

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4992032号
(P4992032)

(45) 発行日 平成24年8月8日(2012.8.8)

(24) 登録日 平成24年5月18日(2012.5.18)

(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
A 6 1 K	35/76 (2006.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00

請求項の数 6 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-533613 (P2004-533613)
 (86) (22) 出願日 平成15年9月2日(2003.9.2)
 (65) 公表番号 特表2005-537021 (P2005-537021A)
 (43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/003791
 (87) 国際公開番号 W02004/022761
 (87) 国際公開日 平成16年3月18日(2004.3.18)
 審査請求日 平成18年7月5日(2006.7.5)
 (31) 優先権主張番号 0220467.5
 (32) 優先日 平成14年9月3日(2002.9.3)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 60/417,673
 (32) 優先日 平成14年10月9日(2002.10.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 306034996
 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
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レトロウイルスベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞をレトロウイルスベクターに感染させることを含む、安定発現細胞株を作製するための方法であって、

前記レトロウイルスベクターは、細胞を感染させることが可能であり、かつ5'LTR又はその一部と3'LTR又はその一部との間にレンチウイルスの転写単位を含み、

前記レンチウイルスの転写単位は、レンチウイルスのGag-Pol及び/又はVSV-Gエンベロープタンパク質をコードする塩基配列を含み、

前記レトロウイルスベクター及び前記レンチウイルスの転写単位は、異なるウイルスに由来し、かつ

前記安定発現細胞株は、少なくとも3ヶ月の間、連続的にレンチウイルスのGag-Pol及び/又はVSV-Gエンベロープタンパク質を安定に産生する、上記方法。

【請求項2】

前記レンチウイルスの転写単位がレンチウイルスのgag及びpolを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記レトロウイルスベクターがMLVに由来する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記レンチウイルスの転写単位がHIVまたはEIAVに由来する、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

10

20

【請求項5】

前記レトロウイルスベクターは、組み込まれたプロウイルスの形態である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

レンチウイルスのGag-Pol及び/又はVSV-Gエンベロープタンパク質を産生する方法であって、

請求項1から5のいずれか1項に定義されるレトロウイルスベクターを用いて細胞を感染させること、及び

レンチウイルスのGag-Pol及び/又はVSV-Gエンベロープタンパク質を産生すること、を含む上記方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はレトロウイルスベクターに関し、特に、細胞に対して潜在的に有害である組み換えRNAまたはタンパク質を産生する細胞を作製するための新規の系に関するがそれに限定されない。本発明はまた、それ自身が、目的のヌクレオチド配列（以後「NOI」と略する）-または複数のNOIさえも-を目的の部位へ配送する能力があるレトロウイルス粒子を発現することができるレトロウイルスベクターに関する。より具体的には、本発明は遺伝子治療において有用であるベクター、安定な細胞株、および方法に関する。

【0002】

20

遺伝子治療は、たとえば、標的細胞といった1つ以上の標的部位における、1つ以上のヌクレオチド配列の付加、置換、欠失、補足、操作、など：のうち任意の1つ以上を含む。標的部位が標的細胞である場合は、その細胞は組織または器官の一部でありうる。遺伝子治療に関する一般的教示は、『分子生物学』（Molecular Biology）（ロバート・マイヤーズ（Robert Meyers）編、VCH出版社、たとえば556～558ページ）に見出すことができる。

【0003】

別の例として、遺伝子治療はまた、たとえば遺伝子といったヌクレオチド配列を適用して欠陥遺伝子を置換または補足することができる；病因遺伝子または遺伝子産物を除去できる；たとえば、より好ましい表現型を作製するために、新しい遺伝子を加えることができる；細胞を分子レベルで操作して、がん（シュミット-ウルフおよびシュミット-ウルフ（Schmidt-Wolf and Schmidt-Wolf）、1994, *Annals of Hematology* 69；273-279）または他の症状-たとえば免疫疾患、心血管疾患、神経疾患、炎症性疾患または感染症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反応を導くことができる-たとえば遺伝子ワクチン接種：のうち任意の1つ以上のための手段を提供する。

30

【0004】

近年、レトロウイルスが遺伝子治療における用途に提案されている。本質的に、レトロウイルスは溶菌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。この点では、レトロウイルスが細胞を感染させる時、そのゲノムはDNA型に変換される。言い換えると、レトロウイルスはDNA中間体を介して複製する感染体である。レトロウイルス感染などに関するさらなる詳細は後掲する。

40

【0005】

上述の通り、レトロウイルスは、特にNOIまたは複数のNOIの1つ以上の目的部位への導入のための配送系（配送媒体または配送ベクターともいう）として提案されている。導入は*in vitro*、*ex vivo*、*in vivo*、またはその組み合わせで起こりうる。このような形で用いられる場合、レトロウイルスは典型的にはレトロウイルスベクターまたは組み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、受容体の使用法、逆転写およびRNAパッケージングを含む、レトロウイルス生活環のさまざまな面を研究するのに利用されてきている（ミラー（Miller）による総説、

50

1992 Curr Top Microbiol Immunol 158; 1-24)。

【0006】

遺伝子治療における使用のための典型的な組み換えレトロウイルスベクターでは、少なくとも gag、pol および env タンパク質コード領域の1つ以上の部分をウイルスから除去することができる。これによってレトロウイルスベクターは複製能を欠くようになる。自分のゲノムを宿主ゲノムへ組み込むことができるが、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することができないウイルスを作製するために、除去された部分を NOI で置き換えることさえ可能である。宿主ゲノムに組み込まれた場合、NOI の発現が起こり、結果としてたとえば治療効果を生じる。このように、NOI の目的部位への導入は典型的には；NOI を組み換えウイルスベクターへ組み込むこと；

10

【0007】

パッケージングまたはヘルパー細胞株と組み換えベクターの組み合わせを用いることによって、たとえば、目的部位のその後の導入のためのレトロウイルスベクター（たとえば適当な力価のレトロウイルスベクターを調製するため）を増殖および単離することが可能である。

【0008】

一部の場合には、増殖および単離は、「パッケージング細胞株」を作製するための、レトロウイルス gag、pol および env 遺伝子の単離と宿主細胞へのそれらの別々の導入を含みうる。パッケージング細胞株は、レトロウイルス RNA をパッケージングするのに必要なタンパク質を産生する。しかし、NOI および psi 領域を有する組み換えベクターがパッケージング細胞株へ導入される場合、そのヘルパータンパク質は psi - 陽性組み換えベクターをパッケージングして組み換えウイルスストックを生じることができる。これは一般に「ウイルス産生細胞」として知られる。ベクターは細胞を感染させて NOI を細胞のゲノム中へ導入するために用いることができる。ゲノムがウイルスタンパク質を作るために必要なすべての遺伝子を欠く組み換えウイルスは、1回しか感染することができず、また増殖することはできない。したがって、NOI は潜在的に有害なレトロウイルスを生じることなく宿主細胞ゲノムへ導入される。入手可能なパッケージング株の概要は『レトロウイルス』(Retroviruses) (1997、コールド・スプリング

20

30

【0009】

レトロウイルスパッケージング細胞株の設計は、初期の設計でしばしば見られた、ヘルパーウイルスの自発産生の問題に対処するように進化してきている。組み換えはホモロジーによって大幅に促進されるため、ベクターと gag/pol との間のホモロジーを減少または消失させることがヘルパーウイルス産生の問題を減少させている。

【0010】

より近年には、gag/pol および env ウイルスコード領域とウイルスベクターが、パッケージング細胞株へ独立してトランスフェクションされる別々の発現プラスミド上に存在し、そのため野生型ウイルス産生には3回の組み換え現象が必要であるパッケージング細胞が開発されている。

40

【0011】

一過性トランスフェクションを用いてベクターを作製することができる。これに関しては、ベクターまたはレトロウイルスパッケージング成分が細胞に対して毒性である場合に、一過性トランスフェクションが用いられている。レトロウイルスベクターを作製するために典型的に用いられる成分は、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。ベクター産生は、これらの成分のうち1つ以上の、その他の必要な成分を含む細胞への一過性ト

50

ランスフェクションを含む。ベクターが毒性遺伝子または、細胞周期の阻害因子といった宿主細胞の複製に干渉する遺伝子、またはアポトーシスを誘導する遺伝子をコードする場合は、安定なベクター産生細胞株を作製するのは難しいことが証明されており、したがって細胞が死ぬ前にベクターを産生するのに一過性トランスフェクションを用いることができる。しかし、前述の技術は、力価レベルが必ずしも十分とは限らないこと、大バッチのウイルスを作製するのが困難であること、および個々の小バッチについて安全性試験を実施しなければならないという意味で問題になりうる。

【0012】

一部のHIVタンパク質、たとえばHIVプロテアーゼ(6)(安定なHIV基礎のパッケージング細胞を作製するのを困難にする可能性がある)の毒性の観点から、HIVベクターは通常は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って作製される。一部の研究者は、HIVのEnvタンパク質を水疱性口内炎ウイルス(VSV)のものと交換さえしている。しかし、この手法に伴う不利益は、VSV-Gタンパク質が細胞に対して非常に毒性が高いことである。

【0013】

したがって、かつ示した通り、レトロウイルスベクターは生物医学研究においてまた遺伝子治療のために広範囲に用いられている。レトロウイルスベクターの産生のための現行の手法は、野生型レトロウイルスゲノムの二つの役割、すなわちタンパク質コードおよび新しいゲノムコピーのテンプレートとしての役割は、分離することができるという事実を利用する(たとえばセネオカ(Soneoka)他1995 Nucl. Acids Res. 23, 628およびその参考文献)。新しいウイルス粒子の組立のために、および酵素および調節機能のために必要なタンパク質は、たとえば、哺乳類パッケージング細胞株中の非ゲノム配列によって産生することができる(たとえばミラー(Miller)1990 Hum. Gene Therapy 1, 5)。結果として生じるレトロウイルスベクター粒子が感染能力を持つが標的細胞中で複製する能力は無いように、タンパク質コード機能を欠くゲノム配列が提供される。ゲノム配列はまた、治療遺伝子の配送および組み込みのために設計することができる(バイル(Vile)およびラッセル(Russell)1995 Brit. Med. Bull 51, 12)。マウス白血病ウイルス(MLV)基礎のベクターを産生するための標準的方法は、たとえば、MLVのgag-polおよびenv遺伝子(パッケージング成分)を発現する安定に操作された細胞株の使用を含む。これらは適当なプラスミドを用いてトランスフェクションによって導入された適合するレトロウイルスベクターゲノムをパッケージングする。HIV基礎のベクターを産生するための代替的方法は、たとえば、適当な細胞へのgag-pol、env、およびベクターゲノムプラスミドの同時の一過性トランスフェクションを含む。

【0014】

これらの系の原理はよく理解されているが、実際には再構成されたウイルス組立系はしばしば、遺伝子治療における用途のために実際に必要なベクター粒子の量を産生することができない。レトロウイルスベクター粒子は一般的に、粒子産生細胞の培養から上清を取ることによって採集される。結果として得られる懸濁液は、物理的方法を用いてベクター粒子に関して濃縮することができるが、しかし凝集または損傷といった問題が生じがちであるため限られた程度までである。したがって、ベクター粒子の懸濁液を最大100倍まで濃縮することができるだけである。

【0015】

発現されている宿主細胞に対して潜在的に有害な組み換えタンパク質を産生することを試みる場合、同じ問題が生じる。考えられている1つの手法は、誘導系を用いることである;しかし、これは毒性の基本的問題を克服せず、誘導産生は一過性でしかなく、また「リーキー(leaky)」プロモーターから問題が生じている。

【0016】

1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)を基礎とするベクターは、分裂および非分裂の両方の幅広い細胞型への治療導入遺伝子の配送のための方法を提供する。HIV-1を

10

20

30

40

50

基礎とするベクターは、一過性に²⁰またはベクター産生が誘導されるパッケージング細胞株を用いて⁷⁻⁹のどちらかで一般に産生されている。大量のH I V - 1 G a g - P o lを安定に発現するのが困難であったため、近年まで、高力価のH I V - 1ベクターを連続的に産生する安定なパッケージング細胞は入手できなかった。さらに、H I V - 1自身のエンベロープタンパク質および'偽型'H I V - 1ベクター粒子を置換するのに最も広く用いられている、ラブドウイルスである水疱性口内炎ウイルスGタンパク質(V S V - G)を連続的に産生するのは困難であることもまた証明されている^{20, 21, 11, 12}。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明は医学分野においてその後有用でありうるウイルス粒子を調製するための改良された系を提供することを目指す。

【0018】

特に、本発明は、医学分野においてその後有用でありうる組み換えタンパク質および/またはウイルス粒子の連続的供給を調製するための改良された系を提供することを目指す。

【0019】

本発明はまた、医学分野においてその後有用でありうる高力価の組み換えタンパク質および/またはウイルス粒子を調製するための改良された系を提供することを目指す。

【0020】

我々は、安定な、構成的パッケージングを開発した。この系は高力価ベクターの大バッチの速やかでまた再現性のある産生を行い、それはたとえば、臨床用途の重要な態様である、大規模な管理試験を可能にする。

【0021】

本発明の一態様によると、我々は現在、H I Vタンパク質の安定な高レベル発現を結果として生じる細胞株を作製するための方法を見出している。より詳細には、我々は、レトロウイルス感染が安定なH I V G a g - P o l発現を結果として生じることを見出している。より一般的に、我々は、他のいくらか細胞毒性であるタンパク質を安定に発現するためにレトロウイルス遺伝子配送を用いることができるという概念を見出している。

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明の一態様によると、目的のヌクレオチド(N O I)を含み、かつN O Iを発現することができる、N O Iは細胞に対して潜在的に有害なR N Aまたはタンパク質をコードする、レトロウイルスベクター(第一のレトロウイルスベクター)の形の組成物が提供される。

【0023】

そのレトロウイルスベクターは細胞を感染させることができる。

【0024】

細胞に対して潜在的に有害な、とは、代謝過程を変えることができるかまたは細胞に対して破壊的な作用を有することができる、すなわち潜在的に細胞毒性であるタンパク質を含む。タンパク質毒性はさまざまなレベルで現れることが可能であり、たとえば一部のタンパク質は細胞増殖を阻害し、一方、別のタンパク質はまた細胞を死滅させる。一部のタンパク質は、たとえば細胞周期の阻害因子またはアポトーシスを誘導するタンパク質のように、宿主細胞の複製に干渉する。我々は、本発明は、細胞に対してある程度の有害作用を示す、すなわち細胞機能を亜致死レベルで阻害するタンパク質の産生に特に有用であることを見出している。あるタンパク質が細胞に対して有害であるかどうかは、構成的プロモーターを用いてそのタンパク質を細胞で発現させ、対照と比較してその細胞に対して何らかの有害作用があるかどうかを判定することによって通常は評価される。

【0025】

一態様ではN O Iは、H I VプロテアーゼといったH I Vタンパク質を発現することが

10

20

30

40

50

できる。

【0026】

好ましくはNOIは、医学、たとえばがん治療において有用である。

【0027】

NOIはレトロウイルスベクター中に転写単位内に存在する。一態様ではNOIは第二のレトロウイルスゲノムの一部を成すことができ、第二のレトロウイルスゲノム自体が第二のNOIを含みうる。この第二のNOIは好ましくは、医学、たとえば遺伝子治療において有用である。この第二のNOIは、細胞に対して有害であってもなくてもよい。

【0028】

このように、本発明の特別の利点は、本発明が、従来のパッケージング細胞株よりも高い力価で偽型粒子を含むレトロウイルス粒子を産生し、かつそのようなレトロウイルス粒子をより長期間産生するパッケージング細胞株の作製を可能にすることである。この利点は、感染を介して第一のレトロウイルスベクターによって細胞のゲノムに組み込まれうる成分である、レトロウイルス粒子の少なくとも1つの成分の安定な組み込みを介して達成される。この状況では、NOIは第二のレトロウイルス粒子の少なくとも1つの成分をコードすると見ることができる。

10

【0029】

このように、本発明のこの態様によると、第二のレトロウイルス成分を含む第一のレトロウイルスベクターを含み、第一のレトロウイルスベクターは細胞を感染させることができ、かつ第二のレトロウイルス成分は第二のレトロウイルスベクターの少なくとも1つの成分をコードする、レトロウイルス発現系の形の組成物が提供される。

20

【0030】

言い換えると、細胞を感染させることができる第一のレトロウイルスベクターを含むレトロウイルス発現系が提供され、かつその第一のレトロウイルスベクターは第二のレトロウイルスベクターの少なくとも1つの成分をコードする、すなわち第二のレトロウイルス成分は第一のレトロウイルスベクター内に組み込まれている。

【0031】

この系の一実施形態では、第二のレトロウイルス成分のgag-polといった遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列を含む第一のレトロウイルス成分を細胞に導入することができる。たとえば第二のレトロウイルス粒子に由来する、tatおよびrevといった調節タンパク質を、効率的なベクターゲノム産生のためにenvおよび第二のレトロウイルス成分のベクターゲノムと共に導入することができ、結果として第二のレトロウイルス粒子の産生が起こる。

30

【0032】

「細胞を感染させることができる」とは、第一のレトロウイルス成分がそれ自身を細胞のゲノムへ組み込むことができることを意味する。

【0033】

細胞は、レトロウイルス粒子の産生のための、パッケージング細胞またはウイルス産生細胞でありうるかまたはそれを形成するのに用いることができる。簡略化のために、我々は第一のレトロウイルスベクターによって感染させられた細胞を「宿主細胞」と呼ぶことがある。

40

【0034】

第二のレトロウイルス成分は、レトロウイルスgag-pol遺伝子、またはenvを含みうる。本分野での偏見とは逆に、我々は、たとえばGag-PolおよびEnvの毒性は、レトロウイルスベクターを用いた組み込み後に安定に発現された場合に低下することを見出している。

【0035】

好ましくは第一のレトロウイルス成分は、第二のレトロウイルス成分とは異なるレトロウイルスから導き出せる。

【0036】

50

好ましくは第一のレトロウイルス成分はM L Vに由来する。

【0037】

好ましくは第二のレトロウイルスベクター成分は、H I VまたはE I A V、より好ましくはH I V、さらにより好ましくはH I V - 1に由来する。

【0038】

本発明の別の実施形態では下記が提供される；

【0039】

組み込まれたプロウイルスの形の、本発明に記載のレトロウイルスベクター。

【0040】

第一のウイルスベクター成分をコードする核酸配列および第二のウイルスベクター成分をコードする核酸配列を含む、本発明のレトロウイルスベクターを産生するための、レトロウイルス産生系。

10

【0041】

本発明の産生系によって産生されたレトロウイルスベクター。

【0042】

本発明のレトロウイルスベクターまたは産生系から得られたレトロウイルス粒子。

【0043】

N O Iが前記細胞に対して有害であるタンパク質をコードする、そのレトロウイルスベクターに感染した細胞。

【0044】

20

医薬における使用のための、本発明のレトロウイルスベクター、レトロウイルス粒子、または細胞。

【0045】

細胞に対して有害であるタンパク質を産生するための、本発明のレトロウイルスベクター、レトロウイルス粒子、または細胞の使用。

【0046】

N O Iをそれを必要とする患者へ配送するための薬剤の調製のための、本発明のレトロウイルスベクター、レトロウイルス粒子、または細胞の使用。

【0047】

細胞を本発明のレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス粒子に感染させることを含む、安定な細胞株を作製するための方法。

30

【0048】

細胞を本発明のレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス粒子に感染させることを含む、細胞に対して有害であるタンパク質を産生する方法。

【0049】

本発明は、細胞に対して有害でありうる、したがって従来の方法を用いて産生するのが困難であると証明された組み換えタンパク質の発現を可能にする。本発明は、

安定な

長期

高レベル

40

：である発現を可能にする。

【0050】

長期とは、少なくとも3ヶ月の期間にわたる発現を含む。高レベルとは、最大約850 ng / mlのH I V - 1 p 2 4分泌および最大10⁷293 T感染単位 / mlの組み換えH I V - 1ウイルス力価のレベルを含む。

【0051】

本発明はこのように、H I V - 1を基礎とするベクターのようなベクターおよび目的のタンパク質を連続的に産生する細胞株の作成を可能にし、かつ、前臨床および臨床用途のためのこれらの産物の大バッチの、再現性のある作成を可能にする。

【0052】

50

何らかの理論によって縛られることを望まない一方、我々は、H I V - 1 g a g - p o l コード領域といったコード領域の、レトロウイルス感染による導入は、レトロウイルス感染後に起こりうるようなタンパク質の安定な高レベル発現を結果として生じると確信する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0053】

本発明のさまざまな好ましい性質および実施形態を、ここで非限定的な実施例によって説明する。

【0054】

一般的にここで言及される技術は本分野でよく知られているが、特にサムブルック (S a m b r o o k) 他、『分子クローニング・実験の手引き』(M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l) (1989) およびアウスベル (A u s u b e l) 他、『分子生物学簡略プロトコル』(S h o r t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y) (1999) 第4版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社 (J o h n W i l e y & S o n s , I n c) (および『分子生物学最新プロトコル』(C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y) の完全版) を参照することができる。

【0055】

レトロウイルスベクター

本発明のレトロウイルスベクターは、第二のまたは二次ウイルスベクターをコードする一次ウイルスベクターを含むハイブリッドウイルスベクター系の形として見ることができ、第一のまたは一次ベクターは宿主細胞を感染させてその中で二次ウイルスベクターを発現させることができ、二次ベクターは他の標的細胞を形質導入することができる。

【0056】

したがって、本発明の遺伝子ベクターは、*i n v i t r o* または *i n v i v o* 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、*i n v i t r o* で作製された一次ベクターから成る。使用の際に、二次ベクターは標的細胞への挿入のための1つ以上の選択された遺伝子を有する。その選択された遺伝子は、1つ以上のマーカー遺伝子および/または治療遺伝子であることができる。

【0057】

一次および二次ウイルスベクターは、さまざまな異なるレトロウイルスベクター、たとえばレンチウイルスベクターであることができ、または複数の一次ウイルスベクターの場合には、異なるウイルス起源のベクターの混合物であることができる。いずれの場合にも、二次ウイルスベクターは好ましくは独立複製ができないような欠陥がある。したがって、二次ウイルスベクターは標的細胞に進入して二次ベクター配列を配送することができるが、複製して他の標的細胞を感染させ続けることはできない。

【0058】

ハイブリッドウイルスベクター系が、二次ベクターをコードする一次ベクターを1つ以上含む場合、すべての一次ベクターは、通常は同時に、一次標的細胞集団を感染させるのに用いられる。

【0059】

好ましい単一または複数の一次ウイルスベクターはM L V ベクターである。

【0060】

二次ウイルスベクターは好ましくはレンチウイルスベクターである。好ましい一実施形態では第二のウイルスベクターはH I V に由来する。レトロレンチウイルス系の構築は実施例に記載する。二次ベクターは宿主細胞内で、欠陥ウイルスベクター粒子の組立およびパッケージングに必須である遺伝子の発現によって産生される。二次ベクターは、独立複製ができない点で欠陥がある。したがって、いったん二次レトロウイルスベクターが標的細胞へ導入されると、それは他のどの標的細胞へも複製によって広がることができない。

【0061】

10

20

30

40

50

二次ベクターは、一次ベクターのDNAにコードされた、レトロウイルスベクター産生のための必須遺伝子の発現から産生されうる。そのような遺伝子は、レトロウイルス由来の *gag-pol* 遺伝子、エンベロープを持つウイルス由来のエンベロープ遺伝子、または細胞進入を媒介することができる任意の他のタンパク質、糖、脂質、またはこれらの複合体、および1つ以上の治療遺伝子を含む欠陥レトロウイルスゲノムを含むことができる。そのレトロウイルスゲノムは一般論として、少なくとも5'長末端反復(LTR)の一部、少なくとも3'LTRの一部、およびパッケージングシグナルの、逆転写を可能にする配列を含む。

【0062】

特に好ましい一実施形態では、我々は安定な構成的HIV-1パッケージング系を開発しており、ここでは「STAR」と呼ぶ。この系は高力価ベクターの大バッチの速やかでまた再現性のある産生を行い、それは臨床用途の重要な態様である、大規模な安全性管理試験を可能にする。この系では、HIV-1 *Gag-Pol* の高レベル発現が、コドン最適化された *gag-pol* 遺伝子をコードするマウス白血病ウイルス(MLV)ベクターを用いて細胞、好ましくは293T細胞に導入することによって達成された¹¹。その後、効率的なベクターゲノム産生のためのHIV-1調節タンパク質TatおよびRev、およびガンマレトロウイルスエンベロープ(Env)が導入され、結果として空のベクター粒子を産生するパッケージング細胞株を生じた。NOIをコードするHIVベクターゲノムの導入によって、高力価HIV-NOIベクターが作製された。

【0063】

好ましい一実施形態では、二次ベクターはまた、独立複製が可能な感染性ウイルスを生じる組み換えの可能性を消去する1つ以上の安全機能が組み込まれている点で、*in vivo*用途についても安全である。

【0064】

複製能を欠くことを確実にするため、二次ベクターは単一または二個以上の一次ベクターに位置しうる複数の転写単位によってコードされうる。したがって、二次ベクターゲノムをコードする転写単位、*gag-pol*をコードする転写単位、および*env*をコードする転写単位が存在しうる。代替的に、これらのうち二個以上を組み合わせることができる。たとえば、*gag-pol*および*env*、または*env*およびゲノムをコードする核酸配列を、単一の転写単位中に組み合わせることができる。これを達成するための方法は本分野で既知である。

【0065】

ここで記載される転写単位は、コード配列、および他のどのコード配列からも独立してそれらのコード配列の発現を達成するためのシグナルを含む、核酸の領域である。したがって、個々の転写単位は一般的に、少なくとも、プロモーター、エンハンサー、およびポリアデニル化シグナルを含む。二次ベクターをコードする転写単位のプロモーターおよびエンハンサーは、標的細胞中で二次ウイルスベクターの産生のための条件下で、好ましくは強く活性であるか、または強く誘導されうる。プロモーターおよび/またはエンハンサーは、構造的に効率的であることができ、またはその活性に関して組織限定的であるかまたは一時的に限られていることができる。

【0066】

ハイブリッドウイルスベクター系に組み込まれうる安全機能を後述する。そのような機能の1つ以上が存在しうる。

【0067】

第一に、二次ベクターの成分をコードする配列間の配列ホモロジーは、ホモロジーの領域の欠失によって回避することができる。ホモロジーの領域は、遺伝子組み換えが起こるのを可能にする。特定の一実施形態では、二次レトロウイルスベクターを構築するのに3つの転写単位が用いられる。第一の転写単位は、非レトロウイルスプロモーターおよびエンハンサーの調節下の、レトロウイルス *gag-pol* 遺伝子を含む。第二の転写単位は、非レトロウイルスプロモーターおよびエンハンサーの調節下の、レトロウイルス *env*

10

20

30

40

50

遺伝子を含む。第三の転写単位は、非レトロウイルスプロモーターおよびエンハンサーの調節下の、欠陥レトロウイルスゲノムを含む。天然のレトロウイルスゲノムでは、パッケージングシグナルは、適切に機能するために *g a g* 配列が必要であるような部分に位置する。通常はレトロウイルスベクター系がその結果構成されている場合、*g a g* 遺伝子の部分を含むパッケージングシグナルは、ベクターゲノム中に残る。この場合にはしかし、ベクターとのホモロジーを欠く合成 *g a g* 配列を用いることができる。

【0068】

第二に、複製能を有する二次ウイルスベクターの可能性は、*e n v* と *g a g - p o l* の成分の間のホモロジーの領域が回避されるように、1つのレトロウイルスのゲノムを、別のレトロウイルスまたはエンベロープを持つ別のウイルスのエンベロープタンパク質を用いて偽型化することによって回避することができる。特定の一実施形態では、レトロウイルスベクターは下記の3成分から構成される。第一の転写単位は、非レトロウイルスプロモーターおよびエンハンサーの調節下の、レトロウイルス *g a g - p o l* 遺伝子を含む。第二の転写単位は、非レトロウイルスプロモーターおよびエンハンサーの調節下の、エンベロープを持つ別のウイルス由来の *e n v* 遺伝子を含む。第三の転写単位は、非レトロウイルスプロモーターおよびエンハンサーの調節下の、欠陥レトロウイルスゲノムを含む。一次ウイルスベクターは偽型化されうることもまた予見される。偽型化は下記により詳細に記載する。

【0069】

第三に、複製能を有するレトロウイルスの可能性は、特定の方法で構成された2つの転写単位を用いることによって消去することができる。第一の転写単位は、*h C M V* プロモーター - エンハンサーまたは組織限定プロモーター - エンハンサーといった、一次標的細胞中で活性であるプロモーター - エンハンサーの調節下にある *g a g - p o l* コード領域を含む。第二の転写単位は、レトロウイルス粒子中にパッケージングされうるレトロウイルスゲノムRNAをコードする。第二の転写単位は、パッケージング、組み込みおよび逆転写に必要なレトロウイルス配列を含み、またエンベロープを持つウイルスの *e n v* タンパク質をコードする配列、および1つ以上の治療遺伝子をコードする配列を含む。

【0070】

一次レトロウイルスベクターは複製能を有するベクターであることができるが、より好ましくは複製能を欠くレトロウイルスベクターである。

【0071】

記載の本発明の実施形態は、遺伝子治療に用いられる一部のウイルスベクターの産生に伴う主要な問題の1つ、すなわち産生が一過性であることを解決する。

【0072】

二次ベクターとしてのレトロウイルスベクターの使用はまた、増殖している標的細胞における安定な発現を含む、標的組織における治療遺伝子の安定な発現を可能にするため、有利である。

【0073】

好ましくは、二次ウイルスベクターは特定の1つの細胞型または複数の細胞型を優先的に感染させる。より好ましくは、二次ベクターは標的化ベクターであり、すなわち二次ベクターは、特定の細胞を標的とするように、天然のウイルスに比較して改変された組織親和性を有する。「標的化ベクター」の語は必ずしも「標的細胞」の語と結びつかない。「標的細胞」は単に、天然のまたは標的化された第二のベクターが感染または導入することができる細胞をいう。

【0074】

レトロウイルスベクターについては、標的化はエンベロープタンパク質を改変することによって達成することができる。レトロウイルス二次ベクターのエンベロープタンパク質は、たとえばMLV両種性エンベロープまたは改変された両種性エンベロープといった、無毒性エンベロープまたは一次標的細胞内において無毒性量で産生されうるエンベロープである必要がある。

10

20

30

40

50

【0075】

本発明に記載の二次ベクターのための標的細胞は、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；間質細胞；星状細胞または膠細胞；筋細胞；上皮細胞；および成体または胚性幹細胞を含むがそれらに限定されない。

【0076】

二次ベクターがNOIを含む場合、好ましくはこの第二の転写単位は、虚血部位または固形腫瘍の微小環境といった、体内の疾患部位において優先的に活性であるプロモーター-エンハンサーの調節下にある。本発明のこの態様の、特に好ましい実施形態では、第二の転写単位は、標的細胞へのそのゲノムの挿入に際して、ウイルスenv遺伝子の発現を低下させ治療遺伝子の効率的な発現を可能にするように作用するイントロンが生じるように構成されている。

10

【0077】

宿主細胞集団は標的細胞集団と同一であることができる。たとえば本発明の一次ベクターの腫瘍細胞への配送は、別の腫瘍細胞へ導入することができる別のベクター粒子の複製および産生に繋がる。代替的に、標的細胞集団は宿主細胞集団とは異なることができる。この場合には、宿主細胞は治療される個体の体内の内在性工場として作用し、標的細胞集団を感染させることができる追加のベクター粒子を産生する。たとえば、宿主細胞集団は、一次ベクターを*in vivo*または*ex vivo*で導入された造血細胞であることができる。標的細胞はその後、腫瘍といった体内の部位へ配送されるかまたは移動して、二次ベクター粒子を産生し、二次ベクター粒子はたとえば固形腫瘍内の細胞に形質導入することができる。

20

【0078】

本発明は、単一または複数の治療タンパク質の作用が必要である部位またはその近傍で、高力価の欠陥レトロウイルスベクター粒子の*in vivo*の局所化された産生を、その後の標的細胞の効率的な形質導入と共に可能にする。この場合、一次ベクターもまた複製能を欠く。

【0079】

本発明はまた、分裂しないかまたは分裂の遅い細胞において*in vivo*で、MLVを基礎とするベクターのようなレトロウイルスベクターの産生を可能にする。MLVを基礎とするレトロウイルスベクターを産生することは、*in vitro*で増殖する組織培養順応細胞または*in vivo*の速やかに分裂する腫瘍細胞といった速やかに分裂する細胞でのみ以前は可能であった。レトロウイルスベクターを産生することができる細胞型の範囲を拡大することは、多くはゆっくり分裂する固形腫瘍の細胞への遺伝子の配送に、および、治療タンパク質の産生のための内在性工場としての内皮細胞およびさまざまな造血系譜の細胞といった分裂しない細胞の利用に有利である。

30

【0080】

レトロウイルス

レトロウイルスベクターを遺伝子治療および遺伝子配送に用いるという概念はよく知られている（バーマ（Verma）およびソミア（Somia）（1997）*Nature* 389；239-242）。

40

【0081】

レトロウイルスは多数存在する。本用途のためには、「レトロウイルス」の語は下記を含む；マウス白血病ウイルス（MLV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、藤波肉腫ウイルス（FuSV）、モロニーマウス白血病ウイルス（Mo-MLV）、FBRマウス骨肉腫ウイルス（FBRMSV）、モロニーマウス肉腫ウイルス（Mo-MSV）、アベルソンマウス白血病ウイルス（A-MLV）、トリ骨髄細胞腫症ウイルス-29（MC29）、およびトリ赤芽球症ウイルス（AEV）、およびスプーマウイルスおよびレンチウイルスを含むすべての他のレトロウイルス科。

50

【0082】

レトロウイルスの詳細な一覧は、コフィン(Coffin)他(『レトロウイルス』1997、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社(Cold Spring Harbour Laboratory Press)、JM・コフィン(Coffin)、SM・ヒューズ(Hughes)、HE・バーマス(Varmus)編、pp 758~763)に見ることができる。

【0083】

好ましい一実施形態では、二次レトロウイルスベクターは少なくともレンチウイルスから導くことができる。レンチウイルスもまたレトロウイルス科に属するが、しかしレンチウイルスは分裂細胞および非分裂細胞の両方を感染させることができる(ルイス(Lewis)他(1992)EMBO J. 3053-3058)。

10

【0084】

レンチウイルス群は「霊長類」および「非霊長類」に分けることができる。霊長類レンチウイルスの例は、ヒト後天性免疫不全症候群(AIDS)の病原体であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびサル免疫不全ウイルス(SIV)を含む。非霊長類レンチウイルス群は、典型的な「スローウイルス」ピスナ/マエディウイルス(MMV)、および関連するヤギ関節炎-脳脊髄炎ウイルス(CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)、ならびにより近年に記載されたネコ免疫不全ウイルス(FIV)およびウシ免疫不全ウイルス(BIV)を含む。

【0085】

ここで用いられるHIVは、たとえばHIV-1およびHIV-2といったHIV、およびたとえばHTLV-IIIIといったHTLVのような、後天性免疫不全症候群(AIDS)およびAIDS関連症候群(ARC)の病原体とみなされるウイルスに与えられるすべての表記を包含する。2つの主要なHIVの型であるHIV-1およびHIV-2のうち、HIV-1が全世界で優勢な種である。現在まで、HIV-1の主な2つの群「M」および「O」が存在する。HIV-1感染の大多数を引き起こすウイルスはM群に属する。O群分離株はM群とは遺伝的に大きく隔たっている。M群のHIV-1亜型はA~J亜型を含む。

20

【0086】

一部のレンチウイルスのゲノム構造に関する詳細を本分野で見出すことができる。一例として、HIVおよびEIAVに関する詳細は、NCBI Genbankデータベースに見出すことができる(すなわちそれぞれゲノム登録番号AF033819およびAF033820)。HIV変異株の詳細もまた、HYPERLINK <http://hiv-web.lanl.gov> <http://hiv-web.lanl.gov>に見出すことができる。EIAV変異株の詳細は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>から見出すことができる。

30

【0087】

感染の過程の間に、レトロウイルスは最初に特定の細胞表面受容体に結合する。感受性の宿主細胞への進入に際して、親ウイルス内に運ばれる、ウイルスにコードされた逆転写酵素によって、レトロウイルスRNAゲノムは次いでDNAへコピーされる。このDNAは宿主細胞核へ輸送され、そこで続いて宿主ゲノム中へ組み込まれる。この段階でそれは典型的にはプロウイルスと呼ばれる。プロウイルスは、宿主染色体中で細胞分裂の間に安定であり、他の細胞遺伝子のように複製される。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他の因子をコードし、そのウイルスは「出芽」と時に呼ばれる過程によって細胞を離れることができる。

40

【0088】

個々の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。これらの遺伝子の両端には、長末端反復(LTR)と呼ばれる領域が隣接する。LTRは、プロウイルス組み込み、および転写を担う。LTRはまた、エンハンサー-プロモーター配列としても機能する。言い換えると

50

、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'末端に位置するpsi配列によって起こる。

【0089】

LTR自身は、U3、R、およびU5と呼ばれる3つの配列に分けることができる同一の配列である。U3はRNAの3'末端に特有の配列に由来する。RはRNAの両端で反復される配列に由来し、U5はRNAの5'末端に特有の配列に由来する。その3つの配列の大きさは、異なるレトロウイルスの間では顕著に異なりうる。

【0090】

ウイルスゲノムに関しては、転写開始の部位は一方のLTRのU3とRの間の境界に、またポリ(A)付加(終止)の部位はもう一方のLTRのRとU5の間の境界に位置する。U3は、プロウイルスの転写調節配列の大部分を含み、それは細胞のおよび一部の場合にはウイルスの転写活性化タンパク質に反応する、プロモーターおよび複数のエンハンサー配列を含む。一部のレトロウイルスは、遺伝子発現の調節に参与するタンパク質をコードする下記の遺伝子のうちいずれか1つ以上を有する；tat、rev、taxおよびrex。

【0091】

構造遺伝子gag、polおよびenv自身に関しては、gagはウイルスの内部構造タンパク質をコードする。Gagタンパク質はタンパク質分解によりプロセシングされて成熟タンパク質MA(マトリクス)、CA(キャプシド)およびNC(ヌクレオキャプシド)となる。pol遺伝子は、ゲノムの複製を媒介する、DNAポリメラーゼ、随伴RNaseHおよびインテグラーゼ(IN)を含む、逆転写酵素(RT)をコードする。env遺伝子は、細胞受容体タンパク質と特異的に相互作用する複合体を形成する、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する。この相互作用は最終的に、ウイルス膜の細胞膜との融合によって感染に繋がる。

【0092】

レトロウイルスはまた、gag、polおよびenv以外のタンパク質をコードする「追加の」遺伝子を含むことができる。追加の遺伝子の例は、HIVでは、vif、vpr、vpx、vpu、tat、revおよびnefのうち1つ以上を含む。EIAVは(中でも)追加の遺伝子S2を持つ。

【0093】

追加の遺伝子によってコードされたタンパク質はさまざまな機能を果たし、その一部は細胞タンパク質によって提供される機能を複製することができる。EIAVでは、たとえば、tatはウイルスLTRの転写活性化因子として作用する。それはTARと呼ばれる安定なステム-ループRN二次構造に結合する。Revはrev応答配列(RRE)を通じてウイルス遺伝子の発現を調節および調整する。これらの2つのタンパク質の作用機序は霊長類ウイルスにおける類似の機構と大まかに同様であると考えられている。S2の機能は未知である。加えて、スプライシングされて膜貫通タンパク質の最初のenvコード配列となるtatの第一のエクソンによってコードされる、EIAVタンパク質であるTtmが同定されている。

【0094】

ベクター系

レンチウイルスベクター系といったレトロウイルスベクター系が、特に1つ以上の目的部位へのNOIの輸送のための配送系として提案されている。輸送は、in vitro、ex vivo、in vivo、またはその組み合わせで起こりうる。レトロウイルスベクター系は、受容体の使用法、逆転写およびRNAパッケージングを含む、レトロウイルス生活環のさまざまな面を研究するのに利用されてきている(ミラー(Miller)による総説、1992 Curr Top Microbiol Immunol 158; 1-24)。

【0095】

ここで用いられる「ベクター系」の語は、レシピエント細胞にNOIを形質導入するこ

10

20

30

40

50

とができるベクター粒子を意味する。

【0096】

ベクター粒子は下記の成分を含む；1つ以上のNOIを含むことができるベクターゲノム、核酸をキャプシド化するヌクレオキャプシド、およびヌクレオキャプシドを囲む膜。

【0097】

「ヌクレオキャプシド」の語は、レトロウイルスゲノムの少なくとも群特異的ウイルスコアタンパク質(gag)およびウイルスポリメラーゼ(pol)をいう。これらのタンパク質はパッケージング可能な配列をキャプシド化し、自身がさらにエンベローブ糖タンパク質を含む膜に囲まれている。

【0098】

一旦細胞内へ入ると、レトロウイルスベクター粒子由来のRNAゲノムは逆転写されてDNAになり、レシピエント細胞のDNAへ組み込まれる。

【0099】

「ベクターゲノム」の語は、レトロウイルスベクター粒子中に存在するRNA構造と組み込まれたDNA構造の両方をいう。その語はまた、そのようなRNAゲノムをコードすることができる個別のまたは単離されたDNA構造も含む。レトロウイルスまたはレンチウイルスゲノムは、レトロウイルスまたはレンチウイルスから導くことができる1つの成分の部分を含むべきである。「導くことができる」の語は、必ずしもレンチウイルスといったレトロウイルスから得られたのでなくともよく代わりにそれから導くことができるヌクレオチド配列またはその一部という意味として通常の意味で用いられる。一例として、その配列は合成的にまたは組み換えDNA技術によって調製することができる。好ましくはゲノムはpsi領域(またはキャプシド形成を起こすことができる類似の成分)を含む。

【0100】

好ましくは一次レトロウイルスベクターは自己不活性化(SIN)ベクター系である。

【0101】

好ましくは一次レトロウイルスベクターは、目的のNOIの発現を促進するための内部プロモーターを含む。

【0102】

好ましくは一次レトロウイルスベクターはスプリットイントロン配列を含む(J Virol 2000 Mar; 74(5); 2365-71. 『スプリットイントロンレトロウイルスベクター；安全性の向上した発現促進』(Split-intron retroviral vectors; enhanced expression with improved safety.) イスマイル(Ismail)SI, キングズマン(Kingsman)SM, キングズマン(Kingsman)AJ, ウーデン(Uden)M.)。

【0103】

好ましくは一次レトロウイルスベクターはスプリットポリA配列を含む(J Viro 2001 Jan; 75(1); 199-204. 『レトロウイルスベクターの発現および安全性を高めるためのイントロン破壊されたポリアデニル化部位の使用』(Use of intron-disrupted polyadenylation sites to enhance expression and safety of retroviral vectors.) イスマイル(Ismail)SI, ロール(Rohll)JB, キングズマン(Kingsman)SM, キングズマン(Kingsman)AJ, ウーデン(Uden)M.)。

【0104】

好ましくは二次レトロウイルスベクターは自己不活性化(SIN)ベクター系である。

【0105】

一例として、自己不活性化レトロウイルスベクター系が、3(LTR)のU3領域中の転写エンハンサー、またはエンハンサーおよびプロモーターを欠失させることによって構築

10

20

30

40

50

されている。1回のベクター逆転写および組み込み後、これらの変化は5(および3(LTRの両方にコピーされ、転写的に不活性なプロウイルスを生じる。しかし、そのようなベクター中のLTR内の任意の(一または複数の)プロモーターは、なお転写的に活性である。この戦略は、内部に置かれた遺伝子からの転写に際してウイルスLTR中のエンハンサーおよびプロモーターの作用を消去するために用いられている。そのような作用は、転写の増加または転写の抑制を含む。この戦略はまた、3(LTRからゲノムDNA中への下流転写を消去するのに用いることができる。これは、内在性発がん遺伝子の偶発的活性化を防ぐことが重要でありうる、ヒト遺伝子治療において特に重要である。

【0106】

好ましくは、本発明のウイルス産生細胞からの高力価の調節されたレトロウイルスベクターの産生を促進する、リコンビナーゼ補助機構が用いられる。

10

【0107】

ここで用いられる「リコンビナーゼ補助系」の語は、バクテリオファージP1のCreリコンビナーゼ/loxP認識部位、または34bpFLP認識標的(FRTs)間の組み換え現象を触媒する酵母(*S. cerevisiae*)の部位特異的FLPリコンビナーゼを用いる系を含むがそれらに限定されない。

【0108】

34bpFLP認識標的(FRT)間の組み換え現象を触媒する酵母(*S. cerevisiae*)の部位特異的FLPリコンビナーゼは、リコンビナーゼ補助組み換え現象を用いて高レベルウイルス産生細胞株を作製するためにDNA構造へ組み込まれている(カーレマン(Karremans)他(1996)NAR 24; 1616-1624)。同様の系が、バクテリオファージP1のCreリコンビナーゼ/loxP認識部位を用いて開発されている(PCT/GB00/03837; バニン(Vanin)他(1997)J. Virol 71; 7820-7826を参照)。これは高力価レンチウイルス産生細胞株が作製されるようにレンチウイルスゲノムへ組み込まれた。

20

【0109】

本発明のウイルス産生/パッケージング細胞株を用いることによって、たとえば、目的の部位(成体脳組織のような)のその後の形質導入のための、多量のウイルスベクター粒子を増殖および単離することが可能である(たとえばウイルスベクター粒子の適当な力価を調製すること)。ウイルス産生細胞株は、通常、大スケール産生またはベクター粒子により適している。

30

【0110】

ウイルス産生細胞/パッケージング細胞は、任意の適当な細胞型であることができる。ウイルス産生細胞は一般的に哺乳類細胞であるが、たとえば、昆虫細胞であることができる。

【0111】

ここで用いられる「ウイルス産生細胞」または「ベクター産生細胞」の語は、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。

【0112】

好ましくは、ウイルス産生細胞は、生成された安定な細胞株から得ることができる。

40

【0113】

ここで用いられる「生成された安定なウイルス産生細胞株」の語は、マーカー遺伝子の高発現についてスクリーニングされ選択されている、形質導入されたウイルス産生細胞株である。そのような細胞株は、ウイルスゲノムからの高レベル発現を支持する。「生成されたウイルス産生細胞株」の語は、「生成された安定なウイルス産生細胞株」の語および「安定なウイルス産生細胞株」の語と相互に交換可能に用いられる。

【0114】

好ましくは、生成されたウイルス産生細胞株はHIVまたはEIAVウイルス産生細胞株である。

【0115】

50

好ましくは、エンベロープタンパク質配列、およびヌクレオキャプシド配列は、ウイルス産生細胞および/またはパッケージング細胞にすべて安定に組み込まれている。しかし、これらの配列のうち1つ以上は、エピソーム形でもまた存在することができ、遺伝子発現はエピソームからも起こりうる。

【0116】

ここで用いられる「パッケージング細胞」の語は、RNAゲノムに欠けている、感染性組み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、そのようなパッケージング細胞は、ウイルス構造タンパク質（たとえばgag-polおよびenv、コード最適化されうる）を発現することができるウイルス産生プラスミドを1つ以上含むが、それらはパッケージングシグナルを含まない。

10

【0117】

「パッケージングシグナル」の語は、相互に交換可能に「パッケージング配列」または「psi」ともいうが、ウイルス粒子形成中にレトロウイルスRNA鎖のキャプシド形成に必要な非コードcis作用性配列について用いられる。HIV-1では、この配列は主要スプライシングドナー部位(SD)の上流から少なくともgag開始コドンにわたる遺伝子座にマッピングされている。

【0118】

パッケージング細胞株は容易に作製することができ(国際公開第92/05266号パンフレットも参照)、レトロウイルスベクター粒子のためのウイルス産生細胞株を作製するために利用されうる。上記で既に言及した通り、入手可能なパッケージング細胞株の概要は『レトロウイルス』(Retroviruses)に示されている。

20

【0119】

パッケージング細胞株は、キャプシド化および高力価ベクター粒子産生のための膜タンパク質を提供するのに必要な遺伝子産物を提供するのに有用である。パッケージング細胞は、組織培養細胞株のように、in vitroで培養された細胞であることができる。適当な細胞株は、マウス線維芽細胞由来細胞株またはヒト細胞株といった哺乳類細胞を含むがそれらに限定されない。好ましくはパッケージング細胞株はヒト細胞株である。適当な細胞株の例は; HEK293、293-T、TE671、HT1080またはHeLa、より好ましくは293TまたはHT1080、さらにより好ましくは293T、を含む。

30

【0120】

代替的に、パッケージング細胞は、単球、マクロファージ、血球または線維芽細胞といった、治療される個体に由来する細胞であることができる。細胞を個体から単離し、パッケージングおよびベクター成分をex vivoで投与し、その後自家パッケージング細胞の再投与を行うことができる。

【0121】

高力価ウイルス調製物を用いることが、実験的用途および実用の両方において非常に望ましい。ウイルス力価を高めるための技術は、psiプラスパッケージングシグナルを上記の通り用いることおよびウイルスストックの濃縮を含む。

【0122】

ここで用いられる「高力価」の語は、標的部位に形質導入することができるウイルスベクターまたは粒子の有効量を意味する。

40

【0123】

ここで用いられる「有効量」の語は、標的部位でのNOIの発現を誘導するのに十分である、調節されたレトロウイルスベクター粒子の量を意味する。

【0124】

ウイルス産生/パッケージング細胞のための高力価ウイルス調製物は、通常はml当たり 10^5 ないし 10^7 t.u.程度である(力価は、293TまたはD17といった標準細胞株について力価測定して、ml当たり形質導入単位(t.u./ml)として表される)。一部の組織における形質導入については、ごく小さい容量を用いる必要がある可能性があり、そのためウイルス調製物は超遠心分離、低速遠心分離、またはクロスフロー(c

50

r o s s - s l o w) 濾過によって濃縮される。

【 0 1 2 5 】

NOIにコードされた発現産物は、細胞から分泌されるタンパク質であることができる。代替的に、NOI発現産物は分泌されず、細胞内で活性である。一部の用途には、NOI発現産物がバースタンダー効果または遠隔バースタンダー効果；すなわち、1つの細胞における発現産物の産生が、共通の表現型を有する近傍のまたは離れた（たとえば転移性の）別の、関係する細胞の調節に繋がることを示すことが好ましい。

【 0 1 2 6 】

中心ポリプリン区域（c P P T）といわれる配列の存在は、非分裂細胞への遺伝子配送の効率を改善しうる（国際公開第00/31200号パンフレットを参照）。このc i s 10
作用性配列は、たとえば、E I A Vポリメラーゼコード領域配列中に位置する。好ましくは本発明に用いられるベクター系のゲノムはc P P T配列を含む。加えて、または代替として、ウイルスゲノムは翻訳後調節配列および/または翻訳エンハンサーを含みうる。

【 0 1 2 7 】

NOIは1つ以上のプロモーター/エンハンサー配列に調節可能に連鎖することができる。1つ以上のNOIの転写は、ウイルスLTRの調節下にあることができ、または代替的にプロモーター-エンハンサー配列を導入遺伝子に組み込むことができる。好ましくはプロモーターはCMVのような強いプロモーターである。プロモーターは調節されたプロモーターでありうる。プロモーターは組織特異的でありうる。

【 0 1 2 8 】

最小系

ベクター産生または分裂および非分裂細胞の形質導入のどちらにも、H I V / S I V 追加遺伝子v i f、v p r、v p x、v p u、t a t、r e vおよびn e fのどれも必要としない、霊長類レンチウイルス最小系を構成することができるのが実証されている。ベクター産生または分裂および非分裂細胞の形質導入のどちらにもS 2を必要としない、E I A V最小ベクター系を構成することができるのもまた実証されている。追加遺伝子の欠失は非常に有利である。第一に、それはレンチウイルス（たとえばH I V）感染において疾患に関連する遺伝子無しでベクターが産生されるのを可能にする。特に、t a tは疾患に関連する。第二に、追加遺伝子の欠失は、ベクターがより多くの異種DNAをパッケージングするのを可能にする。第三に、S 2のように機能が未知である遺伝子を除外すること 30
ができ、それによって、望まない作用を引き起こす危険を低下することができる。最小レンチウイルスベクターの例は、国際公開第A - 9 9 / 3 2 6 4 6号パンフレットに、および国際公開第A - 9 8 / 1 7 8 1 5号パンフレットに開示されている。

【 0 1 2 9 】

このように、好ましくは、本発明に用いられるレトロウイルスベクターは、少なくともt a tおよびS 2を欠き（E I A Vベクター系であれば）、およびおそらくv i f、v p r、v p x、v p uおよびn e fも欠く。より好ましくは、本発明の系はまたr e vも欠く。R e vは以前は、一部のレトロウイルスゲノムにおいて効率的なウイルス産生のために必須と考えられていた。たとえば、H I Vの場合には、r e vおよびR R E配列を含むべきと考えられていた。しかし、r e vおよびR R Eの必要性は、コドン最適化（下記参照）によって、またはM P M V系のような他の機能する同等の系での置換によって、低下または除去できることが見出されている。コドン最適化されたg a g - p o lの発現はR E Vに依存しないため、R R Eをg a g - p o l発現カセットから除去することができ、そのようにしてベクターゲノム上に含まれるいずれかのR R Eとの組み換えの可能性を除くことができる。

【 0 1 3 0 】

好ましい一実施形態では、本発明の第一の態様のウイルスゲノムは、R e v応答配列（R R E）を欠く。

【 0 1 3 1 】

好ましい一実施形態では、本発明に用いられる系は、一部またはすべての追加遺伝子が 50

除去されたいわゆる「最小」系を基礎とする。

【0132】

コドン最適化

コドン最適化は、国際公開第99/41397号パンフレットおよび国際公開第01/79518号パンフレットに以前に記載されている。異なる細胞は、特定のコドンの用法が異なる。このコドンの偏りは、その細胞型における特定のtRNAの相対存在量の偏りに相当する。対応するtRNAの相対存在量に調和するように合わせて、配列中のコドンを変更することによって、発現を増加させることができる。同様に、その特定の細胞型で対応するtRNAが稀であることが知られているコドンを意図的に選択することによって、発現を低下させることができる。このように、追加の程度の翻訳調節が利用可能である。

10

【0133】

HIVおよび他のレンチウイルスを含む多数のウイルスが、多数の稀なコドンを使用し、そしてこれらを一般に用いられる哺乳類コドンに対応するように変えることによって、哺乳類ウイルス産生細胞におけるパッケージング成分の発現増加を達成することができる。コドン用法表は、哺乳類細胞について、およびさまざまな他の生物について、本分野で既知である。

【0134】

コドン最適化はいくつかの他の利点を有する。配列の変化によって、ウイルス産生細胞/パッケージング細胞においてウイルス粒子の組立に必要なウイルス粒子のパッケージング成分をコードするヌクレオチド配列から、RNA不安定性配列(INS)が除去される。同時に、パッケージング成分についてのアミノ酸配列コード配列は保持されるため、その配列によってコードされるウイルス成分は、同一のままであるか、または少なくとも十分に類似しているためパッケージング成分の機能が障害されない。コドン最適化はまた、輸送のためのRev/RREの必要性を克服し、最適化された配列をRev非依存性にする。コドン最適化はまた、ベクター系内での異なる構造間の(たとえばgag-polとenvのオープン・リーディング・フレームの重なり領域)相同組み換えを減少させる。コドン最適化の全体的効果はしたがって、ウイルス力価の顕著な増加および安全性の改善である。

20

【0135】

一実施形態では、INSに関連するコドンだけがコドン最適化される。しかし、はるかに好ましくまた実際的な一実施形態では、配列は、フレームシフト部位を包含する配列を例外として、全体がコドン最適化される。

30

【0136】

gag-pol遺伝子は、gag-polタンパク質をコードする2つの重なり合う読み枠を含む。両方のタンパク質の発現は、翻訳中のフレームシフトに依存する。このフレームシフトは、翻訳中のリボソームの「ずれ」の結果として起こる。このずれは、少なくとも部分的には、リボソームを停止させるRN二次構造によって引き起こされると考えられている。そのような二次構造は、gag-pol遺伝子中のフレームシフト部位の下流に存在する。HIVについては、重なり領域はgagの開始の下流のヌクレオチド1222から(ここでヌクレオチド1はgag ATGのAである)、gagの終わり(nt1503)まで伸びている。このため、フレームシフト部位および2つの読み枠の重なり領域にわたる281bp断片は、好ましくはコドン最適化されていない。この断片を保持することは、gag-polタンパク質のより効率的な発現を可能にする。

40

【0137】

EIAVについては、重なり領域の開始はnt1262(ここでヌクレオチド1はgag ATGのAである)と考えられている。重なり領域の終わりは1461bpにある。フレームシフト部位およびgag-pol重複が保存されていることを確実にするため、野生型配列がnt1156から1465まで保持されている。

【0138】

50

たとえば、便利な制限部位を提供するために、最適コドン用法からの派生を行うことができ、保存されたアミノ酸変化を gag - pol タンパク質に導入することができる。

【0139】

非常に好ましい一実施形態では、コドン最適化は、わずかに発現された哺乳類遺伝子に基づいた。三番目の、および時に二番目および三番目の塩基を変えることができる。

【0140】

遺伝コードの縮重的性質のため、当業者によって多数の gag - pol 配列を達成することができることが理解される。また、コドン最適化された gag - pol 配列を作製するための出発点として用いることができる、記載された多数のレトロウイルス変異株が存在する。レンチウイルスゲノムは非常に可変的でありうる。たとえば、HIV - 1 のなお機能する多数の準種が存在する。EIAV についてもその通りである。これらの変異株は、形質導入過程の特定部分を促進するのに用いることができる。HIV - 1 変異株の例は [HYPERLINK http://hiv-web.lanl.gov](http://hiv-web.lanl.gov) <http://hiv-web.lanl.gov> .で見出すことができる。EIAV クローンの詳細は NCBI データベース; [HYPERLINK http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> .で見出すことができる。

10

【0141】

コドン最適化された gag - pol 配列のための戦略は、どのレトロウイルスについても用いることができる。これは EIAV、FIV、BIV、CAEV、VMR、SIV、HIV - 1 および HIV - 2 を含むすべてのレンチウイルスに当てはまる。加えて、この方法は、HTLV - 1、HTLV - 2、HFV、HSRV およびヒト内在性レトロウイルス (HERV)、MLV、および他のレトロウイルスに由来する遺伝子の発現を増加させるのに用いることができる。

20

【0142】

コドン最適化は、gag - pol 発現を Rev 非依存性にするすることができる。レトロウイルスベクターにおける抗 rev または RRE 因子の使用を可能にするためには、しかし、ウイルスベクター産生系を完全に Rev / RRE 非依存性にする必要がある。したがって、ゲノムを改変する必要もある。これはベクターゲノム成分を最適化することによって達成される。有利なことに、これらの改変はまた、ウイルス産生細胞と形質導入された細胞の両方にすべての追加タンパク質が存在しない、より安全な系の作製に繋がる。

30

【0143】

上述の通り、レトロウイルスベクターのためのパッケージング成分は、gag、pol、および env 遺伝子の発現産物を含む。加えて、効率的なパッケージングは、gag および env 由来の部分配列が後続する、4つのステムループの短い配列に依存する (「パッケージングシグナル」)。したがって、レトロウイルスベクターゲノムに欠失した gag 配列を含めること (パッケージング構造上の完全な gag 配列に加えて) はベクター力価を最適化する。現在まで、効率的なパッケージングは、env 配列をまだ保持しているベクター中に gag の 255 ないし 360 ヌクレオチドを、または特定の組み合わせの スプライドナー変異である gag および env 欠失中の gag の約 40 ヌクレオチドを必要とすると報告されている。驚くべきことに、gag 中の N 末端の 360 個程度のヌクレオチド以外全部の欠失が、ベクター力価の増加に繋がることが見出されている。したがって、好ましくは、レトロウイルスベクターゲノムは 1 つ以上の欠失を含む gag 配列を含み、より好ましくはその gag 配列は、N 末端から導くことができる約 360 ヌクレオチドを含む。

40

【0144】

偽型化

ウイルスベクター系の設計においては、より広い範囲または変化させた範囲の細胞型への遺伝物質の配送を可能にするため、天然ウイルスとは異なる標的細胞特異性を有する粒子を作製することが好ましい。これを達成するための 1 つの方法は、ウイルスエンベロープタンパク質を操作することによってその特異性を変化させることである。もう 1 つの手

50

法は、異種エンベロープタンパク質をベクター粒子へ導入し、そのウイルスの天然エンベロープタンパク質を置換するかまたはそれに加えることである。

【0145】

このように、好ましい一実施形態によると、一次および/または二次ウイルスベクターは偽型化されている。

【0146】

偽型化の語は、ウイルスゲノムのenv遺伝子を、たとえば別のウイルス由来のenv遺伝子といった異種env遺伝子を用いて、少なくとも一部を組み込むか、または一部を置換するか、または全部を代替することを意味する。偽型化は新しい現象ではなく、例は国際公開第99/61639号パンフレット、国際公開第A-98/05759号パンフレット、国際公開第A-98/05754号パンフレット、国際公開第A-97/17457号パンフレット、国際公開第A-96/09400号パンフレット、国際公開第A-91/00047号パンフレット、およびメバチオン(Mebatsion)他1997 Cell 90, 841-847に見出すことができる。

10

【0147】

偽型化は、レトロウイルスベクター安定性および形質導入効率を改善することができる。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)を用いてパッケージングされたマウス白血病ウイルスの偽型が記載されており(マイルティック(Miletic)他(1999) J. Virol. 73; 6114-6116)、超遠心分離中に安定であり異なる生物種に由来するいくつかの細胞株を感染させる能力があることが示されている。エボラウイルス由来のエンベロープタンパク質といった他のエンベロープタンパク質もまた用いることができる。

20

【0148】

本発明の一実施形態では、ベクター系はLMCvenvタンパク質を用いて偽型化することができる。

【0149】

本発明の別の実施形態では、ベクター系はエボラウイルス由来のエンベロープタンパク質を用いて偽型化することができる。

【0150】

本発明の別の実施形態では、ベクター系はアルファウイルスを用いて偽型化することができる。

30

【0151】

別の実施形態では、両種性MLV(MLV-A)、テナガザル白血病ウイルス(GALV)およびネコ内在性ウイルスRD114^{22,16}といったガンマレトロウイルス株由来のEnvを利用することができる。これらのEnvについての細胞受容体は互いに異なり、多様なヒト細胞型上で見出される²³。これらのEnvを有するMLVベクターは、in vitro²⁴⁻²⁶およびex vivo²⁷⁻³⁰の両方で、リンパ球およびCD34⁺前駆細胞といったいくつかの臨床的に意義のある細胞型の形質導入に用いられている。

【0152】

成熟ガンマレトロウイルスEnvは、ヘテロ二量体(複数)の三量体から成る。個々の二量体はウイルス外表面サブユニット(SU)および膜貫通サブユニット(TM)から成る。成熟タンパク質ではSUとTMはいくつかの非共有相互作用³¹および不安定なジスルフィド結合³²を介して結合している。

40

【0153】

本発明に記載の細胞から産生され、ガンマレトロウイルスEnvを用いて偽型化された、HIV-1ベクターといった高力価ベクターは、一過性に産生されたHIV-1(VSV-G)を含む他の系と比較して、多数の臨床状況および実験状況において有利でありうる。

【0154】

本発明はまた、ガンマレトロウイルスEnvの突然変異型、異型、ホモログまたは断片

50

も利用する。たとえば、RD114の細胞質尾部は、MLVエンベロープのもので置き換えることができ、またはRD114 EnvはRペプチド切断部位配列をHIV-1 Gag中のマトリクス-キャプシド切断部位のもので置き換えてRDproを生じることによって改変することができる。

【0155】

ガンマレトロウイルス偽型の力価は、ポリブレンおよび/またはスピノキュレーションの使用で増大できることを我々は見出している。ポリブレンおよびスピノキュレーションの使用は、ベクター形質導入を相加的に促進する。

【0156】

本発明の別の一実施形態では、ウイルスベクター系は、狂犬病Gタンパク質またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部、またはVSV Gタンパク質またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部、またはコカルウイルス糖タンパク質(GenBank AF045556)またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部、またはチャンディプラウイルス糖タンパク質(GenBank J04350)またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部、を用いて偽型化することができる。

【0157】

このように、本発明の一実施形態では、異種env領域が狂犬病Gタンパク質またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部、またはVSV Gタンパク質またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部、またはコカル糖タンパク質またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部、またはチャンディプラ糖タンパク質またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部を含み、標的脂肪組織部位へ形質導入するための、異種env領域を含むウイルスベクターの用途が提供される。

【0158】

異種env領域は、ウイルス産生プラスミド上に存在する遺伝子によってコードされる。ウイルス産生プラスミドは、本発明の第一の態様における用途に適したウイルスベクター粒子の産生のためのキットの一部として存在することができる。

【0159】

狂犬病Gタンパク質

本発明の別の一実施形態では、ベクターを狂犬病Gタンパク質またはその突然変異型、異型、ホモログまたは断片の少なくとも一部を用いて偽型化することができる。

【0160】

狂犬病Gタンパク質およびその突然変異型に関する教示は、国際公開第99/61639号パンフレットおよび同じくローズ(Rose)他, 1982 J. Virol. 43; 361-364, ハンハム(Hanham)他, 1993 J. Virol., 67, 530-542, タフロー(Tuffereau)他, 1998 J. Virol., 72, 1085-1091, クセラ(Kucera)他, 1985 J. Virol 55, 158-162, ディーツショルト(Dietzschold)他, 1983 PNAS 80, 70-74, サイフ(Seif)他, 1985 J. Virol., 53, 926-934, クーロン(Coulon)他, 1998 J. Virol., 72, 273-278, タフロー(Tuffereau)他, 1998 J. Virol., 72, 1085-10910, バーガー(Burger)他, 1991 J. Gen. Virol. 72, 359-367, ゴーディン(Gaudin)他 1995 J. Virol 69, 5528-5534, ベンマンズール(Benmansour)他 1991 J. Virol 65, 4198-4203, ルオ(Luo)他 1998 Microbiol Immunol 42, 187-193, コール(Coll) 1997 Arch Virol 142, 2089-2097, ルオ(Luo)他 1997 Virus Res 51, 35-41, ルオ(Luo)他 1998 Microbiol Immunol 42, 187-193, コール(Coll) 19

10

20

30

40

50

95 Arch Virol 140, 827-851, ツチヤ(Tuchiya)他 1992 Virus Res 25, 1-13, モリモト(Morimoto)他 1992 Virology 189, 203-216, ゴーディン(Gaudin)他 1992 Virology 187, 627-632, ホイット(Whitt)他 1991 Virology 185, 681-688, ディーツショルト(Dietzschold)他 1978 J Gen Virol 40, 131-139, ディーツショルト(Dietzschold)他 1978 Dev Biol Stand 40, 45-55, ディーツショルト(Dietzschold)他 1977 J Virol 23, 286-293, およびオトボス(Otvos)他 1994 Biochim Biophys Acta 1224, 68-76に見出すことができる。狂犬病 G タンパク質はまた欧州特許第 A-0445625号明細書にも記載されている。

10

【0161】

狂犬病 G タンパク質の使用は、狂犬病ウイルスが優先的に感染させる標的細胞へ *in vivo* で優先的に形質導入するベクターを提供する。これは、*in vivo* の脂肪組織標的細胞を含む。脂肪組織標的化ベクターには、ERA といった狂犬病の病原性株に由来する狂犬病 G が特に有効でありうる。一方、狂犬病 G タンパク質は、*in vitro* で、試験したほぼすべての哺乳類および鳥類細胞型を含む、より広い標的細胞範囲を与える(セガンチ(Seganti)他, 1990 Arch Virol. 34, 155-163; フィールズ(Fields)他, 1996『フィールズのウイルス学』(Fields Virology)第3版第2巻、リップニコット-レイブン社(Lippincott-Raven Publishers)、フィラデルフィア、ニューヨーク)。

20

【0162】

偽型化されたベクター粒子の親和性は、細胞外ドメインが改変された突然変異狂犬病 G の使用によって改変することができる。狂犬病 G タンパク質は、標的細胞範囲を制限するために突然変異が可能であるという利点を有する。標的細胞による *in vivo* の狂犬病ウイルスの取り込みは、アセチルコリン受容体(AChR)によって媒介されると考えられているが、しかし狂犬病ウイルスが *in vivo* で結合する他の受容体が存在する(ハンハム(Hanham)他, 1993 J. Virol., 67, 530-542; タフロー(Tuffereau)他, 1998 J. Virol., 72, 1085-1091)。ウイルス進入には神経系において、NCAM(サウルーズ(Thoulouze)他(1998)J. Virol 72(9); 7181-90)および p75 ニューロトロフィン受容体(タフロー(Tuffereau)C他(1998)Embo J 17(24) 7250-9)を含む複数の受容体が用いられると考えられている。

30

【0163】

狂犬病 G タンパク質の抗原性部位 III における突然変異のウイルス親和性に対する効果が調べられており、この領域はアセチルコリン受容体へのウイルスの結合に関与しないと考えられる(クセラ(Kucera)他, 1985 J. Virol 55, 158-162; ディーツショルト(Dietzschold)他, 1983 Proc Natl Acad Sci 80, 70-74; サイフ(Seif)他, 1985 J. Virol., 53, 926-934; クーロン(Coulon)他, 1998 J. Virol., 72, 273-278; タフロー(Tuffereau)他, 1998 J. Virol., 72, 1085-10910)。たとえば成熟タンパク質中のアミノ酸 333 位のアルギニンのグルタミンへの突然変異は、*in vivo* で嗅覚神経細胞および末梢神経細胞へのウイルス進入を制限する一方で中枢神経系への増殖を減少させるのに用いることができる。これらのウイルスは、野生型ウイルスと同程度に効率的に、運動神経細胞および感覚神経細胞へ侵入することができたが、それでも神経細胞間伝播は起こらなかった(クーロン(Coulon)他, 1989, J. Virol. 63, 3550-3554)。ウイルスアミノ酸 330 が突然変異したウイルスは、さらに弱毒化され、筋肉内注射後に運動神経細胞または感覚神経細胞のどちらも感染させることができ

40

50

ない(クーロン(Coulon)他, 1998 J. Virol., 72, 273-278)。

【0164】

代替的に、または加えて、狂犬病の実験室継代株由来の狂犬病Gタンパク質を用いることができる。これらは親和性における変化についてスクリーニングすることができる。そのようなウイルス株は下記を含む；

Genbank登録番号	狂犬病株
J02293	ERA
U52947	COSRV
U27214	NY516
U27215	NY771
U27216	FLA125
U52946	SHBRV
M32751	HEP-Flury

10

20

30

【0165】

一例として、ERA株は狂犬病の病原性株であり、この株に由来する狂犬病Gタンパク質は神経細胞の形質導入に用いることができる。ERA株由来の狂犬病Gの配列はGenBankデータベースにある(登録番号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、成熟タンパク質は転写開始メチオニンから20番目のアミノ酸のリジン残基から始まる。HEP-Flury株は、成熟タンパク質中の333位アミノ酸のアルギニンからグルタミンへの突然変異を含み、これは病原性低下に関連し、ウイルスエンベロープの親和性を制限するのに用いることができる。

【0166】

国際公開第99/61639号パンフレットは、狂犬病ウイルスERA株について核酸配列およびアミノ酸配列を開示する(Genbank遺伝子座RAVGPLS、登録番号M38452)。

【0167】

VSV-Gタンパク質

ラドウイルスの一種である水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロープ糖タンパク質(G)は、ある種のレトロウイルスを偽型化することができることが示されているもう1つのエンベロープタンパク質である。

40

【0168】

MoMLVを基礎とするレトロウイルスベクターを、レトロウイルスエンベロープタンパク質の非存在下で偽型化するその能力は、エミ(Emi)他によって最初に示された(1991 Journal of Virology 65; 1202-1207)。国際公開第94/294440号パンフレットは、VSV-Gを用いてレトロウイルスベクターの偽型化に成功しうることを教示する。これらの偽型化されたVSV-Gベクターは、幅広い哺乳類細胞に形質導入するのに用いることができる。より近年には、アベ(Abe)他(J Virol 1998 72(8)6356-6361)は、非感染性レトロウイルス粒子をVSV-Gの添加によって感染性にすることができることを教示する。

50

【0169】

バーズ (Burns) 他 (1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90; 8033-7) は、VSV-G を用いてレトロウイルス MLV の偽型化に成功し、これは結果として、天然型の MLV と比較して変化した宿主範囲を有するベクターを生じた。VSV-G 偽型化ベクターは、哺乳類 細胞だけでなく、魚類、爬虫類、および昆虫に由来する細胞株もまた感染させることが示されている (バーズ (Burns) 他 1993、同節)。それらはまた、さまざまな細胞株について、従来の両種性エンベロープよりも効率的であることも示されている (イー (Yee) 他, 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91; 9564-9568, リン (Lin), エミ (Emi) 他, 1991 Journal of Virology 65; 1202-1207)。VSV-G タンパク質の細胞質尾部はレトロウイルスコアと相互作用することができるため、VSV-G タンパク質を用いて一部のレトロウイルスを偽型化することができる。

10

【0170】

VSV-G タンパク質といった非レトロウイルス偽型化エンベロープの提供は、ベクター粒子を感染性の損失無しで高力価に濃縮することができるという長所を与える (アッキナ (Akkina) 他, 1996 J. Virol. 70; 2581-5)。レトロウイルスエンベロープタンパク質は、おそらく2個の非共有結合したサブユニットから成るために、明らかに超遠心分離中のせん断力に耐えられない。サブユニット間の相互作用は遠心分離によって破壊されうる。対照的に、VSV 糖タンパク質は単一のユニットから成る。VSV-G タンパク質偽型化は、したがって、潜在的な利点を提供する。

20

【0171】

国際公開第00/52188号パンフレットは、安定なウイルス産生細胞株からの、水疱性口内炎ウイルス-Gタンパク質 (VSV-G) を膜結合ウイルスエンベロープタンパク質として有する偽型化レトロウイルスベクターの作製を記載し、VSV-Gタンパク質について遺伝子配列を提供する。

【0172】

VSV 糖タンパク質と比較して、狂犬病糖タンパク質を用いることの潜在的な利点は、狂犬病ワクチンの広範囲の使用による、ヒトおよび他の動物に対するその毒性の詳細な知識である。特に、カナリア痘組み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ついて第1相臨床試験が報告されており (フリース (Fries) 他, 1996 Vaccine 14, 428-434)、これらの試験はそのワクチンはヒトにおける使用について安全であったと結論した。

30

【0173】

突然変異型、異型、ホモログ、および断片

本発明の一実施形態では、本発明に用いられるレトロウイルスベクター系はエンベロープタンパク質の突然変異型、異型、ホモログ、または断片を用いて偽型化することができる。

【0174】

「野生型」の語は、天然タンパク質 (すなわちウイルスタンパク質) と同一である一次アミノ酸配列を有するポリペプチドを意味するのに用いられる。

40

【0175】

「突然変異型」の語は、野生型配列とは1つ以上のアミノ酸付加、置換、または欠失で異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドを意味するのに用いられる。突然変異型は天然に生じうるかまたは、人工的に作製しうる (たとえば部位特異的突然変異誘発によって)。好ましくは突然変異型は野生型配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。好ましくは突然変異型は野生型配列全体にわたって20個以下の突然変異を有する。より好ましくは突然変異型は野生型配列全体にわたって10個以下の突然変異、非常に好ましくは5個以下の突然変異を有する。

【0176】

50

「異型」の語は、野生型配列とは異なる天然に存在するポリペプチドを意味するのに用いられる。異型は同一のウイルス株内で見出されうる（すなわちそのタンパク質の2個以上のアイソフォームが存在する場合）かまたは別の株で見出されうる。好ましくは異型は野生型配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。好ましくは異型は野生型配列全体にわたって20個以下の突然変異を有する。より好ましくは異型は野生型配列全体にわたって10個以下の突然変異、非常に好ましくは5個以下の突然変異を有する。

【0177】

ここでは、「ホモログ」の語は、野生型アミノ酸配列および野生型ヌクレオチド配列と一定のホモロジーを有するものを意味する。ここでは、「ホモロジー」の語は、「同一性」と同一視することができる。

10

【0178】

この背景では、相同な配列は、対象配列と少なくとも75、85または90%同一でありうる、好ましくは少なくとも95または98%同一でありうるアミノ酸配列を含むものとする。典型的には、ホモログは対象アミノ酸配列と同一の活性部位などを含む。ホモロジーはまた類似性（すなわち類似した化学的性質/機能を有するアミノ酸残基）の点から考えることもできるが、本発明との関連ではホモロジーを配列同一性の点から表すのが好ましい。

【0179】

この背景では、相同な配列は、対象配列と少なくとも75、85または90%同一でありうる、好ましくは少なくとも95または98%同一でありうるヌクレオチド配列を含むものとする。典型的には、ホモログは対象配列と同一の、活性部位などをコードする配列を含む。ホモロジーはまた類似性（すなわち類似した化学的性質/機能を有するアミノ酸残基）の点から考えることもできるが、本発明との関連ではホモロジーを配列同一性の点から表すのが好ましい。

20

【0180】

ホモロジー比較は、目視によって、またはより普通には、容易に入手可能な配列比較プログラムを用いて実施することができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間の%ホモロジーを計算することができる。

【0181】

%ホモロジーは連続配列にわたって計算することができ、すなわち一方の配列を他方の配列と整列させて、一方の配列中の各アミノ酸を他方の配列の対応するアミノ酸と、一度に一残基直接比較することができる。これは「ギャップ無し」整列と呼ばれる。典型的には、そのようなギャップ無し整列は相対的に短い数の残基にわたってだけ実施される。

30

【0182】

これは非常に単純で一貫した方法であるが、これはたとえば、他の点では同一である一対の配列で、1つの挿入または欠失が、以降のアミノ酸残基を整列から押し出し、全体の整列が実施される際にそのようにして潜在的に%ホモロジーの大幅な低下を結果として生じることの考慮していない。このため、大部分の配列比較方法は、全体のホモロジー得点に過度に失点を課すことなく、可能な挿入および欠失を考慮に入れた最適整列を生じるように設計されている。これは、局所的ホモロジーの最大化を試みるように、配列整列中に「ギャップ」を挿入することによって達成される。

40

【0183】

しかし、これらのより複雑な方法は、同数の同一なアミノ酸について、可能な限り少数のギャップ（比較される2つの配列間のより高い関連性を反映する）を持つ配列整列が、多数のギャップを持つものよりも高得点を取るように、整列中に生じる各ギャップに「ギャップ失点」を割り当てる。ギャップの存在に相対的に高いコスト、およびそのギャップ中の後続の各残基についてより小さい失点を課す「アフィンギャップコスト」が典型的には用いられる。これは最も広く用いられるギャップ採点系である。高いギャップ失点はもちろん、ギャップがより少ない、最適化された整列を生じる。大部分の整列プログラムは、ギャップ失点を改変することができる。しかし、配列比較のためのそのようなソフトウ

50

エアを用いる場合は、既定値を用いることが好ましい。たとえばG C G ウィスコンシン・ベストフィット (Wisconsin Bestfit) パッケージを用いる場合は、アミノ酸配列についてのギャップ失点既定値は、1ギャップについて - 12、伸長ごとに - 4である。

【0184】

最大%ホモロジーの計算は、したがって、第一にギャップ失点を考慮した最適整列の作製を要する。そのような整列を実施するために適したコンピュータープログラムはG C G ウィスコンシン・ベストフィット (Wisconsin Bestfit) パッケージである (米国ウィスコンシン大学 (University of Wisconsin) ; デベロー (Devereux) 他, 1984, Nucleic Acids Research 12; 387)。配列比較を実施することができる他のソフトウェアの例は、ブラスト (BLAST) パッケージ (アウスベル (Ausubel) 他, 1999前記 - 18章を参照)、ファスタ (FASTA) (アチュール (Atschul) 他, 1990, J. Mol. Biol., 403 - 410) および比較ツールのジーンワークス (GENEWORKS) 一式を含むがそれらに限定されない。BLASTとFASTAは共にオフラインおよびオンライン検索に利用可能である (アウスベル (Ausubel) 他, 1999前記、7 - 58から7 - 60ページ参照)。しかし、一部の用途には、G C G ベストフィット (Bestfit) プログラムを用いるのが好ましい。ブラスト2シーケンス (BLAST 2 Sequences) という新しいツールもまた、タンパク質およびヌクレオチド配列を比較するために利用可能である (FEMS Microbiol Lett 1999 174 (2); 247 - 50; FEMS Microbiol Lett 1999 177 (1); 187 - 8およびtatiana@ncbi.nlm.nih.govを参照)。

【0185】

最終的な%ホモロジーは同一性に関して測定することができるが、整列過程自体は典型的には、全か無か (all-or-nothing) の対比較には基づかない。代わりに、化学的類似性または進化的距離に基づく対比較ごとに得点を割り当てる、換算類似性得点行列が一般的に用いられる。普通に用いられるそのような行列の一例は、BLASTプログラム一式に用いられる既定値行列の、BLOSUM62行列である。G C G ウィスコンシン (Wisconsin) プログラムは一般的に、公開の既定値かまたは、もしあれば個別のシンボル比較表かのどちらかを用いる (さらなる詳細は取扱説明書を参照)。一部の用途には、G C G パッケージ用の公開既定値、または他のソフトウェアの場合にはBLOSUM62といった既定値行列を用いることが好ましい。

【0186】

ソフトウェアが最適整列を一旦作製すると、%ホモロジー、好ましくは%配列同一性を計算することが可能である。ソフトウェアは典型的にはこれを配列比較の一部として実施し、数値結果を生成する。

【0187】

配列はまた、サイレント変化を生じその結果として機能的に等価な物質を生じるアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換を有しうる。物質の二次結合活性が保持される限り、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または残基の両親媒的性質における類似性に基づいて、意図的なアミノ酸置換を行いうる。たとえば、負に荷電したアミノ酸はアスパラギン酸およびグルタミン酸を含む; 正に荷電したアミノ酸はリジンおよびアルギニンを含む; および、同様の親水性値を有する、非荷電の極性頭部基を持つアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンを含む。

【0188】

保存的置換は、たとえば下記の表に従って行うことができる。2列目で同一区分にあり、および好ましくは3列目で同一行にあるアミノ酸は互いに置換が可能である;

脂肪族	非極性	G A P
		I L V
	極性－非荷電	C S T M
		N Q
	極性－荷電	D E
K R		
芳香族		H F W Y

10

【0189】

本発明はまた、相同置換（置換および交換は両方ともここでは、既存のアミノ酸残基の、別の残基との置き換えを意味するように用いられる）、すなわち塩基性に塩基性、酸性に酸性、極性に極性、などといった同等の置換が起こりうることを包含する。非相同置換、すなわちある種類の残基から別の種類への置換もまた起こる可能性があり、または代替的にオルニチン（以後Zと呼ぶ）、ジアミノ酪酸オルニチン（以後Bと呼ぶ）、ノルロイシンオルニチン（以後Oと呼ぶ）、ピリジル（pyrilyl）アラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、およびフェニルグリシンといった非天然アミノ酸を含めることを含む。

20

【0190】

交換はまた、下記を含む非天然アミノ酸によっても行いうる；アルファ^{*}およびアルファ^{*}ニ置換^{*}アミノ酸、N-アルキルアミノ酸^{*}、乳酸^{*}、トリフルオロチロシン^{*}、p-Cl-フェニルアラニン^{*}、p-Br-フェニルアラニン^{*}、p-I-フェニルアラニン^{*}といった天然アミノ酸のハロゲン化誘導体、L-アリル-グリシン^{*}、^{*}-アラニン^{*}、L-^{*}-アミノ酪酸^{*}、L-^{*}-アミノ酪酸^{*}、L-^{*}-アミノイソ酪酸^{*}、L-^{*}-アミノカプロン酸[#]、7-アミノヘプタン酸^{*}、L-メチオニンスルホン^{#*}、L-ノルロイシン^{*}、L-ノルバリン^{*}、p-ニトロ-L-フェニルアラニン^{*}、L-ヒドロキシプロリン[#]、L-チオプロリン^{*}、4-メチル-Phe^{*}、ペンタメチル-Phe^{*}といったフェニルアラニン（Phe）のメチル誘導体、L-Phe（4-アミノ）[#]、L-Tyr（メチル）^{*}、L-Phe（4-イソプロピル）^{*}、L-Tic（1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸）^{*}、L-ジアミノプロピオン酸（およびL-Phe（4-ベンジル）^{*}）。記号^{*}は上記の考察の目的に用いられ（相同または非相同置換に関して）、誘導体の疎水的性質を示し、一方で[#]は誘導体の親水的性質を示すのに用いられ、^{#*}は両親媒的性質を示す。

30

【0191】

異型アミノ酸配列は、グリシンまたは^{*}-アラニン残基といったアミノ酸スペーサーに加えて、メチル、エチル、またはプロピル基といったアルキル基を含む、配列の任意の2個のアミノ酸残基間に挿入することができる適当なスペーサー基を含みうる。他の形の変化は、ペプチド型の1つ以上のアミノ酸残基の存在を含み、当業者によく理解される。疑いを避けるために、「ペプチド型」は、^{*}-炭素置換基がその残基の^{*}-炭素上でなく窒素原子上にある異型アミノ酸残基をいうのに用いられる。ペプチド型のペプチドを調製するための過程は本分野で既知であり、たとえばサイモン（Simon）R J 他、PNAS（1992）89（20），9367-9371およびホーウェル（Howell）DC，Trends Biotechnol.（1995）13（4），132-134。

40

50

【0192】

「断片」の語は、ポリペプチドが野生型アミノ酸配列の一部を含むことを示す。断片は配列の1つ以上の大きな連続部分または複数の小さな部分を含みうる。そのポリペプチドはまた配列の他の要素も含むことができ、たとえば、それは別のタンパク質との融合タンパク質でありうる。好ましくはそのポリペプチドは、野生型配列の少なくとも50%、より好ましくは少なくとも65%、非常に好ましくは少なくとも80%を含む。

【0193】

機能に関しては、突然変異型、異型、ホモログ、または断片は、適当なベクターを偽型化するのに用いられた場合、細胞に形質導入することができる。

【0194】

本発明で用いられるレトロウイルスベクターは、ここに示すヌクレオチド配列（ここに示すものの相補配列を含む）と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みうる。好ましい一態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列と厳密条件下で（たとえば65°Cおよび0.1SSC）、ここに示すヌクレオチド配列（ここに示すものの相補配列を含む）とハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を包含する。

【0195】

NOI

本発明では、1つ以上のNOI（目的のヌクレオチド配列）を標的細胞へ*in vivo*または*in vitro*で配送することができる。

【0196】

本発明にしたがって、異種NOIでありうる1つ以上のNOIで置換または補完されるように、ウイルスゲノムを操作することが可能である。

【0197】

「異種」の語は、天然には結合していない核酸配列またはタンパク質配列と結合した、核酸配列またはタンパク質配列をいう

【0198】

本発明では、NOIの語は任意の適当なヌクレオチド配列を含み、完全な天然に存在するDNAまたはRNA配列である必要はない。したがって、NOIはたとえば、合成RNA/DNA配列、組み換えRNA/DNA配列（すなわち組み換えDNA技術を用いて調製された）、cDNA配列、または部分ゲノムDNA配列であることができ、その組み合わせを含む。配列はコード領域である必要はない。コード領域である場合は、完全なコード領域である必要はない。加えて、そのRNA/DNA配列はセンス方向またはアンチセンス方向であることができる。好ましくは、それはセンス方向である。好ましくは、配列はcDNAを含むかまたはcDNAから転写される。

【0199】

レトロウイルスベクターゲノムは一般的に、5'末端および3'末端のLTR、1つ以上のNOIを挿入するための適当な挿入部位、および/またはウイルス産生細胞中でゲノムがベクター粒子にパッケージングされることを可能にするパッケージングシグナルを含みうる。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、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しうる。好ましい一実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は逆転写系（適合性逆転写およびプライマー結合部位）および組み込み系（適合性インテグラーゼおよび組み込み部位）を有する。

【0200】

NOIは目的のタンパク質（「POI」）をコードすることができる。このようにして、標的細胞における外来遺伝子の発現の効果を調べるのに、レトロウイルス配送系を用いることができる。たとえば、レトロウイルス配送系を用いて、標的部位に及ぼす特定の作用に関してcDNAライブラリをスクリーニングすることができる。

【0201】

NOIは標的部位において遺伝子の発現を遮断または阻害する能力を有しうる。たとえ

10

20

30

40

50

ば、NOIはアンチセンス配列または干渉するRNA配列でありうる。アンチセンス技術を用いた遺伝子発現の阻害はよく知られている。

【0202】

NOIまたはそれに由来する配列は、標的部位において特定遺伝子の発現を「ノックアウト」する能力を有しうる。いくつかの「ノックアウト」戦略が本分野で既知である。たとえば、NOIは、特定遺伝子の発現を妨害するように標的部位の細胞のゲノムに組み込まれる能力を有しうる。NOIは、たとえば、早期終止コドンを導入することによって、下流コード配列を読み枠から外すことによって、またはコードされたタンパク質の折りたたみ能力に影響を及ぼすことによって（それによってその機能に影響する）、発現を妨害しうる。

10

【0203】

代替的に、NOIは標的部位において遺伝子の異所性発現を促進または誘導する能力を有しうる。NOIまたはそれに由来する配列は、特定遺伝子の発現を「ノックイン」する能力を有しうる。

【0204】

特定の遺伝子を発現するかまたは特定の遺伝子の発現を欠く、形質導入された細胞は、創薬および標的評価に用途を有する。その発現系を用いて、どの遺伝子が標的組織細胞に対して望ましい作用を有するかを判定することができる。

【0205】

本発明のウイルス配送系によって配送されたNOIは、選択遺伝子、またはマーカー遺伝子であることができる。多数の異なる選択可能なマーカーが、レトロウイルスベクターにおける使用に成功している。

20

【0206】

本発明のウイルス配送系によって配送されたNOIは、その遺伝子自身が治療効果を導く能力を有しうるかまたは治療効果を導く能力を持つ産物をコードしうるという意味で、治療遺伝子であることができる。

【0207】

本発明にしたがって、適当なNOIは、下記のような治療および/または診断用途のものを含むがそれらに限定されない；サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、抗酸化剤分子、組み換え免疫グロブリン様分子、一本鎖抗体、融合タンパク質、酵素、免疫共刺激分子、免疫調節分子、アンチセンスRNA、標的タンパク質の種横断優性阻害突然変異型、毒素、条件毒素、抗原、腫瘍抑制因子タンパク質および増殖因子、膜タンパク質、血管作用性タンパク質およびペプチド、抗ウイルスタンパク質およびリボザイム、およびその誘導體（たとえば付随するレポーター基を持つ）をコードする配列。NOIはまた、プロドラッグ活性化酵素をコードすることができる。

30

【0208】

ここで用いられる「抗体」は、完全な免疫グロブリン分子、またはその一部、またはそのバイオイソスターまたはミメティック、またはその誘導體、またはその組み合わせを含む。その一部の例は；Fab、F(ab)₂、およびFvを含む。バイオイソスターの例は、一本鎖Fv（ScFv）断片、キメラ抗体、二価抗体を含む。

40

【0209】

「ミメティック」の語は、抗体と同じ結合特異性を有する、ペプチド、ポリペプチド、抗体、または他の有機化学物質でありうる化学物質に関する。

【0210】

ここで用いられる「誘導體」の語は、抗体の化学的修飾を含む。そのような修飾の例は、アルキル、アシル、またはアミノ基による水素の交換である。

【0211】

スクリーニング法

別の態様では、本発明はまた、スクリーニング法およびそのような方法によって単離可能な調節因子、およびそのような因子の用途に関する。

50

【 0 2 1 2 】

一実施形態では、本発明は細胞についての調節因子に関するスクリーニングのための方法を提供し、その方法は下記の段階を含む；

- (i) 標的細胞を提供する；
- (i i) 複数の候補化合物をコードすることができる c D N A ライブラリを、本発明のレトロウイルスベクターを用いて細胞に形質導入する；
- (i i i) 候補化合物の発現を監視する；および
- (i i i i) 標的細胞の活性を調節することができる候補化合物に関してスクリーニングする。

【 0 2 1 3 】

c D N A ライブラリは、レンチウイルスベクター中に構築されたりボザイムライブラリであることができる。リボザイムライブラリは、ハンマーヘッドリボザイム、E G S、またはグループ I E イントロンリボザイムを含むことができるがそれらに限定されない。リボザイムライブラリは目的の細胞型に *i n v i t r o* および *i n v i v o* で形質導入するのに用いることができる。これらの細胞を次いで、目的の表現型に関してスクリーニングすることができる。遺伝子またはリボザイムに影響された遺伝子は、リボザイムの P C R 分析によって明らかにすることができる。リボザイムに関する一般的教示については、国際公開第 9 9 / 4 1 3 9 7 号パンフレットを参照。

【 0 2 1 4 】

好ましくはレトロウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。レンチウイルスベクターを用いてこれを行うことの利点は、それが初代（非分裂）細胞の形質導入を可能にすることである。

【 0 2 1 5 】

医薬組成物

本発明はまた、本発明のレトロウイルスベクターの、医薬組成物の製造における用途を提供する。医薬組成物は、N O I を、それを必要とする標的細胞へ配送するのに用いることができる。

【 0 2 1 6 】

医薬組成物は遺伝子治療によって個体を治療するのに用いることができ、ここで組成物は本発明に記載のレトロウイルスベクター系の治療上有効な量を含むかまたは産生することができる。

【 0 2 1 7 】

本発明の方法および医薬組成物は、ヒトまたは動物の対象を治療するのに用いることができる。好ましくは対象は哺乳類対象である。より好ましくは対象はヒトである。典型的には、医師が個別の対象について最適となる実際の投与量を決定し、投与量はその特定の患者の年齢、体重、および反応に応じて変化する。

【 0 2 1 8 】

組成物は随意的に、医薬品として許容されるキャリアー、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを含むことができる。キャリアー、賦形剤または希釈剤の選択は、予定の投与経路および標準的な医療行為に関して選ぶことができる。医薬組成物は、キャリアー、賦形剤または希釈剤として（またはそれに加えて）、任意の適当な結合剤、滑沢剤、懸濁剤、コーティング剤、可溶化剤、および標的組織部位へのウイルス進入を助けるかまたは増加させる他のキャリアー物質（たとえば脂質配送系のような）を含むことができる。

【 0 2 1 9 】

適当な場合には、医薬組成物は下記のいずれか 1 つ以上によって投与することができる；吸入、坐剤またはペッサリーの形で、ローション、液剤、クリーム、軟膏、または散布剤の形で局所的に、皮膚パッチを用いて、経口的にデンプンまたは乳糖といった賦形剤を含む錠剤の形で、または、カプセル剤または胚珠状で単独でまたは賦形剤と混合して、または、香料または着色料を含むエリキシル剤、液剤または懸濁剤の形で、または非経口的に、たとえば海綿体内に、静脈内に、筋肉内にまたは皮下に注射することができる。非経

10

20

30

40

50

口投与のためには、組成物はたとえば溶液を血液と等張にするために十分な塩または単糖といった他の物質を含みうる、無菌水溶液の形で最善に用いることができる。口内または舌下投与のためには、組成物は従来の方法で処方することができる錠剤またはトローチ剤の形で投与することができる。

【0220】

本発明で用いられるベクター系は、患者への直接注射によって便利に投与することができる。

【0221】

疾患

本発明のベクター系による1つ以上の治療遺伝子の配送は、単独で、または他の治療または治療の構成要素と組み合わせて用いることができる。

10

【0222】

たとえば、本発明のレトロウイルスベクターは、国際公開第A-98/05635号パンフレットに列挙された疾患の治療に有用な1つ以上のNOIを配送するのに用いることができる。参照の簡略化のため、その一覧の一部をここに提供する；がん、炎症または炎症性疾患、皮膚疾患、発熱、心血管作用、出血、凝固および急性期反応、カヘキシー、食欲不振症、急性感染、HIV感染、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、偏頭痛およびアスピリン依存性抗血栓症；腫瘍増殖、浸潤および伝播、血管新生、転移、悪性腹水および悪性胸水；脳虚血、虚血性心疾患、変形性関節炎、慢性関節リウマチ、骨粗鬆症、喘息、多発性硬化症、神経変性、アルツハイマー病、アテローム性硬化症、脳卒中、血管炎、クローン病および潰瘍性大腸炎；歯周炎、歯肉炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性潰瘍、表皮水疱症；角膜潰瘍形成、網膜症および外科創傷治癒；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、アテローム性硬化症または内膜硬化症。

20

【0223】

加えて、または別の方法では、本発明のレトロウイルスベクターは、国際公開第A-98/07859号パンフレットに列挙された疾患の治療に有用な1つ以上のNOIを配送するのに用いることができる。参照の簡略化のため、その一覧の一部をここに提供する；サイトカインおよび細胞増殖/分化活性；免疫抑制または免疫刺激活性（たとえばヒト免疫不全ウイルスによる感染を含む免疫不全を治療するため；リンパ球増殖の調節；がんおよび多数の自己免疫疾患の治療、および移植片拒絶を防ぐかまたは腫瘍免疫を誘導するため）；造血の調節、たとえば骨髄疾患またはリンパ性疾患の治療；たとえば創傷治癒、火傷、潰瘍、および歯周疾患および神経変性の治療のための、骨、軟骨、腱、靭帯および神経組織の増殖の促進；濾胞刺激ホルモンの阻害または活性化（生殖能の調節）；走化性/化学運動性活性（たとえば特定の細胞型を傷害または感染の部位へ動員するため）；止血活性および血栓溶解活性（たとえば血友病および脳卒中を治療するため）；抗炎症活性（たとえば敗血性ショックまたはクローン病を治療するため）；抗菌剤として；たとえば代謝または行動の調節因子として；鎮痛剤として；特定の不全症の治療；たとえば感染の治療に、医学または獣医学において。

30

【0224】

加えて、または別の方法では、本発明のレトロウイルスベクターは、国際公開第A-98/09985号パンフレットに列挙された疾患の治療に有用な1つ以上のNOIを配送するのに用いることができる。参照の簡略化のため、その一覧の一部をここに提供する；マクロファージ阻害活性および/またはT細胞阻害活性およびしたがって、抗炎症活性；抗免疫活性、すなわち細胞性および/または体液性免疫反応に対する阻害作用、炎症に伴わない反応を含む；マクロファージおよびT細胞の、細胞外マトリクス成分およびフィブロネクチンに接着する能力、およびT細胞におけるアップレギュレートされたfas受容体発現を阻害する；慢性関節リウマチを含む関節炎、過敏性、アレルギー反応、喘息、全身性エリテマトーデス、膠原病、および他の自己免疫疾患に伴う炎症、アテローム性硬化症、動脈硬化症、アテローム硬化性心疾患、再灌流傷害、心停止、心筋梗塞、血管炎症

40

50

性疾患、呼吸窮迫症候群または他の心肺疾患に伴う炎症、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎および消化管の他の疾患に伴う炎症、肝線維症、肝硬変または他の肝疾患、甲状腺炎または他の腺疾患、糸球体腎炎または他の腎および泌尿器疾患、耳炎または他の耳鼻咽喉疾患、皮膚炎または他の皮膚疾患、歯周疾患または他の歯科疾患、精巣炎または精巣・精巣上体炎、不妊症、精巣外傷または他の免疫関連精巣疾患、胎盤機能障害、胎盤機能不全、習慣流産、子癇、子癇前症および他の免疫および/または炎症性関連婦人科疾患、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、ブドウ膜強膜炎、視神経炎、眼内炎症、たとえば網膜炎または嚢胞様黄斑浮腫、交感性眼炎、強膜炎、網膜色素変性症、変性眼底疾患の免疫および炎症性要素、眼外傷の炎症性要素、感染によって引き起こされる眼炎症、増殖性硝子体網膜炎、急性虚血性視神経症、たとえば緑内障手術後の過度の癒痕、眼インプラントに対する免疫および/または炎症反応、および他の免疫および炎症性関連眼疾患、自己免疫疾患または症状に伴う炎症、または、中枢神経系(CNS)または任意の他の臓器の両方で、免疫および/または炎症抑制が有益である疾患、パーキンソン病、パーキンソン病の治療に由来する合併症および/または副作用、AIDS関連痴呆症候群、HIV関連脳症、デビック病、シデナム舞踏病、アルツハイマー病および他の変性疾患、症状、またはCNS疾患、脳卒中(strokes)の炎症性要素、ポリオ後症候群、精神疾患の免疫および炎症性要素、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性全脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、ギラン・バレー症候群、シデナム舞踏病(chorea)、重症筋無力症、特発性頭蓋内圧亢進症、ダウン症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、CNS圧迫またはCNS外傷またはCNS感染の炎症性要素、筋萎縮症および筋ジストロフィーの炎症性要素、および、中枢および末梢神経系の免疫および炎症性関連疾患、症状または障害、外傷後炎症、敗血性ショック、感染症、手術または骨髄移植の炎症性合併症または副作用、またはその他の移植合併症および/または副作用、遺伝子治療のたとえばウイルスキャリアーの感染による炎症性および/または免疫合併症および副作用、または体液性および/または細胞性免疫反応を抑制または阻害するAIDSに関連する炎症、単球または白血球増殖性疾患、たとえば白血病を、単球またはリンパ球の量を減らすことによって治療または改善すること、角膜、骨髄、臓器、レンズ、ペースメーカー、天然または人工皮膚組織といった天然または人工細胞、組織、および臓器の移植術の場合に移植片拒絶の防止および/または治療のため、を含む、望ましくない免疫反応および炎症を阻害する。

【0225】

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医薬組成物を提供し、ここでその組成物は、1つ以上の配送可能な治療および/または診断NOI、またはそれによって産生されたかまたはそれから得られたウイルス粒子を含む、本発明のレトロウイルスベクターの治療上有効な量を含む。医薬組成物はヒト用または動物用であることができる。典型的には、医師が個別の対象について最適となる実際の投与量を決定し、投与量はその特定の個体の年齢、体重、および反応に応じて変化する。

【0226】

組成物は随意的に、医薬品として許容されるキャリアー、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを含むことができる。キャリアー、賦形剤または希釈剤の選択は、予定の投与経路および標準的な医療行為に関して選ぶことができる。医薬組成物は、キャリアー、賦形剤または希釈剤として(またはそれに加えて)、任意の適当な結合剤、滑沢剤、懸濁剤、コーティング剤、可溶化剤、および標的部位へのウイルス進入を助けるかまたは増加させる他のキャリアー物質(たとえば脂質配送系のような)を含むことができる。

【0227】

適当な場合には、医薬組成物は下記のいずれか1つ以上によって投与することができる; 吸入、坐剤またはペッサリーの形でローション、液剤、クリーム、軟膏、または散布剤の形で局所的に、皮膚パッチを用いて、経口的にデンプンまたは乳糖といった賦形剤を含む錠剤の形で、または、カプセル剤または胚珠状で単独でまたは賦形剤と混合して、または、香料または着色料を含むエリキシル剤、液剤または懸濁剤の形で、または非経口的に

10

20

30

40

50

、たとえば海綿体内に、静脈内に、筋肉内にまたは皮下に注射することができる。非経口投与のためには、組成物はたとえば溶液を血液と等張にするために十分な塩または単糖といった他の物質を含みうる、無菌水溶液の形で最善に用いることができる。口内または舌下投与のためには、組成物は従来の方法で処方することができる錠剤またはトローチ剤の形で投与することができる。

【0228】

本発明に記載のベクター系による1つ以上の治療遺伝子の配送は、単独で、または他の治療または治療の構成要素と組み合わせて用いることができる。治療することができる疾患は；がん、神経疾患、遺伝性疾患、心疾患、脳卒中、関節炎、ウイルス感染、および免疫系の疾患を含むがそれらに限定されない。適当な治療遺伝子は、腫瘍抑制因子タンパク質、酵素、プロドラッグ活性化酵素、免疫調節分子、抗体、組み換え免疫グロブリン様分子、融合タンパク質、ホルモン、膜タンパク質、血管作用性タンパク質またはペプチド、サイトカイン、ケモカイン、抗ウイルスタンパク質、アンチセンスRNA、およびリボザイムをコードするものを含む。

10

【0229】

本発明に記載の治療方法の好ましい一実施形態では、プロドラッグ活性化酵素をコードする遺伝子を本発明のベクター系を用いて腫瘍へ配送し、その個体を次いで適当なプロドラッグを用いて治療する。プロドラッグの例は、リン酸エトポシド（アルカリホスファターゼと共に使用、センター（Senter）他、1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85；4842-4846）；5-フルオロシトシン（シトシンデアミナーゼと共に、ミュレン（Mullen）他1994 Cancer Res. 54；1503-1506）；ドキソルピシン-N-p-ヒドロキシフェノキシアセトアミド（ペニシリン-V-アミダーゼと共に（カー（Kerr）他1990 Cancer Immunol. Immunother. 31；202-206）；グルタミン酸パラ-N-ビス（2-クロロエチル）アミノベンゾイル（カルボキシペプチダーゼG2と共に）；セファロsporinナイトロジェンマスタードカルバメート（b-ラクタマーゼと共に）；SR4233（P450還元酵素と共に）；ガンシクロビル（HSVチミジンキナーゼと共に、ボレリ（Borrelli）他1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85；7572-7576）、マスタードプロドラッグ、ニトロ還元酵素と共に（フリードロス（Friedlos）他1997 J Med Chem 40；1270-1275）、およびシクロホスファミドまたはイホスファミド（シトクロムP450と共に、チェン（Chen）他1996 Cancer Res 56；1331-1340）を含む。

20

30

【実施例】

【0230】

1型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）を用いた細胞の感染は、感染性ウイルスを安定に産生する培養を結果として生じうる（1）。しかし、安定なHIV-1を基礎とするベクターパッケージング細胞を、HIV-1 gag-polをコードするプラスミドのトランスフェクションによって作製する試みは、一部のHIV-1感染細胞株によって分泌される1000 ng/ml（5）と比較して低レベルのp24抗原（20~80 ng/ml）しか分泌しない細胞を結果として生じている（2-4）。これはHIV-1プロテアーゼの細胞毒性が原因でありうると考えられており（6）、HIV-1 Gag-Pol発現を誘導することができるパッケージング細胞株の構築に繋がっている（7-10）。

40

【0231】

我々は、マウス白血病ウイルス（MLV）を基礎とするレトロウイルスベクターを用いたHIV-1 Gag-Pol発現カセットの導入は、HIV-1 Gagの安定な、長期の、高レベル（最大850 ng/ml）の発現を可能にすることを実証している。コドン最適化されたHIV-1 Gag-Pol（11）、HIV-1 TatおよびRev、およびC型レトロウイルスのエンベロープタンパク質を発現する、HT1080または29

50

3 Tを基礎とするパッケージング細胞が構築された。H I V - 1ベクターの導入は、最大 10^7 293 T感染単位 / ml (20 293 T 感染単位 / 細胞 / 日) を3ヶ月間にわたって培養中で産生することができるウイルス産生細胞を結果として生じた。

【0232】

実験プロトコル(実施例1~4用)

細胞株。HeLa (ATCC CCL-2)、293 T、HT1080 (ATCC, CCL-121) およびすべての誘導体クローンは、10%ウシ胎仔血清 (FCS) および抗生物質を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で培養した。

【0233】

プラスミド。H I Vパッケージング (pCMVR8.91) およびVSV-G (pMDG) プラスミドは(12)に記載されている。pCNC-MCSは、pCNCGのSacII-NotI短断片(13)をSacII-XhoI-NotIリンカーで交換して構築された。pCMVR8.9のSacII-XhoI断片は、H I V - 1 gag、pol、rev、tat遺伝子およびRREを含むが、pCNC-MCSのSacII-XhoI部位へ導入されてpCNC-GPRTを生じた。pCNC-SYNGPは、コドン最適化されたgag-pol配列を含むpSYNGPのSacII-NotI断片(11)を、pCNC-MCSのSacII-NotI部位へ導入することによって構築された。pCNC-GPを構築するために、pCMVR8.91をテンプレートとして用いるPCRによってH I V RRE配列を増幅し、pCNC-MCSのXhoI-NotI部位へ導入し、その後、pCMVR8.91のSacII-SaII断片の、そのSacII-XhoI部位への導入を行った。pCNC-TATおよびpCNC-REVは、pCMVR8.91由来のTatおよびRev cDNAを、pCNC-MCSのSacII-XhoI部位へ導入することによって構築された。pHRSIN-CSGWは(15)に記載されている。その非自己不活性化誘導体pHVは、pHRSIN-CSGWのNruI-XhoI断片を、pH7GのNruI-SaII部位へ導入することによって構築された(11)。レトロウイルスエンベロープベクターpALFおよびpG+Fは報告された(16, 18)。pRDproLFは、pRDLFのBcII-ApaI断片(16)を、BcII-ApaI断片pHCMVRDproで交換することによって構築された。

【0234】

トランスフェクションおよび選択。トランスフェクションはリポフェクトアミン (Lipofectamine) (インビトロゲン社 (Invitrogen)) を用いて実施した。pCNC-GPRTおよびpCNC-SYNGPトランスフェクションされた細胞を、G418 (1mg/ml) を用いて選択し、G418耐性クローンを2から3週間後に単離した。エンベローププラスミドをトランスフェクションされた細胞を、フレオマイシン; 30 µg/ml を用いてpALF、およびpRDproLFをトランスフェクションされた細胞について、および7 µg/ml を用いてpG+Fをトランスフェクションされた細胞について選択した。フレオマイシン耐性コロニーを3週間後に単離した。ベクターゲノムプラスミド (pHVおよびpSIN-CSGW) の安定なトランスフェクションのために、ベクタープラスミドをpPUR (クローンテック社 (Clontech)) と20; 1の比率で同時トランスフェクションした。ピューロマイシン3 µg/mlを用いた3週間の選択後、15個のピューロマイシンに対して安定なコロニーが単離され、残りの耐性コロニー (>500個) は一括の集団として採取した。

【0235】

ベクター産生および形質導入。感染性CNC-GPRT、CNC-SYNGP、CNC-GP、CNC-REVおよびCNC-TAT MLVビリオンを、293 T細胞の一過性トランスフェクションによって、ベクター対パッケージング対VSV-Gプラスミドの3:2:1の重量比で、リポフェクトアミン (Lipofectamine) を用いて産生した(13)。細胞上清は超遠心分離 (10,000 x g, 1.5 hr) によって濃縮し、HeLa、HT1080、293 T細胞の形質導入に用いた。GPRTまたはSYNGPクローンを確立するために、感染効率 (MOI) 4のCNC-GPRTベクターで3

10

20

30

40

50

回、またはMOI 2のCNC-SYNGPベクターで1回、細胞を感染させた。HeLaまたはHT1080細胞は1mg/mlのG418を用いて3週間選択し、293T細胞は限界希釈法によってクローニングし、クローンをp24発現についてスクリーニングした。HeLa-GP+Rクローンに関しては、HeLa細胞をCNC-GPベクターを用いてMOI 4にて2回形質導入し、次いでG418中で2週間選択した。G418耐性細胞はさらにCNC-REVベクターを用いてMOI 20にて形質導入し、次いで限界希釈法によってクローニングした。HeLa-GPRT1および293T-GPRT1細胞はCNC-REVベクターを用いてMOI = 20にて形質導入し、さらに限界希釈法によってクローニングして、HeLa-GPRT1+R1(クローン22個から1個)および293T-GPRT1+R1細胞(クローン32個から1個)を選択した。HT-STAR
10
およびSTAR細胞を確立するために、HT-SYNGP1および293T-SYNGP1クローンを、Tat-およびRev-発現MLVベクターを用いてそれぞれMOI = 20にて形質導入し、限界希釈法によってクローニングした。HT-STARクローン(28個中1個)およびSTARクローン(34個中1個)を、pHRSIN-CSGWおよびpMDGのトランスフェクションによってTat-およびRev-発現についてのスクリーニング後に選択した。VSV-G偽型化H7GおよびHVベクターは、293T細胞の一過性トランスフェクションによって、ベクター対pCMVR8.91対pMDGプラスミドの3:2:1の重量比で、リポフェクトアミン(Lipofectamine)を用いて産生した。ベクターを採取し、0.45μmフィルターを通し、超遠心分離によ
20
って濃縮した。ベクターを用いてパッケージング細胞株を形質導入し、HIVベクター産生細胞株を確立した。

【0236】

Gag-Pol-安定クローンからのベクターレスキュー。GPRT、GPRT1+R1細胞がHIV-1ベクターをパッケージングする能力を評価するために、pSIN-CSGWおよびpMDGの重量比3:1での一過性トランスフェクションによってベクターレスキュー実験を実施した。GP+R細胞およびSYNGP細胞の場合には、TatおよびRevを発現するプラスミドであるpCNC-REVおよびpCNC-TATもまた、ベクター対VSV-G対Tat対Revプラスミドの重量比3:1:1:1でトランスフェクションされた。

【0237】

ウイルス力価測定。力価を測定するため、24ウェルプレートのウェル当たり計 2×10^5 個の239T細胞に、ポリブレン $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下で6時間、ウイルス上清の連続希釈を接種した。感染した細胞の数を、蛍光活性化細胞選別(FACS)によるFACSscanおよびセル・クエスト(CELL QUEST)ソフトウェア(ベクトン・ディッキンソン社(Becton Dickinson))を用いた少なくとも48時間後のeGFP発現の測定によって測定した。個々のウイルス産生細胞株についての力価は、細胞集団の5~20%がeGFP-陽性であったデータ点から計算した。

【0238】

P24免疫染色。細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄し、マルチウェルスライドグラスに塗沫して風乾した。アセトンを用いて20分間固定後、細胞を抗p24
40
マウスモノクローナル抗体38;96K(AIDS試薬MRCプログラム(AIDS Reagent MRC Program)1;200)と共に30分間37℃にてインキュベートし、PBSで2回洗浄した後、二次抗体であるFITC結合ヤギ抗マウス免疫グロブリンと共に30分間37℃にてインキュベートした。細胞をその後PBSで2回洗浄し、共焦点顕微鏡法で観察した(クリプトン-アルゴンレーザーを装備したMRC1024[バイオラッド社(Bio-Rad)])。

【0239】

P24 ELISA。細胞 1×10^6 個を6ウェルプレートで2mlのOptiMEM(ギブコ社(Gibco))を用いて24時間培養し、連続希釈した試料を、抗p24抗体D7320(アールト・バイオリエージェント社(Aalto bio reagents
50

)、ダブリン)、EH12EI-AP (MRC ADP試薬、ADP452)、および p24 標準品 (MRC ADP試薬、ADP620) を用いた ELISA によって、p24 の検出について分析した。

【0240】

イムノブロットング分析。細胞 10^6 個を 6 ウェルプレートで 2 ml の OptiMEM を用いて 2 日間培養した。 5×10^4 個の細胞に由来する総タンパク質を細胞溶解物として用いた。培養上清は、450 nm 孔径のシリジフィルターを通した濾過および 100,000 g で 90 分間の超遠心分離後に用いた。試料は 12.5% 変性 SDS ポリアクリルアミドゲル上で分離した。p24 CA および前駆体タンパク質の発現は、抗 p24 マウスモノクローナル抗体 38;9K によって検出した。

10

【0241】

安全性測定法。RCR または Gag/Pol 機能導入の検出のために、 10^6 個の 293T または VAT-7 細胞を、 2×10^7 293T iu のベクターを用いて 6 - ウェルプレート中で一夜感染させた。表示の時間の継代および増殖後に、細胞の一部を 10 cm シャーレに播種し、3 日後に培地 12 ml を採取して、1500 g で 90 分間 4 にて遠心分離した。結果として得られた沈澱を 220 μ l の OptiMEM に再懸濁し、 2×10^5 個の 293T 細胞をポリブレン 8 μ g/ml の存在下で感染させるのに用いた。4 日後、緑色蛍光を発するコロニーを計数することによって力価を測定した。Gag-Pol 配列導入の検出は、ネステッド PCR によって gag 特異的プライマーおよびアンプリタックゴールド (Ampli Taq Gold) (パーキン・エルマー社 (Perkin Elmer)) を用いて実施した。F1/R1 および F2/R2 を野生型配列に用い、SynF1/SynR1 および SynF2/SynR2 を合成 gag に用いた。

20

F1; TGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTAT

R1; TCTTTTGCCACAATTGAAACACTTAAC

SynF1; GGTGCACGCGCAGGGCCCATCGCACCCGG

SynR1; GCCACAGTTGAAGCACTTGACGATCT

F2; AGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTAC

R2; GCCTTTCTGTATCATTATGGTAGCT

SynF2; ACGGGGCTCAGACATCGCCGGAACGAC

SynR2; AAAGTTGCCGCGCTGCATCATGATGG

30

細胞 DNA 1 μ g を、約 10^5 個の細胞の等価物として用いた。1 回目の PCR 反応の 1/20 をネステッド PCR の 2 回目のためのテンプレートとして用いた。感度を測定するために、プラスミド pCMVR8.91 および pSYNGP の連続希釈を用いた。

【0242】

実施例 1

ベクター pCNC-GPRT (図 1B に示す) および pCNC-SYNGP (図 1C に示す) は、pCMVR8.91 (12) または pSYNGP (11) にそれぞれ由来する HIV-1 配列を、図 1A に示す MLV ベクター pCNC-MCS へ挿入することによって構築した。

【0243】

40

pCNC-GPRT および pCNC-SYNGP は、(a) HeLa または HT1080 細胞へ直接トランスフェクションされたか、または (b) まず一過性 MLV パッケージング系を用いて (13) MLV ビリオンへパッケージングされ、それを次いで HeLa、HT1080、または 293T 細胞を感染させるのに用いた。

【0244】

トランスフェクションされたかまたは感染した HeLa および HT1080 を、G418 中で neo 遺伝子の存在について選択した。感染した 293T 細胞は、すでに G418 耐性であるため、限界希釈法によってクローニングした。個々のクローンを次いで HIV-1 p24 の存在について免疫蛍光法によって分析した。

【0245】

50

図2は、どちらかのウイルスによるHeLa細胞の、トランスフェクションでなく感染が、HIV-1 p24を発現したクローンをより高頻度に生じたことを示す。

【0246】

HeLa細胞のトランスフェクションによって生じた2つの稀な陽性クローンにおけるp24発現のレベルは相対的に低かったことを示す、免疫蛍光測定法の結果の例を図3に示す。

【0247】

CNC-SYNGPベクターによる3つすべての細胞株の感染において、CNC-GPRTベクターよりも高頻度の陽性クローンが生じた(図2)。

【0248】

これらのデータは、レトロウイルス感染の結果として安定なHIV-1 Gag-Pol発現が生じうることを支持する。

【0249】

実施例2

細胞がHIV-1ベクターをパッケージングする能力を、ベクターpSIN-CSGW(15)(図7Bに示す)および水疱性口内炎ウイルス(VSV)-Gタンパク質発現プラスミド(12)の一過性トランスフェクションによって評価した。GP+R細胞およびSYNGP細胞の場合には、ベクター発現を可能にするために、TatおよびRevを発現するプラスミドであるpCNC-REVおよびpCNC-TATもまた同時トランスフェクションした。一過性にトランスフェクションされた細胞に由来する上清を、293T細胞を感染させるのに用い、GFP発現を監視した。

【0250】

追加のRev発現の効果もまた、追加のRevを発現するためのMLVベクターCNC-REVを用いてHeLa GPRT1+R1および293T GPRT1+R1クローンを構築することによって、pCNC-GPRT細胞において検討した。

【0251】

図4は、追加のRevがベクター産生を促進したこと、およびGPRT1+R1 293Tクローンが、この測定で最高の 10^6 i.u./mlの力価を産生したことを示す。SYNGPを発現している細胞のうち、293Tクローンが図4に示す通り最高の力価を与えた。

【0252】

我々はまた、いわゆる「第3世代」HIV-1パッケージング構造(14)を、HIV-1 gag-polおよびRRE配列がpCMVR8.91に由来する(12)MLVベクターCNC-GP(図1Dに示す)を構築することによって検討した。これを用いてHeLa細胞を感染させ、ここでもMLVベクターCNC-REVを用いてRevを供給し、CP+Rクローンを作製した。

【0253】

図4は、これらの細胞がGPRT1+R1細胞より高い力価を与えなかったことを示す。明らかに、これらの測定はまた、複数プラスミドを用いる相対的な細胞のトランスフェクション効率を反映する。

【0254】

図5は、CNC-GPRTでトランスフェクションされたHeLa細胞とCNC-GPRTおよびCNC-SYNGPを感染させたHeLa細胞に由来する細胞溶解物および上清のイムノプロットを示す。ベクター産生と一致して、Rev発現の増加は、HIV-1 Gag発現のレベルおよびCNC-GPRTによる分泌を向上させた。我々は、細胞溶解物中のGagに対する上清中のGagの比はHeLaウイルス産生細胞のほうが低いこと、および成熟p24に対する前駆体Gagの比はHeLa由来の上清のほうがHT1080または293Tよりも高いことに注目した。これらの結果は、HeLa細胞は他の細胞株よりも、ウイルス放出および成熟に関して効率が低いことを示唆する。図6は細胞上清中のp24レベルを示す；いくつかのSYNGP 293TおよびHT1080クロー

10

20

30

40

50

ンはHeLa細胞よりも多く産生する。

【0255】

実施例3

安定なパッケージング細胞を作製するために、我々は、毒性が無く、HIV-1の相対的に高力価の偽型を産生することができ、臨床遺伝子治療用途に幅広く用いられているため、MLVおよび他のC型レトロウイルスのエンベロープタンパク質を発現することを選んだ。

【0256】

293T GPR1 + R1細胞、MLVベクターCNC-TATおよびCNC-REVを用いてTatおよびRevを発現するように操作されたHT1080 SYNGP1細胞のクローン(HT-STARで表す、クローン28個中の1個)、および、MLVベクターを用いてTatおよびRevを発現するように操作された293T SYNGP1細胞のクローン(STARで表す、クローン34個中の1個)を以降の試験のために選択した。

【0257】

細胞を、MLV4070Aのエンベロープ(Ampho(16)で表す)、HIVプロテアーゼ部位をRペプチド切断部位に導入したネコ内在性ウイルスRD114(Rdproで表す)、またはMLV細胞質尾部を有するテナガザル白血病ウイルス(GALV)(GALV+で表す(18))を発現するベクターpALF、pRDproLF、またはpG+Fを用いてトランスフェクションした。それぞれの場合で、トランスフェクションされた細胞はフレオマイシン中で選択され、高レベルのエンベロープを発現しているクローンが選択された(クローン12個から1個)。Rev非依存性pH7G(11)(図7A)、Rev依存性pHRSIN-CSGW(15)(図7B)、またはその非自己不活性化誘導体pHV(図7C)という3種類のHIV-1ベクターのパッケージングを比較した。

【0258】

図8は、STAR-Ampho細胞は、感染によるベクターゲノムの導入後の一括集団から、 10^7 i.u./mlを超える最高力価のウイルスを産生したことを示す。ベクター中のRevの存在は、STAR細胞において力価に影響せず、パッケージング細胞中のRevのレベルが十分であったことを示唆する(図8)。

【0259】

STAR-Ampho細胞のトランスフェクションおよび選択後に、最大 10^7 i.u./mlの自己不活性化ベクターを産生するクローンを用いて、十分な力価のウイルスを産生することもまた可能であった(図8)。

【0260】

STAR細胞によるウイルス産生のレベルは、長期培養後に安定であり(図9)、ウイルスを遠心分離によって濃縮して最大 5×10^9 i.u./mlの力価を有するストックを作製することができた。

【0261】

実施例4

安定なパッケージング細胞によって産生されたHIV-1ベクターの安全性を評価するために、我々はまず、GPR1 + R1-Ampho細胞またはSTAR RDpro細胞のどちらかのクローンから産生されたベクターpHVの 2×10^7 i.u.を用いて293T細胞を感染させることによって、複製能を有するレトロウイルス(RCR)を測定した(図8)。導入された293T細胞の4週間の継代後、上清を濃縮し、それを用いて新しい293T細胞を感染させた。共焦点顕微鏡法によってGFP陽性細胞は検出されず、これはベクター 2×10^7 i.u.中にRCRは存在しなかったことを示す。

【0262】

我々はまた、pH7G、AmphoエンベロープおよびTatを安定に発現している293T細胞のクローン(VAT-7細胞と表す)を用いて、Gag-Pol機能の導入を

測定した。図10は、 2×10^7 i.u.の一過性にまたは安定に産生されたベクターを用いてVAT-7細胞を感染させた結果を示す。感染したVAT-7細胞に由来する上清を表示の日に採取し、濃縮して、これを用いて新しい293T細胞を感染させ、新しい293T細胞をGFP発現についてスクリーニングした。野生型HIV Gag-Pol構造pCMVR8.91によって一過性に産生されたベクターは、Gag-Pol機能の導入の顕著なレベルを示した。293GPRTR+R1細胞で発現されたその誘導體pCNC-GPRTRによって安定に産生されたベクターは、より低いレベルを示した。対照的に、pSYNGPによって一過性に産生されたベクター、またはSTAR細胞でその誘導體pCNC-SYNGPによって安定に産生されたベクターは、散発的なGag-Pol機能導入しか示さなかった。

10

【0263】

293T細胞のベクター感染後のGag-Pol配列導入はまた、ネステッドPCRによって検出された(図11);ここでも野生型Gag-Polはより高いレベルの導入を示し、安定なウイルス産生細胞株はより低いレベルを示した。

【0264】

実験プロトコル(実施例5~10用)

細胞株。すべての細胞は、37、10%CO₂にて、10%ウシ胎仔血清(FCS)、ペニシリン(100単位/ml)およびストレプトマイシン(100μg/ml)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(ギブコBRL社(GibcoBRL))中で維持し、ただし例外としてNIH3T3細胞は、10%ドナー仔ウシ血清、ペニシリン(100単位/ml)およびストレプトマイシン(100μg/ml)を添加したDMEM中で維持した。pRD+プラスミド¹⁷由来のRD+Env配列をRDLプラスミド¹⁶へ導入し、結果としてRD+Lプラスミドを生じた。STAR RD+細胞は、RD+LプラスミドをSTAR細胞へトランスフェクションすることによって作製し、前述の通りeGFPをコードするHIV-1ベクターであるHIV-1(RD+)を産生するのに用いた。eGFPをコードするHIV-1ベクターであるHIV-1(MLV-A)、HIV-1(RDpro)およびHIV-1(GALV+)をそれぞれ産生する、STAR Ampho、STAR RDproおよびSTAR GALV+細胞は前述した。

20

【0265】

ウイルスベクター調製。ウイルスは10cmシャーレから採取した。STAR細胞からのウイルス採取のために、細胞 4×10^6 個をウイルス採取の開始24時間前に播種した。ウイルスはDMEM+10%FCS+ペニシリンおよびストレプトマイシン、またはOptiMEM(ギブコBRL社(GibcoBRL))のどちらかの8ml中で、48時間、37にて採取した。ウイルス上清を次いで孔径0.45μmのフィルターに通した。HIV-1(VSV-G)ウイルスは、293T細胞の一過性トランスフェクションによって、ベクター(pHV)対パッケージング(pCMVR8.91¹²)対エンベロープ(pMD-G²⁰)プラスミドの3:2:1の重量比で、リポフェクトアミン(Lipofectamine)(ギブコBRL社)を用いて、取扱説明書に従って作製した。OptiMEMで洗浄後、ウイルスを、DMEM+10%FCS+ペニシリンおよびストレプトマイシン、またはOptiMEMのどちらかの8ml中で、48時間、37にて採

30

40

【0266】

ウイルス力価測定。 2×10^5 個の細胞に、ウイルス上清の連続希釈を接種した。感染の48時間後に、蛍光活性化細胞走査機(FACS)を用いてeGFP力価(iu/ml)を測定した。表示した場合には、力価測定はポリブレン(臭化ヘキサジメトリン(シグマ社(Sigma)))8μg/mlの存在下で、またはスピノキュレーション(1,200g、2時間、25)を用いて、または両方で実施した。

【0267】

ウェスタンブロッティング。上清8ml中のウイルスを分析のために、SW41ベックマン・ローター(Beckman Rotor)(30,000rpm、1時間、4)

50

での超遠心分離によって沈澱させた。沈澱を、OptiMEMで希釈した6×負荷緩衝液30μlに再懸濁した。試料を5分間沸騰させ、以降の分析まで-20℃にて冷凍した。試料を10または14%ポリアクリルアミド(SDS)ゲルで泳動した。タンパク質を次いでハイボンド(Hybond)ECLニトロセルロースフィルター(アマシャム社(Amersham))上へ、セミドライ転写器および転写緩衝液(39mMグリシン、48mM Tris塩基、20%メタノール)を用いて転写した。

【0268】

MLV-AおよびGALVエンベロープのTMサブユニットは、ラットハイブリドーマ42/114⁴⁵由来の非希釈上清を用いて検出した。MLV-A SUは、1/1000希釈したヤギポリクローナル抗ラウシャー(Rauscher)白血病ウイルスgp70(クオリティ・バイオテック社(Quality Biotech Inc.))、ニュージャージー州カムデン(Camden))を用いて検出した。RD114 SUは、1/5000希釈したヤギポリクローナル抗RD114 gp70(クオリティ・バイオテック社、ニュージャージー州カムデン))を用いて検出した。HIV-1 CAは、共に1/200希釈したマウスモノクローナル抗体ADP365およびADP366(MRCARD)の1;1混合物を用いて検出した。MLVキャプシド(CA)は、1/1000希釈したヤギポリクローナル抗ラウシャー白血病ウイルスgp70(クオリティ・バイオテック社、ニュージャージー州カムデン))を用いて検出した。プロットは、1/1000希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗免疫グロブリン(ダコ社(DAKO))、および高感度化学発光法(ECL)キット(アマシャム・ライフサイエンス社(Amersham Life Science))を用いて現像した。

【0269】

ヒト血清の調製。ヒト末梢血を氷上で一夜4℃にて凝固させた。血清を血餅から分離して、小分けして必要なだけ-80℃にて冷凍した(新鮮血清調製物)、または56℃にて45分間熱不活化してその後-80℃にて冷凍した(熱不活化血清調製物)。

【0270】

ベクター濃縮。HIV-1(VSV-G)およびガンマレトロウイルス偽型をOptiMEM中に採取した。各上清10mlを10⁵gにてベックマン(Beckman)L7超遠心分離機(SW41ローター、35,000rpm、1.5時間、4℃)を用いて濃縮し、沈澱をOptiMEM250μlに再懸濁した。ベックマンL7超遠心分離機はまた、ウイルスを10⁴gにて濃縮するのにも用いた(SW41ローター、15,000rpm、3時間、4℃)。この場合も沈澱をOptiMEM250μlに再懸濁した。上清30mlを3000gにて(4,000rpm、8時間、4℃)、ヘレウス・メガフュージ(Heraeus Megafuge)2.0R卓上遠心分離機(セパテック社(Sepatech))を用いて濃縮した。ここでは沈澱をOptiMEM750μlに再懸濁した。ウイルスを遠心濾過によってセントリコン・プラス20(Centricon Plus-20)(アミコン社(Amicom))フィルターを用いて取扱説明書に従って濃縮した。ここでは上清16mlを各フィルターに加え、ウイルスは400μl中に回収された。

【0271】

ゲル濾過。濃縮されたウイルス上清100μlを、OptiMEMで予め平衡化したセファロース(Sephacrose)GPC3.2/30カラム(アマシャム社(Amersham))に負荷した。分画は、スマート・マネージャー(Smart Manager)ソフトウェアを用いて制御したLKB;μ分離ユニット(アマシャム社)を用いて実施した。カラムの流速は40μl/分に保ち、100μlの22画分を回収した。ゲル濾過の各画分の25μlを6×負荷緩衝液と混合し、沸騰させ、次いで10%SDS-PAGEによって上記の通り分離した。

【0272】

実施例5

ガンマレトロウイルス偽型を産生するSTAR細胞の作製

MLV - A、RD 114 および GALV に由来する Env を用いて偽型化した HIV - 1 ベクターが一過性系で産生されている^{26, 34, 35}。以前の研究は、GALV および RD 114 に由来する Env を用いて偽型化したレンチウイルスベクターの力価はそれらの細胞質尾部を MLV エンベロープのもので置換することによって向上しうること示している^{34, 35, 17}。したがって、これらの置換を有する構造である GALV +¹⁸ および RD +¹⁷ を用いた。これらの改変は、HIV - 1 プロテアーゼ (PR) と Env の間の反応を促進することによって、ガンマレトロウイルス Env 機能を促進する可能性がある^{34, 17}。PR - Env 反応を促進するための代替戦略として、RD 114 Env はまた、R ペプチド切断部位配列を HIV - 1 Gag のマトリクス - キャプシド切断部位のもので交換することによって、RD pro を生じるように改変された。

10

【0273】

MLV - A、GALV +、RD + および RD pro についてのエンベロープ発現プラスミドを STAR 細胞にトランスフェクションし、エンベロープ発現のためのクローン細胞株を得た。これらのクローンを、eGFP をコードするベクターHV を有する HIV - 1 (VSV - G) に感染させた。最も高力価のウイルスを産生するエンベロープクローンを選択した。培養上清を採取し、Env 組み込みおよびいくつかの細胞株についての感染力に関して分析した。

【0274】

図12はSTAR細胞上清の超遠心分離からの沈澱のウェスタンブロッティングを示す。抗HIV - 1 p24を用いてプロービングしたプロットによって、ベクター粒子の存在がすべてのSTAR細胞株について実証されたが、293T親細胞については示されなかった。RD 114 SU に対して作製された抗体は、RD + または RD pro エンベロープを発現しているSTAR細胞に由来する上清中のRD 114 gp70を認識したが(図1、レーン5および6)、その2者は識別できなかった。同一の膜を、MLVエンベロープSU に対して作製されたポリクローナル抗体を用いてプロービングした。これらの抗体はMLV - A SU を強く認識するが、GALV SU とは弱い交差反応しか示さないことが明らかになった³⁶。この血清を用いて、MLV - A を観察することができたが GALV SU は観察できなかった(図1、レーン3および4)。MLV - A および GALV の両方に由来するTMを認識するモノクローナル抗体(42/411)³⁴は、2つのRD 114 構造とは反応しなかったが、それはそのエピトープが細胞質尾部でなくTMの細胞外ドメインに存在するためである。MLV - A および GALV + エンベロープの未成熟型(p15) および成熟型(p12)の両方を観察することができた(図1、レーン3および4)。総合すると、これらの結果は正しいエンベロープ組み込みを実証する。

20

30

【0275】

いくつかの細胞株についてeGFP力価を、一過性に産生されたHIV - 1 (VSV - G) と比較して測定した(図13)。ガンマレトロウイルスEnvを持つすべてのHIV - 1 ベクターは、試験したすべてのヒト細胞株について、 $10^6 \sim 10^7$ iu/ml の範囲の力価を有した; MLV - A が最高、GALV + が最低であった。これらの力価は、HIV - 1 (VSV - G) の力価と同様であるかまたはそれよりわずかに低かった。STAR細胞株の上清はすべて、 $450 \sim 650$ ng/ml の範囲のp24を有したことに注意する(データ記載せず)。これは一過性に産生されたHIV - 1 (VSV - G) についての約 100 ng/ml に匹敵し、ガンマレトロウイルス偽型についてHIV - 1 (VSV - G) よりもベクター粒子当たりの低い感染力を示す。予想される通り、GALV +、RD + および RD pro を有するベクターは、マウスNIH3T3細胞を感染させることができなかったが、その理由は、マウスはそれらの同族の機能性受容体遺伝子を持たないためである。受容体の正しい利用はさらに受容体干渉によって実証された; HIV - 1 (MLV - A) は複製能を有するMLV - A に慢性的に感染したTE671細胞を感染させず、HIV - 1 (GALV +) はGALV および HIV - 1 (RD +) に慢性的に感染したTE671細胞を感染させず、およびHIV - 1 (RD pro) はRD 114 に慢性的に感染したTE671細胞を感染させなかった(データ記載せず)。交差干渉は観察されな

40

50

かった。

【0276】

実施例6

37での安定性

偽型化されたHIV-1ベクターの保存および形質導入中の安定性は重要な側面である。我々は、ガンマレトロウイルスEnvを有するHIV-1ベクター、およびHIV-1(VSV-G)を、37での安定性、凍結/融解サイクルに対する感受性、およびヒト血清による不活化について検討した。多くの遺伝子治療用途ではベクター調製物中にFCSが存在しないことが望ましいため、これらの実験では、ベクターはOptiMEMまたはDMEM+10%FCSのどちらかの中に採取した。

10

【0277】

ベクター安定性を評価するために、37でのインキュベート後に感染力の減衰を測定した。OptiMEMまたはDMEM+10%FCS中の各ウイルスの一定量を37でインキュベートし、インキュベート開始後2および6時間に293T細胞について力価測定した(図14)。OptiMEM中に採取されインキュベートされたウイルスとDMEM+10%FCS中のものとの間で、37での安定性に実質的な差は観察されなかった。HIV-1(MLV-A)およびHIV-1(RDpro)は半減期が2時間未満であって最も不安定に見えた一方、GALV+またはRD+のどちらかを持つHIV-1は2時間のインキュベートにわたってわずかに安定性が高いように見えた(2ないし6時間の半減期)。HIV-1(VSV-G)ウイルスは一方、37で6時間インキュベート後に、最初の力価の最大40%だけを失った。37で24時間インキュベート後のウイルス力価測定は、HIV-1(VSV-G)力価が90%低下したことを示した(データ記載せず)。このウイルスの37での半減期はしたがって24時間より短かった。

20

【0278】

実施例7

凍結/融解サイクル反復に対する耐性

-80と37の間のサイクル反復後に、293T細胞についてウイルスを力価測定することによって、凍結/融解サイクル中のベクター安定性を次いで検討した。力価は、1回目のサイクルを開始する前の力価の比率として表す(図15)。すべてのガンマレトロウイルス偽型は、凍結/融解に対して何らかの耐性を示した。1サイクル後に、MLV-A偽型化ベクターはどちらの培地中でも元の力価の5%未満を失った。他のすべてのレトロウイルス偽型は凍結/融解に対してより感受性が高いように見えたが、3サイクル後に元の力価の50%より大きい力価を失ったレトロウイルス偽型は無かった。OptiMEMとDMEM+10%FCS中に採取されたベクターの間に、安定性に実質的な差は無かった。これは、しかし、HIV-1(VSV-G)ベクターには当てはまらなかった。1サイクル後に、OptiMEM中に採取されたウイルスは元の力価の最大65%を失った一方、DMEM+10%FCS中のウイルス力価は安定であるように見えた。さらに、3サイクル後に、OptiMEM中のウイルスは元の力価の90%を失った一方、DMEM+10%FCS中のウイルスが失ったのは10%未満であった。このように、HIV-1(VSV-G)を冷凍するための条件は、注意深い最適化を要しうる。

30

40

【0279】

実施例8

新鮮ヒト血清中の不活化に対する耐性

OptiMEMまたはDMEM+10%FCSのどちらかの中の各ウイルスを、等量の新鮮血清または熱不活化血清と共に37にて1時間インキュベートし、その後293T細胞について力価測定した。新鮮凍結血清とのインキュベート後の、対応する熱不活化血清とのインキュベートに対する、ウイルス力価の比率を示す(図16)。両方の培地中ですべてのガンマレトロウイルス偽型は、ヒト血清に曝露された際に良好な安定性を示した。HIV-1(MLV-A)は力価の多くとも8%だけを失った一方、GALV+エンベロープを持つものは、ある場合においては力価の損失(27%)を示した。レトロウイル

50

ス偽型力価の最大の低下である、血清1に曝露された、DMEM+10%FCS中に採取されたHIV-1(RDpro)は、40%だけであった。HIV-1(VSV-G)ウイルスは、対照的に、ヒト新鮮血清による不活化に対して感受性であるように見えた。本研究では、異なるガンマレトロウイルスEnvを持つベクター間で血清感受性に実質的な差は無かった。対照的に、ガラクトシル(1-3)ガラクトシル(Gal)陰性ヒト細胞によって産生された場合³⁷、複製能を有するMLV-AはRD114またはGALVよりも感受性が高かったことを我々は以前に報告した。

【0280】

HIV-1(VSV-G)は、ガンマレトロウイルスEnvで偽型化されたHIV-1ベクターよりも、ヒト血清中での不活化に対して感受性が高かった。血清1への曝露は力価の最大80%の損失を引き起こした一方、血清2とのインキュベーションはこのウイルスの力価の、検出閾値を下回る低下を引き起こした。これらの結果は、VSV-G偽型化HIVベクターはヒト血清中で補体によって容易に不活化される³⁸ことを示すDePolioと共同研究者らによるデータと合致する。さらに、我々の結果および、DePolioと共同研究者らの結果は、異種Gal抗原を持たない、ヒト細胞中で複製している野生型VSVは、ヒト血清中での不活化に感受性であったが、Gal抗原を持つVSVよりはその程度は小さかった^{39,40}という以前の観察と合致する。

【0281】

実施例9

ポリブレンおよびスピノキュレーションを用いたベクター力価の向上

ウイルス結合を増加させるための、形質導入前のベクター濃縮、または*in vitro*または*ex vivo*形質導入手順の改変は、レトロ/レンチウイルスベクター採取物の力価を高めるために一般的に行われている。我々は、ポリブレンの使用、および遠心接種すなわちスピノキュレーションによる、ベクター力価の向上を検討した。偽型ベクターはOptiMEM中に採取した。ポリブレンの存在下で、またはスピノキュレーションを用いて、または両方を用いて、各偽型を293T細胞について力価測定した。これらの実験からの結果を図17に示す。ポリブレンはガンマレトロウイルスEnvを持つHIV-1ベクターの感染を平均して5~6倍促進した一方、スピノキュレーションは感染を平均して4倍促進した。ポリブレンの存在はHIV-1(VSV-G)力価を実質的に向上させなかった。ポリブレンおよびスピノキュレーションを併用した場合、それらの効果は全例で加法的であった。

【0282】

さまざまな細胞株(ヒト細胞株293T、TE671、HeLaおよびHT1080、およびマウス細胞株NIH3T3)に対するポリブレンの促進効果もまた検討した(データ記載せず)。ポリブレンは試験したどの細胞株についてもHIV-1(VSV-G)力価を2倍より大きく上昇させなかった。ガンマレトロウイルス偽型の力価についてのポリブレンの効果は、293TまたはE671細胞(8倍~16倍)について最も顕著であった一方、その効果はHeLaまたはHT1080細胞(2x-4x)についてはそれほど劇的でなかった。NIH3T3細胞についてのポリブレンの感染促進は無視できた。

【0283】

実施例10

STAR細胞由来偽型の濃縮

ベクターストックの濃縮はしばしば必要である。超遠心分離、低速遠心分離、および遠心濾過(または限外濾過)がHIV-1(VSV-G)ベクター濃縮に適用され成功している^{20,41,42}。ガンマレトロウイルス偽型に関しては、超遠心分離および遠心濾過によって濃縮される能力を評価するために調べられているのはHIV-1(MLV-A)だけである。我々は、したがって、4つの異なる偽型を4つの異なる方法/条件で濃縮する比較試験を実施した。MLV-A、GALV+およびRDproEnvを持つベクターおよびVSV-GをOptiMEM中に採取し、4つの条件によって容量で40倍に濃縮した-100kDaのカットオフを有するフィルターを用いた遠心濾過、または3つの異なる速

度での遠心分離；100,000gで1.5時間；10,000gで1.5時間；3,000gで7時間。濃縮の前後に、%eGFP導入細胞を2倍連続希釈で293T細胞についてポリブレンの存在下で測定した。図18は、HIV-1(MLV-A)およびHIV-1(VSV-G)について力価測定曲線の例を示す。濃縮手順後の各ベクター調製物のeGFP力価および%回収率は、力価測定の直線範囲での希釈についての%形質導入データを用いて推定し、表1に示した。

【0284】

【表1】

表1 HIV-1ベクターの濃縮

10

eGFP力価(濃縮後の%回収率)					
遠心分離					
エンベロープ	濃縮前	105g	104g	3000g	100kDaフィルター ^a
VSV-G	1.5 ^b	56(92) ^c	52(85)	28(47)	36(60)
MLV-A	2.1	40(60)	100(117)	72(180)	28(32)
GALV+	0.5	11(55)	18(90)	9(45)	10(50)
RDpro	1.5	45(75)	136(226)	59(98)	13(21)

20

30

【0285】

産生されたウイルスを、100,000g、10,000gおよび3,000gでの遠心分離、および100kDaカットオフでの遠心濾過によって、40倍濃縮した(a)。ウイルスは293T細胞についてポリブレン8μg/mlと共に力価測定し、eGFP発現をFACSによって測定した。b、力価は10⁷iu/mlで表す；c、%回収率(100X濃縮後の力価)/(40X濃縮前の力価)を括弧内に示す。

【0286】

ベクター回収率は大部分の実験で50%より大であったため、濃縮によるベクターへの損傷は限られていたのが観察された。10,000gまたは3,000gでの遠心分離は一般的に、ガンマレトロウイルス偽型についてより高い回収率を結果として生じた。HIV-1(VSV-G)は、より高い超遠心分離速度で、または遠心濾過によって濃縮された場合、ガンマレトロウイルスEnvを持つHIV-1ベクターよりも安定でありうる。また、この試験の延長において、10,000gまたは3,000gのどちらかでの1段階遠心分離によって、最大100倍のより高い濃縮を高収量で達成することができ、結果として2.0X10⁸~1.5X10⁹iu/mlの力価を生じたことが注目された(データ記載せず)。

40

【0287】

HIV-1(VSV-G)はすべての条件において濃縮後に高用量では100%感染を

50

達成した一方(図18Bb)、ガンマレトロウイルス偽型はウイルス上清をより穏和な条件の遠心分離に供した場合のみ、293T細胞について100%感染を達成することができた(HIV-1(MLV-A)に関して図18Aa、HIV-1(GALV+)とHIV-1(RDpro)はデータ記載せず)。高用量では、ガンマレトロウイルス偽型の感染は、ウイルス粒子が100,000gでの超遠心分離かまたは遠心濾過によって濃縮された場合に阻害された。MLVベクターパッケージング細胞株であるFLYA13¹⁶は多量のMLV-A Envをベクター粒子から遊離して培地中へ放出することが以前に報告されている。過剰の可溶性Envは、細胞受容体に関してベクター粒子と競合して、ベクター形質導入を阻害するように見えた^{43,44}。可溶性MLV-A Envが遠心濾過中にベクター粒子と一緒に濃縮され、それによって濾過調製物による高用量での形質導入の低下を引き起こしたかどうかを確認するため、遠心濾過による調製物をセファロース(Sephacrose)ゲル濾過によって分画した。ゲル濾過画分を感染およびHIV-1キャプシド(CA)とMLV-A Envの存在について分析した(図8Aおよび8B)。eGFP感染力およびHIV-1 p24が初めの素通り画分に検出され、感染性ベクター粒子の存在を示した。これらの素通り画分である3~5は高用量で高率の形質導入が可能であり、遠心濾過後のゲル濾過前の調製物による約5%(図19C)と比較して、95~100%形質導入が画分20µlの投入量で達成された(データ記載せず)。これは、ゲル濾過が何らかの阻害因子をベクター粒子画分から分離したことを示す。抗MLV SUを用いてプロービングしたウェスタンブロットは、MLV-A Env SUの大部分が遅い画分10~13に出現したことを明らかにし、粒子から遊離したEnvが遠心濾過調製物中に多量に存在することを示した(図19B)。

10

20

【0288】

ベクター粒子を含まない遅い画分によるベクター感染の阻害について試験するため、画分9~22を293T細胞に、一定量のHIV-1(MLV-A)およびHIV-1(RDpro)と共に加えた(図19C)。阻害無しでは、これらのベクター用量は、40~50%のeGFP形質導入を結果として生じた。eGFP形質導入のHIV-1(MLV-A)による相当な低下が、大部分のMLV-A Envを含む画分10~13について観察されたが、HIV-1(RDpro)によっては観察されなかった。これは、画分10~13中に存在する、ビリオンと結合していないエンベロープが、おそらく細胞受容体についてベクター粒子を競合的に閉め出して、HIV-1(MLV-A)感染を特異的に阻害したことを示す。

30

【0289】

これらの結果は、したがって、ガンマレトロウイルス偽型を産生するSTAR細胞の上清中に見出される、ビリオンと結合していないエンベロープが、ウイルス粒子と共に濃縮された場合に感染の阻害因子として作用しうることを示唆する。しかし、ウイルス粒子がより低速で濃縮された場合、感染の阻害はみられない。10,000gないし100,000gの速度での遠心分離は、したがって、濃縮されたウイルスストックの調製を要する用途に用いることができる。さらに、低速遠心分離は、より長時間かかるにしても、大バッチのベクターストックを濃縮するのにより適している可能性がある。

40

【0290】

要約すると、STAR細胞から産生されガンマレトロウイルスEnvで偽型化されたHIVベクターは、VSV-G偽型化されたHIV-1ベクターと同程度に効率的に、ある種の型のヒト細胞を感染させることができる。それらはHIV-1(VSV-G)に比べて、新鮮ヒト血清中でより安定であり、ex vivo用途においてポリブレンおよびスピノキュレーションと共により効果的に用いることができる。それらは凍結/融解に対して耐性であるが、37°Cでの減衰速度はHIV-1(VSV-G)の減衰速度よりも速い。これは、不要なベクター伝播の無い局所的遺伝子導入が必要である場合に、潜在的に有利である。ベクター調製物中の可溶性Envは好ましくはベクター遠心分離を用いて除去される。これらの結果は、一過性系または誘導系における場合と比較した、安定な連続的ベクター産生における品質管理の容易さと共に、STAR細胞に由来しガンマレトロウイ

50

ルスEnvで偽型化されたHIV-1ベクターの、前臨床および臨床応用のさらなる検討を支持する。

【0291】

上記の明細書中で言及されたすべての出版物は参照により本開示に含まれる。本発明の記載された方法および系のさまざまな改変および変形は、本発明の範囲および精神を離れることなく当業者に明らかとなる。本発明は特定の好ましい実施形態に関連して記載されているが、請求される通りの本発明はそのような特定の実施形態に過度に制限されるべきでないことが理解されるべきである。実際、分子生物学または関連分野の当業者に明らかである、本発明を実施するための記載された様式のさまざまな改変は、下記の請求項の範囲に含まれることが意図される。

10

参考文献

1. Hoxie, J. A., et al. *Science* 229, 1400-1402 (1985).
2. Ott, D. E., et al. *J. Virol.* 69, 2443-2450 (1995).
3. Srinivasakumar, N., et al. *J. Virol.* 71, 5841-5848 (1997)
4. Corbeau, P., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14070-14075 (1996).
5. Carroll, R., et al. *J. Virol.* 68, 6047-6051 (1994).
6. Kaplan, A. H. & Swanstrom R. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4528-4532 (1991).
7. Sparacio, S., et al. *Mol Ther.* 3, 602-612 (2001).
8. Kaul, M., et al. *Virology* 249, 167-174 (2001).
9. Klages, N., et al. *Mol Ther.* 2, 170-176 (2000).
10. Farson, D. et al. *Hum Gene Ther.* 12, 981-997 (2001).
11. Kotsopoulos, E., et al. *J. Virol.* 74, 4839-4852 (2000).
12. Zufferey, R., et al. *Nat Biotechnol.* 15, 871-875 (1997).
13. Soneoka, Y et al. *Nucleic Acids Res.* 23, 628-633 (1995).
14. Dull, T. et al. *J. Virol.* 72, 8463-8471 (1998).
15. Demaison, C. et al. *Hum Gene Ther.* 13, 803-813 (2002).
16. Cosset, F-L., et al. *J. Virol.* 69, 7430-7436 (1995)
17. Sandrin, V. et al. *Blood* 2002; 100; 823-832.
18. Marandin, A. et al. *Hum Gene Ther.* 9, 1497-1511 (1998).
19. Martin, F., et al. *J. Virol.* 73, 6923-6929 (1999).
20. Naldini L et al. *Science* 1996; 272; 263-

50

- 267 .
- 21 . Kim VN , et al . J Virol 1998 ; 72 ; 811 - 816 .
- 22 . Miller AD et al . J Virol 1991 ; 65 ; 2220 - 2224 .
- 23 . Sommerfelt MA , Weiss RA . Virology 1990 ; 176 ; 58 - 69 .
- 24 . Uckert W et al . Hum Gene Ther 2000 ; 11 ; 1005 - 1014 .
- 25 . Kelly PF et al . Blood 2000 ; 96 ; 1206 - 1214 . 10
- 26 . Hanawa H et al . Mol Ther 2002 ; 5 ; 242 - 251 .
- 27 . Blaese RM et al . Science 1995 ; 270 ; 475 - 480 .
- 28 . Bordingnon C et al . Science 1995 ; 270 ; 470 - 475 .
- 29 . Cavazzana - Calvo M et al . Science 2000 ; 288 ; 669 - 672 .
- 30 . Abonour R et al . Nat Med 2000 ; 6 ; 652 - 658 . 20
- 31 . Gliniak BC , et al . J Biol Chem 1991 ; 266 ; 22991 - 22997 .
- 32 . Pinter A et al . J Virol 1997 ; 71 ; 8073 - 8077 .
- 33 . Takeuchi Y et al . J Virol 1994 ; 68 ; 8001 - 8007 .
- 34 . Christodoulopoulos I , Cannon PM . J Virol 2001 ; 75 ; 4129 - 4138 .
- 35 . Stitz J et al . . Virology 2000 ; 273 ; 16 - 20 . 30
- 36 . Duisit G , et al . Hum Gene Ther 1999 ; 10 ; 189 - 200 .
- 37 . Takeuchi Y et al . Nature 1996 ; 379 ; 85 - 88 .
- 38 . DePolo NJ et al . Mol Ther 2000 ; 2 ; 218 - 222 .
- 39 . Takeuchi Y et al . J Virol 1997 ; 71 ; 6174 - 6178 .
- 40 . Welsh RM , et al . J Virol 1998 ; 72 ; 4650 - 4656 . 40
- 41 . Reiser J . et al . Gene Ther 2000 ; 7 ; 910 - 913 .
- 42 . VandenDriessche T , et al . Methods Enzymol 2002 ; 346 ; 573 - 589 .
- 43 . Slingsby JH et al . . Hum Gene Ther 2000 ; 11 ; 1439 - 1451 .
- 44 . Arai T et al . J Virol 1998 ; 72 ; 1115 - 1121 .
- 45 . Pinter A et al . Virology 1982 ; 116 ; 499 - 50

5 1 6 .

【図面の簡単な説明】

【 0 2 9 2 】

【図 1】図 1 は M L V を基礎とするベクター構造の説明を示す。H I V g a g - p o l 配列を p C N C - M C S のクローニング部位に導入し、p C N C - G P R T、p C N C - S Y N G P、および p C N C - G P を構築した。より詳細には、図 1 A は p C N C - M C S を図解する。図 1 B は p C N C - G P R T を図解する。図 1 C は p C N C - S Y N G P を図解する。図 1 D は p C N C - G P を図解する。

【図 2】図 2 はトランスフェクションとレトロウイルス形質導入の間の比較を示す表である。G 4 1 8 - 耐性クローンはトランスフェクションまたはレトロウイルス形質導入の 2 ないし 3 週間後に単離され、または 2 9 3 T クローンは形質導入後に限界希釈法によって単離され、次いで H I V p 2 4 C A 抗原発現に関して免疫染色によってスクリーニングされた。

10

【図 3】図 3 は H e L a クローンにおける p 2 4 発現についての免疫蛍光測定法の結果を示す。C N C - G P R T 形質導入によって作製された 1 2 の陽性クローンの全部が (H e L a C N C - G P R T クローンと表す)、p C N C - G P R T のトランスフェクションによって作製された稀な陽性クローン (H e L a T F クローンと表す) よりも明るい蛍光を示した。

【図 4】図 4 は細胞が H I V - 1 ベクターをパッケージングする能力を図解するグラフである。能力は重量比 3 : 1 の p S I N - C S G W および p M D G の一過性トランスフェクションによって評価した。G P + R 細胞および S Y N G P 細胞の場合、T a t および R e v を発現するプラスミドもまたベクター対 V S V - G 対 T a t 対 R e v プラスミドの重量比 3 : 1 : 1 : 1 でトランスフェクションされた。力価は 2 9 3 T 細胞で測定した。

20

【図 5】図 5 は H e L a、2 9 3 T、および H T 1 0 8 0 クローン由来の細胞溶解物および上清の p 2 4 イムノプロットの結果を示す。細胞 5×10^4 個に由来する総タンパク質を細胞溶解物として用いた。2 m l の培養上清を超遠心分離し、結果として得られた沈澱を上清として用いた。

【図 6】図 6 は H I V - 1 G a g - 安定クローン由来の培養上清中の p 2 4 抗原のレベルを示すグラフである。G a g - 安定クローンの上清中の p 2 4 抗原の検出は、培養上清の連続希釈試料について p 2 4 E L I S A によって実施した。

30

【図 7】図 7 は、安定な H I V - 1 ウイルス産生細胞株の確立に用いた、H I V を基礎とするベクター構造を図解する。図 7 A は R e v を発現する p H 7 G ベクターを図解する。図 7 B は p H R S I N - C S G W を図解する。図 7 C は p H V を図解する。

【図 8】図 8 はレトロウイルスエンベロープ安定パッケージング細胞株からのベクター産生を説明する表である。パッケージング細胞は H V ベクターの H 7 G に感染させ、またはそのベクターおよびピューロマイシン耐性プラスミドの同時トランスフェクション後にピューロマイシンを用いて選択した。力価は 2 9 3 T 細胞で測定した。

【図 9】図 9 は長期培養後の S T A R 細胞によるウイルス産生のレベルを説明する表である。

【図 1 0】図 1 0 は、p H 7 G、T a t および a m p h o エンベロープを含む V A T - 7 細胞からウイルスレスキューする能力によって測定された、g a g / p o l 機能導入のレベルを明らかにする表である。表示の数字は 2 9 3 T 細胞についてレスキューされたウイルスの力価を示す。

40

【図 1 1】図 1 1 は、ネステッド P C R によって測定した、2 9 3 T 細胞への g a g 配列の導入のレベルを示す。

【図 1 2】図 1 2 は H I V - 1 ベクターにおけるガンマレトロウイルスエンベロープの組み込みを明らかにするゲルを示す。上清 8 m l を超遠心分離によって濃縮し、沈澱を負荷緩衝液 3 0 μ l に再懸濁した。各試料 1 5 μ l を 1 0 % (上 3 図) または 1 4 % (最下図) ポリアクリルアミドゲルで泳動した。転写後に膜を、H I V C A に対して作製したマウスモノクローナル抗体 A D P 3 6 5 と A D P 3 6 6 の 1 : 1 混合物 (抗 H I V p 2 4)

50

、RD114SUに対して作製したヤギポリクローナル血清（抗RD114SU）、ラウシャー（Rauscher）MLVに対して作製したヤギポリクローナル血清SU（抗MLV SU）、またはMLV TMに対して作製したラットモノクローナル抗体42/411（抗MLV p15E）を用いてプロービングした。タンパク質マーカーの位置（kDa）を示す。ポリプレンの存在下での293T細胞に対する各ウイルス上清のeGFP力価もまた示す。

【図13】図13はさまざまな細胞株に対するHIV-1ベクターの力価測定を示すグラフである。ガンマレトロウイルスエンベロープを用いて偽型化したHIV-1ベクター（MLV-A、GALV+、RD+、およびRDpro）はOptiMEM中にSTAR細胞から採取され、またはHIV-1（VSV-G）の場合にはOptiMEM中に一過性ウイルス産生の間に採取された。各偽型はポリブレン（8 μ g/ml）の存在下で、ヒト細胞株293T、TE671、HeLaおよびHT1080、またはマウス細胞株NIH3T3について力価測定した。力価はFACSによって感染の48時間後に測定した。4 $\times 10^4$ iu/mlの検出限界を矢印で示す。

10

【図14】図14はHIV-1ベクターの37 $^{\circ}$ Cでの安定性を示すグラフである。ベクターはOptiMEM中またはDMEM+10%FCS中のどちらかに採取した。ベクターストックを37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートし、いろいろな時点で力価測定した。ポリブレン8 μ g/mlの存在下での293T細胞に対するeGFP力価を、インキュベート前のウイルス力価の比率として示す。表示の値は2回の実験の平均値であり、エラーバーは実際のデータ点を示す。

20

【図15】図15は凍結/融解サイクル反復に対するHIV-1ベクターの耐性を示すグラフである。偽型化HIVベクターを最大3回、-80 $^{\circ}$ Cおよび37 $^{\circ}$ Cにてそれぞれ凍結および融解した。ポリブレン8 μ g/mlの存在下での293Tについての、1回目のサイクルの開始前の対照力価に対する相対eGFP力価を比率で示す。表示の値は2回の実験の平均値であり、エラーバーは実際のデータ点を示す。

【図16】図16はヒト血清に対するHIV-1ベクターの耐性を示すグラフである。OptiMEM中またはDMEM+10%FCS中のどちらかに採取した偽型化HIVベクターをヒト血清に曝露した。ポリブレン8 μ g/mlの存在下での293T細胞についての力価を、新鮮凍結血清とのインキュベート後に、対応する熱不活化血清とのインキュベートに対して、ウイルス力価の比率で示す。表示の値は2回の実験の平均値である。2回の実験においてウイルス力価に2倍より大きい差は無かった。対照力価の6%を下回る値はFACSによって検出することができなかった。

30

【図17】図17はHIV-1ベクター感染に及ぼすポリブレンおよびスピノキュレーションの効果を示すグラフである。HIV-1ベクターはOptiMEM中に採取した。各偽型は293T細胞について力価測定し、1200gで2時間25 $^{\circ}$ Cにて遠心分離したかまたは、293Tについてポリブレン（8 μ g/ml）の存在下で力価測定したかまたは、両方を行った。ポリプレンの非存在下およびスピノキュレーション無しでの対照力価に対する相対力価の値を示す。

【図18】図18は濃縮されたHIV-1ベクターの力価測定を説明するグラフを示す。OptiMEM中に採取したHIV-1（MLV-A）（図A）およびHIV-1（VSV-G）（図B）をさまざまな方法によって40倍に濃縮した；100,000gおよび10,000gでの超遠心分離、3,000gでの低速遠心分離、およびセントリコン（Centricon）-20フィルター（100kDaフィルター）を用いた遠心濾過。濃縮された各ストックを2倍連続希釈し、293T細胞についてポリブレン8 μ g/mlの存在下で力価測定した。eGFP形質導入された細胞をFACSによって計数した。

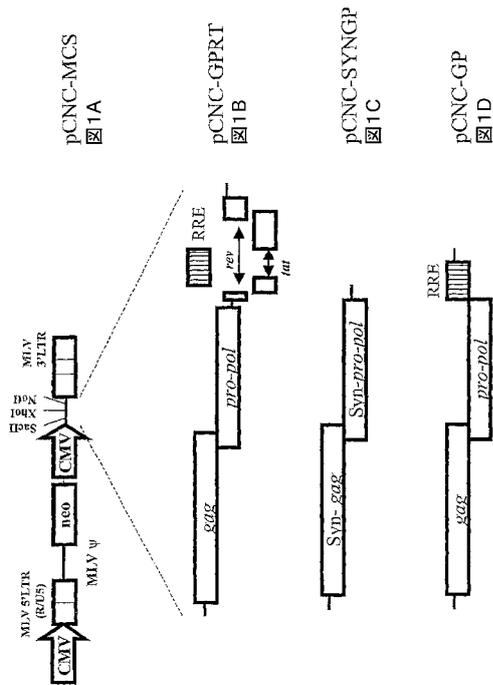
40

【図19】図19は遠心濾過によるHIV（MLV-A）調製物のゲル濾過分析を説明するグラフを示す。HIV-1（MLV-A）偽型をOptiMEM中に採取し、遠心濾過による濃縮に供した。結果として生じる濃縮されたストックをセファロース（Sepharose）ゲル濾過によって分画した。各画分の部分標本を、eGFP形質導入（図A）および、HIV-1CAおよびMLV-A Envの存在についてウェスタンブロットによ

50

ってCAおよびEnv gp70に対する抗体を用いて分析した(図B)。画分9~22に由来する部分標本を、一定量のHIV(MLV-A)またはHIV(RDpro)のどちらかと混合し、293T細胞上へポリブレン8μg/mlの存在下でプレートに加えた。パーセントeGFP形質導入をFACSによって測定した(図C)。

【 図 1 】



【 図 2 】

	CNC-GPRT		CNC-SYNGP	
	トランスフェクション	感染	トランスフェクション	感染
HeLa	2 / 324	12 / 228	0 / 44	17 / 28
HT1080	0 / 83	0 / 72	0 / 20	71 / 75
293T (選択無し)	実施せず	1 / 128	実施せず	92 / 108

図2

【 図 3 】

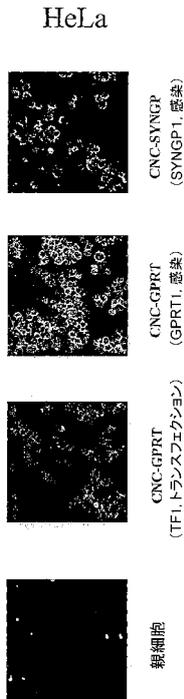


図 3

【 図 4 】

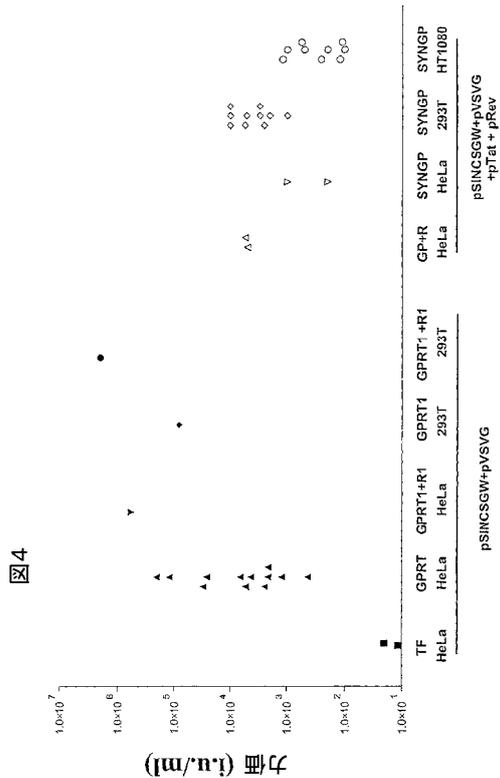


図 4

【 図 5 】

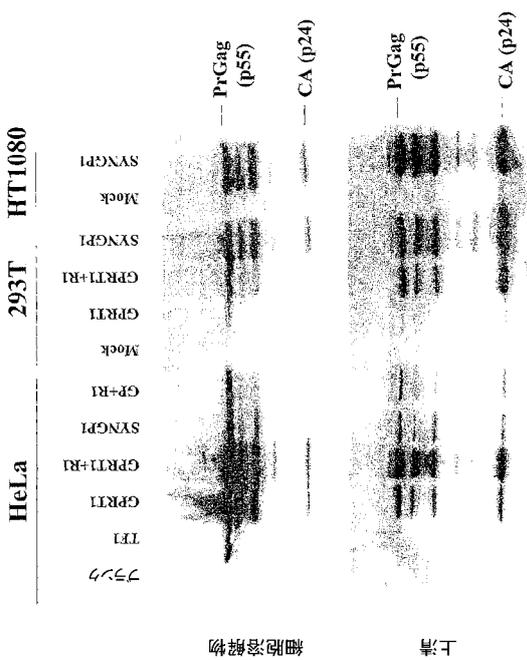


図 5

【 図 6 】

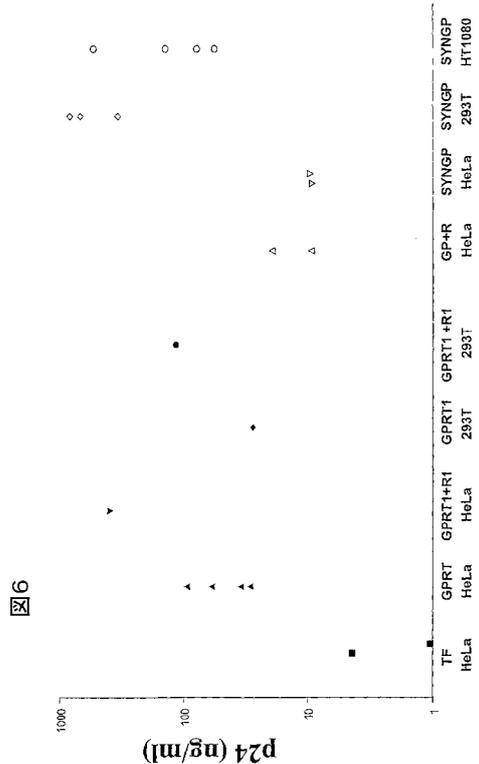
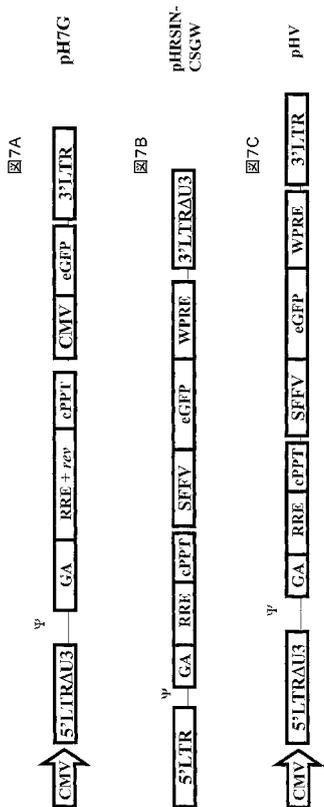


図 6

【 図 7 】



【 図 8 】

図 8

	293T/GRTH1-R1 Amplio	HPL-STAR Amplio	STAR Amplio	STAR RD/ps	STAR GALV+
H7G 感染 (MOI=10)	1.2 x 10 ⁶	4.4 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷	7.6 x 10 ⁶	N/D
H7G 感染 (MOI=10)	2.3 x 10 ⁶ (6.3 x 10 ⁶ -6.1 x 10 ⁶ × 8)	1.3 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁷ (4.5 x 10 ⁶ -3.1 x 10 ⁶ × 9)	8.5 x 10 ⁶ (1.6 x 10 ⁶ -4.3 x 10 ⁶ × 9)	1.6 x 10 ⁶
H7G 感染 (MOI=2)	検出されず	8.0 x 10 ⁵	8.5 x 10 ⁶	4.1 x 10 ⁶	1.7 x 10 ⁶
pH7 + pPuro transfection/selection トランスフェクション/選択	検出されず	検出されず	2.9 x 10 ⁵ (0.6 x 10 ⁵ -2.3 x 10 ⁵ × 12)	検出されず	検出されず
pHRIN-CSGW + pPuro トランスフェクション/選択	検出されず	検出されず	3.5 x 10 ⁵ (6.2 x 10 ⁴ -1.3 x 10 ⁵ × 11)	検出されず	検出されず

【 図 9 】

図 9

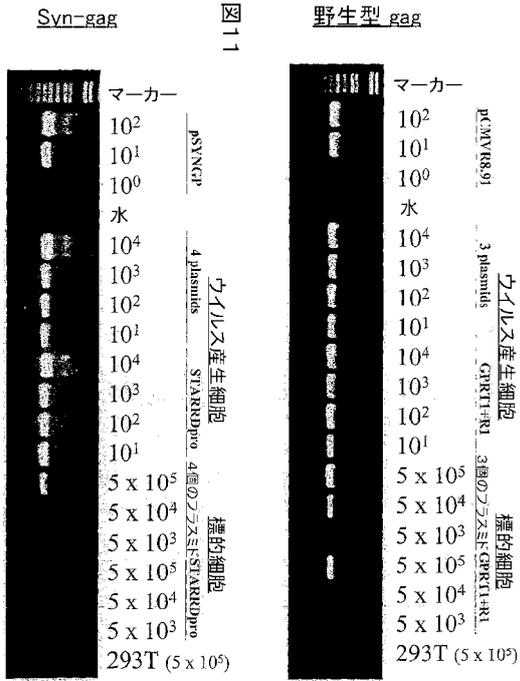
	10	27	49	70	102	270 (導入後の日数)
STAR Amplio/IV (MOI10)	4.8 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁷	8.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁷	検出されず
STAR RD/ps/IV (MOI10)	6.3 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁶	6.2 x 10 ⁶	8.2 x 10 ⁶	5.8 x 10 ⁶	検出されず
293T/GRTH1- Amplio/IV	検出されず	6.1 x 10 ⁶	検出されず	4.8 x 10 ⁶	6.2 x 10 ⁶	5.5 x 10 ⁶

【 図 10 】

図 10

Gag-Pol-Rev/ベクター/Env	3	7	14	導入後の日数			
共通性							
pCMV/RRR/IV/pH7/pMD-G	412,323	検出されず	369,788	46,211	検出されず		
pCMV/RRR/IV/pHRIN-pure/pMD-G	115						
pCMV/RRR/IV/pHRIN-pure/pMD-G	145,429	60			22,381	検出されず	
pSINCP/pCSC-Rev/pH7/pMD-G	16,0				8,0		
pSINCP/pCSC-Rev/pH7/pCMV-RD/ps	114,42				61,2	検出されず	
安定							
293T/GRTH1-R1-IV/ps/pMD-G (transient)	2,794	検出されず	16,52,36			61,7	検出されず
STAR/RRR/RD/ps	14,0,0					6,6	検出されず

【図11】



【図12】

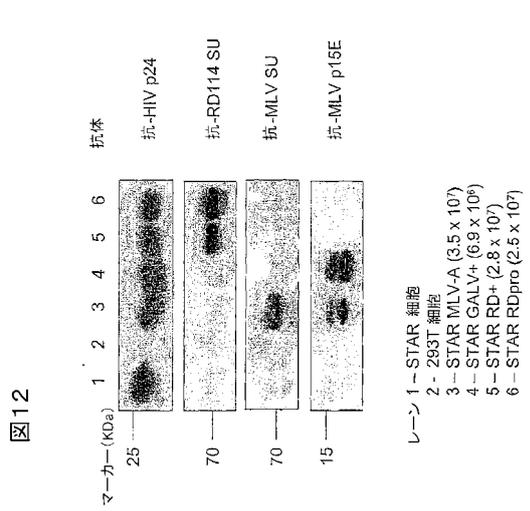


図12

【図13】

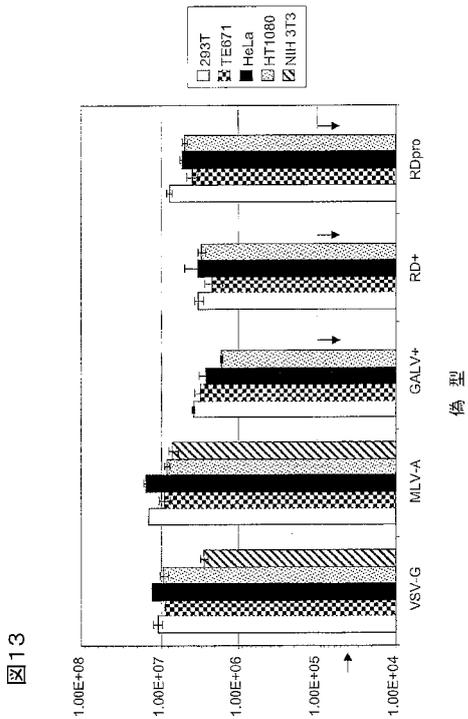


図13

【図14】

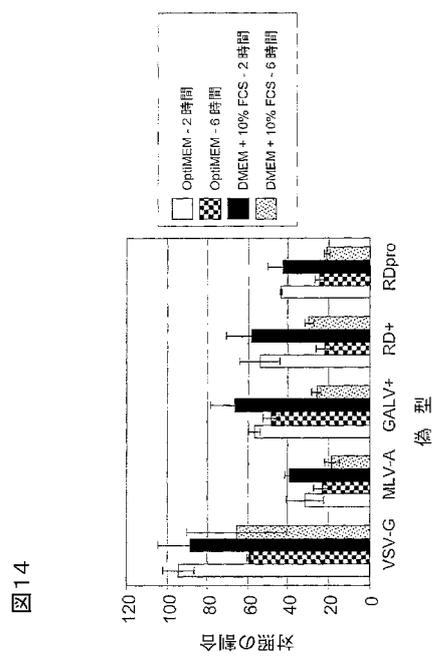
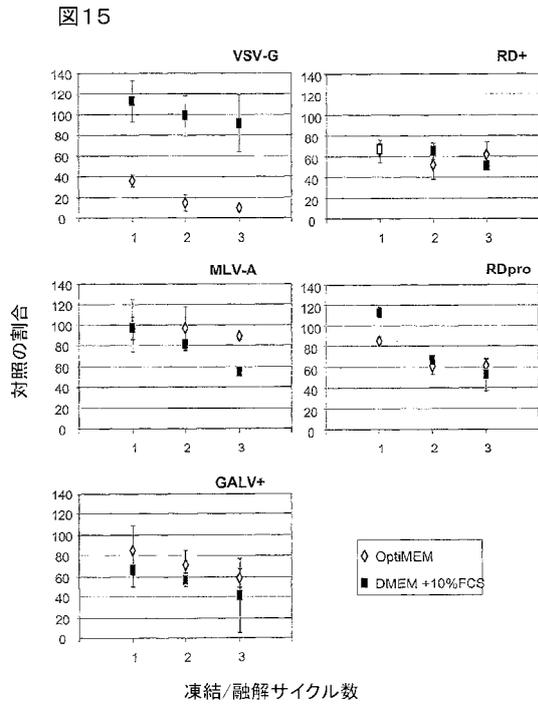
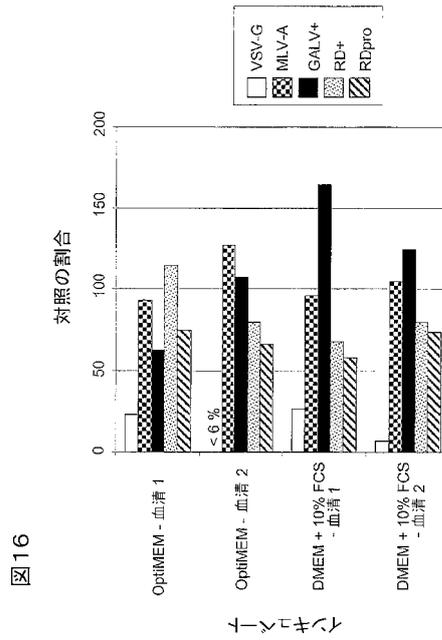


図14

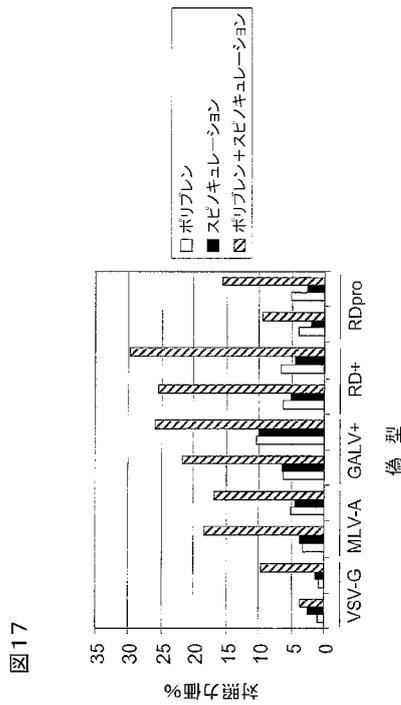
【 図 15 】



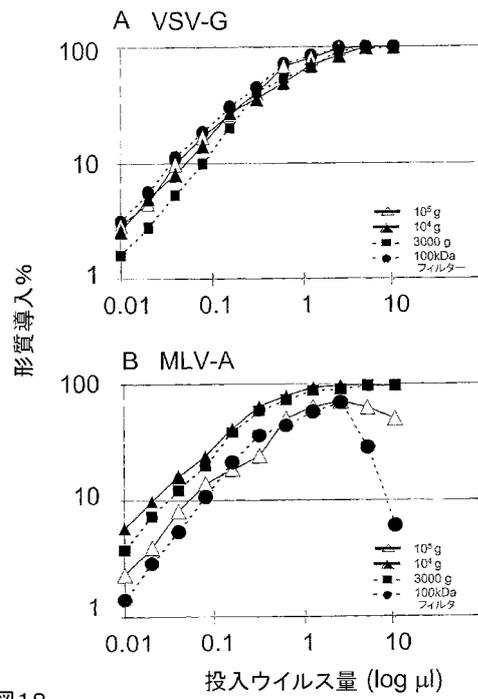
【 図 16 】



【 図 17 】

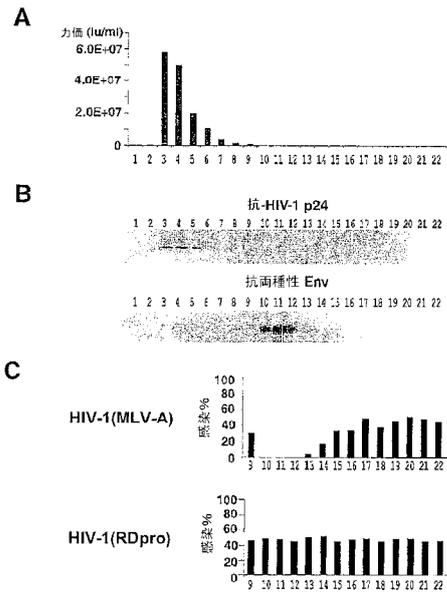


【 図 18 】



【 図 19 】

図 19



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 P 21/00 (2006.01) C 1 2 P 21/00 C

(72)発明者 ミトロファヌース キリアコス
 イギリス オックスフォード オーエックス4 4ジーエー 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 メダワー センター (番地なし) オックスフ
 ォード バイオメディカ(ユークイ)リミテッド内

(72)発明者 コリンズ メアリー
 イギリス ロンドン ダブリュー1ティー 2エイエイチ クリーヴランド ストリート (番地
 なし) ウィンデヤー インスティテュート内

(72)発明者 竹内 康裕
 イギリス ロンドン ダブリュー1ティー 2エイエイチ クリーヴランド ストリート (番地
 なし) ウィンデヤー インスティテュート内

(72)発明者 池田 靖弘
 イギリス ロンドン ダブリュー1ティー 2エイエイチ クリーヴランド ストリート (番地
 なし) ウィンデヤー インスティテュート内

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 米国特許第05691177(US,A)
 国際公開第00/017376(WO,A1)
 特表平11-511026(JP,A)
 特表2002-516065(JP,A)
 HUMAN GENE THERAPY, 2001年 5月20日, Vol.12, No.8, pp.981-997
 HUMAN GENE THERAPY, 2002年 5月 1日, Vol.13, No.7, pp.803-813
 J. Virol. , 2000年, Vol.74, No.10, pp.4839-4852
 Nat. Biotechnol. , 1997年, Vol.15, No.9, pp.871-875

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

A61K 48/00

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)