、例として、組換えDNA技術で用いる一部のベクターは、DNAセグメント(異種cDNAセグメントなどの異種DNAセグメント等)などの実体を、DNAセグメントを含むベクターを複製すること
10
を目的として宿主細胞内に移動することを可能にする。組換えDNA技術で用いるベクターの例には、それだけには限定されないが、プラスミド、染色体、人工染色体又はウイルスが含まれる。

【0072】

用語「発現ベクター」とは、*in vivo*又は*in vitro/ex vivo*の発現が可能な構築体を意味する。

【0073】

本発明の態様で用いるレトロウイルスベクターは、任意の適切なレトロウイルスに由来する、又はそれから誘導可能であり得る。多数の様々なレトロウイルスが同定されている。例には、ネズミ白血病ウイルス(MLV、murine leukemia virus)、ヒト免疫不全ウ
20
イルス(HIV、human immunodeficiency virus)、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV、human T-cell leukemia virus)、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV、mouse mammary tumour virus)、ラウス肉腫ウイルス(RSV、Rous sarcoma virus)、藤浪肉腫ウイルス(FuSV、Fujinami sarcoma virus)、モロニーネズミ白血病ウイルス(Mo-MLV、Moloney murine leukemia virus)、FBRネズミ骨肉腫ウイルス(FBRMSV、FBR murine osteosarcoma virus)、モロニーネズミ肉腫ウイルス(Mo-MSV、Moloney murine sarcoma virus)、アベルソンネズミ白血病ウイルス(A-MLV、Abelson murine leukemia virus)、トリ骨髄球腫症ウイルス-29(MC29、Avian myelocytomatosis virus-29)、及びトリ赤芽球症ウイルス(AEV、Avian erythroblastosis virus)が含まれる。レトロウイルスの詳細なリストはCoffin et al., 1997, "retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763に見つかり得る。
30

【0074】

レトロウイルスは大きく2つにすなわち、「単純」及び「複合」に分類し得る。レトロウイルスは、さらに7つの群に分類し得る。これらの群のうち5つは、発癌の潜在性を有するレトロウイルスを表す。残りの2つの群はレンチウイルス及びスピマウイルスである。これらレトロウイルスの総説は、Coffin et al., 1997 (同書)に示されている。

【0075】

本発明の方法で用いるための典型的なベクターでは、複製に必須の1つ又は複数のタンパク質コード領域の少なくとも一部をウイルスから取り除き得る。これにより、ウイルス
40
ベクターは複製に欠陥をもつこととなる。また、標的の非分裂宿主細胞に形質導入することができる且つ/又はそのゲノムを宿主ゲノム内に組み込ませることができる候補の変調部分を含むベクターを産生させるために、ウイルスゲノムを、部分的に、調節性の制御領域に作動可能に連結している候補の変調部分とベクターゲノム内のレポーター部分tpをコードするライブラリで置き換えてもよい。

【0076】

好ましくは、標的の非分裂細胞又は分裂が遅い細胞に形質導入することができるウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

【0077】

レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターのより大きな群の一部である。レ
50

ンチウイルスの詳細なリストは、Coffin et al ("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763)に見つかり得る。手短に述べると、レンチウイルスは霊長類群及び非霊長類群に分けることができる。霊長類レンチウイルスの例には、それだけには限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒト自己免疫不全症(AIDS、auto-immunodeficiency syndrome)の原因物質、及びサル免疫不全ウイルス(SIV、simian immunodeficiency virus)が含まれる。非霊長類レンチウイルス群には、プロトタイプ「遅発性ウイルス」のビスナ/マエディウイルス(VMV、visna/maedi virus)、並びにそれに関連するヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV、caprine arthritis-encephalitis virus)、ウマ科動物伝染性貧血ウイルス(EIAV、equine infectious anaemia virus)、さらにより最近になって記述されているネコ科動物免疫不全ウイルス(FIV、feline immunodeficiency virus)及びウシ免疫不全ウイルス(BIV、bovine immunodeficiency virus)が含まれる。

10

【0078】

レンチウイルスファミリーと他の種類のレトロウイルスとの差異は、レンチウイルスは分裂細胞及び非分裂細胞のどちらにも感染する能力を有することである(Lewis et al 1992 EMBO. J 11: 3053-3058; Lewis and Emerman 1994 J. Virol. 68: 510-516)。対照的に、MLVなどの他のレトロウイルスは、例えば筋肉、脳、肺及び肝臓組織を構成する非分裂細胞又は分裂が遅い細胞に感染することができない。

【0079】

本明細書中において本発明の一部の態様で使用する「非霊長類」ベクターとは、主として霊長類、特にヒトに感染しないウイルス由来のベクターをいう。したがって、非霊長類ウイルスベクターには、犬、羊及び馬、爬虫類、鳥並びに昆虫などの非霊長類哺乳動物に感染するベクターが含まれる。

20

【0080】

本明細書中で使用するレンチウイルスの(lentiviral)ベクター又はレンチウイルス(lentivirus)ベクターとは、レンチウイルスから誘導可能な構成成分を少なくとも1つ含むベクターである。好ましくは、その構成成分は、ベクターが細胞に感染する、遺伝子を発現する、又は複製される生物学的機構に関与している。用語「誘導可能」は、配列は必ずしもレトロウイルスから得られる必要はないが、それから誘導することができるという意味で、通常感覚で使用される。例として、配列は合成によって又は組換えDNA技術を用いることによって調製し得る。

30

【0081】

非霊長類レンチウイルスは、自然には霊長類に感染しないレンチウイルス科の任意のメンバーであり得、ネコ科動物免疫不全ウイルス(FIV)、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)、マエディビスナウイルス(MVV、Maedi visna virus)又はウマ科動物伝染性貧血ウイルス(EIAV)が含まれ得る。好ましくは、レンチウイルスはEIAVである。ウマ科動物伝染性貧血ウイルスはすべてのウマ科動物に感染し、血漿ウイルス血症及び血小板減少症を生じさせる(Clabough, et al. 1991. J Virol. 65:6242-51)。ウイルスの複製は、単球からマクロファージへの成熟過程によって制御されていると考えられている。

40

【0082】

一実施形態では、ウイルスベクターはEIAV由来である。EIAVはレンチウイルスの最も単純なゲノム構造を有しており、本発明での使用に特に好ましい。EIAVは、gag、pol及びenv遺伝子に加えて3つの他の遺伝子、すなわちtat、rev、及びS2をコードする。tatはウイルスのLTRの転写活性化剤として作用し(Derse及びNewbold 1993 Virology. 194:530-6; Maury, et al 1994 Virology. 200:632-42)、revはrev応答要素(RRE、rev-response element)によってウイルス遺伝子の発現を調節及びコーディネートする(Martarano et al 1994 J Virol. 68:3102-11)。これら2つのタンパク質の作用機構は、霊長類ウイルスの類似機構に大まかに似ていると考えられている(Martano et al 同書)。S2の機能は知られていない。さらに、EIAVタン

50

パク質である T t m が同定されており、これは、膜貫通タンパク質の開始点にある e n v コード配列までスプライシングされた t a t の第 1 のエクソンによってコードされている。

【 0 0 8 3 】

プロテアーゼ、逆転写酵素及びインテグラーゼに加えて、非霊長類レンチウイルスは d U T P a s e をコードする第 4 の p o l 遺伝子産物を含む。このことは、これらのレンチウイルスが特定の非分裂細胞種に感染する能力において役割を果たしているかもしれない。

【 0 0 8 4 】

本発明のこの態様のウイルス R N A は、ウイルス又は非ウイルスの起源であり得るが、哺乳動物細胞などの真核細胞中で発現を指揮することができるプロモーターから転写される。任意選択で、エンハンサーをプロモーターの上流又は下流のどちらかに付加する。R N A の転写は、レンチウイルスの 3 ' L T R 中に提供され得るポリアデニル化部位、又は異なるポリアデニル化シグナルで停止する。

【 0 0 8 5 】

したがって、本発明は、プロモーターと、任意選択で、非霊長類レンチウイルスベクターゲノムの発現を指揮することができるエンハンサーとを含む D N A 転写単位を用いる。

【 0 0 8 6 】

本明細書中に記載した転写単位は、転写されることができる配列を含む核酸の領域を含む。したがって、m R N A、t R N A 及び r R N A をコードする配列がこの定義内に含まれる。配列は、プロモーターに対してセンス方向又はアンチセンス方向であり得る。アンチセンス構築体は、周知の技術に従って細胞内での遺伝子の発現を阻害するために用いることができる。核酸は、例えば、リボ核酸 (R N A、ribonucleic acid) 若しくはデオキシリボ核酸 (D N A、deoxyribonucleic acid) 又はその類似体であり得る。m R N A をコードする配列は、任意選択で、翻訳されたコード配列と天然に又は他の方法で会合している 5 ' 及び / 若しくは 3 ' の転写されているが翻訳されていないフランキング配列の一部或いは全体を含む。この配列は、通常は転写された配列、例えば転写ストップシグナル、ポリアデニル化部位及び下流のエンハンサー要素と会合している、配列と会合した転写制御配列をさらに含み得る。核酸は c D N A 又はゲノム D N A (イントロンを含み得る) を含み得る。

【 0 0 8 7 】

レトロウイルスゲノムの基本構造は 5 ' L T R 及び 3 ' L T R であり、その間又は内部にゲノムのパッケージングを可能にするパッケージングシグナル、プライマー結合部位、宿主細胞ゲノム内への組込みを可能にする組込み部位、並びにパッケージング成分をコードする g a g、p o l 及び e n v 遺伝子 (これらはウイルス粒子の組立てに必要なポリペプチドである) が位置する。より複合的なレトロウイルスは、組み込まれたプロウイルスの R N A 転写物が感染した標的細胞の核から細胞質へと効率的に輸出されることを可能にする H I V 中の r e v 及び R R E 配列などの、さらなる特徴を有する。

【 0 0 8 8 】

プロウイルス内では、これらの遺伝子の両末端に末端反復配列 (L T R) と呼ばれる領域が隣接している。L T R はプロウイルスの組込み及び転写を司っている。L T R はまた、エンハンサー - プロモーター配列としての役割も果たし、ウイルス遺伝子の発現を制御することができる。レトロウイルス R N A のキャプシド形成は、ウイルスゲノムの 5 ' 末端に位置する p s i 配列に基づいて起こる。

【 0 0 8 9 】

L T R 自体は、U 3、R 及び U 5 と呼ばれる 3 つの要素に分割することができる同一の配列である。U 3 は、R N A の 3 ' 末端に独特な配列に由来する。R は R N A の両末端で繰り返される配列に由来し、U 5 は R N A の 5 ' 末端に独特な配列に由来する。3 つの要素の大きさは、様々なレトロウイルス間で大幅に変化することができる。

【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

50

欠陥をもつレトロウイルスベクターゲノムでは、gag、pol及びenvは存在しないか、又は機能的でないかもしれない。RNAの両末端にあるR領域は反復配列である。U5及びU3はそれぞれRNAゲノムの5'及び3'末端の独特の配列を表す。

【0091】

本発明の一態様によって使用する好ましいベクターは、組換え非霊長類レンチウイルスベクターである。

【0092】

用語「組換えレンチウイルスベクター」(RLV、recombinant lentiviral vector)とは、パッケージング成分の存在下で、標的細胞に感染することができるウイルス粒子内へのRNAゲノムのパッケージングを可能にするのに十分なレトロウイルスの遺伝情報を有するベクターをいう。標的細胞の感染には、逆転写及び標的細胞ゲノム内への組込みが含まれる。RLVは、ベクターによって標的細胞内へ送達する非ウイルス性のコード配列を保有する。RLVは、最終標的細胞内で独立に複製して感染性レトロウイルス粒子を産生することができない。通常、RLVは機能的なgag-pol及び/若しくはenv遺伝子並びに/又は複製に必須の他の遺伝子を欠く。本発明のベクターはスプリットイントロンベクターとして構成し得る。スプリットイントロンベクターは、PCT特許出願WO99/15683号に記載されている。

【0093】

好ましくは、本発明のレンチウイルスベクターは最小限のウイルスゲノムを有する。

【0094】

本明細書中で使用する用語「最小限のウイルスゲノム」とは、非必須要素が取り除かれ、目的のヌクレオチド配列を標的宿主細胞に感染させる、形質導入する、及び送達するために必要な機能を提供するための必須要素が保持されるよう、ウイルスベクターを操作したこと意味する。この戦略に関するさらなる詳細は、本発明者らの国際公開公報WO98/17815号に見つけることができる。

【0095】

したがって、本発明で使用するための最小限のレンチウイルスゲノムは、(5')R-U5-1つ又は複数の第1のヌクレオチド配列-U3-R(3')を含む。しかし、宿主細胞/パッケージング細胞内でレンチウイルスゲノムを産生させるために用いたプラスミドベクターは、宿主細胞/パッケージング細胞内でのゲノムの転写を指揮するために、レンチウイルスゲノムに作動可能に連結している転写調節制御配列も含む。これらの制御配列は、転写されたレトロウイルスの配列に会合した天然配列、すなわち5'U3領域であるか、又は別のウイルスのプロモーター、例えばCMVプロモーターなどの異種プロモーターであり得る。一部のレンチウイルスゲノムは、効率的にウイルスを産生するために追加の配列を必要とする。例えば、HIVの場合、rev及びRRE配列が含まれることが好ましい。しかし、rev及びRREの必要性は、コドンの最適化によって軽減又は排除され得る。この戦略のさらなる詳細は、本発明者らの国際公開公報WO01/79518号に見つけることができる。rev/RRE系と同じ機能を行う代替配列も知られている。例えば、rev/RRE系の機能的な類似体がメーソンファイザー(Mason Pfizer)サルウイルス中に見つかる。これはCTEとして知られており、ゲノム中にRRE型の配列を含み、感染した細胞内で因子と相互作用すると考えられている。細胞性因子はrev類似体とみなすことができる。したがって、CTEをrev/RRE系の代替法として用い得る。知られている、又は利用可能となる任意の別の機能的な均等物が本発明に関連し得る。例えば、HTLV-IのRexタンパク質をHIV-1のRevタンパク質で機能的に置き換えることができることも知られている。また、Rev及びRexがIRE-BPに対して同様の効果を有することも知られている。

【0096】

本発明の一実施形態では、レンチウイルスベクターは自己失活ベクターである。

【0097】

例として、3'LTRのU3領域中の転写エンハンサー又はエンハンサー及びプロモ-

10

20

30

40

50

ターを欠失させることによって、自己失活レトロウイルスベクターを構築した。一回りのベクターの逆転写及び組込みののち、これらの変更が転写を失活させたプロウイルスを産生する5'及び3'LTRの両方にコピーされる(Yu et al 1986 Proc Natl Acad Sci 83: 3194-3198; Dougherty及びTemin 1987 Proc Natl Acad Sci 84: 1197-1201; Hawley et al 1987 Proc Natl Acad Sci 84: 2406-2410; Yee et al 1987 Proc Natl Acad Sci 91: 9564-9568)。しかし、このようなベクター中のLTRの内部にある任意のプロモーター(又は複数のプロモーター)は、それでも転写が活性である。この戦略は、内部に配置された遺伝子からの転写に対する、ウイルスのLTR中のエンハンサー及びプロモーターの効果を排除するために用いた。そのような効果には、転写の増加(Jolly et al 1983 Nucleic Acids Res 11: 1855-1872)又は転写の抑制(Emerman及びTemin 1984 Cell 39: 449-467)が含まれる。また、この戦略は、3'LTRからゲノムDNAへの下流転写を排除するためにも用いることができる(Herman及びCoffin 1987 Science 236: 845-848)。これは、内在性発癌遺伝子の偶発的な活性化を防ぐことが非常に重要であるヒトの遺伝子治療において特に関心がもたれる。

【0098】

本発明者らの国際公開公報WO99/32646号では、本発明者らは、本発明に有利に適用し得る特徴の詳細を示している。詳細には、非霊長類レンチウイルスゲノムは、(1)好ましくはgag遺伝子が欠失しており、gagの欠失により、gagコード配列のヌクレオチド約350又は354の下流の1つ若しくは複数のヌクレオチドが取り除かれている；(2)好ましくは非霊長類レンチウイルスゲノムから1つ又は複数のアクセサリ遺伝子が欠如している；(3)好ましくはtat遺伝子を欠くが、5'LTRの末端とgagのATGとの間にリーダー配列を含む；並びに(4)(1)、(2)及び(3)の組合せであることを理解されたい。特に好ましい実施形態では、レンチウイルスベクターは(1)及び(2)及び(3)の特徴すべてを含む。

【0099】

非霊長類レンチウイルスベクターは標的化ベクターであり得る。用語「標的化ベクター」とは、細胞に感染/形質移入/形質導入する能力、又は宿主細胞及び/若しくは標的細胞中で発現される能力が、宿主生物中の特定の細胞種、通常は共通の又は類似した表現型を有する細胞に制限されているベクターをいう。

【0100】

発現は、プロモーター/エンハンサー及び他の発現調節シグナルを含めた制御配列を用いて制御し得る。原核細胞プロモーター及び真核細胞中で機能的なプロモーターを用い得る。組織特異的又は刺激特異的なプロモーターを用い得る。2つ以上の異なるプロモーター由来の配列要素を含むキメラプロモーターも用い得る。

【0101】

適切なプロモーター配列は、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV、cytomegalovirus)、レトロウイルス及びシミアンウイルス40(SV40、Simian Virus 40)などのウイルスゲノム由来のもの、又はアクチンプロモーター若しくはリボソームタンパク質プロモーターなどの異種の哺乳動物プロモーター由来のものを含めた強力なプロモーターである。遺伝子の転写は、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することによってさらに増大させ得る。エンハンサーは配向及び位置に比較的非依存的であるが、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(bp100~270)及びCMV初期プロモーターエンハンサーなどの真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを用いてもよい。エンハンサーはプロモーターの5'又は3'側の位置でベクター内へとスプライシングされ得るが、プロモーターの5'側の部位に位置することが好ましい。

【0102】

プロモーターはさらに、適切な宿主中での発現を確実にする又は増加させるさらなる特徴を含むことができる。例えば、その特徴は、保存的領域、例えばプリブノーボックス又はTATAボックスであることができる。プロモーターはさらに、ヌクレオチド配列の発

現レベルに影響を与える（維持する、増強する、低減させる）ために、他の配列も含まれる。適切な他の配列には、S h 1 - イントロン又はA D H イントロンが含まれる。他の配列には、温度、化学、光、又はストレス誘導要素などの誘導要素が含まれる。また、転写又は翻訳を増強させる適切な要素を存在させてもよい。

【0103】

本発明の発現ベクターは、シグナル配列と目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結しているアミノ末端 t a g 配列とを含む。

【0104】

本発明の特に好ましい実施形態では、N O I が第VIII因子をコードする場合、上述の組織特異的なプロモーターを用いる。

【0105】

産生/パッケージング細胞系を用いることによって、多量のレトロウイルスベクター粒子を増殖及び単離して（例えばレトロウイルスベクター粒子の適切な力価を調製する）、次いで例えば目的部位（成人の脳組織など）への形質導入を行うことが可能である。大規模な産生又はベクター粒子には通常産生細胞系の方がよい。

【0106】

一過性の形質移入には、パッケージング細胞法を超える数々の利点がある。この点に関して、一過性の形質移入では、安定したベクター産生細胞系の作製により長い時間が必要とされることが回避され、ベクターゲノム又はレトロウイルスのパッケージング成分が細胞に毒性である場合に用いる。ベクターゲノムが、細胞周期の阻害剤やアポトーシスを誘導する遺伝子などの、毒性遺伝子又は宿主細胞の複製を妨害する遺伝子をコードする場合、安定したベクター産生細胞系の作製は困難であるかもしれないが、一過性の形質移入を用いると、細胞が死滅する前にベクターを産生させることができる。また、一過性の感染を用いて、安定したベクター産生細胞系から得られるレベルに匹敵するベクター力価レベルを産生する細胞系が開発されている（Pear et al 1993, PNAS 90:8392-8396）。

【0107】

産生細胞/パッケージング細胞は、任意の適切な細胞種のものであることができる。産生細胞は一般に哺乳動物細胞であるが、例えば昆虫細胞であることができる。

【0108】

本明細書中で使用する用語「産生細胞」又は「ベクター産生細胞」とは、レトロウイルスベクター粒子の産生に必要なすべての要素を含む細胞をいう。

【0109】

好ましくは、産生細胞は安定した産生細胞系から得ることができる。

【0110】

好ましくは、産生細胞は誘導した安定した産生細胞系から得ることができる。

【0111】

好ましくは、産生細胞は誘導した産生細胞系から得ることができる。

【0112】

本明細書中で使用する用語「誘導した産生細胞系」とは、マーカー遺伝子の高い発現についてスクリーニング及び選択を行った、形質導入した産生細胞系である。このような細胞系は、レトロウイルスのゲノムからの高レベルの発現を支援する。用語「誘導した産生細胞系」は、用語「誘導した安定した産生細胞系」及び用語「安定した産生細胞系と互換性があるように用いる。

【0113】

好ましくは、誘導した産生細胞系には、それだけには限定されないが、レトロウイルス産生細胞及び/又はレンチウイルス産生細胞が含まれる。

【0114】

好ましくは、誘導した産生細胞系はH I V 又はE I A V 産生細胞系、より好ましくはE I A V 産生細胞系である。

【0115】

10

20

30

40

50

好ましくは、エンベロープタンパク質の配列及びヌクレオカプシドの配列はすべて産生細胞及び/又はパッケージング細胞内に安定して組み込まれている。しかし、これらの配列の1つ又は複数がエピソームの形態で存在し、遺伝子の発現がエピソームから起こることもできる。

【0116】

本明細書中で使用する用語「パッケージング細胞」とは、RNAゲノムを欠く感染性組換えウイルスの産生に必要な要素を含む細胞をいう。典型的には、このようなパッケージング細胞は、ウイルスの構造タンパク質（コドン最適化したgag-pol及びenvなど）を発現することができるがパッケージングシグナルを含まない1つ又は複数の産生プラスミドを含む。

【0117】

「パッケージング配列」又は「psi」と互換性があるように用いられる用語「パッケージングシグナル」とは、ウイルス粒子の形成中においてレトロウイルスRNA鎖のキャプシド形成に必要である、非コード性のシス作用性の配列に関して用いる。HIV-1では、この配列は、主要なスプライスドナー部位（SD、splice donor）の上流から少なくともgag開始コドンまで延びている座位に位置づけられている。

【0118】

上述のベクター構築体との使用に適したパッケージング細胞系は容易に調製し得（国際公開公報WO92/05266号も参照）、また、レトロウイルスベクター粒子を産生するための産生細胞系を作製するために利用できる。上述のように、利用可能なパッケージング系の概要は「レトロウイルス」（上記）に示されている。

【0119】

また、上述のように、パッケージングシグナルが欠失しているプロウイルスを含む単純パッケージング細胞系は、組換えによって望ましくない、複製に適格性のあるウイルスの迅速な産生をもたらすことが判明している。安全性を改善するために、プロウイルスの3'LTRが欠失している第2世代の細胞系が作製されている。このような細胞では、野生型のウイルスを産生するために2回の組換えが必要となる。さらなる改善は、gag-pol遺伝子及びenv遺伝子を別々の構築体、すなわちいわゆる第3世代のパッケージング細胞系内に導入することを含む。これらの構築体は、形質移入中の組換えを防ぐために逐次的に導入する。

【0120】

好ましくは、パッケージング細胞系は第2世代のパッケージング細胞系である。

【0121】

好ましくは、パッケージング細胞系は第3世代のパッケージング細胞系である。

【0122】

このようなスプリット構築体、すなわち第3世代の細胞系では、コドンを変更することによって組換えをさらに軽減させ得る。遺伝暗号の冗長に基づくこの技法は、個別の構築体間、例えばgag-pol及びenvのオープンリーディングフレーム中の重複領域間の相同性を低減させることを目的とする。

【0123】

パッケージング細胞系は、キャプシド形成に必要な遺伝子産物を提供するため、及び高力価のベクター粒子を産生させるための膜タンパク質を提供するために有用である。パッケージング細胞は、組織培養細胞系などのin vitroで培養した細胞である得る。適切な細胞系には、それだけには限定されないが、ネズミ線維芽細胞由来の細胞系又はヒト細胞系などの哺乳動物細胞が含まれる。好ましくは、パッケージング細胞系は、例えばHEK293、293-T、TE671、HT1080などのヒト細胞系である。

【0124】

或いは、パッケージング細胞は、単球、マクロファージ、血液細胞又は線維芽細胞などの、治療する個体に由来する細胞であり得る。細胞を個体から単離し、パッケージング成分及びベクター成分をex vivoで投与し、次いで自己パッケージング細胞を再投与

10

20

30

40

50

し得る。

【0125】

より詳細には、パッケージング細胞は、治療する個体の体内にある *in vivo* パッケージング細胞であるか、又は組織培養細胞系などの *in vitro* で培養した細胞である得る。適切な細胞系には、ネズミ線維芽細胞由来の細胞系又はヒト細胞系などの哺乳動物細胞が含まれる。好ましくは、パッケージング細胞系は、例えば293細胞系、HEK293、293-T、TE671、HT1080などのヒト細胞系である。

【0126】

或いは、パッケージング細胞は、単球、マクロファージ、幹細胞、血液細胞又は線維芽細胞などの、治療する個体に由来する細胞であり得る。細胞を個体から単離し、パッケージング成分及びベクター成分を *ex vivo* で投与し、次いで自己パッケージング細胞を再投与し得る。或いは、パッケージング成分及びベクター成分をパッケージング細胞に *in vivo* で投与し得る。レンチウイルスパッケージング成分及びベクター成分を個体の細胞内に導入する方法は、当分野で公知である。例えば、一手法はレンチウイルスベクター粒子の産生に必要な様々なDNA配列、例えばenvコード配列、gag-polコード配列及び欠陥をもつレンチウイルスゲノムを、一過性の三重形質移入によって細胞内に同時に導入することである (Landau & Littman 1992 J. Virol. 66, 5110; Soneoka et al 1995 Nucleic Acids Res 23:628-633)。

10

【0127】

一実施形態では、本発明のベクターの構成は、その産生系としてゲノム、gag-pol成分及びエンベロープを発現する3つの転写単位を用いる。エンベロープ発現カセットは、VSV-Gなど数々のエンベロープのうちの1つ、又は4070Aなど様々なネズミレトロウイルスエンベロープのうちの1つを含み得る。

20

【0128】

従来、これら3つのカセットは、293Tなどの適切な細胞系内に一過的に形質移入した3つのプラスミドから、又は安定した産生細胞系中に組み込まれたコピーから発現させていた。代替手法は、3つのカセットの発現系として別のウイルス、例えばバキュロウイルス又はアデノウイルスを用いることである。これらはどちらも核発現系である。現在までに、レンチウイルスベクター系の成分をすべて発現させるためにボックスウイルスを用いることは記載されていない。詳細には、レンチウイルスのコドン使用頻度が特異であること、及びそれがrev/RRE系などRNAを取り扱う系が必要であることを考慮すると

30

【0129】

シュードタイプ作製

好ましい一態様では、本発明のレトロウイルスベクターのシュードタイプを作製した。この点において、シュードタイプ作製によって1つ又は複数の利点を与えることができる。例えば、レンチウイルスベクターでは、HIVに基づいたベクターのenv遺伝子産物により、これらのベクターがCD4と呼ばれるタンパク質を発現する細胞にのみ感染するよう制限される。しかし、これらのベクター中のenv遺伝子を他のRNAウイルス由来のenv配列で置き換えると、感染範囲がより広範になり得る (Verma及びSomia 1997 Nature 389:239-242)。例として、研究者によりVSV由来の糖タンパク質を用いてHIVに基づいたベクターのシュードタイプが作製されている (Verma及びSomia 1997、同書)。

40

【0130】

別の代替方法では、Envタンパク質は、突然変異体又は操作したEnvタンパク質などの改変したEnvタンパク質であり得る。改変は、標的化能力を導入するため若しくは毒性を軽減させるため、又は別の目的のために行い或いは選択し得る (Valsesia-Wittman et al 1996 J Virol 70: 2056-64; Nilson et al 1996 Gene Therapy 3: 280-6; Fielding et al 1998 Blood 9: 1802及びそれ中に引用される参考文献)。

【0131】

50

選択した任意の分子を用いてベクターのシュードタイプを作製し得る。

【0132】

V S V - G :

V S V - Gでシュードタイプを作製したレンチウイルスベクターを用いて、DNAのサイクリングなしで非侵襲性の静脈内注射（尾の静脈）ののち、*in vivo*（マウス）で肝細胞の効率的な形質導入が成された（Follenzi et al 2002; Pan et al 2002）。他のデータ（Pfeifer et al 2001）と一致しているこれらのデータと、肝臓の効率的な形質導入には細胞サイクリングが必要であるという以前の発見（Park et al 2000b）との明らかな矛盾は、ベクター設計の改善、具体的にはc P P Tを含めること、及び粒子の感染力の増大に起因することが示唆されている。しかし、1つの研究では、用いたベクター（H R ' c m v G F P）はc P P T要素を含まず、肝臓の形質導入が観察された：注射の4日後に59%のG F P陽性細胞、40日後には1.3%まで低下（Pan et al 2002）。

10

【0133】

ロスリバーウイルス

ロスリバーウイルスのエンベロープは、非霊長類レンチウイルスベクター（F I V）のシュードタイプ作製に用いられており、全身投与した後、主に肝臓に形質導入した（Kang et al 2002）。その効率はV S V - Gでシュードタイプを作製したベクターで得られたものよりも20倍高く、且つそれにより引き起こされる、肝毒性を示唆する肝臓酵素の血清レベルによって測定した細胞毒性が低かったと報告されている。

【0134】

ロスリバーウイルス（R R V）とは、オーストラリアの熱帯及び温帯地域に特有且つ流行性である、蚊によって伝播するウイルスである。温暖な沿岸域における正常集団の抗体保有率は低い傾向があるが（6%～15%）、マレーバレー（Murray Valley）水系の平野における血清陽性率は27～37%に至る。1979～1980年に、R R Vは太平洋諸島で異常発生した。この疾患はヒトの間で接触感染性はなく、致命的となることはないが、その第1の症状は、患者の約半数で疲労及び嗜眠を伴う関節痛であった（Fields Virology）。

20

【0135】

バキュロウイルス G P 6 4

バキュロウイルスのG P 6 4タンパク質は、臨床及び市販の用途に必要な、高力価のウイルスの大規模な産生で用いるウイルスベクターに関して、V S V Gの魅力的な代替物であることが示されている（Kumar M, Bradow BP, Zimmerberg J, Hum Gene Ther. 2003 Jan 1; 14(1):67-77）。V S V Gと比較すると、G P 6 4ベクターは屈性が広範であることが類似しており、且つネイティブ力価が類似している。G P 6 4の発現により細胞が死滅しないので、G P 6 4を構成的に発現する293T系の細胞系を作製することができる。

30

【0136】

別のエンベロープ

E I A Vのシュードタイプの作製に用いた場合に妥当な力価を与える他のエンベロープには、モコラ（Mokola）、狂犬病、エボラ及びL C M V（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、lymphocytic choriomeningitis virus）が含まれる。マウスに子宮内注射した後、V S V - Gのエンベロープは、エボラ又はモコラのどちらよりも肝細胞により効率的に形質導入されることが判明した（Mackenzie et al 2002）。4070Aでシュードタイプを作製したレンチウイルスをマウスに静脈点滴することにより、肝臓中で最大の遺伝子発現がもたらされた（Peng et al 2001）。

40

【0137】

T a tの破壊

T a tの第1のエクソンはパッケージングシグナルの内部にあるという事実にもかかわらず、T a tのオープンリーディングフレームの破壊は、力価に不利益な影響を与えずにベクターの安全性プロフィールを増強する。

【0138】

50

この破壊は、ベクターゲノム中の Tat オープンリーディングフレームの開始コドン（プラスミドのヌクレオチド 1317 ~ 1319）内にヌクレオチドを 1 つ挿入することによって成し得る。

gttgaacCTG gttgaacCTG

これは配列決定によって確認され、新しいゲノム力価決定では、この改変による力価の損失は示されなかった。この改変を行わないゲノムは、産生細胞中でウイルスタンパク質 Tat のアミノ末端部分（29 個の ）を発現する。

【0139】

主要なスプライドナー（SD1）の突然変異

本発明者らは、この改変を有するベクターの力価が、少なくとも機能的な主要なスプライドナーの力価と同等に高いことを見出した。 10

【0140】

破壊は、ヌクレオチド 1405（T）を「C」で置き換えることによってスプライドナーを破壊する部位特異的突然変異誘発によって成し得る。

AGGT AGGC

突然変異したスプライドナーは、下流に機能的なスプライスアクセプターを挿入することによって試験すると、非機能的であった。

【0141】

WPRE / cPPT 要素の含有

WPRE 要素は発現を亢進するので、最大レベルの第 VIII 因子の実現に有益である可能性が高い。 20

【0142】

産生細胞における導入遺伝子の発現

293T 細胞などの産生細胞における導入遺伝子の発現の潜在性を最小限にするために、導入遺伝子のベクターへのクローニングは、第 1 の NOI が任意の上流の ORF に対してフレーム外となるように設計されている。

【0143】

送達系

本発明のベクターは、ウイルスペクター又は非ウイルスペクターによって標的部位に送達し得る。 30

【0144】

当分野では周知のように、ベクターとは、実体が 1 つの環境から別の環境へと移動することを可能にする又は容易にする道具である。例として、組換え DNA 技術で用いる一部のベクターは、DNA セグメント（異種 cDNA セグメントなどの異種 DNA セグメント等）などの実体が標的細胞内に移動することを可能にする。任意選択で、標的細胞内に移動した後、ベクターは、異種 DNA を細胞内に維持するために役割を果たすか、又は DNA 複製単位として機能を果たし得る。組換え DNA 技術で用いるベクターの例には、プラスミド、染色体、人工染色体又はウイルスが含まれる。

【0145】

非ウイルス送達系には、それだけには限定されないが、DNA 形質移入方法が含まれる。ここでは、形質移入には、遺伝子を標的哺乳動物細胞内に送達するために非ウイルスペクターを用いる過程が含まれる。 40

【0146】

典型的な形質移入方法には、電気穿孔、DNA 微粒子銃、脂質媒介の形質移入、コンパクト DNA（compacted DNA）媒介の形質移入、リポソーム、免疫リポソーム、リポフェクチン、陽イオン剤（cationic agent）媒介、陽イオン性両親媒性物質（CFA、cationic facial amphiphile）（Nature Biotechnology 1996 14; 556）、及びそれらの組合せが含まれる。

【0147】

ウイルス送達系には、それだけには限定されないが、アデノウイルスペクター、アデノ 50

関連ウイルス（AAV、adeno-associated viral）ベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、バキュロウイルスベクターが含まれる。ベクターの他の例には、それだけには限定されないが、電気穿孔、DNA微粒子銃、脂質媒介の形質移入、コンパクトDNA媒介の形質移入などのDNA形質移入方法を含めた *ex vivo* 送達系が含まれる。

【0148】

本発明のベクター送達系は、*in vivo* で二次ベクターを産生するのに必要な遺伝子をコードする、*in vitro* で作製した一次ベクターからなり得る。

【0149】

一次ウイルスベクター又は複数の一次ウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス若しくはポックスウイルスベクターなどの様々な異なるウイルスベクターであってもよく、又は複数の一次ウイルスベクターの場合は、これらは様々なウイルス起源のベクターの混合物であり得る。いずれの場合にも、一次ウイルスベクターは、独立して複製できないという欠陥をもつことが好ましい。したがって、これらは標的細胞内に入って二次ベクター配列を送達することはできるが、複製して追加のさらなる標的細胞にさらに感染することはできない。

【0150】

本発明によるベクター系による、1つ若しくは複数の治療遺伝子の送達は、単独で、又は他の治療若しくは治療の他の成分と組み合わせて用い得る。

【0151】

例えば、本発明のレトロウイルスベクターは、国際公開公報WO-A-98/05635号に記載した障害の治療に有用な1つ又は複数のNOIを送達するために用い得る。参照を容易にするために、その一部をここに記載する：癌、炎症又は炎症性疾患、皮膚障害、発熱、心血管系への影響、出血、凝血及び急性期反応、悪液質、摂食障害、急性感染症、HIV感染症、ショック状態、移植片対宿主反応、自己免疫疾患、再灌流傷害、髄膜炎、偏頭痛及びアスピリン依存性抗血栓症；腫瘍増殖、侵襲及び拡大、血管形成、転移、悪性、腹水及び悪性胸水；大脳虚血、虚血性心臓病、骨関節炎、関節リウマチ、骨粗鬆症、喘息、多発性硬化症、神経変性、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、血管炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎；歯周病、歯肉炎；乾癬、後ピー性皮膚炎、慢性潰瘍、表皮水泡症；角膜潰瘍、網膜症及び外科的創傷治癒；鼻炎、アレルギー性結膜炎、湿疹、アナフィラキシー；再狭窄、鬱血性心不全、子宮内膜症、アテローム性動脈硬化症又は内部硬化症（*endosclerosis*）。

【0152】

それに加えて、又はその代わりに、本発明のレトロウイルスベクターは、国際公開公報WO-A-98/07859号に記載した障害の治療に有用な1つ若しくは複数のNOIを送達するために用い得る。参照を容易にするために、その一部をここに記載する：サイトカイン及び細胞の増殖/分化活性；免疫抑制活性又は免疫賦活活性（例えば、ヒト免疫不全ウイルスによる感染症を含めた免疫不全の治療；リンパ球増殖の調節；癌及び多くの自己免疫疾患の治療、及び移植拒絶の予防若しくは腫瘍免疫の誘導のため）；造血の調節（例えば骨髄系又はリンパ系疾患の治療）；骨、軟骨、腱、靭帯及び神経組織の増殖促進（例えば創傷治癒、火傷、潰瘍及び歯周病、並びに神経変性の治療；卵胞刺激ホルモンの阻害又は活性化（受精能の変調）のため）；化学走性/化学運動性の活性（例えば特定の細胞種を傷害又は感染部位に動員するため）；止血及び血栓溶解活性（例えば血友病及び脳卒中を治療するため）；抗炎症性活性（例えば敗血症性ショック又はクローン病を治療するため）；抗微生物剤として；例えば代謝又は行動のモジュレーター；鎮痛剤として；特定の欠乏性障害の治療；ヒト又は獣医学における例えば乾癬の治療において。

【0153】

それに加えて、又はその代わりに、本発明のレトロウイルスベクターは、国際公開公報WO-A-98/09985号に記載した障害の治療に有用な1つ若しくは複数のNOIを送達するために用い得る。参照を容易にするために、その一部をここに記載する：マク

10

20

30

40

50

ロファージ阻害活性及び/又はT細胞阻害活性、したがって抗炎症性活性；抗免疫活性、すなわち炎症に関連しない応答を含めた細胞性及び/又は液性免疫応答に対する阻害効果；マクロファージ及びT細胞が細胞外基質成分及びフィブロネクチンに接着する能力の阻害、並びにT細胞におけるfas受容体発現のアップレギュレーション；関節リウマチを含めた関節炎、過敏症に関連する炎症、アレルギー反応、喘息、全身性エリテマトーデス、コラーゲン病及び他の自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症に関連する炎症、動脈硬化症、アテローム硬化性の心臓病、再灌流傷害、心停止、心筋梗塞、血管炎症性障害、呼吸窮迫症候群又は他の心肺疾患、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎及び胃腸管の他の疾患に関連する炎症、肝線維症、肝硬変又は他の肝臓病、甲状腺炎又は他の腺性疾患、糸球体腎炎又は他の腎臓及び泌尿器系疾患、耳炎又は他の耳鼻咽喉学系疾患、皮膚炎又は他の皮膚病、歯周病又は他の歯牙疾患、睾丸炎又は睾丸副睾丸炎、不妊症、睾丸外傷又は他の免疫関連の精巣疾患、胎盤機能障害、胎盤機能不全、習慣性流産、子癇、子癇前症並びに他の免疫及び/又は炎症性関連の婦人科疾患、後部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、結膜炎、脈絡網膜炎、ブドウ膜網膜炎、視神経炎、眼内炎、例えば網膜炎若しくは類嚢胞黄斑浮腫、交感性眼炎、強膜炎、網膜色素変性症、変性フォンダス(fundus)病の免疫及び炎症性成分、眼球外傷の炎症性成分、感染症によって引き起こされる眼球炎、増殖性硝子体網膜炎、急性虚血性視神経障害、例えば緑内障濾過手術後の過剰な瘢痕、眼球移植に対する免疫及び/又は炎症反応並びに他の免疫及び炎症性関連の眼病、自己免疫疾患或いは中枢神経系(CNS、central nervous system)又は任意の他の器官のどちらにおいても免疫及び/若しくは炎症の抑制が有益となる病気若しくは障害に関連する炎症、パーキンソン病、パーキンソン病の治療による合併症及び/又は副作用、AIDSに関連する痴呆、複合HIVに関連する脳症、デビック病、シデナム舞踏病、アルツハイマー病及び他の変性疾患、CNSの病気又は障害、ストークスの炎症性成分、ポリオ後症候群、精神障害の免疫及び炎症性成分、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性汎脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、ギラム-バレー症候群、シデナムコラ、重症筋無力症、偽脳腫瘍、ダウン症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、CNS圧迫若しくはCNS外傷又はCNS感染症の炎症性成分、筋萎縮及び筋ジストロフィーの炎症性成分、並びに免疫及び炎症関連疾患、中枢神経系及び末梢神経系の病気又は障害、外傷後炎症、敗血症性ショック、感染症、手術の炎症性合併症又は副作用、骨髄移植又は他の移植合併症及び/若しくは副作用、遺伝子治療の炎症性及び/又は免疫合併症並びに副作用(例えばウイルス担体の感染による)、或いは、液性及び/若しくは細胞性の免疫応答を抑制又は阻害するため、単球若しくは白血球の増殖性疾患、例えば白血病を、単球若しくはリンパ球の量を低減させることによって治療又は寛解させるため、角膜、骨髄、器官、水晶体、ペースメーカー、天然若しくは人工皮膚組織などの天然又は人工の細胞、組織及び器官を移植する場合の移植片拒絶を予防及び/若しくは治療するための、AIDに関連する炎症を含めた、所望しない免疫反応及び炎症の阻害。

【0154】

本発明は血友病の治療に特に有用である。

【0155】

本発明はまた、遺伝子治療によって個体を治療するための薬剤組成物であって、組成物が、1つ若しくは複数の送達可能な治療的及び/又は診断的NOI、或いはそれから産生した又は得たウイルス粒子を含む治療上有効な量の本発明のレトロウイルスベクターを含む薬剤組成物を提供する。薬剤組成物は、ヒト又は動物で使用するものであり得る。典型的には、個体対象に最も適切である実際の用量を医師が決定し、これは、特定の個体の年齢、重量及び応答に応じて異なる。

【0156】

組成物は、任意選択で製薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤又はアジュバントを含み得る。製薬用の担体、賦形剤又は希釈剤の選択は、意図する投与経路及び標準の製薬上の慣行に関連して行うことができる。薬剤組成物は、担体、賦形剤若しくは希釈剤として、又はそれに加えて、任意の適切な結合剤、潤滑剤、懸濁剤、コーティング剤、可溶化剤、

及びウイルスが標的部位内に進入することを補助又は増加させ得る他の担体物質（例えば脂質送達系など）を含み得る。

【0157】

必要に応じて、薬剤組成物は以下のうちの任意の1つ又は複数によって投与することができる：吸入、坐薬又は膣坐薬の形態、ローション、溶液、クリーム、軟膏又は粉剤の形態で局所的に、皮膚パッチの使用、デンプン若しくはラクトースなどの賦形剤を含む錠剤、又はカプセル若しくは胚珠中に単独で若しくは賦形剤と混合した形態で、或いは香味剤若しくは着色料を含むエリキシル、液剤又は懸濁液の形態で経口的に、或いは、例えば空洞内、静脈内、筋肉内又は皮下に非経口的に注射することができる。非経口投与には、組成物を他の物質、例えば溶液を血液と等張にするのに十分な塩又は単糖を含み得る滅菌した水溶液の形態で用いることが最もよいかもしい。頬側又は舌下投与には、従来方法によって形成することができる錠剤又はロゼンジの形態で組成物を投与し得る。

10

【0158】

第VIII因子の *in vitro* 産生

本発明のコドン最適化した第VIII因子をコードするベクター又は核酸は、*in vitro* / 細胞培養物発現系中での第VIII因子の発現でも用い得る。したがって、本発明の別の態様では、本発明は、発明の任意の態様によるベクターを形質導入した、又は発明の任意の態様による核酸を形質移入した宿主細胞を提供する。

【0159】

本発明のコドン最適化した第VIII因子をコードするベクター又は核酸を用いた形質導入に適した宿主細胞には、宿主生物の細胞、正常な初代細胞又は培養一次組織に由来する細胞系が含まれ、これを用い得る。適切には、細胞は哺乳動物細胞、好ましくはハムスターCHO細胞、マウスC127細胞又はヒト「293」細胞である。別の実施形態では、細胞は、本明細書中に記載したHepG2細胞であり得る。

20

【0160】

宿主細胞の形質導入は、本発明のベクター又は核酸を宿主細胞と共にインキュベートすることを含む。形質導入した / 形質移入した細胞の継代ののち、例えば本明細書中に記載したCOATEST (ChromogonIX) を用いた第VIII因子の活性の試験を行うために培地を取り出した。

【0161】

遺伝子が適切な宿主細胞内に導入された後、宿主細胞を適切な培地中で高密度まで増殖させ得る。発現された第VIII因子が分泌されている又は溶解によって細胞から単離した場合は、慣用の手段を用いて細胞培地から抽出することができる。その後、所望の産物を慣用技術、例えば、固定した抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー、アミノヘキシル-セファロース上のクロマトグラフィー又は混合高分子電解質方法によって単離及び精製する。

30

【0162】

したがって、本発明のさらなる態様は、本発明による細胞を作製すること、前記細胞を培地中で継代すること、前記培地を取り除くこと、及び第VIII因子を単離することを含む、第VIII因子を *in vitro* で産生する方法を提供する。

40

【0163】

本発明の別の態様は、本発明による、第VIII因子をコードするコドン最適化した核酸を含む細胞を作製すること、前記細胞を培地中で継代すること、前記培地を除去すること、及び第VIII因子を単離することを含む、第VIII因子を *in vitro* で産生する方法を提供する。

【実施例】

【0164】

ベクター構築体

pONY8.4の詳細は、本発明者らの国際公開公報WO03/064665号に見つけることができる。より詳細には、pONY8.4シリーズのベクターは、力価に不利益な影響を与え

50

ずに、アクセサリタンパク質から完全に独立して一過性の又は安定したベクター系の一部として機能することを可能にする、いくつかの改変を有する。従来、レンチウイルスベクターゲノムは、十分な力価を得るために産生細胞（一過性又は安定）中にウイルスタンパク質 rev が存在することを必要としていた。これには、現在の HIV ベクター系及びより初期の EIAV ベクターが含まれる。

【0165】

pONY8.1シリーズのベクターゲノムと比較した場合に、以下の4つの改変点が存在する

a) gag から、及びパッケージングシグナルの一部から誘導した ATG モチーフはすべて、ATTG と読まれるように改変されている。これにより、LTR 中のプロモーターによって駆動させることができるオープンリーディングフレームの挿入が可能となる。

【0166】

b) ゲノムの長さ、すなわち R 領域間の距離は、wt ウイルスで見られる距離よりも短い (7.9 kb)。

【0167】

c) 3' U3 領域はモロニー白血病ウイルス (MLV) の U3 領域由来の配列を含むように改変されているので、形質導入された後、これは内部カセットに加えて第2のオープンリーディングフレーム (ORF) を駆動することができる。本実施例では本発明者らは MLV を用いたが、これは任意のプロモーターであることができる。

【0168】

d) ベクターはウイルスの LTR に作動可能に連結しているヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列は内部プロモーターの上流にあり、前記ヌクレオチド配列はポリプチド又はその断片をコードする。

【0169】

これらの改変は一緒になって、アクセサリタンパク質を必要とせずにウイルス送達系の産生を可能にし、元のウイルス配列の10%のみが標的細胞内に組み込まれる。免疫応答及び複製に適格性のあるウイルスが発生する確率の観点から、これらの要素は将来の安全性への配慮に重要である。LTR を改変するさらなる詳細は、本発明者らの国際公開公報 WO 96 / 37623 号及び国際公開公報 WO 98 / 17816 号に見つけることができる。

【0170】

pONY8.7シリーズのベクターは cPPT 及び WPRE を有する (pONY8.4 はどちらも有さない)。

【0171】

pONY8.8シリーズのベクターは cPPT を有するが WPRE を有さない。

【0172】

pONY8.9シリーズのベクターは WPRE を有するが cPPT を有さない。

【0173】

ベクターでは、末尾の 5 (例えば pONY8.95) は、以下に記載する Tat 及びスプライズドナー両方の改変を示す。

【0174】

ベクターでは、末尾の 3 (例えば pONY8.43) は、以下に記載する Tat の改変を示すがスプライズドナーの改変は示さない。

【0175】

ベクターの学名では：

「N」は neo の存在を示し、

「C」は CMV の存在を示し、

「G」は GFP の存在を示し、

「F」又は「HEN」若しくは「HENSQ」は、コドンをも最適化した、Bドメインが欠失した第VIII因子の存在を示し、

10

20

30

40

50

「Z」はLacZの存在を示し、
 「A」はhAATの存在を示し、
 「I」はICAM-2の存在を示す。

【0176】

したがって、例として：pONY8.4NCZは、SINLTRを有し、neoは発現されず、Revからの独立のために上流のORFがある。pONY8.95NCZは、WPREを有し、cPPTを有さず、SINLTRを有するのでneoは発現されず、Tatエクソン1及びSD1は突然変異している。pONY8.7NCFは、cPPT、WPRE、上流ORFはneoであり、CMV内部プロモーター、コドン最適化したBドメインが欠失した第VIII因子を有する。

10

ベクターの分析

PERT（高性能逆転写）による力価の予測値

内部CMVプロモーターからLacZ又は第VIII因子を発現するベクターゲノムを用いて、VSV-Gでシュードタイプを作製したベクターを調製した。リアルタイムPCRを用いて、粒子を破壊した後のMS2RNA鋳型からのRT-PCR産物を測定することによって、逆転写酵素の活性を定量した。ベクター粒子の数（力価）の予測値は、未知のものを参照標準と比較することによって決定する。

【0177】

第VIII因子のゲノムの力価予測値はLacZよりも低かったが、その差は1log以内であった。

20

【0178】

RNAゲノムのレベルによる力価

CMV又は組織特異的なプロモーターからGFP、LacZ及び第VIII因子の導入遺伝子が発現するベクターゲノムを用いて、ウイルスベクターを調製した。ロスリバーウイルス(RRV)エンベロープを用いてhAAT内部プロモーターを含むベクターのシュードタイプを作製し、エボラエンベロープを用いてICAM-2プロモーターを含むベクターのシュードタイプを作製した。エンベロープの選択は標的細胞種に基づく：エボラエンベロープは、ICAM-2プロモーターの活性を試験するために選択したHUVEC細胞の効率的な形質導入を可能にし、RRVエンベロープは、肝細胞の効率的な形質導入を可能にすることが報告されている(Kang et al 2002)。両エンベロープを用いて、内部CMV

30

【0179】

組織特異的な内部プロモーターを含む第VIII因子のゲノムの力価予測値は、標準のCMV（一貫して $\sim 1 \times 10^5$ TU/mlの力価予測値を与える）で得られた力価よりも約5倍高い。

【0180】

293T細胞内のプロモーター活性

産生細胞内におけるICAM-2、hAAT及びCMVプロモーターの相対活性を決定するために、293TにGFPを発現するゲノムを一過的に形質移入した。細胞は、酪酸ナトリウム処理の約24時間後、形質移入の36時間後にUV顕微鏡で観察した。代表的な画像を図7に示した。

40

【0181】

標的細胞内のプロモーター活性

肝細胞

ヒト肝細胞癌細胞系であるHepG2を、hAATプロモーターの活性を試験するために選択した。これは、このプロモーターのin vitro試験に以前に用いられており(Kramer et al 2003)、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター（エンハンサー領域を含む）の活性の40%の活性を有すると報告されている。CMV又はhAATプロモーターのいずれかからレポーター遺伝子が発現するベクターを形質導入したHe

50

pG2及び293A細胞の代表的な画像を図8に示した。

【0182】

- ガラクトシダーゼ及びGFPレポーター遺伝子をどちらも用いると、CMV又はhAATプロモーターのどちらかを用いて導入遺伝子の発現を駆動した場合に形質導入した細胞のコロニーが容易に可視化された。生物学的力価(X-galで染色された細胞)は等価であり、これはRNAゲノムのレベルによって測定した力価が匹敵することを反映しており、また、2つのプロモーターの活性がHe p G2中で類似していることを示している。このことは、形質導入した細胞から調製した溶解物の - ガラクトシダーゼアッセイによって支持されている(データ示さず)。

【0183】

内皮細胞

HUVEC(ヒト臍静脈内皮細胞、human embilical vein endothelial cell)を、ICAM-2プロモーターの活性を試験するために選択した。ICAM-2及びCMVプロモーターからLacZを発現するベクターで形質導入した、X-galで染色された細胞の画像を図9に示した。

【0184】

293A細胞

FACS解析では、組織特異的なプロモーターを含むベクターで形質導入した293A細胞中でGFP陽性細胞を検出することができなかった(データ示さず)。このことは、発現の高い細胞の集団をもたらしたCMV対照ベクターと対照的である。

【0185】

要約すると、ICAM-2及びhAATのどちらの組織特異的なプロモーターも、所望どおり293(293A及び293T)細胞中で低い活性レベルをもたらした。ICAM-2ベクターの場合は、内皮細胞中でのプロモーター活性の証拠を検出することができた。hAATプロモーターの場合は、肝細胞中で非常に高い活性が明らかであった(CMVプロモーターに匹敵する)。

【0186】

遍在性プロモーターから発現される第VIII因子をコードするベクターの力価が低いことは、機能的なウイルス粒子の産生を阻害する293T産生細胞中での第VIII因子タンパク質の発現に起因する。したがって、293Tにおける導入遺伝子の発現を回避する戦略が求められていた。標的細胞における導入遺伝子の高い発現を維持したままでこれを達成するために最も有効な手段は、内部CMVプロモーターを強力な肝臓特異的ヒト₁-抗トリプシン(hAAT)プロモーターで置き換えることであった。さらに、ゲノムにさらなる改善が加えられている:結果的に力価が減少されることなしに、Tatエクソン1及び主要なスプライスドナーの突然変異が行われている。

【0187】

組込みアッセイによる力価

ベクターの性能の機能的アッセイは、第VIII因子を送達するための高力価のベクターを産生することができるかを確かめるのに重要である。図5及び6に示したように、RNAゲノムのレベルの測定もウイルス粒子数(PERT)の測定も、力価の予測に不十分である。したがって、293A細胞をウイルスの上清で形質導入ことによって組込みアッセイを実施した。hAATベクター及びCMV対照ベクターのデータを図10に示した。

【0188】

pONY8.95NAF(hAATプロモーターから発現させた第VIII因子)で形質導入した細胞は、レポーター遺伝子をコードするベクター(pONY8.95NCG)で形質導入した細胞と同様のレベルのベクターを含む。しかし、pONY8.7NCF(内部CMVプロモーター)で形質導入した細胞は、バックグラウンド(UT=形質導入していない細胞、untransduced cells)より僅かだけの高い非常に少ない量のベクターしか含まず、これは、このベクター構築体で得られた機能的力価が低いことを反映している。これらのデータは、CMVプロモーターをhAATプロモーターに交換することによって産生細胞中の第VIII因子の発現により

10

20

30

40

50

もたらされる粒子産生の阻害が完全に回避されたことを示している。

【0189】

CAM-2ベクター及びCMV対照ベクターのデータを図11に示した。

【0190】

hAATベクターの場合と同様、ICAM-2プロモーターを用いることにより、高い機能的力価(LacZ対照ベクターの約1/3)を有する第VIII因子のベクターの産生が可能となる。

【0191】

ゲノム混合実験

第VIII因子を発現するゲノム(pONY8.7NCHEMSQ)、又は第VIII因子を発現するプラスミド(pSQ)の同時形質移入の結果、レポーター遺伝子を発現するベクターの力価が常に約2log低下する。新しい第VIII因子のゲノムの同時形質移入が第2のゲノムの力価の不相応な低下をもたらしたのではないことを確認するために、これらをpONY8.95NCZを共に同時形質移入し、D17細胞で力価決定した後にLacZ力価のスコアをつけた。結果を図12に示した。

【0192】

これらのデータは、組込みアッセイの結果を確かに行っている：新しい第VIII因子のベクターゲノムは機能的なウイルス粒子の産生の阻害を引き起こさない。

【0193】

産生細胞における第VIII因子タンパク質の発現が他のレンチウイルスベクター及びレトロウイルスベクターの機能的力価に影響を与えるかどうかを確認するために、HIV及びMLVベクターを用いて混合実験を行った。データを図13に示した。

【0194】

データは、第VIII因子を発現するプラスミドを形質移入に含めた場合、MLV及びHIVベクターの力価が約1log低下することを示している。これらのデータは類似の以前の実験と一致している。産生細胞における第VIII因子の発現は、明らかにHIV及びMLVベクターの力価に不利益な影響を与える。ただし、これはEIAVではそれほど劇的ではない。

【0195】

pONY8.45NCZの構築

Tatエクソン1

Tatエクソン1の突然変異は、シトシン残基をヌクレオチド434の後に挿入することによって行った(アクセッション番号EIU01866)。

【0196】

標準の手順を用いて以下に示すオリゴヌクレオチドをT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、アニーリングさせ、その後、BseRI及びEco0109Iで消化したpONY8.4NCZ(9463bpの断片)内にライゲーションさせて、pONY8.43NCZを作製した。

【0197】

TATのエクソン1を突然変異させるために用いたオリゴ

オリゴ1 GGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTACCTGTTGAACCTCGGCTGATCGTAGGATCCCCGGGA

オリゴ2 TGTAAGTTCTCCTCTGCTGTCCCGGGGATCCTACGATCAGCCGAGGTTCAACAGGTAGGG

主要なスプライズドナー

主要なスプライズドナーの突然変異は、以下のオリゴヌクレオチドを用いて不変のチロシンをシトシンへと交換することによって達成された：

SD1K01F: CAGAACACAGGAGGACAGGCAAGATTGGGAGACCCTTTG

SD1K02R: CAAAGGTCTCCCAATCTTGCCTGTCTCCTGTGTTCTG

(変化したヌクレオチドを太字で示す)。

【0198】

スプライズドナーの突然変異はStratageneのQuickChange(商標)部位特異的突然変異誘発キットを用いて行い、配列決定によって確認した。Tatエクソン1及び主要なスプ

10

20

30

40

50

ライズドナーの突然変異をどちらも含むこの構築体は、pONY8.45NCZと命名した。

【0199】

単一の突然変異でも、2つの突然変異の組合せでも、力価は顕著に変更されなかった。

図14の第1実験のデータを参照されたい。

【0200】

主要なスプライズドナーを含むベクターの力価は僅かに増強された。このことは、次の実験でも観察された。

【0201】

以下に、TATの第1のエクソン、主要なスプライズドナーのロックアウト及びpONY8.45NCZベクターのパッケージングシグナルにおける突然変異及び挿入を示す。

UI01866 401 cctgagaggggagcagaccctacctgttgaacct-ggctgatcgtaggatccccgggacagcagaggagaacttacagaagtcttctggaggtgttctggccagaacacaggaggacag

8.45 NCZ 213 cctgagaggggagcagaccctacctgttgaacctcggtgatcgtaggatccccgggacagcagaggagaacttacagaagtcttctggaggtgttctggccagaacacaggaggacag

UI01866 520 gtaagat-gggagaccctttgacat-ggagcaaggcgctcaagaagttagagaaggtgacgggtacaaggggtctcagaaattaactactggtaactgtaattgggcgctaagtctagtaga

8.45 NCZ 333 gcaagattgggagaccctttgacatggagcaaggcgctcaagaagttagagaaggtgacgggtacaaggggtctcagaaattaactactggtaactgtaattgggcgctaagtctagtaga

UI01866

638 cttatttcat-gataccaactttgtaaaagaaaaggactggcagctgagggat-gtcattccattgctggaagat-gtaactcagacgctgtcaggacaagaaagagaggcctttgaaag

8.45 NCZ 453 cttatttcatgataccaactttgtaaaagaaaaggactggcagctgagggattgtcattccattgctggaagattgtaactcagacgctgtcaggacaagaaagagaggcctttgaaag

UI01866 755 aacat-ggtgggcaatttctgctgtaaagat-gggcctccagattaataat-gtagtaga t-ggaaaggcatcattccagctcctaagagcgaatat-gaaaagaagactgctaataaa

8.45 NCZ 573 aacattggtgggcaatttctgctgtaaagattgggcctccagattaataattgtagtaga ttggaaaggcatcattccagctcctaagagcgaatatgaaaagaagactgctaataaa

UI01866 870 aagcagtctgagccctctgaagaatctc

8.45 NCZ 693 aagcagtctgagccctctgaagaatctc

コドンの最適化

Bドメインが欠失した第VIII因子のS Q型のコドンの最適化

He p G 2細胞を、第VIII因子の遺伝子の野生型(WT、wild type)又はコドンを最適化した(CO、codon optimised)「S Q」型を発現するE I A Vベクターを用いて、2つの異なるMOI(1x及び10x)で形質導入した。形質導入した細胞を継代した後、新しい培地を加え、細胞を24時間インキュベーションした。培地を取り出し、COA TEST(Chromogonix)を用いて第VIII因子の活性について試験した。このアッセイでは、合成の第VIII因子の遺伝子を含むベクターの最も高いMOIで形質導入した細胞からの上清が、非常に高いレベルの活性をもたらした(アッセイの直線範囲を超えた)。WT x 10の結果とCO x 1の結果とを比較すると、コドンの最適化の結果、細胞上清中で第VIII因子の活性が約50倍増大し、WTの形質導入細胞中に10倍多いベクターコピー数が存在すると考えられる。

【0202】

10

20

30

40

50

このことを試験するために、継代ののち、形質導入した細胞においてE I A V シグナルのリアルタイムPCRアッセイを実施した。このアッセイでは、WTベクターと比較して、COベクターで形質導入した細胞中で約2.5倍多いベクターコピー数が検出された。したがって、コドンの最適化の結果、第VIII因子の活性に20倍の増加(ベクターコピー1つあたり)がもたらされた。結果を図16に示した。

【0203】

図16に概要を示した実験を繰り返し、上清を2つに分割し、タンパク質の量(Affinity Biologicals FVIII ELISA)及び活性(COATEST)についてアッセイを行うために適切に希釈した。

【0204】

第VIII因子の活性は全体的により低いが、ここでも、コドンを最適化した試料は、両方のアッセイでの測定においてはるかに高いレベルの第VIII因子が存在していた。最も高いMOIで形質導入したHe p G 2細胞からの上清のみで、ELISAによる測定においてバックグラウンドよりも高い第VIII因子のレベルが得られた。これは、ポリクローナル抗体は、完全長の第VIII因子タンパク質に対して産生させており、B-ドメインが欠失した型では欠落している完全長のタンパク質上のエピトープを認識することに起因する可能性が高い。結果を図17に示した。

【0205】

図18は、170、90及び80kDaの第VIII因子ポリペプチドに対応するコドンを最適化した(CO)ベクターを用いて形質導入した細胞の上清中に存在する特異的なバンドを示すウエスタンブロットを示す図である。

【0206】

これらのバンドは、形質導入なしの上清、又は野生型の第VIII因子の遺伝子をコードするベクターで形質導入した細胞からの上清のどちらにも存在していない。

【0207】

完全長第VIII因子の遺伝子のコドンの最適化

ウイルスベクターはHEK293T細胞の一過性の形質移入によって作製し、2000倍まで濃縮した。その後、HEK293T細胞を示したベクター(pRV67シュードタイプ)で形質導入した。継代及びDNA抽出ののち、E I A V レベルをリアルタイムPCRによって測定し、結果を上述のグラフ中に形質導入単位/ml(TU/ml)として表した。結果を図23に示した。

【0208】

NAF aは完全長(fl、full-length)、野生型(wt)の第VIII因子の配列を表し；NAF bは完全長の、コドンを最適化した(co)第VIII因子の配列を表し；NAS qwtはB-ドメインが欠失した(bdd、B-domain deleted)、野生型の第VIII因子の配列を表し；NAFはB-ドメインが欠失した、コドンを最適化した第VIII因子の配列を表す。すべてのゲノムはpONY8.95の骨格中にある。

【0209】

完全長の配列から得た力価の比較により、コドンを最適化した型(NAF)は、野生型(NAF a)よりも50倍高い力価を生じることが示されている。さらに、B-ドメインが欠失した型から得た力価の比較により、コドンを最適化した型(NAF)は、野生型(NAS qwt)よりも8倍高い力価を生じることが示されている。全体的に、B-ドメインが欠失した、コドンを最適化した型の第VIII因子ゲノムが最も高い力価を生じる。

【0210】

エンベロープに対する第VIII因子発現の影響

産生細胞における第VIII因子の発現は、明らかにベクターの力価に不利益な影響を与える。これまで、この矛盾の理由は不明確であった。しかし、本発明者らは今回、293T産生細胞における第VIII因子の発現によりウイルス粒子上のVSV-Gエンベロープの顕著な低減がもたらされることを示した(図24参照)。

【0211】

10

20

30

40

50

様々なエンベロープタンパク質でシュードタイプを作製した場合における、第VIII因子によるウイルスベクター産生の阻害

最適化した比の、様々なエンベロープを含めたプラスミド成分を用いた形質移入によって、pONY8.95NCZ (LacZゲノム)を調製した。形質移入混合物にpSQ (第VIII因子を発現するプラスミド)又はpCIneo (対照プラスミド)のどちらかを2 µg加えた。D17力価 (コロニー形成単位 (cfu, colony forming unit))を示した。

【0212】

いくつかの実験により、VSV-G (pRV67)でシュードタイプを作製した場合、第VIII因子の発現がウイルスベクターの産生に対して阻害効果を有することが示されている。この阻害がVSV-Gに特異的であるかどうかを検討するために、7つの異なるエンベロープを用いて上述の実験を行った (図25参照)。結果は、阻害はVSV-Gに特異的ではなく、すべての力価が第VIII因子の発現によって様々な度合いで影響を受けることを示している。pHCMV-Gは、pRV67と比べて第VIII因子の発現による影響が少ないと考えられる。これは、第2のグリコシル化部位上の単一のアミノ酸の変更に起因しているかもしれない、又は発現レベルの差異に起因している可能性がある。

10

【0213】

上述の明細書中で言及したすべての出版物は本明細書中に参考として組み込まれている。本発明の記載した方法及び系の様々な改変及び変形が、本発明の範囲及び精神から逸脱せず、当業者には明らかであろう。本発明を特定の好ましい実施形態に関連して記載したが、特許請求した本発明は、そのような具体的な実施形態に過度に限定されるべきでないことを理解されたい。実際、生化学及び生命工学又は関連分野の技術者には明らかである、ほん発明を実施するための記載した方法の様々な改変が、添付の特許請求の範囲内にあることを意図する。

20

【図面の簡単な説明】

【0214】

【図1】本発明の一態様によるベクターを示す模式図である。SD = スプライスドナー、SA = スプライスアクセプター、pA = ポリアデニル化シグナル、BGH = ウシ成長ホルモン、syn = 合成、 = パッケージングシグナルである。

【図2】組み込まれた本発明の一態様によるベクターを示す模式図である。

【図3】第VIII因子のB-ドメインに隣接するアミノ酸配列を示す図である。より詳細には、A2配列 (737から740)、A3配列 (1690から1696)を示した。タンパク質分解性の活性化中にトロンピンによって切断される部位を示した (四角で囲んだ)。第VIII因子のSQ型はSer743をGln1638に融合させることによって作製し、LA型は760から1639の残基を欠失させることによって作製した (Thr759をPro1640に融合)。Arg740及びGlu1649は、第VIII因子のプロセッシングに重要であると考えられている。したがって、SQ型は90kDa鎖のC末端 (Arg740)と80kDaの軽鎖のN末端との間に14個のアミノ酸の連結部を有する。

30

【図4】ヒト1-抗トリプシンプロモーター (305bp)を示す模式図である (Kramer et al (2003) Mol Ther. 7:375-85)。より詳細には、特異的 (C/EBP、CCAATエンハンサー結合タンパク質 又は ; HNF (hepatocyte nuclear factor)、肝細胞核因子)及び非特異的 (AP-1)な活性化転写因子を示した。非肝細胞中に存在する推定上のリプレッサー因子の結合領域を示した (De Simone及びCortese 1989)。cap部位に対する座標を示した。制御要素を示した: DE、遠位要素 (distal element); TSE、組織特異的要素 (tissue-specific element)、TATAボックス。

40

【図5】PERT (高性能逆転写、performance enhanced reverse transcription)アッセイによって測定したウイルスベクター調製物の力価の予測値を示す図である。ベクターゲノムは、CMVプロモーターからLacZ又は第VIII因子を発現する。

【図6】CMV及び組織特異的なプロモーターを有するベクターのRNAゲノムのレベルを示す図である。より詳細には、hAAT (暗)又はICAM-2 (明)プロモーターのどちらかからの、GFP、LacZ及び第VIII因子を発現するベクターの力価予測値を示

50

した。内部CMVプロモーターを含むベクターも、対照として平行して調製した(NCG = pONY8.95NCG、NCZ = pONY8.95NCZ、NCF = pONY8.7NCF)。ロスリバーウイルス(RRV、Ross river Virus)又はエボラのエンベロープを用いてベクターのシュードタイプを作製した。

【図7】293T細胞におけるプロモーターの活性を示す図である。より詳細には、293T細胞を様々な内部プロモーター由来のGFP(示したものを)を発現するゲノムで形質移入し、位相差又はUV顕微鏡観察によって観察した。

【図8】示したベクターで形質導入したHepG2及び293A細胞を示す図である。

【図9】示したベクターで形質導入したHUVEC細胞を示す図である。

【図10】組込みアッセイ：hAAT及びCMVプロモーターの結果を示す図である。より詳細には、293A細胞を示したベクター(RRVシュードタイプ)で形質導入した。継代及びDNA抽出ののち、EIAVレベルをリアルタイムPCRによって測定した。

【図11】組込みアッセイ：ICAM2及びCMVプロモーターの結果を示す図である。より詳細には、293A細胞を示したベクター(エボラシュードタイプ)で形質導入した。継代及びDNA抽出ののち、EIAVレベルをリアルタイムPCRによって測定した。

【図12】第2のゲノムで同時形質移入した場合のpONY8.95NCZ(VSV-G)の力価を示す図である。より詳細には、等量のpONY8.95NCZプラスミド及び示したプラスミドを形質移入に用いた。その結果生じたLacZの力価を示した。

【図13】HIV、MLV及びEIAVのD17力価：第VIII因子のゲノムの混合を示す図である。より詳細には、HIV(pH7G)、MLV(pHIT111)及びEIAV(pONY8.7NCZ)ベクターは、最適化した比のプラスミド成分を用いて形質移入を行うことによって調整した。形質移入混合物に2µgの示したプラスミドを加えた。D17力価(コロニー形成単位)を示した。

【図14】Tatエクソン1及びノ又は主要なスプライドナー1の突然変異を有するpONY8.4NCZ(SINMIN)ベクターのD17力価を示す図である。

【図15】第VIII因子の遺伝子のコドン使用頻度を示す表である。

【図16】COATESTの結果を示す図である。

【図17】タンパク質の量及び活性のアッセイによる、野生型及びコドンを最適化した第VIII因子の遺伝子の比較を示す図である。

【図18】第VIII因子をコードするEIAVベクターで形質導入したHepG2由来の上清のウエスタンブロットを示す図である(レーン1：形質導入なし；レーン2：COx1；レーン3：COx1；レーン4：WTx10；レーン5：形質導入なし；レーン6：pONY8.95NAF；レーン7：pONY8.95NAF；レーン8：マーカー；レーン9：マーカー；レーン10：rFVIII)。

【図19】本発明によるコドンを最適化した第VIII因子のヌクレオチド配列を示す図である。

【図20】pONY8.95NAFと命名したpONY8.95骨格中における、完全長の、コドンを最適化した第VIII因子の遺伝子を示す図である。

【図21】pONY8.95NAFの完全な配列を示す図である。

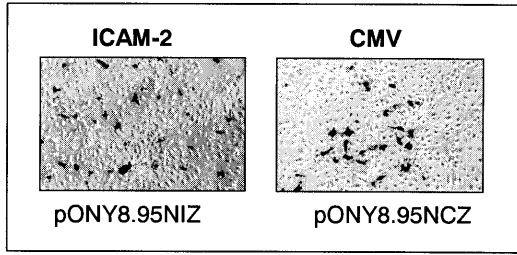
【図22】完全長の、コドンを最適化した配列の翻訳を示す図である。

【図23】コドンを最適化した完全長の第VIII因子(NAFb)、野生型の第VIII因子(NAFa)、B-ドメインが欠失した第VIII因子(NASqwt)及びコドンを最適化した、B-ドメインが欠失した第VIII因子(NAF)を含む、pONY8.95-hAATベクターの力価の比較を示す図である。

【図24】VSV-Gエンベロープの濃度に対する、293T産生細胞中での第VIII因子の発現の影響を示す図である。

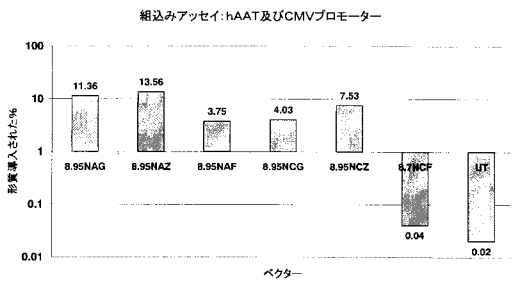
【図25】様々なエンベロープタンパク質を用いてシュードタイプを作製した場合における、ウイルスベクター産生の産生に対する第VIII因子の発現の影響を示す図である。

【 図 9 】

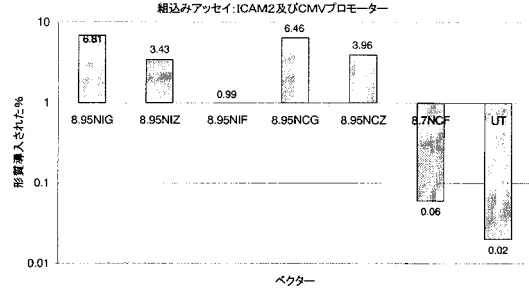


示したベクターで形質導入したHUVEC細胞。

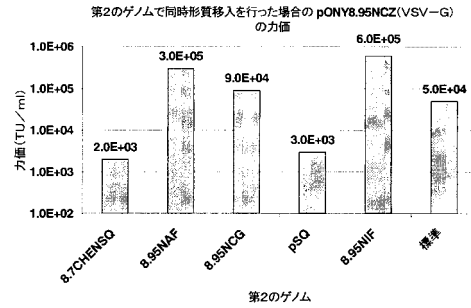
【 図 10 】



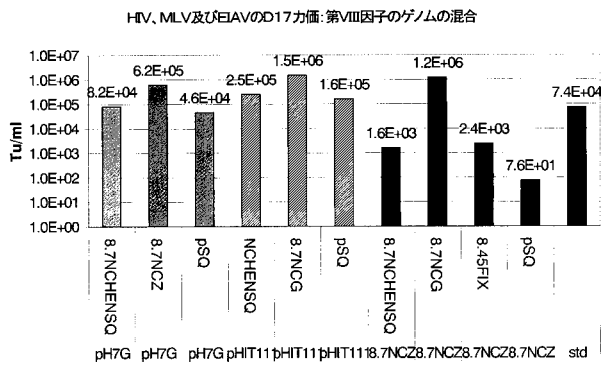
【 図 11 】



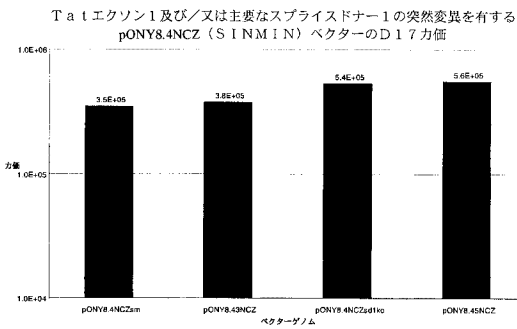
【 図 12 】



【 図 13 】



【 図 14 】



【 図 15 】

第VIII因子の遺伝子のコドン使用頻度表

コドン	Hu	WT	CO
Ala C	53	27	54
U	17	44	17
GCA	13	26	13
G	17	3	16
Arg C	37	14	39
CGU	7	10	7
A	6	15	6
G	21	8	22
AGA	10	30	8
G	18	23	18
Asn C	78	41	79
AAU	22	59	21
Asp C	75	33	76
GAU	25	67	24
Cys C	68	68	68
UGU	32	32	32
Hu	28	16	34
Ser C	13	23	8
UCU	5	22	5
A	3	12	2
G	58	29	60
UUU	2	8	1
A	18	61	20
Lys A	12	20	11
AAU	14	43	13
A	14	28	15
G	15	1	16
Phe C	80	43	81
UUU	20	58	19
Pro C	48	20	48
CCU	19	35	18
A	16	43	16
G	17	1	18
Tyr C	74	40	74
UAU	26	60	26
Val C	25	26	23
GUU	7	19	6
A	5	22	6
G	64	33	66

Hu = 高度に発現されるヒト, WT = 第VIII因子
CO = コドンを最適化した

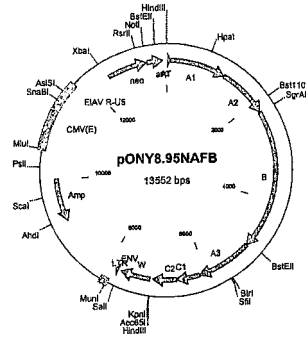
【 図 19 】

```

TTCTGGAAAGGTCAGCACCAATGGCACTACCAAGGACGAGTGTGGATTGCAAGGCTGCG
GCCTACTCTCCGACAGTGGACCTGGGAAAGATGTGCACAGGGCTCGATTGGCCCTCTG
CTGGTGTGTCAACAGAACACACTGAAACCTTCACACCGGCGGCTCACTGTGCGAGAA
TTGCGCCCTGTCTTTACCCCTTTTGTGTGAGACGAAATCTCTGTGATTACACGAAACATG
GAGAGGACAGCGCCCGCCACCTCGCAACATCCAGATGAGAGATCCGACATTCAGAGAGAAC
TACCGGTTCATGCCATCAATGGCTACATCATGACACCTCGCTGGCTGTGATGGCC
CAGACCCGCGGTATCCGCTGGTATCTGCTGTGGATGGCTCCAAAGGAAACATCCATAGT
ATCCACTTCAGCGGGCATGTCTTCACGGTGGGAAAAGGAGGATGACAGATGGCATGTG
TACAACCTCTATCCCGGCGTGTTCGAGACCGTGGAGATGCTGCTCTCAAGGGCGGATC
TGGAGGTGGAATGCGCTGTATGCGGACCGCTCACCTCGGATGTCCAGCGCTGTCTCTC
GTTTACAGCAATAGTGTGCGGACCGCTCACCTCGGATGTCCAGCGCTGTCTCTC
CAGATTACCGCCGCGCCAGTACCGCTCAGGCTGCGGATGGCGAGCGACACATCCGCGACTC
TCCGATTCATCAACCGCTGTCCACCAAGGACCGTCTCCCTGGATCAAAGTAGACCTG
CTAGCCCCATGATCATTCAGCGCATCAAGACCAAGGCGCCCGACAGAAATTCGAGGC
CTCTATATCTCCAGTTCATCATCATGTATGCTGGACCTGGACGGAAGAAGTGGCAGACTTAC
CGCGAATCTCGACAGGACCCCTGATGATGCTGGACGGAAGAAGTGGCAGACTTAC
AAGCACACATCTTCAGACCCCTCATGCGCTCAGGCTCAATCCCGCCAGCCCACTCAC
TTATGCAATTAGTTCACCCCTCATGCGCTCAGGCTCAATCCCGCCAGCCCACTCAC
ATGCGCCCTCGCATGAGTCTAAGCGATCTCCGAGCGACAGATAAGCGCATCATCTTAC
TTTACCAAGTGTGCTACTGCTCCCGCTCCAAAGGCGGACTCCACCTGCAAGGGAGA
TCCAACCGCTGGCGCCACAGTCAACAATCCAAAGGAGTGGCTGCAAGTGGACTTTCAG
AAAACATGAAAGTCAACCGAGTGCACCAAGGAGTGAAGTCTGCTGCAAGGATG
TACGTGAAAGAGTCTCTCATCTGAGTGGAGGAGTGGCCACCGCTGGAGCGTGTCTTCC
CAAAACGATAGTCAAGTCTTCCAGGGAACAGGACAGCTTACACCCGCTGCTGAAAC
TCCCTGACCCCGCTCTCACTAGATACCTCCGATCCACCCCTAGAGCTGGGTGCAAC
CAGATTCCCTCGCATGAGAGTTCGGGCTGGAAGCCGACGACTGTAC

```

【 図 20 】



分子の特徴:

開始	終了	名称	説明
20	76	sp	シグナルペプチド
79	1194	A1	A 1ドメイン
1195	2206	A2	A 2ドメイン
2207	5019	B	Bドメイン
5020	6133	A3	A 3ドメイン
6136	6592	C1	C 1ドメイン
6595	7072	C2	C 2ドメイン
7114	7703	W	WPRE, no X, X-prom ko
7758	7814	ENV	env の 56 bp
7832	7979	LTR	LTR
10025	9165	Amp	Amp
10535	11679	CMV(E)	エンハンサーを有するCMVプロモーター
11680	11799	ELAV	R-U5
12364	13158	neo	
13167	13479	aAT	ヒトα1抗トリシンプロモーター

完全長の第VII因子

【 図 21 】

Figure 21

```

1 AGCTTCACGT GCCGCCACCA TGCAGATGCA ACTGAGACT TGTCTCTCC
>>.....bp.....>>
51 TGTGTCTCCT GCGCTTTGCG TCTCCGCCA CAGGAGATA CTATCTCGGT
>>.....bp.....>>
101 GCGGTGGAGC TCAGCTGGCA CTACATGAC AGGACTTGG GTGAACTGCC
>>.....A1.....>>
151 TGTGGACGCC AGGTTCCAC CCGCGTACC CAGAGATTG CCGTCAACA
>>.....A1.....>>
201 CCAGTGTCTG GTACAGAAA ACCCTCTTGG TGGAAITCAG CGACCACCTG
>>.....A1.....>>
251 TTCAACATCG CCAAACCGCG CCGTCCCTGG ATGAGGCTGC TCGGCGCGAC
>>.....A1.....>>
301 GATCCAGGCT GAGTCTAIG ACACGGTGGT GATTACCTTC AAGAATATGG
>>.....A1.....>>
351 CTAGCCACCC GGTGAGCCTG CAGCCCGTGG GCGTGTCTTA TTGAAAGCG
>>.....A1.....>>
401 TCCGAGGCTG CCGAGTACGA TGACAGACT TCACAGCGGG AGAAGAGAA
>>.....A1.....>>
451 CGACAAGTGT TTCCCGGCGG GTTCCCGCAC CTATGCTCTGG CAGTCTCTGA
>>.....A1.....>>
501 AAGGAAATGG TCTATATGCC TTCGACCCAT TGTGCTTAC CTACTCTTAC
>>.....A1.....>>
551 CTAAAGCCATG TGGATCTGGT CAGGAGACTG AACTCGGGCG TGTATGGGCG
>>.....A1.....>>
601 CCTGCTCTGT TCGCGGAGG GCTCACTGCG CAAGAGAGAG ACCCAACTC
>>.....A1.....>>
651 TGGACAAGTT CATCTCTCTG TTGCGGATAT TCGAGAGGG GAAGTCTGG
>>.....A1.....>>
701 CACTCCGAGA CCAAGAACAG CCTGATGCGG GACCGCGACG CAGCTCTGCC
>>.....A1.....>>

```

【 図 21 】

```

751 CCGTGCCTGG CCAAGATGC ACACCGTGAA CGGCTACGTT AACAGGACC
>>.....A1.....>>
801 TACCGGCTCT GATCGGCTGC CACCGAAT CCGTCTACTG GCATGTGATC
>>.....A1.....>>
851 GGAATGGGCA CAAGCCCGA GGTCCACAGT ATCTCTCTCG AAGGCCACAC
>>.....A1.....>>
901 TTTCCTGGTC CCGAATCAC CCGAGCCAG CCGTGGATGC AGCCCCATAA
>>.....A1.....>>
951 CTTTCTGAC GCGCAGACC TTACTGATGG ATCTCGCCA GTTCTCTCTG
>>.....A1.....>>
1001 TTCTGCCACA TTTCGTCCA CCGAGCAGAT GGGATGGAAG CATATGTGAA
>>.....A1.....>>
1051 AGTGGACTCC TGCCCGGAG AACCCGAGCT TAGGATGAG AACAAATGAG
>>.....A1.....>>
1101 AGGCCGAGGA CTACGACGAT GACCTTACCG ATTGAGAAAT GACATAGTA
>>.....A1.....>>
1151 CGCTTTGAGC ACGACAATC TCCATCTCTC ATACAGATTC GCTCCGTCG
>>.....A1.....>>
1201 CAAGAGACAC CCTAAGACTT GGGTGCATA CATCGCGCC GAGGAGGAG
>>.....A2.....>>
1251 ACTGGATTA TGTCCCGTGG GTGCTGGCC CCGACAGCC CAGCTACAAG
>>.....A2.....>>
1301 AGCCAGTACC TGAATAACGG GCCCGAGCC ATCCGCGGA AGTACAAGAA
>>.....A2.....>>
1351 AGTCCGCTTC ATGGCTTACA CCGACGAGAC CTTCAAGACC CGGAGGCTA
>>.....A2.....>>
1401 TCCAGATGGA GAGCGGCATC TTGGGCCCC TCTGTACGG CGAAGTGGGA
>>.....A2.....>>
1451 GACACACTGC TGAATCATTT CAGAACCG GCGAGCGCC CCAACACAT
>>.....A2.....>>

```

【 2 1 】

1501 CTACCCCCAC GGCATTACC ANTCGCGCC GTTGTACAG CGACGGCTGC
>.....A2.....>

1551 CCAAGGGCGT GAAGCACCTG AAGGACTTC CGATCCTGCC GGGGAGATC
>.....A2.....>

1601 TTCAAGTACA AATGGACTGT GACCTGGAG GATGGGCGA CCAAGAGCA
>.....A2.....>

1651 TCCGGCTGC CTGACCCGTT ACTACTCCAG CTTTGTCAAT ATGGAGCCG
>.....A2.....>

1701 ACCTGCTAG CGGCTTGATT GGCCTCTGC TGATCTGCTA CAGAGATTC
>.....A2.....>

1751 GTGACCAGA GGGGGAATCA GATCATGAT GACAAGAGGA ACGTGAATCT
>.....A2.....>

1801 GTTCTCCGTC TTGACGAAA ACCGACGCTG GTATCTCAC GAGANTATC
>.....A2.....>

1851 AGCCTTCCT GCCCAACCG GCCGCTGTC AGCTGGAGA CCCCAGATT
>.....>

1901 CAGCCAGCA ACATCATGCA TTCTATCAAC GGTATATGT TTGATTCCT
>.....A2.....>

1951 GCAGCTTCA GTGTCTGTC ACGAGTCCG CTACTGATAT ATCCTCAGA
>.....A2.....>

2001 TTGGGCACA GACCCATTC CTGAGGTGTC TCTTCCGCT GTATACCTC
>.....A2.....>

2051 AAGCACAAGA TGTGTACGA GGAATCCCTG ACCCTGTCC CCTTAGCGG
>.....A2.....>

2101 CGAACCCTG TTTATGCTA TGGAGAACC CGGCTCTGTC ATCCTGGCT
>.....A2.....>

2151 GGCATAACTC GACTTCCG ACCCGGAAA TGAACCGCT CTTGAAATG
>.....A2.....>

2201 TGGATGTG ACAAGAACG CGGCACTAT TACAGGACA GTTACGAGA
>>.....B.....>

2251 CATCTCTGG TACTCTCTA GCAAGAATA GGCATCGAG CCAAGATCT
>.....B.....>

【 2 1 】

2301 TCAGCCAGAA CAGCCGCAAC CCGACACCC GCGAGAGCA GTTCAACGC
>.....B.....>

2351 ACCACCATCC CCGAAGCA CATCGAGAAA ACCGACCCCT GGTTCGCCA
>.....B.....>

2401 CCGGACCCC ATGCCAAGA TCCGAACCT GAGCAGCAG GACTTCTGA
>.....B.....>

2451 TGCTGCTGG GCGAGCCCC ACCCCCAAG GCTTAGCCT GAGCAGCTG
>.....B.....>

2501 CAGGAGCCA AGTACGAGC CTTACGCGC GACCCAGCC CTGGCCCAT
>.....B.....>

2551 CGACAGCAC AACAGCCTT CCGAGATGAC CCACTCCCG CCCAGCTGC
>.....B.....>

2601 ACCCAGCGG CGATCTGTG TTCAACCCG AGAGCGCCT GCAGCTCGG
>.....B.....>

2651 CTGAACGAGA AGCTGGCAC CACCGCCGC ACCGAGCTGA AAGAGCTGA
>.....B.....>

2701 CTTCAAGTG AGCAGACCA GCAACAACCT GATCAGCAC ATCCCAGCG
>.....B.....>

2751 AGAACCTGC CGCCGCAAC GACAACCA GCAAGCTGG CCTTCCAGC
>.....B.....>

2801 ATGCCGTCG ACTAGACAG CAGCTGGAC ACCACCTGT TCGGCAAGA
>.....B.....>

2851 GAGCAGCCC CTGACAGAA GCGCGGACC CCGAGCTGT TCTGAGGA
>.....B.....>

2901 AACACGACG CAGCTGCTG GATCCGCGC TGATGACAG CAGAGATCC
>.....B.....>

2951 AGCTGGGGA AGAAGCTGC TACGACGAG AGCGAGCAG TGTCAAGG
>.....B.....>

3001 CAAGCGGCC CACGCGCTG CCTGTGAC CAGGACAAC GCCTGTCA

【 2 1 】

>.....B.....>

3051 AAGTGTCCAT CAGCCTGCTG AAAACGACA AGACTTCCA CAACAGCC
>.....B.....>

3101 ACCAACGCA AGACCCCAT CGAGCGCCA AGCTGCTGA TCGAAGACG
>.....B.....>

3151 CCCCAGCTG TGGCAGAACA TCTGTGAGG CGACACCGAG TTCAGAAG
>.....B.....>

3201 TGACCCCTT GATCCACGAC CGGATCTGA TGGATAGAA CCCCACGCC
>.....B.....>

3251 CTGAGACTGA ACCACATGAG CAACAGACC ACCTCCAGCA AGAACATGA
>.....B.....>

3301 GATGCTCAG CAGAAGAAG AGGGCCCAT CCCCACGAC GCCCAGAAC
>.....B.....>

3351 CCGACATGAG CTTCTCAG ATGCTGTCC TGGCCAGAG CGCCCGTGG
>.....B.....>

3401 ATCCAGCGA CCCACGCAA GAACAGCTG AACAGCGCC AGGCCCCAG
>.....B.....>

3451 CCCCAGCAG CTGCTGAGC TGGGACCGA GAAGAGCTG GAGGGCAGA
>.....B.....>

3501 ACTTCTGAG CGAGAAGAC AAATGCTGG TGGGAGAGG CGAGTTCAC
>.....B.....>

3551 AAGGATGTG GCCTGAAGA GATGCTGTC CCGAGCAGC GGAACCTGT
>.....B.....>

3601 CCTGACCAAC CTGGACAAC TGCAGGAAA CAACACCCAC AACCAAGAA
>.....B.....>

3651 AGAATATCA GAGGAGATC GAGAAGAAG AAACCTGAT CCAGAGAAC
>.....B.....>

3701 GTGGTCTGC CCGGATCCA CACCGTACC GGCACAAGA ACTTATGAA
>.....B.....>

3751 GAATCTGTC CTGCTGACA CCGACAGAA CTTGAGGAC AGCTAGACG

【 2 1 】

>.....B.....>

3801 GCGCCTACG CCCCCTGCTG CAGGCTTCC GGAGCCTGAA CGACAGCAC
>.....B.....>

3851 AACCGACCA AGAAGCACAC CGCCACTTC AGCAAGAGG GCGAGAGGA
>.....B.....>

3901 GAACCTGAG GGCCTGGCA ACCAGACCA GCAGATCTG GAGAATAG
>.....B.....>

3951 CCTGCACAC CCGATCAGC CCCACACCA GCCACGAAA CTTCTGACC
>.....B.....>

4001 CAGCGAGCA AGAGGCTCT GAACAGTTT CGCTGCCCC TGGAGGAGC
>.....B.....>

4051 AGAGCTGAG AAGGGATCA TCCTGACGA CACCAGACA CAGTGTCCA
>.....B.....>

4101 AGAATGAA GCACCTGAC CCTAGACCC TGACCCAGAT CGACTACAC
>.....B.....>

4151 GAGAGGAGA AGGACCCAT CACCCAGAC CCCCAGAGC ACTGCTGAC
>.....B.....>

4201 CCGAGCCAC AGCATCCCC AGCCAAACC GAGCCCTGT CCTATGCCA
>.....B.....>

4251 AAGTGTGAG CTTCCCGAG ATCAGGCCA TGTACTGAC CAGAGTCTG
>.....B.....>

4301 TTCCAGACA ACAGTCCCA CTTGCCGTC GCCAGTACC GGAAGAAGA
>.....B.....>

4351 CAGCGGCTG CAGGAGACA GCACTTCTT CGAGGCGCC AAGAAGAA
>.....B.....>

4401 ACCTGAGCT GGCATCTGT ACCCTGAGA TGAACGCGA CCGCCGAAA
>.....B.....>

4451 GTGGGCGCC TGGAAACCA GCGCAAAC AGCTGTACT ACAAGAAAT
>.....B.....>

4501 GGAGAACAC GTGCTGCCA AGCCGACT GCGCAAGAC AGCGGAAG

【 2 1 】

>.....B.....>
 4551 TGGAGCTGCT GCCCAAAGTG CACATCTACC AGAAGGACCT GTTCCCCACC
 >.....B.....>
 4601 GAGACCAGCA ACGGCGCC TGCGCCCTG GACCTGGTG AGGGCTCCCT
 >.....B.....>
 4651 GCTCGAGGC ACCGAGGCG CATTAAATG GAACGAGCC AACGAGCCCG
 >.....B.....>
 4701 GCAAAGTCC CTTCCTGAGA GTGCGCACCG AGACGAGCC CAGACCCCC
 >.....B.....>
 4751 TCCAACTGC TGGACCCCT GGCCTGGAC AATCATAGG GCACCCAGAT
 >.....B.....>
 4801 CCCCAAGAG GAGTGAAGA GCGAGGAGA GTCCCCGAA AAGACCGCT
 >.....B.....>
 4851 TCAAGAAGA GGATACCATC CTGTCCCTGA ACGCTGCGA GAGCAACCAC
 >.....B.....>
 4901 GCCATGCGC CCATCAACGA GGGACAGAAC AAGCCGAGA TAGAGGTGAC
 >.....B.....>
 4951 CTGGCGAAG CAGGCGAGA CCGAGCCCT GTGCGCCAG AACCCCCAG
 >.....B.....>
 5001 TGCTGAAGG GCATCAGCG GAGATCACCC GCACGACCT GCATCGGAT
 >.....B.....>
 5051 CAGGAGAGA TTGATTGCA CGACGATGC AGTGTGGAGA TGAAGAGGA
 >.....A3.....>
 5101 GCACTTCGAC ATCTAGCAG AAGATGAAA CCAGTCCCT CGTCTCTCC
 >.....A3.....>
 5151 AAGAGAGAC CCGCAGTAC TCACTGCGC CTGTGAGCG CCTGTGGAC
 >.....A3.....>
 5201 TATGGAATG CTTCAGACC TCACCTTTG AGGAACCGG CCCAGTGGG
 >.....A3.....>
 5251 CAGCTGCCC CAGTCAAGA AAGTGTGTT CCAGGATTC ACCGACGGT

【 2 1 】

>.....A3.....>
 5301 CTTTCACCCA GCACTTTAC CAGGCGAGC TCAATGAACA TCTGGCCCTG
 >.....A3.....>
 5351 CTGGACCCCT ACATCAGGC TGAAGTGGAG GACACATCA TGGTGCATT
 >.....A3.....>
 5401 CCGAATGAG GCGACAGAC CATACTTTT CTACACTICA CTCATCTCT
 >.....A3.....>
 5451 ACGAGGAGA CCGGCGCAG GGGGCTGAC CCGTAAGA CTTCGTGAG
 >.....A3.....>
 5501 CCAACGAAA CAAAGACTA CTTCGTGAG GTCCAGACC ACATGCGAC
 >.....A3.....>
 5551 TACCAAGGAC GAGTGGATT GCAAGCCCT GGCCTACTC TCCGAGTGG
 >.....A3.....>
 5601 ACCTGGAGA AGATGTGAC AGCGCCCTG TGGCCCTCT GCTGTGTGT
 >.....A3.....>
 5651 CACAGGACA CACTCAACC TGCACACGG CCGCAGTCA CTGTGAGGA
 >.....A3.....>
 5701 ATTGCCCTG TCTTACCA TCTTTGATG GACGAGTCC TGTATTCA
 >.....A3.....>
 5751 CCGAABACAT GAGAGGAGC TGGCGGACR CTTGCAACAT CCGATGAAA
 >.....A3.....>
 5801 GATCCGACAT TCAAGGAGA CTACCGGTC CATGCCATA ATGGTACAT
 >.....A3.....>
 5851 CATGGACCC CTGCTGGCC TCGTATGTC CCAAGACCA GGTATCCCT
 >.....A3.....>
 5901 GGTACTGCT GTCGATGGC TCCAGGAGA ACATCCATG TATCCACTC
 >.....A3.....>
 5951 AGCGGGCATG TCTTACCGT GAGGAAAAG GAGGATACA AGATGGCAT
 >.....A3.....>
 6001 GTACACCTC TATCCCGCG TGTGAGAC GGTGAGATG CTGCCCTCA

【 2 1 】

>.....A3.....>
 6051 AGGCCGCGAT CTGAGAGTG GATGCTGTA TGGCGAGCA CCICACGCT
 >.....A3.....>
 6101 GGGATGCA CCGTGTCTT CGTTACAGC AATAGTGC AGACCCCTCT
 >.....A3.....>
 6151 GGCATGGCG AGCGGCCCA TCGCGACTT CCAGATTACA GCGCGCGCC
 >.....C1.....>
 6201 AGTAGGTCA GTGGCTCCA AAGCTGCGC GTCTGACTA CTCGGATCC
 >.....C1.....>
 6251 ATCAACGCT GTCCACCAA GGAACCTTC TCTGATCA AAGTAGACT
 >.....C1.....>
 6301 GCTAGCCCC ATGATATTG ACGGATCAA GACACAAGC GCGGACAGA
 >.....C1.....>
 6351 AGTCTGGAG CCTATATTC TCCAGTICA TCATATGTA TAGCCTGAC
 >.....C1.....>
 6401 GGAAGAAGT GGCAGACTA CCGCGAAGC TCGACAGGA CCTGATGTT
 >.....C1.....>
 6451 ATTCTCGGT AACCTGACA GCTCCGAAAT CAGCACACAC ATCTCAACC
 >.....C1.....>
 6501 CAGCCATTAT CCGCGCTAC ATCCCGCTG ACCCCACTCA CTATAGCAT
 >.....C1.....>
 6551 AGTCCACCC TCGAATGGA GTCATGGGC TGTGACTGA ACAGCTGTAG
 >.....C1.....>
 6601 CATGCCCTC GGCATGGAT CTAAGCGAT CTCGAGGCA CAGATAACG
 >.....C2.....>
 6651 CATATCCTA CTTACCAAC ATGTTCGTA CCTGGTCCC CTCGAGGCC
 >.....C2.....>
 6701 CAGTCCACC TCGAAGGAG ATCCAAGCC TGGCGGCC AGTTCACAA
 >.....C3.....>
 6751 TCCAGGAG TGGCTGCAG TGGACTTCA GBAACATG AAGTCAACG

【 2 1 】

6801 GAGTACCRC ACGGGAGTG AAGTCTGTC TGACCAGAT GTACTGAGG
 >.....C2.....>
 6851 GAGTCTCTA TCTCCATTC GAGGATGGC CACCAATGA CGTGTCTCT
 >.....C2.....>
 6901 CCAAAAGGT AAGTCAAG TCTTCAAGG GACCCAGAC AGCTTTACAC
 >.....C2.....>
 6951 CCGTCTGAA CTCCTGGAC CCGCGCTTC TCACTAGATA CTTCCGATC
 >.....C2.....>
 7001 CACCTCAGA GCTGGTGA CAGATTGCC CTGGCATGG AGTCTCTGG
 >.....C2.....>
 7051 GTGTGAGCC CAGACCTGT ACTAATGATA TCAAGCTTA AAGTACCAA
 >.....C2.....>
 7101 ATAGCITAT GATAATCAC CTCTGATTA CAAAATTGT GAAGATTGA
 >.....W.....>
 7151 CTGGATTCT TAACTATGT GCCTTTTGA GCTATGTTG ATACGCTCT
 >.....W.....>
 7201 TTAATGCTT TGTATATGC TATTGCTTC CGTATGGCT TCAATTTCT
 >.....W.....>
 7251 CTCTGTAT AAATCTGGT TGTGTCTCT TATGAGAG TGTGGCCCG
 >.....W.....>
 7301 TTGTCAGCA ACGTGGCTG GTGTGACTG TGTGTGCTA CCGAACCCC
 >.....W.....>
 7351 ACCTGGTGG GCATGCGAC CACTGTGAG CTCCTTCCG GAGCTTCCG
 >.....W.....>
 7401 TTCCCCCTC CTTATGCA CCGCGAAT CATGCCGCC TGCCTGGCC
 >.....W.....>
 7451 GCTGCTGAC AAGGGCTCG CTGTTGGCA CTGCAATTC CTTGTGTTG
 >.....W.....>
 7501 TCGGGAAAT CATGCTCT TCTTGGCTG CTCGCTGTTG TGGCACTG
 >.....W.....>

【 2 1 】

7551 GATTCGCGC GGGACGTCCT TGTGCTACGT CCCTCGGCC CTCATCCAG
>.....W.....>

7601 GGGACCTTCC TTCCCAGGCG CTGCGCGGCC CTCTCGGCC TCTTCGCGT
>.....W.....>

7651 CTTCGCTTTC GCGCTCAGAG GAGTCCGATC TCCTTTGGG CCGCCTCCC
>.....W.....>

7701 GCATCGATAC CGTCGACCTC GAATTAATTC GCGGCCCTAG CTTATCGATA
>>>

7751 CGTCGCAATT GGAAGGCTT TAAATCCTGG CACATCTCAT GTATCAATGC
>.....BNV.....>

7801 CTCAGTATGT TTAGAAAAC AAGGGGGGAA CTGTGGGOTT TTTATGAGGG
>.....BNV.....>

7851 GTTTTATACA ATTGGGCACT CAGATCTGCG GGTCTGAGTC CCTTCTCTGC

7901 TGGGCTGAAA AGGCCTTTGT AATAAATATA ATTCTCTACT CAGTCCCTGT

7951 CTCTAGTTTG TCTGTTGAG ATCCACAGAA GCTCATGCGT TGGGTAATC

8001 ATGCTCATAG CTGTTTCTCG TGTGAATTC TTTCCGCTCC ACAATCCAC

8051 ACAACATACG AGCCGGGAGC ATAAAGTATA AAGCCTGGG TGCCTAATGA

8101 GTGAGCTAAC TCACATTAAT TCGCTTCGCG TCACGTCCCG CTTTCCAGTC

8151 GGGAAACCTG TCCTCCGACG TCCATTAATG AATCGGCCAA GCGCGGGGA

8201 GAGGCGGTTT GCGTATTGGG GCGCTTCCCG CTCTCCGCT CACTGACTCG

8251 CTGGGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAGGC

8301 GGTAAATCGG TTATCCACAG AATCAAGGGA TAACCGAGGA AAGAACATGT

8351 GAGCAAAAGG CCAAGCAAAAG GCGAGGAAC GTAAAAGGC GCGTTCGCTG

8401 GCGTTTTTCC ATAGGCTCG CCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGAG

【 2 1 】

8451 CTCAGTCCAG AGGTGGGAA ACCCGAGAG ACTATAAGA TACCAGCGT

8501 TTCCCCCTGG AAGTCCCTCC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CTTGCCCTTT

8551 ACCGATACC TGTCCGCTTT TCTCCCTTCG GGAAGGTTGG CCGTTTCTCA

8601 TAGCTCACGC TGTAGTATC TCAGTTCGGT GTAGTTCGTT CCGTCCAAGC

8651 TGGGCTGTGT GCACGACCC CCGTTCGAG CCGACCGTGT CCGCTTATCC

8701 GGTACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACAGACT TATCGCCACT

8751 GCGAGCAGCC ACTGTAACA GATTAGCAG ACGAGGATAT GTAGGCGGTG

8801 CTACAGGTTT CTTGAAGTGG TGGCTAATC ACGCTACAC TAGAAGGACA

8851 GTATTGGTGA TCTCGGCTCT GCTGAAGCCA GTTACTTTCG GAAAAGGAT

8901 TGGTAGCTCT TGATCGGCGA AACAAACAC CCGTGGTAGC GGTGTTTTTT

8951 TTTGTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAGGATC TCAAGAGAT

9001 CCTTTTATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAACG AAAACTCACG

9051 TTAAGGATAT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC

9101 TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA

9151 ACTTGTCTCG ACAATTACCA ATGCTTAATC AGTAGGACC CTATCTCAGC
<.....Amp.....>

9201 GACTCTCTTA TTTCTGCTAT CCGTAGTTCG CTGACTCCC GTCGTGAGA
<.....Amp.....>

9251 TAAGTACGAT ACGGAGGCG TCCCATCTG CCGCCAGTGC TGCAATGATA
<.....Amp.....>

9301 CCGCGAGACC CAGCTCACG GCGTCCGAGT TTATCAGCAA TAAACGAGC
<.....Amp.....>

9351 AGCCGGAAGG GCGAGGCGCA GAGTGTGTC TGCACTTTA TCCGCTCCA
<.....Amp.....>

【 2 1 】

9401 TCCAGTCTAT TAATGTTGC CCGGAAGCTA GAGTAAATAG TTCCCCAGTT
<.....Amp.....>

9451 AATAGTTTGC GCAACGTTGT TCGCATCTGT ACAGGCATCG TGGTGTACG
<.....Amp.....>

9501 CTCTCGTTT GGTATGCTT CATTGACTC CCGTCCCAA CGATCAAGGC
<.....Amp.....>

9551 GAGTACATG ATCCCCCATG TTTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCCTCGGT
<.....Amp.....>

9601 CCTCGATCG TTTGCAAGG TAAGTTGGCC GCGTGTAT CACTCATGTT
<.....Amp.....>

9651 TATGGCAGCA CTGCATATT CTCTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT
<.....Amp.....>

9701 TTTCTGTGAC TGGTGAATC TCAACCAAGT CACTCTGAGA ATAGTGTATG
<.....Amp.....>

9751 CCGGACCGA GTTCTCTTG CCGCGCTCA ATACGGGATA ATACCGGCC
<.....Amp.....>

9801 ACHTAGCAGA ACTTTAAAG TGTCTACTAT TGGAAAAGT TCTTCGGGC
<.....Amp.....>

9851 GAAAACCTTC AAGGATCTTA CCGCTGTGA GATCCGTTTC GATGTAACCC
<.....Amp.....>

9901 ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTGACATCT TTTACTTTCA CCAAGTTTT
<.....Amp.....>

9951 TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCRAATGC GCGAAAAGG GGAATAGGG
<.....Amp.....>

10001 CGACCGGAA ATGTTGAATA CTCATCTCT TCCTTTTCA ATATATTGA
<.....Amp.....>

10051 AGCATTATC AAGGTTATG TCTCATGAC GATACATAT TTGAATGTAT

10101 TTAGAAAAT AAACAATAG GGTTCGCGC CACATTTCC GAAAAGTGC

10151 CACCTAAAT GTAAGGPTA ATATTTTGT AAAATTCGC TTAATTTTT

【 2 1 】

10201 GTTAAATCAG CTCATTTTT AACCAATAGG CCGAAATCG CAAATCCCT

10251 TATAAATCA AAGAATAGC CAGATAGGG TTGAGTGTG TTCCAGTTG

10301 GAACAAGAT CCACTATTA AAGAACTGGA CTCCAACCTC AAAGGGCGAA

10351 AAACCGCTA TCGAGCGAT GCGCCACTAC GTGAACCTAC ACCCTAATCA

10401 AGTTTTTGG GGTCCAGTG CCGTAAAGCA CTAATCGGA ACCCTAAGG

10451 GAGCCCCGA TTTAGACTT GACGGGAAA GCGCACTGG CTTATCGAAA

10501 TTAATACGAC TCATATAGG GAGGCCGCA GATCTTGAAT AATAAATGT

10551 GTTTTGTCC GAAATAGCG TTTTGAATT TCTGTCCCG ACTAATTTCA

10601 TGTCCGCGA TAGTGTGTT TATCCCGAT AGAGATGCG ATATTGGAAA

10651 AATGATAT TBAAAATAG GCAATGAA ATGTCCCGC ATGTGAGTTT

10701 CTGTAAACT GATATCGCA TTTTTCAAA AGTGAATTT GGCATACCC

10751 GATATCTGC GATACGCTT ATATGTTA CCGGGGATGG CAGTAGACGA

10801 CTTTGTGAC TTGGGGAAT CTGTGTGCG CAAATACGC AGTTTCGATA

10851 TAGTGTGCG ACSATAGAG GCTATATCC CAGTAGAGGC GACATCAAGC

10901 TGGCAGATG CCAATGATA TCGATCTATA CATTGAATCA ATATGAGCCA

10951 TTAGCCATAT TATTCAATGG TATATAGCA TAAATCAATA TTGGCTATTG

11001 GCCATTGACT ACGTTGATC CATATGTA TATGACATT TATATTGGCT

11051 CATGTCCAC ATTACGCCA TGTGACATT GATTATGAC TAGTATTAA

11101 TAGTAAATCA TTACGGGTC ATTAGTTCAT AGCCATATA TGAATTCGG

11151 CPTTACATA CTACGTTAA ATGGCCGCG TGGCTAGCC CCAACAGCC

【 2 1 】

11201 CCGCCCATTT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA
11251 GGGACTTTCC ATYGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAACATGCCA
11301 CTTGGCAATA CATCAAGTGT ATCATATGCG AAGTCCGCCC CCTATTGAGG
11351 TCBAATGACGG TAAATGGCCC GCCTTGGCATT ATGCCCACTA CATGACCTTA
11401 CGGACTTTTC CTACTTGGCA GTACTTCTAC GTATTGATCA TCGCTATTAC
11451 CATGGTGAAT CGGTTTGGC AGTACACCAA TGGGGTGGG TAGCGGTTTG
11501 ACTCACGGGG ATTTCCAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG
11551 TTTTGGCACC AAAATCAAGC GGACTTTCCA AAATGTGTA ACAACTGGGA
11601 TGGCCCGCCC CGTTGACGCA AATGGCGGTT AGGCGTGTAC GGTGGGAAGT
11651 CTATATAAGC AGAGCTCGTT TAGTGAACCC GGCACCTAGA TTCTCCGGTC
11701 TGAGTCCCTT CTCTGTGGG CTGAAAAGCC CTTTGTATA AATATAATTC
11751 TCTACTCAAT CCTCTCTCT AGTTTGTCTG TTGAGATCC TACAGTTGGC
11801 GCGCAACAG GACCTGAGA GGGGCGCAGA CCTTACCTGT TGAACCTGGG
11851 CTGATCGTAG GATCCCGGGC ACAGCAGAGG ABAACTTACA GAAGTCTTCT
11901 GAGGTGTTC CTGGCAGAA CACAGAGGA CAGGCAAGT TGGGAGGCC
11951 TTTGACATTG GAGCAGGCG CTCAGAAATG TAGGAAGGT GAOGTACAA
12001 GGGTCTCAGA AATTAACACT TGTAACTGT AATTGGGCGC TAAGTCTAGT
12051 AGACTTATTT CAITGATACC AACTTTGTA AAGAAAAGGA CTGGCAGCTG
12101 AGGGATTGTC ATTTCAATGC TGGAAAGTTG TAACCTAGAC GCTGTAGGA
12151 CAAGAAGAG AGCCCTTGA AAGAACATTG GTGGCAATT TCTCTGTAA

【 2 1 】

12201 AGATTGGGCC TCCAGATTAA TAATTGTAGT AGATTGGAAA GGCATCAATC
12251 CAGCTCCTAA GAGCSAATA TTGAAAAGAA GACTCTAAT AAAAAGCAAT
12301 CTGAGCCCTC TGAAGAATAT CTCTAGAATC AGTGGATCCC CCGGGCCAAA
12351 ACCTAGGCCC ACCATGATTG AACAGATGG ATTGGACCCA GGTTCCTCCG
>>.....neo.....>>
12401 CCGCTTGGGT GGAGAGGCTA TTCCGGTATG ACTGGGACA ACAGACAATC
>.....neo.....>
12451 GCCTGCTCTG ATGCCGCGGT GTTCCGGCTG TCAGCGAGG GCGCCCGGTT
>.....neo.....>
12501 TCTTTTGTTC AAGACCGACC TGTCCGCTGC CCTGAATGAA CTGAGGAGC
>.....neo.....>
12551 AGGCAGCGCG GCTATCGTGG CTGGCCAGCA CGGGGTTCC TTGCGCAACT
>.....neo.....>
12601 GTGCTGAGG TTGTCACTGA AGCGGAGGG GACTGGCTGC TATTGGGGA
>.....neo.....>
12651 AGTCCCGGGC CAGGATCTCC TGTCACTCA CCTTCTCCT GCCGAGAAAG
>.....neo.....>
12701 TATCCATCAT GCGTATGCA ATGGGCGCGC TGCATCGCT TGAATCCGGT
>.....neo.....>
12751 ACTGCGCAT TCGACACCA AGCGAATCAT GGCATCGAGC GAGCACATAC
>.....neo.....>
12801 TCGGATGAA GCGGCTCTTG TCGATAGGA TGATCTGAC GAAGAGCATC
>.....neo.....>
12851 AGGGGCTCGC GCGAGCGAA CTGTTGCCA GCGTCAAGC GCGCATGCC
>.....neo.....>
12901 GACGCGAGG ATCTCGTCT GACCCATGC GATCCCTGCT TCCGAAATAT
>.....neo.....>
12951 CATGTTGAAA AATGGCCCTT TTTCTGGATT CATCGACTGT GCGCGCTGG
>.....neo.....>

【 2 1 】

13001 GTGTGGCGGA CGCTATCAG GACATAGCGT TGGTACCGG TGATATGCT
>.....neo.....>
13051 GAAGAGCTTG GCGCGGATG GGCTACCGC TTCTCGTGC TTTACGGTAT
>.....neo.....>
13101 CGCGCTCCG GATTGCGAGC GCATCGCCTT CTATCGCTT CTGACAGAT
>.....neo.....>
13151 TCTTCTGAGC GCGCGGTAC CCGCACCCC CTCCACCTTG GACACAGGAC
>.....neo.....>
13201 GCTGTGGTTC CTGAGCCAGG TACAATGACT CCTTTCGGTA AGTCCAGTGG
>.....neo.....>
13251 AAGCTGTACA CTGCCAGGC AAAGCTCCG GGCACGCTAG GCGGCGACT
>.....neo.....>
13301 CAGTCCGAG CCAATGACT TAGCCCTTGT TTGCTCTCC GATACTGGG
>.....neo.....>
13351 GTGACCTTGG TTAATATCA CAGCAGCCTT CCGCCGTTGC CCTCTGGAT
>.....neo.....>
13401 CCACTGCTTA AATACGACC AGGACAGGC CTTCTCTCT CAGCTTCAGG
>.....neo.....>
13451 CACCACACT GACTGGGAC AGTGAACCG CCTGAGAGC CCATCCAGC
>.....neo.....>
13501 TGTTTTGGAC TCCATAGAG ACACCGGAC CGATCCAGC TCGCGGCCC
13551 CA

【 2 2 】

Figure 22

20 ATGCGATCG AACTGAGCAC TTGCTCTTC CTGCTCTCC TGGGCTTTG
M Q I E L S T C F F L C L L R F
70 CTCTCCGCC ACAAGGAT ACTATCTCG TGGCTGGAG CTCAGCTGG
C F S A T R R Y Y L G A V E L S W
120 ACTACATCA GACGACTTG GTGACTCTG CTGTGAGCG CAGTTTCA
D Y M Q S D L G B L P V D A R F P
170 CCGCGGTGC CCAAGGATT CCGTTCAC ACCATGTGCG TGTACAGAA
F R V P K S P P P N T S V V Y K
220 AACCTCTTC GTGAAATCA CCGACCACT GTTCAACATC GCCAACCCG
K T L F V E F T D H L F N I A K P
270 GCGTCCCTG GATGCGCTG CTGCGCCGA CGATCCAGC TGAGTCTAT
R P P W M G L L G P T I Q A E V Y
320 GACCGGTGG TGAATCCCT CAGAGACTG GCTAGCCACC CGTGGACCT
D T V V I T L K N M A S H P V S
370 GCACCCGTC GCGTGTCTT ATTGAAAGC GTCCGAGGT GCGGATFAG
L H A V G V S Y W K A S E G A E Y
420 ATGACCAGC TTACAGCGG GAGAAGAG ACGACAAGT GTTCCCGGG
D D Q T S Q R E K E D D K V F P G
470 GGTCCCACT CCTATGCTG CGAGTCTCT AAGGAGATG GTCTATPCC
G S H T Y V W Q V L K E N G P M
520 CTCCAGCCA TTGTGCTCA CCTACTTTA CCTAAGCCAT GTGATCTCG
A S D P L C L T Y S Y L S H V D L
570 TCAAGGACT GAACTCGGG CTGATCGCG CCTCTCTGT GTCCCGGAG
V K D L N S G L I G A L L V C R E
620 GGTCTACTG CCAAGAGAA GACCCAACT CTGCAAGT TCACTCTCT
G S L A K E K T Q T L H K F I L
670 GTTGGCGTA TTGACGAGG GGAATCTGT GCACTCGAG ACCAGAACAA
L F A V F D E G E S W H S E B T K N
720 GCTGATGCA GGACCGGAC GCAGCTCGG CCGTGGCTG GCCAAGATG
S L M Q D R D A A S A R A W P K M
770 CACACGTA ACGGCTACT TAACAGGAG CTACCGGCC TGATGGCTG
H T V N G Y V N R S L P G L I G
820 CCACCGAAA TCGTCTACT GGCATGATC CGAATGGC ACACGCGCC
C H R K S V Y N H V I S M G T T P
870 AAGTCCAGG TATCTTCTC GAGGCGACA CTTTCTGTT CCGAATCAC
E V H S I P L E G H T F L V R N H
920 CGCCAGGCA GCTTGGAT CAGCCGATA ACCTTCTGA CCGCCAGAC
R Q A S L B I S P I T P L T A Q
970 CTACTCATG GATCTCGCC AGTCTCTCT GTTCTCGAC ATTTCTGCC

【 2 2 】

T L L M D L G O P L L F C H Y S S
 1020 ACCGACAGCA TGGGATGAAA GCATATGTA AAGTGGACT CTGCCCGAG
 H Q H D G M E A Y V K V D S C P E
 1070 GAACCCGAGC TTAGGATGAA GAACAATGAG GAGCCGAGG ACTACACGA
 S P Q L R M K N N E B A E D Y D
 1120 TGACCTTACC GATTGAGAAA TGACCTTACG ACCTTTGAC GACACACT
 D D L T D S E N D V V R P D D D N
 1170 CTCATCTCT CATACGAGT CGCTCCGTC CAGAGAGCA CCTAAGACT
 B P S F I Q I R S V A K K H P K T
 1220 TGGTGCATC ACATCGCGC CGAGGAGGAG GACTGGGAT ATGCTCCCT
 W V H Y I A A E E E D W D Y A P
 1270 GGTCTGACC CCGACGACC CGAGCTACA GAGCCAGTAC CTGATACAG
 L V L A P D D R S Y K L S Q Y L N N
 1320 GGGCCGAGC CATCGCGCG AAGTACAAGA AAGTGGGTT CATGGCTTAC
 G P Q R I G R K Y K X V R F M A Y
 1370 ACGGACGAGA CCTTCAAGC CGGAGAGCT ATCCAGCAIG AGAGCGCAT
 T D E T F K T R B A I Q H E S G
 1420 CTGCGGCCC CTCTGTACG CGGAAGTGG AGACACACTG CTGATCATCT
 I L G P L L Y G E V G D T L L I I
 1470 TCAGAGACA GCGAGGAGG CCTTCAACA TGTACCCCA CGGACTTACC
 F K N Q A S R P Y N I Y P H G T T
 1520 GATGTCGGC CGTGTACAG CCGAGCGTCC CCGAGGCGC TGAAGCACT
 D V R P L Y S R R L P K G V K H
 1570 GAAGACTTT CCGATCTCC CGGCGAGAT CTTCAGTAC AAGTGGACTG
 L K D F P I L P G E I F K Y K N T
 1620 TGACCTGGA GATGCGGCG ACCAGAGCC ATCCCGCTCG CTGACCCCT
 V T V E D G P T K S D P R C L T E
 1670 TACTACTCCA GCTTTGCAA TATGAGGCG GACTCGCTA CGGCTTGAT
 Y Y S S F V N M E R D L A S G L
 1720 TGCCCTCTG CTGATCTGT ACAGAGATC CTGAGGAGC AGGAGGATC
 I G P L L I C Y K B S V D Q R G N
 1770 AGATCATGAG TGACAGAGG AACGTATCC TTTCTCTCT GTCACGAA
 Q I M S D K R N V I L F S V F D E
 1820 AACCGAGCT GGTATCTAC CAGAAATAC CAGCGCTTC TGCCARCCC
 N E S W Y L T E N I Q R F L P N
 1870 GCGCGTGTG CAGCTGAGC ACCCGAGTT TCGGCGAGC AACATATGC
 P A G V Q L E D P E F Q A S N I M
 1920 ATCTATCAA CGATATGTC TTTATTCCT TGACCTTCT AGTCTGTCT
 H S I N G Y V F D S L Q L S V C L
 1970 CAGAGGTCG CTTACTGTA TATCTCAGC ATGGGCGAC AGACCGATT
 H E V A Y W Y I L S I G A Q T D

【 2 2 】

2020 CCTGAGCGTG TTCTTCTCC GGTATACCTT CAGCACAG ATGGTGTACG
 P L S V F P S G Y T F K H K M V Y
 2070 AGATACCTT GACCTGTTC CCCTTACG GCGAAAGCTT GTTATGTCT
 E D T L T L F P F S G E T V P N S
 2120 ATGGAGAAC CCTGCTCTG GATCCTTGG TCCATAACT CGACTTCCG
 M E N P G L W I L G C H N S D F
 2170 CACCCGCGA ATGACCGCC TCCTGAAAGT GTGAGTGT GACAGAACA
 R N R G M T A L L K V S S C D K N
 2220 CCGCGACTA TTACGAGAC AGTACAGAG ACATCTCTC GTACTCTCT
 T G D Y Y E D S Y E D I S A Y L L
 2270 AGCAGAAITA ACSCCATGGA GCGAGATCC TTACAGCAGA AGACCGGCA
 S K N H A I E P R S F S Q N S R
 2320 CCCCAGACC CCGCAGAGC AGTTCACGC CACCACATC CCGGAGAAG
 H P S T R Q K Q F N A T T I P E N
 2370 ACATCGAGAA AACGACCCC TGGTTCGCC ACCGACCCC PATTGCCAG
 D I E K T D P N F A H R T C M P M P K
 2420 ATCCAGAAC TGACAGAGC CGACTCTCT ATGTCTCTC GCGAGGCC
 I Q N V S S S D L L M L L R O S
 2470 CACCCCCAC GCGCTGAGC TGAGGAGCT CAGAGAGCC AAGTACGAGA
 P T P H G L S L S D L Q E A K Y E
 2520 CCTTCAGCA CAGCCCGAC CCGCGGCA TGACAGCAA CAACGCTG
 T F S D D P S P G A I D S N N S L
 2570 TCCGAGTGA CCGACTTCC GCGCCAGCT CACACAGCG CCGATGCT
 S E M T H F R P Q L H H S G D M
 2620 GTTACCCCT GAGAGCGCG TCGACTTCC GCTGAGGAG AAGCTGGGA
 V P T P E S G L Q L R L N E K L G
 2670 CACCCCGCC CACCGAGCT AGAAGCTG ACTTCAGT GAGGACCC
 T T A A T E L K K L D F K V S S T
 2720 AGCAACAAC TGATCAGAC CATCCCGAG CAGACCTGG CCGCGGAC
 S N N L I S T I P S D W L A A G
 2770 CAGCAGACC AGCAGCTG CCGCTCCGC CATCTAGCA T D N T S S L G P P S M P V H Y D
 2820 GCGAGTGA CACCCCTG TTGGCAAGA AGAGAGGCC CCGACAGAG
 S Q L D T T L F G K K S S P L T E
 2870 AGCGCGGAC CCGTACGCT GTCTGAGAG AACACGACA CAGAGCTGT
 S G G P L S L S H E N N D S K L
 2920 GAGTCCGCG CTGATGACA CCGAGAGTC CAGCTGAGC AAGAGCTGT
 L E S G L M M S Q E S S W G K N V
 2970 CTAGCACGA GAGCGAGCG CTGTTCAAG GCAAGCGGC CACCGCCCT
 S S T E S B R L F K G K R A H G P

【 2 2 】

3020 GCGCTGCTG CCAAGGACA CCGCTGTC AAAGTGTCA TCAGCGCTG
 A L L T K D N A L F K V S I S L
 3070 GAABACACAC AAGACTCCA ACACAGCC CACCAACGC AGACCCACA
 L K T N K T S N N A T A L R K L N H M
 3120 TGACGCGCC AAGCTGCTG ATCAGAAC CAACCCGCT GTGACAGAC
 I D G P S L L I E N S P S V N Q N
 3170 ATCTGAGA GCGACAGCA GTTCCAGAA GTGACCCCC TGATCCAGA
 I L B S D T E P K K G V T P L I H
 3220 CCGATGCTG ATGATAGA ACGCCCGCC CCGAGACTG AACCAATGA
 D R M L M D K N A T A L R K L N H M
 3270 GCAACAGAC CACTCCAGC AAGACATGG AGATGTGCA CAGAGAGAG
 S N K T T S S K N M E M V Q Q K K
 3320 GAGGCCCCA TCCCCCGCA GCGCAGAAC CCGACATGA CTTCTTCAA
 E G P I P P D A Q N P D M S P P
 3370 GATGCTTTC CTGCCGAGA GCGCCGCTG GATCCAGCG ACCCAAGCA
 K M L F L P E S A R W I Q R T H G
 3420 ABAACACCT GACAGCGCG CAGGCCCCA GCGCCAGCA GCTGTGAGC
 K N S L N S G Q G P S P K Q L V S
 3470 CTGGACCGG ABAAGCTCT GAGGCGCAG ACTTCTGTA CCGAGAAGA
 L G P E K S V E G Q N P L S E K
 3520 CAAGTGTGT GTGGCAAGG CCGAGTTC CAGAGATGT GCGCTGAGG
 N K V V V G K G E F T K D V G L K
 3570 AGATGTGTT CCGCAGCAG CAGAACCTGT TCGTACCAA CCTGACAC
 E M V F P S S R N L F L T N L D N
 3620 CTGACAGAA ACACAGCCA CACCCAGAG ABAAGATCC AGGAGGAGT
 L H E N N T H N Q E K K I Q E E
 3670 CAGAGAAGG GAACCTGTA TCCAGAGAA GGTGCTGCT CCGCAGATC
 I E K K B T L I Q E N N V L P Q I
 3720 ACACCTGTG CCGCACAGG AACCTCAGA AGAATGTGT CCGTGTGAG
 H T V T G T K N F M K N L F L L S
 3770 ACCAGACAG AGTGGAGGG GAGCTAGAG GCGCCTAG CCGCCGTGCT
 T E Q N V B G S Y D G A Y A P V
 3820 GCGAGACTG CCGAGCTGA ACAGAGAGC CACCCGAGC ABAAGACACA
 L Q D F R S L N D S T N R T K K H
 3870 CCGCCACTT CAGCAAGAG GCGAGAGG AGAACCTGA GCGCTGAGC
 T A H F S K K G E E N L E G L G
 3920 AACCGACCA ACAGATGCT GAGAGAGC GCTTCACCA CCGGATCAG
 N Q T K Q I V E K Y A C T T R I
 3970 CCCCACACC AGCAGCAGA ACTCTGAG CACCGAGCC ABAAGAGCC
 S P N T B Q Q N F V T Q R S K R A

【 2 2 】

4020 TGAAGCAGT TCGCTGCC CTGAGGAGA CAGAGCTGA GAAGCGATC
 L K Q F R L P L E E T H L B K R I
 4070 ATCTGTGAG ACACAGCAC ACAGTGTGC ABAAGATGA AGCAGTGC
 I V D D T S T Q W S K N M K H L
 4120 CCTAGACCC CTGACCGAA TGACATCAA CAGAGAGAG ABAAGCGCA
 T P S T L T Q I D Y N E K R K G A
 4170 TCACCCAGG CCGCTGAGC GATGCTGTA CCGGAGCCA CAGCATCCC
 I T Q S P L S D C L T R S H S I P
 4220 CAGGCCAAC GAGCCCGCT GCCTTCCGC AAGTGTGTA GCTTCCAG
 Q A N R S P L P I A K V S S F P
 4270 CATCAGGCC ATCTAGTGA CAGAGTGTG GTTCCAGAC AACCTCCC
 S I R P I Y L T R V L F Q D N S S
 4320 ACCTGCTGC CCGCAGTAC CCGAGAGAG CAGCGCGCT CCGAGAGAG
 H L P A A S Y R K K D S G V Q E S
 4370 AGCACTTTC TCGAGGCGC CAAGAGAAC AACCTGAGC TGCCATCTT
 S H F L Q G A K K N N D S L A I
 4420 GACCCGAGG ATGACCGGC ACCAGCGGA AGTGGCAGC CTGGAAACA
 L T L E M T G D Q R E V G S L G T
 4470 GCGCCAGAA CAGCTGACC TACAAGAGG TCGAGACAC GCTCTGCC
 S A T N S V T Y K K V E N T V L P
 4520 AAGCCGACC TGCCAGAC CAGCGAAA GTGAGCTGC TGCCAAAGT
 K P D L P K T B G K V E L L P K
 4570 GCACATCTG CAGAGAGCC TGTTCGCC CAGACAGC AAGCGAGCC
 V H I Y Q K D L F P T E T S N G S
 4620 CTGGCACCT GAGCTGTGT GAGGCTTCC TGCTCAGCG CACCGAGCC
 P G H L D L V E G S L L Q G T E G
 4670 GCAATTAAGT GAGAGAGCC CACAGAGCC GCGAAGTGC CTTCTCTG
 A I K N M E A N R P G K V P F L
 4720 AGTGGCCACC GAGAGAGCC CAGAGACCC CTCCAACTG CTGACCCCC
 R V A T E B S S A K T P S K L L D P
 4770 TGCTCTGGA CATCTACTG GCGCCAGAA TCCCAAGGA GAGTGGAG
 L A W D N H Y G T Q I P K E R W K
 4820 AGCCAGAGA AATCCCGCC ABAAGCGCC TTAGAGAGA ABAATACAT
 S Q B K E P S K T A P K K D T
 4870 CCGTCCCTG AACCGCTGC AGAGACACA CCGCATGCC GCATACAG
 I L S L N A C E S N H A I A I Y
 4920 AGGACAGAA CAGCCCGAG ATAGAGTGA CCGGCGAAA CCGAGCAGA
 B G Q N K P E I E V T W A K Q G R
 4970 ACAGAGGCC TGTGAGCAC GACCCCGCA GTGCTGAGA GCTCAGAG
 T E R L C S Q N P P V L K R H Q

【 2 2 】

```

5020 GGAGATCACC CCGACGACC TGCATCGGA TCAGGAGGAG ATTGATTACG
    R E I T R T T L Q S D Q B E I D Y
5070 ACGACACGAT CAGTGTGGG ATGAGAGAGG AAGACTTCGA CATCTACGAC
    D D T I S V R M K K E D F D I Y D
5120 GAAGATGAAA ACCGATCCG TCGGTCTCT CAAAGAAGA CCGGCACTA
    H D E N Q S P R S F Q K K T R H
5170 CTTCAATGCC GCTGTGGAAC GCTGTGGGA CTATGGAAG TCTTCTAGCC
    Y F I A A V E R L W D Y G M S S S
5220 CTCACGTTT GAGGAACCG GCCCATGGG GCAGCGTCC CCAATTCAAG
    P H V L R N R A Q S G S V P Q P F K
5270 AAGTGTGTG TCCAGAGTT CACGACGCG TCTTCTACC AGCACTTTA
    K V V F Q E E F T D G S E T Q P L
5320 CCGGCGGAG CTCAATGAC ATCTGGGCT GCTGGGACC TACATCAGG
    Y R G E L N B H L G L L G P Y I R
5370 CTGAGTGGG GAGCAACAT ATGATGACAT TCCGGAATCA GCGCAGAGA
    A B V H D N I M V T F R N Q A S R
5420 CCATACAGT TCTACAGTC ACTCATCTC TACGAGGAG ACCGACGCA
    P Y S F Y S S L I S Y E E D Q R
5470 GGGGCTGAA CCCCPTAGA ACTCTGTGA SCCAAAGAA ACAAGACCT
    Q G A E P R K H P V K P H E T K T
5520 ACTCTGGAA GGTCCAGAC CACATGCGC CTACCAAGA CAGTTCGAT
    Y F W K V Q H H M A P T K D B F D
5570 TCGAAGCCT GCGCTACTT CTCGACGTG GACCTGGAGA AAGATGTGA
    C K A W A Y P S D V D L B K D V
5620 CAGGCGCTG ATTGGCCCT TCGTGTGTG TCGAGGAC ACATCTACC
    H S G L I G F L L V C H T N T L N
5670 CTGACACGG GCGGAGGTC ACTGTGAGG AATTGGCCCT GTCTTTACC
    P A H G R Q V T V Q E F A L F F T
5720 ATCTTTGAT AGACGAAGT CTGGTATTT ACCGAAAACA TGGAGAGAA
    I F D E T K S W Y F T E N M E R
5770 CTGCGCGCA CCTCGACAT TCCAGATGA AGATCGACA TTCAGGAGA
    N C R A P C N I Q M E D P T F K B
5820 ACTACGGTT CCAATGCCAT AATGGCTACA TCATGACAC CTTGCCGTG
    N Y R F H A I N G Y I H D T L P G
5870 CTCGTATGG CCGAAGACA GCGTATCCG TGGTATCTG TGTGATGGG
    L V M A Q D Q R I R W Y L L S M
5920 CTCGACGAG AACATCATA GATTCACCT CAGCGGCAT GTCTTCAGG
    G S N E N I H S I H F S G H V E T
5970 TGAGGAAAA GAGGAGTAC AAGATGACC TGTACACCT CTATCCGGC
    V R K K B E Y K N A L Y N L Y P G

```

【 2 2 】

```

6020 GTGTTGAGA CCGTGGAGT GCTGCCCTC AAGGCGGCA TCGGAGAGT
    V F B T V B M L P S K A G I W R
6070 GGAATGCGT ATCGCGGCG ACCTCCAGC TGGGATGTC ACGTGTCTC
    V E C L I G B H L H A G M S T L F
6120 TCGTTACAG CAATAGTGC CAGACCCCTC TGGGATGCG GAGGCGCAC
    L V Y S H K C Q T F L G W A S G H
6170 ATCCCGGACT TCCAGATTG AGCCAGCGC CAGTACGTC AGTGGGCTC
    I R D F Q I T A S G Q Y G Q W A
6220 AAGCTGGCC GGTGTGACT ACTCCGATC CATCAAGCC TGTCCACCA
    P K L A R L H Y S G S I N A W S T
6270 AAGAACGTT CTCTGTGAT AAGTAGACC TGTAGCCCC CATGATCAT
    X E P F B W I K V D L L A P M I I
6320 CACGCAATCA AGACCAAGG CGCCGACAG AAGTCTGGA GCTCTATAT
    H G I K T Q G A R Q K F S S L Y
6370 CTCGCGATC ATCATCATG ATAGCCGGA CGGAAGAGG TGGCAGCTT
    I S Q F I I M Y S L D G K K W Q T
6420 ACCCGGAAA CTGACAGGG ACCCTGATG TATCTTCGG TAAGTGGAC
    Y R G N S T G T L M V F P G N V D
6470 AGCTCCGAA TCAAGCAGA CATCTTCAAC CCGCCGATTA TCGCCGCTA
    S S G I K H N I P N P P I A R
6520 CATCCGCGT CACCCACTC ACTATAGAT TAGTCCACC CTGCGATGG
    Y I R L H P T H Y S I R S T L R M
6570 AGCTCATGG CTGTGACTG AACAGCTGA GCATGCCCT CCGCATGGAG
    E L M G C D L N S C S M P L G M E
6620 TCTAAGGGA TCTCCGCGC CAGATAACG GCATCATCT ACTTACCAA
    S K A I S D A Q I T A S S Y F T
6670 CATGTGCGT ACTGTGCTC COTCCAAGC CCGACTCCG CTGCAAGGA
    N M F A T W S F S K A R L H L Q G
6720 GATCCAGCC CTGCGGCGA CAGTCAACA ATCCCAAGG GTGCTGACA
    R S N A W R P Q V N N P K E W L Q
6770 GTGACTTTC AGAATCTAT GAAATCACC GAGTGAACA CACAGGAGT
    V D F Q K E M K V T G V T T Q G
6820 GAGTCTGTG CTGACAGCA TGTAGTGA AAGTCTCTC ATCTCGGTT
    V K S L L T S M Y V K E F L I S S
6870 GCGAGATGG CACACAGTG ACGTGTCTT TCCAAAAGG TAAAGTCAA
    S Q D G H Q W T L F F Q N G K V K
6920 GTCTCCAGG GAGACAGGA CAGCTTACA CCGGTGTGA ACTCCGTGA
    V F Q G N Q D S F T P V V N S L
6970 CCCCCGCTT CTCATAGAT ACCTCGGAT CCGACTCAG ACGTGGGTC
    D P P L L T R Y L R I H P Q S W V

```

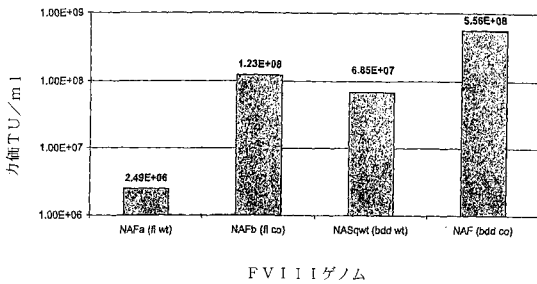
【 2 2 】

```

7020 ACCAGATGC CTTGCGGATG GAGGTTCTGG GGTGTGAGC CCGAGCCTG
    H Q I A L R M E V L G C E A Q D L
7070 TAC
    Y

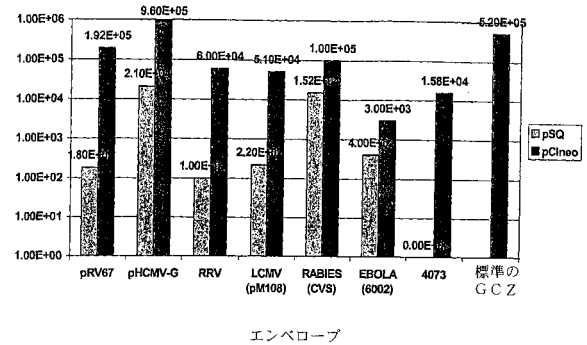
```

【 2 3 】



【 2 5 】

D17力価cfu



【 2 4 】



【配列表】

2007510412000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB2004/004553
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/867 C12N5/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/092134 A (CELL GENESYS, INC) 21 November 2002 (2002-11-21)	1-3, 19-23, 29, 33-39
Y	the whole document	26
X	VANDENDRIESSCHE T ET AL: "Development of ex vivo and in vivo gene therapy for hemophilia A using retroviral and lentiviral vectors expressing factor VIII" HAEMOSTASIS, BASEL, CH, vol. 30, 2000, page 27, XP002954884 the whole document	1,5
X	US 5 681 746 A (BODNER ET AL) 28 October 1997 (1997-10-28) the whole document	1,4,6-8, 34-40
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
C document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 17 February 2005		Date of mailing of the international search report 08.06.2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Valcarcel, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB2004/004553

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/00600 A (CHANG, LUNG-JI) 6 January 2000 (2000-01-06) The whole document, see in particular abstract and claim 1. -----	26
P,X	"EIAV-based vectors for the treatment of haemophilia A" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA., US, vol. 9, May 2004 (2004-05), page 64, XP004634534 ISSN: 1525-0016 the whole document -----	1,4,6
X	WO 00/17375 A (VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR BIOTECHNOLOGIE VZW; VANDENDRIE) 30 March 2000 (2000-03-30) the whole document -----	1,19-22, 34-39
X	WO 98/53063 A (LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT VZW; VANDEN DRIESSCHE, THIERRY; CHUAH, M) 26 November 1998 (1998-11-26) the whole document -----	1,5,21, 33-39
Y	WO 02/064799 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES, INC; SELDON, RICHARD, F; MILLER, ALLAN, M; TR) 22 August 2002 (2002-08-22) the whole document -----	1,4,6
Y	US 6 114 148 A (SEED ET AL) 5 September 2000 (2000-09-05) the whole document -----	1,4,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB2004/004553

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 38 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-8 (entirely); 19-23, 26, 29, 33- 40 (partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2004/004553

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-8 (entirely); 19-23, 26, 29, 33-40 (partially)

Lentiviral or retroviral vectors encoding factor VIII according to claims 1-8, retroviral particles, uses and methods involving said vectors or particles.

2. claims: 9-18 (entirely); 19-23, 26, 29, 33-40 (partially)

Retroviral vectors according to claims 9-18, retroviral particles, uses and methods involving said vectors or particles.

3. claims: 24, 25, 32 (entirely); 26, 29, 33-40 (partially)

A retroviral vector wherein the major splice donor is absent or disrupted, retroviral particles, uses and methods involving said vectors or particles.

4. claims: 27, 28 (entirely); 29, 33-40 (partially)

A retroviral or lentiviral vector wherein the initial codon of the Tat exon is disrupted. Retroviral particles, uses and methods involving said vectors or particles.

5. claims: 30 (entirely); 21, 22, 33-40 (partially)

A lentiviral vector pseudotyped with a Ross River viral envelope according to claim 30. Retroviral particles, uses and methods involving said vectors or particles.

6. claims: 31 (entirely); 33-40 (partially)

A lentiviral vector wherein the Tat exon of lentiviral pro-vector is deleted or disrupted, according to claim 31. Retroviral particles, uses and methods involving said vectors or particles.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB2004/004553

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02092134 A	21-11-2002	EP 1395293 A1	10-03-2004
		WO 02092134 A1	21-11-2002
		US 2003077812 A1	24-04-2003
		US 2004259208 A1	23-12-2004
US 5681746 A	28-10-1997	AU 4602596 A	24-07-1996
		EP 0795021 A2	17-09-1997
		JP 11503602 T	30-03-1999
		WO 9621035 A2	11-07-1996
WO 0000600 A	06-01-2000	US 6207455 B1	27-03-2001
		WO 0000600 A2	06-01-2000
		US 6531123 B1	11-03-2003
		AU 4207899 A	13-12-1999
		AU 773015 B2	13-05-2004
		AU 4312699 A	17-01-2000
		CA 2333481 A1	06-01-2000
		EP 1082447 A2	14-03-2001
		WO 9961598 A2	02-12-1999
		US 2002108930 A1	15-08-2002
WO 0017375 A	30-03-2000	AU 6468199 A	10-04-2000
		WO 0017375 A2	30-03-2000
WO 9853063 A	26-11-1998	EP 0938904 A1	01-09-1999
		AU 8105798 A	11-12-1998
		CA 2289918 A1	26-11-1998
		WO 9853063 A2	26-11-1998
		EP 0980264 A2	23-02-2000
WO 02064799 A	22-08-2002	CA 2425732 A1	22-08-2002
		EP 1325138 A2	09-07-2003
		WO 02064799 A2	22-08-2002
US 6114148 A	05-09-2000	AU 737122 B2	09-08-2001
		AU 4355697 A	14-04-1998
		BR 9712077 A	29-04-2003
		CA 2265976 A1	26-03-1998
		CN 1237977 A	08-12-1999
		CZ 9900968 A3	15-09-1999
		EP 0929564 A1	21-07-1999
		HU 9904239 A2	28-04-2000
		JP 2001503252 T	13-03-2001
		KR 2000048511 A	25-07-2000
		PL 332431 A1	13-09-1999
		RU 2233329 C2	27-07-2004
		TR 9900624 T2	21-07-1999
		WO 9812207 A1	26-03-1998

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 C 0 8 7
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ラドクリフ フィリップ
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード ザ オックスフォード サイエンスパーク ロバート ロビンソン アベニュー メドワー センター シー/オー オックスフォード バイオメディカ (ユーケー) リミテッド
- (72) 発明者 ウィルクス フレイザー
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード ザ オックスフォード サイエンスパーク ロバート ロビンソン アベニュー メドワー センター シー/オー オックスフォード バイオメディカ (ユーケー) リミテッド
- (72) 発明者 キングスマン スーザン
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード ザ オックスフォード サイエンスパーク ロバート ロビンソン アベニュー メドワー センター シー/オー オックスフォード バイオメディカ (ユーケー) リミテッド
- (72) 発明者 ミトロファノス キリアコス
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード ザ オックスフォード サイエンスパーク ロバート ロビンソン アベニュー メドワー センター シー/オー オックスフォード バイオメディカ (ユーケー) リミテッド

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA02 DA02 EA02 FA02 GA11 HA03 HA17
4B064 AG01 CA10 CA12 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AA97X AA97Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA44
4C084 AA13 MA13 MA17 MA23 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA52
MA55 MA57 MA60 MA63 MA66 NA13 NA14 ZA012 ZA332 ZA362
ZA512 ZA532 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA962 ZB072 ZB112
ZB132 ZB262 ZB332 ZC552
4C086 AA01 AA02 EA16 NA13 NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZA51 ZA53
ZA66 ZA68 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13 ZB26
ZB33 ZC55
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA04 CA12 NA13 NA14 ZA01 ZA33
ZA36 ZA51 ZA53 ZA66 ZA68 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB07
ZB11 ZB13 ZB26 ZB33 ZC55