

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4612950号  
(P4612950)

(45) 発行日 平成23年1月12日(2011.1.12)

(24) 登録日 平成22年10月22日(2010.10.22)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 O 2
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02

請求項の数 12 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2000-551022 (P2000-551022)	(73) 特許権者	306034996
(86) (22) 出願日	平成11年5月21日 (1999.5.21)		オックスフォード バイオメディカ (ユー ケー) リミテッド
(65) 公表番号	特表2002-518997 (P2002-518997A)		イギリス国, オーエックス4 4ジーエー 、オックスフォード, 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, メダウォー センター
(43) 公表日	平成14年7月2日 (2002.7.2)	(74) 代理人	100099623
(86) 国際出願番号	PCT/GB1999/001607		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開番号	W01999/061639	(74) 代理人	100096769
(87) 国際公開日	平成11年12月2日 (1999.12.2)		弁理士 有原 幸一
審査請求日	平成18年5月22日 (2006.5.22)	(74) 代理人	100107319
(31) 優先権主張番号	9811153.7		弁理士 松島 鉄男
(32) 優先日	平成10年5月22日 (1998.5.22)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	60/093,149		
(32) 優先日	平成10年7月17日 (1998.7.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レトロウイルス送達システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ウマ感染性貧血ウイルス (E I A V) から誘導できるレトロウイルス製作システムであって、狂犬病 G タンパク質もしくは標的細胞上のレセプター分子に結合し、レトロウイルスをシュードタイプする狂犬病 G タンパク質の活性を有するそのフラグメント、または、標的細胞上のレセプター分子に結合し、レトロウイルスをシュードタイプする狂犬病 G タンパク質の活性を有する狂犬病 G タンパク質の突然変異体もしくは変異型の全長もしくはフラグメントをコードする第1の核酸配列と、E I A V ベクターゲノムをコードする第2の核酸配列とを含む、システム。

【請求項2】

ゲノムを含む感染性 E I A V ベクター粒子を生成するために要求されるパッケージング成分をコードする、E I A V 由来の1以上のさらなる核酸配列を含む、請求項1に記載のシステム。

【請求項3】

第1のヌクレオチド配列が、狂犬病 G タンパク質またはその突然変異体、変異型もしくはフラグメントの全長をコードする請求項1又は2に記載のレトロウイルス製作システム。

【請求項4】

前記レトロウイルス製作システムが、少なくとも1つの関心のあるヌクレオチド配列を含む、請求項1~3のいずれか1項に記載のレトロウイルス製作システム。

## 【請求項 5】

前記関心のあるヌクレオチド配列が、治療効果を有するか、あるいは治療効果を有するタンパク質をコードする請求項 4 に記載のレトロウイルス製作システム。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のレトロウイルス製作システムから得られる E I A V ベクター粒子。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の E I A V ベクター粒子により形質導入された細胞。

## 【請求項 8】

医療に使用するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のレトロウイルス製作システム、または請求項 6 に記載の E I A V ベクター粒子。

10

## 【請求項 9】

請求項 6 に記載の E I A V ベクター粒子と、単離された細胞を接触させることを含む方法。

## 【請求項 10】

狂犬病 G タンパク質を含むエンベロープを有する E I A V 粒子を製作するための方法であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のレトロウイルスベクター製作システムを提供するステップと、前記レトロウイルス製作システムをベクター粒子成分の発現及びベクター粒子の製作に適した条件におくステップと、ベクター粒子を上澄から回収するステップとを含む、方法。

20

## 【請求項 11】

プロデューサー細胞中に、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のレトロウイルスベクター製作システムを提供するステップと、プロデューサー細胞をベクター粒子成分の発現及びベクター粒子の製作に適した条件下におくステップと、ベクター粒子を上澄から回収するステップとを含む、請求項 10 に記載の E I A V 粒子の製作方法。

## 【請求項 12】

超遠心分離を使用して上澄を濃縮する請求項 10 又は 11 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、送達システムに関する。特に、本発明は、関心のあるヌクレオチド配列 (nucleotide sequence of interest; 以下、「NOI」と略記する)、または複数の NOI を、関心のある部位に送達することができるレトロウイルスベクターに関する。

30

## 【0002】

さらに、特に、本発明は、遺伝子療法に有用なレトロウイルスベクターに関する。

## 【0003】

遺伝子療法は、たとえば、標的細胞等の、1 つまたは複数の標的部位における 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の、付加、置換、欠失、補足、操作等のいずれか 1 つまたは複数を含む。標的部位が標的細胞であれば、そのときは、その細胞は、組織または器官の一部であってもよい。Molecular Biology (Robert Meyers 編、VCH 発行、たとえば、556 - 558 ページ) には、遺伝子療法に関する一般的教示が記載されている。

40

## 【0004】

さらなる例として、遺伝子療法は、以下のいずれか 1 つまたは複数を提供する方法も提供する。即ち、ヌクレオチド配列、たとえば遺伝子を使用して、欠陥遺伝子を置換または補足することができる。病原遺伝子または遺伝子産物を除去することができる。たとえば、より好ましい表現型を作るために、新しい遺伝子を付加することができる。細胞を分子レベルで操作して癌 (Schmidt - Wolf and Schmidt - Wolf, 1994, Annals of Hematology 69; 273 - 279)、または他の状態、たとえば、免疫病、心血管疾患、神経学的疾患、炎症性疾患または感染性疾患を治療することができる。抗原を操作および / または導入して、免疫応答を誘導する

50

ことができる（たとえば、遺伝子ワクチン接種）。

【0005】

近年、レトロウイルスを遺伝子療法に使用することが推奨されている。本来、レトロウイルスは、溶菌性ウイルスとは異なるライフサイクルを有するRNAウイルスである。この点について、レトロウイルスが細胞に感染すると、そのゲノムは、DNA型に変換される。言い換えれば、レトロウイルスは、DNA中間体を介して複製する感染実体である。レトロウイルス感染等に関するさらなる詳細については後述する。

【0006】

多くのレトロウイルスがあり、その例を以下に挙げる。ネズミ白血病ウイルス(MLV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ウマ感染性貧血ウイルス(EIAV)、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、フジナミ肉腫ウイルス(FuSV)、モロニーネズミ白血病ウイルス(Mo-MLV)、FBRネズミ骨肉腫ウイルス(FBRMSV)、モロニーネズミ肉腫ウイルス(Mo-MSV)、エーベルソンネズミ白血病ウイルス(A-MLV)、鳥類骨髄細胞腫ウイルス-29(MC29)、および鳥類赤芽球症ウイルス(AEV)。

10

【0007】

レトロウイルスの詳細なリストは、Coffin et al ("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press eds: LM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763)に掲載されている。

20

【0008】

当技術分野で、幾つかのレトロウイルスのゲノム構造に関する詳細を見つけることができる。例として、HIVに関する詳細をNCBI GenBankからみつけることができる(すなわち、ゲノム寄託番号第AF033819号)。

【0009】

全てのレトロウイルスは、不可欠なピリオンタンパク質をコードする3つの主要なコード領域、gag、pol、envを含む。それにもかかわらず、レトロウイルスは、大きく2つのカテゴリー(すなわち、「単純」と「複雑」)に分けられる。これらのカテゴリーは、そのゲノムの構成によって識別できる。単純レトロウイルスは、通常、この基本情報のみを担持する。対照的に、複雑レトロウイルスは、多数のスプライシングされたメッセージから誘導される調節タンパク質もさらにコードする。

30

【0010】

レトロウイルスは、さらに7群に分けることができる。そのうち5群は、発癌性を有するレトロウイルスを表す。残りの2群は、レンチウイルスおよびスプマウイルスである。これらのレトロウイルスに関する総説は、"Retroviruses"(1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: LM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 1-25)にある。

【0011】

ヒトT細胞白血病ウイルス-ウシ白血病ウイルス(HTLV-BLV)以外の全ての発癌性メンバーは、単純レトロウイルスである。HTLV、BLVならびにレンチウイルスおよびスプマウイルスは、複雑レトロウイルスである。ラウス肉腫ウイルス(RSV)、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、ネズミ白血病ウイルス(MLV)およびヒトT-細胞白血病ウイルス(HTLV)は、最もよく研究された発癌性レトロウイルスの一部である。

40

【0012】

レンチウイルス群は、さらに、「霊長類」および「非霊長類」に分けられる。霊長類レンチウイルスの例としては、ヒト自己免疫不全症候群(AIDS)の原因であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびシミアン免疫不全ウイルス(SIV)などが挙げられる。非霊長類レンチウイルス群には、基本型「スローウイルス」ピスナ/マエディウイルス(VMV)、ならびに関連ヤギ関節炎-脳炎ウイルス(CAEV)、ウマ感染性貧血ウイル

50

ス (E I A V) が含まれ、最近では、ネコ免疫不全ウイルス (F I V) およびウシ免疫不全ウイルス (B I V) について記載されている。

【0013】

レンチウイルスファミリーと他のタイプのレトロウイルスとの間の重要な相違点は、レンチウイルスは、分裂細胞も非分裂細胞も共に感染することができる点である (Lewis et al 1992 EMBO J 11; 3053-3058、Lewis and Emerman 1994 J. Virol. 68:510-516)。対照的に、他のレトロウイルス、たとえば、MLVは、非分裂細胞 (たとえば、筋組織、脳組織、肺組織および肝組織を構成するもの等) に感染することができない。

【0014】

感染の経過中、レトロウイルスは、最初に、特定の細胞表面レセプターに付着する。感染しやすい宿主細胞に侵入すると、レトロウイルスRNAゲノムは、親ウイルス内部にある、ウイルスによりコードされた逆転写酵素によってDNAにコピーされる。このDNAは、宿主細胞核に輸送され、続いて宿主ゲノムに組み込まれる。この段階で、一般に、プロウイルスと呼ばれる。プロウイルスは、細胞分裂中、宿主染色体内で安定であり、且つ他の細胞タンパク質と同様に転写される。プロウイルスは、より多くのウイルスを作るのに必要なタンパク質およびパッケージング機構をコードし、「出芽」と呼ばれることもあるプロセスにより、細胞をそのままの状態にしておくことができる。

【0015】

既に指摘した通り、各レトロウイルスゲノムは、ピリオンタンパク質および酵素をコードする gag、pol および env と呼ばれる遺伝子を含む。これらの遺伝子は、その両端が、長末端反復配列 (long terminal repeats; LTR) と呼ばれる領域により挟まれている。このLTRは、プロウイルスの組み込み、および転写に關与する。LTRは、エンハンサー-プロモーター配列の役割も果たす。言い換えれば、LTRは、ウイルス遺伝子の発現を調節することができる。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'末端にある psi 配列によって起こる。

【0016】

LTRそれ自体は、U3、R および U5 と呼ばれる、3つのエレメントに分けることができる配列と同じ配列である。U3は、RNAの3'末端に特有の配列から誘導される。Rは、RNAの両末端で反復する配列から誘導され、U5は、RNAの5'末端に特有の配列から誘導される。3つのエレメントのサイズは、異なるレトロウイルス間でかなり変化する可能性がある。

【0017】

理解しやすくするために、LTR、gag、pol および env の基本的特徴を示すレトロウイルスゲノムの簡単な一般的線図を (比率は別として)、図6に示す。

【0018】

ウイルスゲノムの場合、転写開始部位は、左手側のLTR内のU3とRとの間の境界にあり (図6に示す)、poly(A)付加 (終結) 部位は、RおよびU5は、右手側LTR内のRとU5との間の境界にある (図6に示す)。U3は、プロウイルスの転写調節エレメントの大部分を含み、その中には細胞の転写アクティベータータンパク質、および場合によってはウイルスの転写アクティベータータンパク質に回答するプロモーター配列および多数のエンハンサー配列が含まれる。一部のレトロウイルスは、遺伝子発現の調節に關与するタンパク質をコードする遺伝子である tat、rev、tax および rex のいずれか1つまたは複数を含む。

【0019】

構造遺伝子 gag、pol および env それ自体に関しては、gag はウイルスの内部構造タンパク質をコードする。gag は、タンパク質分解によるプロセッシングを受けて、成熟タンパク質 MA (基質)、CA (キャプシド)、NC (ヌクレオキャプシド) になる。遺伝子 pol は、逆転写酵素 (RT) をコードし、DNAポリメラーゼ、および関連 RNAse H 活性の両者およびゲノムの複製を仲介するインテグラーゼ (IN) を含む。遺伝

10

20

30

40

50

子envは、ビリオンの表面(SU)糖タンパク質および膜貫通(TM)タンパク質をコードし、これらは、細胞レセプタータンパク質と特異的に相互に反応する複合体を形成する。この相互作用は、最終的に、ウイルス膜と細胞膜との融合につながる。

【0020】

レトロウイルスのエンベロープ糖タンパク質複合体は、2つのポリペプチド、すなわち、外側の、グリコシル化された親水性ポリペプチド(SU)および膜貫通タンパク質(TM)を含む。これらは、一緒に、オリゴマーの「こぶ」または「こぶ付きスパイク」をビリオンの表面上に形成する。両ポリペプチドは、env遺伝子にコードされ、ポリタンパク質前駆体の形で合成されて、細胞表面に輸送される間にタンパク質分解により切断される。未分解のenvタンパク質はレセプターに結合することができるが、切断事象それ自体は、ウイルスが宿主細胞に侵入するのに必要なタンパク質の融合潜在能力を活性化することが必要である。一般に、SUタンパク質とTMタンパク質の両者が多数の部位でグリコシル化されている。しかし、一部のウイルス(MLVが好例である)では、TMはグリコシル化されていない。

10

【0021】

SUタンパク質およびTMタンパク質は常に必要なわけではないが、エンベロープに包まれたビリオン粒子それ自体を組み立てるために、侵入過程において極めて重要な役割を果たす。この点について、SUドメインは標的細胞上のレセプター分子(多くの場合、特定のレセプター分子)に結合する。この結合事象はTMタンパク質の膜融合誘導性能を活性化し、その後、ウイルス膜と細胞膜が融合すると考えられる。一部のウイルス(特にMLV)では、結果としてTMの細胞質尾部の短い部分が除去される切断事象は、タンパク質の全融合活性を明らかにする際に、重要な役割を果たす(Brody et al 1994 J. Virol. 68:4620-4627, Rein et al 1994 J. Virol. 68:1773-1781)。TMの膜貫通断片から離れた、この細胞質「尾部」は、ウイルス膜の内側に残存し、異なるレトロウイルスで長さかなり変化する。

20

【0022】

このように、SU/レセプター相互作用の特異性により、レトロウイルスの宿主範囲および組織親和性が規定される。ある場合には、この特異性により、組換えレトロウイルスベクターの形質導入能が制限される。このため、多くの遺伝子療法実験でMLVが使用されてきた。4070Aと呼ばれるエンベロープタンパク質を有する独特のMLVは、両種性ウイルスとして知られ、そのエンベロープタンパク質は、ヒトとマウスとの間で保存されるリン酸輸送タンパク質と「ドッキング」するため、ヒト細胞を感染させることができる。この輸送体は遍在しているため、これらのウイルスは、多くの細胞タイプを感染させることができる。しかし、場合によっては、特に安全性の観点から、限られた細胞を特異的に標的とすることが有益なこともある。このために、幾つかのグループは、マウス狭宿主性(その両種親和性系統と異なり、通常、マウス細胞のみを感染させる)レトロウイルスを、特定のヒト細胞を特異的に感染させるように操作した。エリトロポエチンセグメントを含むエンベロープタンパク質のフラグメントを置換すると、赤血球前駆体等の、エリトロポエチンレセプターを表面上に発現するヒト細胞に特異的に結合する組換えレトロウイルスを生じる(Maulik and Patel 1997 "Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies" 1997. Wiley-Liss Inc. pp 45.)。

30

40

【0023】

複雑レトロウイルスは、gag、polおよびenvに加えて、アクセサリタンパク質すなわち補助タンパク質をコードする「アクセサリ」遺伝子も含む。アクセサリタンパク質すなわち補助タンパク質は、通常の伴複製遺伝子すなわち構造遺伝子、gag、polおよびenvにコードされるものに加えて、アクセサリ遺伝子によりコードされるタンパク質と定義される。これらのアクセサリタンパク質は、tat、rev、tar

50

および rex によりコードされるもの等の、遺伝子発現の調節に関与するものと異なる。アクセサリ-遺伝子の例としては、vif、vpr、vpx、vpu および nef の1つまたは複数を挙げることができる。これらのアクセサリ-遺伝子は、たとえば、HIV にみられる(たとえば、"Retroviruses" Ed. Coffin et al Pub. CSHL 1997の802ページ および 803ページを参照)。非必須アクセサリ-タンパク質は、分化した細胞タイプで機能することができ、細胞タンパク質により提供される機能を少なくとも部分的に倍加する機能を提供する。一般に、アクセサリ-遺伝子は、pol と env との間、LTR のU3領域を含む env からすぐ下流、または env の重複部分および互いの重複部分に位置する。

【0024】

複雑レトロウイルスは、ウイルスによりコードされる転写アクティベーターならびに細胞性転写因子を使用する調節機構を進化させた。これらのトランス作用ウイルスタンパク質は、LTR により指令されるRNA転写のアクティベーターの役割をする。レンチウイルスの転写トランスアクティベーターは、ウイルスの tat 遺伝子によりコードされる。tat は、TAR と呼ばれるRNA二次構造(その1つの機能はTatを最適所に置いて、転写をトランス-活性化することである)である、安定なステム・ループに結合する。

【0025】

前述の通り、レトロウイルスは、特に、NOI、または複数のNOIを、関心のある1つまたは複数の部位に移動させるための送達システム(あるいは、送達媒体または送達ベクターと表現される)として推薦されている。この移送は、それらの組み合わせで起こり得る。この様式で使用する時、レトロウイルスは、一般に、レトロウイルスベクターまた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、レセプター使用法、逆転写およびRNAパッケージングを含め、レトロウイルスライフサイクルの様々な態様の研究に利用されてきた(Miller, 1992 Curr Top Microbiol Immunol 158:1-24による論評)。

【0026】

遺伝子治療用の一般的な組換えレトロウイルスベクターの場合、gag タンパク質コード領域、pol タンパク質コード領域およびenv タンパク質コード領域の1つまたは複数の少なくとも一部をウイルスから除去することができる。こうすることにより、レトロウイルスベクターを複製能欠損にさせる。宿主ゲノムにウイルスゲノムを組み込むことができるウイルスを産生するために、除去された部分をNOIと置き換えることも可能であるが、この場合、改変されたウイルスゲノムは構造タンパク質が欠如しているため、それ自体増殖できない。宿主ゲノムに組み込まれる時、NOIの発現が起こり、結果として、たとえば、治療効果が生じる。したがって、関心のある部位へのNOIの移動は、一般に、NOIを組換えウイルスベクターに組み込むこと、改変されたウイルスベクターをピリオン外皮内にパッケージングすること、および関心のある部位、たとえば、標的細胞または標的細胞群への形質導入を可能にすることによって実現される。

【0027】

パッケージングまたはヘルパー細胞系と、組換えベクターとの組み合わせを使用することにより、次に、たとえば、関心のある部位に形質導入するために、多量のレトロウイルスベクターを増殖させて単離する(たとえば、適当なタイターのレトロウイルスベクターを作成する)ことができる。

【0028】

場合によっては、増殖および単離が、レトロウイルスの gag 遺伝子、pol 遺伝子およびenv 遺伝子を単離し、宿主細胞に別々に導入して「パッケージング細胞系」を作成することを伴ってもよい。このパッケージング細胞系は、パッケージングレトロウイルスのDNAに必要なタンパク質を産生するが、psi領域が欠如しているため、パッケージングすることはできない。しかし、NOIおよびpsi領域を担持する組換えベクターをパッケージング細胞系に導入するとき、ヘルパータンパク質は、psi陽性組換えベクターをパッケージして、組換えウイルスストックを製作することができる。これを使用して、

10

20

30

40

50

細胞を感染させ、NOIを細胞のゲノムに導入することができる。ウイルスタンパク質の作成に必要な全ての遺伝子が欠如しているゲノムを有する組換えウイルスは、1度だけ感染させることができ、増殖することはできない。したがって、潜在的に有害なレトロウイルスの世代なしに、宿主細胞ゲノムにNOIが導入される。"Retroviruse" (1997 Cold Sprong Harbour Laboratory Press Eds: LM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 449)に、利用できるパッケージング系の概要が掲載されている。

【0029】

しかし、この技術は、タイターレベルが常に満足のゆくレベルにあるとは限らないという意味で問題がある。それにもかかわらず、特に、初期のデザインで頻繁に直面するヘルパーウイルスの自発的産生の問題を検討するところまで、レトロウイルスのパッケージング細胞系のデザインは進化した。相同性により組換えが非常に容易になるため、ベクターのゲノムとヘルパーのゲノムとの間の相同性を減少または排除することにより、ヘルパーウイルス産生の問題を減少させた。

10

【0030】

その後、gag、polおよびenvウイルスのコード領域が、それぞれ独立にパッケージング細胞系に形質導入される別々の発現プラスミド上に担持されており、それ故、野生型ウイルスの産生に3つの組換え事象が必要とされるパッケージング細胞が開発された。この方策は、3プラスミドトランスフェクション法と呼ばれることもある(Soneoka et al 1995 Nucl. Acids Res. 23:628-633)。

20

【0031】

ベクターを開発するとき、一過性トランスフェクションを使用して、ベクター生成を測定することもできる。この点について、一過性トランスフェクションは、安定なベクター製作細胞系の生成に必要なより長い期間を避けることができ、ベクターまたはレトロウイルスのパッケージング成分が細胞に有毒である場合、使用される。レトロウイルスベクターの製作に一般に使用される構成要素は、Gag/Polタンパク質をコードするプラスミド、envタンパク質をコードするプラスミドおよびNOIを含むプラスミドを含む。ベクター生成は、その他の必要な成分を含む細胞内に、これらの成分の1つまたは複数を一時的にトランスフェクトすることを含む。ベクターが、有毒な遺伝子または宿主細胞の複製を妨害する遺伝子、たとえば、細胞周期の阻害剤またはアポトーシスを誘導する遺伝子をコードするのであれば、安定なベクター製作細胞系を製作することは困難であろうが、一過性トランスフェクションを使用して、細胞が死ぬ前にベクターを製作することができる。また、一過性の感染を使用して、安定なベクター製作細胞系から得られるレベルに匹敵するベクタータイターレベルを生じる細胞系が開発された(Pear et al 1993, PNAS 90:8392-8396)。

30

【0032】

幾つかのHIVタンパク質の毒性(安定なHIVを基にしたパッケージング細胞の製作を困難にする可能性がある)を考慮して、HIVベクターは、通常、ベクターおよびヘルパーウイルスの一過性トランスフェクションにより製作される。HIV Envタンパク質を水泡性口内炎ウイルス(VSV)のenvタンパク質と置き換えた研究者さえいる。一過性トランスフェクションにより $5 \times 10^5$ (濃縮後 $10^8$ )のタイターを有するHIV/VSV-Gベクターを製作したように、VSVのEnvタンパク質を挿入すると、ベクター濃縮が容易になる(Naldini et al 1996 Science 272:263-267)。したがって、HIVベクターの一過性トランスフェクションは、高タイターベクターを製作するための有用な方策を提供することが可能である(Yee et al 1994 PNAS 91:9564-9568)。しかし、この方法による欠点は、VSV-Gタンパク質が細胞に対してかなり有毒なことである。

40

【0033】

env遺伝子と異種env遺伝子との置き換えは、シュードタイピング(pseudot

50

yping)と呼ばれる技術または方策の一例である。シュードタイピングは、新しい現象ではなく、WO - A - 98 / 05759、WO - A - 98 / 05754、WO - A - 97 / 17457、WO - A - 96 / 09400、WO - A - 91 / 00047およびMe bastion et al 1997 Cell 90, 841 - 847に例が見られる。

【0034】

シュードタイピングは、1つまたは複数の利点を与えることができる。たとえば、レンチウイルスのベクターを使用すると、HIVを基にしたベクターのenv遺伝子産物は、CD4と呼ばれるタンパク質を発現する細胞のみを感染させるように、これらのベクターを制限ようになる。しかし、これらのベクターのenv遺伝子が、他のRNAウイルス由来のenv配列と置換されると、その時には、より広い感染性スペクトルを有する可能性がある(Verma and Somia 1997 Nature 389:239 - 242)。前述の通り、また例として、研究者らは、VSV由来の糖タンパク質を含むHIVを基にしたベクターを、シュードタイプした(Verma and Somia 1997 同書)。

10

【0035】

また、例として、レトロウイルスenvタンパク質の相対的な脆弱性によって、レトロウイルスベクターを濃縮できる能力が限定される可能性があり、ウイルスを濃縮すると、ウイルスの回収が不十分になる。レトロウイルスEnvタンパク質をより安定なVSV-Gタンパク質と置換して、収率の高い、より効率的なベクター濃度が可能になり、この問題をある程度まで克服することができる(Naldini et al 1996, Science 272:263 - 267)。

20

【0036】

しかし、VSV-Gタンパク質を用いたシュードタイピングが常に望ましいとは限らない。これは、VSV-Gタンパク質が細胞障害性であるためである(Chen et al 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 10057およびその中に引用の参考文献)。

【0037】

それゆえ、無毒で且つレトロウイルスベクターのシュードタイピングに使用することができる他のタンパク質を発見することが望ましい。

30

したがって、本発明は、改良されたレトロウイルスベクターを提供しようとするものである。

【0038】

本発明の態様によれば、標的部位に形質導入することが可能なレトロウイルス送達システムであって、エンベロープタンパク質の少なくとも一部をコードする第1のヌクレオチド配列、およびレトロウイルス送達システムにより標的部位への形質導入を確実にするレトロウイルスから誘導できる1つまたは複数の他のヌクレオチド配列を含み、第1のヌクレオチド配列は、前記その他のヌクレオチド配列の少なくとも1つに関して異種であり、第1のヌクレオチド配列は、標的部位を認識することができる狂犬病Gタンパク質またはその突然変異体、変異型、誘导体またはフラグメントの少なくとも一部をコードすることを特徴とするレトロウイルス送達システムが提供される。

40

【0039】

本発明のレトロウイルス送達システムは、1つの実体(entity)を含むことができる。あるいは、本発明のレトロウイルス送達システムは、共同して、本発明のレトロウイルス送達システムを提供する複数の実体を含むことができる。これらのウイルス送達システムの例としては、Savard et al 1997, J Virol 71(5):4111 - 4117; Feng et al 1997, Nat Biotechnol 15(9):866 - 870; および英国特許出願第9720465.5号に記載されているような、ヘルペスウイルスおよびアデノウイルスが挙げられるが、その限りではない。

50

## 【 0 0 4 0 】

用語「誘導可能な」は、必ずしもレトロウイルスから得る必要はなく、それから誘導することができる配列を意味するという、通常の意味で使用される。例として、この配列を合成的に、もしくは組換えDNA技術を使用して、製作することができる。

## 【 0 0 4 1 】

本発明の第2の態様によれば、本発明によるレトロウイルス送達システムから得られるウイルス粒子が提供される。

## 【 0 0 4 2 】

本発明の第3の態様によれば、レトロウイルスベクターが本発明の第1の態様によるレトロウイルス送達システムであるか、それから得られる、レトロウイルスベクターが提供される。

10

## 【 0 0 4 3 】

本発明の第4の態様によれば、本発明によるレトロウイルス送達システム、本発明によるウイルス粒子、または本発明によるレトロウイルスベクターを用いて形質導入された細胞が提供される。

## 【 0 0 4 4 】

本発明の第5の態様によれば、医薬用の、本発明によるレトロウイルス送達システム、本発明によるウイルス粒子、本発明によるレトロウイルスベクターが提供される。

## 【 0 0 4 5 】

本発明の第6の態様によれば、NOIを必要とする標的部位に、それを送達するための医薬組成物の製造において、本発明によるレトロウイルス送達システム、本発明によるウイルス粒子、本発明によるレトロウイルスベクターを使用することができる。

20

## 【 0 0 4 6 】

本発明の第7の態様によれば、細胞を、本発明によるレトロウイルス送達システム、または本発明によるウイルス粒子、または本発明によるレトロウイルスベクターと接触させることを含む方法が提供される。

## 【 0 0 4 7 】

本発明の第8の態様によれば、本発明によるレトロウイルス送達システム、本発明によるウイルス粒子、本発明によるレトロウイルスベクターを提供するためのベクターであって、狂犬病Gタンパク質またはその突然変異体、変異型、誘導體またはフラグメントの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を含むベクターが提供される。

30

## 【 0 0 4 8 】

本発明の第9の態様によれば、本発明によるレトロウイルス送達システム、本発明によるウイルス粒子、または本発明によるレトロウイルスベクターを提供するためのプラスミドであって、狂犬病Gタンパク質またはその突然変異体、変異型、誘導體またはフラグメントの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドが提供される。

## 【 0 0 4 9 】

本発明の第10の態様によれば、少なくとも1つのプラスミドが、本発明によるプラスミドであり、少なくとも1つの他のプラスミドがレトロウイルスから誘導できる1つまたは複数のヌクレオチド配列を含む、複数のプラスミドが提供される。

40

## 【 0 0 5 0 】

本発明の第11の態様によれば、レトロウイルスまたはレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス粒子の感染性プロフィールに影響を及ぼすために、レトロウイルスまたはレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス粒子をシュードタイプするのに、狂犬病Gタンパク質を使用することができる。

## 【 0 0 5 1 】

本発明の第12の態様によれば、レトロウイルスまたはレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス粒子の宿主範囲および/または細胞親和性に影響を及ぼすために、レトロウイルスまたはレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス粒子をシュードタイプするのに、狂犬病Gタンパク質を使用することができる。

50

## 【 0 0 5 2 】

本発明の第 1 3 の態様によれば、狂犬病 G タンパク質を用いてシュードタイプされたレトロウイルスまたはレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス粒子が提供される。

## 【 0 0 5 3 】

本発明の第 1 4 の態様によれば、異種 e n v 領域が狂犬病 G タンパク質をコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む、異種 e n v 領域を含むレトロウイルス送達システムが提供される。

## 【 0 0 5 4 】

本発明の第 1 5 の態様によれば、異種 e n v 領域が狂犬病 G タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、異種 e n v 領域を含むレトロウイルス送達システムが提供される。

10

## 【 0 0 5 5 】

第 1 のヌクレオチド配列は、狂犬病 G タンパク質またはその突然変異体、変異型、誘導体またはフラグメントの全てをコードすることが好ましい。

## 【 0 0 5 6 】

他のヌクレオチド配列の少なくとも 1 つは、レンチウイルスまたはオンコレトロウイルスから誘導できることが好ましい。

## 【 0 0 5 7 】

その他のヌクレオチド配列は、レンチウイルスまたはオンコレトロウイルスから誘導できることが好ましい。

## 【 0 0 5 8 】

その他のヌクレオチド配列は、M L V、H I VまたはE I A Vから誘導できることが好ましい。

20

## 【 0 0 5 9 】

レトロウイルス送達システムは、少なくとも 1 つの N O I を含むことが好ましい。

## 【 0 0 6 0 】

N O I は治療効果を有するか、治療効果を有するタンパク質をコードすることが好ましい。

## 【 0 0 6 1 】

標的部位は細胞であることが好ましい。

## 【 0 0 6 2 】

したがって、本発明は、異種エンベロープタンパク質を有するレトロウイルスベクターを提供する。このレトロウイルスベクターは、遺伝子療法に有用である。

30

## 【 0 0 6 3 】

本発明の重要な態様は、狂犬病タンパク質、特に、狂犬病 G タンパク質を含む、コードするヌクレオチド配列を用いた、レトロウイルス、および/または誘導可能なもしくはレトロウイルスを基にしたレトロウイルスベクターのシュードタイピングである。ここで、用語シュードタイピングは、別のウイルス由来のタンパク質を、ウイルスゲノムまたはウイルスベクターの e n v 遺伝子の少なくとも一部に組み込むこと、一部と置換すること、全てを置き換えることを意味する。

## 【 0 0 6 4 】

狂犬病 G タンパク質、ならびにその突然変異体に関する教示は、R o s e e t a l . , 1 9 8 2 J . V i r o l . 4 3 : 3 6 1 - 3 6 4 , H a n h a m e t a l . , 1 9 9 3 J . V i r o l . , 6 7 , 5 3 0 - 5 4 2 , T u f f e r e a u e t e t a l . , 1 9 9 8 J . V i r o l . , 7 2 , 1 0 8 5 - 1 0 9 1 , K u c e r a e t a l . , 1 9 8 5 J . V i r o l 5 5 , 1 5 8 - 1 6 2 , D i e t z s c h o l d e t a l . , 1 9 8 3 P N A S 8 0 , 7 0 - 7 4 , S e i f e t a l . , 1 9 8 5 J . V i r o l . , 5 3 , 9 2 6 - 9 3 4 , C o u l o n e t a l . , 1 9 9 8 J . V i r o l . , 7 2 , 2 7 3 - 2 7 8 , T u f f e r e a u e t a l . , 1 9 9 8 J . V i r o l . , 7 2 , 1 0 8 5 - 1 0 9 1 0 , B u r g e r e t a l . , 1 9 9 1 J . G

40

50

en. Virol 65, 4198-4293, Luo et al 1998  
 Microbiol Immunol 42, 187-193, Coll 1997  
 Arch Virol 142, 2089-2097, Luo et al.,  
 1997 Virus Res 51, 35-41, Luo et al 1998  
 Microbiol Immunol 422, 187-193, Coll 19  
 95 Arch Virol 140, 827-851, Tuchiya et a  
 l., 1992 Virus Res 25, 1-13, Morimoto et  
 al 1992 virology 189, 203-216, Gaudin e  
 t al 1992 Virology 187, 627-632, Whitt e  
 tal 1991 Virology 185, 681-688, Dietzsch  
 old et al 1978 J Gen Virol 40, 131-139,  
 Dietzschold et al 1978 Dev Biol Stand 40  
 , 45-55, Dietzschold et al 1978 J Gen Vi  
 rol 23, 286-293及びOtcosetal 1994 Biochem  
 Biophys Acta 1224, 68-76にある。狂犬病Gタンパク質は、欧州  
 特許EP-A-0445625号にも記載されている。

10

## 【0065】

本発明による狂犬病Gタンパク質を使用すると、優先的に標的細胞に*in vivo*で形質導入し、この細胞を狂犬病ウイルスが優先的に感染させるベクターを得ることができる。この中には、特に、*in vivo*でのニューロン標的細胞が含まれる。ニューロンを標的としたベクターの場合、ERA等の、狂犬病の病原性株由来の狂犬病Gが特に有効である。その反面、狂犬病Gタンパク質は、*in vitro*で試験したほぼ全ての哺乳類細胞タイプおよび鳥類細胞タイプを含む広い標的細胞範囲を与える(Seganti et al., 1990 Arch Virol. 34, 155-163; Fields et al., 1996 Fields Virology, Third Edition, vol.2, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York)。関心のある他の細胞タイプを感染させる能力を与えることも、多分、確認されるであろう。したがって、本発明による狂犬病Gタンパク質を使用すると、*in vitro*でも*in vivo*でも、多種多様の細胞タイプに形質導入するベクターを提供することもできる。*in vivo*および*in vitro*で異なる狂犬病ウイルスの親和性は、狂犬病Gが一連のレセプターに結合できる能力(その一部は*in vitro*のみで活性である)に起因すると考えられる。

20

30

## 【0066】

あるいは、本発明にしたがってシュードタイプされたベクター粒子の親和性は、細胞外ドメイン内で改変される突然変異体狂犬病Gを使用することにより、改変することが可能である。狂犬病Gタンパク質には、標的細胞範囲を制限するように突然変異させることが可能であるという利点がある。*in vivo*での標的細胞による狂犬病ウイルスの取り込みには、アセチルコリンレセプター(AchR)が介在するが、*in vivo*で結合する他のレセプターもある(Hanham et al., 1993 J. Virol., 67, 530-542; Tuffereau et al., 1998 J. Virol., 72, 1085-1091)。狂犬病Gタンパク質の抗原性部位IIIにおける突然変異がウイルス親和性に及ぼす作用について研究が行われており、この領域は、ウイルスのアセチルコリンレセプターへの結合に関与していないと考えられている(Kucera et al., 1985 J. Virol 55, 158-162; Dietzschold et al., 1983 Proc Natl Acad Sci 80, 70-74; Seif et al., 1985 J. Virol., 53, 926-934; Coulon et al., 1998 J. Virol., 72, 273-278; Tuffereau et al., 1998 J. Virol., 72, 1085-10910)。たとえば、

40

50

成熟タンパク質のアミノ酸333におけるアルギニンの、グルタミンへの突然変異を使用して、*in vivo*でのウイルスの嗅覚器官および末梢ニューロンへの侵入を制限すると同時に、中枢神経系への増殖を減少させることができる。これらのウイルスは、wtウイルスと同じぐらい効率よく運動ニューロンおよび感覚ニューロンを透過することができたが、経ニューロン移動は起こらなかった(Coulon et al. 1989 J. Virol. 63 3550-3554)。アミノ酸330が突然変異したウイルスの筋内注射後に、運動ニューロンまたは感覚ニューロンのいずれも感染させることができないところまで、さらに弱毒化する(Coulon et al. 1998 J. Virol. 72 273-278)。

【0067】

代替的に、又は追加の手法として、狂犬病の実験用継代株由来の狂犬病Gタンパク質を使用してもよい。親和性の変化について、これらをスクリーニングすることができる。このような株として、以下のものが挙げられる。

【0068】

【表1】

Genbank 受託番号	狂犬病株
J02293	ERA
U52947	COSRV
U27214	NY 516
U27215	NY771
U27216	FLA125
U52946	SHBRV
M32751	HEP-Flury

【0069】

例として、ERA株は、狂犬病の病原性株であり、ニューロン細胞への形質導入に、この株由来の狂犬病Gタンパク質を使用することができる。ERA株由来の狂犬病Gの配列は、Genbankデータベースに存在する(寄託番号J02293)。このタンパク質は、19アミノ酸のシグナルペプチドを有し、成熟タンパク質は、翻訳開始メチオニンから20アミノ酸のリジン残基で開始する。HEP-Flury株は、低減した病原性と関連し、且つウイルスエンベロープの親和性を制限するのに使用することができる、成熟タンパク質のアミノ酸333位におけるアルギニンからグルタミンまでの突然変異を含む。

【0070】

狂犬病Gタンパク質の一例を配列番号2として示し、そのコード配列を配列番号1として表す。本発明は、これらの配列の変異型、相同物(homologue)または誘導体を含む。

【0071】

本発明の好ましい酵素に関するアミノ酸配列に関連した用語「変異型」、「相同物」または「フラグメント」は、配列からもしくは配列への、1つ(または複数)のアミノ酸の置換、変異、修飾、置き換え、欠失または付加のいずれかを含むが、但し、結果として得られるタンパク質が、Gタンパク質活性および/またはGタンパク質特性またはプロフィールを有し、配列番号2として示したGタンパク質と少なくとも同じぐらい生物学的に活性であることが好ましい。特に、用語「相同物」は、構造および/または機能に関して相同を含む。配列相同に関しては、配列番号2として示した配列と、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%の相同性

10

20

30

40

50

がある。さらに好ましくは、配列番号 2 として示した配列と、少なくとも 95%、さらに好ましくは少なくとも 98% の相同性がある。

【0072】

本発明の好ましい酵素をコードするヌクレオチド配列に関連した用語「変異型」、「相同物」または「フラグメント」は、配列からもしくは配列への、1つ（または複数の）核酸の、置換、変異、修飾、置き換え、欠失または付加を含むが、但し、結果として得られるヌクレオチド配列は、Gタンパク質活性および/またはGタンパク質特性またはプロフィールを有するタンパク質をコードするか、コードすることができ、配列番号1として示した配列によりコードされるGタンパク質と少なくとも同じくらい生物学的に活性であることが好ましい。特に、用語「相同物」は、構造および/または機能に関して相同を含むが、但し、結果として得られるヌクレオチド配列は、Gタンパク質活性および/またはGタンパク質特性またはプロフィールを有するタンパク質をコードするか、コードすることができる。配列の相同性に関しては、配列番号1として示した配列と、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%の相同性がある。さらに好ましくは、配列番号1として示した配列と、少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%の相同性がある。

10

【0073】

特に、本明細書で使用する用語「相同」は、用語「同一性」と等価とみなされる。相対的配列相同（すなわち配列同一性）は、2つ以上の配列間の%相同を算出することができる市販のコンピュータプログラムによって決定することができる。このようなコンピュータプログラムの代表例はCLUSTALである。

20

【0074】

用語「変異型」、「相同物」または「フラグメント」は、配列の対立遺伝子変異と同義である。

【0075】

用語「変異型」は、本明細書に記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる配列に相補的な配列も含む。好ましくは、用語「変異型」は、ストリンジェントな条件（たとえば、65 および 0.1 SSC {  $1 \times SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M$  クエン酸ナトリウム、pH 7.0 }）で、本明細書に記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる配列に相補的な配列を含む。

30

【0076】

本発明は、本発明のヌクレオチド配列（本明細書に記載のものの相補的配列を含む）にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列も含む。好ましい態様では、本発明は、ストリンジェントな条件（たとえば、65 および 0.1 SSC）で、本明細書のヌクレオチド配列（本明細書に記載のものの相補的配列を含む）にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を含む。

【0077】

VSV糖タンパク質と比較して、狂犬病糖タンパク質を使用する主な利点は、狂犬病ワクチンが長く使用されてきたため、ヒトおよび他の動物に対する毒性が詳しくわかっていることである。特に、カナリヤ痘組換えウイルスから発現される狂犬病糖タンパク質のヒトワクチンとしての使用に関する、フェーズI臨床試験が報告され（Fries et al., 1996 Vaccine 14, 428-434）、これらの研究で、このワクチンは、ヒトに使用して安全であると結論づけられた。

40

【0078】

本発明のレトロウイルスベクターは、*in vivo*および*in vitro*で、細胞に1つまたは複数のNOIを送達するのに、特に、治療上有効なNOIを送達するのに有用である。1つまたは複数の選択されたNOIを、標的細胞で発現させるためのベクターゲノムに組み込むことができる。NOIは、1つまたは複数の、それ自身の発現調節配列を有してもよく、その発現をベクターLTRで調節してもよい。NOIを適切に発現するために、LTR内またはLTR間に、ある一定の条件下またはある一定の細胞タイプで、

50

優先的に活性であるプロモーターを含めてもよい。NOIは、センス配列であってもよく、アンチセンス配列であってもよい。さらに、複数のNOIが存在する場合、これらのNOIは、センス配列であってもよく、アンチセンス配列であってもよく、あるいはそれらの組み合わせであってもよい。

【0079】

本発明のレトロウイルスベクターゲノムは、一般に、5'末端および3'末端におけるLTR、治療上有効な遺伝子および/またはマーカー遺伝子を含む1つまたは複数のNOI、または1つまたは複数のNOI(s)を挿入するための適当な挿入部位、およびプロデューサー細胞内のベクター粒子内にゲノムをパッケージできるようにするパッケージングシグナルを含む。ベクターRNAのDNAへの逆転写およびプロウイルスDNAの標的細胞ゲノムへの組み込みを可能にするための、適当なプライマー結合部位および組み込み部位さえ存在する可能性がある。好ましい実施形態では、レトロウイルスベクター粒子は、逆転写システム(適合した逆転写部位およびプライマー結合部位)および組み込みシステム(適合したインテグラーゼおよび組み込み部位)を有する。

10

【0080】

したがって、本発明によれば、ウイルス遺伝子が1つまたは複数のNOIで置き換えられるか、または1つまたは複数のNOIを補足されるように、ウイルスゲノムまたはレトロウイルスベクターヌクレオチド配列を操作することが可能である。NOIは、選択遺伝子、マーカー遺伝子および治療用のいずれか1つまたは複数であってもよい。レトロウイルスベクターに、多くの異なる選択可能なマーカーが申し分なく使用されてきた。これらは、"Retroviruses"(1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: LM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 444)で検討されており、その例として、細菌のネオマイシン遺伝子およびヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(それぞれ、G418およびヒグロマイシンに対する耐性を与える)、突然変異体マウスジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(メトトレキサートに対する耐性を与える)、細菌のgpt遺伝子(マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、キサンチンおよびアミノプテリンを含む培地中で細胞を成長させる)、細菌のhisD遺伝子(ヒスチジンを含まない培地中で細胞を成長させる)、多剤耐性遺伝子(mdr)(様々な薬剤に対する耐性を与える)、およびピューロマイシンまたはフレオマイシンに対する耐性を与える細菌遺伝子が挙げられるが、その限りではない。これらのマーカーは全て、優性遺伝子選択可能であり、且つこれらの遺伝子を発現するほとんどの細胞を化学的に選択することが可能である。

20

30

【0081】

本発明によれば、遺伝子それ自体が治療効果を誘発できてもよく、あるいは、治療効果を誘発することができる生成物をコードしてもよいという意味で、NOIは治療用遺伝子であり得る。

【0082】

治療用NOIの非限定的例としては、腫瘍サプレッサータンパク質、サイトカイン類、抗ウイルスタンパク質、免疫調節分子、抗体、操作されたイムノグロブリン様分子、融合タンパク質、ホルモン類、膜タンパク質、血管作用性タンパク質またはペプチド、成長因子、リボザイム、アンチセンスRNA、酵素、プロドラッグ活性化酵素等のプロドラッグ、細胞障害性薬剤、および酵素阻害剤をコードする遺伝子が挙げられる。

40

【0083】

プロドラッグの例としては、リン酸エトポシド(アルカリホスファターゼと一緒に使用される)、5-フルオロシトシン(シトシンデアミナーゼと一緒に使用される);ドキシソルピシン-N-p-ヒドロキシフェノキシアセトアミド(ペニシリン-V-アミダーゼと一緒に使用される)、パラ-N-ビス(2-クロロエチル)グルタミン酸アミノベンゾイル(カルボキシペプチダーゼG2と一緒に使用される)、セファロスポリンナイトロジェンマスタードカルバメート(B-ラクタマーゼと一緒に使用される)、SR4233(p4

50

50 還元酵素と一緒に使用される)、ガンシクロビル(HSVチミジンキナーゼと一緒に使用される)、ニトロリダクターゼおよびシクロホスファミドまたはイホスファミドを含むマスタードプロドラッグ(チトクローム p 450と一緒に使用される)が挙げられるが、その限りではない。

【0084】

治療することが可能な疾患としては、癌、心疾患、脳卒中、神経変性疾患、関節炎、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、免疫システム疾患、ウイルス感染、腫瘍、血液凝固障害、およびレッシュ-ナイハン症候群、パーキンソン病、膿胸、フェニルケトン尿症、鎌形赤血球貧血、サラセミア、サラセミア、ゴーシュ病等の慢性肉芽腫症遺伝病が挙げられるが、その限りではない。

10

【0085】

レトロウイルスベクターを使用した遺伝子療法用の標的細胞としては、造血細胞(単球、マクロファージ、リンパ球、顆粒球、またはこれらのいずれかの前駆細胞を含む)、内皮細胞、腫瘍細胞、ストロマ細胞、星状細胞、またはグリア細胞、筋細胞、上皮細胞、ニューロン、線維芽細胞、肝細胞、星状細胞、および肺細胞が挙げられるが、その限りではない。

【0086】

本発明のレトロウイルスベクター内で、1つまたは複数のNOIは、ウイルスLTRの転写調節下にあってもよい。あるいは、より高いレベルの発現を実現するために、エンハンサー-プロモーターエレメントの組み合わせが存在してもよい。プロモーター-エンハンサーエレメントは、好ましくは、標的細胞内で、強く活性であるかまたは強力に誘導することができる。強く活性なプロモーター-エンハンサー組み合わせの1例は、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)主要中間初期(MIE)プロモーター/エンハンサー組み合わせである。プロモーター-エンハンサー組み合わせは、それらの活性が組織制限的であってもよく、時間制限的であってもよい。MUM遺伝子またはCEA遺伝子由来のプロモーター-エンハンサー等の、適当な組織制限プロモーター-エンハンサー組み合わせの例は、腫瘍細胞内で極めて活性である。

20

【0087】

低酸素または虚血制御可能な発現も、ある一定の環境で、特に有用な可能性がある。低酸素は、広範囲の異なる細胞タイプで遺伝子発現の強力なレギュレーターであり、様々な遺伝子プロモーター上の低酸素応答エレメント(HRE)である、同族のDNA認識部位に結合する低酸素誘導可能因子-1(HIF-1)等の、低酸素-誘導可能な転写因子の活性の誘導によって作用する(Wang and Semenza 1993 PNAS, (USA) 90:430)。in vitroでは低酸素に应答して、またin vivoでは充実性腫瘍内で、ヒト線維腫細胞によるマーカー遺伝子と治療用遺伝子の両者の発現の調節に、マウスホスホグリセレートキナーゼ-I(PGK-1)遺伝子由来のHREの多重結合型が使用されてきた。(Firth et al 1994, PNAS 9104):6496-6500; Dachs et al 1997 Nature Med. 5:515)。あるいは、腫瘍の虚血領域にグルコース欠乏も存在することを使用して、特に腫瘍における異種遺伝子発現を活性化することができる。グルコース欠乏により特異的に活性化されることが知られているgrp78遺伝子プロモーターの末端を切断した632塩基対配列は、in vivoで、ネズミ腫瘍におけるレポーター遺伝子の高レベル発現を推進できることが証明されている(Gazit et al 1995 Cancer Res. 55:1660)。

30

40

【0088】

次の遺伝子療法に使用するための本発明のレトロウイルスベクターゲノムは、ベクターとして効率よく機能するのに必要な最小限のレトロウイルス物質を含むことが好ましい。この目的は、NOIを組み込むための空間を与えるためと、安全性の理由である。レトロウイルスベクターゲノムは、gag-pol遺伝子およびenv遺伝子によりコードされる構造(またはパッケージング)成分の1つまたは複数にコードする機能遺伝子が欠けてい

50

ることによる複製能欠損であることが好ましい。粒子製作に必要な、欠けている成分は、プロデューサー細胞において、トランスで提供される。ゲノムにウイルス構成成分が欠けていることは、標的細胞で発現されるウイルスタンパク質に対して発生する望ましくない免疫応答が、減少するか回避されることも意味する。さらに、*in vivo*使用を考慮する場合、感染性ウイルス粒子の可能な再建を避けることが好ましい。したがって、組換えの機会を減少させるために、できる限り、ウイルスの構成成分をゲノムから排除することが好ましい。

【0089】

本発明のレトロウイルスベクター粒子は、一般に、適当なプロデューサー細胞で生成される。プロデューサー細胞は、一般に、哺乳類細胞であるが、たとえば昆虫細胞であってもよい。プロデューサー細胞は、通常はそのゲノムに組み込まれる、ウイルス構造遺伝子を含むパッケージング細胞であってもよい。次いで、感染性の複製能欠損ベクター粒子を製作するために、ベクターゲノムをコードする核酸を、パッケージング細胞に形質導入する。あるいはプロデューサー細胞に、ベクターゲノムおよび構成成分をコードする核酸配列、および/またはプラスミド、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターまたは機能的DNAを標的細胞に送達することがわかっているいずれかの方法の1つまたは複数の発現ベクター上に存在する核酸配列を共形質導入する。

【0090】

本発明の好ましい実施形態に従って、筆者らは、狂犬病ウイルス由来のエンベロープタンパク質、すなわち、狂犬病Gタンパク質が、多種多様のレトロウイルスベクターを効率よくシュードタイプできることを予期せず発見した。この中には、MLV等のネズミオンコレトロウイルスから構築されるベクターのみならず、HIV等の霊長類レンチウイルスから構築されるベクターおよび非霊長類レンチウイルス等のウマ感染性貧血ウイルス(EIAV)から構築されるベクターも含まれる。

【0091】

1つの実施形態では、本発明のベクターは、レンチウイルスから構築されるか誘導される。これは、ベクターが非分裂細胞および分裂細胞に形質導入を行うことができる可能性があるという利点を有する。

【0092】

したがって、本発明によるシュードタイピングに好ましいレトロウイルスベクターは、HIVベクターまたはEIAVベクター等のレンチウイルスベクターである。これらには、上記の利点がある。特に、狂犬病ウイルス標的細胞範囲を有する狂犬病Gでシュードタイプされたレンチウイルスベクターは、ニューロン等の、中枢神経系の非分裂細胞に形質導入を行うことができる。

【0093】

本発明の発見は非常に目覚ましい。この点に関して、狂犬病およびVSVは、(5つの異なる下位群を含む非常に大きいファミリーである)が、それら(すなわちVSVおよび狂犬病)は、異なる下位群にある。さらに、狂犬病Gタンパク質は、VSV-Gとの相同性をほとんど持たない(Rose et al., 1982 J. Virol. 43: 361 - 364)。この狂犬病Gタンパク質は、VSV-Gよりもはるかに長い細胞質ドメインも有し、28~31アミノ酸のVSV-G細胞質ドメインに対して約44アミノ酸(長さ)である。したがって、144アミノ酸HIV-1細胞質の尾部の末端切断には、効率よくMLV粒子をシュードタイプする必要があることを考えると(Mammano et al., 1997 J. Virol. 71: 3341 - 3345)、狂犬病Gタンパク質がMLVをシュードタイプできるという発見は予想外である。狂犬病Gタンパク質が、他のレトロウイルス、たとえば、レンチウイルス群のウイルスをさらにシュードタイプできることも意外である。

【0094】

したがって、本発明は、1つの態様において、狂犬病ウイルスGタンパク質でシュードタイプしたレトロウイルスベクター粒子を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0095】

別の態様では、本発明は、狂犬病ウイルスGタンパク質をコードする核酸配列、レトロウイルスベクターゲノムをコードする核酸配列、および任意に、そのゲノムを含む感染性レトロウイルスベクター粒子の製作に必要なパッケージング成分をコードする1つまたは複数のさらなる核酸配列を含む、レトロウイルスベクター製作システムを提供する。

## 【0096】

さらなる態様では、本発明にしたがって、レトロウイルスベクターの標的細胞範囲を変えるために狂犬病ウイルスGタンパク質を使用することができる。

## 【0097】

別の態様では、本発明は、狂犬病ウイルスGタンパク質を含むエンベロープを有するレトロウイルスベクター粒子を製作する方法であって、本明細書に記載の、プロデューサー細胞内のレトロウイルスベクター製作システムを提供することと、上記プロデューサー細胞をベクター粒子成分の発現およびベクター粒子の製作に適した条件に供することと、ベクター粒子を上澄から回収することとを含む方法を提供する。

10

## 【0098】

さらに別の態様では、本発明は、標的細胞にNOIを形質導入する方法であって、本明細書に記載のレトロウイルスベクター粒子と上記細胞を接触させることと、NOIが標的細胞ゲノム内に侵入するように、ベクターが付着し、細胞内に侵入できる条件でNOIを担持することを含む方法を提供する。

## 【0099】

本発明によるベクターのエンベロープ内に存在する狂犬病Gタンパク質に加えて、1つまたは複数の他のエンベロープタンパク質も存在してもよい。この中には、たとえば、レトロウイルスの天然のエンベロープタンパク質も含まれる。シュドタイプタンパク質に加えて天然のエンベロープタンパク質を使用することは、エンベロープの安定性および/または機能に有益な可能性がある。ベクターの感染性プロフィールを広げることさえ可能である。

20

## 【0100】

本発明は、遺伝子療法によって個体を治療するための医薬組成物であって、本発明によるレトロウイルスベクターの治療有効量を含む組成物を提供する。この医薬組成物は、ヒト用または動物用である。一般に、医師が、個々の対象者に最も適当であろう実際の投与量を決定するが、これは、年齢、体重および個々の患者の応答によって様々であろう。

30

## 【0101】

本組成物は、薬学的に許容できる担体、希釈剤、賦形剤、または補助剤を任意に含んでもよい。製剤担体、担体、賦形剤または希釈剤の選択は、所期の投与経路および標準的な製剤実施に関して、選択することができる。この医薬組成物は、担体、賦形剤または希釈剤として、あるいは担体、賦形剤または希釈剤に加えて、適当なバインダー、滑沢剤、懸濁化剤、コーティング剤、可溶化剤、およびウイルスが標的部位に侵入するのを助けるまたは増進することが可能な他の担体剤（たとえば脂質送達システム等）を含んでもよい。

## 【0102】

適当な場合、吸入、坐剤またはペッサリーの形で、ローション、溶液、クリーム、軟膏、または粉剤の形で局所的に、皮膚パッチを使用して、スターチまたはラクトース等の賦形剤を含む錠剤の形で、単独または賦形剤との混合物のいずれかのカプセルもしくは小卵内で、または調味料もしくは着色剤を含むエリキシル、溶液もしくは懸濁液の形で経口的に投与する方法のうち、いずれか1以上の方法によって、本医薬組成物を投与することができる。あるいは、本医薬組成物を、非経口的に、たとえば海綿体内、静脈内、筋内または皮下に注射することができる。非経口投与の場合、溶液を血液と等張にするために、他の物質、たとえば十分な塩類または単糖類を含んでもよい無菌水溶液の形で、本組成物を最もよく使用することができる。頬投与または舌下投与の場合、従来方式で調剤することが可能な錠剤もしくはトローチ剤の形で、本組成物を投与することができる。

40

## 【0103】

50

したがって、要約すると、本発明は、異種エンベロープタンパク質、特に狂犬病ウイルスGタンパク質を有するレトロウイルスベクターに関する。本発明は、狂犬病ウイルスGタンパク質を含むエンベロープを有するレトロウイルスベクターを製作するための、レトロウイルスベクター製作システム、ならびに、ベクターおよびシステムを製作する方法、およびベクターおよびシステムの使用を含む方法にも関する。

#### 【0104】

次に、単なる例として、また下記の図を参照しながら、本発明を説明する。ここで、

図1は、プラスミド地図を表す図であり、

図2は、gelの写真であり、

図3は、一組の略線図であり、

図4は、グラフを表し、

図5は、2つのグラフを表し、

図6は、略線図を表す。

10

#### 【0105】

例1 - 狂犬病Gタンパク質を発現するベクターの製作および使用した他のベクターの詳細。

pSG5rabgp (Burger et al., 1991 J. Gen. Virol. 72: 359-367) 由来の1.7 kbpのBglII狂犬病Gフラグメント(株ERA)を、BamHI消化および再連結によりgpt遺伝子が除去されたpGWLHG誘導体(Soneoka et al. 1995 Nucl. Acids Res. 23: 628-633)であるpSA91(図1)にクローニングすることにより、狂犬病Gに関する発現ベクターを構築した。この構築物pSA91RbGはヒトサイトメガロウイルス(HCMV)即時型初期遺伝子プロモーター-エンハンサーから狂犬病Gを発現させることができる。Soneoka et al. 1995(同書)に記載の方法で、このプラスミドを、pONY3(後述の構築に関する詳細を参照)およびpONY2.1nlslacZ(後述の構築に関する詳細を参照)と一緒に293T細胞に形質導入し、形質導入した細胞における狂犬病Gの発現を、ウエスタンブロッティングによって確認した。狂犬病Gの代わりにHCMVの調節下でVSV-GがpSA91で発現されたVSV-G発現プラスミドを、陰性対象として使用した。形質導入細胞をPBSで洗浄し、用時調製した1mM PMSFを含むRIPA緩衝溶液で溶解し、製造会社の仕様書に従ってBCAタンパク質定量化試薬キット(BCA Inc., USA)を使用して、総タンパク質濃度を決定した。50 μgの細胞溶解物を、10% SDS/PAGEにかけた。このゲルをイモビロン膜(Millipore Inc)上にエレクトロブロットした。狂犬病Gに対するマウスモノクローナル抗体である17D2(1:3000希釈)およびウサギペルオキシダーゼ接合抗マウスIgG(1:1000希釈)(Vector Laboratories, Peterborough, UK)を用いて、ウエスタンブロット分析を実施した。ECLキット(Amersham International, UK)を使用して、化学ルミネセンスによる検出を実施した。pSA91RbGを形質導入した細胞で、狂犬病Gについて報告されたサイズに対応する68 kDバンドが(図2)が識別できる。

20

30

40

#### 【0106】

下記の実施例の全てで、前述の3プラスミドトランスフェクション法(Soneoka et al., 1995、同書)を使用して、シュードタイプされたベクターを製作した。これらの実験で使用したプラスミドは、次の通りであった。pHIT111およびpHIT60は、E. coli lacZマーカー遺伝子およびMLV gag-polを含むMLVベクターを発現する(Soneoka et al., 1995)。pH3ZおよびpGP-RRE3は、対応するHIVベクター成分である(Kim et al., 1998 J. Virol. 72: 811-816)。pONY2.1nlslacZおよびpONY3は、対応するEIAVベクター成分である(英国特許出願第9727135.7号)。EIAVベクターの特徴を含む、これらのベクターの重要な特徴

50

を図 3 に示す。

略語の説明および図 3 に使用したラベルは次の通りである

【 0 1 0 7 】

【表 2】

CMV	ヒトサイトメガロウイルス即時型初期エンハンサー/プロモーター領域	
SV40	シミアンウイルス 40 エンハンサー及び初期プロモーター領域	
LTR	末端反復配列	
R	LTR の反復領域	
U3	LTR の 3 プライムユニーク領域	10
$\Delta$ U3	不完全 U3 配列	
U5	LTR の 5 プライムユニーク領域	
$\psi$	ゲノムパッケージングシグナル	
tat	調節タンパク質	
rev	調節タンパク質	
RRE	rev 応答エレメント	
env	エンベロープタンパク質をコードする遺伝子	
$\Delta$ env	先端の欠如したタンパク質産物を生成するために欠失を含む env 遺伝子	
gag	キャップシドタンパク質をコードする領域	20
$\Delta$ gag	不完全なシリーズのキャップシドタンパク質を生成するために欠失を含む gag 領域	
pol	酵素タンパク質をコードするための領域	
vif	ウイルスの感染性因子	
pA	ポリアデニル化シグナル	
lacZ	$\beta$ ガラクトシダーゼをコードする遺伝子	
neo	ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子	

【 0 1 0 8 】

E I A V ベクターの構築は以下の通りであった。

Payne et al. (1994, J. Gen. Virol. 75:425-9) に記載の感染性プロウイルスのクローン、pSPEIAV19 を出発点として使用した。エンベロープタンパク質をコードするプラスミドの領域から、HindIII フラグメント 5835-6571 を欠失させることにより、プラスミド pSPEIAV H を構築した。PCR で pSPEIAV19 から増幅した E I A V L T R を pBluescript I I K S + (Stratagene) に挿入することにより、ベクターゲノムプラスミドを構築した。次いで、pSPEIAVAH の M l u I / M l u I (216/814) フラグメントを L T R / B l u e s c r i p t プラスミドに挿入して p O N Y 2 を製作した。さらに、p o l (1901/4949) 内の B g l I I / N c o I フラグメントを欠失させ、H C M V I E エンハンサー/プロモーターにより駆動される核局局性  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を、その場所に挿入した。これを、p O N Y 2 . 1 n l s L a c Z と呼んだ。

【 0 1 0 9 】

次いで、gag-pol タンパク質が H C M V I E エンハンサー/プロモーターから発現されるように、p O N Y 2 H 由来の M l u I / M l u I フラグメントを哺乳類発現プラスミド p C I - n e o (Promega) に挿入することにより、gag-pol 遺伝子をコードする E I A V プラスミド (p O N Y 3) を製作した。

【 0 1 1 0 】

【表 3】

30

40

50

Gag-pol 発現ベクター	lacZ 含有ベクター	ウイルスベクタータイプ
pHIT60	pHIT111	MLV
pGP-RRE1	pH3Z	HIV
pONY3	pONY2.1nlsLacZ	EIAV

## 【0111】

例2 - 狂犬病Gタンパク質を用いたレトロウイルスベクターのシュードタイピング  
 前述の3プラスミドトランスフェクション法 (Soneoka et al 1995) を使用して、シュードタイプされたベクターを製作した。最初の実験で、6ウェル組織培養皿のウェル当たり、各10 $\mu$ gのgag-pol発現プラスミドおよびE. coli lacZ遺伝子を発現させることができるレトロウイルスベクターで、10 $\mu$ gのpSA91RbGをコトランスフェクトした。10 $\mu$ gのpRV67 (ヒトサイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサーの調節下でVSV-Gが発現されたVSV-G発現プラスミド) を、pSA91における狂犬病Gの代わりに使用することにより、VSV-Gを用いたシュードタイピングをこれらの実験用の陽性対照として使用した。

10

## 【0112】

ヒト腎細胞系293Tでトランスフェクションを実施し (Soneoka et al. , 1995に記載通り)、ベクターピリオンを製作した。トランスフェクションの36時間後に培養上澄を収穫し、0.45mmポアサイズのフィルター (Millipore) を通過させて濾過した。

20

## 【0113】

in vivoでの狂犬病のニューロン特異性と対照的に、狂犬病ウイルス実験用株は、in vitroで広く様々な細胞系と相互に作用できる (Reagan and Wunner 1985 Arch. Virol. 84:277-282)。狂犬病Gでシュードタイプしたレトロウイルスベクターの標的細胞として使用するために、2つの細胞系BHK21細胞 (ベビーハムスター腎細胞系) およびD17細胞 (イヌ黒色腫細胞系) を評価した。

30

## 【0114】

感染の前日に、ウェル当たり3 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞にて、細胞を6ウェル組織培養プレートにまいた。上述のEIAV、HIV-1およびMLVベクターをシュードタイプするために、293T細胞を適当なプラスミドでトランスフェクトすることによって調製したウイルス上澄を、これらの細胞に加えた。感染用に使用される培養上澄1mlに形質導入する時に、ポリブレン (8 $\mu$ g/ml) を各ウェルに加えた。感染の12時間後、培養上澄を新鮮培地と取り替えた。ウイルスタイトルを測定するために、細胞を洗浄し、感染の48時間後に固定して染色した。

## 【0115】

3レトロウイルスベクター構築物の全てを含むpSA91RbGおよびpRV67を用いてトランスフェクトする場合、D17細胞の $\beta$ -ガラクトシダーゼ陽性コロニーを確認することができた。pSA91RbGまたはpRV67のいずれかが存在しないトランスフェクションでは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ陽性コロニーは皆無であり、形質導入を引き起こすためには、エンベロープが必要なことがわかる。BHK21細胞を用いた感染の場合、MLVシュードタイプの場合に限って $\beta$ -ガラクトシダーゼ陽性コロニーを確認することができたが、EIAVおよびHIV-1シュードタイプでは確認できなかった。このように確認できなかったのは、この細胞タイプにおけるEIAVおよびHIV-1に対する結合後ブロックによる可能性がある。以上の結果から、狂犬病GがEIAV、HIVおよびMLVベクターをシュードタイプできることが証明される。

40

## 【0116】

50

これらのシュードタイプされたベクターについて、ウイルスタイトーを比較することによりシュードタイプの効率を試験した。 - ガラクトシダーゼ陽性コロニー数からウイルスタイトーを推定した(表4)。

【0117】

【表4】

狂犬病Gタンパク質によるレトロウイルスベクターのシュードタイプの相対的効果

ウイルス成分					下記の細胞で評価したときの ml あたりの形質導入粒子数	
					D17	BHK-21
レトロウイルスベクター	対応するプラスミド構築物	Gag-pol 発現プラスミド	Envelope-7 発現プラスミド	得られたシュードタイプされたベクター		
1 EIAV	pONY2.lnlsLacZ	pONY3	pRV67	EIAV-VSVG	8.4 x 10 <sup>4</sup>	<10 <sup>1</sup>
2 EIAV	pONY2.lnlsLacZ	pONY3	pSA91RbG	EIAV-RbG	3.2 x 10 <sup>4</sup>	<10 <sup>1</sup>
3 HIV	pH4Z	pGP-RRE1	pRV67	HIV-VSVG	3.0 x 10 <sup>4</sup>	<10 <sup>1</sup>
4 HIV	pH4Z	pGP-RRE1	pSA91RbG	HIV-RbG	6.4 x 10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>
5 MLV	pHIT111	pHIT60	pRV67	MLV-VSVG	6.3 x 10 <sup>6</sup>	4.8 x 10 <sup>6</sup>
6 MLV	pHIT111	pHIT60	pSA91RbG	MLV-RbG	1.6 x 10 <sup>6</sup>	7.8 x 10 <sup>6</sup>
7 Mock	-	-	-	-	<10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>

【0118】

狂犬病GでシュードタイプしたMLVに関するウイルスタイトーは、試験した両細胞系のVSV-Gシュードタイプで確認されたものに匹敵する(BHK21において、VSV-Gおよび狂犬病Gは、それぞれ、 $4.8 \times 10^6$ および $7.8 \times 10^6$ ; D17細胞において、VSV-Gおよび狂犬病Gは、それぞれ、 $6.3 \times 10^6$ および $1.6 \times 10^6$ )。

【0119】

VSV-Gおよび狂犬病GでシュードタイプしたEIAVおよびHIV-1の場合、D17細胞において、同様の結果が得られた。EIAVの場合、VSV-Gおよび狂犬病Gでシュードタイプしたベクターに関するウイルスタイトーは、それぞれ、 $8.4 \times 10^4$ および $3.2 \times 10^4$ であった。VSV-Gおよび狂犬病Gを用いたシュードタイプの場合、HIV-1では、ウイルスタイトーは、それぞれ、 $3.0 \times 10^4$ および $6.4 \times 10^3$ であった。以上の結果から、狂犬病Gは、3レトロウイルスベクターの全てでシュードタイプする際に、本質的にVSV-Gと同じぐらい効率がよいことがわかる。

【0120】

筆者らの結果から、狂犬病Gタンパク質は、VSV-Gで得られるものに匹敵する非常に高いタイターで、レトロウイルスベクターEIAV、HIV-1およびMLVをシュードタイプできることが証明される。

【 0 1 2 1 】

例 3 - 変化したアミノ酸 3 3 3 を含む狂犬病 G タンパク質の製作および特性決定 重複 P C R を使用して、結果として得られるタンパク質が、3 3 3 位にアルギニンではなくグルタミン酸を有するように、p S A 9 1 R b G における狂犬病糖タンパク質遺伝子のコード配列を操作した。この変化は、狂犬病ウイルスにおいて、弱毒化および変化した細胞親和性をもたらすと報告されている。突然変異誘発に使用したプライマーは、次の通りであった：

正プライマー

5' GATGCTCACTACAAGTCAGTCCAGACTTGAATGAGATCCTCCC<sup>3'</sup>

逆プライマー

5' GGGAGGATCTCATTCCAAGTCTGGACTGACTTGTAGTGAGCATC<sup>3'</sup>

10

【 0 1 2 2 】

操作したフラグメントを、S p h I B g l I I フラグメントとして p S A 9 1 R g に再導入した。結果として得られたプラスミドは p S A 9 1 R M である。このベクターから生成した、操作された狂犬病 G タンパク質を、これが M L V 粒子をシュードタイプできる能力について試験した。S o n e o k a e t a l 1 9 9 5 に記載の通りに、このプラスミドを、p H I T 6 0 および p H I T 1 1 1 と一緒に、2 9 3 T 細胞内にトランスフェクトし、p S A 9 1 R g を陽性対照として使用した。前述の通り、これらのトランスフェクションからの上澄を収穫し、B H K - 2 1 またはネズミ神経芽腫細胞系 C - 1 3 0 0 クローン N A のいずれかに形質導入できる能力によって、2 つのエンベロープが M L V 粒子をシュードタイプできる能力を評価した ( 表 5 ) 。

20

【 0 1 2 3 】

【表 5】

変化したアミノ酸 3 3 3 を含む狂犬病 G タンパク質が M L V 粒子をシュードタイプできる能力の特性決定

30

ウイルス成分					下記の細胞で評価したときの m l あたりの形質導入粒子数	
					BHK21 C-1300	
レトロウイルスベクター	対応するプラスミド構築物	Gag-pol 発現プラスミド	エンベロープ発現プラスミド	得られたシュードタイプされたベクター		
1 MLV	pHIT111	pHIT60	pSA91RbG	MLV-RbG	4.2 x 10 <sup>6</sup>	6.1 x 10 <sup>6</sup>
2 MLV	pHIT111	pHIT60	pSA91RM	MLV-RMG	3.1 x 10 <sup>5</sup>	7.2 x 10 <sup>6</sup>
3 Mock	-	-	-	-	<1	<1

40

【 0 1 2 4 】

B H K - 2 1 細胞 ( 狂犬病ワクチンの生産によく使用される細胞系 ) で得られたタイターは、w t を用いたときより操作された狂犬病 G タンパク質を用いた方が低かったが、C - 1 3 0 0 細胞の場合、2 つのエンベロープで等価のタイターが得られた。以上の結果から、操作されたタンパク質は、M L V 粒子を効率よくシュードタイプできることがわかる。

50

## 【0125】

例4 - 狂犬病Gでシュードタイプされたレトロウイルスベクターのタイターの最適化  
最適ウイルスタイターを決定するために、3 - プラスミドトランスフェクションシステム  
に加えたpSA91RbGDNAの量を、他の2成分に対して滴定した。

## 【0126】

この実験で、CaPO<sub>4</sub>沈殿と、プラスミドpSA91RbG、pHIT111、および  
pHIT60とを使用して、COS-1細胞をトランスフェクトした。後者の2つのプラ  
スミドを等量で使用した(8μg/トランスフェクション/mm組織培養皿)が、pSA  
91RbGの量は、逐次減少させた。トランスフェクションの36時間後にトランスフェ  
クションからの上澄を収穫し、存在する形質導入粒子数を、HT1080細胞で決定した  
。結果を図4に示す。他のプラスミドと比較して、pSA91RbGDNAの量を8倍  
減少させると、最高のタイターをもたらすことがわかった。タイターは、例1で293T  
細胞から得られたものより全般的に低かった。

10

## 【0127】

EIAV-を基にしたベクターの製作に必要な2成分に対するpSA91RbGの滴定も  
実施した。この場合、CaPO<sub>4</sub>沈殿と、gag/polをコードするプラスミド(pO  
NY3)8μgおよび - ガラクトシダーゼをコードするEIAVベクターを発現するプ  
ラスミド(pONY2.1lnlacZ)8μgとを使用して、293T細胞をトランス  
フェクトした。様々な量のpSA91RbGまたはpRV67を上述の通りに加え、それ  
ぞれ、狂犬病GもしくはVSV-Gでシュードタイプしたベクターを得た。トランスフェ  
クションの36時間後に、トランスフェクションからの上澄を収穫し、存在する形質導入  
粒子数を、D17細胞で決定した。結果を図5に示す。他のプラスミドと比較して、pS  
A91RbGDNAの量を2~4倍減少させると、最高のタイターをもたらすことがわ  
かった。pRV67を他の2プラスミドと等量で使用したとき、タイターの有意な低下は  
認められなかった。

20

## 【0128】

以上の結果から、プロデューサー細胞で発現される狂犬病Gおよび他のベクター成分の相  
対量を調整することにより、狂犬病Gでシュードタイプされたレトロウイルスベクターの  
改良されたタイターを得ることが可能である。

## 【0129】

例5 - 狂犬病Gでシュードタイプされたレトロウイルスベクターの濃度  
超遠心分離を使用してウイルス上澄を濃縮することにより、ウイルスタイターを高めるこ  
とができるかどうかをさらに調査し(Burns et al., 1993 PNAS  
90:8033-8037)、超遠心分離で、VSV-GでシュードタイプされたML  
Vを基にしたベクターを含む1ml当たり10<sup>9</sup>形質導入粒子というウイルスタイターが  
得られた。

30

## 【0130】

前述の3プラスミドトランスフェクション法(Soneoka et al., 199  
5)を使用して、狂犬病GまたはVSV-Gでシュードタイプした粒子を製作した。トラ  
ンスフェクションの36時間後に、形質導入粒子を収穫し、超遠心分離で濃縮し、D17  
細胞で滴定した。48時間後、 - ガラクトシダーゼを求めるためにこれらの細胞を染色  
した。3つの独立した実験からタイターを平均し、ml当たりの - ガラクトシダーゼ産  
生単位として計算した。実験間で、10%を超える差はなかった。2つのエンベローブの  
いずれかでシュードタイプしたEIAVもMLV粒子も、かなりの形質導入粒子の損失な  
しに、収穫量を130倍減少することができた(表6)。

40

## 【0131】

## 【表6】

## 狂犬病Gでシュードタイプされたレトロウイルスベクターにおける濃度の影響

ウイルス成分					濃縮前 のタター	濃縮後 のタター	体積減 少 (倍)	タイター 増 加 (倍)	回 収 率 (%)
レトロウ イルスベ クター	対応す る プ ラスミド 構 築物	Gag-pol 発現プ ラスミ ド	イン バー プ 発 現プ ラスミ ド	得られた シュード タイプ プ ラスミ ド ベ クター					
EIAV	pONY2.1n 1s LacZ	pONY3	PRV67	EIAV- VSVG	2.0 x 10 <sup>5</sup>	2.5 x 10 <sup>7</sup>	130	125	96
EIAV	pONY2.1n 1s LacZ	pONY3	pSA91RbG	EIAV- RbG	1.0 x 10 <sup>5</sup>	1.2 x 10 <sup>7</sup>	130	120	96
EIAV	pONY2.1n 1s LacZ	pONY3	Mock		<1	<1	130	N.A.	N.A.
MLV	pHIT111	pHIT60	PRV67	MLV- VSVG	4.0x 10 <sup>5</sup>	4.8 x 10 <sup>7</sup>	130	119	92
MLV	pHIT111	pHIT60	pSA91RbG	MLV- RbG	3.5 x 10 <sup>5</sup>	4.5 x 10 <sup>7</sup>	130	128	98
MLV	pHIT111	pHIT60	Mock		<1	<1	130	N.A.	N.A.

10

20

30

40

## 【0132】

以上の結果から、超速心分離で、狂犬病Gでシュードタイプしたベクターを濃縮でき、ベクタータイターの上昇はVSV-Gで観察されるものに匹敵することがわかる。

## 【0133】

これらの特性は、ニューロン細胞に対する狂犬病Gの*in vivo*特異性と相俟って、狂犬病Gを用いたシュードタイピングを、神経系に治療用遺伝子を運搬するレトロウイルスベクターを容易にターゲティングするための魅力的な計画にしている。

## 【0134】

50

例6 - 狂犬病Gシュードタイプが培養ヒト標的細胞に形質導入できる能力の選択性。  
 狂犬病Gでシュードタイプしたベクター細胞の特異性を、ニューロンおよび非ニューロン起源のヒト細胞系を使用して決定した。VSV-Gを用いたシュードタイピングを陽性対照として使用した。3プラスミドトランスフェクションから調製したウイルス上澄を使用して、IMR-32（ヒト神経芽腫細胞系）およびCEM-A（ヒトT細胞系）を感染させた。 - ガラクトシダーゼ陽性コロニーからウイルスタイターを推定する（表7）。

【0135】

【表7】

狂犬病シュードタイプが培養ヒト標的細胞に形質導入できる能力の選択性

10

ウイルス成分					下記の細胞で評価したときの ml あたりの形質導入粒子数	
					IMR32	CEM-A
ウイルスベクター	対応するプラスミド構築物	Gag-pol 発現プラスミド	インバーター発現プラスミド	得られたシュードタイプされたベクター		
1 MLV	pHIT111	pHIT60	pRV67	MLV-VSVG	4.9 x 10 <sup>3</sup>	7.3 x 10 <sup>2</sup>
2 MLV	pHIT111	pHIT60	pSA91RbG	MLV-RbG	3.1 x 10 <sup>5</sup>	1.7 x 10 <sup>1</sup>
3 Mock	-	-	-	-	0	0

20

【0136】

狂犬病GおよびVSV-GでシュードタイプしたMLVベクターは、IMR-32細胞を感染させることができた。しかし、狂犬病GでシュードタイプしたMLVベクターは、VSV-Gでシュードタイプしたもの（ $4.9 \times 10^3$ ）より100倍高い（ $3.1 \times 10^5$ ）タイターを生じた。CEM-A細胞では、狂犬病GでシュードタイプしたMLVベクターは、 $1.7 \times 10^1$ という低いタイターを示した。このように効率が低かったのは、MLVがこれらの細胞に形質導入できないためではなかった。このことは、VSV-Gでシュードタイプした同ベクターでは、比較的高いタイター（ $7.3 \times 10^2$ ）を示したことによって証明される。

30

【0137】

筆者らの結果から、狂犬病GシュードタイプはVSV-Gと違って、ヒト標的細胞に形質導入できる能力に選択性があり、T-細胞系よりニューロン細胞で、形質導入効率が高いことがわかる。

【0138】

例7 - *in vitro*（一次培養）および*in vivo*（ラット/マウスモデル系）で、狂犬病Gシュードタイプが脳細胞に形質導入できる能力。

40

*in vivo*で、狂犬病ウイルスにより、少なくとも2つの異なるレセプターが使用され（Hanharn et al., 1993 J. Virol. 67:530-542; Tuffereau et al., J. Virol. 72:1085-1091）、これらのレセプターの1つがニコチン性アセチルコリンレセプターであることを示唆する証拠がある。マウスモデル系で、wt狂犬病（CVS株）およびこの株の二重突然変異体（アミノ酸330および333にて変化している）を用いて、感染したニューロン細胞のタイプおよび神経系全体にわたるウイルスの広がりに関する詳細な研究が実施されている（Coulon et al., 1989 J. Virol. 63:3550-3554; Lafay et al., 1991 Virology 183:320-330）。上記研究から、突然変異ウイルスの広がりおよび範囲は、w

50

t に比べて著しく制限されることがわかる。

【0139】

狂犬病Gタンパク質でシュードタイプされたEIAVベクターの親和性を決定するために、以下の分析を開始した。成体メスAORラットを麻酔し、 $2 \times 1 \mu\text{l}$ のウイルスストックを、線条領域または他の脳領域内に定位注入した。注射の後7日または30日に、ラットを麻酔し、4%パラホルムアルデヒドで心臓内灌流した。脳を摘除し、24時間固定後、30%スクロースで飽和し、凍結用低温装置で切断した( $50 \mu\text{m}$ )。X-gal溶液で切片を3時間から一晩染色し、スライドガラスに載せ、光学顕微鏡で分析した。ニューロン(NeuNほか)、星状細胞(GFAP)または希突起神経膠細胞(GalC)および-ガラクトシダーゼに特異的な抗体と種特異的二次抗体とを組み合わせ使用した免疫蛍光法三重標識によって、形質導入された詳細な細胞タイプの同定を行った。共焦点検鏡法を使用して、形質導入された脳領域の画像を分析した。

10

【0140】

*in vitro*形質導入実験用に、一次ニューロンを、ラット胎芽から培養し、完全に分化するまで成長させる。 $4 \mu\text{g/ml}$ のポリブレンを使用して、ウイルスベクターを5時間加える。培地を変え、2日後に、X-gal染色または抗体のいずれかを使用して、発現分析を実施する。

【0141】

例8 - 狂犬病GでシュードタイプされたHIV-1ベクターの濃度、ならびにこのようなベクターを製作するためのVSV-G使用と狂犬病エンベロープ使用との間の比較

20

例5から、狂犬病GでシュードタイプしたEIAVベクターは、VSV-Gでシュードタイプされたベクターで報告されていたものと同じ様式で、超遠心分離によって、効率よく濃縮できることがわかる。狂犬病Gを使用して、HIV-1ベクターをシュードタイプできること、これらの粒子を超遠心分離で効率よく濃縮できること、およびVSV-Gでシュードタイプされたベクターを用いてD17細胞で得られるものと同じタイターを得ることが可能なことを証明するために、これらの観察を拡張した。

【0142】

前述の3プラスミドトランスフェクション法(Soneoka et al., 1995)を使用して、狂犬病GまたはVSV-Gのいずれかでシュードタイプした粒子を製作した。この実験で使用したHIV-1プラスミド、pH4ZおよびpGP-RRE3は、Kim et al. (1998 Journal of Virology 72: 811-816)に記載されている。この実験で使用した成分の比率は、狂犬病Gの場合、1:1:1、gag1pol:ゲノム:エンベロープであり、VSV-Gの場合、1:1:0.5、gag1pol:ゲノム:エンベロープであって、これは、COS-1細胞の場合に使用された比率と異なるが、それは、293T細胞はCOS細胞よりも狂犬病Gタンパク質の発現に抵抗することがわかったためである。トランスフェクションの48時間後に形質導入粒子を収穫し、超遠心分離で濃縮し、D17細胞で滴定した。48時間後、-ガラクトシダーゼを求めるために、これらの細胞を染色した。2つのエンベロープのいずれかでシュードタイプしたHIV-1粒子によって、収穫物のタイターを約100倍高めることができた(表8)。上記エンベロープのいずれかでシュードタイプしたベクターで得られるタイターは、有意に異ならなかった。以上の結果から、狂犬病Gでシュードタイプしたベクターは、超遠心分離で濃縮することができ、ベクタータイターの上昇は、VSV-Gで確認されたものに匹敵し、且つD17細胞で、2つのエンベロープは同様に有効であった。

30

40

【0143】

【表8】

調製品	0.5 ml あたりの LacZ コロニー形成単位			ml 当たりの平均タ イター
狂犬病でシュドタイプ <sup>o</sup> された濃縮前の HIV-1	3.4 x10 <sup>5</sup>	4.1 x10 <sup>5</sup>		7.5 x 10 <sup>6</sup>
狂犬病でシュドタイプ <sup>o</sup> された濃縮後の HIV-1	3.5x10 <sup>8</sup>	3.3 x10 <sup>8</sup>	3.6 x10 <sup>8</sup>	6.9 x 10 <sup>8</sup>
VSV-G でシュドタイプ <sup>o</sup> された濃縮前の HIV-1	3.7x10 <sup>6</sup>	4.0 x10 <sup>6</sup>		7.7 x 10 <sup>6</sup>
VSV-G でシュドタイプ <sup>o</sup> された濃縮後の HIV-1	4.8x10 <sup>8</sup>	4.6x10 <sup>8</sup>	3.9x10 <sup>8</sup>	8.9 x 10 <sup>8</sup>

10

## 【0144】

## 考察および要約

前述の通り、レトロウイルスおよびレトロウイルスから誘導されるベクターは、標的細胞に効率よく形質導入するために、特定のエンベロープタンパク質を必要とする。このエンベロープタンパク質は、ウイルスまたはベクターを産生する細胞で発現され、ウイルスまたはベクター粒子に組み込まれる。レトロウイルス粒子は、ウイルスRNAを包む gag 遺伝子から誘導されるタンパク質コアを含む。次いで、このコアは、ウイルスenv 遺伝子から誘導されるエンベロープタンパク質を含む細胞膜の一部に包まれる。このエンベロープタンパク質は、前駆体として産生され、2つまたは3つの単位に処理される。それらは、エンベロープの完全に外側にある表面タンパク質(SU)、SUと相互に作用し、且つ膜貫通領域および細胞質尾部を含む貫膜タンパク質(TM)である(Coffin 1992 In The Retroviridae, Pleum Press, ed Levy)。一部のレトロウイルスでは、小ペプチドがTMから除去される。標的細胞表面に結合してウイルスの侵入を仲介できる有効なエンベロープタンパク質の役割を果たすためには、生産的感染を起こさせるために、エンベロープタンパク質は、結果として細胞の正確な区画にゲノムを送達するのに適当な方式でウイルス粒子のインターナリゼーションを招来するような方法で、標的細胞上の適切なレセプターと的確に相互に作用しなければならない。

20

30

## 【0145】

1つのウイルス由来のエンベロープを、異なるウイルスのパッケージングに使用する多くの試みがなされ、これがシュドタイピングとして知られている。シュドタイピングの効率は非常に変わりやすく、また、エンベロープの細胞質尾部とウイルス粒子のコアタンパク質との間の相互作用により強く影響されるようである。エンベロープタンパク質が出芽ピリオン内に召集されるプロセスは十分に理解されていないが、ほとんどのT細胞タンパク質がレトロウイルス粒子排除されるため、プロセスは選択的であることが判明しており(Hunter 1994 Semin. Virol. 5:71-83)、エンベロープタンパク質が存在しない条件下で、出芽が起こり得ることが、一部のレトロウイルスで記録されている(Einfeld 1996 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 214:133-176; Krdusslich および Welker 1996 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 214:25-63)。エンベロープタンパク質の細胞質メインと、一部のレトロウイルス内のウイルスコアとの間の的確な分子相互作用に関する証拠がある。Januszeki et al(1997 J. Virol. 71:3613-3619)は、ネズミ白血病ウイルス(MLV)エンベロープタンパク質の細胞質尾部における小

40

50

さい欠失または置換は、エンベロープタンパク質のウイルス粒子への組み込みを強く阻害することを証明した。HIV-1の場合、Cosson(1996 EMBO J. 15:5783-5788)は、HIV-1の基質タンパク質とそのエンベロープタンパク質の細胞質ドメインとの間の直接相互作用を証明した。基質とエンベロープタンパク質との間のこの相互作用は、エンベロープタンパク質の出芽HIV-1ピリオンへの取りこみにおいて、重要な役割を果たす。このことは、ヒスナウイルスgagポリタンパク質の基質ドメインのアミノ末端が等価のHIV-1基質ドメインで置き換えられた場合に、ヒスナウイルスをHIV-1envで効率よくシュードタイプできるにすぎないことによって証明される(Dorfman et al., 1994 J. Virol. 68:1689-1696)。しかし、モロニーネズミ白血病ウイルスを効率よくシュードタイプするにはHIV-1envの切頭が必要である(Mammano et al., 1997 J. Virol. 71:3341-3345)が、ヒト泡沫ウイルスエンベロープタンパク質を末端を切断すると、ネズミ白血病ウイルスをシュードタイプすることができる能力が低下する(Lindemann et al., 1997 J. Virol. 71:4815-4820)ため、状況は複雑である。レトロウイルスのコアとそのエンベロープタンパク質の細胞質尾部との間の相互作用には、環境成分もある。一部の細胞系においてEIAVを長期継代すると糖タンパク質の末端が切断されうため、エンベロープタンパク質のC末端ドメインに基づいて、ウイルスに適した宿主細胞因子を選択できることが示唆される(Rice et al., 1990 J. Virol. 1990 64:3770-3778)。

10

20

## 【0146】

以上の研究および多くの他の研究者の研究から、近縁関係にあるレトロウイルスでさえも互いにシュードタイプできる可能性があることをなことがわかる。さらに、所与のエンベロープが特定のウイルスシュードタイプできない場合、シュードタイプできる能力を与えるであろう分子の変化を予測することは不可能である。シュードタイプは幾らかの成功をおさめたが、ウイルス成分と異種エンベロープタンパク質との間の適合性の必要性によって明らかに制約を受ける。

## 【0147】

細胞タイプの拡大された範囲または変化した範囲への遺伝物質の送達を可能にするために、レトロウイルスベクターを構築する際に、天然のウイルスに対して異なる標的細胞特異性を有するベクターを操作することが望ましい。これを実現する1つの方式は、ウイルスエンベロープタンパク質を操作してその特異性を変えることによる。別のアプローチは、異種エンベロープタンパク質をベクターに導入して、ウイルスの天然のエンベロープタンパク質に補充する、すなわち加えることである。

30

## 【0148】

MLVエンベロープタンパク質は、様々な異なるレトロウイルスをシュードタイプすることができる。両種性ウイルス由来のMLVエンベロープタンパク質を使用すると、ヒト細胞を含む広範囲の細胞タイプに形質導入することが可能になる。しかし、多数の細胞タイプを感染させるレトロウイルスベクターを有することが常に望ましいとは限らない。

## 【0149】

水泡性口内炎ウイルス(VSV)(ラブドウイルス)のエンベロープ糖タンパク質(G)は、ある一定のレトロウイルスをシュードタイプできることが証明されている別のエンベロープタンパク質である。レトロウイルスMLVは首尾よくシュードタイプし(Burns et al. 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-7)、結果として、天然型のMLVに比べて変化した宿主範囲を有するベクターを生じた。VSV-Gシュードタイプされたベクターは、哺乳類細胞のみならず、魚、爬虫類および昆虫由来の細胞系も感染させることが証明されている(Burns et al. 1993)。その細胞質尾部はレトロウイルスのコアと相互に作用することができるため、VSV-Gタンパク質を使用して、ある一定のレトロウイルスシュードタイプすることができる。VSV-GおよびMLVエンベロープタンパク質は、両者と

40

50

もに短い細胞質尾部（それぞれ、28～31アミノ酸および32アミノ酸）を有しており、したがって、よく似た長さである。

【0150】

非レトロウイルスのシュードタイピングエンベロップ、たとえば、VSV-Gタンパク質を提供することにより、感染性を失わずに高タイターまで、ベクター粒子を濃縮できるという利点が得られる（Akkina et al 1996 J. Virol. 70: 2581-5）。レトロウイルスエンベロップタンパク質は、明らかに、超遠心分離中の剪断力に耐えることができないが、それは、このタンパク質が2つの非共有結合サブユニットからなるためであろう。サブユニット間の相互作用は、遠心分離により破壊される。比較すると、VSV糖タンパク質は、ただ1つの単位を含む。

10

【0151】

したがって、VSV-Gタンパク質シュードタイピングは、潜在的な利点を提供する。しかし、VSV-Gタンパク質を使用して実現されるもの以外の標的細胞特異性も望ましい可能性がある。タンパク質内に標的部位を操作することにより、VSV-Gの標的細胞範囲を変えようという試みがなされた。1997年の治療用遺伝子送達のためのベクターターゲティング方法に関する会議（Cold Spring Harbor, USA）で報告されたこれらの試み（Chen et al.）は、成功しなかった。したがって、レトロウイルスベクター標的細胞範囲を変える他の方法が必要である。

【0152】

他のラブドウイルスエンベロップでレトロウイルスを効率よくシュードタイプするための試みが幾つかのなされた。1997年の治療用遺伝子送達のためのベクターターゲティング方法に関する会議（Cold Spring Harbor, USA）での1つのレポート（Reiser et al.）で、狂犬病ウイルスおよびモコラウイルスの糖タンパク質は、HIV-1粒子をシュードタイプすることができたが、「得られたタイターは、VSV-Gタンパク質を用いて得られるものよりはるかに低い」と報告された。

20

【0153】

本発明は、狂犬病タンパク質、特に狂犬病Gタンパク質でシュードタイプされたレトロウイルス送達システムを提供することによって、上記の問題を克服しようとするものである。

【0154】

上記明細書に記載の全ての出版物を、参照により本明細書に援用する。説明した本発明の方法およびシステムの様々な修飾および変更は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者に明らかになるであろう。本発明を具体的な好ましい実施形態と一緒に説明してきたが、請求の範囲に記載されている本発明が、そのような具体的な実施形態に不当に制限されると考えてはならない。それどころか、分子生物学または関連分野における熟練者に明白な、本発明を実施するための、記載された形態の様々な修飾は、特許請求の範囲内と解釈される。

30

## SEQUENCE LISTING

<110> Oxford Biomedica (UK) Limited

<120> Delivery System

<130> 12-515

<140> PCT/GB99/01607

<141> 1998-07-17

10

<150> GB 9811153.7

<151> 1998-05-22

<150> US 60/093,149

<151> 1998-07-17

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

20

<210> 1

<211> 1650

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: nucleotide  
sequence

<400> 1

aggaaagatg gtctctcagg ctctctctgtt tgiacccctt cgggtttttc catttggttt 60  
 tgggaaattc cctatttaca cgatactaga caagcttggg cccitggagcc cgattgacat 120  
 acatcaccct agctgcccaa acaatttggg agtggaggac gaaggatgca ccaacctgtc 180  
 agggttctcc tacatggaac ttaaagtggg atacatctta gccataaaaa tgaacgggtt 240  
 cacttgcaca ggcgttgtga cggaggctga aacctacact aacttcgttg gttatgtcac 300  
 aaccacgttc aaaagaaagc atttccgcc aacaccagat gcatgtagag ccgcttaca 360  
 ctggaaagat gccgggtgacc ccagatatga agagtcctta cacaatccgt accctgacta 420  
 ccgttggctt cgaactgtaa aaaccaccaa ggagtcctc gttatcatat ctccaagtgt 480  
 agcagatttg gaccataatg acagatccct tcaactcagg gtcttcccta gcgggaagtg 540  
 ctccaggagta gcgggtgtct ctacctactg ctccactaac cagattaca ccatttggat 600  
 gcccgagaat ccgagactag ggtatgtctt tgacatcttt accaatagta gaggggaagag 660  
 agcatccaaa gggagtgaga ctctggctt tgtagatgaa agaggcctat ataagcttt 720  
 aaaaggagca tgcaactca agttatgttg agttctagga cttagactta tggatggaac 780  
 atgggtcgcg atgcaaacat caaatgaaac caaatgggtc cctcccgatc agtttggtaa 840  
 cctgcacgac tttcgtcag acgaaatga gcacctgtt gtagaggagi tggtcaggaa 900  
 gagagaggag tgtctggatg cactagagtc catcatgaca accaagtcag tgagtticag 960  
 acgtctcagt catttaagaa aacttctccc tgggtttgga aaagcatata ccatattcaa 1020  
 caagaccttg atggaagccg atgtcacta caagtcagtc agaacttggg atgagatcct 1080  
 cccitcaaaa ggggttttaa gaggttgggg gagggtctat cctcatgtga accgggtgtt 1140  
 ttcaatggt ataatattag gacctgacgg caatgtctta atcccagaga tgcaatcctc 1200  
 cctctccag caacatatgg agttgttggg atcctcgggt atcccccttg tgcacccct 1260  
 ggcagaccgg tctaccgttt tcaaggacgg tgacgaggct gaggattttg ttgaagtcca 1320  
 ccttcccgat gtgcacaatc aggtctcagg agttgacttg ggtctcccga actgggggaa 1380  
 gtatgtatta ctgagtgacg gggccctgac tgcttgaatg ttgataattt tctgtatgac 1440  
 atgtttaga agagtcaatc gatcagaacc tacgcaacac aatctcagag ggacagggag 1500  
 ggagggttca gtcactcccc aaagcgggaa gatcatatct tcatgggaat cacacaagag 1560  
 tgggggtgag accagactgt gaggactggc cgtctttca acgatccaag tcttgaagat 1620

10

20

cacctccct tgggggttc tttttaaaaa

1650

<210> 2

<211> 524

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: amino acid sequence

10

<400> 2

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu

1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Leu Asp Lys Leu Gly Pro

20 25 30

Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys Pro Asn Asn Leu Val

35 40 45

20

Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly Phe Ser Tyr Met Glu

50 55 60

Leu Lys Val Gly Tyr Ile Leu Ala Ile Lys Met Asn Gly Phe Thr Cys

65 70 75 80

Thr Gly Val Val Thr Glu Ala Glu Thr Tyr Thr Asn Phe Val Gly Tyr

85 90 95

Val Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg Pro Thr Pro Asp Ala  
 100 105 110

Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys Met Ala Gly Asp Pro Arg Tyr Glu  
 115 120 125

Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr Arg Trp Leu Arg Thr Val  
 130 135 140

Lys Thr Thr Lys Glu Ser Leu Val Ile Ile Ser Pro Ser Val Ala Asp  
 145 150 155 160

Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His Ser Arg Val Phe Pro Ser Gly  
 165 170 175

Lys Cys Ser Gly Val Ala Val Ser Ser Thr Tyr Cys Ser Thr Asn His  
 180 185 190

Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg Leu Gly Met Ser Cys  
 195 200 205

Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Lys Gly Ser Glu  
 210 215 220

Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu Tyr Lys Ser Leu Lys Gly  
 225 230 235 240

Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly Leu Arg Leu Met Asp

10

20



Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val Ile Pro Leu Val His  
 405 410 415

Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Lys Asp Gly Asp Glu Ala Glu  
 420 425 430

Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His Asn Gln Val Ser Gly  
 435 440 445

Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr Val Leu Leu Ser Ala  
 450 455 460

10

Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys  
 465 470 475 480

Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr  
 485 490 495

Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser  
 500 505 510

20

Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu  
 515 520

- <210> 3
- <211> 44
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

30

- <220>
- <223> Description of Artificial Sequence: synthetic oligonucleotide

<400> 3  
 gatgctcact acaagtcagt ccgacttgg aatgagatcc tccc 44

- <210> 4
- <211> 44
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

40

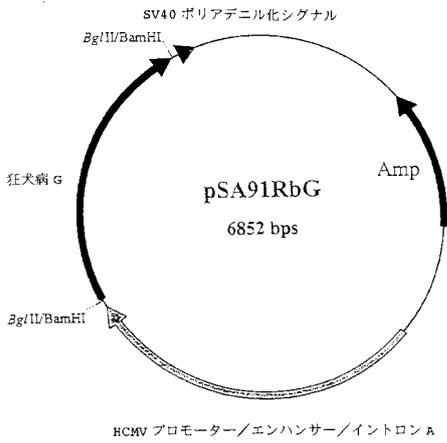
- <220>
- <223> Description of Artificial Sequence: synthetic oligonucleotide

<400> 4  
 gggaggatct cattccaagt ctggactgac ttgtagtgag catc 44

【 図 1 】

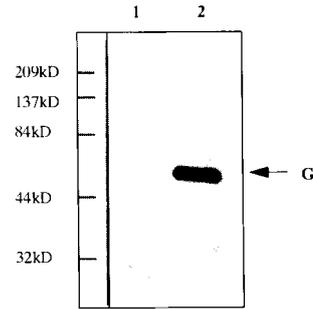
Figure 1

pSA91 の BamHI 部位にクローニングされた狂犬病 G タンパク質をコードする BglII フラグメントを示す pSA91RbG の地図



【 図 2 】

Figure 2 西スタンプ\*ロテイング\*で確認された 293T 細胞中のウサギ G タンパク質の発現



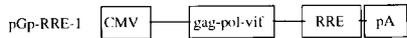
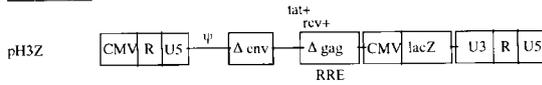
狂犬病 G タンパク質が、マウス抗ウサギ G モノクローナル抗体(1702) を使用して検出された

- レーン 1. pRV67, pONY2, 1nlslacZ 及び pONY3 でトランスフェクトされた細胞からの細胞質抽出物
- レーン 2. pSA91RbG, pONY2, 1nlslacZ 及び pONY3 でトランスフェクトされた細胞からの細胞質抽出物

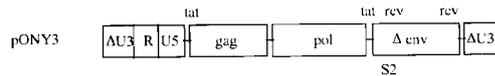
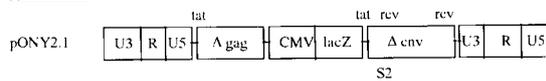
【 図 3 】

Figure 3 シュードタイプ実験で使用されたベクターの説明

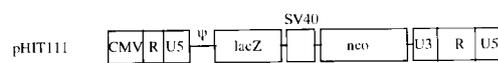
HIV-1 ベクター



EIAV ベクター

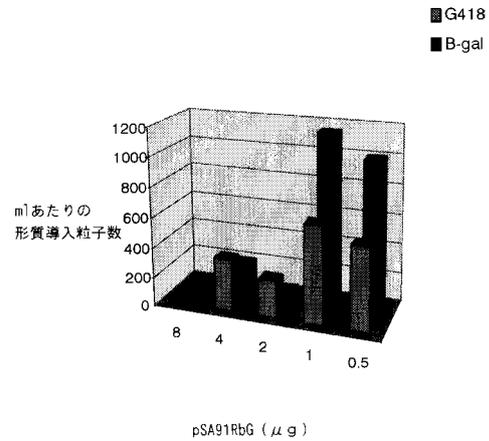


MLV ベクター



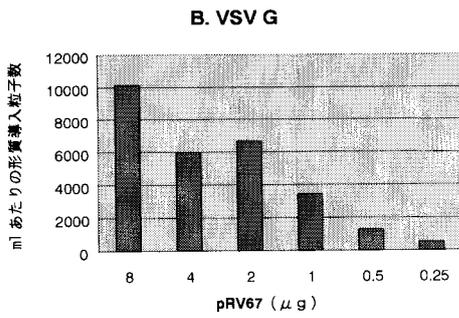
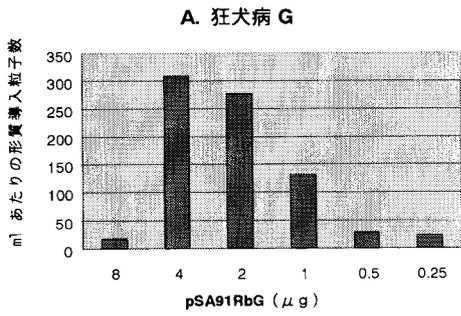
【 図 4 】

Figure 4 pSA91RbGの使用量を減少させることによる 狂犬病 G タンパク質でシュードタイプされた MLV 粒子の収量の最適化



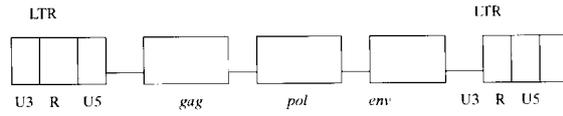
【 図 5 】

Figure 5 シュードタイプされた EIAV 粒子を製造するのに使用されるエンベロープの相対量減少量が滴定結果に及ぼす影響の比較



【 図 6 】

Figure 6



## フロントページの続き

- (72)発明者 ミトラファノス, キリヤコス・アンドレオ  
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、ジ・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・アヴェニュー、メダワー・センター、オックスフォード・バ  
イオメディカ・(ユーケイ・)リミテッド
- (72)発明者 パティル, デヴァ  
イギリス国、オーエックス1 3キューユー オックスフォード、サウス・パークス・ロード、ユ  
ニヴァーシティ・オヴ・オックスフォード、デパートメント・オヴ・バイオケミストリー
- (72)発明者 キングズマン, アラン・ジョン  
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、ジ・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・アヴェニュー、メダワー・センター、オックスフォード・バ  
イオメディカ・(ユーケイ・)リミテッド
- (72)発明者 キングズマン, スーザン・メアリ  
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、ジ・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・アヴェニュー、メダワー・センター、オックスフォード・バ  
イオメディカ・(ユーケイ・)リミテッド
- (72)発明者 エラード, フィオナ・マーガレット  
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、ジ・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・アヴェニュー、メダワー・センター、オックスフォード・バ  
イオメディカ・(ユーケイ・)リミテッド

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第98/005759(WO, A1)  
特表平09-509060(JP, A)  
REISER, J. et al., High-titer pseudotyped HIV-1 vectors, Abstracts of papers presented  
at the 1997 Meeting on Vector Targeting Strategies for Therapeutic Gene Delivery, Mar  
ch 14-March 16, 1997, 1997年, p.19  
J. Virol., 1998年 1月, Vol.72, No.1, p.273-278  
J. Virol., 1998年11月, Vol.72, No.11, p.8873-8883

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/867  
C12N 7/01  
A61K 48/00  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)