

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-172

(P2005-172A)

(43) 公開日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/711	A 6 1 K 31/711	2 G O 5 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
		4 B O 6 5
	審査請求 有 請求項の数 48 O L (全 113 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2004-199828 (P2004-199828)	(71) 出願人	591013229
(22) 出願日	平成16年7月6日(2004.7.6)		バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平9-543095の分割		BAXTER INTERNATIONAL INCORPORATED
原出願日	平成9年5月30日(1997.5.30)		アメリカ合衆国 60015 イリノイ州
(31) 優先権主張番号	08/658, 961		、ディアフィールド、ワン・バクスター・パークウェイ (番地なし)
(32) 優先日	平成8年5月31日(1996.5.31)	(74) 代理人	100083806
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 三好 秀和
(31) 優先権主張番号	08/791, 218	(72) 発明者	ウェイウェイ ザン
(32) 優先日	平成9年1月31日(1997.1.31)		アメリカ合衆国 60048 イリノイ州
(33) 優先権主張国	米国 (US)		リバティーヴィル ダーネル ストリート 1915
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミニアデノウイルスベクター

(57) 【要約】

【課題】 ウイルスの増殖の間の導入遺伝子の発現を調節し、且つヘルパー A d ゲノムのパッケージ化を選択的に弱力化するのも役立ち得るヘルパー細胞系を提供するために、改変されたアデノウイルスベクターを提供する。

【解決手段】 E 1 欠失ヘルパー A d ゲノムを含む単離 DNA 分子であって、該 E 1 欠失ヘルパー A d ゲノムが野生型ヘルパー A d ゲノムよりも低い頻度でパッケージ化されるように変更されたパッケージ化シグナルを該 E 1 欠失ヘルパー A d ゲノムが含む単離 DNA 分子である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E 1 欠失ヘルパー A d ゲノムを含む単離 D N A 分子であって、該 E 1 欠失ヘルパー A d ゲノムが野生型ヘルパー A d ゲノムよりも低い頻度でパッケージ化されるように変更されたパッケージ化シグナルを該 E 1 欠失ヘルパー A d ゲノムが含む単離 D N A 分子。

【請求項 2】

前記弱力化パッケージ化シグナルがアデノ富化モチーフ (A 反復) の部分的な欠失を含む、請求項 1 に記載の単離 D N A 分子。

【請求項 3】

前記弱力化パッケージ化シグナルが、該弱力化パッケージ化シグナルに対するパッケージ化タンパク質の親和性が低下するように直接反復を含む、請求項 1 に記載の単離 D N A 分子。 10

【請求項 4】

前記弱力化パッケージ化シグナルが、該弱力化パッケージ化シグナルに対するパッケージ化タンパク質の親和性が低下するように A 反復配列の直列反復を含む、請求項 1 に記載の単離 D N A 分子。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の単離 D N A 分子であって、前記弱力化パッケージ化シグナルが該 D N A 分子上のタンパク結合部位に隣接して位置し、それにより該タンパク質の該タンパク結合部位への結合がパッケージ化タンパク質と該弱力化パッケージ化シグナルとの会合を妨げる単離 D N A 分子。 20

【請求項 6】

前記パッケージ化シグナルが前記 E 1 欠失ヘルパー A d ゲノム内の野生型ヘルパー A d ゲノムに見出されるもの以外の位置に位置する、請求項 1 に記載の単離 D N A 分子。

【請求項 7】

前記パッケージ化シグナルが、パッケージ化タンパク質に対する親和性が野生型パッケージ化タンパク質よりも低い合成パッケージ化シグナルである、請求項 1 に記載の単離 D N A 分子。

【請求項 8】

前記アデノウイルスゲノムが E 1 に加えてアデノウイルス遺伝子の欠失を含む、請求項 1 に記載の単離 D N A 分子。 30

【請求項 9】

A d E 1 遺伝子配列を含む D N A 分子が安定に形質移入されている細胞であって、該配列が E 1 欠失ヘルパー A d ゲノムのゲノムと重複する配列を持たない細胞。

【請求項 10】

非ヒトトランスジェニック動物の生成方法であって、
胚幹細胞に、 A A V S 1 配列及び薬剤選択マーカー遺伝子を含む D N A 分子を形質移入する工程；

該薬剤選択マーカー遺伝子の発現により耐性が付与される薬剤の存在下において成長させることにより、そのゲノム内に該 D N A 分子を含む胚幹細胞を選択する工程； 40

該胚幹細胞を胚盤胞に微量注入する工程；

該胚盤胞を仮母に移植する工程；

得られた子孫を飼育する工程；

該子孫を A A V S 1 配列の存在について検定する工程；及び

A A V S 1 配列が検出されている子孫をホモ接合まで飼育する工程；

を組み合わせることで包含し、

それによりそのゲノムに A A V S 1 配列が組み込まれているトランスジェニック動物が生じる方法。

【請求項 11】

前記非ヒトトランスジェニック動物がマウスである、請求項 10 に記載の方法。 50

【請求項 12】

前記 DNA 分子が図 50 に示される pAAVS1-Neo である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

そのゲノムに安定に組み込まれている AA VS 1 配列を有する非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 14】

そのゲノムに安定に組み込まれている AA VS 1 配列を有する非ヒトトランスジェニック動物であって、該動物がマウスである非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 15】

前記動物が、該動物のゲノムに安定に組み込まれている、FV III 様活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をさらに有する、請求項 14 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

10

【請求項 16】

前記動物が、該動物のゲノムに安定に組み込まれている、ヒト FV III をコードする核酸をさらに有する、請求項 14 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 17】

前記動物が血友病表現型、及び該動物のゲノムに安定に組み込まれている、FV III 様活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を有する、請求項 14 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

20

【請求項 18】

前記動物が血友病表現型及び該動物のゲノムに安定に組み込まれているヒト FV III 遺伝子を有する、請求項 14 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 19】

そのゲノムに安定に組み込まれている DNA 分子 pAAVS1-Neo 又はそれらの断片を有する、非ヒトトランスジェニックマウス。

【請求項 20】

前記動物がマウスである、請求項 19 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 21】

そのゲノムに AA VS 1 配列が組み込まれている非ヒトトランスジェニック動物への、AAV-ITR を含むウイルスベクターのイン・ビボ送達を試験するための方法であって

30

、
生理学的に許容し得るバッファ中の、AAV-ITR 配列を有する DNA 分子を含み、かつレポーター又はエフェクター遺伝子をコードするベクターを該動物の静脈内又は門脈に注射する工程；

該動物から複数の血液試料を得る工程；

該血液試料における遺伝子発現の水準を測定して導入遺伝子の発現の持続を決定する工程；及び

該動物の肝臓組織からゲノム DNA を単離する工程；及び

AA VS 1 特異的プライマーを用いて該組織のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 分析を行って該動物のゲノムへの該ベクターの組み込みを検出する工程；
を組み合わせる方法。

40

【請求項 22】

前記ゲノム DNA に対する蛍光インサイツ・ハイブリダイゼーション分析を行って、前記 AA VS 1 配列の染色体位置を決定し、かつ前記 AA VS 1 配列での前記レポーター又はエフェクター遺伝子の組み込みを検出する工程をさらに含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 DNA 分子がアデノウイルス ITR 配列、AAV ITR 配列、転写制御領域、レポーター又はエフェクター遺伝子、及び Rep 発現カセットを含み、これらの全てが感染

50

性複製不全組換えアデノウイルスベクターの生成に作用的に関連し、該DNA分子の残部はアデノウイルスタンパク質をコードしない、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

前記DNA分子がアデノウイルスITR配列、AAV ITR配列、転写制御領域、FV III様活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、及びRep発現カセットを含み、これらの全てが感染性複製不全組換えアデノウイルスベクターの生成に作用的に関連し、該DNA分子の残部はアデノウイルスタンパク質をコードしない、請求項21に記載の方法。

【請求項25】

前記DNA分子がアデノウイルスITR配列、AAV ITR配列、転写制御領域、ヒトFV IIIをコードする核酸、及びRep発現カセットを含み、これらの全てが感染性複製不全組換えアデノウイルスベクターの生成に作用的に関連し、該DNA分子の残部はアデノウイルスタンパク質をコードしない、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

ヒトFV IIIに対して寛容化されている非ヒトトランスジェニック動物の生成方法であって、

胚幹細胞にヒトFV IIIをコードする核酸及び薬剤選択マーカー遺伝子を含むDNA分子を形質移入する工程；

該薬剤選択マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質の発現により耐性が付与される薬剤の存在下において該細胞を成長させることにより、そのゲノム内に該DNA分子を含む胚幹細胞を選択する工程；

該胚幹細胞を胚盤胞に微量注入する工程；

該胚盤胞を仮母に移植する工程；

得られた子孫を飼育する工程；

該子孫を、該子孫のゲノム内の該ヒトFV III遺伝子の存在について検定する工程；及び

該ヒトFV III遺伝子が検出されている子孫をホモ接合まで飼育する工程；を組み合わせる包含し、

それによりヒトFV IIIに対して寛容化されたトランスジェニック動物が生じる方法

。

【請求項27】

前記DNA分子が、合成プロモーター、発生的に調節されるプロモーター又は組織特異的プロモーターからなる群より選択されるプロモーターの転写制御の下にヒトFV III遺伝子を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記DNA分子が、 - 胎児タンパク質プロモーター、アルブミンプロモーター及び - 抗トリプシンプロモーターからなる群より選択されるプロモーターの制御の下にヒトFV III遺伝子を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

前記DNA分子が図57に示されるmAFP-hFV III/pGKNeoを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項30】

前記動物がマウスである、請求項26に記載の方法。

【請求項31】

ヒトFV III遺伝子を肝臓特異的プロモーターの転写制御の下に含むDNA分子を含む胚幹細胞であって、該DNA分子が薬剤選択マーカー遺伝子をさらに含む胚幹細胞。

【請求項32】

ヒトFV IIIに対して寛容化されているトランスジェニックマウス。

【請求項33】

- 胎児タンパク質プロモーター、アルブミンプロモーター及び - 抗トリプシンプロ

モーターからなる群より選択されるプロモーターの転写制御の下に、そのゲノムに組み込まれているヒト F V I I I 遺伝子を有する、ヒト F V I I I に対して寛容化されているトランスジェニックマウス。

【請求項 3 4】

図 5 7 に示される DNA 分子 m A F P - h F V I I I / p G K N e o 又は、それらの断片を有し、前期マウスのゲノムに組み込まれているトランスジェニックマウス。

【請求項 3 5】

緑色蛍光タンパク質に対して寛容化されている非ヒトトランスジェニック動物の生成方法であって、

胚幹細胞に、合成プロモーター、組織特異的プロモーター及び発生的に調節されるプロモーターからなる群より選択されるプロモーターの転写制御の下に緑色蛍光タンパク質遺伝子を含む DNA 分子を形質移入する工程； 10

該薬剤選択マーカー遺伝子のタンパク質産生物の発現により耐性が付与される薬剤の存在下において成長させることにより、そのゲノム内に該 DNA 分子を含む胚幹細胞を選択する工程；

該胚幹細胞を胚盤胞に微量注入する工程；

該胚盤胞を仮母に移植する工程；

得られた子孫を飼育する工程；

該子孫を緑色蛍光タンパク質遺伝子配列の存在について検定する工程；及び

そのゲノム内に緑色蛍光タンパク質遺伝子配列が検出されている子孫をホモ接合まで飼育する工程； 20

を組み合わせる包含し、

それにより緑色蛍光タンパク質に対して寛容化されたトランスジェニック動物が生じる方法。

【請求項 3 6】

前記動物がマウスである請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記組織特異的プロモーターが肝臓特異的である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記組織特異的プロモーターが - 胎児タンパク質プロモーター、アルブミンプロモーター及び 1 - 抗トリプシンプロモーターからなる群より選択される、請求項 3 5 に記載の方法。 30

【請求項 3 9】

前記 DNA 分子が図 6 0 に示される B S 由来 R I P - p E G F P 及び図 5 9 に示される A F P - p E G F P - 1 からなる群より選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 4 0】

緑色蛍光タンパク質に対して寛容化されているトランスジェニックマウス。

【請求項 4 1】

そのゲノムに安定に組み込まれている、図 6 0 に示される B S 由来 R I P - p E G F P 及び図 5 9 に示される A F P - p E G F P - 1 からなる群より選択される DNA 分子を有するトランスジェニックマウス。 40

【請求項 4 2】

そのゲノム内に A A V S 1 配列を含む非ヒトトランスジェニック緑色蛍光タンパク質寛容化動物への、A A V - I T R 及び緑色蛍光タンパク質遺伝子を含むベクターのイン・ピボ送達を試験する方法であって、

該ベクターを該動物に注射する工程；

該動物から血液試料を単離し、該血液試料を緑色タンパク質の存在について分析する工程；

該動物から肝臓組織を単離する工程；

ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 分析により、緑色蛍光タンパク質遺伝子配列をコード 50

する核酸の存在について該肝臓組織を分析する工程；

該肝臓組織の凍結切片を調製し、蛍光顕微鏡技術を用いて該凍結切片を緑色蛍光タンパク質の存在について分析する工程；

を組み合わせる包含し、

緑色蛍光タンパク質の存在は該トランスジェニック動物内で検出される方法。

【請求項 4 3】

前記非ヒトトランスジェニック動物がマウスである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

図 4 2 に示される、G T 2 0 7 4 と呼ばれる D N A 分子。

【請求項 4 5】

図 4 3 に示される、p C M V - h F V I I I ミニと呼ばれる D N A 分子。

【請求項 4 6】

図 6 0 に示される、A F P - p E G F P - 1 と呼ばれる D N A 分子。

【請求項 4 7】

図 5 6 に示される、m A F P - h F V I I I / p G K N e o と呼ばれる D N A 分子。

【請求項 4 8】

図 6 0 に示される、B S 由来 R I P - p E G F P と呼ばれる D N A 分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、1996年5月31日出願の米国出願番号08/658,961号及び1997年1月31日出願の米国出願番号08/791,218号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

本発明はアデノウイルス(A d)ベクター、並びに遺伝子移入、遺伝子治療、及び遺伝子ワクチン接種を含む遺伝学的医療の分野におけるそれらの用途に関する。特に、本発明は、A dゲノムの最小c i s - 要素を担持し(ミニA dベクター)、且つ約36kbまでの導入遺伝子及び/又は異種D N Aを送達することが可能なA dベクターに関する。このミニA dベクターの生成及び増殖には、A dヘルパー細胞系におけるパッケージ化弱力化複製欠損ヘルパーA d(ヘルパー)のトランス補完性が必要とされる。

【0 0 0 3】

本発明は、さらに、血友病の遺伝子治療において用いるためのミニアデノウイルス(ミニA d)ベクター及びこのA dベクターのイン・ビボ評価のための動物試験系を生成するための方法論を包含する。特に、本発明では、A dゲノムの最小シス - 要素(いわゆるミニA d)のみを有し、且つヒトF V I I I c D N Aを他の支持D N A要素と共に36kdまで含む第V I I I因子(F V I I I)A dベクターが説明される。このF V I I IミニA dは、パッケージ化弱力化ヘルパーA d及びヘルパー細胞系の補助により生成し、優先的に増幅させることができる。また、本発明は、ミニA dのイン・ビボ試験に用いることができるトランスジェニックマウスモデルを生成するための構造及び方法も報告する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

遺伝学的医療の開発における重要な問題は好ましい遺伝子送達系の開発である。この好ましい遺伝子送達系は、単一の遺伝子治療ベクターにおいて現在利用不可能である幾つかの特性を有していなければならない。この好ましいベクターは、大きな、もしくは複数の、調節要素を含む導入遺伝子を受け入れるのに適する収容力を保持し、且つ製造のための簡潔な操作及びスケールアップに順応しなければならない。また、このようなベクターは安全で低毒性を示すことはもちろん、標的細胞又は組織への非常に効率的且つ選択的な導入遺伝子の送達を示さなければならない。最後に、このようなベクターは、標的細胞における導入遺伝子の適切な保持、発現、及び調節を支持することが可能でなければならない。本発明は、新規構造の高収容力且つ高効率A dベクター系を包含し、好ましい遺伝子送

10

20

30

40

50

達系に関する問題及び当業者の関心を解決することに焦点を当てる。

【0005】

血友病Aは、疾患に冒された個体において凝固因子V I I I (F V I I I) の発現又は機能における欠損の結果生じる。血友病の治療は、現在、血漿濃縮物から得られ、又は組換えF V I I I タンパク質を発現するように操作された培養細胞から精製して得られる正常F V I I I タンパク質の注入を含む(1)。治療上の利点は血漿濃度が正常血漿濃度(ミリリットル当たり200 - 300 ngもしくは1単位;参考文献2)の5 - 10%にまで回復することにより達成される。正常血漿濃度の30%を上回る濃度の維持が正常な生活様式の近いものと見込まれることが研究により示されている(3)。血友病の治療を指向する遺伝子治療アプローチは刺激的な潜在力を有する;しかしながら、幾つかの主な挑戦は、これらの治療様式を現実のものとするために克服すべきもののみである(4)。本発明は、これらの困難を解決することが可能な幾つかの手段を提供する。

10

【0006】

F V I I I は通常肝臓において生成され、新生ポリペプチドのアミノ末端から誘導される、92 k D a乃至210 k D aの見かけの分子量範囲を有する重鎖ポリペプチド及び80 k D aのC - 末端軽鎖を含んでなる(53)。これは、ファンデルワールス力(v W F)での複合体の形成によりタンパク分解から保護されている。その活性化形態は、血液凝固カスケードにおいて、活性化第I X 因子(F I X a)、負に荷電したリン脂質及びカルシウムイオンと共に補因子として作用し、第X 因子をその活性化形態X aに変換する。ヒトc D N Aは9 k bの長さであり、数種類のドメインをA 1、A 2、B、A 3、C 1及びC 2の順で含んでなる2351アミノ酸のペプチドをコードする(5 - 7)。A及びCドメインは機能的な活性に重要であり、これに対して約980アミノ酸からなるBドメインの大部分は活性には不必要である(8)。完全長F V I I I c D N Aはレトロウイルス及びアデノウイルスベクターのサイズ制限を超えるため、現在までに当業者によって用いられる遺伝子治療プロトコルの大部分は、残りのc D N Aが約4.5 k bとなるようにBドメインを欠失させたF V I I I c D N Aを用いる。

20

【0007】

レトロウイルスベクターは遺伝子治療における使用について最初に研究すべきもののうちの1つであった(64、65)。外来性D N Aの挿入に対するサイズ容量は約7.5 k bに制限される。一般には、ウイルスm R N Aの不安定性の問題及びF V I I I 遺伝子産生物(61, 63, 74)をコードするm R N Aの発現の困難性のため、レトロウイルスベクターから高水準のF V I I I の発現を得ることは困難である。加えて、大部分の肝細胞のような非分裂細胞の感染にも問題がある。この制限を克服する方法の1つは、レトロウイルス感染に先立って2/3部分的肝切除を行い、活発に再生する肝細胞の感染を可能にすることである(73)。別のアプローチにおいては、筋肉特異的エンハンサーを用いて長期間の発現が達成されているが、低水準の遺伝子産生物F I Xのみが達成されただけである(78)。治療水準のF V I I I はマウスにおいて達成されている(77)。

30

【0008】

近年、ネズミアルブミンプロモーターの制御の下にあるBドメイン欠失F V I I I c D N Aを含むE 1置換アデノウイルスベクターが用いられ、マウス及びイヌにおいて治療水準のヒトF V I I I の発現が達成されている(13 - 15)。F V I I I c D N Aを含むこのアデノウイルスベクターを高用量(4 X 10⁹ p f u)投与した場合、免疫適格動物における遺伝子の発現は持続性の点で制限された;遺伝子発現の漸進的な低下は肝臓組織におけるアデノウイルスベクターD N Aの検出の喪失と相関していた(13)。発現の低下はベクター接種物を減少させることにより部分的に解消され、その結果、F V I I I の治療血漿濃度が投与の後22週間続いた(16)。しかしながら、これらの研究において用いられたC 5 7 B 1 / 6株のマウスは免疫応答が弱力化された;このため、これらの結果は、完全に免疫適格の動物を用いて得ることができるものを反映していない可能性がある。イヌにおける、これらのベクターを用いる発現の急速な低下は、ヒトF V I I I タンパク質又はアデノウイルスタンパク質に対する免疫応答に起因するものであると考え

40

50

ることが可能であった。このようなE1置換アデノウイルスベクターのヒトにおける潜在的な使用を確認するには、イヌのようなより大型の動物でイヌFV111を用いて実験を行うことが必要であろう。

【0009】

アデノウイルスベクターは、1)アデノウイルスの静脈内(I.V.)注射の結果、部分的にはこのアデノウイルスベクターが主として肝臓組織に蓄積するため、遺伝子発現の標的が肝臓に設定され;2)肝臓からのFV111の発現が血漿中のFV111の濃度を大きく上昇させ;及び3)正常な個体においては肝臓がFV111の合成の主要部位であるという事実により、FV111の送達に好ましいものであり得る。

【0010】

しかしながら、重大な困難はアデノウイルス遺伝子の送達に関連する。例えば、Adは通常宿主細胞のゲノムに組み込まれない。導入遺伝子の発現を長期間維持するためには、Adが宿主細胞の統合に必要な要素又はDNA保持の他の機構を含まなければならない。加えて、アデノウイルスベクターに対して介在する免疫応答がそのベクターの再投与を非常に困難なものとする(76)。本発明のミニAdベクターは、導入遺伝子を担持するミニAdベクターから全てのアデノウイルス遺伝子が排除されている。これは、少なくとも部分的に、宿主細胞におけるAd遺伝子の発現によって生じる可能性がある、導入遺伝子の発現の低下に寄与し得るあらゆる有害な免疫応答を排除する。

【0011】

大きな異種DNAインサートを考慮したアデノウイルスベクターが国際特許出願WO96/33280号に記述されている(参考文献132を参照);しかしながら、このベクターは、標的細胞に侵入した際にこのベクターを標的細胞ゲノムに組み込むための、又はエピソーム維持のための要素を提供しない。本発明は、標的細胞ゲノムに組み込むことにより、又はエピソーム核酸として維持することにより、宿主細胞における送達された導入遺伝子の保持が考慮された要素を提供する。本発明によってこれが達成される方法の1つは、ウイルス組み込み機構を用いて宿主細胞のゲノムへの導入遺伝子の組み込みを容易にすることを含む。アデノ関連ウイルス(AAV)ゲノムは感染した細胞のDNAに組み込まれる能力を有し、ヒトゲノムの特定の部位、19q13.3-qtterのAAVS1に組み込まれる外来性DNAの唯一の例である(35、133)。AAV組み込みの最小要素は逆末端反復(ITR)配列及び機能的Rep78/68タンパク質である。本発明は、導入遺伝子の発現を持続させるために宿主細胞のゲノムに導入遺伝子を組み込むためのこれらの組み込み要素を包含する。また、本発明は、標的細胞のゲノムへの異種組換えが可能なアデノウイルスベクター、当業者が現在利用可能なアデノウイルスベクターを上回る別の重要な利点をも提供する。また、本発明は、導入遺伝子のエピソーム複製を可能にする要素をも提供する。

【0012】

不死化細胞系(22-24、134)、エピソーム系(25-27)、及び細胞非含有抽出物(28)におけるAAV又はAAVベースのベクターの部位特異的組み込みを検出するためにイン・ビトロモデル系が開発されている。始原ヒト細胞又は不死化細胞系を用いるAAVの形質導入効率の比較は、形質導入効率が不死化ヒト細胞において始原細胞よりも10-60倍高いことを示した(29)。これらの結果は始原細胞を用いることの重要性を、又は、イン・ビボモデル系においてAAVベクターを遺伝子治療用途について正確に評価することがさらに良いことを強調する。しかしながら、現在に至るまで、部位特異的組み込みを検出するためのイン・ビボ動物モデル系は開発されていない。そのゲノムにヒトAAVS1配列が組み込まれた動物モデルが本発明において提供される。この動物モデルは、部位特異的組み込みを試験するだけでなく、イン・ビボでの遺伝子送達、遺伝子導入効率、組織分布、及び遺伝子の発現の持続をも試験するための、AAV組み込み機構を有するベクターの評価に有用である。

【0013】

血友病のイヌ及びマウスを含む動物モデルがFV111調製品の効率の試験に用いられ

10

20

30

40

50

ている(11、13-15、82、83)。しかしながら、ヒトFV III 遺伝子治療については、動物モデルにおけるヒトFV III タンパク質に対する免疫応答がFV III の長期送達の研究を複雑なものにする可能性がある。本発明はヒトFV III に対して寛容である動物モデルを提供する。このような動物におけるヒトFV III に対する免疫応答の欠如には、ヒトFV III に対する免疫応答によって生じ得る免疫学的な複雑性なしに導入遺伝子の送達を正確に評価する余地がある。

【0014】

本発明のミニAdベクター系は2つの重要な発見に基づいて開発された：1) ウイルスゲノムの大部分がSV40の配列で置換されているものの、Ad ITR及びパッケージ化要素が存在するため処理を受けてパッケージ化され得るAd-SV40ハイブリッドの発見(17)；及び2) パッケージ化シグナルの部分的な欠失によりAdのパッケージ化を弱力化することが可能であること(18)。パッケージ化及びゲノム複製のための最小シス要素の組み込みに基づく他のアデノウイルスベクターパッケージング系を他者が開発中である(19-21)。

10

【特許文献および非特許文献】

【0015】

参 考 文 献

1. Mannuchi, P.M. 1993. Modern Treatment of Hemophilia: From the shadows towards the light. *Thrombosis and Haemostasis* 70: 17-23.
2. Kazazian, H. H. Jr. 1993. The molecular basis of hemophilia A and the present status of carrier and antenatal diagnosis of the disease. *Thrombosis and Haemostasis* 70: 600-62. 10
3. Furie, B, S.A. Limentani, and C.G. Rosenfield. 1994. A practical guide to the evaluation and treatment of hemophilia. *Blood* 84: 3-9.
4. Jones, L.K., and E.G.D. Tuddenham. 1995. Gene therapy for hemophilias. *Gene Ther.* 2: 699-701.
5. Toole, J.J., J.L. Knopf, J.M. Wozney, L.A. Sultzman, L.L. Buecker, D.D. Pitman, R.J. Kaufman, E. Brown, C.B. Sheoemaker, E.C. Orr, G.W. Amphlett, B. Foster, M.L. Coe, G.J. Knutson, D.N. Fass, and R.M. Hewick. 1984. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 312: 342-347. 20
6. Wood, W.I., D.J. Capon, C.C. Simonsen, D.L. Eaaton, J. Gitschier, B. Keyt, P.H. Seeburg, D.H. Smith, P. Hollingshead, K. Wion, E. Delwart, E.G.D Tuddenham, G.A. Vehar, and R.M. Lawn. 1984. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312: 330-337.
7. Truett, M.A., R. Blacher, R.L. Burke, D. Caput, C. Chu, D. Dina, K. Hartog, C. H. Kuo, F.R. Masiarz, J.P. Merryweather, R. Najarian, C. Pachl, S.J. Potter, J.Puma, M. Quiroga, L.B. Rall, A Randolph, M.S. Urdea, P. Valenzuela, H.H. Dahl, J. Favalaro, J. Hansen, O. Nordfang, and M. Ezban. 1985. Characterization of the polypeptide composition of human factor VIII:C and the nucleotide sequence and expression of the human kidney cDNA. *DNA* 4: 333-349. 30
8. Toole, J.J., D.D. Pittman, E.C. Orr, P. Murtha, L.C. Wasley, and R.J. Kaufman. 1986. A large region (~95 kDa) of human factor VIII is dispensable for *in vitro* procoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 5939-5942. 40
9. Koeberl, D.D., C.L. Halbert, A. Krumm and A.D. Miller. 1995. Sequences within the coding regions of clotting factor VIII and CFTR block transcriptional elongation. *Human Gene Ther.* 6: 469-479.

10. Hoeben, R.C., F.J. Fallaux, S.J. Cramer, D.J.M. van den Wollenberg, H. van Ormondt, E. Briet, and A.J. van der Eb. 1995. Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. *Blood*. 85: 2447-2454.
11. Dwarki, V.J., P. Belloni, T. Nijar, J. Smith, L. Couto, M. Rabier, S. Clift, A. Berns and L. Cohen. 1995. Gene therapy for hemophilia A: Production of therapeutic levels of human factor VIII *in vivo* in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1023-1027. 10
12. Chuah, M.K.L., T. Vandendriessche, and R.A. Mogan. 1995. Development and analysis of retroviral vectors expressing human factor VIII as a potential gene therapy for hemophilia A. *Human Gene Ther.* 6: 1363-1377.
13. Connelly, S., T.A.G. Smith, G. Dhir, J.M. Gardner, M.G. Mehaffey, K.S. Zaret, A. McClelland and M. Kaleko. 1995. *In vivo* gene delivery and expression of physiological levels of functional human factor VIII in mice. *Human Gene Therapy* 6: 185-193. 20
14. Connelly, S., J.M. Gardner, A. McClelland, and M. Kaleko. 1996. High-level tissue-specific expression of functional human factor VIII in mice. *Hum. Gene Ther.* 7:183-195.
15. Connelly, S., J. Mount, A. Mauser, J. Gardner, M. Kaleko, A. McClelland, and C. D. Lothrop Jr. 1996. Complete short-term correction of canine hemophilia A by *in vivo* gene therapy. *Blood* 88: 3846-3853. 30
16. Connelly, S., J.M. Gardner, A., R.M. Lyons, A. McClelland, and M. Kaleko. 1996. Sustained expression of therapeutic levels of human factor VIII in mice. *Blood* 87: 4671-4677.
17. Gluzman, Y. and K. Van Doren. 1983. Palindromic adenovirus type 5-simian virus 40 hybrid. *J. Viol.* 45: 91-103. 40
18. Grable, M., and P. Hearing. 1992. *cis* and *trans* requirements for the selective packaging of adenovirus type 5 DNA. *J. Virol.* 66: 723-731.
19. Fisher, K. J., H. Choi, J. Burda, S-J Chen, and J.M. Wilson. 1996 Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* 217: 11-22.

20. Haecker, S.E., H.H. Stedman, R.J. Balice-Gordon, D.B.J. Smith, J.P. Greelish, M.A. Mitchell, A. Wells, H.L.Sweeney, and J.M. Wilson. 1996. *In vivo* expression of full-length human dystrophin from adenoviral vectors deleted of all viral genes. *Hum. Gene Ther.* 7: 1907-1904.
21. Kochanek, S., P.R. Clemens, K. Mitani, H-H Chen, S. Chan, and C.T. Caskey. 1996. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and β -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5731-5736 10
22. Kotin, R., Siniscalco, M., Samulski, J., Zhu, X., Hunter, L., Laughlin, C., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K.I. (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2211-2215.
23. Samulski, J., Zhu, X., Brook, J., Housman, D., Epstein, N., and Hunter, L. (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10: 3941-3950. 20
24. Shelling, A. and Smith, M. (1994) Targeted integration of transfected and infected adeno-associated virus vectors containing the neomycin resistance gene. *Gene Therapy* 1: 165-169.
25. Giraud, C., E. Winocour, and K.I. Berns 1994. Site-specific integration by adeno-associated virus is directed by a cellular sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10039-10043. 30
26. Giraud, C., E. Winocour, and K. Berns. (1995) Recombinant junctions formed by site-specific integration of adeno-associated virus into an episome. *J. Virol.* 69: 6917-6924.
27. Linden, R., E/ Winocour, and K. Berns. (1996) The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *P.N.A.S.* 93: 7966-7972.
28. Urcelay, E., P.S.M. Ward, S.M. Wiener, B. Safer, and R. Kotin 1995. Asymmetric replication *in vitro* from a human sequence element is dependent on adeno-associated virus rep protein. *J. Virol.* 69: 2038-2046. 40
29. Halbert, C., L. Alexander, G. Wolgamot, and D. Miller. (1995) Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells. *J. of Virology* 69: 1473-1479.

30. Tripathy, S., H. Black, E. Goldwasser, and J. Leiden. (1996). Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nature Medicine* 2: 545-550.
31. Ghosh-Choudhury, G., Y. Haj-Ahmad, and F.L. Graham. 1987. Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full-length genomes. *EMBO J.* 6: 1733-1739.
32. Hayashi, Y., J. Chan, H. Nakabayashi, T. Hasimoto, and T. Tamaoki. 1992. Identification and characterization of two Enhancers of the human albumin gene. *J. Biol. Chem.* 267: 14580-14585. 10
33. Urano, Y., M. Sakai, K. Watanabe, and T. Tamaoki. 1984. Tandem arrangement of the albumin and alpha-fetoprotein genes in the human genome. *Gene* 32: 255-261.
34. Berns, K.I. 1996. Parvoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincot-Raven. Third, ed. 2173- 2197. 20
35. Kotin, R.M., R.M. Linden, and K.I. Berns 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* 11: 5071-5078.
36. Im, D.S., and N. Muzyczka 1989. Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol.* 63: 3095-3104.
37. Ashktorab, H., and A. Srivastava 1989. Identification of nuclear proteins that specifically interact with adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeat hairpin DNA. *J. Virol.* 63: 3034-3039. 30
38. Im, D.S., and N. Muzyczka 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61: 447-457.
39. Im, D.S., and N. Muzyczka 1992. Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep68, Rep52 and Rep40 and their biochemical characterization. *J. Virol.* 66: 1119-1128. 40
40. Wonderling, R.S., S.R.M. Kyöstiö, and R.A. Owens 1995. A maltose-binding protein/adeno-associated virus rep68 fusion protein has DNA-RNA helicase and ATPase activities. *J. Virol.* 69: 3542-3548.

41. Weitzman, M.D., S.R.M. Kyöstiö, R.M. Kotin, and R.A. Owens 1994. Adeno-associated virus (AAV) rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5808-5812.
42. Deuschle, U., W.K-H Meyer, and H-J Thiesen. 1995. Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1907-1914. 10
43. Robertson, E.J. 1987. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical Approach.* IRL Press, Oxford. pp. 71-182.
44. Pittman, D.D., E.M. Alderman, K.N. Tomkinson, J.H. Wang, A. R. Giles, and R.J. Kaufman. 1993. Biochemical, Immunological, and in vivo characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood* 81: 2925-2935.
45. Ghebranious, N., B.J. Knoll, L. Yavorkovsky, Z. Ilic, J. Papaconstantinou, G. Lozano, and S. Sell. 1995. Developmental control of transcription of the CAT reporter gene by a truncated mouse alpha-fetoprotein gene regulatory region in transgenic mice. *Ma. Reprod. Dev.* 42: 1-6. 20
46. Spear, B.T., and S.M. Tilghman. 1990. Role of alpha-fetoprotein regulatory elements in transcriptional activation in transient heterokaryons. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5047-5054.
47. Feuerman, M.H., R. Godbout, R.S. Ingram, and S.M. Tilgman. 1989. Tissue-specific transcription of the mouse alpha-fetoprotein gene promoter is dependent on HNF-1. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4204-4212. 30
48. Vogt, T.F., R.S. Compton, R.W. Scott, and S. Tilghman. 1988. Differential requirements for cellular enhancers in stem and differentiated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 487-500.
49. Mittereder, N., K. L. March, and B.C. Trapnell. 1996. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* 70: 7498-7509.
50. Kotin, K., R. Linden, and K. Berns. 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* 11: 5071-5078. 40

51. Bi, L., A. Lawler, S. Antonarakis, K. High, J. Gearhart, and H. Kazazian. 1995. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of Hemophilia A. *Nature Genetics* 10: 119-121.
52. Mizushima and Nagata. 1990. *pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector*. *Nuc. Acids Res.* 18:5322.
53. Fay, P.J. 1993. *FVIII structure and function*. *Thromb. Haemostas.* 70: 63-67.
54. McGrory, et al. 1988. *A simple technique for rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5*. *Virology*, 163: 614-617. 10
55. "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases" (Editors: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, 7th edition, 1996)..
56. Balague, C., Kalla, M. and Zhang, W-W. (1997) *Adeno-associated Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome*. *J. Virol.* 71: 3299-3306.
57. Gendron-Maguire, M. and T. Gridley. 1993. Identification of transgenic mice. *Methods in Enzymology* 225: 794-799. 20
58. Mann, J.R. 1993. Surgical techniques in production of transgenic mice. *Methods in Enzymology* 225: 782-793.
59. Gordon, J.W. 1993. Production of transgenic mice. *Methods in Enzymology* 225: 747-771.
60. Mann, J.R. and A.P. McMahon. 1993. Factors influencing frequency production of transgenic mice. 30
61. Bradley, A. 1987. Production and analysis of chimaeric mice. In *Teratocarcinomas and embryonic stem cells - a practical approach*. Pp. 113-151. Robertson, E.J., Ed. IRL Press, Washington, D.C.
62. Koeberl, et al. 1995. Sequences within the coding regions of clotting factor VIII and CFTR block transcriptional elongation. *Human Gene Ther.* 6: 469-479.
63. Hoeben, et al. 1995. Expression of the blood-clotting factor FVIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. *Blood* 85:2447-2454. 40
64. Miller, A.D. and G.J. Rosman. 1989. Improved retroviral vectors for gene therapy and expression. *Biotechniques* 7: 980-990.

65. Mulligan, R.C. 1993. The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-932.
66. Parks, et al. 1996. A helper-dependent adenovirus helper system: removal of helper virus by cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13565-13570.
67. Hitt, et al. In *Methods in Molecular Genetics*, K.W. Adolph, ed. (Academic Press, San Diego, CA) Vol. 7, pp. 13-30.
68. Broach, et al. 1982. Recombination within the yeast plasmid 2 μ circle is site-specific. *Cell* 29: 227-234. 10
69. Gorman, et al. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2: 1044-1051.
70. Calos, M.P. 1996. The potential of extrachromosomal replicating vectors for gene therapy. *TIG* 12: 463-466.
71. Krysan, et al. 1993. Autonomous replication in human cells of multimers of specific human and bacterial DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2688-2696. 20
72. Haase, S.B. and M.P. Calos. 1991. Replication control of autonomously replicating human sequences. *Nucleic Acids Res.* 19: 5053-5058.
73. Kay, et al. 1993. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* 262: 117-119.
74. Chuah, et al. 1995. Development and analysis of retroviral vectors expressing human factor VIII as a potential gene therapy for hemophilia A. *Human Gene Ther.* 6: 1363-1377. 30
75. Hammarskjold, M.-L. and G. Winberg. 1980. Encapsidation of adenovirus 16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome. *Cell* 20: 787-795.
76. Yang, Y., et al. 1994. Cellular immunity to viral antigen limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 4407-4411.
77. Dwarki, V.J., et al. 1995. *Gene therapy for hemophilia A: Production of therapeutic levels of human factor VIII in vivo in mice.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1023-1027. 40
78. Dai, et al. 1992. Gene therapy via primary myoblasts: *Long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10892-10895.

79. Cotton, M., et al. 1992. *High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase) gene constructs using the endosome disruption activity of defective or chemically-inactivated adenovirus particles.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6094-6098.
80. Frank, et al. 1994. *High-level expression of various apolipoprotein(a) isoforms by "transferinfection": the role of kringle IV sequences in the extracellular association with low-density lipoprotein.* Biochemistry 3: 12329-12339. 10
81. Chen, C. and H. Okayama. 1987. *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA.* Mol. Cell. Biol. 7: 2745-2752.
82. Marchioro, T.L., et al. 1969. Science 163:188.
83. Webster, et al. 1971. Am. J. Physiology 220:1147.
84. Graham, F.L., and L. Prevec. 1991. Manipulation of adenovirus vectors. In: Methods in Molecular Biology (Vol. 7), Gene Transfer and Expression Protocols, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, NJ. 20
85. Engelhardt, J.F., X. Ye, B. Doranz, and J.M. Wilson. 1994. Ablation of *E2A* in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 6196-6200.
86. Krouglik, V., and F.L. Graham. 1995. Development of cell lines capable of complementing E1, E4, and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. Human Gene Ther. 6: 1575-1586.
87. Mitani, K., F.L. Graham, C.T. Caskey, and S. Kochanek. 1995. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3854-3858. 30
88. Lieber, et al. 1996. Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo. J. Virology 70:894-8960.
89. Stow, N.D. 1981. Cloning of a DNA fragment from the left-hand terminus of the adenovirus type 2 genome and its use in site-directed mutagenesis *J. Virol.* 37, 171-180. 40
90. Grable, M., and P. Hearing. 1992. *cis* and *trans* requirements for the selective packaging of adenovirus type 5 DNA. J. Virol. 66: 723-731.

91. Graham, F.L., and L. Prevec. 1991. Manipulation of adenovirus vectors. In: *Methods in Molecular Biology* (Vol. 7), Gene Transfer and Expression Protocols, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, NJ.
92. Graham, F.L. 1984. Covalently closed circles of human adenovirus DNA. *EMBO J.* 3: 2917-2922.
93. Ruben, M., S. Bacchetti, and F.L. Graham 1983. *Nature* 301: 172-174. 10
94. McGrory, W.J., D.S. Bautista, and F.L. Graham 1988A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 163: 614-617.
95. Robinson, A.J., H.B. Younghusband, and A.J.D. Bellett. 1973. A circular DNA-protein complex from adenovirus. *Virology* 56: 54
96. Bett, A.J., W. Haddara, L. Prevec, and F.L. Graham 1994. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8802-8806. 20
97. Grable, M., and P. Hearing. 1990. Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant. *J. Virol.* 64: 2047-2056.
98. Webster, N., J.R. Jin, S. Green, M. Hollis, and P. Chambon 1988. The yeast UAS_G is a transcriptional enhancer in human Hela cells in the presence of the Gal4 *trans*-activator. *Cell* 52: 169-178,
99. Gatz, C. and P.H. Ouau 1988. *Tn10*-encodes *tet* repressor can regulate an operator-containing plant promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1394-1397. 30
100. Gossen, M. and H. Bujard 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551.
101. Nevins, J.R.. 1993. Transcriptional activation by the adenovirus E1A proteins. *Semin. Virol.* 4: 25-31.
102. Graham, F.L., P.J. Abrahams, C. Mulder, H.I. Heijneker, S.O. Warnaar, F.A.J. de Vries, W. Fiers, and A.J. van der Eb 1974. Studies on *In Vitro* Transformation by DNA and DNA Fragments of Human Adenoviruses and Simian Virus 40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39: 637-650. 40

103. Mckinnon, R.D., S. Bacchetti, and F.L. Graham 1982. Tn5 Mutagenesis of the Transforming Genes of Human Adenovirus Type 5. *Gene* 19: 33-42.
104. van der Eb, A.J., C. Mulder, F.L. Graham, and A. Houweling 1977. Transformation With Specific Fragments of Adenovirus DNAs. I. Isolation of Specific Fragments With Transforming Activity of Adenovirus 2 and 5 DNA. *Gene* 2: 115-132.
105. Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-72. 10
106. Aiello, L., R. Guilfoyle, K. Huebner, and R. Weinmann 1979. Adenovirus 5 DNA Sequences Present and RNA Sequences Transcribed in Transformed Human Embryo Kidney Cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology* 94: 460-469.
107. Lochmuller, H., A. Jani, J. Huard, S. Prescott, M. Simoneau, B. Massie, G. Karpati, and G. Ascadi, G. 1994. Emergence of Early Region 1-Containing, Replication-Competent Adenovirus in Stocks of Replication Defective Adenovirus Recombinants (E1 + E3 Deletions) During Multiple Passages in 293 Cells. *Human Gene Ther.* 5: 1485-1491. 20
108. Fallaux, F.J., O. Kranenburg, S.J. Cramer, A. Houweling, H. van Ormondt, R.C. Hoeben, and A.J. van der Eb 1996. Characterization of 911: A new Helper Cell Line for the Titration and Propagation of Early Region 1 - Deleted Adenoviral Vectors. *Human Gene Ther.* 7: 215-222.
109. Imler, J-L., C. Chartier, D. Dreyer, A. Dieterle, M. Sainte-Marie, T. Faure, A. Pavirani, and M. Mehtali 1996. Novel Complementation Cell Lines Derived From Human Lung Carcinoma A549 Cells Support the Growth of E1-Deleted Adenovirus Vectors. *Gene Ther.* 3: 75-84. 30
110. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res.* 16: 1215.
111. Kilby, N.J., M.R. Snaith, and J.A.H. Murray. 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9: 413-421. 40
112. Austin, S., M. Ziese, and N. Sternberg. 1981. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729-36.

113. Broach J.R., V.R. Guarascio, and M. Jayaram. 1982. Recombination within the yeast plasmid 2 μ circle is site-specific. *Cell* 29: 227-34.
114. Wobbe C.R., F. Dean, L. Weissbach, and J. Hurwitz. 1985. In vitro replication of duplex circular DNA containing the simian virus 40 DNA origin site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5710-4.
115. Yates J.L., N. Warren, and B. Sugden. 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313: 812-5. 10
116. Yates, J.L., and N. Guan. 1991. Epstein-Barr Virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J. Virol.* 65: 483-488.
117. Miller, A.R., W.H. McBride, K. Hunt, and J.S. Economou. 1994. Cytokine-mediated gene therapy for cancer. *Ann. of Surg. Onc.* 1:436-450.
118. Rosenberg, S.A., M.T. Lotze, J.C. Tang, P.M. Aebersold, W.M. Linehan, C.A. Deipp, and D.E. White. 1989. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann. Surg.* 210:474-484. 20
119. Dranoff, G. and R.C. Mulligan. 1995. Gene transfer as cancer therapy. *Adv. in Immunol.*, 58:417-454.
120. Isaka, Y., D.K. Brees, K. Ikegaya, T. Kaneda, E. Imai, N.A. Noble, And W.A. Border. 1996. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat. Med.* 1996, 2:418-423.
121. Fakhrai, H., O. Dorigo, D.L. Shawler, H. Lin, D. Mercola, K.L. Black, I. Royston, and R.E. Sobol. 1996 Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor b antisense gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:2909-2914. 30
122. Leach, D.R., M.F. Krummel and J.P. Allison. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734-1736.
123. Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346:425-434. 40
124. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 233-58.

125. Zhang, W.-W. 1995. Adenovirus as a system for delivering and expressing tumor suppressor genes in tumor cells. *Method: A Companion to Methods in Enzymology* 8: 198-214.
126. Harris, H. 1993. How tumor suppressor genes were discovered. *FASEB J.* 7: 978-979.
127. Kamb, A., N.A. Gruis, J. Weaver-Feldhaus, Q. Liu, K. Harshman, S.V. Tavtigian, E. Stockert, R.S. Day III, B.E. Johnson, and M.H. Skolnick. 1994. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440. 10
128. Nobori, T., K. Miura, D.J. Wu, A. Lois, K. Takabayashi, and D.A. Carson. 1994. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-756.
129. Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P.A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L.M. Bennett, W. Ding, R. Bell, J. Rosenthal, C. Hussey, T. Tran, M. McClure, C. Frye, T. Hattier, R. Phelps, A. Haugen-Strano, H. Katcher, K. Yakumo, Z. Gholami, D. Shaffer, S. Stone, S. Bayer, C. Wray, R. Bogden, P. Dayananth, J. Ward, P. Tonin, S. Narod, P.K. Bristow, F.H. Norris, L. Helvering, P. Morrison, P. Rosteck, M. Lai, J.C. Barrett, C. Lewis, S. Neuhausen, L. Cannon-Albright, D. Goldgar, R. Wiseman, A. Kamb, and M.H. Skolnick. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 266: 66-71. 20
130. Hannon G., and D. Beach. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257-261. 30
131. Zhang, W.-W., and X. Fang. 1995. Gene therapy strategies for cancer. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 4: 487-514.
132. International Patent Application number PCT/US96/05310, published October 24, 1996 as WO 96/33280.
133. International Patent Application number PCT/US96/14312, published March 13, 1997 as WO 97/09442. 40
134. International Patent Application number PCT/GB96/02061, published March 6, 1997 as WO 97/08330.

【0016】

本発明の目的は、1) 導入遺伝子の発現を制御し、標的細胞ゲノムDNAへの外来性DNAの組み込みを助成し、及び/又はベクターを標的細胞内においてエピソーム形態で維持するための要素を含んでいてもよい約36kbの異種DNAを挿入するための収容力を有する大容量アデノウイルス(Ad)ベクター(“ミニAd”ベクター); 2) このミニAdベクターの増殖を支持するように設計され、且つ宿主産生細胞内でこのミニAdベクターがより大きなベクターにパッケージ化されるように操作されたパッケージ化シグナルを有する同族ヘルパーAdベクター; 及び3) ミニAdベクター及びヘルパーAdベクターの両者の増殖を支持するように設計されたヘルパー細胞系であって、ウイルスの増殖の間の導入遺伝子の発現を調節し、且つヘルパーAdゲノムのパッケージ化を選択的に弱力

10

【0017】

当業者が遭遇する問題は、従来のベクターに挿入することができる外来性DNAの量が現在の最大で約8kbに制限されることである。本発明の目的は、約37kbまでのインサート収容力を提供することが可能なミニAdベクターを提供することにあり、この収容力は大きなコーディング領域を有するタンパク質をコードする核酸の送達に十分なものである。

【0018】

態様の1つにおいて、本発明はミニAdベクターを単離DNA分子として提供し、この単離DNA分子は複製、パッケージ化及び持続性の遺伝子発現に必要な要素、例えば、逆末端反復(ITR)、パッケージ化シグナル、転写調節領域、エフェクター又はレポーター遺伝子、及びゲノム組み込み配列又はエピソーム維持配列のいずれかを有し、これらの全ては感染性複製不全組換えアデノウイルスベクターを産生するために作動の上で協働し、前記DNA分子の残りの部分はアデノウイルスのタンパク質をコードしない。このようなベクターの例の1つにおいては、ヒトFVIIをコードするミニAdベクターが提供される。

20

【0019】

当業者が遭遇する別の問題は、標的細胞に導入した後の遺伝子発現の持続期間が制限されることである。本発明のさらに別の目的は、標的細胞に導入した後の導入遺伝子の発現の持続時間を延長させるのに必要な要素を有するベクターを提供することである。したがって、本発明は、標的細胞における導入遺伝子発現の安定化をエピソームとして、又は導入された遺伝子のその細胞のゲノムへの組み込みを容易にすることにより、助成し得る要素を有するベクターを提供する。態様の1つにおいて、本発明は、ミニAdベクター内にゲノム組み込み要素又はエピソーム維持要素のいずれかを提供する。このような系の一例では、AAVの組み込み要素を含むミニAdベクターが提供される。このような系の別の例では、ミニAdベクター内に相同組換えアームが提供される。

30

【0020】

本発明のさらに別の目的は、パッケージ化が弱力化された複製不全ヘルパーAdをE1補完性Adヘルパー細胞系と組み合わせて用いて、ミニAdベクターを生成するための試薬及び方法論を提供することにある。態様の1つにおいて、E1欠失ヘルパーAdゲノムが野生型ヘルパーAdゲノムよりも低い頻度でパッケージ化されるように変更されたパッケージ化シグナルを有するE1欠失ヘルパーAdゲノムが提供される。別の態様においては、Ad E1遺伝子配列が安定に形質移入された細胞としてヘルパー又は産生細胞が提供され、このAd E1遺伝子欠失配列にはE1欠失ヘルパーAdゲノムのゲノムと重複する配列がない。加えて、さらに別の態様においては、ヘルパー又は産生細胞にミニAdベクター及びAdヘルパーゲノムを同時形質移入し、及び/又はこの細胞にAdヘルパーウイルスを感染させ、且つ該産生細胞の細胞非含有溶解物を調製することにより、組換えアデノウイルスベクターを生成する方法が提供される。このようにして調製される細胞非含有溶解物はこの感染性複製障害組換えアデノウイルスベクター粒子を含み、その大部分

40

50

はミニ A d ベクター D N A を含む。

【 0 0 2 1 】

動物モデル系においてイン・ピボで、形質導入効率を分析し、且つ A A V の標的をその組み込み部位 A A V S 1 に設定することが困難であることも当業者にとっては立証されている。本発明のさらに別の目的は、本発明のミニ A d ベクターに組み込まれた A A V 組み込み機構によって指向される標的組み込みを評価するための動物モデル系を提供することにある。一例として、本発明は、それらのゲノム内にヒト A A V S 1 組み込み配列を有するトランスジェニックマウスを生成するための方法論を提供する。このような動物にミニ A d ベクターを注射した後、A A V S 1 部位への導入遺伝子の標的組み込みを評価することができる。

10

【 0 0 2 2 】

また、当業者は、ヒト F V I I I の外来タンパク質としての免疫学的認識のため、ヒト F V I I I ベクターの毒性及び長期間の効力の決定において困難に直面している。本発明の目的は、ヒト F V I I I の発現を評価するためのヒト第 V I I I 因子寛容動物を提供する。本発明は、成熟動物ではなく発生中のマウスにおいてヒト F V I I I が発現するように、発生的に調節されたプロモーター（すなわち、胎児タンパク質プロモーター）に作動可能に連結されたヒト F V I I I 遺伝子を有するトランスジェニックマウスを開発するための方法論を提供する。この一時的な発現の結果、その動物はヒト F V I I I タンパク質に対して寛容となり、それによりヒト F V I I I を“自己”タンパク質として認識する。この場合、そのような動物においてはヒト F V I I I に対する免疫応答は生じない。本発明は、さらに、ヒト F V I I I 寛容友血病マウス種に加えて、そのゲノムにヒト A A V S 1 予備組み込み部位が組み込まれているヒト F V I I I 寛容友血病マウスを提供する。

20

【 0 0 2 3 】

したがって、本発明は、当業者が遭遇している、遺伝子治療ベクターに関連する多くの困難を克服するのに必要とされる試薬及び方法論を提供する。本発明の上述の目的はもちろん、他の目的も、以下に記載される発明の詳細な説明に鑑みて理解される。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 4 】

本発明の目的は、1) 導入遺伝子の発現を制御し、標的細胞ゲノム D N A への外来性 D N A の組み込みを助成し、及び/又はベクターを標的細胞内においてエピソーム形態で維持するための要素を含んでもよい約 3 7 k b までの異種 D N A を挿入するための収容力を有する大容量アデノウイルス (A d) ベクター (“ ミニ A d ” ベクター) ; 2) このミニ A d ベクターの増殖を支持するように設計され、且つ宿主産生細胞内でこのミニ A d ベクターがヘルパー A d ベクターよりも高い頻度でパッケージ化されるように操作されたパッケージ化シグナルを有する同族ヘルパー A d ベクター ; 及び 3) ミニ A d ベクター及びヘルパー A d ベクターの両者の増殖を支持するように設計されたヘルパー細胞系であって、ウイルスの増殖の間の導入遺伝子の発現を制御し、且つヘルパー A d ゲノムのパッケージ化を選択的に弱力化するのにも役立ち得るヘルパー細胞系を提供するために、改変されたアデノウイルスベクターを提供することである。

30

40

【 0 0 2 5 】

本発明は、F V I I I c D N A のような治療用遺伝子をイン・ピボで標的組織に送達することが可能なウイルスベクターの生成に有用な 3 つの成分を包含する。これらの成分はヘルパーウイルス、ミニウイルスゲノム、及びヘルパー細胞系からなる。ヘルパーウイルス及びヘルパー細胞系はミニウイルスゲノムを遺伝子送達用のウイルス粒子内にパッケージ化するのに用いられる。この系を用いて生成されるミニウイルスは、ヘルパーウイルスが誘導されたアデノウイルス株と等しい向性及び宿主範囲を有する。

【 0 0 2 6 】

本発明は、さらに、アデノ関連ウイルス (A A V) から誘導される要素を含めるためのミニ A d ベクターの改変を提供する。これらの要素は、宿主細胞ゲノムへの遺伝物質の組

50

み込みを促進する能力を有するものである。本発明においては、宿主細胞ゲノムへのミニ A d ベクターのレポーター又はエフェクター遺伝子の組み込みを促進するのにこれらの要素が用いられる。このようにして、遺伝子の発現が従来のアデノウイルスベクターよりも長い期間宿主細胞において観察される。

【 0 0 2 7 】

本発明は、さらに、ミニ A d ベクターであって、このベクターを宿主細胞内でエピソームとして維持して送達される遺伝子（1つ又は複数）の発現を長期化させるための要素を含むミニ A d ベクターを提供する。宿主細胞における E 1 欠失ウイルスのウイルスゲノムの制限された複製には、複製が不可能であるゲノムと比較して関心のある遺伝子がより長期間発現する余地があることが測定されている（88）。アデノウイルスゲノムの E 2 領域を欠失させると、その E 2 欠失アデノウイルスベクターからの遺伝子の発現の複製及び持続が減少する。したがって、本発明の目的は、標的細胞におけるミニ A d ゲノムの DNA 複製を容易にする、正常な細胞ゲノムから誘導される DNA 配列又はそれと等価の配列を本発明のミニ A d ベクターに組み込むことである。DNA の複製を容易にするような配列の1つはアルフォイド（alphoid）DNA である。アルフォイド DNA 反復の 16.2 kb 配列は DNA 複製は可能にするが、その DNA の人工染色体としての分離は許容しない。本発明には、この 16.2 kb 配列（70 - 72）のミニ A d ベクターへの組み込みの備えがある。したがって、これらの配列を含むミニ A d ベクターの複製は、標的細胞内でのミニ A d ベクター DNA の持続及び関心のある遺伝子の発現を長期化させる。

【 0 0 2 8 】

本発明の改変ベクターを評価するための動物モデル試験系も提供される。本発明によって提供される動物モデルには：1) AAV ベースの組み込み機構を評価するためにそのゲノムに AAVS1 配列が組み込まれているトランスジェニックマウス；及び2) そのゲノムに挿入されている発生的に調節されるプロモーターに作動可能に連結するヒト F V I I I 遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック動物が含まれる。この第2のモデルにおいては、発生の過程でのそのトランスジェニック非ヒト動物におけるヒト F V I I I の一時的な発現の結果、その動物のヒト F V I I I に対する寛容化が生じる。この動物のヒト F V I I I 遺伝子はひとたびその動物が成熟すると発現せず、したがって、これらの動物へのヒト F V I I I 遺伝子の送達の評価が導入遺伝子からの h F V I I I の発現により、又は h F V I I I に対する免疫応答により複雑になることがない。したがって、このようにして、その動物による抗 - h F V I I I 免疫応答によってもたらされる潜在的な複雑性が加わることなく、ベクターによる遺伝子送達の効率を評価することができる。

【 0 0 2 9 】

本願においては、他に述べられない限り、用いられる技術は幾つかの公知の参考文献のいずれかに見出すことができ、これらには：分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）（Sambrookら、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press）、遺伝子発現技術（Gene Expression Technology）（酵素学における方法（Methods in Enzymology）、第185巻、D. Goeddel編、1991、Academic Press, San Diego, CA）、PCR プロトコル：方法及び適用の手引（PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications）（Innisら、1990、Academic Press, San Diego, CA）、動物細胞の培養：基礎技術マニュアル（Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique）第2版（R.I. Freshney、1987、Liss, Inc. New York, NY）、抗体：実験マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual）（Harlow及びLane、1988、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY）、タンパク質生成の手引：酵素学における方法（Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology）第182巻（M.P. Deutscher編、Academic Press, San Diego, CA）、酵素学における方法（Methods in Enzymology）第225巻（参考文献57 - 60を参照）及び奇形癌腫及び胚性幹細胞 - 実用アプローチ（Teratocarcinomas and embryonic stem cells - a practical approach）（Robertson, E.J.編、1987、IRL Press, Washington, D.C.; 参考文献61も参照）。

【 0 0 3 0 】

本願においては、転写調節領域又は転写制御領域は遺伝子の転写の調節に関わるあらゆる核酸要素として定義され、これにはプロモーター、エンハンサー、サイレンサー及びリプレッサーが含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0031】

DNA断片は、あらゆる源から誘導される一本鎖又は二本鎖DNAのセグメントとして定義される。

【0032】

DNA構築体は、あらゆる源から誘導されるプラスミド、ウイルス、自立的に複製する配列、ファージ又は一本鎖もしくは二本鎖DNAもしくはRNAの直鎖セグメントとして定義される。

10

【0033】

レポーター構築体は、検定可能な産生物をコードする遺伝子を含む染色体下の精製DNA分子として定義される。

【0034】

検定可能な産生物は、検定を用いて検出可能である遺伝子によってコードされるあらゆる産生物を含む。さらに、この検定可能な産生物の検出及び定量は、その遺伝子の発現の水準に直接比例するものと予想される。

【0035】

組織特異的な方法で発現する遺伝子は、ある生物において1以上の第2の組織とは対照的に1つの組織においてより多くの量の発現を示すものである。

20

【0036】

エフェクター遺伝子は、その遺伝子によってコードされるポリペプチドの発現により、生物、組織又は細胞に効果を及ぼすあらゆる遺伝子として定義される。

【0037】

異種DNAは、アデノウイルスゲノム以外の源から単離された、アデノウイルス構築体に導入されるDNAとして定義される。

【0038】

導入遺伝子は、生物のゲノムに挿入されている、その生物のゲノムに通常存在するもの以外の遺伝子として定義される。

【0039】

組換えアデノウイルスベクターは、そのゲノムに少なくとも1つの異種DNAのセグメントが含まれているアデノウイルスとして定義される。

30

【0040】

アデノウイルス粒子は、野生型又は組換えの両者を含む感染性アデノウイルスとして定義される。アデノウイルスにはアデノウイルスゲノム内にコードされるタンパク質外被によってキャプシドが形成されているDNA分子が含まれるが、これに限定されるものではない。

【0041】

組換えアデノウイルス粒子は、少なくともそのゲノムの一部に少なくとも1つの他の源から誘導されるものを有し、アデノウイルス遺伝物質はもちろんアデノウイルス遺伝物質以外の遺伝物質をも含む感染性アデノウイルスとして定義される。

40

【0042】

安定な遺伝子の発現は、少なくとも7日を上回る期間宿主において一貫して検出することができる遺伝子の発現として定義される。

【0043】

治療可能な状態は、ある形態の治療の執行により変更することが可能な生物の状態として定義され、この治療には通常医療起源のものであると定義される治療が含まれるがこれに限定されるものではない。

【0044】

抗原は、抗体が結合し、且つ免疫応答の活性化及び阻止もしくは抑制の両者を含めて免

50

疫応答を刺激することが可能なあらゆる分子をさらに含むことができる分子として定義される。

【0045】

腫瘍抑制遺伝子は、そのタンパク産物の発現により、腫瘍の発生を抑制する役目を果たす遺伝子として定義され、この抑制には成長の抑制又は細胞の死の誘発が含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0046】

成長抑制遺伝子は、そのタンパク産物の発現により、細胞の成長を抑制する役目を果たす遺伝子として定義される。

【0047】

癌遺伝子は癌を引き起こす遺伝子として定義される。

【0048】

免疫調節遺伝子は、その核酸もしくはタンパク産物の発現により、免疫反応を変更する役目を果たすあらゆる遺伝子として定義される。

【0049】

リボザイムは、他の核酸分子を分解する能力を有するRNA分子として定義される。

【0050】

遺伝的状態は、本願においては、少なくとも部分的には少なくとも1つの特定の遺伝子の発現の結果である生物の状態として定義され、この特定の遺伝子にはその遺伝子の野生型形態及びその遺伝子のあらゆる突然変異体形態が含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0051】

発現カセットは、コーディング配列を含むDNA断片であって、このコーディング配列がコードされたタンパク質の適切な細胞型における発現に十分な転写調節領域又は転写制御領域に作動可能に連結するレポーター又はエフェクターのものであるDNA断片である。

【0052】

I. ミニAdベクター系の基本概念

1. 系の構成 ミニAdベクター系は3つの主要部分：1) パッケージ化弱力化ヘルパーAd；2) 最少量のウイルスゲノムを有する同族Adベクター；及び3) 293細胞と同様のE1トランス活性化の機能及び/又はヘルパーAdのパッケージ化シグナルの調節をもたらすAdヘルパー細胞系からなる。パッケージ化弱力化ヘルパーAdは、自己複製に必要されるのはもちろんミニAdベクターの複製のトランス補完にも必要とされるウイルス性遺伝物質を含む。ヘルパーAdは、E1の欠失又は置換、及びヘルパーAdのパッケージ化を本発明のミニAdベクターのパッケージ化に有利に制御又は区別するのに有用な操作されたパッケージ化シグナルを除いて、野生型のAd遺伝物質を保持する。このミニAdベクターは、逆末端反復(ITR)のみを含む最小Ad遺伝物質、並びにこのミニAdベクターの複製及びパッケージ化を促進する役割を果たすシス要素としての野生型パッケージ化シグナルを含む。このミニAdベクターの残部は導入遺伝子、すなわち異種DNAを含む。本発明のAdヘルパー細胞系は、Ad E1遺伝子を含み、且つヘルパーAdの複製を支持するAd E1遺伝子産物をもたらすという点で293細胞(ATCC # CRL 1537)に類似する。この細胞系は、さらに、ヘルパーAdのパッケージ化を弱力化するための制御機構を含んでいてもよい(図1)。

【0053】

2. 系の作動機構 Adのパッケージ化タンパク質は感染細胞内に少量存在するトランス作動性因子であり、Adのパッケージ化において速度制限因子としての役割を果たす。本発明のミニAdベクターによって処理された野生型パッケージ化シグナルはヘルパーAdの操作されたパッケージ化シグナルよりも高い親和性でパッケージ化タンパク質によって認識されるため、ヘルパーAd遺伝物質のパッケージ化はこのミニAdベクターの存在

10

20

30

40

50

下において部分的に、もしくは完全に抑制される。その結果、ミニ A d ベクターの優先的なパッケージ化が生じる。ミニ A d ベクターを高力価で複製及びパッケージ化するため、ウイルス DNA の複製のためのタンパク質及びキャプシド組み立てのためのタンパク質が適度の量でもたらされなければならない。これらのタンパク質は幾つかの異なる源からもたらすことができ、これらの源には細胞系又はウイルスが含まれるがそれらに限定されるものではない。本発明の好ましい態様においては、これらのタンパク質はヘルパー A d によってもたらされる。本発明では、多量の A d 構造タンパク質をミニ A d ベクターが利用可能であるように、ヘルパー A d がヘルパー細胞内でそれ自体を複製する点において完全に機能的なままであることが考慮される。ミニ A d ベクターが存在しない状況において、パッケージ化の弱力化の選択圧なしで、徐々に、又は非効率的にはあるが、ヘルパー A d はパッケージ化される。ミニ A d ベクターの複数のコピーを生成するため、ミニ A d ベクター DNA の増幅にウイルス DNA 複製タンパク質も必要である。本発明の好ましい態様においては、これらのタンパク質はヘルパー A d によってもたらされる。野生型パッケージ化シグナルを含むミニ A d ベクターは、感染性複製適格 A d 粒子として A d ビリオンにパッケージ化される。対照的に、ヘルパー A d DNA は操作されたパッケージ化シグナルに対するパッケージ化タンパク質の乏しい認識又は低親和性により競合で排除され、そのためヘルパー細胞内で完全に、又は部分的に遊離したままである。このヘルパー A d のパッケージ化の弱力化及びミニ A d ベクターのパッケージ化の選択により、本発明の系はミニ A d ベクターの優先的な増殖を生じる。この系を用いて生成されたミニ A d ベクターは少量のヘルパー A d で汚染される可能性があり、したがって、このミニ A d 粒子調製品は 100% 純粋ではない可能性がある。必要であれば、汚染されているヘルパー A d を生物学的、生化学的、又は物理的方法を用いて除去することができ、これらの方法には C s C l 勾配を通す超遠心が含まれるがこれに限定されるものではない。

10

20

【0054】

3. 系の収容力 本発明のミニ A d ベクター系の 3 つの主な特徴は、それを独自の、洗練された、現在当業者が利用可能な A d ベクターより大きく進歩したものにする (図 2)。これらの特徴には以下のものが含まれるがこれらに限定されるものではない: 1) このミニ A d ベクターは最小の免疫原性を示す; 2) 粉のミニ A d ベクターは現実には複製適格アデノウイルス (RCA) を生成することができない; 及び 3) このミニ A d ベクターは従来 of A d ベクターよりも非常に大きな異種 DNA セグメントを含むことができる。免疫原性及び RCA 生成の低下 (遺伝子治療の分野における主な安全性上の関心) は、このミニ A d ベクターが最少量のウイルスシス要素 (ITR 及びパッケージ化シグナル) のみを担持し、それだけでは A d タンパク質をコードしないために可能となる。このため、現在利用可能な A d ベクターの免疫原性及び細胞毒性の主な源は大部分が除去されている。したがって、通常宿主細胞内又はその細胞表面上での A d ウイルスタンパク質の発現から生じる細胞毒性、炎症性、及び免疫原性応答が減少する。

30

【0055】

本発明のミニ A d ベクターは、さらに、従来 of A d ベクターよりも異種 DNA の収容力が増大している。野生型 A d は 36 kb の平均ゲノムサイズを有する。A d の最大パッケージ化収容力はそのゲノムの約 105%、すなわち、約 38 kb である。本発明のミニ A d ベクターは 1 kb 未満の A d 遺伝物質を含むことができる; したがって、このミニ A d ベクターの異種 DNA の収容力は 37 kb であり得る。異種 DNA には導入遺伝子発現カセット、調節要素、又はレポーターもしくはエフェクター遺伝子に作動可能に連結する転写制御領域が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。発現カセットには単一又は複数の発現カセットが含まれ得るがこれらに限定されるものではない。調節要素には導入遺伝子の保持、組み込み、転写、及び/又はベクターターゲティングを制御するための DNA 配列が含まれるがこれらに限定されるものではない。

40

【0056】

4. パッケージ化弱力化ヘルパー A d

a. ヘルパーの原型構造 このヘルパー A d ベクターは、操作されたパッケージ化シグ

50

ナル及び変更された E 1 遺伝子を有する野生型 A d ゲノムを含む。安全性の理由から、ヘルパー A d は現在利用可能な E 1 欠失もしくは置換ウイルス構築体のように複製が不完全でなければならない。ミニ A d ベクターの存在下においてパッケージ化を制御するため、このヘルパーはパッケージ化も不完全でなければならない(以下に詳述)。したがって、このヘルパーの一般構造は、E 1 領域及びパッケージ化シグナルが操作されていることを除いて野生型ゲノムを有する A d ベクターとして要約することができる。しかしながら、E 2 及び E 4 のような他の必須調節遺伝子を操作することも可能である。ウイルスゲノムは、ヘルパー A d の複製適格性をさらに無効とするため、又は C s C l 勾配を通す超遠心を含むがこれに限定されるものではない生物学的、生化学的、もしくは物理的方法を用いてミニ A d ベクターから分離するためにヘルパー A d のゲノムサイズを減少させるため、断片に分割することができる。ヘルパー A d の力価が大きな影響を受けない限り、ヘルパー A d のウイルス複製の不全及びパッケージ化の弱力化の両者をヘルパー A d の設計に含めることができる。

10

【0057】

b. ヘルパー A d の一般的な機能 ヘルパー A d の主要機能はミニ A d ベクターのパッケージ化に必要なキャプシドタンパク質を供給することである。このタンパク質を提供するため、ヘルパー A d は、野生型 A d より効率が劣るとしても、宿主細胞内で複製可能でなければならない。好ましくは、ヘルパーのゲノムの複製及び転写は影響を受けない。ヘルパー A d ゲノムの合成が阻害される場合、後期遺伝子産生物(キャプシドタンパク質)の収量に変化し、ミニ A d ベクターの力価に悪影響を及ぼし得る(すなわち、力価が低下する)。特定の用途については、ミニ A d からのヘルパー A d の除去が不必要であることがある。このような状況においては、ヘルパー A d のパッケージ化弱力化の厳密性は大きく低下し得る。

20

【0058】

c. パッケージ化弱力化の設計 ヘルパー A d のパッケージ化を弱力化する目的は、ミニ A d ベクターの調製品におけるヘルパー A d 汚染の可能性を減少させることである。これは、特定の用途に比較的純粋なミニ A d ベクターのバッチが必要とされる場合に特に重要である。ヘルパー A d のパッケージ化機能は、ミニ A d ベクターが存在しない状況においてはヘルパー A d が徐々にではあっても増殖することが可能でなければならぬため、不完全ではあるが完全に無効ではないように設計される。以下の遺伝子操作をパッケージ化弱力化ヘルパー A d の生成に用いることができる。

30

【0059】

1. パッケージ化シグナルの突然変異 A d 5 パッケージ化シグナルは機能的に縮退した反復要素を含んでなる(18)。このパッケージ化シグナル要素を部分的に欠失させることにより、変異体 A d の収量が野生型パッケージ化シグナルを有する A d と比較して数倍から約 100 倍減少することが示されている(18)。したがって、本発明のパッケージ化シグナル突然変異の設計には、野生型 A d パッケージ化シグナルからの共通アデノシン富化モチーフ(例えば、“A 反復”: T A A A T T T G ; 図 3)の部分的欠失を取り込むことができる。

【0060】

2. 合成パッケージ化シグナル A d 5 パッケージ化シグナルが共通 A (アデノシン)富化モチーフ(例えば、A 反復: T A A A T T T G)を有するため、選択された A - 反復又は人工パッケージ化シグナルに対するパッケージ化タンパク質の親和性を変更することが可能なあらゆる合成 D N A モチーフを含むがこれらに限定されるものではない直列反復の組み込み。

40

【0061】

3. パッケージ化シグナルの妨害 A d パッケージ化シグナルは、パッケージ化タンパク質によって認識され、且つそれと結合する特異的 D N A 配列である。このシグナルへのパッケージ化タンパク質の有効な結合を妨害するため、ヘルパー A d パッケージ化シグナルの A 反復列の近位又はその内部に他の D N A 配列を配置することができる。挿入された

50

DNAはそれらの同族DNA結合タンパク質による結合を可能にし、この同族DNA結合タンパク質はAdパッケージ化シグナルへのAdパッケージ化タンパク質の結合を位置的に競合して排除することが可能なものである。

【0062】

4. パッケージ化シグナルの再配置 野生型Adパッケージ化シグナルは野生型Adゲノムの左端に位置する。研究者らはこのパッケージ化シグナルが右端に位置してその機能を保持し得ることを見出しており(75)、これはパッケージ化シグナルを再配置することができることを示す。操作されたパッケージ化シグナルを野生型以外の位置に配置することは、ヘルパーAdのパッケージ化効率をさらに弱力化するのに有用である可能性がある。加えて、Adゲノムの別の領域へのパッケージ化シグナルの再配置は、ヘルパーAdの加工されたパッケージ化シグナルとミニAdベクターの野生型パッケージ化シグナルとの間の相同組換えによるヘルパーAdの野生型Adの回帰(すなわち、RCAの生成)の可能性を最小にする助けとなり得る。

10

【0063】

5. さらなる可能性 ヘルパーAdのパッケージ化を弱力化してミニAdベクターの調製に対するヘルパーの汚染を最小にするため、2つの因子を考慮することができる: シス要素及びトランス作動性因子。したがって、他の可能性のある設計はこれらの2つの因子のいずれか、もしくは両者の操作を指向する。操作することができるシス要素の例はA反復モチーフである。操作することができるトランス作動性因子の例はパッケージ化タンパク質である。その系によるミニAdベクターの高力価産生量を犠牲にすることなくパッケージ化を制御することができる機構をさらに考慮すべきである。

20

【0064】

II. ミニAdベクター

A. ミニAdベクターの基本構造 AdベクターはAd ITRの融合による環化プラスミドとして用いることができる(54)。本発明のミニAdベクターの最も単純なプラスミド形態は、(野生型パッケージ化シグナルを有するAd ITRを含む) ITR融合配列、プラスミドDNA複製起点、及び1つもしくは複数の制限酵素部位からなるポリクローン化部位を含む環状DNA分子である。ITR融合配列は、野生型Adの左端、好ましくはマップ単位0乃至1、及び右端、好ましくはマップ単位99乃至100を含む。Ad DNA複製基点は各々のITR内に位置し、野生型パッケージ化シグナルは左ITRに隣接して位置する。

30

【0065】

B. ミニAdベクターの構造的及び機能的可能性 以下に記載され、且つ図7Bに示されるものを含むがこれらに限定されるものではない他のDNA配列及び要素をミニAdベクターに含めることができる。

【0066】

1. 導入遺伝子の発現カセット 発現カセットは基本的な転写単位である。所定の遺伝子の単純な発現カセットは、一般に、転写制御領域、関心のある遺伝子(すなわち、異種DNA、インサートDNA)、及びポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む。発現カセット内には、2以上の遺伝子を、これらの遺伝子の間にRNAの転写もしくはスプライシングのためのさらなる要素がもたらされている限り、二もしくは多シストロン単位として含めることができる。一般に、ミニAdベクターは1つもしくは複数の発現カセットを含む。

40

【0067】

2. ベクターDNA保持のための機能的要素 標的細胞ゲノムへの発現カセットの組み込みを助成し得る(すなわち、AAV組み込み要素)又は宿主細胞においてミニAdベクターをエピソーム形態として維持する要素。組み込みを助成することが示されている要素はアデノ関連ウイルス(AAV)の逆末端反復(ITR)及びRep78/68タンパク質である。AAVは、これらの要素を、ヒト染色体19(19q13.3-qter)のAAVS1と命名された部位へのそのゲノムの特異的組み込みを達成するのに用いる。

50

【0068】

AAVは遺伝子治療のための候補ベクターとして考えられているが、幾つかの制限が研究者によって同定されている。AAVは：1) 外来性DNAに対する低収容力(4.3 kb)；2) 大規模調製における高力価の達成の困難性；及び3) 組換えAAVの特異的組換えの喪失により制限される。これらの各々は、当業者にとって困難な挑戦であることが立証されている。本発明は、AAV-ITR配列及びRep78/68発現カセット(Rep発現カセット)をベクターに組み込むことにより、MiniAdベクターの利点をAAVの組み込み収容力と組み合わせる。

【0069】

同様にMiniAdゲノムに含めることができる機構には染色体外複製配列(70)が含まれる。染色体又はウイルス配列のいずれかを含んでなるこのような配列は、ベクターが哺乳動物細胞内で効率的に複製し、且つ保持されることを可能にする役割を果たす。これらの配列は、ヒトゲノムDNAのような複製成分及び/又は保持成分、例えば、ヒトセントロメア配列もしくはoriP族の反復及び/又はEBNA-1のようなエプスタイン・バーウイルス(EBV)から誘導される配列を含むことができる(70)。ヒトゲノムDNAはテロメア及び/又はアルフォイドDNAを含むことができる(70)。このような要素をMiniAdベクターに含めることにより、MiniAdゲノムが宿主細胞においてより高いコピー数に複製し、それによりMiniAdゲノムがヘルパーウイルスより高い効率でパッケージ化される可能性が増加する。加えて、これらの配列は、宿主細胞内でのエフェクター又はレポーター遺伝子の発現の持続を長期化する役割を果たす。このような機能は遺伝子治療へのMiniAdベクターの使用において有用である。

【0070】

3. DNAの転写を制御するための調節要素 エンハンサー、リプレッサー、活性化因子結合部位、イントロン、及び5'もしくは3'非翻訳領域を含むがこれらに限定されるものではない転写調節機能を有する要素。

【0071】

4. ベクター及び導入遺伝子ターゲティングのための要素 ターゲティングは幾つかの方法で達成することができ、この方法にはベクター表面修飾及び組織特異的発現が含まれるがこれらに制限されるものではない。特定の細胞型又は組織における遺伝子の発現を駆動させるのに組織特異的プロモーターを用いることができる。

【0072】

5. さらなる支持要素 これらには原核細胞もしくは真核細胞のDNA複製起点、プラスミドもしくはベクター選択マーカ、及びベクター主鎖が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。

【0073】

C. MiniAdベクターの高力価生成の設計 MiniAdベクターの高力価生成は本発明の別の主要な側面である。他のウイルスベクターを上回るAdベクターの利点の1つは、Ad粒子が高力価調製品保存物の調製に貢献することである(67)。ADの高力価増殖は、主として、感染の間に293細胞のような宿主細胞内に生じる多量のウイルスクャプシドタンパク質及びウイルスゲノムコピーのために可能である。以下に記載されるものは、高力価MiniAdベクターの生成方法の設計において考慮することができる因子の幾つかである。

【0074】

1. 増強されたDNAの複製 AdはDNA複製のためのそれ自体の酵素系を有する。E2領域タンパク質がウイルスDNAの複製を生じる主要トランス作動性要素である。複製起点はウイルスゲノムのいずれかの端部又は両端に位置するシス要素である。MiniAdゲノムの複製を支持するため、十分な量のE2タンパク質がヘルパーウイルスによってもたらされなければならない。ヘルパーウイルスゲノムを適切に設計することにより、(AdのE2領域内でコードされる)E2タンパク質の高水準の発現が保証される。MiniAdゲノムのコピー数を増加させるための他のこのような機構を考慮することもできる。この

ような機構には、ミニA dゲノムにS V 4 0のD N A複製起点(5 4)を挿入し、ヘルパー細胞におけるS V 4 0 T - A g発現と同時にミニA dのコピー数を増加させることが含まれるが、これに限定されるものではない。

【0 0 7 5】

2. 増強されたパッケージ化シグナル より多数の、又はより効率的なパッケージ化配列を、例えば、ミニA dゲノムの一端もしくは両端により多数の直列配列を組み込むことにより、又は野生型パッケージ化シグナルより効率的な様式で機能する1つもしくは複数の合成パッケージ化シグナルを組み込むことにより用いることができる。

【0 0 7 6】

3. 増強されたパッケージ化プロセス A dのパッケージ化プロセス及び機構は当業者によって未だに完全に理解されているわけではない。A dのパッケージ化シグナル以外のD N A結合タンパク質がパッケージ化に対して相乗的な役割を有しているかどうかは明確ではない。“パッケージ化の足場”と呼ばれ、且つA dゲノム内に天然に存在する、D N A結合タンパク質が親和性を示す配列をミニA dベクターに組み込むことができる。

10

【0 0 7 7】

D . A dヘルパー細胞系

1. A dヘルパー細胞の基本要素及び一般的機能 (宿主細胞としての役割を果たす) 本発明の細胞系は、従来用いられる細胞系2 9 3 (A T C C # C R L 1 5 7 3)を改善する幾つかの重要な改変を提供する。好ましい態様において、宿主細胞は、ヘルパーA dゲノムの転写プログラムをトランス活性化するためのA d - E 1断片をコードする核酸配列を含む(図1)。現在当業者に利用可能な2 9 3細胞のE 1断片とは異なって独自に、本発明の細胞系はヘルパーA dゲノムと重複する核酸配列を持たないE 1断片をコードする核酸配列を含むことができる。したがって、本発明は、A dベクターに関連する現在の困難の1つ：相同組換えによる野生型A d、すなわち複製適格A d (R C A)の生成を排除する。他の要素にはミニA dベクターの高コピー数生成の支持、ミニA dベクターのパッケージ化の増強、及び/又はヘルパーA dのパッケージ化の弱力化に關与する遺伝子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0 0 7 8】

2. ヘルパーA dのパッケージ化弱力化のための補助機構 ヘルパーA dのパッケージ化を弱力化する他の方法には、ヘルパーA dゲノム内のパッケージ化タンパク質結合部位の近傍に異なるタンパク質の結合部位を配置することによりパッケージ化タンパク質の結合部位を妨害することが含まれ得る。このような系にはテトラサイクリン - リプレッサー (T e t - R)、リコンビナーゼ、及び/又は変更されたパッケージ化タンパク質の使用が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。好ましい態様においては、この異なるタンパク質は宿主細胞内で発現する。T e t - Rは、T e t - Rの結合部位、t e t - オペロン (T e t - O)を含むヘルパーウイルスの操作されたパッケージ化シグナルに結合し、それにより、パッケージ化タンパク質の結合を阻害することでパッケージ化を抑制することが可能である。T e t - RのT e t - Oへの結合はテトラサイクリンによって制御される。細胞培養培地にテトラサイクリンを添加することによりT e t - Rへのテトラサイクリンの結合が生じ、それがt e t - Oに結合することを妨げる。テトラサイクリンを除去することによりT e t - Rは加工されたパッケージ化シグナルへの結合について自由になり、ヘルパーウイルスのパッケージ化をさらに弱力化する役割を果たす。

30

40

【0 0 7 9】

C r e又はF l pのようなリコンビナーゼの発現も、ヘルパーウイルスのパッケージ化シグナルにそれぞれl o x - p又はF R Pのような組換え部位が隣接するのであれば、パッケージ化を阻害することが可能である(6 6、6 8)。ヘルパーウイルスの複製をさらに弱力化するため、ヘルパーウイルスゲノム内の他の遺伝的改変を上に記載されるものとは別に、又はそれに加えて提供することもできる。

【0 0 8 0】

幾つかの方法のいずれかによりパッケージ化タンパク質を変更することが可能であり、

50

これらの方法には、A dの特定のパッケージ化タンパク質が同定されるという条件の下でミニA dのパッケージ化をヘルパーA dと区別するのにパッケージ化シグナルが異なる特定の血清型又は種を用いることが含まれるがこれに限定されるものではない。加えて、パッケージ化タンパク質は、そのパッケージ化タンパク質をコードする遺伝子を遺伝的に改変することにより変更することができる。この改変は、そのパッケージ化タンパク質を野生型パッケージ化シグナルに対するその結合が増大するように変更するものであってもよい。それにより、その改変されたパッケージ化タンパク質はミニA dゲノムの好ましいパッケージ化をさらに提供し得る。

【0081】

3. ミニA dベクターの高力価生成のための補助機構 宿主細胞内でのミニA Dゲノムのコピー数が増加するように設計されたミニA dベクターの改変は、高力価ミニA dベクターの開発において有用である。宿主細胞によるSV40T-Ag(形質転換活性を持たない変異T-Ag)の発現は、SV40 DNA複製起点がミニA dプラスミドベクターに組み込まれている場合、ミニA dゲノムのコピー数を増加させ得る。

【0082】

IV. 本発明の潜在的な用途

a. 遺伝病の治療のためのイン・ビボでの遺伝子の送達 大きな治療用遺伝子又は複数の遺伝子はもちろん、制御可能な、もしくは組織特異的な発現を決定し、且つより有効な治療上の効果を生じ得る、主要治療用遺伝子に伴う調節要素及び/又は他の関連遺伝子の送達に大きな収容力が必要である。例には、嚢胞性線維症の遺伝子治療の最適化に幾つかの遺伝子の制御可能な発現を必要とする嚢胞性線維症が含まれるが、これに限定されるものではない。デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の遺伝子治療が、その治療に大容量ベクターが必要とされる状態の別の例である。この疾患を治療するには、完全な生理学的効果をもたらして患者の筋肉機能を回復させるため、筋肉及び神経成長因子を含むがこれらに限定されるものではない遺伝子を同時送達することが必要となり得る。

【0083】

b. ベクターの腫瘍内注射による宿主の抗癌性免疫の誘発 A dベクターは、培養腫瘍細胞及びイン・ビボでの異なる型の固形腫瘍モデルにおいて高水準の感染性を示す。A dベクターのこの特徴は癌の治療において用いられている。治療の効率はベクターによって送達される遺伝子に依存する。腫瘍抑制及び免疫調節の機能を併せ持つものを含むがこれに限定されるものではない複数の遺伝子が抗癌効果の最適化に用いられる。このミニA dベクターは複数の遺伝子を送達する能力を有し、腫瘍内注射のための抗癌性A dベクターの構築に有用である。

【0084】

c. 移植細胞又は組織の遺伝的改変による宿主の免疫の調節 移植には宿主の免疫の一時的な、又は恒久的な抑制が必要である。移植細胞又は移植組織を含むがこれらに限定されるものではない細胞又は組織に免疫抑制遺伝子を送達することが、免疫抑制剤の投与に代わるアプローチであり得る。本発明において用いられる免疫抑制タンパク質をコードする遺伝子の例には、本発明のミニA dベクターによって単独で、又は組み合わせて送達することが可能なTGF β 、IL-10、ウイルスタンパク質HSV-ICP47及びCMV-US11、並びに分泌性Fasリガンドタンパク質が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。

【0085】

d. 遺伝的改変によるイン・ビボでの標的細胞機能の改変又は標的細胞の成長の調節 A dベクターは高力価の貯蔵物を生成することが可能であるという点で他のウイルスベクターを上回る別の利点を有しており、これはイン・ビボ遺伝子治療において有用である。ミニA dベクターは最少量のA dゲノムのシス要素のみを含むため、ミニA dの免疫原性は最小化されている。したがって、ミニA dベクターは、遺伝的改変によるイン・ビボでの標的細胞の機能の改変又は標的細胞の成長の調節に有用である。

【0086】

e. ベクターの表面修飾によるイン・ビボでの標的細胞又は組織への導入遺伝子の特異的送達 アデノウイルスのヘキソン及び腺維タンパク質をコードする遺伝子を、標的細胞表面上に存在する特定のエピトープ又はリガンド（例えば、IgGのFc断片に結合するプロテインA）と融合するように加工する。これらの改変遺伝子を、標的細胞表面に対するターゲティング作用因子として作用するリガンドと相互作用する表面部位を有するウイルスを生成するため、組換えウイルスゲノムに組み込む。これにより、生成したウイルス粒子は組織又は細胞認識能を有する。

【0087】

f. 直接イン・ビボアプローチによるAd介在ワクチン接種への使用 ワクチン接種の目的に、E1置換Adベクターの免疫原性は利益をもたらす可能性があり、Adベースの組換えベクターの開発において用いられている。この型の用途において用いられるミニAdベクターは、E1置換Adベクターを含むがこれに限定されるものではないヘルパーウイルスはもちろんのこと、免疫をもたらす抗原及び免疫源をコードする遺伝子の同時送達を用いる。

10

【0088】

g. エキソ・ビボ遺伝子送達への使用 従来のAdベクターの使用に関連する一時的な遺伝子の保持及び発現は、Adがエキソ・ビボ送達プロトコルにおいて広く用いられることを妨げている。DNA保持機構を有するこのミニAdベクターはこの目的に有用である。さらに、培養細胞系におけるAdの高い感染性が、このミニAdベクターを遺伝子治療に対するエキソ・ビボアプローチにとって非常に有効な遺伝子送達系にしている。

20

【0089】

h. アデノウイルス学の基本的な研究及び開発並びに新規ベクターの構築のための手段としての使用 ミニAdベクター系それ自体は基本的なアデノウイルス学の研究にとって高い価値を有する。その構築と実施可能性及び作動の立証は既に当該分野における大きな進歩である。このヘルパーAd及びミニAdは、Ad及びその潜在的な用途を研究するのに好都合の手段を提供する。これはミニAdベクターについて特に言えることである。ミニAdの複製、パッケージ化、及び増殖効率の特徴は、従来入手することができなかった重要な新しい情報を備える場を提供する。

【0090】

i. 遺伝子伝達及び治療の分野における他の方法論と組み合わせての使用 Adベクターはポリリジン、リポソーム、及び他の結合物質と共に遺伝子送達複合体として用いられている。このミニAdベクターも、これらの化合物はもちろんのこと、遺伝子送達複合体としての役目を果たす能力を有する他の化合物と共に用いることができる。

30

【0091】

j. 遺伝子伝達及び治療の分野における他の目的での使用 このミニAdベクター系は、上に論じられているものに加えて、遺伝子伝達及び治療に用いられる大きな潜在性を有している。この可能性は遺伝子伝達及び治療の分野のさらなる開発に沿って理解されるであろう。

【0092】

IV. 肝臓関連疾患の治療のためのミニAdベクター

40

アデノウイルスの静脈内注射の後、90%を上回るウイルス粒子が肝臓に局在する。ウイルス粒子の投与の後にアデノウイルス遺伝子又はアデノウイルスベクターの導入遺伝子の発現が観察されるのは肝臓においてである。本発明は、レポーター又はエフェクター遺伝子の発現を駆動することが可能な転写調節遺伝子、すなわちプロモーターを改変され、且つ大きく改善されたアデノウイルスベクターと組み合わせて用いて、遺伝子の発現を肝臓に向けるための方法論を包含する。当業者は、肝臓における異常な遺伝子又は遺伝子の遺伝子産生物の発現によって引き起こされる多くの疾患を思い描くことができる。異常な遺伝子又は遺伝子産生物の発現は肝臓に通常見出されるものを上回り、又は下回る水準の発現を含むことがあり、それは、遺伝子転写の構造もしくは機能の遺伝子欠失、複製、挿入、もしくは変化、又は遺伝子それ自体もしくはそのタンパク産生物のいずれかの他の変

50

更の結果であり得る。また、異常な遺伝子又は遺伝子産生物の発現は、それぞれ、遺伝子及び遺伝子産生物の転写又は翻訳の上で機構的に調節する発現の変化からも生じ得る。

【 0 0 9 3 】

治療用又はレポーター遺伝子を肝臓に送達するためのベクターは本発明の重要な利点を含んでいる。肝臓における遺伝子又はタンパク質のいずれかの発現の欠陥に基づく多数の疾患の治療に本発明を用いることができることを当業者は理解するであろう。本発明を用いて治療又は利用することができる疾患及び遺伝子の例がそれぞれ表1にまとめられている。加えて、これらの遺伝子全てのプロモーターが、肝臓における遺伝子又は遺伝子産生物の発現を駆動する目的で肝臓における遺伝子の発現の駆動に有用であることが判明する

。

【表 1】

表 1

疾患	頻度	欠陥タンパク質/遺伝子	機能不全の徴候	現在の治療
アポA-I構造的突然変異	1:1,000	アポA-I	2, 3の場合において、冠状動脈硬化性心疾患を伴わずにHDL-C濃度の減少を引き起こす。2つ の突然変異がアミロイド症につながる。	食事療法： HMG-CoAレダクターゼ阻害剤
家族性リガンド欠陥アポB-100	～1:500-1,000 異種接合	アポB-100	全ての有核細胞におけるLDLの受容体依存性飲食作用の障害。血漿中LDL濃度の上昇。	食事療法：HMG-CoAレダクターゼ阻害剤
家族性低βリポタンパク症	～1:3,000 異種接合	アポリポタンパク質 B-100	アテローム硬化性心疾患の危険性の増加 切り詰めがアポB-100の配列の2/3を上回るものを含む場合、VLDL及びカイロミクロンの分泌の不全。重篤性が低い切り詰めは分泌を妨げないが、異常な血漿リポタンパク質を生じる。異種接合体は脂質の異常性を示すが、通常無症候性である。ホモ接合体はホモ接合無βリポタンパク質症に類似する症候群を有することがある。	ホモ接合に対して：食事の脂肪の制限及びビタミンEの補充 ヘテロ接合の対して：中用量（400-800mg/日）のトコフェノール
家族性III型高リポタンパク症 (異常βリポタンパク症)	1: 1,000-5,000	アポリポタンパク質E	血漿中のカイロミクロン及びVLDL残遺物（集合的に、β-VLDL）の蓄積、これは高脂血症及びアテローム硬化症につながる。	食事療法：HMG-CoAレダクターゼ阻害剤；ニコチン酸に イブリック酸 (fibric acid) 誘導体。
家族性高コレステロール血症	ほとんどの集団 において1:500	LDL受容体	LDLの受容体介在飲食作用が存在しないこと又はその欠乏が血漿中にLDLを蓄積させる。高コレステロール血症及びアテローム硬化症が生じる。	食事療法：HMG-CoAレダクターゼ阻害剤；ニコチン酸に加えて胆汁酸結合樹脂。ホモ接合については、プロブコール、門脈大動脈吻合、血漿交換及び肝移植が必要となることがある。

10

20

30

40

50

フォン・ビレブランド (von Willebrand) 病	1 : 8,000	フォン・ビレブランド 因子	異常血小板付着及び穏やかなものから中程度の 第VIII因子濃度の減少が出血を引き起こす	穏やかな不全に対してはパンプ レッシン類似体DDAVP。重症患者 に対しては血漿注入及びrPF治療。
第VII因子不全 (血友病A)	1 : 10,000男性	第VII因子	第VII因子が第X因子活性化のための補因子と して作用することができず、凝固カスケードを 損なう。	予防、血漿注入、及び第VII 因子治療。
第IX因子不全 (血友病B)	1 : 70,000	第IX因子	血液凝固の障害	予防、血漿注入、及び第IX因子 治療
第XI因子不全 (血友病C)	イスラエルのアシュケナ ージ・ジュー (Ashkenazi Jews) において~1 : 1,000	第XI因子	タンパク質の欠乏が接触活性化の障害及び穏やか 出血傾向につながる	予防、血漿注入、及び第XI因子 治療
抗トロンビン不全	~1 : 5,000	抗トロンビン	血漿中の第IIa、第IXa、及び第Xa凝固因子の阻害 の障害が再発性の静脈血栓を引き起こす。	長期抗凝血治療、血漿又は 抗トロンビンの注入
プロテインC不全	1 : 10,000	プロテインC	血液凝固の調節の障害。血栓症の素因。	長期抗凝血治療、血漿又はプ ロテインCの注入。
α1-抗トリプシン不全 (2変異体)	1 : 7,000北欧人; 1 : 3,000スカンジナビア人	α1-抗トリプシン	ポリペプチドの肝貯蔵; 血漿のタンパク質不足が エラスターゼの過剰活性化を可能にする	α1-抗トリプシン置換処置
C2不全	~1 : 10,000	補体成分2	古典的経路の活性化の顕著な低下	置換処置
PAH不全によるフェニル ケトン尿症 (PKU)	~1 : 10,000出生 (かなりの地域的変動)	フェニルアラニン ヒドロキシラーゼ (PAH)	肝酵素の不足が高フェニルアラニン血症を引き 起こす; 認識発現障害を伴って血漿値が持続的に1mM を上回る。女性発端者によって積み上げられた胎児に 対する母性高フェニルアラニン血症効果の危険性。	低フェニルアラニン食事療法 (細菌性フェニルアラニン トランスフェラーゼ不全 及び酵素アンモニアリアーゼ)

		処置	
トランスフェラーゼ 不全ガラクトクトース血症	1: 35, 000-60, 000	ガラクトクトース1- ホスフェートウリ ジルトランス フェラーゼ	ガラクトクトース、ガラクチクトール、ガラクトクトース1- ホスフェート、及びガラクトネートの蓄積が 白内障、精神薄弱、並びに肝臓及び腎臓機能障害 を引き起こす。
遺伝性フラクトース 不寛容	1: 20, 000/ スイス人d	フラクトース1, 6 -ビスホスフェート アルドラーゼB	フラクトースの摂取がフラクトース1-ホスフェー トの蓄積を引き起こし、そのために小腸、肝臓及び 腎臓の機能障害が生じる。
Ia型糖尿病 (フォン・ ギーク (von Gierke) 病)	~1: 100, 000	グルコース6- ホスファターゼ	低血糖症、高脂血症、高尿酸血症、及び高乳酸血症。 肝臓及び腎臓におけるグリコーゲンの蓄積。
III型糖尿病	~1: 125, 000	アミロ-1, 6-グル コシダーゼ (脳分枝酵素)	肝臓及び/又は筋肉中の短鎖鎖 (制限デキストリン) を有するグリコーゲン。中程度の低血糖症及び高脂血 症。筋肉の衰えはほとんど成人において生じる。
メンケス病 (Menkes disease)	1: 250, 000	P型ATP分解酵素 (Cu2+) 輸送	銅の細胞内輸送の欠陥が銅含有酵素の不全につながり、 動脈及び脳の変性を引き起こす
ウィルソン病 (Wilson disease)	1: 50, 000	P型ATP分解酵素 [膜 カチオン (Cu2+) 輸送]	銅の胆汁性排出の欠陥が肝臓 (肝硬変)、角膜 (カイ ザー・フライシャー (Kayser-Fleischer) 環)、及び 基底核 (運動障害) における蓄積につながる。
			疾患を実質的に修正し得る。 ペニシラミン、トリエンテ ン、又は経口投与された亜 鉛塩。不可逆的な肝損傷に は肝移植を適用することが できる。

カルバミルホスフェー	1 : 70, 000	カルバミルホスファ	尿素形成の障害がアンモニア中毒につながる。	食事制限、フェニル酪酸ナ
トシンセターゼ不全	-100, 000	ターゼシンセターゼ		トリウム、及びシトルリン。
オルニチントランス	1 : 70, 000	オルニチントランス	尿素形成の障害がアンモニア中毒につながる。	食事制限、フェニル酪酸ナ
カルバミラーゼ不全	-100, 000	カルバミラーゼ		トリウム、及びアルギニン。
アルギニノコハク酸	1 : 70, 000	アルギニノコハク酸	尿素形成の障害がアンモニア中毒につながる。	食事制限及びアルギニン。
シンセターゼ不全	-100, 000	シンセターゼ		
メチルマロン酸血症	1 : 20, 000	メチルマロンニル-CoA	メチルマロン酸塩の蓄積が代謝性ケトアシドーシス及	食事タンパク質制限及び
(mul+及びmul-と		ムターゼ (MUT)	び遅延の発症につながる。	経口抗生物質処置。
呼ばれる2つの対立		アポ酵素		
遺伝子変種)				
メチルマロン酸血症	1 : 20, 000	cb/A形態：未知；	アデノシルコバラミンシンターゼの障害がメチルマロ	食事タンパク質制限を伴う、
(cb/A及びcb/Bと呼		cb/B形態：	ニル-CoAムターゼ (MUT) の不足につながる；臨床的	シアノコバラミン又はヒド
と呼ばれる非対立遺伝子形態)		ATP：コブ (I) アラ	及び化学的知見はアポタンパク質MUT欠乏症に似ている。	ロキシコバラミン処置。
		アデノシルトランス		
		フェラーゼ		
キサンチン尿症	1 : 45, 000	キサンチンデヒドロ	蓄積した物質 (キサンチン) が腎臓、尿管、又は筋肉	利用可能な特別もしくは有
		ゲナーゼ (キサンチン	内で結晶化し、それが腎不全、腎結石症、又は	な治療法はない。プリンに
		オキシダーゼ)	筋障害、薬物代謝の障害/攪乱を引き起こし得る。	富む食物の回避が助言され
				る。

10

20

30

40

* 表 1 は 参考文 献 5 5 から の デー タ 及 び 情 報 を 吟 ん で なる。

【 0 0 9 4 】

本発明のさらに別の態様は、本発明のミニ A d ベクターを含む医薬組成物を包含する。この医薬組成物は固体形態（顆粒、粉末又は座剤を含む）又は液体形態（例えば、溶液、懸濁液、又はエマルジョン）で製造することができる。経口投与のための固体投与形態にはカプセル、錠剤、ピル、粉末、及び顆粒が含まれ得る。経口投与のための液体投与形態には、当該技術分野において一般に用いられる不活性希釈剤、例えば水を含む、薬学的に許容し得るエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルが含まれ得る。このような組成物は、湿潤剤、甘味料、調味料、香料のような添加剤を含んでいてもよい。本発明の化合物は無機又は有機酸から誘導される塩の形態で用いることができる。

【 0 0 9 5 】

本発明のベクターは単独の活性医薬組成物として投与することができるが、本発明の 1 以上のベクター又は他の薬剤と組み合わせて用いることも可能である。組み合わせとして投与する場合、治療剤は同時に、もしくは異なる時期に投与される別々の組成物として処方することも、単一の組成物として投与することもできる。

【 0 0 9 6 】

I V . F V I I I 活性を置換するためのミニ A d ベクター

F V I I I 遺伝子を含む E 1 置換アデノウイルスベクターが宿主動物における治療水準の F V I I I の発現の達成に用いられている（ 1 3 ）。しかしながら、アデノウイルスベクターを遺伝子治療に用いることを試みている研究者は幾つかの困難に遭遇している。本発明は、以下に説明されるように、これらの問題の多くの解決法を提供する。

【 0 0 9 7 】

A d D N A 複製及びパッケージ化の必須シス作動性要素がウイルスゲノムの端部に位置するため（ I T R に加えてパッケージ化シグナル、 1 k b 未満）、ミニ A d ベクターの主鎖はこの必須シス要素のみを含むように改変されている。ミニ A d ゲノムの残部は、その約 3 8 k b のパッケージ化限界まで、異種 D N A を含むことが可能である。本発明においては、この異種 D N A はヒト F V I I I に類似する活性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含む。 F V I I I は通常肝臓において生成し、発生期ポリペプチドのアミノ末端から誘導される 9 2 k D a 乃至 2 1 0 k D a の見かけの分子量範囲を有する重鎖ポリペプチド及び 8 0 k D a の C 末端軽鎖を含む（ 5 3 ）。その活性化形態は、血液凝固カスケードにおいて活性化第 I X 因子（ F I X a ）、負に荷電したリン脂質及びカルシウムイオンと共に補因子として作用し、第 X 因子をその活性化形態、 X a に変換する。ヒト c D N A は 9 k b の長さであり、幾つかのドメインを A 1、 A 2、 B、 A 3、 C 1 及び C 2 の順で含んでなる 2 3 5 1 アミノ酸のポリペプチドをコードする（ 5 - 7 ）。 A 及び C ドメインは機能的活性に重要であり、これに対して約 9 8 0 アミノ酸からなる B ドメインの大部分は活性には不必要である（ 8 ）。本発明は、 F V I I I 様活性を有するミニ A d ベクターの例として、ヒト F V I I I 遺伝子を含むミニ A d ベクターを提供する。 F V I I I 様活性（すなわち、第 X 因子のその活性化形態 X a への変換において補因子として作用する能力）を有するタンパク質をコードする遺伝物質を含むミニ A d ベクターが本発明に包含されることは当業者によって理解されるはずである。

【 0 0 9 8 】

本発明の F V I I I ミニ A d は、ヒト F V I I I c D N A はもちろんのこと、宿主細胞ゲノムへの遺伝子の組み込み及び宿主細胞内でのヒト F V I I I の発現を支持する D N A 要素（すなわち、異種組換えアーム、 A A V / I T R 配列、及び転写制御領域）をも含む。 D N A の複製及び F V I I I ミニ A d ベクターのキャプシド形成に必要なウイルスタンパク質はヘルパー A d （トランス補完）からトランスでもたらされる。 F V I I I ミニ A d ベクターの比較的純粋な調製品をウイルス粒子として生成するため、そのパッケージ化シグナルの改変によりヘルパー A d ゲノムのパッケージ化が弱毒化されている。これは、ヘルパー細胞系における F V I I I ミニ A d ベクターゲノムの優先的なパッケージ化を斟酌する。

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

50

態様の1つにおいて、このFV I I IミニAdは部位特異的組み込み機構を含む。この機構は、ヒト組み込み配列(AAVS1部位)に標的設定された異種組換え配列又はAAV/I TRを含むことができる。この組み込み機構を試験するためには、AAVS1部位をマウスゲノムに移さなければならない。これを伴う方法の1つは、胚幹細胞形質転換のような遺伝子導入技術を用いることにより、又はAAVS1部位を含む導入遺伝子をマウス単細胞卵子の雄性前核に直接DNAを注射することにより達成することができる(57-60)。このような方法論によって開発されたトランスジェニックマウスをミニAdベクターの組み込み効率及び特異性の試験に用いることができる。

【0100】

本発明のさらなる態様は、宿主動物体内で生じ得る潜在的な抗-ヒトFV I I I免疫応答に取り組む。このような免疫応答は、ミニAdベクターの利用又はこのベクターの効率の分析を妨害する可能性がある。ミニAdベクターが送達され、且つマウス体内でのヒトFV I I Iの発現を駆動するため、処置マウスの免疫応答がFV I I Iの発現の持続及び水準の評価を複雑にする可能性がある。これらの、及び他の理由から、FV I I I不全トランスジェニックマウスモデルが本発明によって提供される。ミニAdベクターのレポーター又はエフェクター遺伝子が移入され、その結果そのレポーター又はエフェクター遺伝子の遺伝子産生物に対して寛容である非ヒトトランスジェニック動物を本発明が包含することは理解されるであろう。

10

【0101】

上述のトランスジェニックマウスの各々の例が本発明によって提供され、これらは遺伝的に改変された胚幹(ES)細胞の微量注入により生成される。本発明の一態様においては、一時的な遺伝子の発現を可能とするために発生的に調節されたシス作動性制御要素に作動可能に連結する二本鎖ヒトFV I I I DNAが組み込まれている非ヒトトランスジェニック動物が提供される。プロモーターは、発生の間の一時的なヒトFV I I I遺伝子の発現をその発現した外来性タンパク質に対する寛容化が生じるように方向付けることが可能な発生的に調節されたあらゆる遺伝子単位から誘導することができる。その動物の寛容化及び成熟の後には、そのFV I I I導入遺伝子はもはや発現しない。本発明においては、胎児タンパク質プロモーターがヒトFV I I I cDNAに作動可能に連結され、そのゲノム内にヒトFV I I I cDNAを有するトランスジェニックマウスの生成に用いられた。このようなマウスは発生的に調節された様式でhFV I I Iを発現し、その

20

30

【0102】

以下の例は本発明の特定の態様を説明するものであり、本明細書及び請求の範囲をいかなる意味においても限定するものではない。

【実施例】

【0103】

40

IV. 実施例

<実施例1> パッケージ化シグナル変異ヘルパーAd、及び緑色蛍光タンパク質(GFP)レポーター遺伝子を担持するミニAdベクターの構築及び特徴付け

1.1 パッケージ化シグナル変異ヘルパーAdの生成

Ad5のパッケージ化シグナル欠失変異体の幾つかが記述されている(90)。変異体d110/28(d1309-194/243:274/358とも記述される)はAd5のnt194乃至243及び274乃至358が欠失している。d110/28ウイルスは、Stowの方法(89)により、Ad5の左端含むプラスミドをこの二重変異体(pE1A-10/28)及びAd5ゲノムの残部とライゲートすることにより生成した(90)。d110/28は単一のウイルス感染におけるウイルスの収量で143倍の低下

50

を示し、野生型ウイルスと同時感染した場合には検出されなかった。我々は、d110 / 28と同じ突然変異を有するヘルパーウイルスに関して、低収量であってもそのウイルスを増幅することが可能であり、且つ野生型パッケージ化シグナルを含むミニウイルスベクターの存在下においてそのヘルパーウイルスは未包被のままではあるはずだと結論付けた。

【0104】

このパッケージ化シグナルをPCRによりpE1A-10/28から下記プライマーを用いて増幅した。

【0105】

R7: 5' - G G A A C A C A T G T A A G C G A C G G

(Ad5のnt137乃至163、AflIII部位には下線が付されている)及び

R8: 5' - C C A T C G A T A A T A A T A A A A C G C C A A C T T T G A C C C G

(nt449乃至421、ClaI部位が結合している)

増幅した133bpの断片をAflIII及びClaIで切断し、シャトルベクターGT4004の対応する配列の置換に用いた(この構築スキームについては図4を参照)。GT4004はAd5の左領域をXhoI部位(nt5792、16mu)からSnaBI部位(nt10307、28mu)まで伸長することによりpXCX2(91)から誘導され、したがって、GT4004はAd5の左端を0.38muのAflIII部位を含めて0muから1.2muまで、E1欠失をこの欠失点内のClaIを含めて1.2muから9.2muまで、及びAd5の左アームの残部を28muまで含む。この伸長された左アームは組換えウイルスの生成に用いられる相同組換えの頻度を高める。野生型パッケージ化シグナルが欠失したもので置換されているGT4004はGT5000と命名された。pTk(クローンテック、Ca)に由来する-gal発現カセットをSalI断片として切断し、クレノウ酵素で平滑末端化して、GT5000の平滑末端化ClaI部位に挿入した。したがって、得られたプラスミドGT5001は二重欠失パッケージ化シグナル及びTkプロモーターによって駆動される-gal遺伝子で置換されたE1領域を含む(図4)。この構築体では、X-gal染色によるヘルパーウイルスの検出が斟酌される。

【0106】

ヘルパーウイルスを生成するのに、Graham及びPrevecによって記述される方法を用いた(91)(図5)。ATCCから入手した293細胞の早期継代をMEM-10%ウマ血清において成長させ、60mmプレートに播種した。30%集密で、CaPO₄により、プレート当たり2mgのGT5001及び4mgのpJM17(91)を用いて細胞に同時形質移入した。同時形質移入の3日後、細胞を0.5%アガロースを含む培地で覆い、その後そのオーバーレイ上の培地を毎日代えた。プラークが視認されるようになったら、X-gal(DMSO中40mg/ml)を100mg/mlまで培地に直接添加し、一晚インキュベートした。所望のヘルパーウイルスを生成するプラークを青色で識別した(図6)。青色プラークを採取し、そのアガロースプラグを1mlMEM-10%FBSに再懸濁した。この培地の370mlをパッケージ化シグナルのPCR増幅のために以下のように処理した: 40mlの10X DNA分解酵素Iバッファ(400mM トリス-HCl pH7.5、60mM Cl₂Mg、20mM Cl₂Ca)(この処理の対照として0.5mgのシャトルベクターを収容する管を用いた)及び1mlのDNA分解酵素I(ベーリンガーM(Boehringer M)、10u/ml)を添加し、37で1時間インキュベートした。DNA分解酵素Iを不活性化し、32ml EDTA(0.25M)、EGTA(0.25M)、10ml SDS(20%)、5ml プロテイナーゼK(16mg/ml)を添加することによりウイルスのキャプシドを開裂させ、56で2時間インキュベートした。フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(1:1:1/24)で1回抽出した後、1mlの酵母tRNA(10mg/ml)を添加してウイルスDNAの調製を助成し、これを微量遠心において12000rpmで遠心することに集めて20mlのH₂Oに再懸濁した。5mlを、プライマーR7及びR

8を用いるPCR反応に用いた。

【0107】

所望の欠失パッケージ化シグナルを含む青色プラークの1つをDMEM-10%FBS中で成長する293細胞においてさらに増幅させた。以下、Adヘルパー-gal又はAdHと命名する(図5を参照)。このウイルスを、感染後48時間で、集めた細胞の800gで5分間の遠心並びに細胞ペレットの3回の急速冷凍及び解凍サイクルにより抽出した。このX細胞からの粗製抽出物を3X細胞の感染に用いた(増幅スケールは、野生型パッケージ化シグナルを有するウイルスの1対20とは対照的に1対3であった)(図6)。継代毎に、上清のPCRによりパッケージ化シグナルの欠失サイズを検証した(図7)。この欠失及び-galの発現は分析した継代の全てにおいて安定であった。継代9で、AdHをCsClにより精製した。精製は、凍結-解凍サイクルを3回行い、その溶解物を0.5ml CsCl 1.5mg/ml + 2.5ml CsCl 1.35mg/ml + 2.5ml CsCl 1.25mg/mlの段階的勾配に積層し、SW41ベックマン(Beckman)ローターにおいて10、35000rpmで1時間遠心することにより行った。集めたウイルスバンドをCsCl 1.35mg/mlと混合し、前と同様に18時間遠心した。このウイルスバンドをPBSに対して2回、PBS-10%グリセロールに対して1回透析し、-80で保存した。第2勾配の後に5つの異なるバンドが見られ、それらの全てを別々に精製した。精製したウイルスから、EDTA/SDS/プロテイナーゼK処理、フェノール/クロロホルム抽出、及びエタノール沈殿(PCRについて上述されるものと同じ条件)によりウイルスDNAを抽出した。臭化エチジウムゲルにおいては上部3つのバンドにはDNAが検出されず、それらは大部分が空のキャプシドであると考えられる。下部の2つのバンドはウイルスDNAを含み、したがって、完全なキャプシドであり、これは制限マップ分析によりAdHと一致することが示された。R7+R8オリゴを用いるPCRにより欠失パッケージ化シグナルが全てのバンドから増幅され、これは、ウイルスが所望の弱力化を備えることを示す。溶液中のウイルスのミリリットル当たりのプラーク形成単位(PFU)の数で表される力価を決定するため、ウイルス含有溶液をD-MEM10%FBSで連続的に希釈し(1:10希釈で10-12まで)、90%集密の293細胞(6ウェルプレート内に0.5ml/ウェル)の感染に用いた。37で1時間感染させた後、ウイルス懸濁液を新鮮な培地で置き換えた。翌日、細胞を0.5%アガロース、0.025%酵母抽出物及び5mM Hepes pH7.4を含む培地で覆った。6乃至10日後、プラークをカウントした。AdHの増幅及び精製の後に得られた力価は約109PFU/ml(ウイルスを150mm²のプレート2枚から精製し、再懸濁して最終容積1mlとした)であった。この力価は、wtパッケージ化シグナルを含む類似のウイルスベクターを用いて得られるものより約100X低い。

10

20

30

【0108】

1.2 ミニウイルスベクター用のプラスミドの構築

直鎖アデノウイルスDNAは、その末端ITRによって頭部と尾部とが共有結合で環化した場合、細菌内でプラスミドとして成長することが可能であるが、許容的ヒト細胞に移入された場合に複製してウイルスを精製することが示されている(92)。機能的接合は、感染細胞から抽出された環状DNAを用いて細菌を形質転換することにより自然に選択されている。接合部には小さな欠失が観察されており、それは、おそらく、アデノウイルスDNAのITRの頭部と尾部との融合の結果生じた完全な回文構造を破壊することによりそのプラスミドに安定性を付与している。したがって、基本的なミニウイルスの構造はAd5の右端(少なくとも103nt-ITRを含む)に融合したAd5の左端(103nt-ITR及びパッケージ化シグナルをnt358まで含む)を含むプラスミドである。ミニウイルスベクター系の試験に用いられた初期のアプローチには、機能的ITR融合を含むプラスミドpJM17において漸進性欠失を生成することが含まれていた。pJM17は、Ad5のゲノム全体をITR配列で環化したDNA分子として、及び(細菌複製起点並びにアンピシリン及びテトラサイクリン耐性遺伝子をもたらず)E1Aに挿入され

40

50

た p B R 3 2 2 誘導体 p B R X を含むプラスミドである (9 3) 。 E 1 A の欠陥を補完する 2 9 3 細胞内に形質移入されると、 p J M 1 7 は複製するが、アデノウイルスキャプシド (最大は 3 8 k b) 内にパッケージ化するには大きすぎる (4 0 . 3 k b) ためパッケージ化はされない。

【 0 1 0 9 】

本発明のものに加えて現在の文献示される様々なミニウイルスベクターの例が図 5 に示されている。 p J M 1 7 を A s c I で切断し、再ライゲートして p B R X - A s c I を得た。これにより A d 5 の m u 4 3 . 5 乃至 7 0 . 2 が除去され、これは E 2 A (D N A 結合タンパク質) 及び L 3 (ヘキソン、ヘキソン関連タンパク質及び 2 3 K プロテアーゼ) を完全に欠失させ、且つ L 2 (ペントン基部及び核タンパク質) 及び L 4 (ヘキソン関連タンパク質、ヘキソン - 三量体足場タンパク質、及び 3 3 K タンパク質) を部分的に欠失させる。この欠失は環状ウイルス D N A から複製及びキャプシド形成を抑止し、それを十分な量の必要とされる複製タンパク質をトランス作動的に提供するヘルパーウイルスに完全に依存性にする。 p B R X - A s c I は 7 5 . 2 m u (L 4) に独自 S p e I 部位を含み、 M 3 2 (3 2 k B のミニウイルス) を得るため、そこに緑色蛍光タンパク質 (G F P) 発現カセットを含む 2 . 7 k b の D N A 断片が挿入された。この G F P カセットは、 C M V エンハンサー / - アクチンプロモーター (C A プロモーター) 、 エクオレア・ピクトリア G F P c D N A 、 及び S V 4 0 ポリ A シグナルを含んでなる。ミニウイルスベクター構築体における G F P の使用は、細胞におけるこのベクターの存在を蛍光顕微鏡法を用いて測定するために用いた。蛍光顕微鏡法は、 G F P を発現する細胞の検出に用いることができるフローサイトメトリーを含むがこれに限定されるものではない幾つかの方法のうちの 1 つを代表する。 A d H の存在は X - g a l 染色の青色によって検出することができる。 M 3 1 を生成するため、 M 3 2 を M l u I で切断して再ライゲートした。これにより 3 1 . 4 乃至 3 4 . 5 m u が除去され、これは L 1 (5 2 K 、 5 5 K 及びペントン関連タンパク質) を部分的に欠失させた。 M 2 8 を生成するため、 M 3 2 を M l u I 及び A s c I で切断して再ライゲートした。これにより 3 1 . 4 乃至 4 3 . 5 m u が除去され、これは M 3 2 に依然として残留していた L 1 及び L 2 タンパク質を完全に欠失させた。 M 2 6 を生成するため、 M 2 8 を R s r I I 及び S p e I で切断して再ライゲートした。これにより 3 0 . 9 乃至 7 5 . 2 m u が除去され、これは L 1 及び L 4 の欠失に及んだ。 M 2 3 を生成するため、 M 3 2 を N s i I で消化して再ライゲートした。 G F P カセットを含む、 3 2 . 2 m u 乃至 C A プロモーターの N s i I 断片 (7 5 . 2 m u での融合の次の N s i I 部位を含む) は再ライゲートされ、その結果、 C A プロモーターの N s i I 部位は 5 . 5 m u にライゲートされ、 3 2 . 2 の N s i I 部位は 7 5 . 3 m u でライゲートされた。これは、 E 2 b (末端タンパク質、 D N A ポリメラーゼ) 及び I V a 2 タンパク質を含む 5 . 5 乃至 7 5 . 3 m u の全てのタンパク質の発現を抑止する。 M 2 0 を生成するため、 M 2 3 を M l u I 及び A s c I で切断し (これは、 M 2 3 の N s i I 断片の 3 4 . 5 乃至 4 3 . 5 m u の領域を除去する) 、再ライゲートした。

【 0 1 1 0 】

p J M 1 7 におけるものような環化完全長ウイルスゲノムの切り落としの代わりに、 I T R 配列及びパッケージ化シグナルを含む、複製及びパッケージ化に必要な最小シス要素を p B l u e s c r i p t (ストラタジーン) のような小プラスミドにサブクローン化し、導入遺伝子カセット及びそのウイルスベクターの治療上の潜在性を改善し得る他の要素、例えば、エピソーム維持もしくは染色体組み込みのための要素を漸進的に加えることにより他のミニウイルスベクターを構築した (図 8 、最下部) 。頭部と尾部とが融合した I T R 及び左 I T R の次のパッケージ化シグナル (I T R / I T R + p a c) を E c o 4 7 I I I (9 8 . 7 m u) 及び P v u I I (1 . 2 6 m u) を用いて p B R X - A s c I から切断し、平滑末端化して、それぞれ p B l u e s c r i p t の S m a I - E c o R V にサブクローン化した。得られたプラスミド p B S / ミニ I T R 、すなわち G T 4 0 0 7 は、発現カセットを含まず、且つ I T R / I T R + p a c に隣接する幾つかの独自制限部位を有する 3 . 8 ミニウイルスプラスミドである。 X h o I 及び K p n I を用いて、上述の

GFP発現カセットをpBS/ミニITRにサブクローン化してM6.5を生成した。次に、内部リボソームエントリ部位(IRES)及びネオマイシン(neo)cDNAをCAプロモーターとGFP遺伝子との間にサブクローン化してM7.0を生成した。2つの別々のカセットにneo及びGFPを含む類似のミニウイルスM8.5を生成した;Tkプロモーター、neo cDNA及びTk pAを含むpREP9(インビトロゲン(Invitrogen))に由来するNrui-BstEII断片を平滑末端化し、M6.5のStuI-EcoRIにサブクローン化した。アデノウイルスゲノムを外来性DNAで完全に置換したミニAdベクターのパッケージ化を試験するため、より大きなミニAdプラスミドの構築にM8.5を用いた。インサートとして、アルブミン遺伝子の3'、半分及び胎児タンパク質遺伝子の5'、半分に相当するゲノム断片を用いた。これらの断片は、潜在的なアームとして、この部位での相同組換えを研究する見込みで選択した。これらの断片は、M8.5の二重GFP/neo発現カセットの上流及び下流に挿入した。したがって、得られた構築体においては、pGnE5E3(23.8Kb)、GFP及びneo導入遺伝子とそのヒトゲノム内に存在する対応10Kbアルブミン-a-胎児タンパク質遺伝子間領域を置換する。図9は上述のプラスミドを用いて得られるミニウイルスの構造を示す。

10

【0111】

1.3 ミニAdGFPベクターの生成及び増幅

様々なミニAdプラスミドの複製及びパッケージ化を支持するのにAdHを用いた。ミニウイルスがパッケージ化可能であったかどうかを決定することが重要であった。また、ミニウイルスのサイズがパッケージ化効率に影響を及ぼすかどうかを決定することも重要であった。

20

【0112】

アデノウイルスにおいては、100%野生型長のDNAが最も効率的にパッケージ化され、ゲノムサイズが最大で105%まで増加し、又は100%未満に減少するに従ってパッケージ化の効率が低下した。野生型アデノウイルスを欠陥ミニウイルスの補完に用いた場合、69%(25kb)というより低い限界が示唆されている(94)が、弱力化ヘルパーウイルスを用いることにより、より短いミニウイルスのパッケージ化が可能であった。

【0113】

本発明のミニウイルスを補完するため、各々同様の効率で作用する2つの方法を用いた(図10)。第1の方法においては、CsCl精製ミニウイルスプラスミドを精製AdHから抽出した直鎖ウイルスDNAと共に同時形質移入した。このウイルスDNAの精製に用いられた方法は、複製の初回刺激の原因である末端タンパク質を破壊するSDS及びプロテイナーゼKに処されることに注意されたい。この方法は、同様に末端タンパク質を欠くミニウイルスプラスミドを上回る複製の利点をヘルパーウイルスに付与することを回避するために用いた。したがって、AdHでの直接感染による補完がミニウイルスを救済することはなかった。同時形質移入は、50%集密の293細胞で、6ウェルプレートのウェル当たりCa₂PO₄及び2mgのミニウイルスプラスミド及び1mgのウイルスDNAを用いて行った。この形質移入混合物中で一晩インキュベートした後、培地を代え、蛍光顕微鏡法を用いて細胞を検査することにより形質移入の効率を評価した。CsCl精製プラスミドで、この効率はプラスミドのサイズに関わりなく100%に達した(図11)。同時形質移入の6日後にCPEが観察され、3回の凍結及び解凍サイクルによりウイルスを細胞から回収した。第2の補完方法においては、ミニウイルスプラスミドをpBHG10、パッケージ化シグナルが完全に欠失しているためにパッケージ化が不可能であるpJM17に類似する環化アデノウイルスプラスミド(95)、と共に同時形質移入した。このプラスミドは、複製に必要な早期タンパク質の全てに加えてキャプシドを形成する後期タンパク質をも生成する。ミニウイルスがpBHG10と同じ細胞内に存在する場合、それもまた複製し、且つ、ミニウイルスが野生型パッケージ化シグナルを含むため、ミニウイルスベクターがキャプシドに包まれる主要核酸である。しかしながら、ミニウイルスが隣接細胞に放出される場合、欠陥を有するために増幅しない。したがって、このミ

30

40

50

ニウイルスを増幅させるため、同時感染の3日後、その細胞単層に10プラーク形成単位 (p f u) / 細胞の感染多重度 (m o i) で A d H を感染させた。同時形質移入の3日後に C P E が観察され、3回の凍結及び解凍サイクルによりウイルスを回収した。

【 0 1 1 4 】

補完の方法に関わりなく、その溶解物 (生成ミニウイルスの継代 0) を用いて 9 0 % 集密 2 9 3 細胞の新鮮な単層に (1 対 3 の増幅スケールを用いて) 感染させた。感染後の当日、ミニウイルスの存在を蛍光により観察し、ヘルパーの存在を X - g a l 染色により確認した。どのようなものであっても溶解物中にヘルパーウイルスが存在した場合には、これらの細胞のさらなるインキュベーションによりミニウイルス + ヘルパー混合物の増幅が C P E の出現を伴って導かれた (この単層の新たな溶解物はミニウイルスの継代 1 と考えられる) 。溶解物中にヘルパーが存在しない場合には、ミニウイルス単独ではパッケージ化せず、新たなヘルパーを添加することによってのみ C P E が出現した。したがって、ヘルパーの存在を X - g a l 染色により、及びより高い感度で C P E の出現により評価した。

10

【 0 1 1 5 】

ミニウイルス構築体 (M 3 2 、 M 3 1 、 M 2 8 、 M 2 6 、 M 2 3 、 及び M 2 0) の各々を用いて別々に形質移入した後、GFPを含むプラークの出現を観察した (図 1 2) 。これにより、試験したプラスミドの各々について補完が可能であったことが示された。新鮮な 2 9 3 細胞単層に各々のウイルスの粗製抽出物を感染させた2日後に C P E が観察され、これはヘルパーウイルスの存在を示した。さらなるミニウイルスの継代の結果は、全ての継代において5倍の増幅が生じ、パッケージ化効率がミニウイルスのサイズに比例することを示した (図 1 3) 。ベクターサイズが 3 k b 減少する毎に効率が2倍低下することが観察された。例えば、M 2 0 のパッケージ化効率は野生型 ((3 6 - x k b) / 3 = n 、効率は 0.5^n である) の 2 . 4 8 % である。しかしながら、M 6 . 5 、 M 7 . 9 及び M 8 . 5 では蛍光プラークは見出されず、これは非常に非能率的なパッケージ化、又はパッケージ化が存在しないことを示した (図 1 3) 。これは、8 . 5 K b 乃至 2 0 K b のどこかに存在するパッケージ化下限を反映している可能性があった。しかしながら、これらの限界の間でもパッケージ化は依然として生じているが、観察された線形の減少によると、1 1 . 5 K b のサイズの差が 7 . 6 倍のパッケージ化効率の低下を生じ、それにより増殖が不可能になり得るといのがより確からしいように思われる。

20

30

【 0 1 1 6 】

外来 DNA によるウイルスゲノムの完全な置換が可能であり、これがパッケージ化効率に影響を及ぼすかどうかを試験した。A d 5 の I T R 及びパッケージ化シグナルのみを含む 2 3 . 8 K b の完全に置換されたミニ A d を構築した。外来性 DNA として、一方が GFP で他方がネオマイシンのものである2つの直列の発現カセットにアルブミン a - 胎児タンパク質ゲノム DNA の2つの長アームを隣接させた (図 9) 。A d H b v DNA で最初に補完した後に得られたウイルスを継代させたときに、GFP - 陽性 2 9 3 細胞の数を増加させることによりパッケージ化が示された。この形質導入単位力価は M 2 3 で得られるものに類似しており (図 1 3) 、これは、A d 5 DNA と比較した場合、外来性 DNA がパッケージ化効率において有害な効果を持たないことを示した。

40

【 0 1 1 7 】

1 . 4 ミニ A d G F P ウイルス (M 3 2) の精製

ミニウイルスの継代に続いて、感染後に全ての細胞が蛍光を発するようになるまで力価を増加させた。これは、例えば、M 3 2 の継代 4 で生じた。M 3 2 を 1 対 3 の増幅スケールで連続的に継代することにより継代 8 に達したとき、 150 mm^2 のプレート 7 5 枚を感染させるのに十分なウイルスが得られた。C P E が出現したら、上述のように3回の凍結 / 解凍サイクルによりウイルスを抽出し、C s C l 勾配により精製した。勾配中には、3つの上部バンドと遠心管の中央部のより濃い1つのバンドとの4つのバンドが観察された (図 1 4 のスキームを参照) 。管の頂部から吸引することによりそれぞれのバンドを別々に集め、透析した。2 9 3 細胞にそれぞれのバンドを感染させて蛍光を観察し、又は X

50

- g a l 染色することにより、ミニウイルス及びヘルパーウイルスが両者とも高密度バンドに存在することが示された(図15)。緑色及び青色細胞の数に基づいて、ミニウイルス及びヘルパーの量が同じ範囲内にあることが決定された。M32(32Kb)及びAdH(37.1Kb)内に存在するウイルスDNAのサイズの相違は、M32をAdHよりも密度が僅かに劣るものとした。ミニAdベクターのヘルパーに対する比を増加させるため、高密度バンドを1.35g/ml連続CsCl勾配中に分離し、その管の底部から画分を集めた。それぞれの画分の0.5mlを亜集密の293細胞の感染に直接使い、24時間後に蛍光性及び青色細胞をチェックした。多量のAdHを含むピーク(図16、画分7乃至16)の後により軽い画分が続き、これはAdHに対して10倍のM32の濃縮を示した(画分17乃至29)。したがって、ミニAd調製品中に存在するヘルパーウイルスの量の低減にCsClによる分画を用いることができる。

【0118】

まとめると、これらの結果は、d118/28から採取されたパッケージ化シグナルにおける部分的な欠失と共に用いられるヘルパーはミニウイルス系における大きな欠失を補完することが可能であるが、ミニウイルスの存在下において依然としてパッケージ化することを示す。このヘルパーは、純粋なミニウイルスの集団が重要ではない場合、例えば、幾つかの治療用遺伝子(例えば、インターロイキン及び腫瘍抑制遺伝子)を含むミニウイルスを他の治療用遺伝子を含むこのヘルパーに結合させることが可能な抗腫瘍ベクター系において用いることができる。ヘルパーに対するより高いミニAdの比が必要である場合には、このヘルパーをそのパッケージ化においてさらに弱力化する必要がある。

【0119】

<実施例2>パッケージ化シグナルが妨害されたヘルパーAdの設計

アデノウイルスのパッケージ化はパッケージ化要素(A反復)に結合するのにパッケージ化タンパク質を必要とする(90、96)ため、本発明ではAd5パッケージ化シグナル(A反復)に隣接する幾つかの特定のDNA結合配列を導入してヘルパーウイルスのパッケージ化機能をさらに物理的に妨害する。2つのDNA結合配列が選択されている:A.GAL4結合配列(97);B.テトラサイクリンオペレーター配列(tetO)(98、99)。GAL4は、酵母サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)における転写を活性化する配列特異的DNA結合タンパク質である。GAL4の最初の147アミノ酸は、ガラクトース中の活性化領域UASG又は自然に生じる部位、“1-量体”5'-CGGAGTACTGTCCCTCCG-3'もしくは5'-CGGAGGACTGTCCCTCCG-3'近似共通の上流の4つの部位に結合する(97)。tetOは大腸菌のTn10特異的テトラサイクリン耐性オペロンに由来するものであり、耐性介在遺伝子の転写はtetOの19-bp逆転反復配列5'-TCCCTATCAGTGATAGAGA-3'の結合するテトラサイクリンリプレッサー(tetR)によって負に調節される(98、99)。

【0120】

パッケージ化シグナル変異構築体GT5000(実施例、第1項)に基づいて、GT5000のXhoI乃至XbaI(nt194、0.5mu乃至nt452、1.25mu)の配列の置換に合成配列が用いられている。4種類の合成配列(図21及び22)が設計されている。4種類の合成配列は全て、Ad5パッケージ化要素(A反復)I、II、VI及びVIIを含む。17量体GAL4結合配列(5'-CGGAGTACTGTCCCTCCG-3'(97)又は19量体tetO配列(5'-TCCCTATCAGTGATAGAGA-3'(100、102)の3つもしくは4つの反復をこれらのA反復の周囲又はそれらの間に導入した(図17及び18)。A反復の間の領域はパッケージ化効率に影響を及ぼす(90、96)ため、各A反復間の距離はそのヘリックスのほぼ完全なターン、すなわち、10、21又は31bpに維持する(図17及び18)。図19及び20は合成オリゴ配列及び位置を示す。

【0121】

<実施例3>Ad-E1ヘルパー細胞系の構築及び特徴付け

10

20

30

40

50

遺伝子治療用途において用いられるアデノウイルスベクターの大部分はアデノウイルス 5 (Ad5) ゲノムの E1 領域に欠失を有するように設計されていた。領域 IX を含まない E1 領域は Ad5 の左端の 9% (1.2 - 9.8 マップ単位) からなり、2つの早期領域タンパク質 E1A 及び E1B をコードする。E1A / E1B の発現には、ウイルスの複製並びに E2 - E4 及び後期タンパク質のような他の Ad5 タンパク質全ての発現が必要とされる (100)。E1 の欠失は、理論上は、全ての Ad5 タンパク質の発現について無活動であり、且つ関心のある導入遺伝子のみを発現する複製不適格ウイルスを創出する。E1A 及び E1B の欠失も、これらの 2種類のタンパク質が組み合わせて哺乳類動物細胞の癌遺伝子性形質転換に関連付けられているため、安全性の理由から関心のあるものである (101 - 103)。ヒトの臨床試験において現在までに用いられている全てのクラ

10

【0122】

E1 不全アデノウイルスは 293 と呼ばれる Ad5 ヘルパー細胞系において増殖する (104)。293 細胞は、Ad5 DNA の共有断片を含むヒト胚性腎臓細胞を形質転換することにより誘導された。ゲノムの分析により、293 細胞は細胞当たり 4 乃至 5 コピーのウイルスゲノムの左側 12% (E1 領域全体を含む) 及び細胞当たり約 1 コピーの右端、E4 領域の 9% を含むことが明らかになった (105)。293 細胞は高力価の E1 不全アデノウイルスを生成する点では非常に効率的ではあるが、(E1 領域以外の) 293 ゲノムに組み込まれている外来性 Ad5 配列の存在のため、E1 欠失アデノウイルスベクター中の配列との組換えが生じ、それが E1 を含む複製適格アデノウイルス (RCA) の生成を引き起こす可能性があるという不利な点を有する。E1 不全アデノウイルスの増幅及び増殖の間にいかに早い継代 (この継代はアデノウイルス貯蔵物の大規模生成に用いられるものである) で異常な組換え現象が生じるのかに依存して、293 細胞における RCA の生成はヒト遺伝子治療試験の安全性に対する深刻な結果を提示し得る (106)。RCA の生成に加えて、293 細胞における組換えは、導入遺伝子の発現に影響を与え、それにより機能的アデノウイルス粒子の力価を低下させる欠失及び再配置をも引き起こし得る。近年、E1 領域を含む決定された Ad5 DNA を用いて細胞系が開発されているが、これらの細胞系は E1 欠失アデノウイルスベクター中の相同配列と重複する重要な配列を保持し、これが望ましくない相同組換え現象及び RCA の生成の可能性の余地を残す (107、108)。

20

30

【0123】

3.1 細胞系生成のためのプラスミドの構築

アデノウイルスベクターとの組換えの可能性を排除するため、補完に必要なとされる E1A / E1B 配列のみを有し、且つ E1 不全アデノウイルス中の領域と重複するいかなる相同配列をも含まない新規 Ad5 ヘルパー細胞系が開発されている。Ad5 E1A 及び E1B をコードする配列を含む、AfI III (462 bp) 部位と AfI I (3537 bp) 部位との間の 3.1 kb DNA 断片を、以下のように、スーパーリンカーベクター pSL301 (インビトロゲン) に 2つの断片として連続的にクローン化した：まず、881 bp の AfI III 乃至 XbaI 断片 (Ad5 bp 462 - 1343) を pBRXad5KpnIC1 (pJM17 のサブクローン) から pSL301 (AfI III / XbaI) にクローン化した。次に、近接する 2194 bp の XbaI 乃至 AfI I (Ad5 bp 11343 - 3537) を pBRXad5XhoIC1 から同じベクターにクローン化した。得られた 3075 bp の E1 断片 (pSL301 中) は、E1A の TATA ボックス及び RNA キャップ部位、E1A コーディング配列、完全な E1B プロモーター、並びに E1B コーディング配列を含み、これには E1B p55 タンパク質の停止コドンが含まれるが領域 IX は含まれない。この 3075 bp の AfI III - AfI I E1A / E1B 断片 (Ad5 bp 462 - 3537) を単離し、クレノウ酵素で平滑末端化して、CMV プロモーター / エンハンサーの制御の下で哺乳動物発現ベクター pCDNA3 (インビトロゲン) の EcoRV 部位に平滑末端ライゲートした。このプロ

40

50

セスにより A d 5 E 1 発現ベクター C M V - E 1 が生じた (図 2 1) 。

【 0 1 2 4 】

3 . 2 新規細胞系の生成及び特徴付け

この C M V - E 1 発現ベクター (G 4 1 8 耐性遺伝子、 n e o を含む) をリポフェクタ
ミン (ギブコ / B R L) を用いて A 5 4 9 ヒト肺癌細胞に形質移入し、 G 4 1 8 ^R コロニ
ーを単離した。単細胞クローンを機能的な E 1 A / E 1 B の発現についてスクリーニング
した ; 緑色蛍光タンパク質 (F G P) 発現カセットを C M V / - アクチン (C A) プロ
モーター A d 5 C A - G F P の存在下に含む E 1 欠失アデノウイルスを A 5 4 9 - E 1 ク
ローンの感染に用いた。感染の 3 日後、細胞変性効果 (C P E) の目視検査により E 1 補
完 A d 5 C A - G F P アデノウイルスの生成についてクローンをスクリーニングした。ク
ローンの 1 つ、 A 5 4 9 E 1 - 6 8 が 3 日間で (2 9 3 細胞について観察されるものに類
似する) 1 0 0 % の C P E を示した。このクローンは高い感染性も示し、実質的に 1 0 0
% の細胞が感染後 2 4 時間で緑色の蛍光を発した (図 2 2) 。

【 0 1 2 5 】

この細胞系に誘発された C P E の迅速な生成に加えてこの高い感染率は、 E 1 欠失 A d
5 C A - G F P ウイルスの複製及び増幅を促進することが可能な機能的 E 1 A / E 1 B タ
ンパク質が生じていることの強力な証拠である。 E 1 配列特異的プローブを用いるサザン
プロット分析により、 A 5 4 9 E 1 - 6 8 、 A 5 4 9 E 1 - 6 8 のサブクローン (E 1 -
6 8 . 3) 、 及び 2 9 3 細胞における C M V - E 1 導入遺伝子の存在が示されたが、親の
A 5 4 9 細胞系には示されなかった (図 2 3) 。これらの E 1 形質移入細胞の形態は親の
A 5 4 9 細胞系とは大きく異なっていた。亜集密密度の A 5 4 9 細胞は細長い線維芽細胞
様の形態を有する別々の単細胞として成長し、これに対して E 1 細胞系、 A 5 4 9 E 1 -
6 8 はより立方体状の形態を有する細胞のコロニーとして成長する (図 2 4) 。

【 0 1 2 6 】

E 1 欠失アデノウイルス (A d 5 C A - G F P) の生成についてブランク検定により A
5 4 9 E 1 - 6 8 を 2 9 3 細胞と比較し、等しい力価の補完ウイルス (A 5 4 9 E 1 - 6
8 についての 7×10^9 P F U 対 2 9 3 についての 9×10^9 P F U) を生成することが
見出された。免疫沈殿及び E 1 A 特異的抗体 (M 7 3 、 オンコジーン・サイエンス (O n
c o g e n e S c i e n c e)) を用いるウェスタンプロットにより 4 6 k d 及び 4 2
k d の見かけの分子量を有する 2 つの E 1 A 特異的バンドが明らかとなり、これらは E 1
A 1 3 S 及び 1 2 S m R N A から予想される産生物 (6) に相当し、且つ 2 9 3 細胞
中に観察されるものと同じサイズであった (図 2 5 A) 。 A 5 4 9 E 1 - 6 8 は、 E 1 B
p 5 5 に特異的なモノクローナル A b を用いて約 5 5 k d のバンドを生成した。この 5 5
k d の E 1 B 特異的バンドはもちろん、二次バックグランドバンドも、同様に 2 9 3 細胞
において観察された (図 2 5 B) 。実験及び対照レーンの両者に見出される余分な “ バッ
クグラウンド ” バンドは他の著者によって観察されており、サイクリン、 p 5 3 、 及び R
b を含む様々なタンパク質の同時免疫沈殿によるものと考えられている。 A 5 4 9 E 1 -
6 8 及び 2 9 3 細胞とは異なり、親の A 5 4 9 細胞系は 4 6 k d 、 4 2 k d 、 又は 5 5 k
d E 1 A / E 1 B タンパク質の発現を示さなかった。 A 5 4 9 E 1 - 6 8 が E 1 A 及び
E 1 B を発現するだけでなくそれらが機能的であることは、この細胞系が高力価の E 1
欠失組換えアデノウイルスの生成を補完することが可能であることから明らかである。こ
の新規 A d 5 ヘルパー細胞系が R C A を生成することなく補完可能であることを立証する
ため、 A 5 4 9 E 1 - 6 8 細胞で E 1 欠失アデノウイルスを連続的に継代し、継代の間に
増幅したウイルスを、 E 1 を含む複製適格アデノウイルス (R C A) については親 A 5 4
9 細胞を用いて、 C P E によってはもちろん、 E 1 A / E 1 B 配列に特異的な P C R プラ
イマーを用いることにより試験した。この細胞系は、 E 1 欠失アデノウイルスベクターの
増殖及びスケールアップの間に、製造ロットが R C A を含まないことを保証するために用
いられる。

【 0 1 2 7 】

< 実施例 4 > F V I I I c D N A を含む発現カセット

本発明のAdミニベクターの関心のある遺伝子に対する大きな収容力は、従来のAdベクターのサイズ容量を大きく上回る大プロモーター及びタンパク質コーディング領域の組み込みを許容する。本発明の目的上、このFV IIIミニAdベクターはFV III遺伝子を肝臓に送達することが好ましい。したがって、肝臓において作用する非常に活性の高いプロモーターを用いることが重要である。このようなプロモーターの1つはヒトアルブミン遺伝子プロモーターである(32)。ヒトアルブミンプロモーターの12.5 kb領域はカルガリー大学のTamaoki博士から入手した。この12.5 kbプロモーター内の3つの領域がプロモーターの活性に大きく影響することが決定されている(32): 1) TATAボックスを含む近位領域(550 bp); 2) -1.7 kbのエンハンサー領域; 及び3) -6.0 kbの第2エンハンサー領域(図26)。合わせると、これらの領域は12.5 kbヒトアルブミンプロモーター全体の強度に近づく。pAlb12.5CATの10.5 kb EcoRI/AvaI断片(図2)をAvaI/HindIII近位ヒトアルブミンプロモーター断片と共にpBlue-script-KS⁺ベクターのEcoRI/HindIII部位に同時ライゲートして組換えプラスミドGT4031を生成した(図27)。5'側接SV40最初期イントロン及び3'側接SV40ポリアダニル化シグナルを有する7.2 kb完全長ヒトFV III cDNAをプラスミドGT2051からXhoI/SalI消化により切り出し、GT4031のSalI部位にクローン化してプラスミドGT2053を生成した(図28)。次に、最小ITR領域及びAdパッケージ化シグナルを含むGT2033から誘導されるXhoI断片をGT2053のSalI部位に正方向又は逆方向のいずれかにクローン化し、それぞれ、アルブミン/hFV IIIミニウイルスプラスミドGT2059及びGT2061を生成した(図29)。このGT2059及びGT2061ミニウイルスプラスミドの制限酵素消化パターンが図30及び31に示されている。

【0128】

FV III cDNAはプロモーターもしくは転写制御要素に作動可能に連結させることが可能であり、この要素は合成であっても、制御可能もしくは調節可能であっても、あるいは組織/細胞型に特異的であってもよい。好ましくは、産生もしくはヘルパー細胞におけるFV III cDNAの発現はウイルス生成の間抑制され、標的細胞に送達された後に活性化される。このようにして、このミニAdベクターのレポーター又はエフェクター遺伝子の弁別的発現が活性化される。このような弁別された発現は、1-抗トリプシン(1-AT)プロモーターに作動可能に連結する肝臓特異的エンハンサーを有するもの又はテトラサイクリンオペロン(tetO)がサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(tetO-CMV)に作動可能に連結するもの(この場合、tet-KRAB転写リプレッサータンパク質を発現する細胞系が用いられる)のような合成プロモーターの転写制御の下にFV III cDNAを有するDNA分子を構築することにより達成される。

【0129】

<実施例5> FV III発現カセットの相同組換えアーム

外来性遺伝子を標的細胞のゲノムに挿入して安定な遺伝子発現を得るのに相同組換えを用いることができる。この技術を用いて、ヒトFV III cDNAの標的を標的細胞のゲノムDNAに設定することができる。ヒトアルブミン遺伝子又はヒト-胎児タンパク質から誘導される細胞DNAの大セグメントを用いた(32、33)。FV IIIミニAdベクター中の12.5 kbアルブミンプロモーターは、6 kbを上回る幾つかの下流断片が潜在的な3'組換えアームとして調製されたのに対して、上流相同組換えアームとして作用する。本発明において用いられるアルブミン遺伝子、遺伝子間領域及び-胎児タンパク質遺伝子領域の形状が図31に示されている。5'末端にこの12.5 kbアルブミンプロモーターを含み、且つ3'同族組換えアームとしての役割を果たす幾つかの領域を含むプラスミドGT2061内の発現カセットの構造が図32に示されている。これらのベクターは、これらのアームの方向が正常ヒトゲノムにおける配列と同じ方向であるため、相同組換え置換ベクターとしての役割を果たす。ヒトアルブミン遺伝子から誘導され

る3' XhoI組換えアーム及びGT2061の独自SalI部位にクローン化されたpAlb-E5セグメントを含む構築体(GT2063)が図33に示されている。3'アルブミン相同組換えアームに隣接するヒトアルブミンプロモーター誘導hFVIIを構築するのに適するベクターの制限酵素消化が図34に示されている。プラスミドpE5のXhoIアルブミン遺伝子断片をGT2061の独自SalI部位に挿入することによりプラスミドGT2063を構築した。

【0130】

<実施例6> FVIIミニAdベクターの生成

12.5kb EcoRI/HindIIIヒトアルブミンプロモーター断片をpBluescriptKS+(ストラタジーン、ラ・ホーヤ、CA)に挿入した。これにより、ヒトアルブミンプロモーターベクターGT4031は、ヒトFVII cDNA(5'末端にSV40早期イントロンを、及び3'末端にSV40ポリアデニル化シグナルを含む、GT2051のXhoI乃至SalIの領域)が挿入されている独自SalI部位を含む。得られたプラスミドGT2053は、ポリアデニル化部位の3'、に位置する独自SalI及びXhoI部位を含む(図29)。Ad最小ITR及び野生型パッケージ化シグナルをプラスミドGT2033からXhoI消化により切り出し、プラスミドGT2053のSalI部位にクローン化してプラスミドGT2061を生成した。アルブミン遺伝子の6.8kbアームpAlb-E5から単離し、GT2061の独自SalI部位にクローン化してプラスミドGT2063を生成した。GT2063をヘルパーウイルスDNAと共に293細胞に形質移入し、GT2063と呼ばれるミニAd FVIIミニウイルスを生成した。

【0131】

FVIIミニウイルスを生成するため、ヘルパーウイルスゲノム(2µg)をウイルス粒子から精製し、ヘルパーAdゲノム(0.2µg)と共にリン酸カルシウム介在形質移入(81)により293細胞に同時形質移入した。CPEが出現した後、細胞非含有凍結解凍溶解物を調製し、新鮮な293細胞の感染に用いた。その細胞上清中に、コート色素生成検定(ファルマシア(Pharmacia))を用いて、FVIIIGT2063ミニAdの存在を示すヒトFVIIが検出された。これらのデータはヘルパー/GT2063ミニAdベクター混合物の増殖と一致した。

【0132】

さらに別のアプローチ(図35)においては、Adパッケージ化シグナル及びE1領域を欠いているがAdタンパク質の残部をコードするアデノウイルスヘルパープラスミドpBHG10をミニAdクローンGT2063と共に293細胞に同時形質移入した。このAdミニウイルスゲノムの救済は、293細胞の感染の後、弱力化パッケージ化機能を有するE1置換ヘルパーウイルスを用いて達成した。本発明の方法論を用いて、ヘルパーAd/ミニAd比は変化し得るが、これらのAdヘルパー及びミニAdゲノムの両者をパッケージ化することが可能であり、いずれかのゲノムを担持するアデノウイルス粒子を生成することが可能である。

【0133】

FVIIミニAdの生成及び検出がそれぞれ図35及び36に示されている。ヘルパープラスミドpBHG10(0µg)及びヒトFVII遺伝子を含むミニAdベクター(GT2063; 2µg)を、リン酸カルシウム形質移入(81)により293細胞に同時形質移入した。293細胞への形質移入は、公知の広く利用可能な技術のいずれか、例えば、リポフェクチン(すなわち、ギブコ/BRL製のリポフェクタミン)又は電気穿孔法(すなわち、バイオ・ラッド(Bio-Rad)から入手可能な試薬及びエレクトポレーター)を用いて行うことができる。形質移入293細胞への弱力化ヘルパーウイルスの感染は形質移入の3日後に行った(図35B)。アデノウイルスの感染が十分に進行していることを示す図35Bの細胞変性効果(CPE)は感染の4日後に観察された。その後、ウイルス貯蔵物(継代0、すなわちP0)を、感染細胞ペレットを複数回凍結-解凍することにより調製した。次に、293細胞をP0貯蔵物に感染させ(1:1)、感染の

24時間後に集めた上清はhFV I I I配列の存在に特異的なPCRで陽性であった。6日後にCPEが検出され、凍結-解凍溶解物(P2)を調製した。次いで、このP2溶解物をPCRによりパッケージ化GT2063ミニAdの存在及び機能的hFV I I Iについて試験した。293細胞におけるhFV I I Iの発現は、ヒトアルブミンプロモーターがこれらの細胞においては活性が低いため、最小であるものと予想された。これは、リン酸カルシウム沈殿形質移入法を用いて293細胞にGT2061を形質移入した後、CAT検定(69)及びFV I I I色素産生検定(ヘレナ・ラボラトリーズ(Hele na L a b o r a t o r i e s)、ファルマシア)の両者を用いて測定されている。

【0134】

<実施例7>ミニAdFV I I Iの増幅及び生成

出願人は、以前、1996年5月31日に米国特許出願番号08/658,961号を出願し、その出願の中でミニAdFV I I IベクターGT2063を生成し、且つ増殖物の初期継代を実施するための試薬及び方法論を提供した(79、80)。これらの増殖段階において、出願人は、ヘルパーウイルスAdH に対するミニAdFV I I Iの比が増殖の進行に従って増加することを見出した。本願は、いずれも当業者に公知の通常技術であるPCR及びサザンブロットを用いる、ヘルパーに対するベクターの比の分析を提供する。全ての継代について、500µlの(感染細胞の3回の凍結/解凍サイクルにより得られた)ウイルス粗製抽出物を6ウェルプレートのウェルにおける293細胞の新たな亜集密単層の感染に用いた。感染の1時間後、1.5mlの新鮮な培地(DMEM/10%FBS)を添加した。細胞変性効果(CPE)が完了したら直ちに細胞を回収し、再度ウイルスを抽出した。各々の継代において、2mlのうちの0.5mlが用いられ、そのためこの増殖の増幅スケールは1対4である。全ての継代の清澄化した粗製溶解物を用いて、SDS/EDTA/プロテイナーゼK消化及びエタノール沈殿によりウイルスDNAを精製した。このウイルスDNAをPCR及びサザンブロットに用いてミニAd及び、独立に、ヘルパーAdウイルスDNAを検出した。

【0135】

PCRはヒトFV I I I cDNAに特異的なプライマーを用いて行い、増幅は、DNA抽出の前にDNA分解酵素処理を行ってあらゆる残留非ウイルス汚染プラスミドDNAを除去したウイルスに対して行った。PCRは、テンプレートとしての単離ウイルスDNA(単離されたウイルスDNAの1/20)、最終濃度1µMのFV I I Iプライマー#1(配列番号1; ACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAAGAとして記載)、最終濃度1µMのFV I I Iプライマー#2(配列番号2; CGATGGTTCCCTCACAAGAAATGTとして記載)、及び以下の条件を用いて行った: 55 で1分間のアニール、72 で1分間の重合、94 で1分間の変性を合計35サイクル。これらの結果は、FV I I Iミニウイルスが早期継代中に存在することを示した(継代3; データは示さず)。

【0136】

図36は、FV I I IミニAd及び、独立に、ヘルパーAdのパッケージ化シグナルのPCR増幅の結果を示す。PCRをパッケージ化シグナル領域に対しても行った。PCRは、テンプレートとしての単離ウイルスDNA(単離された全ウイルスDNAの1/20)、最終濃度1µMのパッケージ化シグナルプライマー#1(配列番号3; GGAAACAATGTAAGCGACGG)、最終濃度1µMのパッケージ化シグナルプライマー#2(配列番号4; CCATCGATAATAATAAACAAGCCAACTTTGACC CG)及び以下の条件を用いて行った: 55 で1分間のアニール、72 で1分間の重合、94 で1分間の変性を合成35サイクル。ヘルパーAdのパッケージ化シグナルが部分的に欠失しているため、パッケージ化シグナル欠失ヘルパーからのPCR産物は野生型パッケージ化シグナルを有するミニAdのもの(約310bp)より短い(177bp)。初期継代においてはFV I I IミニAdは検出されないが、その存在は継代3乃至6において徐々に検出された。同じ結果がサザンブロット分析を用いて得られた(図37)。サザンブロット分析におけるプローブとして、FV I I IミニAd及びヘルパーAd

10

20

30

40

50

の両者に存在する右 I T R に隣接する A d D N A 断片を用いた。ミニ A d G T 2 0 6 3 及び A d H の P s t I 消化の後に検出される断片の予想される長さは、それぞれ、3 . 3 及び 2 . 2 K である。図 3 7 は、継代 1 乃至 2 1 から独立に単離された F V I I I ミニ A d D N A の 4 つのサザンプロット (A - D) を編集したものである。ミニ A d F V I I I に相当する 3 . 3 K b バンドが継代 5 - 2 1 から単離された D N A に検出された。F V I I I ミニ A d D N A の安定な増加が継代 1 0 まで検出され、その後継代 1 2 まで F V I I I ミニ A d が漸進的に減少した。この F V I I I ミニ A d D N A の水準の増加及び減少のサイクルは 4 つの継代ほぼ全てに生じることが観察され、これには僅かに早く開始するヘルパー A d D N A の水準の平行なサイクルが付随した。これらのサイクルをより十分に決定するため、サザンプロットから F V I I I ミニ A d D N A 及びヘルパー A d D N A の量を濃度測定により定量し、図 3 8 にプロットした。等量のマーカー (ギブコ、ゲーズバーグ、M D からの 1 K b ラダーマーカー) からのバンドの強度を用いて、異なるプロットの結果を標準化した。観察されたサイクルは、欠陥妨害性ウイルスに関連して生成するウイルス集団 (本発明の系においては、このウイルス集団は F V I I I ミニ A d を含む) 及びヘルパーウイルスの公知の動態と一致する。これらのサイクルの理解及び制御は、最適力価を得るためにどの継代でミニ A d ベクターを精製するべきであるのかを決定するのに重要である。# 1 8 (P 1 8) のような継代は、低力価ではあるが、F V I I I ミニ A d に富むベクター調製品を生じる (すなわち、P 1 8 はヘルパー A d より 1 0 倍多い F V I I I ミニ A d を含むものと考えられる)。# 2 0 (p 2 0) のような継代は、1 : 1 の望ましくない F V I I I ミニ A d 対ヘルパー A d 比ではあるが、高濃度の F V I I I ミニ A d 及びヘルパー A d を含む。

【 0 1 3 7 】

大規模増幅を p 2 0 で行った。各々約 10^9 個の感染 2 9 3 細胞 (A T C C # C R L 1 5 7 3) を収容する 1 0 0 の 1 5 c m 皿を C P E が完了したら直ちに回収した。その後、粗製溶解物を 3 回の凍結 / 解凍サイクルによって調製してウイルスを抽出した。この粗製溶解物を遠心によって清澄化し、C s C l の段階濃度勾配 (1 . 5 、 1 . 3 5 、 及び 1 . 2 5 g / m l の 3 層) にのせて 3 5 0 0 0 X g で 1 時間遠心した。ミニ A d 及びヘルパー A d に相当するバンドを、1 . 3 5 g / m l の第 2 連続 C s C l 勾配を用いてさらに精製した。3 5 , 0 0 0 r p m (1 5 0 , 0 0 0 X g) で 1 6 時間遠心した後に類似の強度を有する 2 つのバンドが観察され、それらを別々に単離して 1 0 % グリセロールを含むリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中に透析した。各々のバンドの一定分量からウイルス D N A を精製し、ミニ A d F V I I I 及びヘルパーの量をサザンプロットにより分析した。上部バンド (より軽量) は主としてミニ A d を含み、下部バンドは主としてヘルパー A d を含むものと思われた。これらの結果は F V I I I ミニ A d ゲノム (G T 2 0 6 3 = 3 1 K b) がヘルパー A d ゲノム (A d H = 3 7 . 1 K b) より小さいことから予想されたことであり、本願の親出願 (1 9 9 6 年 5 月 3 1 日出願の米国 0 8 / 6 5 9 , 9 6 1 号) において示される M 3 2 ミニ A d についての以前の C s C l 分画結果と一致する。

【 0 1 3 8 】

< 実施例 8 > 細胞系におけるミニ A d F V I I I の試験

F V I I I ミニ A d (G T 2 0 6 3) を上述の通り C s C l により精製し、このベクターで感染した宿主細胞における F V I I I の生成を示すのに用いた。この目的を達成するため、2 9 3 及び H e p G 2 細胞を、アルブミンプロモーターを用いるそれらの能力のために用いた。これらの細胞における F V I I I の生成は感染の 2 4 時間後に免疫組織化学及び機能的検定により検定した。精製 F V I I I ミニ A d ベクターを 0 . 5 m l の培地に添加し、4 c m² ウェルにおける 6×10^5 個の 2 9 3 及び H e p G 2 細胞の感染に用いた。4 時間インキュベートしてウイルス粒子を宿主細胞に吸着させた後、その感染培地を新鮮な培地に置き換えた。F V I I I ミニ A d を含むより軽量の画分の 1 / 1 0 0 希釈液 0 . 1 μ l で 2 9 3 細胞を感染させ、これらの細胞をヒト F V I I I の存在について免疫組織科学的分析を行った後、これらの細胞の約 1 0 % が F V I I I の発現について陽性に染色された (図 4 0 、 パネル A - D) 。ミリリットル当たりの形質導入単位での見積もり

力価は 6×10^9 形質導入単位 / ml と決定された。4 時間の吸着時間、 4 cm^2 に 0.5 ml の吸着容積、及び非振盪吸着を考慮に入れた場合、見積もり力価はそれぞれ 0.42 、 0.56 、及び 0.53 の因子だけ減少し得る (49)。したがって、ミニ Ad F V I I I ベクターの実際の力価は、 4.6×10^{10} 形質導入因子 / ml と見積もられる。ミリリットル当たりのウイルス粒子の数を反映する 260 nm での光学吸収によって決定される力価は、F V I I I ミニ Ad の軽量画分について 3.6×10^{12} 粒子 / ml と決定された。したがって、F V I I I ミニ Ad の生物活性は 78 ウイルス粒子毎に 1 F V I I I 形質導入単位と算出することができ、これは食品医薬品局が推奨する許容度の水準内に入る。

【0139】

形質導入細胞の上清中の機能的 F V I I I の量を色素産生コースター F V I I I 試験 (ファルマシア、ピスカタウェイ、NJ) を用いて測定した。100 万個の 293 細胞又は、独立に、Hep G2 細胞に、100% の形質導入を達成するため、過剰量の精製ベクターを感染させた。感染条件は上述の通りであり、感染の 24 時間後に上清 (2 ml) を集めた。標準曲線を作成するため、標準ヒト血漿試料を細胞培養培地で連続的に希釈して 62.5 乃至 4000 ng/ml の最終 F V I I I 濃度範囲を得た。これらの結果が図 41 に示される。Hep G2 及び 293 上清中に検出された F V I I I の量は、それぞれ、 0.8 及び 0.23 ng/ml であった。したがって、24 時間で生成した F V I I I の総量は 100 万個の Hep G2 細胞当たり 1.6 ng 、100 万個の 293 細胞当たり 0.46 ng であった。

【0140】

< 実施例 9 > イン・ビボでのミニ Ad F V I I I の改善

様々な発現カセットをクローン化することができるベクターを生成することによりベクター系の改善を達成した。近位アルブミンプロモーター領域並びに P m e I 及び S a l I 部位の間に位置するヒト F V I I I 遺伝子を切除することによりベクター GT 2063 を改変した。これは、まず、S a l I リンカーを P m e 部位にライゲートすることによって GT 2063 の P m e I 部位を S a l I 部位に変換することにより達成した。得られたクローン GT 2072 を S a l I で処理し、再ライゲートして近位アルブミンプロモーター / h F V I I I 遺伝子を除去し、それにより様々な発現カセットを挿入するための独自 S a l I クローニング部位を有するミニ Ad ベクターを作製した。このようなカセットからの発現は上流に位置するアルブミン遺伝子エンハンサーの影響を受ける可能性がある。各々のクローンを分析して導入遺伝子の発現の水準を決定した。

【0141】

この改善されたベクター GT 2072 に挿入するため、発現カセットを調製した。この例の発現カセットは、サイトメガロウイルス (CMV) 最初期プロモーター、伸長因子 I (EF-I) プロモーター (これは様々な細胞型で作用することが知られている) 又はピルビン酸ホスホエノールカルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子の肝臓特異的プロモーターを含む。EF-I 及び CMV プロモーターは、各々別々に、完全長 F V I I I c D N A 又は B ドメイン欠失 (BDD) 第 V I I I 因子 c D N A のいずれかの発現を駆動するのに用いた (それぞれ、図 42 及び 43)。次に、S a l I 部位が隣接する EF-1 B D D F V I I I カセットを GT 2073 の S a l I 部位にクローン化し、図 42 に示されるプラスミドを生成した。完全長ヒト F V I I I コーディング領域を CMV プロモーターの制御の下に含む発現ベクターも構築し、これは図 43 に示される。

【0142】

< 実施例 10 > 組み込み可能な A A V - I T R / R e p 系ベースのベクターの構築

アデノ関連ウイルスは、アデノウイルス又はヘルペスウイルスのようなヘルパーウイルスの存在下においてのみ複製する、ヒト非病原性一本鎖直鎖パルボウイルスである。しかしながら、ヘルパーが存在しない状況では、A A V は宿主細胞ゲノムに特異的に組み込まれ、潜在的なプロウイルスとして維持される (34)。A A V が組み込まれる特定の遺伝子座は染色体 19 q 13.3 - q t e r に位置しており、A A V S 1 と呼ばれる (22 -

10

20

30

40

50

25、35)。

【0143】

AAV組み込みの機構は完全には解明されていない。しかしながら、2つのウイルス要素がこのプロセスに関連付けられている：AAV ITR及び2つの形態のRepウイルスタンパク質 (Rep78及びRep68)。AAV ITR (逆末端反復) はAAVゲノムの両端に存在する回文構造配列であり、これはヘアピン構造に折り畳まれ、複製起点として作用する。Rep78/68タンパク質については、配列特異的DNA結合 (36、37)、配列及び鎖特異的エンドヌクレアーゼ活性 (38)、及びATP依存性ヘリカーゼ活性 (38-40) を含む幾つかの活性が記述されている。これらのタンパク質はITR DNAの特定の配列に結合することが可能であり、それによってITRヘアピンに切れ目が入って複製が行われる末端分解と呼ばれるプロセスを促進する。Rep結合モチーフ及び末端分解部位 (trs) はAAV ITR及びAAVS1の両者において同定されており、Repの存在下においてイン・ビトロDNA複製を促進することが示されている (28)。また、Rep68タンパク質がイン・ビトロでのAAV ITRとAAVS1部位との複合体形成に介在し得ることも示されている (41)。これらの発見は、ITR及びAAVS1部位でのRepのDNA結合及びエンドヌクレアーゼ活性が、制限されたDNAシターゼと共に、ITRの間に含まれる配列の標的設定された組み込みを可能にすることを示唆する (27)。

10

【0144】

AAVは遺伝子治療の候補ベクターとして考えられている。しかしながら、それが受け入れることができる外来性DNAのサイズの制限 (4.2 Kb)、大規模調製において高力価を得ることの困難性、及び組換えAAVの特異的組み込みの喪失がこのウイルスを遺伝子治療ベクターとして用いる上での問題を引き起こす。

20

【0145】

10.1 AAV/ITR-Rep組み込み系を試験するためのプラスミドの構築

ミニAdベクターへのAAV組み込み機構の取り込みに向けて (図44)、出願人は組み込みに必要なAdノ関連ウイルス要素を含むプラスミドベクターを開発して試験している。本発明の設計 (図45) において、このベクターは (ウイルス内在性プロモーターを含む) Rep発現カセットに加えて2つのAAV ITRが隣接するレポーター遺伝子の発現のためのカセットからなる。このRep発現カセットは、プラスミドpSUB201 (41) に由来するAAVゲノムの配列193乃至2216のPCR増幅の後に得られた。この断片はITRの後の右側から始まり、p5プロモーター及びRep78コーディング領域を通して延びる。

30

【0146】

10.2 培養細胞におけるAAV/ITR-Rep組み込み系の試験

一時的に形質移入した293細胞及びE1非発現細胞系 (チャン肝細胞) におけるこのプラスミドからのRepの発現を、免疫沈殿に加えて、特異的抗体を用いるウェスタンブロットにより試験した。それらの結果 (図46) は、2種類の異なる形態のRepが293及びチャン肝細胞に生成されることを示す。Rep78は二重の白色として現れ、Rep52、p19プロモーターの産生物は単一のバンドとして現れる。チャン肝細胞においては、信号は293細胞のほうがより強いものの、2種類の主要な形態、同様に二重線としてのRep78及びRep52、が検出される。

40

【0147】

これらのプラスミドの特異的組み込み能力を試験するため、Rep発現カセットを除去し、しかしながらレポーター遺伝子発現カセットは2つのAAV ITRの間に配置したままにすることにより対照プラスミドを構築した。293細胞にプラスミドGT9003又はGT9004を形質移入した後、G418 (0.5 mg/ml) で12日間選択した。G418耐性コロニーを単離して増殖させ、ゲノムDNAを異なるコロニーから塩沈殿法 (125) により抽出した。ゲノムDNAをEcoRIで消化し、AAVS1に対するプローブを用いるサザンブロットにより分析した。EcoRIは、AAVS1遺伝子座が

50

8 K b の E c o R I - E c o R I 断片内に含まれることから選択した。図 4 7 (パネル A) は、正常な配列に相当する 8 k b のバンドに加えてシフトしたバンドの存在により示されるように、プラスミド G T 9 0 0 3 (R e p 発現プラスミド) から誘導した分析済の耐性コロニーの 5 0 % が少なくとも 1 つの A A V S 1 遺伝子座の再配置を見せたことを示す。プラスミド G T 9 0 0 4 から誘導されるコロニーにおいては再配置は観察されず、これは、この現象が R e p の発現に依存することを示す。これらの結果は、R e p が導入遺伝子の特異的組み込みを駆動し得ることを示唆していた。次に、これらのメンブランを n e o に対する特異的プローブと再度ハイブリダイズさせた (図 4 8 、 パネル B) 。得られたバンドのパターンは、幾つかの A A V S 1 の再配置が n e o に相当する (例えば、クローン 2 L 2) ことを示したが、おそらくは適用した選択圧のために分析したクローンにおいて無作為組換え現象が頻繁に生じることをも示唆していた。

【 0 1 4 8 】

1 0 . 3 選択圧のない A A V / I T R - R e p 組み込み系の試験

この可能性を除外するため、プラスミド G T 9 0 1 2 及び G T 9 0 1 3 を用いて別の 1 組の実験を行った。これらのプラスミドにおいては、レポーター遺伝子は G F P (エクオレア・ピクトリア緑色蛍光タンパク質) である。このレポーターは細胞を、フローサイトメトリーによる仕分け及び単細胞クローン化を含むがこれに限定されるものではない方法を用いる単離に適するものとし、それにより n e o 発現カセットによって付与される選択圧の効果を排除する。2 9 3 細胞にいずれかのプラスミドを形質移入した。形質移入の 1 日後、所定の蛍光範囲に入る (それにより形質移入性の相違による可変性を除去する) 細胞をフローサイトメトリーにより仕分け、単細胞を 9 6 ウェルプレートにおいてクローン化した。仕分けの 2 乃至 3 週間後、コロニーを蛍光について採点した。3 回の独立の実験を行い、それらの結果が表 2 - 1 に示されている。クローン化効率 (播種ウェルの総数当たりの発生したコロニーの数) は G T 9 0 1 3 誘導細胞について幾らかの可変性を示したが、プラスミド G T 9 0 1 2 を形質移入したものについては一般に一定であった。プラスミド G T 9 0 1 2 から誘導されるコロニーは約 5 0 % が蛍光を発生し、且つ引き続き継代においてそれらの蛍光を維持し、それに対してプラスミド G T 9 0 1 3 から誘導されるものは 8 % が幾らかの蛍光を示した。蛍光強度は微かであり、観察は宿主細胞ゲノムへの 1 もしくは数コピーの G F P 発現カセットの組み込みと一致する。興味深いことに、幾つかのコロニーは G F P 発現のモザイク現象を示した。この説明の 1 つは、仕分けされた細胞が分裂を始めた後に組み込み現象が生じ、これが 2 種類の異なる集団を発生させたとするものであり得る。平行する実験においては、G F P 発現カセットを単独で含むプラスミド p C A - G F P (ウイルス配列を含まない) を細胞に形質移入した。仕分けに加えて単細胞クローン化の後、蛍光を発生するコロニーは検出されなかった (表 2 - 1) 。考え合わせると、これらの結果は、組み込みの効率は A A V I T R の存在によって高められるが、R e p が発現する場合には 4 - 5 倍高いことを示す。A A V S 1 における G F P の標的設定された組み込みをさらに分析するため、幾つかのコロニー (蛍光性及び非蛍光性) を成長させ、ゲノム D N A を上述の通りに抽出した。図 4 8 (パネル A) は、A A V S 1 に対するプローブを用いるサザンプロットによって得られた結果を示す。プラスミド G T 9 0 1 2 から誘導される幾つかのコロニーにおいては A A S V 1 の再配置が実際に検出され、これに対して G T 9 0 1 3 誘導コロニーにおいては再配置は検出されず、これは、R e p の存在が標的設定された組み込みに必要であることを示す。次に、このメンブランを G F P について探索し、再配置されたバンドとの一致をチェックした (図 4 8 、 パネル B) 。親細胞系 2 9 3 は予想通り陰性であった。5 つのコロニーが A A V S 1 で得られるものに一致する 8 K b 上回るバンドを示し、したがって、A A V S 1 における G F P の特異的組み込みを示す。全体的に見て、上に示される結果は、A A V I T R 及び R e p を含むプラスミドが宿主ゲノム D N A に高頻度で組み込まれ得ることを示し、且つこの設計がアデノウイルスベクターによって送達される配列の組み込みに有用であることを示唆する (図 4 4) 。

【 0 1 4 9 】

表 2 - 1 . 単細胞クローン化実験の結果

【表 2】

		GT9012	GT9013	pCAGFP
実験 1	クローン化効率*	92/192 (48%)	116/192 (60%)	
	組み込み効率**	43/92 (47%)	5/116 (4%)	
実験 2	クローン化効率	42/96 (44%)	26/96 (27%)	
	組み込み効率	23/42 (55%)	2/26 (8%)	
実験 3	クローン化効率	93/192 (48%)	25/192 (13%)	51/96 (53%)
	組み込み効率	37/93 (40%)	1/25 (4%)	0/51 (0%)

10

20

【 0 1 5 0 】

* 播種したウェルの数当たりのコロニー数を示す。

【 0 1 5 1 】

** コロニーの数当たりの、仕分けの 2 週間後に蛍光性細胞を示すコロニーの数を示す。

【 0 1 5 2 】

< 実施例 1 1 > F V I I I 発現カセットの部位特異的組み込み

Rep 7 8 の発現と結び付けられるプラスミドへの I T R DNA 配列の導入が関心のある DNA 配列の細胞ゲノムへの組み込みを増強することは、本願の親出願 (1 9 9 6 年 5 月 3 1 日に出願された米国 0 8 / 6 5 9 , 9 6 1 号) において本出願人らによって以前に示されている (5 6) 。この以前の発明は、 A A V I T R 配列が隣接するレポーター遺伝子 [すなわち、 neo 又は緑色蛍光タンパク質 (G F P) をコードする遺伝子] を有する発現カセット (以下、組み込みカセットと称する) を上流 Rep 発現カセットと組み合わせる複数のプラスミドを包含する (図 4 4 、パネル A - D) 。実験の結果は、これらのプラスミド (すなわち、 G T 9 0 0 3 及び G T 9 0 1 2) の組み込み効率が Rep 活性を欠くプラスミド (すなわち、 G T 9 0 0 4 及び G T 9 0 1 3) よりも約 1 0 倍高いことを示す。このデータは、さらに、 Rep が宿主細胞ゲノムへの外来性 DNA の効率的な標的設定された組み込みに必須であることを示す。これらの結果を鑑みて、本発明は、 A d ベクターの利点 (高力価調製品、外来性 DNA に対する大きな収容力、複数の細胞型の高水準の感染性) 及び A A V の組み込み能力を兼ね備えるハイブリッドベクターを提供する。本発明のこのハイブリッドウイルスはアデノウイルスとして複製し、組み込みに十分な A A V 要素を含む。

30

40

【 0 1 5 3 】

本発明は、 Rep 発現カセット及び A A V I T R が隣接する F V I I I 発現カセットを有するミニ A d ベクターを含む (図 4 4) 。さらなる外来性 DNA (3 6 k b まで) をこのベクターに挿入することができる。このベクターのさらなる外来性 DNA はヒトアルブミンゲノム配列 (非コーディング) に相当する。 Rep 発現カセットは A A V ゲノムの 1 9 3 乃至 2 2 1 6 b p を含む。この断片は I T R の直後で始まり、 p 5 プロモーター及

50

びRep78コーディング配列を通して延びる。以下に記載される理由により、7つのtetオペレーターを含む断片をp5プロモーターの上流に導入し、tet-KRABリプレッサー(42)によるrep遺伝子の転写抑制を可能とするために含めた。

【0154】

細胞内の高濃度のRepタンパク質が細胞成長抑制性であり、ことによるとMiniAdベクターの複製を妨害する可能性がある。そこで、ウイルスベクターの生成の間Repの発現を阻止するため、tet-KRAVリプレッサーを転写スイッチとして提供することができる。この目的を達成するため、本発明は、tet-KRABリプレッサータンパク質を安定に発現する293細胞系を提供する。tet-KRABリプレッサータンパク質を発現しない宿主細胞にウイルスが侵入すると、それらの細胞内にリプレッサーが存在しないためRepの発現が生じ、それによりAAV ITRが隣接する配列の細胞ゲノムへの組み込みが促進される。このようにして生成するウイルスベクターは、イン・ビトロ及びイン・ビボで、組み込みの頻度及び特異性について試験することができる。

10

【0155】

<実施例12> AAVS1のクローン化及びベクターの構築

本発明の態様の1つは、イン・ビボ動物モデルとして用いられる、ヒトAAVS1組み込み部位を有するトランスジェニックマウスを生成するための方法論である。この動物モデルは、上述のAAV組み込み機構を含むウイルスベクターの部位特異的組み込みの試験に用いられる。この動物モデルの開発を目指す第1の段階は、AAVS1部位のクローン

20

【0156】

AAVS1ヒト組み込み部位は、最初に、Kotinら(50)によって8.2kbのEcoRI断片としてクローン化され、その最初の4067bpは配列決定されている。このDNA配列情報を用いて2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、続いてそれらを、AAVS1特異的プローブとして用いるための253bpPCR産生物の生成に用いた。上方プライマーU2493(配列番号5:GCTGTC TGGTGC GTTTC ACTGAT)はAAVS1配列の塩基対2492-2515に延びる23量体であり、下方プライマーL2722(配列番号6:TCACAAAGGGAGTTTTC CACA CG)もAAVS1配列の塩基対2722-2754に延びる23量体である。PCR増幅は、テンプレートとしての100ngのヒトゲノムDNA並びに最終濃度1μMのU2492及びL2722プライマー(それぞれ、配列番号5及び配列番号6)を用いて以下の通りに行った:95、4分-1サイクル;95、0.5分、55、0.5分、72、1分-35サイクル;72、7分-1サイクル。253bpのAAVS1特異的PCR産生物をゲノム・システム(Genome System)(セントルイス、MO)に送り、そこでヒトP1ゲノムDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。80-120kbのサイズ範囲の4つのP1クローン(#6576、6577、6578、6579)を正しい253bp AAVS1 PCR断片を生じるものと同定した。これらのクローンがAAVS1配列を含むことを確認するため、これら4つのP1クローンからDNAを単離し、EcoRI単独で、又はEcoRIをEcoRVと組み合わせて消化し、サザンブロット分析に用いた。253bpのAAVS1特異的PCR産生物をプローブとして用いるブロットのハイブリダイゼーションにより、全てのクローンが予想される8.2kb EcoRI断片(図49A)及び予想される5.2kb EcoRI/EcoRV断片(図49B)を含むことが明らかとなり、これは、これらがヒトAAVS1配列の無傷の完全長コピーを含むことを示す。8.2kb EcoRI断片をP1クローン#6576から単離し、哺乳動物発現ベクターpGKneoのEcoRI部位にクローン化した。得られた12.9kbのプラスミドpAAVS1-Neoは、ヒトAAVS1配列に加えて、哺乳動物細胞での選択のためのネオマイシン耐性遺伝子(Neo)有する(図50)。

30

40

【0157】

50

<実施例13> AAVS1(+) ES細胞系の生成及び特徴付け

AAVS1トランスジェニックマウスの生成において用いられるAAVS1配列を含むマウス胚幹(ES)細胞系を生成するため、pAAVS1-NeoプラスミドをマウスES細胞(129Svアグーチ、ゲノム・システムズ)に形質移入した(図51)。25µgのpAAVS1-NeoプラスミドDNAをXbaIで直線化し、バイオラッド・ジーン・パルサー(Biorad Gene Pulser)を用いて電気穿孔法(975µF、252V)によりES細胞に形質移入した。形質移入細胞を250µg/ml G418において1週間選択した。24のneo-耐性(Neo^R)コロニーが単離され、分化全能性表現型を維持する細胞系を富化させるため、それらを増殖させ、形態により特徴付けて>95%が“非微分化”であるクローンを得た。17のNeo^R ESクローンに加えて非形質移入親ES細胞系からゲノムDNAを単離し、そのDNA 100ngをテンプレートとして、プライマーU2492及びL2722(それぞれ、配列番号5及び配列番号6;最終濃度1µM)を用いて、AAVS1特異的PCRに用いた。PCRの条件は:95、4分-1サイクル;95、0.5分、55、0.5分、72、1分-35サイクル;72、7分-1サイクルであった。図52に示されるように、17/17Neo^R ESクローンに由来するDNAのPCRでは予想される253bpのAAVS1 PCR産物が生成し、一方、非形質移入対照ES細胞に由来するDNAのPCR分析では検出可能なPCR産物は生成しなかった。サザンブロット分析を対照及びAAVS1(+) ES細胞系に対して行い、機能的AAVS1配列が形質移入及びゲノム組み込みの後に保存されていることを確認した(図53)。(PCRによる検定で)AAVS1陽性のES細胞系(AAVS1 ES#4及びES#3.16)をEcoRIにEcoRVを組み合わせて消化し、電気泳動してブロットし、8.2kb AAVS1プローブとハイブリダイズさせた。ES#4及びES#3.16細胞系の両者は予想される5.2kb及び3.0kb EcoRI/EcoRV断片を含み、これは8.2kb AAVS1配列全体の組み込みを示す(図53)。非形質移入親ES細胞は、このヒトAAVS1特異的プローブを用いてハイブリダイズするバンドを示さなかった。AAVウイルスはヒトに加えてマウスゲノムに組み込まれるが、AAVS1のマウス相同体(これは未だ同定されていない)はヒトの配列とは大きく相違するはずでヒトAAVS1プローブとは交差ハイブリダイズしないことが知られているため、対照マウスES細胞に幾らかのハイブリダイゼーションが検出されることが予想されていた。これらのAAVS1(+)細胞系ES#4及びES#3.16の各々を、AAVS1トランスジェニックマウスの生成を目指す次の胚盤胞微量注入実験に用いた。

【0158】

<実施例14> AAVS1トランスジェニックマウスの生成

未分化の分化全能性表現型を保存するため、AAVS1陽性ESクローンES#4及びES#3.16を白血病抑制因子(LIF-抗分化因子)の存在下において1°ネズミ胚性線維芽細胞支持層上で成長させ、非常に低い継代(P.2-P.7)で維持した。第3.5p.c.に胚盤胞段階の胚を過剰排卵C57BL/6マウスから集め、M16胚培地において維持した。15-20個のES細胞(AAVS1 ES#4又はES#3.16)を3.5日の胚の胞胚腔にライツ(Lietz)DM-ILBマイクロインジェクション・ワークステーション(Microinjection Workstation)を用いて微量注入した。微量注入に続いて、これらの胚をM16培地に戻し、5%CO²中37で2時間インキュベートして胚盤胞に再度腔を形成させた。続いて、10-15個の注入胚盤胞を、交尾後(p.c.)第2.5日の偽妊娠CG6F₁仮母の子宮に移した。子宮に移入された後、それらの胚盤胞は子宮壁に植え付けられ、AAVS1陽性ES細胞が胚の内部細胞塊に取り込まれてそれらの遺伝情報を胚の発生に渡し、その結果約17日後にトランスジェニック(キメラ)子孫が誕生する。現在までに40を上回る高率で雄キメラ(始祖)が生成されている。ES細胞誘導アグーチ(茶色)毛皮色遺伝子の高率の寄与を示すこれらのキメラ始祖の幾つかの例が図54に示されている。キメラマウスにおいてAAVS1導入遺伝子を検出するためにPCR分析を行った。ゲノムDNAをAAV

S 1 キメラ及び非キメラ同腹子の尾から単離し、これらのDNA 100 ng を、AAV S 1 特異的プライマーU 2 4 9 2 及びL 2 7 2 2 (それぞれ、配列番号5 及び配列番号6) を最終濃度1 μM で用いるPCR 分析によりスクリーニングした。PCR の条件は：9 5 、4 分 - 1 サイクル；9 5 、0 . 5 分、5 5 、0 . 5 分、7 2 、1 分 - 3 5 サイクル；7 2 、7 分 - 1 サイクルであった。正しい2 5 3 b p A A V S 1 PCR 産生物が高率キメラに由来する尾DNA においては実際に検出された(図5 7、レーン7) が、非キメラ同腹子の尾DNA 又は1 0 % 未満のアグーチ毛皮色キメラ現象を示す低率キメラにおいては検出されなかった(図5 5、それぞれレーン5 及び6)。したがって、ヒトAAV S 1 組み込み配列をクローン化し、それをマウス胚性幹細胞に形質移入し、これらのES 細胞を胚盤胞段階の胚に微量注入し、得られたトランスジェニックマウスのゲノム内にこのヒト導入遺伝子の存在を示すことに成功している。これらのキメラ始祖は、現在、ヒトAAV S 1 導入遺伝子の生殖系列伝達を得るために野生型C 5 7 B L / 6 の雌と共に飼育されている。ひとたび生殖系列伝達が達成されると、そのF 1 ヘテロ接合体子孫を飼育することでホモ接合AAV S 1 トランスジェニックマウス系が得られる。次に、このホモ接合系を用いてAAV ウイルスベクター、ハイブリッドアデノウイルス / AAV ウイルスベクター、又はAAV S 1 部位での組み込みに必要とされるAAV I T R 及びR e p 7 8 / 6 8 遺伝子を含む他のあらゆるプラスミドベクターのいずれかのAAV S 1 部位特異的組み込みの試験に用いることができる。このAAV 導入遺伝子は、ウイルスの感染(I . V . 注入の後)により、又はリガンド介在DNA / リボソーム複合体を用いることにより、イン・ビボでAAV S 1 トランスジェニックマウスに送達することができる。部位特異的組み込みの頻度、組み込まれた導入遺伝子の安定性及び安定なタンパク質発現の持続期間(すなわち、ヒト第V I I I 因子又は第IX 因子)は標的細胞への組み込みの後に評価することができる。

10

20

30

40

50

【0 1 5 9】

ゲノムにAAV S 1 配列が組み込まれているトランスジェニックマウスへのアデノ関連組み込み要素を含むウイルスベクターのイン・ビボ送達の効率は以下の方法で試験することができる。本発明のウイルスベクターをトランスジェニックマウスの静脈内又は門脈に注射する。このベクターは医薬組成物の一部であってもよく、且つリポフェクタミン(ギブコ / B R L) のような脂質及び / 又は肝臓特異的リガンド(7 9、8 0) と複合体を形成していてもいなくてもよい。マウスにウイルスベクターを投与した後、血液試料を1 年まで、もしくはそれ以上、毎週尾の静脈から採取して導入遺伝子の発現の持続を評価する。ウイルスベクターのエフェクター又はレポーター遺伝子の発現水準は、ノーザンブロット、RNA 分解酵素保護検定、又はPCR のような技術を用いて測定する。F V I I I ミニA d の試験において、F V I I I はE L I S A 検定により検出する。導入遺伝子の発現の持続を決定するため、各血液試料中のエフェクター又はレポーター遺伝子の発現水準を互いに比較する。また、ベクターの部位特異的組み込みを決定するため、その動物の肝臓組織からゲノムDNA を単離する。その後、AAV S 1 特異的プライマー及びこのベクターの配列と相同の配列を含むプライマーを用いるゲノムDNA のPCR 分析を行う。このベクターの、トランスジェニック動物ゲノムのAAV S 1 部位での部位特異的組み込みにより、AAV S 1 及びベクター配列の両者を含む産生物が生じる。増幅したPCR 産生物は、ウイルスベクターがその動物のAAV S 1 部位に組み込まれているのであれば、ベクター配列を含む。

【0 1 6 0】

< 実施例 1 1 >

A . ヒトAAV S 1 組み込み配列を有するF V I I I トランスジェニックマウスneo 又はG F P レポーター遺伝子のいずれかを含むAAV / I T R - R e p ベクター(それぞれ、G T 9 0 0 3 及びG T 9 0 1 2) をヒト2 9 3 細胞に形質移入した。次に、これらの細胞の抽出物を、サザンブロットにより、内在性AAV S 1 部位でのこのベクターの部位特異的組み込みについて検定した。AAV S 1 での組み込みは、AAV - I T R / R e p ベクターのneo 又はG F P バージョン(それぞれ、G T 9 0 0 3 又はG T 9 0

12) のいずれかを形質移入した後に得られた試料において50%の頻度で観察された。これらの結果は、これらのAAV ITR及びRepコーディング領域がAAVS1での高効率の部位特異的組み込みを導くのに十分なものであることを示す(56)。AAV-ITR/Rep組み込み要素を含むミニAd-hFV I I Iベクターがイン・ピボでAAVS1を標的とし、部位特異的な様式で組み込まれ、且つhFV I I Iの長期間の発現を維持することを示すため、動物モデル系を開発した。

【0161】

本発明は、そのゲノム内にヒトAAVS1組み込み部位を有するトランスジェニックマウスを包含する。このトランスジェニックマウスは、図51に示される胚幹細胞操作技術(43)を用いて生成される。8.2kbヒトAAVS1配列全体及びneo(もしくはNeo)選択マーカを含む発現ベクターを構築する。このAAVS1/Neoベクターを分化全能性マウス胚幹(ES)細胞に移入してNeoR、AAVS1⁺ES細胞クローンを得、続いてこれをマウス胚盤胞段階の胚に微量注入して仮母の子宮に移植する。移植の後、このAAVS1⁺ES細胞は正常な胚発生を再開し、それらのゲノム情報(ヒトAAVS1配列を含む)を発生する胚に渡す。キメラ(トランスジェニック)子孫はES細胞誘導アグーチ茶毛皮色の存在によって同定する。次に、キメラ始祖を野生型C57BL/6マウスと共に飼育して導入遺伝子の生殖系列伝達を得る。F1ヘテロ接合体を飼育して、そのゲノムにヒトAAVS1組み込み配列が安定に取り込まれているホモ接合マウス系を得る。次いで、このマウスモデルに尾の静脈又は門脈を介してAAV-ITR/ミニAd-FV I I Iベクターを注射し、イン・ピボ形質導入効率、ヒトAAVS1配列での組み込み、及び導入遺伝子発現の持続を評価する。

【0162】

B. ヒトFV I I Iに対して寛容化されたトランスジェニックマウス

FV I I I寛容化マウスモデル系も本発明によって提供される。過去、FV I I I寛容化は、新生児マウスにFV I I Iを一時的に注入することにより達成されている(44)。本発明は、発生期特異的な様式で作用するプロモーターの制御下にヒトFV I I I遺伝子を有するマウスを包含する。このようなプロモーターには - 胎児タンパク質遺伝子又は胚性グロビン遺伝子、イプシロンのものが含まれ得るが、これらに限定されるものではない。 - 胎児タンパク質プロモーターは、成熟動物においては不活性である早期発生段階特異的プロモーターの例である(45)。胚性グロビン遺伝子、イプシロンは、本発明において用いることができる発生的に調節される遺伝子の別の例である。 - 胎児タンパク質プロモーターの制御下において、遺伝子の発現は肝臓に限定され、活性化については肝臓特異的転写因子に依存する(46、47)。FV I I I発現の正常部位及びFV I I I遺伝子送達の好ましい標的臓器が肝臓であるため、同様に発生的に調節される肝臓特異的プロモーター要素が好ましい。 - 胎児タンパク質プロモーター(AFP)はこれらの基準の両者を満たす。 - 胎児タンパク質プロモーターは未分化ES細胞においては作用しないが、分化の間に誘発される(48);これは、そのようなものとして、トランスジェニックマウスにおけるhFV I I Iの発現の制御に用いることができる。

【0163】

本発明の目的の1つは、異種間ヒトFV I I Iタンパク質に対して寛容化されているトランスジェニックマウスを提供することである。このトランスジェニックマウスは、アデノウイルスもしくはAAVベクター系を用いて、又は免疫単離装置内でFV I I I分泌細胞を用いて、イン・ピボでのヒトFV I I Iの送達の試験に用いることができる。この系においては、ヒトFV I I Iは、発生するトランスジェニックマウスにおいてAFPプロモーターの制御の下に胚性に発現する。これにより、hFV I I Iがマウスから“自己”と見なされ、寛容が生じる。マウスがhFV I I Iに対して寛容であるため、異種間ヒトFV I I I導入遺伝子が治療用ベクター(すなわち、AAV-ミニAd-FV I I I)によって送達されたときに、それに対する免疫反応は生じない。このようにして、ウイルスベクター主鎖の抗原性の正確な評価が、イン・ピボでの遺伝子発現の持続の信頼のおける測定に加えてなされる。また、AFP-FV I I I導入遺伝子は胚形成の間にのみ発現す

る（動物が成熟した後には発現しない）ため、正確な濃度のhFV I I Iが成熟トランスジェニックマウスの肝臓に送達される。

【0164】

<実施例16> AFP-FV I I I-Neoベクターの構築

トランスジェニックマウスの子宮内寛容化を達成するため、細胞において時間的に調節された胚特異的な様式でヒト第V I I I因子の発現を駆動することが可能なベクターを生成するのにマウス-胎児タンパク質(AFP)プロモーターを用いた。プラスミドGT2057は7.5kb AFPプロモーター配列を含み、この配列は最初にUra^rによって特徴付けられた(33)。完全長ヒト第V I I I因子遺伝子を含む7.2kb Not I断片をpCMV-FV I I I(GT2051)から単離し、GT2057のAFPプロモーターの後ろのNot I部位にクローン化した(図56)。続いて、AFPプロモーター及びhFV I I I遺伝子を含むカセットをAat II/Sal I断片としてNeo発現ベクターpGKNeoのAat II/Xho Iにクローン化した。得られた20.2kbのベクター、mAFP-hFV I I I-pGKNeo(図56)はhFV I I I遺伝子を胚性プロモーター(AFP)の制御の下に有し、且つ哺乳動物細胞における選択のためのNeo発現カセットを有する。

【0165】

<実施例17> AFP-FV I I I(+)ES細胞クローンの生成及び特徴付け

トランスジェニックマウスの生成において用いられる、AFP-hFV I I I配列を含むマウス胚幹(ES)細胞を生成するため、mAFP-hFV I I I-pGKNeoベクターをマウスES細胞に安定に形質移入した。20µgのAFP-FV I I I-Neo DNAをAat IIで直線化し、バイオラッド・ジーン・パルサーを用いて電気穿孔によりES細胞に移入した(975µF、252V)。電気穿孔の後、ES細胞を胚性線維芽細胞支持層上で250µg/ml G418中において増殖させてNeo^Rクローンについて選択した。48のNeo^Rクローンを取り出し、増殖させ、コーテストキットを用いて機能的第V I I I因子タンパク質について分析した。これらの48のクローンのいずれの組織培養上清においてもFV I I Iは検出されなかった。ゲノムDNAを13のNeo^R ESクローン及び非形質移入親ES細胞から単離し、Xba Iで消化して、GT2051に由来する7.2kb FV I I I Not I断片をプローブとして用いるサザンブロット分析によりスクリーニングした。11/13の形質移入クローンが予想される7.8kb Xba I断片を含んでおり、hFV I I I配列はもちろん、AFPプロモーターの3'末端の500bpの存在も確認された。これらのAFP-FV I I I(+)ESクローンのうちの4つに加えて親ES細胞対照の分析が図57に示されている。これらの結果は、hFV I I I導入遺伝子がNeo^Rクローン内に存在していたことを示す。

【0166】

AFPプロモーターがES細胞内において機能的であったかどうかを試験するため、AFPプロモーターをEcoRI/Sal I断片としてレポータープラスミドpEGFP-1(クローンテック)にクローン化し、緑色蛍光タンパク質(GFP; 図58を参照)の発現を駆動させた。このpAFP-EGFP-1プラスミドをES細胞及びHepG2細胞(高水準の-胎児タンパク質を発現することが知られる肝細胞系)の両者に一時的に形質移入し、FITCフィルターを備えるニコン・ディアフォト(Nikon Diaphot)広範囲顕微鏡を用いる直接可視化により、24時間後に緑色蛍光性細胞について検査した。GFPの発現はHepG2細胞系においては検出されたがマウスES細胞においては検出されず(データは示さず)、AFPプロモーターは未分化ES細胞においては作用しないが分化した肝細胞系においては作用することが確認された。これらの結果は、AFPプロモーターが未分化F9胚幹細胞において活動休止状態であり、レチノイン酸で処理された後に分化するように誘発されたときに活性化されることを示すVogtら(48)のものと一致する。発現が期待される細胞系においてmAFP-hFV I I I-pGKNeoベクターが機能的であったことを確認するため、mAFP-hFV I I I-pGKNeoベクターをHepG2細胞に形質移入し、10ラ濃縮上清を色素生成コーテスト

F V I I I 検定 (ファルマシア、ピスカタウェイ、N J) を用いて h F V I I I タンパク質の発現について分析した。ヒト F V I I I が $3.0 \text{ ng} / 10^6 \text{ 細胞} / 24 \text{ 時間}$ の濃度で検出され、これにより A F P - F V I I I 構築体が機能的であり、且つ 7.5 kb A F P プロモーター/エンハンサー要素の組織特異的及び発生特異的発現パターンが保存されていたことが確認された。A P F - F V I I I ベクターが相応に機能性であることが示されたことで、A F P - F V I I I (+) E S クローンのうちの1つ、クローン # 22 (図 57、レーン 3) をその未分化成長表現型に基づいて選択し、胚盤胞微量注入実験に用いた。

【0167】

< 実施例 18 > h F V I I I 寛容化トランスジェニックマウスの生成

10

本発明は、異種間ヒト第 V I I I 因子タンパク質に対して子宮内で寛容化されているトランスジェニックマウスを提供する。このトランスジェニックマウスは、アデノウイルスもしくは A A V ベクター系を用い、又は米国特許 5,314,417 号; 5,344,454 号; 5,421,923 号; 5,453,278 号; 5,545,223 号; もしくは 5,569,462 号に記述されるもののようなセラサイト (The r a C y t e) 免疫単離装置において F V I I I 分泌細胞を用いるイン・ピボでのヒト F V I I I の送達の実験に用いられる。h F V I I I が発生中のトランスジェニックマウスにおいて A F P プロモーターの制御の下で胚性に発現するため、治療用ベクター (すなわち、A A V - ミニ A d - h F V I I I) によって送達される h F V I I I はマウスの免疫系によって構己剥 R 原として認識される。そのようなものとして、h F V I I I タンパク質に対する寛容が生じる。このトランスジェニックマウスは h F V I I I に対して寛容化されているため、“異種間”ヒト F V I I I タンパク質に対する免疫反応が生じることはなく、ウイルスベクター主鎖の抗原性の正確な評価及びイン・ピボでの遺伝子発現の持続の現実的な測定を決定することができる。また、A F P - F V I I I 導入遺伝子は主として胚形成の間に発現するため、成熟トランスジェニックマウスにおいてこのベクターによる形質導入の結果として肝臓が発現する h F V I I I タンパク質の量を正確に定量することができる。

20

【0168】

h F V I I I 寛容化トランスジェニックマウスを生成するためのスキームはその概要が図 59 に記されている。A F P - F V I I I (+) E S クローン # 22 からの E S 細胞を C 5 7 B L / 6 胚盤胞に微量注入し、仮母の子宮内に移植した。現在までに、E S クローン # 22 を用いて 4 匹のキメラ子孫が生まれている。それらを野生型 C 5 7 B L / 6 マウスとつがわせて生殖系列伝達について試験し、生殖系列始祖を飼育してホモ接合 A F P - h F V I I I トランスジェニックマウス系を得る。このキメラ子孫は、定義上、それらの組織の全てにおいて A F P - h F V I I I 導入遺伝子のモザイク発現を示すため、ホモ接合系の生成を待つことなく、イン・ピボ遺伝子送達実験にも直接用いられる。このスキームによって生成されるトランスジェニック動物に、最初に h F V I I I タンパク質を注射することにより抗原投与して飼育し、ヒトタンパク質に対する抗体についてスクリーニングして h F V I I I に対する寛容化を確かなものとする。また、この A F P - h F V I I I 寛容化トランスジェニックマウスを、成体動物における h F V I I I の“漏出性”出現についても試験する。少量の h F V I I I タンパク質が成体トランスジェニック動物において生成される場合には、治療用ベクター又はタンパク質送達装置によって送達される h F V I I I の濃度から減ずることができるようそれを正確に定量する。トランスジェニック動物が h F V I I I に対して寛容化され、且つ有意の水準で内在性ヒトタンパク質を発現することがないのであれば、それを h F V I I I のイン・ピボ送達の効率の試験に用いることが可能であり、遺伝子発現の持続、組織分布、及び導入遺伝子以外の送達系の要素 (すなわち、ベクター主鎖、ウイルス被覆タンパク質) に対する免疫反応を分析することができる。他のパラメータもこのトランスジェニック動物を用いて試験することができる。

30

40

【0169】

< 実施例 15 > 第 2 世代トランスジェニック動物モデル

50

a . F V I I I ノックアウトマウスとの A F P - h F V I I I 寛容化マウスの飼育

マウス第 V I I I 因子遺伝子の標的設定破壊（遺伝子ノックアウト）が行われているトランスジェニックマウス株が、ジョンホプキンス大学及びペンシルバニア大学と結ばれた非排他的使用制限付きライセンスにより得られている。このマウス系は m F V I I I の欠乏が深刻であり、したがって血友病 A の有用なモデルである（51）。ヒト第 V I I I 因子に対して寛容化された我々のトランスジェニックマウスを全体に的的にマウス第 V I I I 因子が欠乏するマウスと交雑させることにより、h F V I I I のイン・ピボ送達を試験するための“クリーン”モデルを生成することが可能である。h F V I I I と交差反応する潜在能力を有するマウス F V I I I が存在しない状況において、h F V I I I の正確な定量。加えて、この二重トランスジェニックマウスは、遺伝子治療を用いる血友病 A の表現型修正の有用なモデルを提供する。 10

【0170】

b . 三重トランスジェニックマウス

本発明のさらなる態様は、上記3種類のトランスジェニック動物全てを交雑させて“三重トランスジェニック”マウスモデルを生成することを含む。ヒト F V I I I に対して寛容化され、且つマウス F V I I I が欠乏する、前項に記述されるマウスを A A V S 1 トランスジェニックマウス系と交雑飼育する。この三重トランスジェニックマウスモデルは、A A V I T R / R e p 組換え系による A A V S 1 での部位特異的組み込み；寛容化された導入遺伝子に対する免疫反応を伴わないヒト F V I I I 導入遺伝子の送達及び長期間の発現；ヒト F V I I I の成体発現の欠如に加えて交差反応性マウス F V I I I タンパク質の欠如による送達された h F V I I I の正確な定量；並びに、最後に、深刻な F V I I I の欠乏（血友病 A）の遺伝上及び表現型上の修正を含む我々の A A V - ミニ A d - h F V I I I ベクター系の全ての側面の試験に好ましく適する。 20

【0171】

c . 緑色蛍光タンパク質（G F P）に対して寛容化されたトランスジェニックマウス

G F P 発現カセットを様々なウイルスベクターにレポーター遺伝子として組み込み、新規ミニ A d ベクター、A A V ベクター、及び新規バージョンのヘルパーウイルスを開発することが好都合である。ウイルス感染、増殖、ヘルパー補完及び標的細胞へのイン・ピボ送達は緑色蛍光の目視検出により容易に理解される。導入遺伝子によってコードされるタンパク質に対する免疫応答が、アデノウイルスベクターの注入後の遺伝子発現の安定性に負に衝撃を与え得ることが示されている（30）。マウスに注入した後の G F P 発現の持続期間を短くし得る、ベクターに組み込まれる G F P 導入遺伝子に対する免疫応答を排除するため、G F P 寛容化トランスジェニックマウスを開発する。図 5 8 に示される A F P - E G F P - 1 ベクター、又は G F P の膵臓特異的発現のためのラットインシュリンプロモーター（R I P）を含む類似のベクターをこの目的で用いることができる。 30

【0172】

安定な N e o^R R I P - G F P E S 細胞系 [R I P - G F P (+) E S] を開発するため、R I P - E G F P - 1 ベクター（図 6 0）をマウス E S 細胞の形質移入に用いた。R I P - G F P (+) E S 細胞を、A F P - h F V I I I 寛容化マウスモデルの生成について説明されるもの（図 5 9）と同じ様式で、A F P - h F V I I I ベクターの代わりに R I P - E G F P - 1 ベクターを用いて、G F P 寛容化トランスジェニックマウスの生成に用いる。このようにして生成した R I P - G F P 寛容化マウスは、新規アデノウイルスベクター又は G F P 導入遺伝子をレポーターとして用いる他の送達系を開発するための有用な研究手段を提供する。 40

【0173】

実施例 1 2 に提供される A A V S 1 トランスジェニックマウス、実施例 1 5 の h F V I I I 寛容化トランスジェニックマウス、及び実施例 1 9 C の G F P 寛容化トランスジェニックマウスを含む上述のトランスジェニック動物モデルは全て、導入遺伝子（それぞれ、p A A V S 1 - N e o、m A F P - h F V I I I - p G K N e o 及び R I P - E G F P - 1）の直接 D N A 注入により代わりに生成させることができる。これは、上述の E S 細胞 50

技術を用いる代わりに、導入遺伝子をマウス単細胞卵子の雄性前核に注入してトランスジェニックマウスを生成することにより達成される。当業者にとっては、これはトランスジェニックマウスを生成するための明白な代替法である。したがって、本発明は、本願において論じられる方法のいずれかによって生成することができる(57-61)。

【0174】

<実施例20> エピソームミニAdウイルスの設計

ミニウイルスベクターによって送達される導入遺伝子の長期間の発現を可能にする要素を提供する別のアプローチとして、本発明は、標的細胞の感染の際にミニウイルス配列から自己複製エピソームを切除することを可能にする部位特異的リコンビナーゼベースの系の設計を提供する。

10

【0175】

部位特異的リコンビナーゼはDNAの操作に広く用いられている。部位特異的リコンビナーゼは2つの適切な標的配列の間の正確な組換えを触媒するもので、DNA特定の部位で開裂させ、それを開裂されたDNAの第2部位にライゲートする(再検討のためには、参考文献111を参照)。バクテリオファージP1に由来するcre/loxP系(111)又は酵母に由来するFLP/FRT(112)のような幾つかの系が同定され、特徴付けられている。両リコンビナーゼ(cre及びFLP)の認識部位(loxP及びFRT)は共通の構造を共有する：これらは中央コア領域(乗換え部位)に隣接する2つの逆反復要素(リコンビナーゼ結合部位)を有する。(コア領域によって決定される)これらの標的部位の方向は最終的な結果に影響を及ぼす：同じ分子上の2つの平行な部位の間の組換えは介在する配列の切除を生じ、各々標的部位を有する2つの分子を生成する。2つの逆平行部位の間の組換えは介在配列の逆転を生じる。異なる分子における2つの平行な部位の間の組換えは標的部位が隣接する配列の組み込みを生じる。切除は分子内の現象であるため、組み込みよりも好ましい。

20

【0176】

本発明の設計において、リコンビナーゼは真核細胞複製起点(ori)を有する配列の切除に用いられる。哺乳動物ori配列及び結合因子は現在までには特徴付けられていない。しかしながら、幾つかのウイルスori配列及び複製の開始に必要なとされるウイルスタンパク質が特徴付けられ、プラスミドベクターに組み込まれており、その例の幾つかにはシミアンウイルス40に由来するSV40 ori/T-Ag(113)及びエプスタイン・バーウイルスに由来するoriP/EBNA-1(114)が含まれるがこれらに限定されるものではない。これらの要素は真核細胞において自立的に複製し、且つ選択圧に対して安定に維持されるプラスミドの生成を可能にしている。oriPを含み、且つEBNA-1を発現するプラスミドは細胞サイクル当たり1回複製し(115、116)、培養において細胞から選択圧が除去されると失われる。しかしながら、肝細胞のような非分裂細胞におけるエピソームプラスミドの安定性に関するイン・ビボデータは存在しない。非分裂細胞(すなわち、分化した細胞)において、且つ選択なしで、エピソームが長期間安定のままであり得ることが予想される。本発明者らは、ミニウイルスDNAにori配列を組み込むことにより非分裂細胞における導入遺伝子の発現を長期化することが可能であるものと信じる。

30

40

【0177】

エピソームミニウイルスには以下のものが含まれるがこれらに限定されるものではない(図61)：

a) リコンビナーゼ発現カセット：ウイルスの生成に用いられる細胞における不適切な発現は2つの組換え部位の間に含まれる配列の切除を促進するため、リコンビナーゼは標的細胞内でのみ発現しなければならない。このため、発現は、プロモーターの上流に転写リプレッサーの結合配列を加えるか(例えば、tetO)、又は組織特異的プロモーター(例えば、アルブミンプロモーター、第VII因子プロモーター)を用いることにより厳密に制御される。

【0178】

50

b) 複製起点 (ori) : これは DNA の複製を開始させるための配列及び複製に必要とされる他のあらゆる要素 (例えば、起点の配列を認識する DNA 結合タンパク質) を含んでいなければならない。

【0179】

c) 導入遺伝子 : これは組換え部位 (5 秩 j 及びポリ A シグナル配列 (3 秩 j が隣接する) あらゆる治療用又はレポーター遺伝子であり得る。これは、その DNA の環化の際に標的細胞内でのみ発現する。

【0180】

d) リコンビナーゼ標的部位 : 平行な方向の 2 つの部位が必要であり、一方はプロモーターとリコンビナーゼ cDNA との間に配置され、他方は治療用遺伝子 cDNA の上流に配置される。

10

【0181】

e) アデノウイルス ITR : これはミニウイルスの複製及びパッケージ化に必要である。

【0182】

f) スタファー DNA 配列 : ミニウイルスのサイズをパッケージ化可能な長さまで増加させる必要がある場合。スタファー DNA 配列はいかなる長さのいかなる DNA 断片であってもよい。

【0183】

この設計で、ミニウイルスが増幅する間リコンビナーゼは発現しない。ミニウイルスベクターが標的細胞に送達されると、プロモーターが機能的になってリコンビナーゼが発現し、2 つのリコンビナーゼ標的部位の間に含まれる配列を切除して環化する。リコンビナーゼプロモーターは導入遺伝子プロモーターとなり、複製起点が存在することでそのプラスミドの安定な維持が可能となり、したがって、導入遺伝子の安定な発現が保証される。

20

【0184】

< 実施例 21 > 癌治療のためのミニ Ad の設計

現在、遺伝子治療を用いる癌の治療に対する最も有効なアプローチの 1 つは、腫瘍 - 宿主の関係を変化させ、免疫系を用いて悪性細胞の認識及び破壊を容易にすることである。腫瘍を有する個人において、有効な免疫応答の欠如は、部分的には、腫瘍細胞の弱い免疫原性、免疫同時刺激の欠如、又は腫瘍特異的免疫抑制環境のいずれかのためである可能性がある。腫瘍細胞のサイトカイン介在遺伝子移入は、免疫系を増強してより有効な抗腫瘍応答を導く方策の 1 つを提供する (117)。近年、多くのサイトカイン遺伝子が単離され、クローン化され、特徴付けられている。これらの免疫調節因子の特定のもの、例えば IL-2、の全身投与により一定の割合の抗腫瘍応答が生じている。しかしながら、臨床効果を生成させるのに必要とされる高い濃度のため、これらの生物製剤の多くはその使用に毒性が伴う。極めて望ましくない効果と全身投与による最低限の治療結果との組み合わせは、腫瘍細胞を遺伝的に加工してサイトカインそれ自体を生成させる努力を刺激している (118)。

30

【0185】

動物モデルにおいて、遺伝子改変腫瘍細胞がワクチンとして抗腫瘍応答の刺激に用いられている (117、119)。腫瘍指向サイトカイン遺伝子移入の訴求点は、局所的に生成されるサイトカインが免疫学的により効率的であり、全身的な毒性を生じないことである。このサイトカイン (1 種もしくは複数) の高い局所濃度で示される、新生物細胞上に発現する腫瘍抗原は、外来性サイトカインの投与では再現することができない免疫学的微小環境を創出する。サイトカイン生成性腫瘍細胞によって創出されるこの免疫学的微小環境は細胞毒性 T リンパ球の生成に有効である。幾つかの異なる動物モデルにおいて、サイトカイン生成性腫瘍細胞は腫瘍原性の低下及び免疫学的に重要な分子の発現の増加に有効であることが示されている (117、119)。初期抗腫瘍拒絶には非特異的炎症応答が付随するように思われる。しかしながら、サイトカイン分泌腫瘍細胞の拒絶は、ほとんどの場合、T 細胞依存性の全身性腫瘍特異的免疫の生成につながった。

40

50

【0186】

予め存在する腫瘍免疫原性に対する要求はほとんどの遺伝子移入モデルで確立されていない；しかしながら、多くの十分に特徴付けられている腫瘍細胞系は高度に分化し、且つ免疫原性である。幾つかの系において、非免疫原性腫瘍がサイトカイン遺伝子移入の後に免疫を生成することが示されている。さらに、腫瘍指向遺伝子移入モデルの大部分は、これらの悪性物の急速な成長が免疫治療が介入する時間をほとんど与えないため、それ自体では既存腫瘍負荷の存在下において宿主を治療する研究の役に立たない(119)。

【0187】

近年の研究は、腫瘍細胞によるTGFの分泌の低下が癌遺伝子治療の重要なアプローチであり得ることを示している(120、121)。一組の実験において、Fakhraiaらは、ラットグリアサルコーマ(gliosarcoma)細胞系におけるそのサイトカインの発現の阻害にTGFのアンチセンスを用いた。このアンチセンス改変腫瘍細胞での腫瘍担持ラットの免疫は、対照ベクターで改変した腫瘍細胞での動物の免疫と比較して動物の高い生存を生じた。異なるアプローチを用いて、Isakらは、骨格筋にcDNAコーディングデコリンを形質移入することにより、ラットにおける繊維性疾患の量を低下させることが可能であった。デコリンはTGFの発現を阻害する小プロテオグリカンである。したがって、TGFbの発現を阻害する2つの異なるアプローチが癌又は前癌の2種類の異なるモデルにおける効力を示している。

【0188】

加えて、B7によるT細胞の同時刺激がT細胞の活性化に対する正及び負の両者の効果を有することが新たな証拠により示されている(122)。T細胞の他の同時刺激性分子、例えば、ICAM-I、LFA-3及びVCAM-Iも適切な抗腫瘍応答の誘発に関連付けられている(123)。当業者の間での一般的な総意は、これらの同時刺激性信号のうち最も重要なものがT細胞上のCD28とその一次リガンドB7-1(CD80)及び抗原提示細胞表面上のB7-2(CD86)との相互作用によってもたらされるものであるというものである(124)。様々なモデル系において、B7cDNAが形質移入された腫瘍細胞が、改変及び非改変腫瘍細胞の両者に対する強力な抗腫瘍応答を誘発した。同様にT細胞上に発現する分子であるCTLA-4は、CD28よりも非常に高い親和性でB7-1及びB7-2を結合する。幾つかの研究の結果は、CTLA-4がT細胞応答性の負の調節因子として作用し、CTLA-4-B7相互作用によってもたらされる阻害の遮断が腫瘍細胞に対するT細胞応答を増強し、且つ抗腫瘍活性を高める可能性を生じることを示す。Leachらは、CTLA-4に抗体を注入した結果、マウスモデルにおける予め確立された腫瘍を含む腫瘍の拒絶が生じることを示した(124)。これは、遺伝子移入実験の設計においては、所望の効果が他の潜在的な有害効果によって覆い隠されないように注意を払わなければならないことを示す。

【0189】

癌の遺伝的基礎には癌遺伝子及び/又は腫瘍抑制遺伝子における異常が含まれる。両方の型が癌遺伝子治療の標的になっている。腫瘍抑制遺伝子の癌関連欠陥が通常突然変異又は欠失であるため、これまで開発されている腫瘍抑制遺伝子治療における方策は遺伝子置換治療であり、この治療では野生型腫瘍抑制遺伝子を癌細胞に移入して欠陥遺伝子の正常な機能を回復させ、又は殺腫瘍性効果を誘発する(124)。クローン化されて特徴付けられているヒト腫瘍抑制遺伝子には、小児癌に關与するRb、ウィルムス(Wilms)腫瘍(WT1)、及び神経線維腫症(NF1)；結腸直腸癌に寄与する腺腫ポリープ症coli(APC)及び結腸癌における欠失(DCC)；広範囲のヒト癌において変異形態で見出されるp53が含まれる(再検討のためには、参考文献125を参照)。近年、新たな腫瘍抑制因子又は癌感受性遺伝子の同定の領域において2つの大きな事件が発生した。第1に、p16(主要腫瘍抑制因子1、MTS1)及びp15(MTS2)と呼ばれるサイクリン依存性キナーゼ(cdk)阻害因子集団の2つの高度に関連するメンバーが、染色体領域9p21から単離された(126-128)。第2に、乳癌及び卵巣癌感受性遺伝子BRCA1の強力な候補が単離された(129)。p16は広範囲の癌細胞系にお

10

20

30

40

50

いて欠失もしくは変異を受けていることが示されたが、p 1 5 は T G F - 誘発細胞サイクル停止の強力なエフェクターであることが示された (1 3 0)。これら全ての腫瘍抑制遺伝子の中で、これまでに癌の遺伝子治療に用いられているものは p 5 3 遺伝子である (1 3 1)。

【 0 1 9 0 】

癌の遺伝子治療に対する我々の現在の努力は、腫瘍抑制遺伝子及び癌の免疫調節遺伝子治療を他の分子、例えば、腫瘍抗原、M H C 分子、細胞接着分子及び他の免疫調節因子の導入と組み合わせることである。以下は、抗癌超 A d ベクターの 2 つの設計の一般的な説明である。

【 0 1 9 1 】

2 1 . 1 第 1 パージョンの抗癌超 A d ベクターの構築

免疫分子の幾つかの組み合わせを抗癌超 A d ベクターの構築に用いることができる。このミニ A d ベクターは、腫瘍の成長を抑制し、又は宿主の抗癌免疫応答を誘発するように作用する複数の遺伝子を担持することができる。この型のベクターは抗癌超 A d ベクターと呼ばれる。この超 A d ベクターの第 1 パージョンは、ヒト p 5 3 c D N A、G F P マーカー遺伝子、ヒト I L 2 c D N A、ヒト G M - C S F c D N A、ヒト B 7 - 1 c D N A、ヒト I L 7 c D N A 並びにヒト I L 1 2 p 3 5 及び p 4 0 c D N A の 4 つの二重発現カセットを担持する。また、これは、左及び右 A d 5 I T R 及び A d 5 パッケージ化配列の最小配列 (合計 6 6 0 b p) 並びにヒト a - 胎児タンパク質遺伝子の約 1 8 k b ゲノム配列をも有し、3 0 k b を超えるサイズに到達する (図 6 2)。カセット 1 は C M V プロモーター、ヒト p 5 3 c D N A、E M C - I R E S、G F P 遺伝子及び S V 4 0 p A を含む。カセット 2 は E F プロモーター、ヒト G M - C S F c D N A、E M C - I R E S、ヒト I L 1 2 c D N A 及びウシ成長ホルモン p A を含む。カセット 3 は S V 4 0 プロモーター、ヒト B 7 - 1 c D N A、E M C - I R E S、ヒト I L 7 c D N A 及び S V 4 0 p A を含む。カセット 4 は t k プロモーター、ヒト I L 1 2 p 3 5 c D N A、E M C - I R E S、ヒト I L 1 2 p 4 0 c D N A 及びウシ成長ホルモン p A を含む (図 6 4)。

【 0 1 9 2 】

2 1 . 2 第 2 パージョンの抗癌超 A d ベクターの構築

抗癌超 A d ベクターの第 2 パージョンは第 1 パージョンに類似する構造を有し、5 ' 及び 3 ' 末端の両者にアデノウイルス逆末端反復を含み、且つ 4 つの別々の発現カセットを含む。調節分子及び遺伝子の幾つかの組み合わせを抗癌超 A d ベクターの構築において用いることができる。以下に説明される例は、腫瘍細胞の成長を調節するために構築することが可能なミニ A d ベクターの型をいかなる点においても限定するものではない。各々の発現カセットには 5 ' 末端に独自プロモーターが隣接する。加えて、各々の発現カセットは、“末端”遺伝子の独立の翻訳を完了させるための、脳心筋炎ウイルス内部リボソームエントリ部位配列で連結された 2 つの遺伝子を含む。このベクターのために示される遺伝子には、I L - 2、I L - 7、及び G M - C S F によって代表されるサイトカイン遺伝子；p 5 3 に代表される腫瘍抑制遺伝子；B 7 - 1 及び I C A M - 1 に代表される免疫細胞同時刺激性分子；並びに、しばしば癌に関連する免疫抑制を保存することが可能な分子、抗 - T G F 及び S C A 乃至 C T L A - 4 が含まれる。ベクターのサイズを増加させて子孫ウイルス内に効率的にパッケージ化させるため、ヒト - 胎児タンパク質の“スタファ- D N A”が含められている。スタファ- D N A は、いかなる長さの D N A フラグメントを含んでいてもよい。第 2 パージョンの抗癌超 A d ベクターの一般構造が図 6 3 に示されている。

【 0 1 9 3 】

< 実施例 2 2 > 系を改善するための他の設計

1 . 標的設定能力を有するミニ A d ベクター。遺伝子発現の標的を特定の細胞型又は組織に設定するのに、複数の機構を用いることができる。そのような機構の 1 つは、細胞型、細胞型サブセット又は特定の組織の転写ターゲティングに関与する。転写ターゲティン

10

20

30

40

50

グは特定の型の細胞又は組織においてのみ遺伝子の発現を駆動する転写調節単位の使用を含む。このような転写調節単位は組織特異的と呼ばれる。ミニ a d ベクターは、レポーター又はエフェクター遺伝子の発現を駆動する組織特異的転写調節単位を含めるように設計される。このようにして、組織特異的転写調節単位の制御の下にあるレポーター又はエフェクター遺伝子の発現は、この転写調節単位が活性である特定の組織において高水準で検出される。遺伝子の発現を特定の細胞型又は組織に限定することが好ましいことがある。治療用遺伝子は、多量に発現する場合、しばしば毒性である。そのため、遺伝子の発現の特定の組織への調節は、特定の治療用遺伝子の高水準の遺伝子発現の悪影響から宿主を保護する役割を果たし得る。

【0194】

組織特異的な遺伝子発現を導くさらなる方法は、関心のある細胞型上のリガンドに対して反応性の細胞表面タンパク質をコードするヘルパーウイルスを用いることである。例えば、ヘルパーウイルスを、細胞表面受容体に対するリガンドを発現するように加工することができる。本発明の組換えパッケージ化適格 DNA 構築体のパッケージ化により、細胞表面上の受容体に結合する組換えアデノウイルス粒子が生成する。さらなる例は、そのウイルス外被の表面上に抗体又は抗体断片を発現する組換えアデノウイルスを含む。このような組換えウイルスは、パッケージ化不全ヘルパーウイルスを、そのウイルス外被上に抗体又は抗体断片を融合タンパク質又は別々のタンパク質として発現するように加工することにより生成することができる。少なくとも1つのアデノウイルスパッケージ化配列及び少なくとも1つのレポーター又はエフェクター遺伝子をコードする DNA 分子を形質移入した細胞の感染により、標的細胞上の細胞表面分子に対して反応性の抗体又は抗体断片を有する組換えアデノウイルス粒子が生成する。このようにして、組換えアデノウイルス粒子は、その抗体又は抗体断片に対して反応性の細胞表面分子を発現する宿主中の細胞に特異的に結合する。

【0195】

2. 局所免疫抑制機能を有するミニ A d ベクター。特定の自己免疫疾患は不適切な免疫反応から生じる。この自己免疫反応を妨げ、停止させ、又は遅らせるのに用いることができる方法の1つはそのような反応の部位に免疫調節タンパク質を導くことである。これは、本願で示されるように、ミニ A d ゲノムから構築されるアデノウイルス粒子を適用することにより達成することができる。特定のサイトカイン又はケモカインをコードする遺伝子を発現させることが可能であり、そのような発現は免疫応答の弱力化を生じ得る。この免疫応答における弱力化は自己免疫反応の症状の緩和につながる。さらなる例には、アレルギー反応の弱力化が含まれ得る。アレルギー反応を引き起こすことが知られる抗原をミニ A d ベクターでコードすることができる。組換えアデノウイルス粒子によって細胞に送達されたこのミニ A d ベクターで駆動される、低濃度もしくは極端に高濃度の抗原のいずれかの発現により寛容が生じ得る。さらに、この抗原の発現を、この抗原の発現が寛容を誘発し得る組織に向けることができる。このような組織には発生中の胸腺が含まれ得る。脱感作の後、組換えアデノウイルス粒子が送達された宿主はその抗原との相互作用でアレルギー反応を示すことがない。このようにして、加工されたミニ A d DNA 分子を担持する組換えアデノウイルス粒子を投与することにより、免疫抑制の一形態が達成される。

【0196】

3. 他の要素とハイブリダイズするミニ A d ベクター。本願において説明されるミニ A d ベクターを宿主内でのウイルス感染及び複製の予防又は排除に用いることも可能である。ミニ A d ベクターは、ウイルスの特定の遺伝的プロセスが妨害もしくは排除され得るように設計することができる。ミニ A d ベクターは、感染の転写又は翻訳段階でウイルスの複製を妨害するアンチセンス核酸を発現するように設計することができる。妨害は、伝令 RNA に結合し、又はウイルスゲノムへの組み込みの後に DNA に結合して転写を妨げるものを含むアンチセンス RNA 又は DNA の発現により促進することができる。さらに、特定のウイルス転写体を破壊の標的に設定するリボザイムを設計することができる。ミニ A d ベクターによって“おとり”分子をコードすることもできる。このようなおとりは、

10

20

30

40

50

ウイルスの転写に必要とされる転写因子に、ウイルス遺伝子の発現及び複製に必要とされる遺伝子への結合及びその転写の駆動にその転写因子がもはや利用可能ではなくなるように結合することにより作用し得る。

【0197】

4. ワクチン接種に用いることができるミニAdベクター。発現が生じる生物において免疫を生成するように働く特定の抗原又は免疫源の発現を駆動するようにミニAdベクターを加工することができる。免疫反応を誘発し、それにより免疫を生じる細菌又はウイルス遺伝子の発現を駆動するミニAdベクターを設計することができる。例えば、HIVのようなレトロウイルスに由来する外被タンパク質をミニAdベクターでコードすることができる。このミニAdベクターを含む組換えアデノウイルス粒子で宿主の細胞を感染させることにより、HIVウイルスに対する免疫を確実なものとすることができる。また、癌特異的抗原の発現を駆動するようにミニAdベクターを設計することもできる。癌抗原の発現を導くミニAdベクターを含む組換えアデノウイルス粒子で宿主の細胞を感染させることにより、その型の癌に対する免疫が生じる。最適には、このような免疫は、その原発腫瘍はもちろんのこと、治療した生物全体にわたって存在する他の転移及び微小転移をも広範囲にわたって根絶する。加えて、寄生虫から誘導される抗原性分子をコードするミニAdベクターを設計することができる。このミニAdベクターを含む組換えアデノウイルスベクターの投与に続いて、この寄生虫による感染に対する免疫が生じる。

【0198】

本発明の好ましい形態が図面に示され、かつ記述されているが、この好ましい形態の変形が当該技術分野における熟練者に明らかであるため、本発明は図示され、かつ記述される特定の形態に限定されるものと解釈されるべきではなく、その代わりに請求の範囲に記載される通りのものである。

【図面の簡単な説明】

【0199】

【図1】ミニAdベクター系の原理。ミニAdベクター系の3つの主要成分：ヘルパーAd、ミニAdベクター、及びAdヘルパーが示される。ヘルパー細胞によって供給されるE1はヘルパーAdがそれ自体で複製し、ウイルスキャプシドを形成する後期ウイルスタンパク質を合成することを可能にする。このキャプシド内へのヘルパーAdゲノムのパッケージ化は、本発明のヘルパーAdのパッケージ化シグナルが弱力化されているため非能率的である。ミニAdベクターゲノムの存在下において、ヘルパーAdはそのミニAdベクターゲノムの複製を支持し、これはその野生型パッケージ化シグナルがヘルパーウイルスパッケージ化タンパク質に対して高い親和性を有するため優先的にパッケージ化される(31)。ミニAdベクターのさらなる精製は、生化学的又は物理的方法、例えば超遠心を用いて達成することができる。

【図2】現在のAdベクターの本発明との比較。このミニAdベクター系と比較した、現在のAdベクターの一般的な設計及び補完機構が図示される。

【図3】ヘルパーウイルス及びミニAdベクターの原型。A. アデノウイルスの左ITRを参照したパッケージ化シグナルの配置。B. 野生型アデノウイルス5のパッケージ化シグナル配列領域の配列が示される。角括弧は弱力化ヘルパーウイルスパッケージ化シグナルを含めるために欠失された領域を示す。C. Bに示される配列の反復領域は共通反復と共に記載されている。

【図4】パッケージ化弱力化ヘルパーAdH₁を生成するためのシャトルベクターの構築。GT5000を構築するため、突然変異パッケージ化シグナル配列mt₁をPCRにより増幅し、シャトルベクター内で28.9muまで延びるAd5配列で置換した(GT4004)。pTk₁に由来する-gal発現カセットをGT5000のE1欠失物にクローン化し、シャトルベクターGT5001を得た。

【図5】AdH₁の生成。シャトルベクターGT5001(図8を参照)をpJM17と共に293細胞に同時形質移入した。これらのプラスミドの間の相同7Kb領域(Ad5の9.24乃至28.9)での組換えにより、GT5001から誘導される左アームを有

10

20

30

40

50

するパッケージ化可能なウイルスが生じる。最下部に示される AdH の左領域の数字は Ad5 nt 配列に相当し、パッケージ化シグナルに加えて -gal 発現カセットが挿入されている E1 における二重欠失の伸長を示す。同時形質移入の 2 週間後、幾つかの青色ブランクを単離し、パッケージ化シグナル中の突然変異をオリゴ 7 及び 8 を用いて PCR により分析した。増幅した断片のサイズ、野生型パッケージ化シグナル (wt) については 310 bp、突然変異パッケージ化シグナル (mt) については 177 bp は、示されるように、2% アガロースゲルにおいて区別することが可能である。1 kb ラダー、ギブコ (Gibco) BRL (ゲサースバーグ、MD) 製の 1 kb DNA ラダーマーカー; wt 及び mt、vDNA がそれぞれ E1 欠失ベクター Ad-CMV gal 及び dl110/28 ウイルスから抽出された PCR 対照; 青色ブランク、X-gal で青色に染色されたブランクからの vDNA; 白色ブランク、X-gal で青色に染色されなかったブランクからの vDNA (図 6 を参照)。

10

【図 6】X-gal での染色による AdH ブランク対他のものの同定。[これらのブランクのパッケージ化シグナルの PCR 増幅が図 5 に示される。]

【図 7】AdH の増幅及び特徴付け。293 細胞中に存在する内在性左 Ad5 配列を用いる組換えが複製適格アデノウイルス (RCA、E1+) 又は wt を有する E1 アデノウイルスを生じ得る可能性があるため、AdH のパッケージ化シグナルを各継代後に増幅した。CsCl 精製以前には継代中に wt は検出されなかった (4 乃至 8)。継代 9 では、AdH を精製したときに、ウイルス DNA 含量を勾配の 5 つのバンドの全てについて別々に分析した。1% アガロースゲル (最下部左) においては上方の 3 つのバンドにおいて vDNA はほとんど観察されず、これは、これらが大部分空のキャプシドによって形成されることを示す。下方のバンド (4 及び 5) は充満キャプシドによって形成される。PCR により、全てのバンドにおいて期待される突然変異パッケージ化シグナルが検出される (最下部右)。1 kb ラダーマーカー (図 9 と同様) は各々のゲルの左レーンである。vDNA を含むゲルは l/HindIII マーカーも含む。

20

【図 8】ミニウイルスプラスミドの構築。これらのプラスミドは、AdH で補完された場合のパッケージ化に対するアデノウイルスゲノムの様々な欠失の効果を決定するために構築する。全ての構築体は、CMV プロモーターによって -アクチンエンハンサー (濃い矢印) で駆動される緑色蛍光タンパク質 cDNA (GFP、縦線付きのボックス) を含む。M7.9 (最下部右) はネオマイシン cDNA 及び内部リボソームエントリ部位 (IRES) をも有する。上部の 6 つは M32 から誘導され、これは Ad5 ゲノムの中間に 10 kb の欠失がある pJM17 誘導体である。最下部の 2 つは pBluescript-KS (ストラタジェン (Stratagene)、CA) から Ad5 の複製及びパッケージ化のための最小シス要素を含めて誘導される。数字は Ad5 マップ単位に対応し、欠失及び挿入部位を示す。0/100 及び 100/0 は Ad5 DNA の逆末端反復 (ITR)、Ad5 DNA の天然の融合を示す、濃いレーン; プラスミド主鎖 DNA、薄いレーン。

30

【図 9】パッケージ化のために構築されたミニアデノウイルス (ミニ Ad) ベクターの模式的図示。最上部は、初期 (E) 及び後期 (L) 転写領域を伴う Ad5 転写マップ及びマップ単位 (mu)。MLP/TL: 主要後期プロモーター及び三部構成ラダー。逆末端反復 (ITR) 及びパッケージ化シグナル () は全てのミニ Ad ベクターにおける独自の共通配列である。ベクターは、複製の後にキャプシド内で見出される通りに、直鎖形態で示される。ベクターの生成に用いられる環状プラスミドは、同じ配列を有するが IRT により頭部が尾部に融合している。それぞれのミニ Ad ベクターの名称は kb でのそのサイズを引き合いにする。M32 乃至 M20 は pHM17 から中央アデノウイルスゲノムの漸進的欠失により誘導される。これらのベクターにおいては、プラスミド主鎖 (pBRX、図示せず) は 3.7 mu に位置する。M6.5 乃至 vGNE5E3 は、pBluescript 主鎖 (図示せず; GFP 発現カセットの前に位置する) において、ネオマイシン cDNA 及び chr. 4 q11-22 に由来するヒトゲノム断片を挿入することにより構築される。

40

50

【図10】補完の2つの方法。ミニウイルスベクターを生成するのに、類似の収量が得られる2つの別々の補完プロトコルを用いた。第1の方法においては、ミニAdプラスミドをAdHに由来するウイルスDNAと共に同時形質移入し、それらの細胞をCPEが観察されるまで培養する。第2の方法においては、ミニAdプラスミドをpBHG10と共に同時形質移入した3日後にAdHをウイルスとして加え、細胞をCPEが観察されるまで培養する。

【図11】ミニウイルスプラスミドでの293細胞の同時形質移入。CaPO₄ 改変プロトコルを用いることによりほとんど全ての細胞に形質移入した。M32プラスミドの形質移入は形質移入の1日後に示される。右、明視野；左、同じ視野の蛍光顕微鏡写真。

【図12】ミニウイルス含有プラーク。ミニウイルス(ここではM32)の存在がプラークの蛍光によって示される。右、明視野；左、同じ視野の蛍光顕微鏡写真。

【図13】異なるサイズのミニウイルスベクターのパッケージ化効率。異なるサイズのミニAdベクターのパッキング効率及び増幅。同時形質移入の後に生成されるウイルスを継代0と命名する。その粗製溶解物を用いて293細胞を感染させ、継代1を生成した。1mlの粗製溶解物継代1を用いて106個の293細胞を感染させ、24時間後に蛍光を発する細胞の数を数えた(形質導入単位/ml、黒柱)。24時間後にCPEが出現し、凍結/解凍によりウイルスを抽出した(粗製溶解物継代2)。再度、1mlの粗製溶解物継代2を用いて106個の293細胞を感染させ、24時間後に蛍光を発する細胞の数を数えた(斜線付きの柱)。継代1と2との相違は5Xの増幅収量を示し、異なるミニAdベクター間の相違はパッケージ化におけるサイズの効果を示す。

【図14】M32の精製スキーム。数回継代することによりM32を増幅させた後、粗製抽出物をCsCl分離した。第1勾配の結果4つのバンドが生じた：3つは上方で1つが下方。これらを別々に集めて透析し、図12に示されるように293細胞の感染に用いた。上方及び下方バンドの第2分離勾配から画分を集め、図16に示されるように293細胞の感染に用いた。

【図15】M32ミニAdウイルスの精製(1)。第1CsCl勾配。M32及びAdHをより高密度のバンドにおいて同時精製する(第4番以下)。蛍光のチェックに用いたものと同じウェルを後に固定及びX-galでの染色に用いる。

【図16】M32ミニAdウイルスの精製(2)：第2CsCl勾配を用いる第1CsCl勾配からの下方バンドの分画。各画分の一定分量0.5µlを、60%集密の293細胞を収容する96ウェル/プレートのウェルの1つを感染するのに用いた。最初の画分(1乃至6)はM32又はAdHを含んでいなかった(これらの画分は勾配の3mlまでを表す)。画分7乃至16の100µlの試料は多量のM32及びAdHを明らかにする(パネルAにおいて蛍光の下で示されるものと同じ画分のX-gal染色についてはパネルBを参照)。続く画分(17乃至29)はそれ以前の画分に類似する濃度のM32を示すが、AdHの濃度は約10倍低い。したがって、画分17-29は、AdHに対して約10倍のM32の濃縮を表す。

【図17】GAL4結合部位を用いるAd5パッケージ化シグナルの改変。XhoI及びXbaI部位の間のヌクレオチド配列が示される(設計#1及び設計#2)。設計#1においては、A反復Iの前に2つのGAL4結合部位が存在し、A反復IIとVIとの間に1つのGAL4結合部位が存在する。設計#2においては、A反復Iの前に2つのGAL4結合部位が存在し、別の2つのGAL4結合部位がA反復VIIの後に存在する。下線が付された配列は17量体GAL4結合部位である。イタリック体の配列はA反復である。各GAL4結合部位の中心とA反復との間の距離が示される。

【図18】tetO配列を用いるAd5パッケージ化シグナルの改変。XhoI及びXbaI部位の間のヌクレオチド配列が示される(設計#1及び設計#2)。設計#1においては、A反復Iの前に2つのtetO配列が存在し、A反復IIとVIとの間に1つのtetO配列が存在する。設計#2においては、A反復Iの前に2つのtetO配列が存在し、A反復VIIの後にさらなるtetO配列が存在する。下線が付された配列は19量体tetO配列である。イタリック体の配列はA反復である。各tetO結合部位の中心

10

20

30

40

50

とA反復との間の距離が示される。

【図19】Ad Pac - GAL4 変更のための合成オリゴの位置及び配列。Gal # 1乃至Gal # 8は、設計# 1及び# 2におけるXho I及びXba I部位の間の配列に隣接する合成オリゴである。各オリゴの位置及び方向が矢印で示される。Gal # 1乃至Gal # 8の配列が記載される。

【図20】ad Pac - terO 変更のための合成オリゴの位置及び配列。tet # 1乃至tet # 10は、設計# 1及び# 2におけるXho I及びXba I部位の間の配列を覆う合成オリゴである。各オリゴの位置及び方向が矢印で示される。tet # 1乃至tet # 10の配列が記載される。

【図21】CMV - E1 哺乳動物発現ベクターの構築。E1A及びE1Bをコードするアデノウイルス5配列462 - 3537 (Afl III - Afl III断片)をpCDNA3のEcoRV部位に平滑末端クローン化した。 10

【図22】E1 補完性細胞系A549E1 - 68におけるGFP発現及びブランク形成。E1欠失アデノウイルスAd5CA - GFPを感染させた後。このブランクの中心の透明領域はE1補完ウイルスの増幅によって生じるCPEの証拠である。

【図23】G418r A549E1クローンのサザンブロット分析。ゲノムDNAをHind IIIで消化し、750bpのE1プローブ (Pst I断片)で探索した。レーン1: 1kb DNAラダー;レーン2: A549;レーン3: 293;レーン4: A549E1 - 68;レーン5: サブクローンA549E1 - 68.3。

【図24】新規細胞系の形態学的分析。親A549細胞 (上部パネル) 及びE1 補完性細胞系A549E1 - 68 (下部パネル) の形態学的比較。 20

【図25】形質転換細胞系におけるE1タンパク質の発現の分析。A. A549細胞 (レーン1)、293細胞 (レーン2) 及びA549E1 - 68 (レーン3) におけるE1Aタンパク質の発現の、E1A特異的モノクローナル抗体 (M73、オンコジーン・サイエンス (Oncogene Science)) を用いるウェスタンブロット分析。B. E1B p55特異的モノクローナル抗体 (オンコジーン・サイエンス) を用いる、A549細胞 (レーン1)、293細胞 (レーン2) 及びA549E1 - 68 (レーン3) におけるE1Bタンパク質の代謝性³⁵S標識及び免疫沈殿。

【図26】pAlb12.5CATプラスミドの模式図。このプラスミドは、pBRCA Tプラスミドベクター中に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (CAT) の上流に作動可能に連結するpAlb12.5CAT 12.5kbヒトアルブミンプロモーター (EcoRI乃至Hind III) を含む。近位プロモーター及びエンハンサー領域 (E1.7及びE6) が示される。 30

【図27】pBlueScript KS+ベクターへの12.5kbヒトアルブミンプロモーターのクローン化。EcoRI乃至Ava Iの10.5kb断片及び2.0kbのAva I乃至Hind IIIアルブミンプロモーター断片をpAlb12.5CATから別々に単離し、pBlueScript - KS+ベクターのEcoRI/Hind III部位に同時にライゲートしてGT4031を生成した。

【図28】GT4031へのhFVIIII発現カセットのクローン化。7.5kbヒトFVIIIIカセットをプラスミドGT2051からXho I及びSal Iを用いて切り出してGT4031のSal I部位にライゲートし、hFVIIII cDNAに作動可能に連結するヒトアルブミンプロモーターを含むGT2053を得た。 40

【図29】アルブミンプロモーター - FVIIIIミニウイルスプラスミドの構築。GT2033に由来するアデノウイルス5' ITR及びパッケージ化シグナルを含む断片をXho Iを用いて切り出し、GT2053のSal I部位にクローン化した。順方向又は逆方向 (それぞれGT2061及びGT2059) のいずれかのITRを有するプラスミドを得た。GT2061中のインサートは、FVIIII遺伝子に近接する独自Sal I部位と共に配向される。GT2059はGT2061とは反対の方向のAd ITRを含む。

【図30】GT2053、GT2059及びGT2061の制限消化プロファイル。消化により、Sal Iとの組み合わせでBamHI、XbaI、ClaI及びXho Iに期待 50

される結合パターンが示される。

【図31】染色体4上のアルブミン/ α -胎児タンパク質遺伝子領域の図。この図は相同組換えのための3'組換えアームとしての機能を果たす3つの領域：1) A1b-E5、アルブミン遺伝子の3'領域；2) AFP-3、 α -胎児タンパク質遺伝子の中央領域；及び3) α -胎児タンパク質のさらに3'、に位置するEBB14を示す。

【図32】クローン化スキーム。異なる3耐薬性組換えアームを含む3つのベクター（A、B、及びC）の、それらのアームを（パネルA、B、及びCの上に示される）GT2061にクローン化した後の制限酵素マップ。

【図33】クローン化スキーム。クローンpA1b-E5のヒトアルブミン遺伝子の3室U.8Kb XhoI断片がGT2061のSalI部位にクローン化されているGT2063の詳細なクローン化スキーム。このベクターをベースとするミニウイルスはFVIIII遺伝子の潜在的なイン・ビトロ治療手段である。 10

【図34】制限酵素マッピング。図9に示される3'相同アルブミン相同組換えアームを有するアルブミンプロモーター駆動hFVIIIIを含むプラスミドの生成に用いられたベクターの制限酵素消化を示すアガロースゲル。示される構築体の各々についてEcoRI及びClaI消化が示されている。

【図35】ミニAdFVIIIIウイルスを生成するためのスキーム。hFVIIIIミニウイルスを生成するための2つのスキーム（A及びB）が示される。スキームA：第1日に、ヘルパーウイルスゲノムDNA及びプラスミドGT2063をリン酸カルシウム沈殿により293細胞（ATCC#CRL1573）に同時形質移入した。形質移入はリン酸カルシウム沈殿によるものであった。第6日に、細胞変性効果（CPE）を観察し、細胞溶解物を調製した。その後、継代4まで毎回、感染に続く3日間溶解物を回収し、その時点でウイルス調製物は5倍に増幅していた。培地は感染後毎日代えた。スキームB：プラスミドpBHG10をプラスミドGT2063と共にリポフェクタミン（Lipofectamine）（ギブコ）を用いて293細胞に同時形質移入した。72時間後に、5pfu/細胞の多重度でヘルパーAdを感染させた。5日後、CPEを観察し、細胞溶解物を調製した。その後、等しい接種容積を用いて継代3まで感染させ、その時点でウイルスは5倍に増幅し得る。培地は感染後毎日代えた。 20

【図36】FVIIIIを含むミニAdベクターの生成。ミニAdFVIIIIベクターを、ミニAdプラスミドGT2063を293細胞に形質移入し、ヘルパーAdHを感染させることにより生成した。細胞変性効果（CPE）が完了したとき、それらの細胞及び上清を集めた（継代0）。増殖させるため、数回の凍結/解凍サイクルによりウイルスを細胞から抽出し、新鮮な293細胞の感染に用いた。各々の継代時に、SDS、EDTA、及びプロテイナーゼKを含む溶液中でのインキュベーション及び続くエタノール沈殿によるウイルスDNAの抽出に740 μ lの上清を用いた。ピリオン溶解工程に先立って、上清をDNA分解酵素I消化に処し、GT2063プラスミドDNAからの汚染を回避した。1/20の精製ウイルスDNA（vDNA）を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるパッケージ化シグナル配列の増幅における基質として用いた。FVIIIIミニAd及びヘルパー増幅領域の予想されるサイズは、それぞれ、177及び310bpであった。DNAサイズマーカー：ギブコ（ゲーズバーク、MD）製の1Kbラダー。さらなるGT2063プラスミドを含み、又は含まない、非形質移入239細胞からの上清を、それぞれ、陰性対照及びDNA分解酵素I処理の対照として用いた。 30 40

【図37】ミニAdFVIIIIベクターの継代0乃至21に由来するvDNAのサザンブロット分析。vDNAは図14と同様に精製した。1/2の精製vDNA（370 μ lの上清に相当）をPstIで消化し、1%アガロースゲルで分離してナイロンメンブランにブロットした。ミニAd及びヘルパーの両者に存在する右（3秩jITRに隣接する配列に対応するプローブをvDNAの検出に用いた。検出される断片の予想サイズ：ミニAdFVIIII=3.3Kb；AdH=2.2Kb。4つの独立のブロットが示される（A、B、C及びD）。マーカー断片への特異的ハイブリダイゼーションを標準化のために用いた。 40

【図38】連続継代の全期間にわたる、ミニAdFV I I I及びヘルパーにおける動的変動。このプロットは、図15に示されるバンドの濃度測定による定量化によって得た。ヘルパーは方形を伴う明線によって示される；ミニAdFV I I Iは菱形を伴う暗線によって示される。1単位はY軸上で検出される最低量と定義される（継代18でのヘルパーvDNAの量に相当）。他の値はこの単位に標準化される。

【図39】CsCl勾配遠心によるミニAdFV I I I及びAdH の分離。第1勾配からの最下部バンドはビリオンを含んでおり、これらを第2勾配に適用することによりさらに分離した。ミニAd(31kb)とヘルパー(37.1kb)とのサイズが異なることにより分離が可能となり、その結果、サザンプロットによる測定で、10:1 ミニAd/ヘルパーウイルス比を有する上部画分及び1:10 ミニAd/ヘルパーウイルス比を有する下部画分が生じた。 10

【図40】ミニAdベクターが形質導入された細胞におけるFV I I Iの発現。293細胞をチャンバスライドにおいて成長させ、図18Cに示されるように上部又は下部画分の希釈した(1/100)一定分量1µlで感染させた。感染の24時間後、これらの細胞を固定し、FV I I I特異的mAb(シーダーレーン Sheep Cedar Lane S)抗ヒトFV I I I C、#CL20035A、アキュレート・ケミカル・アンド・サイエンティフィック・コーポレーション(Accurate Chemical and Scientific Corporation)、ウエストバリー、NY)、続いて二次抗体(ビオチン化ロバ抗ヒツジ Ig G、ジャクソン・イムノリサーチ(Jackson Immunoresearch)、#713-065-147)及びDAB(赤みを帯びた茶色を生じる；シグマ(SIGMA)カタログ番号D7679)で染色した。A. 模倣非感染対照293細胞。B及びC. 図18Cに示されるような上部画分の2つの独立の調製品での形質導入(ミニAdFV I I I濃縮)。B及びCの両者において、10%の細胞がFV I I Iの発現について陽性に染色された(矢印)。C. 図18C(ヘルパーウイルス濃縮)に示されるような下部画分での形質導入の結果、0.1%の細胞がFV I I Iの発現について陽性に染色された。 20

【図41】ミニAdFV I I Iベクターが形質導入された細胞における機能的FV I I I発現。機能的FV I I Iのコアテスト(Coatest)色素生成検定。上の表はOD読み取り値を示す。試料からの読み取り値を外挿するための等式を得るため、4000ng/ml乃至62.5ng/ml(列A乃至G)から3回(レーン1、2、及び3)作成した標準曲線もプロットする。レーン4、5及び6は試料から3回得たものである。A: 293細胞中の一定分量10µlのミニAdFV I I I；B: 293細胞中の1µlのミニAdFV I I I；C: HepG2細胞中の10µlのミニAdFV I I I；D: HepG2細胞中の1µlのミニAdFV I I I。E: 非形質導入293細胞からの馴化培地。F: 非形質導入HepG2細胞からの馴化培地。 30

【図42】クローンGT2074のマップ。このプラスミドは、プラスミドGT4020からSalI消化によって切り出され、GT2073の独自SalI部位にクローン化された、[B-ドメイン欠失ヒトFV I I I cDNAに作動可能に連結された伸長因子-1(EF-1；参考文献52)プロモーターを含む]発現カセットを含む。TATA及びCCAAATを含むpALB12.5におけるPmeI部位の下流の3'近位アルブミンプロモーター領域(32)が欠失していた。この発現カセットはB-ドメイン欠失ヒトFV I I I cDNAに連結する伸長因子Iプロモーターを含む。 40

【図43】pCMV-hFV I I Iのマップ。このプラスミドは、GT2073のSalI部位にクローン化されている完全長hFV I I Iコーディング領域に作動可能に連結するCMVプロモーターを含む。このサイトメガロウイルスプロモーターはpCMV(クローンテック、パロアルト、CA)から誘導した。

【図44】組み込み頻度及び特異性の試験に用いられるプラスミドの模式図。プラスミドGT9003及びGT9004は両側にAAV ITR配列が隣接するneo発現カセットを含む；GT9012及びGT9013はAAV ITR配列が隣接するGFP発現カセットを含む；GT9003及びGT9012は組み込みカセットの上流にRep78発 50

現カセットも含む。プラスミドGT9003を構築するため、AAVゲノムの193乃至2126のRep配列をプラスミドpSUB201からPCR(Pfu pol)により増幅し、pCRII(インビトロジェン(Invitrogen)、CA)にクローン化した。得られたプラスミド(GT9000)をNotI及びXhoIで消化し、SV40ポリA部位(Not-SalI)を含む断片をその部位にクローン化した。得られたプラスミド(GT9001)をXbaIで消化し、クレノウで平滑末端化した。全AAVゲノムを含むPvuII-PvuII断片をpSUB201から得、GT9001の平滑末端化XbaI部位にサブクローン化した。その後、このプラスミド(GT9002)をXbaIで開裂させた。これは、AAVコーディング配列を除去してAAV ITRを残す。次に、neo発現カセット(BamHI-BamHI)をXbaI及びBamHIアダプターを用いてGT9002にサブクローン化し、プラスミドGT9003を生成させた。EcoRIを用いてGT9003からRepコーディング配列を除去することによりプラスミドGT9004を生成した。GT9003及びGT9004のneo配列(XbaI-XbaI)をそれぞれGFP発現カセット(SpeI-NheI)で置換することによりプラスミドGT9012及びGT9013を生成した。

10

【図45】組み込み可能な第VII因子カセットを含むミニアデノウイルスベクターの設計。この構築体中に存在する複製及びパッケージ化に必要なミニAd要素はAd ITR及びパッケージ化シグナルである。第VII因子カセットは2つのAAV ITRの間に含まれる。Rep発現カセットはこの組み込み可能なセグメントの外側に位置する。Repの発現はリプレッサー-tet-KRABを安定に発現する細胞系のTetオペレーターで調節することができる。標的細胞において、Repの発現は、AAV ITRが隣接する配列の染色体19のAAVS1部位を標的とする組み込みをもたらすはずである。

20

【図46】293及びチャン(Chang)肝細胞におけるRepタンパク質の免疫沈殿。10cmペトリ皿において成長させた細胞に10mgのプラスミドGT9001、GT9003、及びGT9004を形質移入した(プラスミドの構築に関する詳細は図31を参照)。非形質移入細胞及びGT9004形質移入細胞を陰性対照として用いた。形質移入の2日後、細胞を溶解し、プロテインG-アガロースに結合させた抗-Repモノクローナル抗体(クローン226.7; ARP、ベルモント、MA02178)を用いてRepタンパク質を免疫沈殿させ、10%ポリアクリルアミドゲルに流して、免疫沈殿において用いたものと同じ抗体で免疫プロットした。タンパク質を化学発光(ELCキット、アマシャム(Amersham))により可視化した。Rep78及びRep52タンパク質の移動が示される。

30

【図47】プラスミドGT9003又はGT9004を形質移入した293クローンのサザンプロット。幾つかのneo耐性クローンに加えてneo耐性集団(プールで示される)からの15mgのゲノムDNAをEcoRIで消化して電気泳動し、ナイロンメンブラン(ハイボンド-N(Hybond-N)、アマシャム)にプロットして8KbのEcoRI-EcoRI断片にわたるAAVS1プローブにハイブリダイズさせた。正常なAAVS1遺伝子座が示される(パネルA)。幾つかのGT9003クローンはバンドのずれを示し、これはAAVS1遺伝子座のうちの1つの破壊に相当する。パネルBはneo配列に再度ハイブリダイズされた同じメンブランを示す。

40

【図48】プラスミドGT9012又はGT9013を形質移入した293クローンのサザンプロット。条件は図33に記述される通りである。A)AAVS1サザンプロット。プラスミドGT9012から誘導されたクローンの幾つかがAAVS1の再編成を示す。B)幾つかのプロットをGFP配列に再度ハイブリダイズさせた。

【図49】AAVS1 P1ゲノムクローンのサザンプロット分析。PCR[AAVS1 PCR(+)]によってAAVS1配列が検出された(P1クローン6576、P1クローン6577、P1クローン6578、及びP1クローン6579と呼ばれる)4つのP1ゲノムクローンからプラスミドDNA(1µg)を単離し、EcoRI(図23A)又はEcoRVと組み合わせたEcoRI(図23B)で消化し、1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブラン(ハイボンドN+、アマシャム)にプロットし、253

50

b pのAAVS1 PCR産物をプローブとして用いてハイブリダイズした。A及びBの両者において、レーン1はP1クローン6576を表し、レーン2はP1クローン6577を表し、レーン3はP1クローン6578を表し、且つレーン4はP1クローン6579を表す。

【図50】pAAVS1-Neoベクターの構築。AAVS1組み込み配列を含む8.2 kbのEcoRI断片をP1クローン6576から単離し、Neo発現ベクターpGKNeoのEcoRI部位にライゲートしてpAAVS1-Neoを作製した。

【図51】ヒトAAVS1組み込み配列を有するトランスジェニックマウスの生成。トランスジェニックマウスの生成に関する工程の列が図示される。ES細胞にAAVS1プラスミドクローンを形質移入して胚盤胞に微量注入した後、それらを仮母に移植した。約17日後、キメラマウスをC57BL/6と交雑育種し、子孫をAAVS1導入遺伝子の存在について試験した。陽性子孫の交雑育種を行い、導入遺伝子がホモ接合している系を生成した。次いで、これらのモデルをアデノ関連ウイルス組み込み系を含むように改変されたミニAdベクターのイン・ビボ送達を試験するのに用い、このベクターDNAの部位特異的組み込みの効率を評価した。

【図52】pAAVS1-Neoを形質移入した後のNeo^R ES細胞クローンのPCR分析。17のNeo^R ES細胞クローン(3.1-3.17)及び非形質移入親ES細胞から独立に単離されたゲノムDNAをAAVS1特異的プライマーU2493及びL2722を用いてPCRによりスクリーニングし、AAVS1配列を有するNeo^Rクローンを確認した。これらのPCR反応試料を以下のように1.5%アガロースゲルにのせた：レーン1-1 kb DNAサイズマーカー(ギブコ/BRL)；レーン2-pAAVS1-Neoプラスミド対照；レーン3-非形質移入ES細胞DNA；レーン4乃至20-17の個々のpAAVS1Neo形質移入Neo^R ES細胞クローン。

【図53】AAVS1 PCR(+) ES細胞クローンのサザンブロット分析。2つのAAVS1 PCR(+) ES細胞クローン(ES#4及びES3.16)及び親ES細胞に由来するゲノムDNAをEcoRVと組み合わせたEcoRIで消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、ハイボンドN+ナイロンメンブランにブロットし、8.2 kbのAAVS1プローブとハイブリダイズさせた。レーン1-AAVS1 ES#4；レーン2-AAVS1 ES#3.16；レーン3-親ES細胞。AAVS1配列全体をES細胞ゲノムに組み込んだ結果生じる、予想される断片は、5.2及び3.0 kbである。

【図54】AAVS1キメラマウス。AAVS1 ES#4細胞を用いる胚盤胞微量注入実験から得られた2匹の高パーセンテージトランスジェニック(キメラ)マウス。ES幹細胞を用いて生成した動物においては、キメラ現象の程度の高さは導入遺伝子の伝達の可能性の高さと相関する。

【図55】キメラマウスにおいてAAVS1導入遺伝子を検出するためのPCR分析。ゲノムDNAをAAVS1キメラの尾及び、独立に、非キメラ同腹子から単離し、AAVS1特異的プライマーU2492及びL2722を用いてPCRによりスクリーニングした。PCR反応物を以下のように1.5%アガロースゲルにのせた：レーン1-1 kg DNAサイズマーカー；レーン2-pAAVS1-Neoプラスミド対照C；レーン3-非形質移入親ES細胞DNA；レーン4-AAVS1 ES#4細胞DNA(4)；レーン5-非キメラ同腹子からの尾のDNA；レーン6-低パーセンテージキメラ(10%未満のアグーチコート色)からの尾のDNA；レーン7-高パーセンテージAAVS1キメラ(90%を上回るアグーチコート色)からの尾のDNA。予想PCR産物=253 bp。

【図56】hFVIIマウス寛容化ベクターの構築。7.2 kbの完全長hFVII遺伝子をNotIを用いてGT2051から切り出し、GT2057のNotI部位にクローン化してGT2058におけるmAFP-FVIIカセットを生成した。次に、このmAFP-hFVIIカセットをAatII及びSalI断片を用いてGT2058から切り出し、pGKNeoのAatII/XhoIにクローン化してmAFP-hFVII-pGKNeo(GT2062)を生成した。

【図57】mAFP-hFVII-pGKNeo ES細胞クローンのサザンブロット

分析。非形質移入親ES細胞及び4つのNeoR ESクローンに由来するゲノムDNAをXbaIで消化し(図29を参照)、電気泳動し、プロットし、完全長hFVIIINotI断片をプローブとして用いてハイブリダイズさせた。図に示されるように、mAFP-hFVIIICassetの挿入を示す予想断片サイズは7.8kbであった。

【図58】mAFP-EGFP-1ベクターの構築。AFPプロモーター/エンハンサー領域全体を含む7.5kbのEcoRI/SalI断片をpEGFP-1ベクター(クローンテック)のEcoRI/SalIにクローン化し、pAFP-EGFP-1を作製した。

【図59】免疫という結果をもたらすことなくhFVIIIIのイン・ビボ送達を試験するためにhFVIIIIに対して子宮内で寛容化されたトランスジェニックマウスの生成スキーム。トランスジェニックマウスの生成に関する工程の列が図示される。a-胎児タンパク質プロモーターに作動可能に連結するFVIIII cDNAを含むAFP-hFVIIII-Neoプラスミドが形質移入されたES細胞を胚盤胞に微量注入し、それを仮母に移植する。約17日後、キメラマウスをC57BL/6マウスと交雑育種し、子孫をAFP-hFVIIII導入遺伝子の存在について試験する。陽性子孫の交雑育種を行い、導入遺伝子がホモ接合している系を生成した。これらのモデルを、ヒトFVIIII発現カセットを含むように改変されたミニAdベクターのイン・ビボ送達の試験に用いる。

【図60】緑色蛍光タンパク質(GFP)に対して寛容化されたトランスジェニックマウスの生成において用いられるRIP-EGFPベクター。BSプラスミドに由来するRIP-pEGFPの制限酵素マップが示される。このプラスミド(4855bp)は、ラットインシュリンプロモーターに作動可能に連結する緑色蛍光タンパク質(GFP)コーディング領域を含む。このインシュリンプロモーターは、膵臓組織におけるGFPの発現の駆動のためにこの構築体において用いられた。

【図61】FVIIIIカセットを含むエピソームミニアデノウイルスベクターの構造。このミニAdベクターは、このウイルスベクターが標的細胞に侵入した後に、エピソーム維持機構及びFVIIII発現カセットを含む環状プラスミド構造が形成されるように設計される。このベクターの一般的な構造は以下の成分:(a)組換え発現カセット;(b)複製起点;(c)ヒトFVIIII cDNA;(d)リコンビナーゼ標的部; (e)アデノウイルスITR;及び(f)スタファー(Stuffer)DNA配列を有する。

【図62】第1バージョンの抗癌性超Ad(super-Ad)ベクターの一般的な構造。このウイルスベクターはAdヘルパーと癌抑制及び抗癌性免疫調節のための複数の遺伝子とを含む超-Adからなる。送達のために選択された遺伝子が図中に示される。

【図63】第2生成抗癌性超Adベクターの一般的な構造。このウイルスベクターはAdヘルパーと癌抑制及び抗癌性免疫調節のための複数の遺伝子とを含む超Ad-からなる。その一般的な構造はこれらのベクターの第1バージョンに類似する。

【図64】ミニAdベクター及びヘルパーAdベクターの変種。A.ミニAdベクターの考えられる要素。B.ヘルパーAdベクターの考えられる要素。

【0200】

10

20

30

【表 3】

配列表

(1) 一般情報	
(i) 代理人：バクスターヘルスケア社	
(i i) 発明の名称：F V I I I ミニ - A d ベクター	10
(i i i) 配列番号：6	
(i v) 連絡場所	
(A) 受信者：M c D o n n e l , B o e h n e n , H u l b e r t & B e r g h o f f	
(B) 通り：3 0 0 S , W a l k e r D r i v e	20
(C) 市：シカゴ	
(D) 州：イリノイ	
(E) 国：米国	
(F) 郵便番号：6 0 6 0 6	
(V) コンピューター判読形式	
(A) 媒体：フロッピーディスク	30
(B) コンピューター：I B M P C 互換性有	
(C) 作動システム：P C - D O S M S - D O S	
(D) ソフトウェア：A S C I I	
(V i) 現在のアプリケーションデータ	
(A) アプリケーション番号：無	40
(B) 提出日：	
(C) 分類	
(V i i) 従来 of アプリケーションデータ	
(A) アプリケーション番号：無	

(B) 提出日 :

(V i i i) 弁理士 / 代理人情報

(A) 名前 : M c D o n n e l , J o h n J

(B) 登録番号 : 2 6 9 4 9

(C) 参照 / 証明書番号 : 9 6 . 2 0 8 7

(i X) 遠距離通信

10

(A) 電話 3 1 2 - 9 1 3 - 0 0 2 1

(B) F A X 3 1 2 - 9 1 3 - - 2 1 2 8

(2) 配列番号 1 の情報

(i) 配列の特性 :

20

(A) 長さ : 2 3 ヌクレオチド

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : オリゴヌクレオチド

30

(i x) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す名称 / 記号 : F V I I I プライマー #

1

(B) 存在位置 : 1 - 2 3

40

(D) 他の情報

(x i) 配列

ACCAGTCAAA GGGAGAAAGA AGA 23

(3) 配列番号2の情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：23ヌクレオチド

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

10

(ii) 配列の種類：オリゴヌクレオチド

20

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す名称／記号：F V I I I プライマー #
2

(B) 存在位置：1 - 2 3

(D) 他の情報

30

(xi) 配列

CGATGGTTCC TCACAAGAAA TGT 23

40

(4) 配列番号3の情報

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：20ヌクレオチド

- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : オリゴヌクレオチド

10

(i x) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す名称 / 記号 : パッケージ化シグナルプライマー # 1

(B) 存在位置 : 1 - 2 0

(D) 他の情報

20

(x i) 配列

GGAACACATG TAAGCGACGG 20

(5) 配列番号 4 の情報

30

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 3 4 ヌクレオチド

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

40

(i i) 配列の種類 : オリゴヌクレオチド

(i x) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す名称／記号：パッケージ化プライマー
2

(B) 存在位置：1 - 3 4

(D) 他の情報

10

(x i) 配列

CCATCGATAA TAATAAAACG CCAACTTTGA CCCG 34

(7) 配列番号 5 の情報

20

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：2 3 ヌクレオチド

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

30

(i i) 配列の種類：オリゴヌクレオチド

(i x) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す名称／記号：PCRプライマー U 2 4
9 2

40

(B) 存在位置：1 - 2 3

(D) 他の情報

(x i) 配列

GCTGTCTGGT GCGTTTCACT GAT 23

(8) 配列番号 6 の情報

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 2 3 ヌクレオチド

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

10

(i i) 配列の種類 : オリゴヌクレオチド

(i x) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す名称 / 記号 : P C R プライマー L 2 7
2 2

(B) 存在位置 : 1 - 2 3

(D) 他の情報

20

30

(x i) 配列

TCACAAAGGG AGTTTTCCAC ACG 23

(9) 配列番号 7 の情報

(i) 配列の特性 :

40

- (A) 長さ：20ヌクレオチド
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：オリゴヌクレオチド

10

(ix) 配列の特徴：

- (A) 特徴を表す名称／記号：PCRプライマーR7
- (B) 存在位置：1-20
- (D) 他の情報

20

(xi) 配列

GGAACACATG TAAGCGACGG 20

(10) 配列番号8の情報

30

(i) 配列の特性：

- (A) 長さ：34ヌクレオチド
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

40

(ii) 配列の種類：オリゴヌクレオチド

(i x) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す名称 / 記号 : P C R プライマー R 8

(B) 存在位置 : 1 - 3 4

(D) 他の情報

(x i) 配列

10

CCATCGATAA TAATAAAACG CCAACTTTGA CCCG 34

(1 1) 配列番号 9 の情報

(i) 配列の特性 :

20

(A) 長さ : 1 7 ヌクレオチド

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : オリゴヌクレオチド

30

(i x) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す名称 / 記号 : 1 7 量体 - 1

(B) 存在位置 : 1 - 1 7

(D) 他の情報

40

(x i) 配列

CGGAGTACTG TCCTCCG

(1 2) 配列番号 1 0 の情報

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 1 7 ヌクレオチド

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

10

(i i) 配列の種類 : オリゴヌクレオチド

20

(i x) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す名称 / 記号 : 1 7 量体 - 2

(B) 存在位置 : 1 - 1 7

(D) 他の情報

30

(x i) 配列

CGGAGGACTG TCCTCCG

(1 3) 配列番号 1 1 の情報

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 1 9 ヌクレオチド

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

40

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：オリゴヌクレオチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す名称／記号：19

(B) 存在位置：1 - 19

(D) 他の情報

(xi) 配列

TCCCTATCAG TGATAGAGA

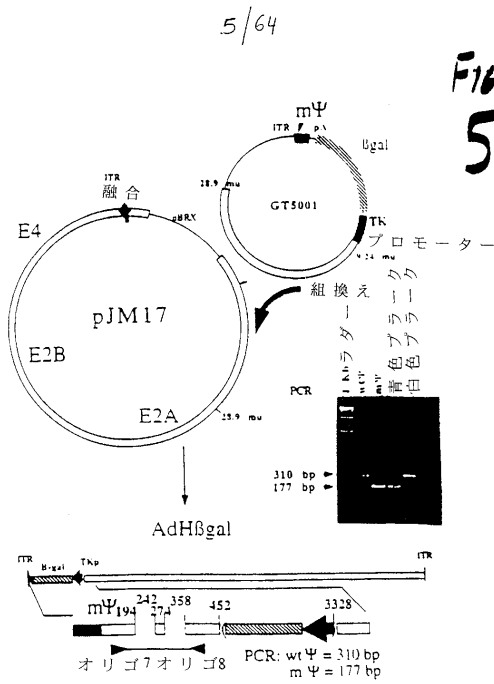
10

20

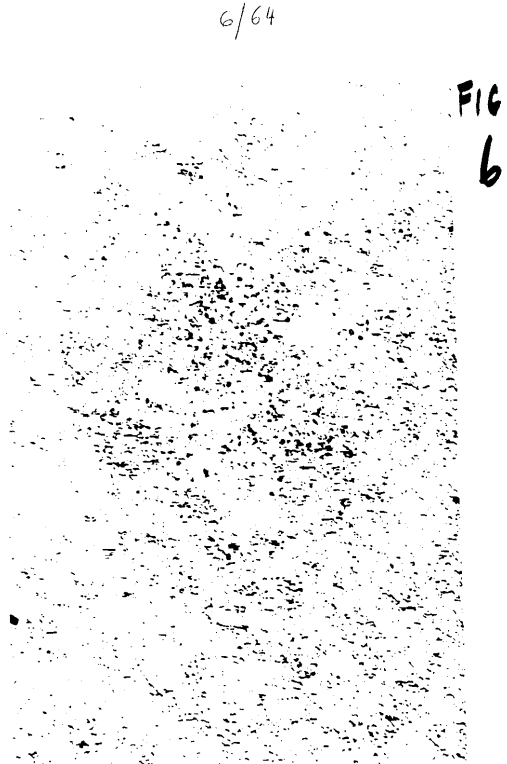
30

40

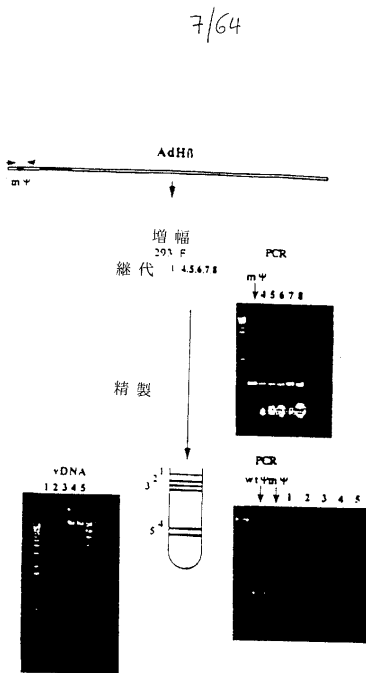
【 図 5 】



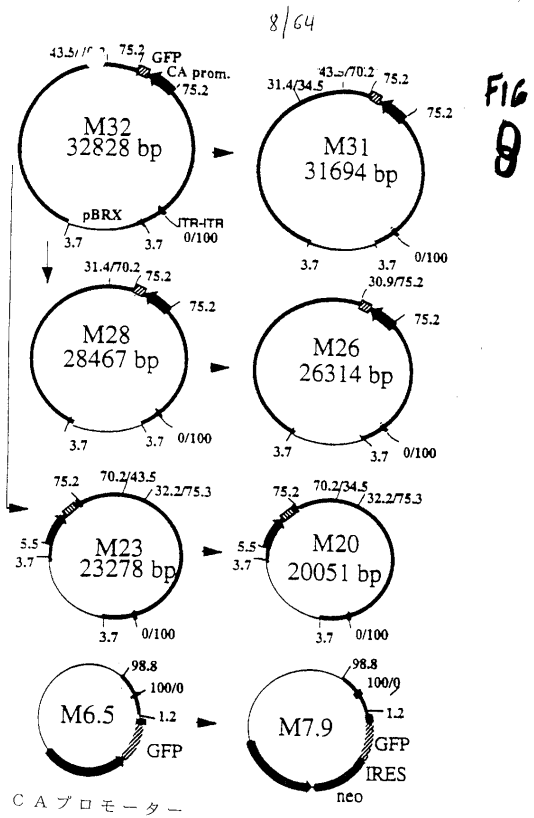
【 図 6 】



【 図 7 】



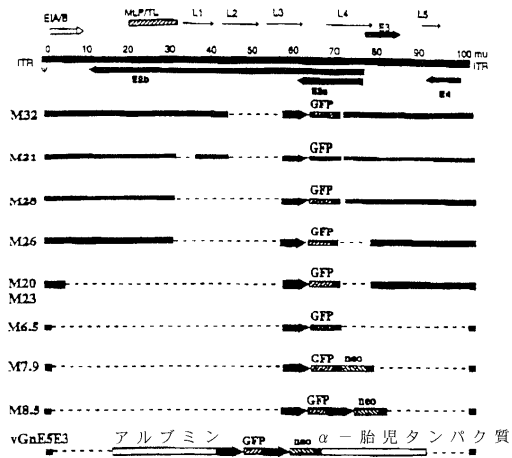
【 図 8 】



【 図 9 】

9/64

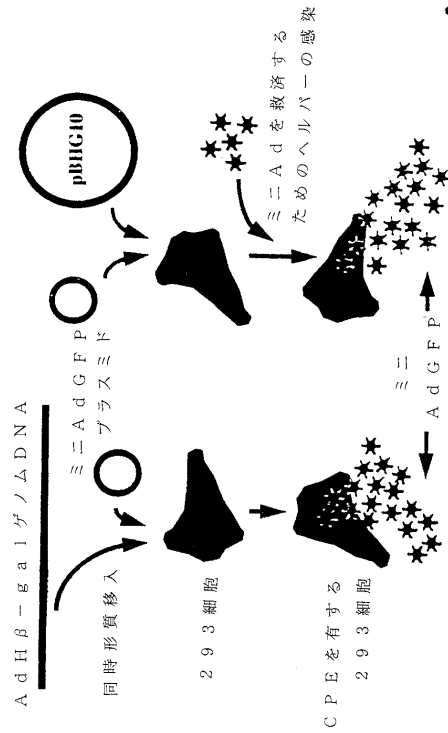
FIG 9



【 図 10 】

10/64

FIG 10



【 図 11 】

11/64

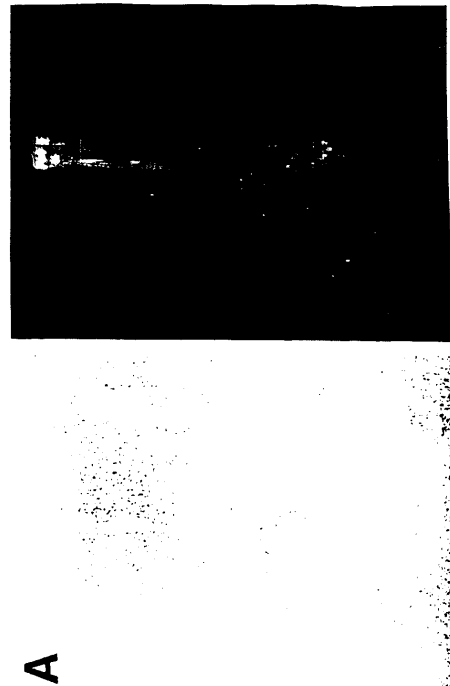
FIG 11



【 図 12 】

12/64

FIG 12



【 図 1 3 】

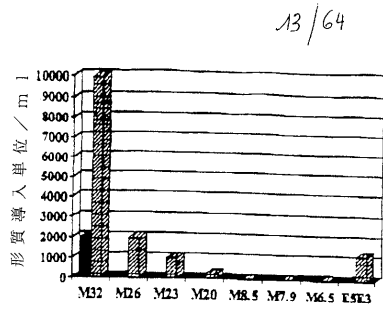


FIG 13

【 図 1 4 】

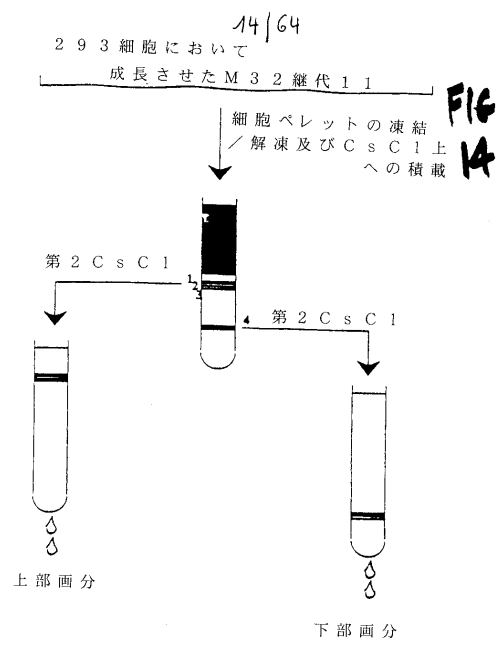
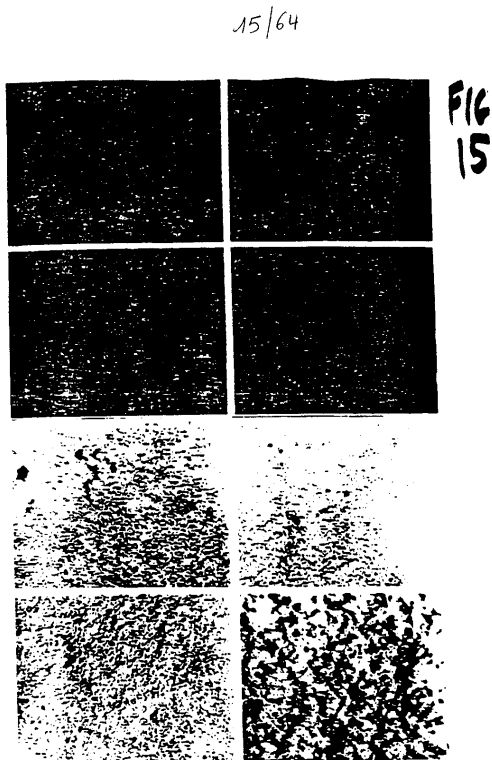
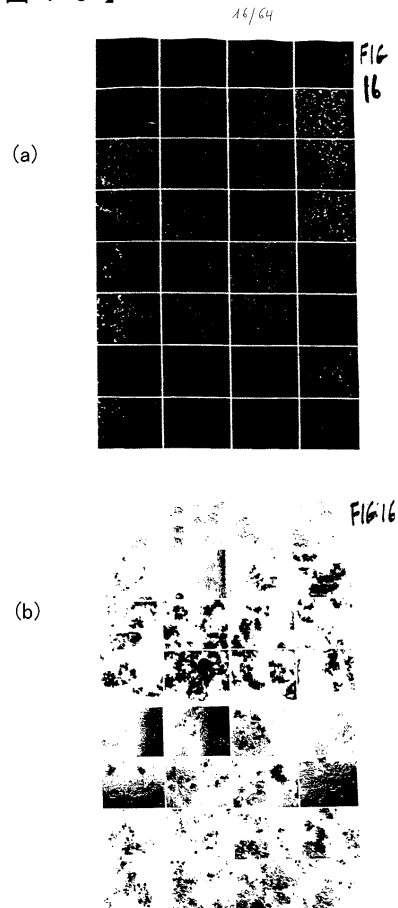


FIG 14

【 図 1 5 】



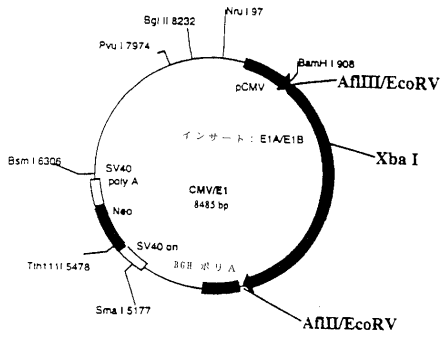
【 図 1 6 】



【 図 2 1 】

22/64

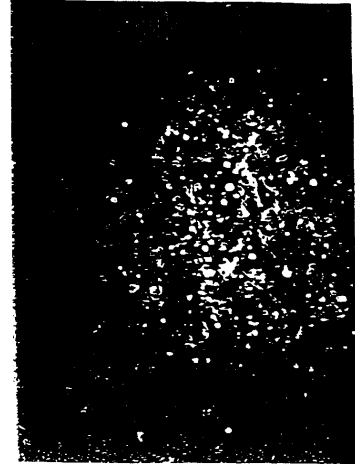
FIG 21



【 図 2 2 】

23/64

FIG 22

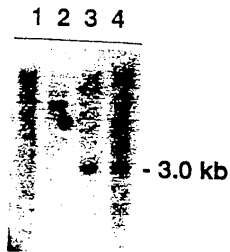


【 図 2 3 】

24/64

FIG 23

E1 細胞系 - サザンブロット分析



【 図 2 4 】

25/64

FIG 24



【 図 2 5 】

26/64
ウェスタンブロット分析 - E1A

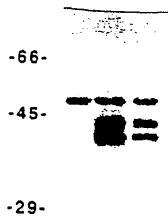
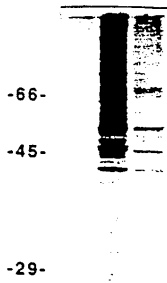


FIG 25

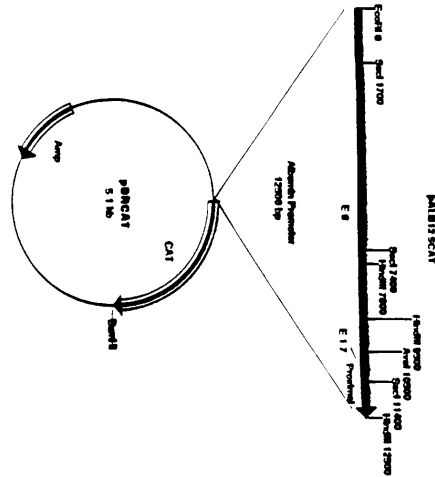
ウェスタンブロット分析 - E1B



【 図 2 6 】

27/64

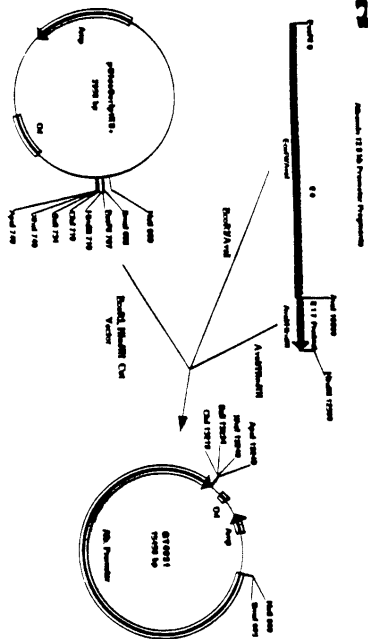
FIG 26



【 図 2 7 】

28/64

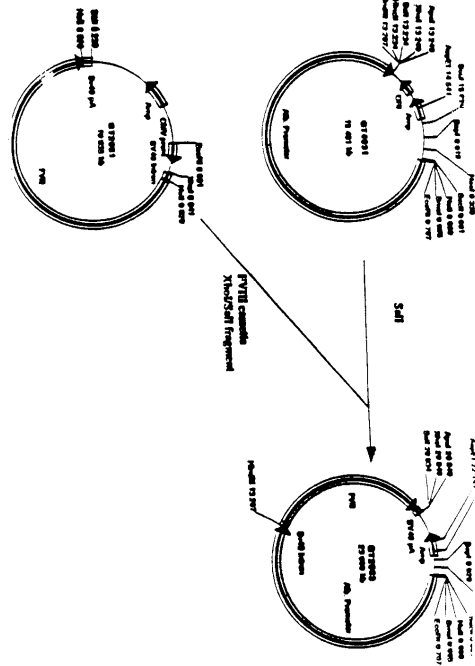
FIG 27



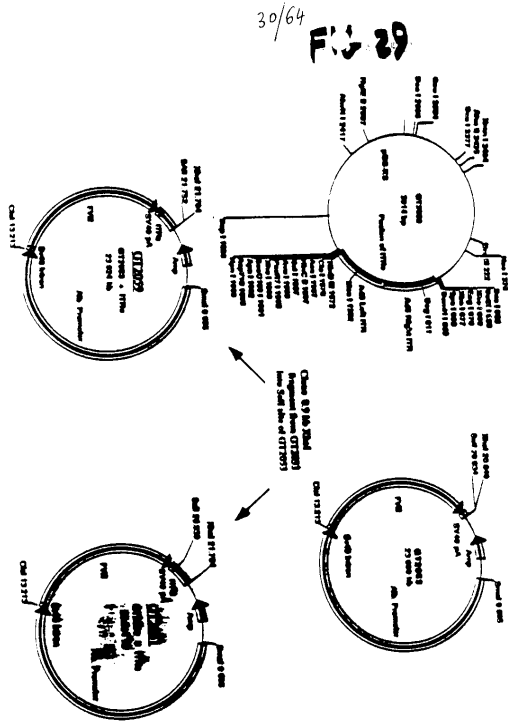
【 図 2 8 】

29/64

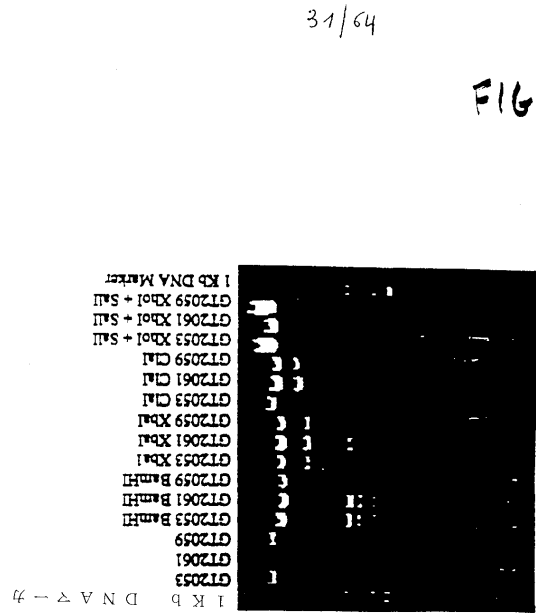
FIG 28



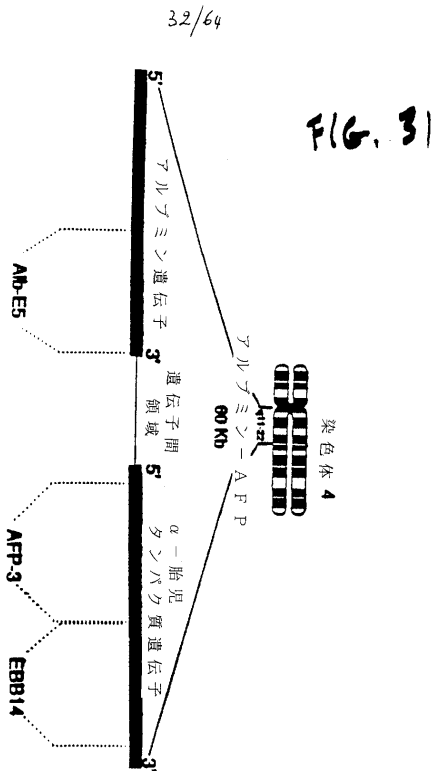
【 29 】



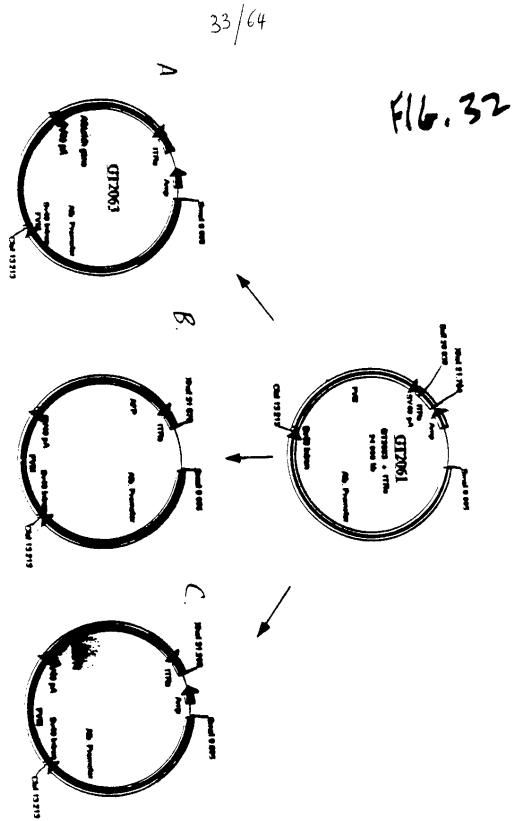
【 30 】



【 31 】



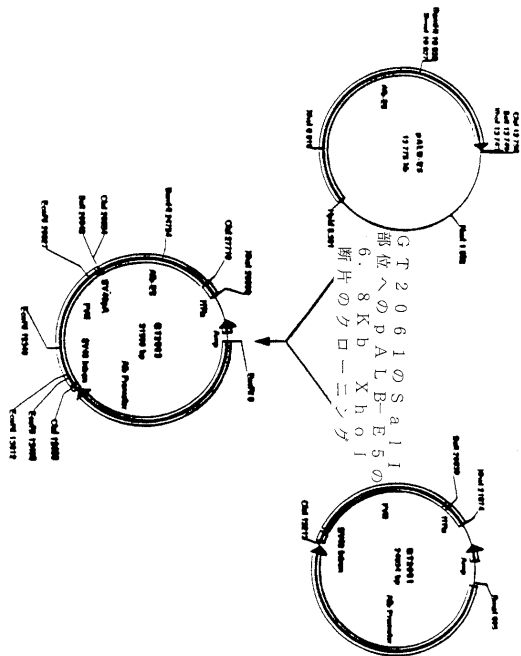
【 32 】



【 図 3 3 】

34/64

FIG 33

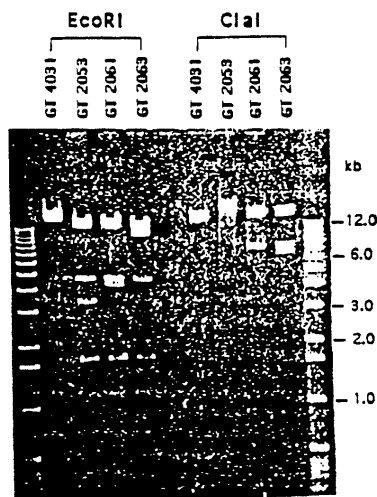


【 図 3 4 】

35/64

FIG 34

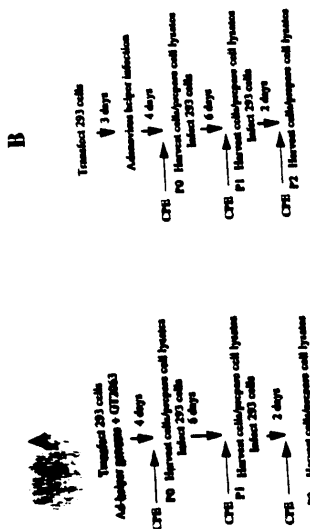
≒ Ad-FVIIIベクターの構築



【 図 3 5 】

36/64

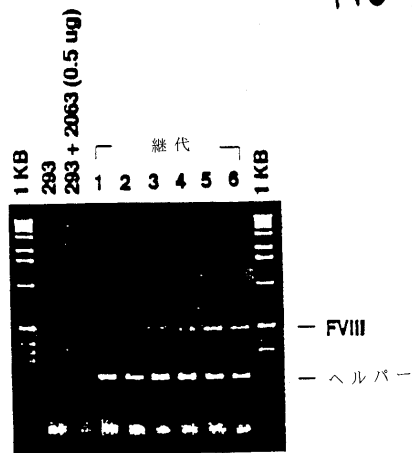
FIG 35



【 図 3 6 】

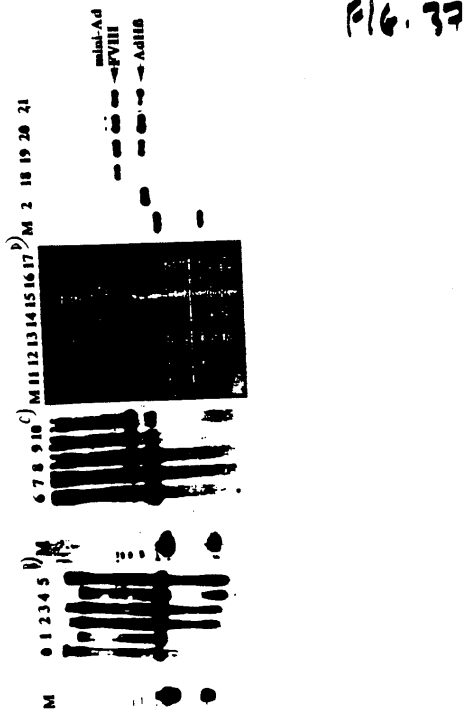
37/64

FIG 36



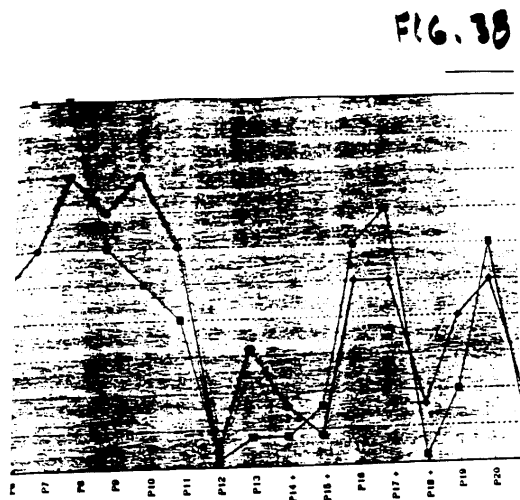
【 図 3 7 】

38/64



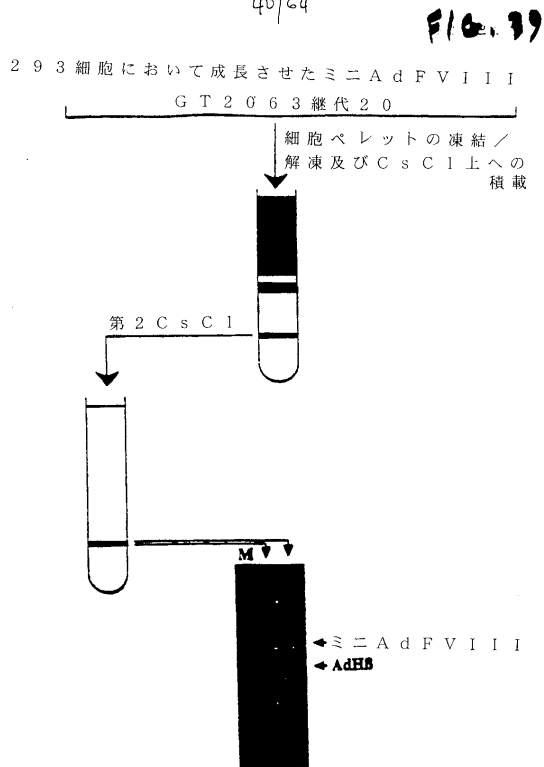
【 図 3 8 】

39/64



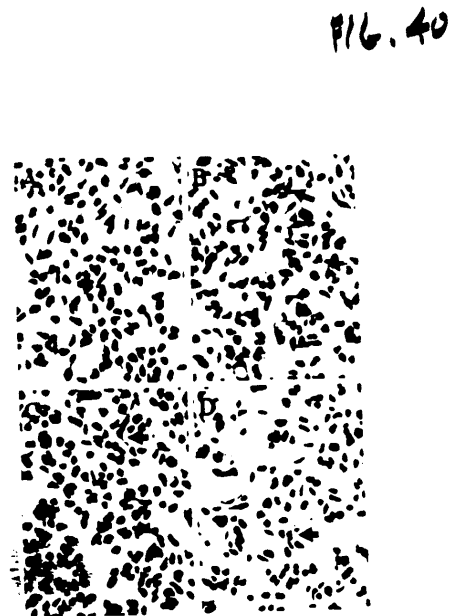
【 図 3 9 】

40/64



【 図 4 0 】

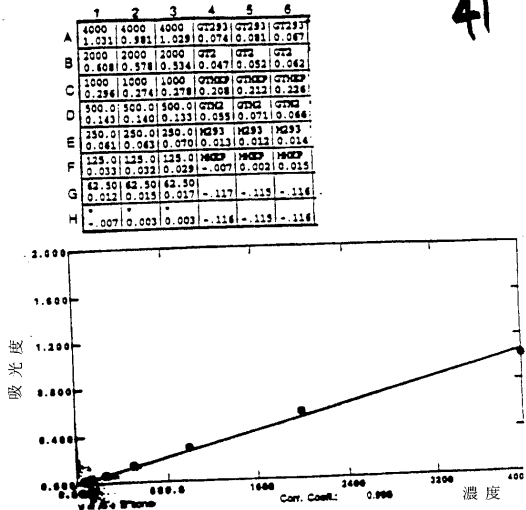
41/64



【 図 4 1 】

42/64

FIG. 41

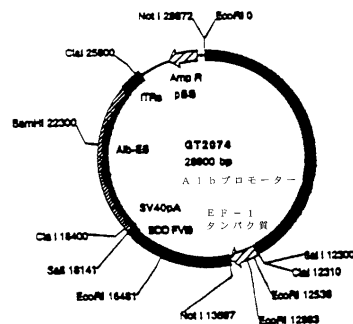


【 図 4 2 】

43/64

FIG. 42

アルブミン3'及び5'同族組換えアームを有する
ミニAd-hFV111ベクター：
EF-1プロモーター-BDD-hFV111

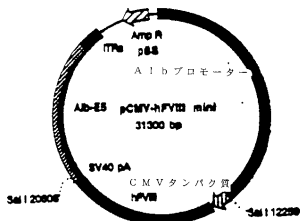


【 図 4 3 】

44/64

FIG. 43

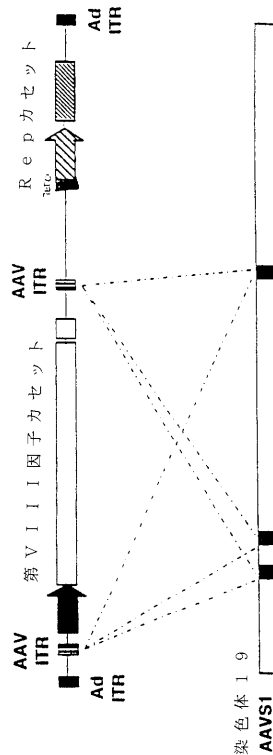
アルブミン3'及び5'同族組換えアームを有する
ミニAd-hFV111ベクター：
CMVプロモーター-hFV111



【 図 4 4 】

45/64

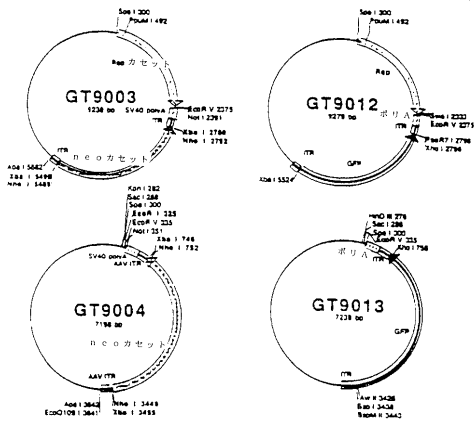
FIG. 44



【 図 4 5 】

46/64

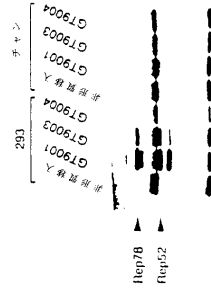
FIG 45



【 図 4 6 】

47/64

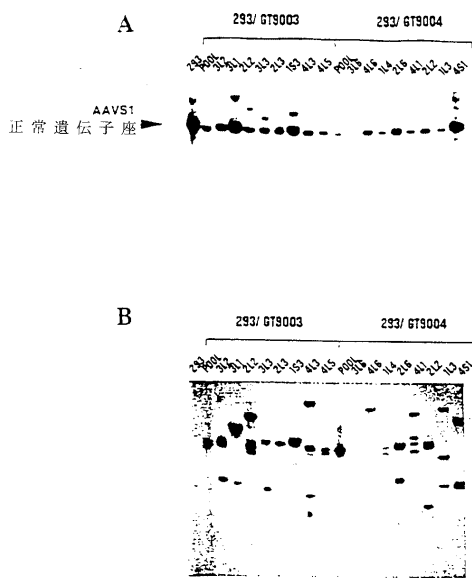
FIG 46



【 図 4 7 】

48/64

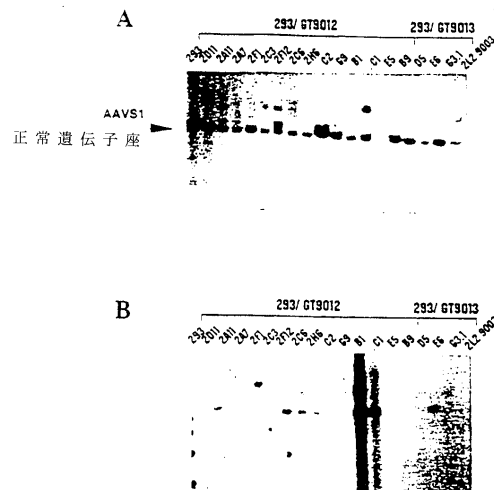
FIG 47



【 図 4 8 】

49/64

FIG 48

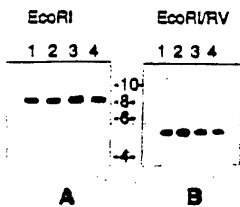


【 図 4 9 】

50/64

FIG 49

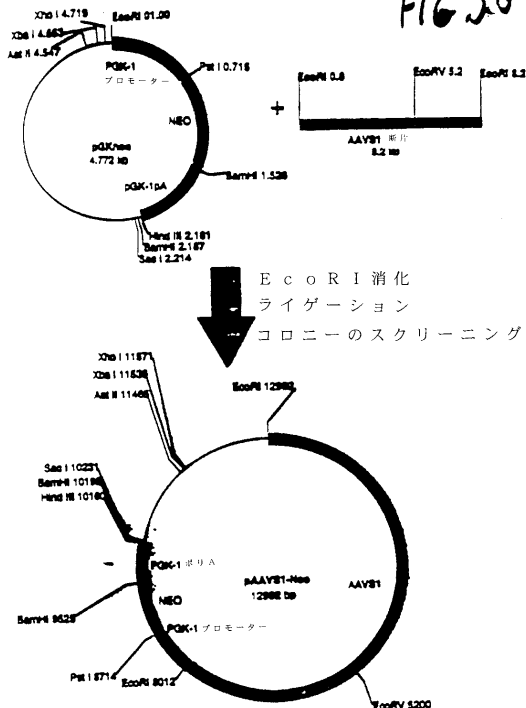
サザンブロット分析 - AAVS1 PIクローン



【 図 5 0 】

51/64

FIG 50

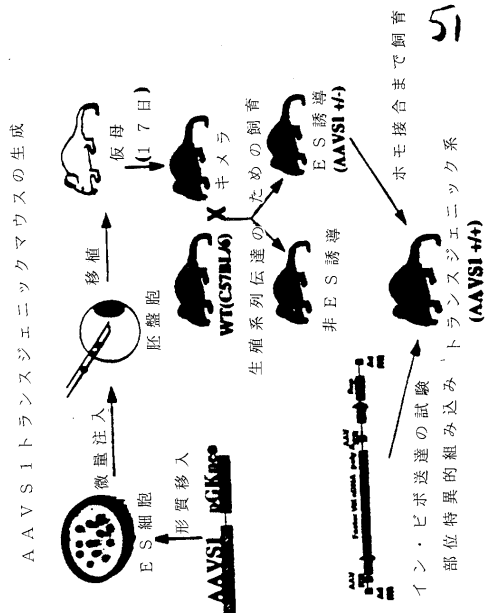


EcoRI 消化
ライゲーション
コロニーのスクリーニング

【 図 5 1 】

52/64

FIG 51

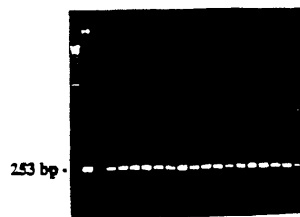


【 図 5 2 】

53/64

FIG. 52

NeoR ESクローン - AAVS1 についての PCRスクリーニング

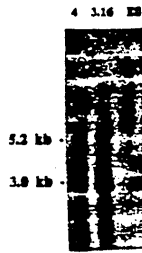


【 図 5 3 】

54/64

FIG. 53

サザンブロット分析 - AAVS1 ES細胞クローン

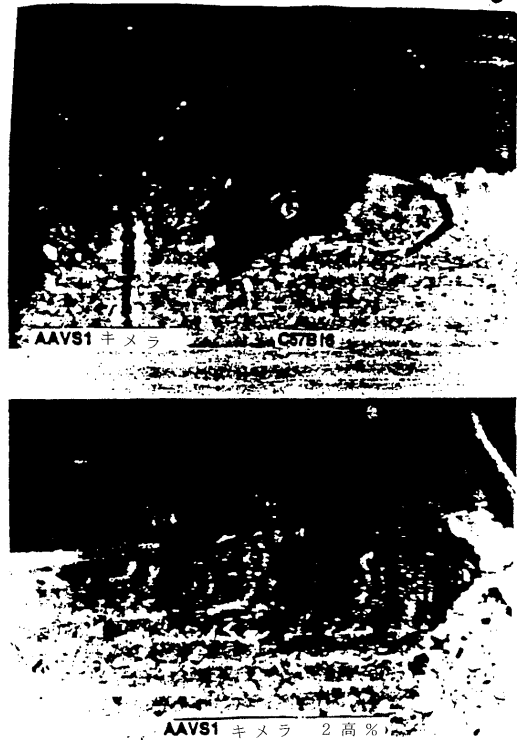


【 図 5 4 】

55/64

FIG

54

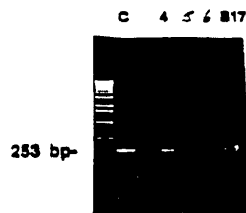


【 図 5 5 】

56/64

FIG 55

トランスジェニックマウスにおける AAVS1 配列



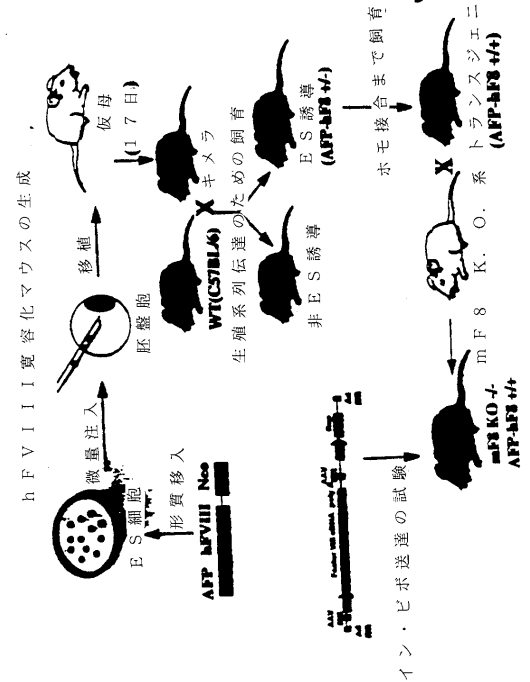
細胞系及び F1 キメラマウスにおいて AAVS1 導入遺伝子を検出するための PCR 分析

予想 PCR 産生物 = 253 bp

【 図 5 6 】

57/64

FIG. 56

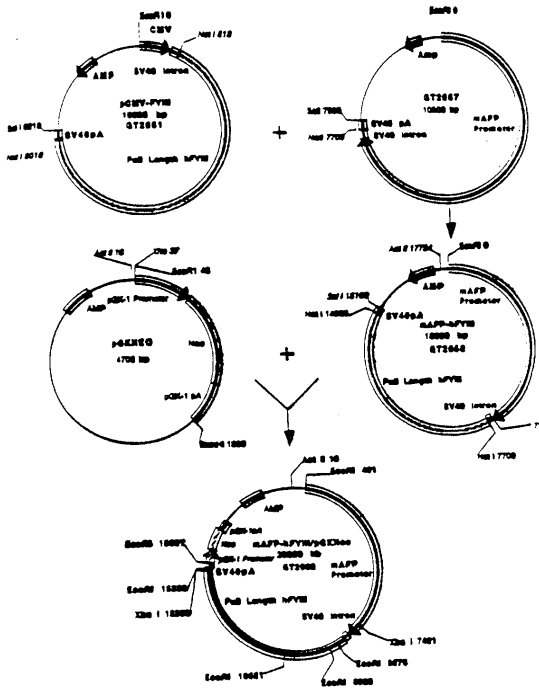


【 図 5 7 】

58/64

FIG 57

h F V I I I マウス寛容化ベクター

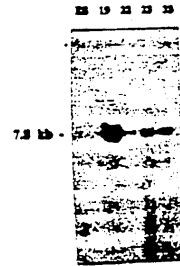


【 図 5 8 】

59/64

FIG 58

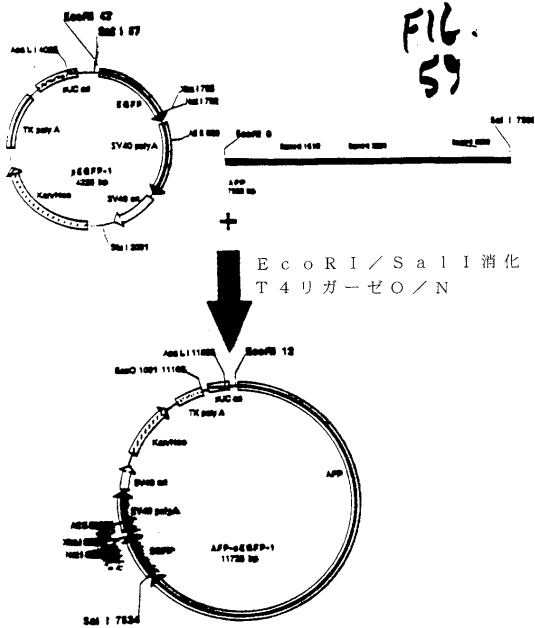
サザンブロット分析 -
AFP-FVIII ES細胞クローン



【 図 5 9 】

60/64

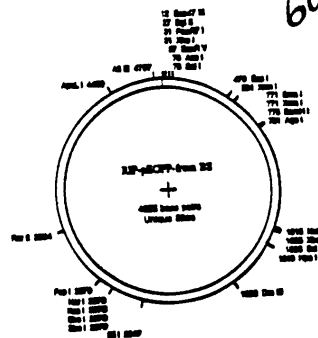
FIG. 59



【 図 6 0 】

61/64

FIG. 60



【手続補正書】

【提出日】平成16年8月30日(2004.8.30)

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0199

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0199】

【図1】ミニAdベクター系の原理。ミニAdベクター系の3つの主要成分：ヘルパーAd、ミニAdベクター、及びAdヘルパーが示される。ヘルパー細胞によって供給されるE1はヘルパーAdがそれ自体で複製し、ウィルスカプシドを形成する後期ウイルスタンパク質を合成することを可能にする。このカプシド内へのヘルパーAdゲノムのパッケージ化は、本発明のヘルパーAdのパッケージ化シグナルが弱力化されているため非能率的である。ミニAdベクターゲノムの存在下において、ヘルパーAdはそのミニAdベクターゲノムの複製を支持し、これはその野生型パッケージ化シグナルがヘルパーウイルスパッケージ化タンパク質に対して高い親和性を有するため優先的にパッケージ化される(31)。ミニAdベクターのさらなる精製は、生化学的又は物理的方法、例えば超遠心を用いて達成することができる。

【図2】現在のAdベクターの本発明との比較。このミニAdベクター系と比較した、現在のAdベクターの一般的な設計及び補完機構が図示される。

【図3】ヘルパーウイルス及びミニAdベクターの原型。A. アデノウイルスの左ITRを参照したパッケージ化シグナルの配置。B. 野生型アデノウイルス5のパッケージ化シグナル配列領域の配列が示される。角括弧は弱力化ヘルパーウイルスパッケージ化シグナルを含めるために欠失された領域を示す。C. Bに示される配列の反復領域は共通反復と共に記載されている。

【図4】パッケージ化弱力化ヘルパーAdH₁を生成するためのシャトルベクターの構築。GT5000を構築するため、突然変異パッケージ化シグナル配列mtをPCRにより増幅し、シャトルベクター内で28.9muまで延びるAd5配列で置換した(GT4004)。pTk-由来する-gal発現カセットをGT5000のE1欠失物にクローン化し、シャトルベクターGT5001を得た。

【図5】AdH₁の生成。シャトルベクターGT5001(図8を参照)をpJM17と共に293細胞に同時形質移入した。これらのプラスミドの間の相同7Kb領域(Ad5の9.24乃至28.9)での組換えにより、GT5001から誘導される左アームを有するパッケージ化可能なウイルスが生じる。最下部に示されるAdH₁の左領域の数字はAd5nt配列に相当し、パッケージ化シグナルに加えて-gal発現カセットが挿入されているE1における二重欠失の伸長を示す。同時形質移入の2週間後、幾つかの青色プラークを単離し、パッケージ化シグナル中の突然変異をオリゴ7及び8を用いてPCRにより分析した。増幅した断片のサイズ、野生型パッケージ化シグナル(wt)については310bp、突然変異パッケージ化シグナル(mt)については177bpは、示されるように、2%アガロースゲルにおいて区別することが可能である。1Kbラダー、ギブコ(Gibco)BRL(ゲーサースバーグ、MD)製の1KbDNAラダーマーカー；wt及びmt、vDNAがそれぞれE1欠失ベクターAd-CMVgal及びdl10/28ウイルスから抽出されたPCR対照；青色プラーク、X-galで青色に染色されたプラークからのvDNA；白色プラーク、X-galで青色に染色されなかったプラークからのvDNA(図6を参照)。

【図6】X-galでの染色によるAdH₁プラーク対他のものの同定。[これらのプラークのパッケージ化シグナルのPCR増幅が図5に示される。]

【図7】AdH₁の増幅及び特徴付け。293細胞中に存在する内在性左Ad5配列を用いる組換えが複製適格アデノウイルス(RCA、E1+)又はwtを有するE1アデノウイルスを生じ得る可能性があるため、AdH₁のパッケージ化シグナルを各継代後に増

幅した。C s C l 精製以前には継代中に w t は検出されなかった (4 乃至 8)。継代 9 では、A d H を精製したときに、ウイルス D N A 含量を勾配の 5 つのバンドの全てについて別々に分析した。1 % アガロースゲル (最下部左) においては上方の 3 つのバンドにおいて v D N A はほとんど観察されず、これは、これらが大部分空のキャプシドによって形成されることを示す。下方のバンド (4 及び 5) は充満キャプシドによって形成される。P C R により、全てのバンドにおいて期待される突然変異パッケージ化シグナルが検出される (最下部右)。1 K b ラダーマーカー (図 9 と同様) は各々のゲルの左レーンである。v D N A を含むゲルは l / H i n d I I I マーカーも含む。

【図 8】ミニウイルスプラスミドの構築。これらのプラスミドは、A d H で補完された場合のパッケージ化に対するアデノウイルスゲノムの様々な欠失の効果を決定するために構築する。全ての構築体は、C M V プロモーターによって - アクチンエンハンサー (濃い矢印) で駆動される緑色蛍光タンパク質 c D N A (G F P、縦線付きのボックス) を含む。M 7 . 9 (最下部右) はネオマイシン c D N A 及び内部リボソームエントリ部位 (I R E S) をも有する。上部の 6 つは M 3 2 から誘導され、これは A d 5 ゲノムの中間に 1 0 K b の欠失がある p J M 1 7 誘導体である。最下部の 2 つは p B l u e s c r i p t - K S (ストラタジェン (S t r a t a g e n e)、C A) から A d 5 の複製及びパッケージ化のための最小シス要素を含めて誘導される。数字は A d 5 マップ単位に対応し、欠失及び挿入部位を示す。0 / 1 0 0 及び 1 0 0 / 0 は A d 5 D N A の逆末端反復 (I T R)、A d 5 D N A の天然の融合を示す、濃いレーン ; プラスミド主鎖 D N A、薄いレーン。

【図 9】パッケージ化のために構築されたミニアデノウイルス (ミニ A d) ベクターの模式的図示。最上部は、初期 (E) 及び後期 (L) 転写領域を伴う A d 5 転写マップ及びマップ単位 (m u)。M L P / T L : 主要後期プロモーター及び三部構成ラダー。逆末端反復 (I T R) 及びパッケージ化シグナル () は全てのミニ A d ベクターにおける独自の共通配列である。ベクターは、複製の後にキャプシド内で見出される通りに、直鎖形態で示される。ベクターの生成に用いられる環状プラスミドは、同じ配列を有するが I R T により頭部が尾部に融合している。それぞれのミニ A d ベクターの名称は K b でのそのサイズを引き合いにする。M 3 2 乃至 M 2 0 は p H M 1 7 から中央アデノウイルスゲノムの漸進的欠失により誘導される。これらのベクターにおいては、プラスミド主鎖 (p B R X、図示せず) は 3 . 7 m u に位置する。M 6 . 5 乃至 v G n E 5 E 3 は、p B l u e s c r i p t 主鎖 (図示せず ; G F P 発現カセットの前に位置する) において、ネオマイシン c D N A 及び c h r . 4 q 1 1 - 2 2 に由来するヒトゲノム断片を挿入することにより構築される。

【図 10】補完の 2 つの方法。ミニウイルスベクターを生成するのに、類似の収量が得られる 2 つの別々の補完プロトコルを用いた。第 1 の方法においては、ミニ A d プラスミドを A d H に由来するウイルス D N A と共に同時形質移入し、それらの細胞を C P E が観察されるまで培養する。第 2 の方法においては、ミニ A d プラスミドを p B H G 1 0 と共に同時形質移入した 3 日後に A d H をウイルスとして加え、細胞を C P E が観察されるまで培養する。

【図 11】ミニウイルスプラスミドでの 2 9 3 細胞の同時形質移入。C a P O ₄ 改変プロトコルを用いることによりほとんど全ての細胞に形質移入した。M 3 2 プラスミドの形質移入は形質移入の 1 日後に示される。右、明視野 ; 左、同じ視野の蛍光顕微鏡写真。

【図 12】ミニウイルス含有ブランク。ミニウイルス (ここでは M 3 2) の存在がブランクの蛍光によって示される。右、明視野 ; 左、同じ視野の蛍光顕微鏡写真。

【図 13】異なるサイズのミニウイルスベクターのパッケージ化効率。異なるサイズのミニ A d ベクターのパッキング効率及び増幅。同時形質移入の後に生成されるウイルスを継代 0 と命名する。その粗製溶解物を用いて 2 9 3 細胞を感染させ、継代 1 を生成した。1 m l の粗製溶解物継代 1 を用いて 1 0 6 個の 2 9 3 細胞を感染させ、2 4 時間後に蛍光を発する細胞の数を数えた (形質導入単位 / m l、黒柱)。2 4 時間後に C P E が出現し、凍結 / 解凍によりウイルスを抽出した (粗製溶解物継代 2)。再度、1 m l の粗製溶解物

継代2を用いて106個の293細胞を感染させ、24時間後に蛍光を発する細胞の数を数えた(斜線付きの柱)。継代1と2との相違は5Xの増幅収量を示し、異なるミニAdベクター間の相違はパッケージ化におけるサイズの効果を示す。

【図14】M32の精製スキーム。数回継代することによりM32を増幅させた後、粗製抽出物をCsCl分離した。第1勾配の結果4つのバンドが生じた：3つは上方で1つが下方。これらを別々に集めて透析し、図12に示されるように293細胞の感染に用いた。上方及び下方バンドの第2分離勾配から画分を集め、図16に示されるように293細胞の感染に用いた。

【図15】M32ミニAdウイルスの精製(1)。第1CsCl勾配。M32及びAdHをより高密度のバンドにおいて同時精製する(第4番以下)。蛍光のチェックに用いたものと同じウェルを後に固定及びX-galでの染色に用いる。

【図16】M32ミニAdウイルスの精製(2)：第2CsCl勾配を用いる第1CsCl勾配からの下方バンドの分画。各画分の一定分量0.5µlを、60%集密の293細胞を収容する96ウェル/プレートのウェルの1つを感染するのに用いた。最初の画分(1乃至6)はM32又はAdHを含んでいなかった(これらの画分は勾配の3mlまでを表す)。画分7乃至16の100µlの試料は多量のM32及びAdHを明らかにする(パネルAにおいて蛍光の下で示されるものと同じ画分の-gal染色についてはパネルBを参照)。続く画分(17乃至29)はそれ以前の画分に類似する濃度のM32を示すが、AdHの濃度は約10倍低い。したがって、画分17-29は、AdHに対して約10倍のM32の濃縮を表す。

【図17】GAL4結合部位を用いるAd5パッケージ化シグナルの改変。XhoI及びXbaI部位の間のヌクレオチド配列が示される(設計#1及び設計#2)。設計#1においては、A反復Iの前に2つのGAL4結合部位が存在し、A反復IIとVIとの間に1つのGAL4結合部位が存在する。設計#2においては、A反復Iの前に2つのGAL4結合部位が存在し、別の2つのGAL4結合部位がA反復VIIの後に存在する。下線が付された配列は17量体GAL4結合部位である。イタリック体の配列はA反復である。各GAL4結合部位の中心とA反復との間の距離が示される。

【図18】tetO配列を用いるAd5パッケージ化シグナルの改変。XhoI及びXbaI部位の間のヌクレオチド配列が示される(設計#1及び設計#2)。設計#1においては、A反復Iの前に2つのtetO配列が存在し、A反復IIとVIとの間に1つのtetO配列が存在する。設計#2においては、A反復Iの前に2つのtetO配列が存在し、A反復VIIの後にさらなるtetO配列が存在する。下線が付された配列は19量体tetO配列である。イタリック体の配列はA反復である。各tetO結合部位の中心とA反復との間の距離が示される。

【図19】Ad Pac-GAL4改変のための合成オリゴの位置及び配列。Gal#1乃至Gal#8は、設計#1及び#2におけるXhoI及びXbaI部位の間の配列に隣接する合成オリゴである。各オリゴの位置及び方向が矢印で示される。Gal#1乃至Gal#8の配列が記載される。

【図20】ad Pac-terO改変のための合成オリゴの位置及び配列。tet#1乃至tet#10は、設計#1及び#2におけるXhoI及びXbaI部位の間の配列を覆う合成オリゴである。各オリゴの位置及び方向が矢印で示される。tet#1乃至tet#10の配列が記載される。

【図21】CMV-E1哺乳動物発現ベクターの構築。E1A及びE1Bをコードするアデノウイルス5配列462-3537(AflIII-AflIII断片)をpCDNA3のEcoRV部位に平滑末端クローン化した。

【図22】E1補完性細胞系A549E1-68におけるGFP発現及びプラーク形成。E1欠失アデノウイルスAd5CA-GFPを感染させた後。このプラークの中心の透明領域はE1補完ウイルスの増幅によって生じるCPEの証拠である。

【図23】G418r A549E1クローンのサザンブロット分析。ゲノムDNAをHindIIIで消化し、750bpのE1プローブ(PstI断片)で探索した。レーン

1 : 1 k b DNA ラダー ; レーン 2 : A 5 4 9 ; レーン 3 : 2 9 3 ; レーン 4 : A 5 4 9 E 1 - 6 8 ; レーン 5 : サブクローン A 5 4 9 E 1 - 6 8 . 3 .

【図 2 4】新規細胞系の形態学的分析。親 A 5 4 9 細胞 (上部パネル) 及び E 1 補完性細胞系 A 5 4 9 E 1 - 6 8 (下部パネル) の形態学的比較。

【図 2 5】形質転換細胞系における E 1 タンパク質の発現の分析。A . A 5 4 9 細胞 (レーン 1) 、 2 9 3 細胞 (レーン 2) 及び A 5 4 9 E 1 - 6 8 (レーン 3) における E 1 A タンパク質の発現の、E 1 A 特異的モノクローナル抗体 (M 7 3 、 オンコジーン・サイエンス (O n c o g e n e S c i e n c e)) を用いるウェスタンブロット分析。B . E 1 B p 5 5 特異的モノクローナル抗体 (オンコジーン・サイエンス) を用いる、A 5 4 9 細胞 (レーン 1) 、 2 9 3 細胞 (レーン 2) 及び A 5 4 9 E 1 - 6 8 (レーン 3) における E 1 B タンパク質の代謝性 ^{3 5} S 標識及び免疫沈殿。

【図 2 6】p A l b 1 2 . 5 C A T プラスミドの模式図。このプラスミドは、p B R C A T プラスミドベクター中に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (C A T) の上流に作動可能に連結する p A l b 1 2 . 5 C A T 1 2 . 5 k b ヒトアルブミンプロモーター (E c o R I 乃至 H i n d I I I) を含む。近位プロモーター及びエンハンサー領域 (E 1 . 7 及び E 6) が示される。

【図 2 7】p B l u e S c r i p t K S + ベクターへの 1 2 . 5 k b ヒトアルブミンプロモーターのクローン化。E c o R I 乃至 A v a I の 1 0 . 5 k b 断片及び 2 . 0 k b の A v a I 乃至 H i n d I I I アルブミンプロモーター断片を p A l b 1 2 . 5 C A T から別々に単離し、p B l u e S c r i p t - K S + ベクターの E c o R I / H i n d I I I 部位に同時にライゲートして G T 4 0 3 1 を生成した。

【図 2 8】G T 4 0 3 1 への h F V I I I 発現カセットのクローン化。7 . 5 k b ヒト F V I I I カセットをプラスミド G T 2 0 5 1 から X h o I 及び S a l I を用いて切り出して G T 4 0 3 1 の S a l I 部位にライゲートし、h F V I I I c D N A に作動可能に連結するヒトアルブミンプロモーターを含む G T 2 0 5 3 を得た。

【図 2 9】アルブミンプロモーター - F V I I I ミニウイルスプラスミドの構築。G T 2 0 3 3 に由来するアデノウイルス 5 ' I T R 及びパッケージ化シグナルを含む断片を X h o I を用いて切り出し、G T 2 0 5 3 の S a l I 部位にクローン化した。順方向又は逆方向 (それぞれ G T 2 0 6 1 及び G T 2 0 5 9) のいずれかの I T R を有するプラスミドを得た。G T 2 0 6 1 中のインサートは、F V I I I 遺伝子に近接する独自 S a l I 部位と共に配向される。G T 2 0 5 9 は G T 2 0 6 1 とは反対の方向の A d I T R を含む。

【図 3 0】G T 2 0 5 3 、 G T 2 0 5 9 及び G T 2 0 6 1 の制限消化プロフィール。消化により、S a l I との組み合わせで B a m H I 、 X b a I 、 C l a I 及び X h o I に期待される結合パターンが示される。

【図 3 1】染色体 4 上のアルブミン / - 胎児タンパク質遺伝子領域の図。この図は相同組換えのための 3 ' 組換えアームとしての機能を果たす 3 つの領域 : 1) A l b - E 5 、アルブミン遺伝子の 3 ' 領域 ; 2) A F P - 3 、 - 胎児タンパク質遺伝子の中央領域 ; 及び 3) - 胎児タンパク質のさらに 3 ' 、に位置する E B B 1 4 を示す。

【図 3 2】クローン化スキーム。異なる 3 耐薬性組換えアームを含む 3 つのベクター (A 、 B 、 及び C) の、それらのアームを (パネル A 、 B 、 及び C の上に示される) G T 2 0 6 1 にクローン化した後の制限酵素マップ。

【図 3 3】クローン化スキーム。クローン p A l b - E 5 のヒトアルブミン遺伝子の 3 室 U . 8 K b X h o I 断片が G T 2 0 6 1 の S a l I 部位にクローン化されている G T 2 0 6 3 の詳細なクローン化スキーム。このベクターをベースとするミニウイルスは F V I I I 遺伝子の潜在的なイン・ビトロ治療手段である。

【図 3 4】制限酵素マッピング。図 9 に示される 3 ' 相同アルブミン相同組換えアームを有するアルブミンプロモーター駆動 h F V I I I を含むプラスミドの生成に用いられたベクターの制限酵素消化を示すアガロースゲル。示される構築体の各々について E c o R I 及び C l a I 消化が示されている。

【図 3 5】ミニ A d F V I I I ウイルスを生成するためのスキーム。h F V I I I ミニウ

ウイルスを生成するための2つのスキーム(A及びB)が示される。スキームA:第1日に、ヘルパーウイルスゲノムDNA及びプラスミドGT2063をリン酸カルシウム沈殿により293細胞(ATCC#CRL1573)に同時形質移入した。形質移入はリン酸カルシウム沈殿によるものであった。第6日に、細胞変性効果(CPE)を観察し、細胞溶解物を調製した。その後、継代4まで毎回、感染に続く3日間溶解物を回収し、その時点でウイルス調製物は5倍に増幅していた。培地は感染後毎日代えた。スキームB:プラスミドpBHG10をプラスミドGT2063と共にリポフェクタミン(Lipofectamine)(ギブコ)を用いて293細胞に同時形質移入した。72時間後に、5pfu/細胞の多重度でヘルパーAdを感染させた。5日後、CPEを観察し、細胞溶解物を調製した。その後、等しい接種容積を用いて継代3まで感染させ、その時点でウイルスは5倍に増幅し得る。培地は感染後毎日代えた。

【図36】FV IIIを含むミニAdベクターの生成。ミニAdFV IIIベクターを、ミニAdプラスミドGT2063を293細胞に形質移入し、ヘルパーAdHを感染させることにより生成した。細胞変性効果(CPE)が完了したとき、それらの細胞及び上清を集めた(継代0)。増殖させるため、数回の凍結/解凍サイクルによりウイルスを細胞から抽出し、新鮮な293細胞の感染に用いた。各々の継代時に、SDS、EDTA、及びプロテイナーゼKを含む溶液中でのインキュベーション及び続くエタノール沈殿によるウイルスDNAの抽出に740µlの上清を用いた。ビリオン溶解工程に先立って、上清をDNA分解酵素I消化に処し、GT2063プラスミドDNAからの汚染を回避した。1/20の精製ウイルスDNA(vDNA)を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるパッケージ化シグナル配列の増幅における基質として用いた。FV IIIミニAd及びヘルパー増幅領域の予想されるサイズは、それぞれ、177及び310bpであった。DNAサイズマーカー:ギブコ(ゲーズバーク、MD)製の1Kbラダー。さらなるGT2063プラスミドを含み、又は含まない、非形質移入239細胞からの上清を、それぞれ、陰性対照及びDNA分解酵素I処理の対照として用いた。

【図37】ミニAdFV IIIベクターの継代0乃至21に由来するvDNAのサザンブロット分析。vDNAは図14と同様に精製した。1/2の精製vDNA(370µlの上清に相当)をPstIで消化し、1%アガロースゲルで分離してナイロンメンブランにブロットした。ミニAd及びヘルパーの両者に存在する右(3秩jITRに隣接する配列に対応するプローブをvDNAの検出に用いた。検出される断片の予想サイズ:ミニAdFV III=3.3Kb; AdH=2.2Kb。4つの独立のブロットが示される(A、B、C及びD)。マーカー断片への特異的ハイブリダイゼーションを標準化のために用いた。

【図38】連続継代の全期間にわたる、ミニAdFV III及びヘルパーにおける動的変動。このブロットは、図15に示されるバンドの濃度測定による定量化によって得た。ヘルパーは方形を伴う明線によって示される;ミニAdFV IIIは菱形を伴う暗線によって示される。1単位はY軸上で検出される最低量と定義される(継代18でのヘルパーvDNAの量に相当)。他の値はこの単位に標準化される。

【図39】CsCl勾配遠心によるミニAdFV III及びAdHの分離。第1勾配からの最下部バンドはビリオンを含んでおり、これらを第2勾配に適用することによりさらに分離した。ミニAd(31kb)とヘルパー(37.1kb)とのサイズが異なることにより分離が可能となり、その結果、サザンブロットによる測定で、10:1ミニAd/ヘルパーウイルス比を有する上部画分及び1:10ミニAd/ヘルパーウイルス比を有する下部画分が生じた。

【図40】ミニAdベクターが形質導入された細胞におけるFV IIIの発現。293細胞をチャンバスライドにおいて成長させ、図18Cに示されるように上部又は下部画分の希釈した(1/100)一定分量1µlで感染させた。感染の24時間後、これらの細胞を固定し、FV III特異的mAb(シーダーレーンシープ(Cedar Lane Sheep)抗ヒトFV III C、#CL20035A、アキュレート・ケミカル・アンド・サイエンティフィック・コーポレーション(Accurate Chemical a

nd Scientific Corporation)、ウェストバリー、NY)、続いて二次抗体(ビオチン化ロバ抗ヒツジIgG、ジャクソン・イムノリサーチ(Jackson Immunoresearch)、#713-065-147)及びDAB(赤みを帯びた茶色を生じる;シグマ(SIGMA)カタログ番号D7679)で染色した。A. 模倣非感染対照293細胞。B及びC. 図18Cに示されるような上部画分の2つの独立の調製品での形質導入(ミニAdFVIII濃縮)。B及びCの両者において、10%の細胞がFVIIIの発現について陽性に染色された(矢印)。C. 図18C(ヘルパーウイルス濃縮)に示されるような下部画分での形質導入の結果、0.1%の細胞がFVIIIの発現について陽性に染色された。

【図41】ミニAdFVIIIベクターが形質導入された細胞における機能的FVIII発現。機能的FVIIIのコートテスト(Coatest)色素生成検定。上の表はOD読み取り値を示す。試料からの読み取り値を外挿するための等式を得るため、4000ng/ml乃至62.5ng/ml(列A乃至G)から3回(レーン1、2、及び3)作成した標準曲線もプロットする。レーン4、5及び6は試料から3回得たものである。A: 293細胞中の一定分量10µlのミニAdFVIII; B: 293細胞中の1µlのミニAdFVIII; C: HepG2細胞中の10µlのミニAdFVIII; D: HepG2細胞中の1µlのミニAdFVIII。E: 非形質導入293細胞からの馴化培地。F: 非形質導入HepG2細胞からの馴化培地。

【図42】クローンGT2074のマップ。このプラスミドは、プラスミドGT4020からSalI消化によって切り出され、GT2073の独自SalI部位にクローン化された、[B-ドメイン欠失ヒトFVIII cDNAに作動可能に連結された伸長因子-1(EF-1; 参考文献52)プロモーターを含む]発現カセットを含む。TATA及びCCAATを含むpALB12.5におけるPmeI部位の下流の3'近位アルプミンプロモーター領域(32)が欠失していた。この発現カセットはB-ドメイン欠失ヒトFVIII cDNAに連結する伸長因子Iプロモーターを含む。

【図43】pCMV-hFVIIIのマップ。このプラスミドは、GT2073のSalI部位にクローン化されている完全長hFVIIIコーディング領域に作動可能に連結するCMVプロモーターを含む。このサイトメガロウイルスプロモーターはpCMV(クローンテック、パロアルト、CA)から誘導した。

【図44】組み込み頻度及び特異性の試験に用いられるプラスミドの模式図。プラスミドGT9003及びGT9004は両側にAAV ITR配列が隣接するneo発現カセットを含む; GT9012及びGT9013はAAV ITR配列が隣接するGFP発現カセットを含む; GT9003及びGT9012は組み込みカセットの上流にRep78発現カセットも含む。プラスミドGT9003を構築するため、AAVゲノムの193乃至2126のRep配列をプラスミドpSUB201からPCR(Pfu pol)により増幅し、pCRII(インビトロジェン(Invitrogen)、CA)にクローン化した。得られたプラスミド(GT9000)をNotI及びXhoIで消化し、SV40ポリA部位(Not-SalI)を含む断片をその部位にクローン化した。得られたプラスミド(GT9001)をXbaIで消化し、クレノウで平滑末端化した。全AAVゲノムを含むPvuII-PvuII断片をpSUB201から得、GT9001の平滑末端化XbaI部位にサブクローン化した。その後、このプラスミド(GT9002)をXbaIで開裂させた。これは、AAVコーディング配列を除去してAAV ITRを残す。次に、neo発現カセット(BamHI-BamHI)をXbaI及びBamHIアダプターを用いてGT9002にサブクローン化し、プラスミドGT9003を生成させた。EcoRIを用いてGT9003からRepコーディング配列を除去することによりプラスミドGT9004を生成した。GT9003及びGT9004のneo配列(XbaI-XbaI)をそれぞれGFP発現カセット(SpeI-NheI)で置換することによりプラスミドGT9012及びGT9013を生成した。

【図45】組み込み可能な第VIII因子カセットを含むミニアデノウイルスベクターの設計。この構築体中に存在する複製及びパッケージ化に必要なミニAd要素はAd IT

R及びパッケージ化シグナルである。第V I I I因子カセットは2つのA A V I T Rの間に含まれる。R e p発現カセットはこの組み込み可能なセグメントの外側に位置する。R e pの発現はリプレッサー t e t - K R A Bを安定に発現する細胞系のT e tオペレーターで調節することができる。標的細胞において、R e pの発現は、A A V I T Rが隣接する配列の染色体19のA A V S 1部位を標的とする組み込みをもたらすはずである。

【図46】293及びチャン(C h a n g)肝細胞におけるR e pタンパク質の免疫沈殿。10cmペトリ皿において成長させた細胞に10mgのプラスミドG T 9 0 0 1、G T 9 0 0 3、及びG T 9 0 0 4を形質移入した(プラスミドの構築に関する詳細は図31を参照)。非形質移入細胞及びG T 9 0 0 4形質移入細胞を陰性対照として用いた。形質移入の2日後、細胞を溶解し、プロテインG-アガロースに結合させた抗-R e pモノクローナル抗体(クローン226.7; A R P、ベルモント、M A 0 2 1 7 8)を用いてR e pタンパク質を免疫沈殿させ、10%ポリアクリルアミドゲルに流して、免疫沈殿において用いたものと同じ抗体で免疫プロットした。タンパク質を化学発光(E L Cキット、アマシャム(A m e r s h a m))により可視化した。R e p 7 8及びR e p 5 2タンパク質の移動が示される。

【図47】プラスミドG T 9 0 0 3又はG T 9 0 0 4を形質移入した293クローンのサザンプロット。幾つかのn e o耐性クローンに加えてn e o耐性集団(プールで示される)からの15mgのゲノムDNAをE c o R Iで消化して電気泳動し、ナイロンメンブラン(ハイボンド-N(H y b o n d - N)、アマシャム)にプロットして8KbのE c o R I - E c o R I断片にわたるA A V S 1プローブにハイブリダイズさせた。正常なA A V S 1遺伝子座が示される(パネルA)。幾つかのG T 9 0 0 3クローンはバンドのずれを示し、これはA A V S 1遺伝子座のうちの1つの破壊に相当する。パネルBはn e o配列に再度ハイブリダイズされた同じメンブランを示す。

【図48】プラスミドG T 9 0 1 2又はG T 9 0 1 3を形質移入した293クローンのサザンプロット。条件は図33に記述される通りである。A)A A V S 1サザンプロット。プラスミドG T 9 0 1 2から誘導されたクローンの幾つかがA A V S 1の再編成を示す。B)幾つかのプロットをG F P配列に再度ハイブリダイズさせた。

【図49】A A V S 1 P 1ゲノムクローンのサザンプロット分析。P C R [A A V S 1 P C R (+)]によってA A V S 1配列が検出された(P 1クローン6576、P 1クローン6577、P 1クローン6578、及びP 1クローン6579と呼ばれる)4つのP 1ゲノムクローンからプラスミドDNA(1µg)を単離し、E c o R I(図23A)又はE c o R Vと組み合わせたE c o R I(図23B)で消化し、1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブラン(ハイボンドN+、アマシャム)にプロットし、253bpのA A V S 1 P C R産物をプローブとして用いてハイブリダイズした。A及びBの両者において、レーン1はP 1クローン6576を表し、レーン2はP 1クローン6577を表し、レーン3はP 1クローン6578を表し、且つレーン4はP 1クローン6579を表す。

【図50】p A A V S 1 - N e oベクターの構築。A A V S 1組み込み配列を含む8.2kbのE c o R I断片をP 1クローン6576から単離し、N e o発現ベクターp G K n e oのE c o R I部位にライゲートしてp A A V S 1 - N e oを作製した。

【図51】ヒトA A V S 1組み込み配列を有するトランスジェニックマウスの生成。トランスジェニックマウスの生成に関する工程の列が図示される。E S細胞にA A V S 1プラスミドクローンを形質移入して胚盤胞に微量注入した後、それらを仮母に移植した。約17日後、キメラマウスをC 5 7 B L / 6と交雑育種し、子孫をA A V S 1導入遺伝子の存在について試験した。陽性子孫の交雑育種を行い、導入遺伝子がホモ接合している系を生成した。次いで、これらのモデルをアデノ関連ウイルス組み込み系を含むように改変されたミニA dベクターのイン・ピボ送達を試験するのに用い、このベクターDNAの部位特異的組み込みの効率を評価した。

【図52】p A A V S 1 - N e oを形質移入した後のN e o^R E S細胞クローンのP C R分析。17のN e o^R E S細胞クローン(3.1-3.17)及び非形質移入親E S

細胞から独立に単離されたゲノムDNAをAAVS1特異的プライマーU2493及びL2722を用いてPCRによりスクリーニングし、AAVS1配列を有するNeoRクローンを確認した。これらのPCR反応試料を以下のように1.5%アガロースゲルにのせた：レーン1 - 1 kb DNAサイズマーカー（ギブコ/BRL）；レーン2 - pAAVS1 - Neoプラスミド対照；レーン3 - 非形質移入ES細胞DNA；レーン4乃至20 - 17の個々のpAAVS1Neo形質移入Neo^R ES細胞クローン。

【図53】AAVS1 PCR(+) ES細胞クローンのサザンブロット分析。2つのAAVS1 PCR(+) ES細胞クローン（ES#4及びES3.16）及び親ES細胞に由来するゲノムDNAをEcoRVと組み合わせたEcoRIで消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、ハイボンドN+ナイロンメンブランにブロットし、8.2 kbのAAVS1プローブとハイブリダイズさせた。レーン1 - AAVS1 ES#4；レーン2 - AAVS1 ES#3.16；レーン3 - 親ES細胞。AAVS1配列全体をES細胞ゲノムに組み込んだ結果生じる、予想される断片は、5.2及び3.0 kbである。

【図54】AAVS1キメラマウス。AAVS1 ES#4細胞を用いる胚盤胞微量注入実験から得られた2匹の高パーセンテージトランスジェニック（キメラ）マウス。ES幹細胞を用いて生成した動物においては、キメラ現象の程度の高さは導入遺伝子の伝達の可能性の高さと相関する。

【図55】キメラマウスにおいてAAVS1導入遺伝子を検出するためのPCR分析。ゲノムDNAをAAVS1キメラの尾及び、独立に、非キメラ同腹子から単離し、AAVS1特異的プライマーU2492及びL2722を用いてPCRによりスクリーニングした。PCR反応物を以下のように1.5%アガロースゲルにのせた：レーン1 - 1 kg DNAサイズマーカー；レーン2 - pAAVS1 - Neoプラスミド対照C；レーン3 - 非形質移入親ES細胞DNA；レーン4 - AAVS1 ES#4細胞DNA（4）；レーン5 - 非キメラ同腹子からの尾のDNA；レーン6 - 低パーセンテージキメラ（10%未満のアグーチコート色）からの尾のDNA；レーン7 - 高パーセンテージAAVS1キメラ（90%を上回るアグーチコート色）からの尾のDNA。予想PCR産生物 = 253 bp。

【図56】hFVIIマウス寛容化ベクターの構築。7.2 kbの完全長hFVII遺伝子をNotIを用いてGT2051から切り出し、GT2057のNotI部位にクローン化してGT2058におけるmAFP - FVIIカセットを生成した。次に、このmAFP - hFVIIカセットをAatII及びSalI断片を用いてGT2058から切り出し、pGKNeoのAatII/XhoIにクローン化してmAFP - hFVII - pGKNeo（GT2062）を生成した。

【図57】mAFP - hFVII - pGKNeo ES細胞クローンのサザンブロット分析。非形質移入親ES細胞及び4つのNeoR ESクローンに由来するゲノムDNAをXbaIで消化し（図29を参照）、電気泳動し、ブロットし、完全長hFVII NotI断片をプローブとして用いてハイブリダイズさせた。図に示されるように、mAFP - hFVIIカセットの挿入を示す予想断片サイズは7.8 kbであった。

【図58】mAFP - EGFP - 1ベクターの構築。AFPプロモーター/エンハンサー領域全体を含む7.5 kbのEcoRI/SalI断片をpEGFP - 1ベクター（クローンテック）のEcoRI/SalIにクローン化し、pAFP - EGFP - 1を作製した。

【図59】免疫という結果をもたらすことなくhFVIIのイン・ビボ送達を試験するためにhFVIIに対して子宮内で寛容化されたトランスジェニックマウスの生成スキーム。トランスジェニックマウスの生成に関する工程の列が図示される。a - 胎児タンパク質プロモーターに作動可能に連結するFVII cDNAを含むAFP - hFVII - Neoプラスミドが形質移入されたES細胞を胚盤胞に微量注入し、それを仮母に移植する。約17日後、キメラマウスをC57BL/6マウスと交雑育種し、子孫をAFP - hFVII導入遺伝子の存在について試験する。陽性子孫の交雑育種を行い、導入遺伝子がホモ接合している系を生成した。これらのモデルを、ヒトFVII発現カセットを含むように改変されたミニAdベクターのイン・ビボ送達の試験に用いる。

【図60】緑色蛍光タンパク質（GFP）に対して寛容化されたトランスジェニックマウスの生成において用いられるRIP-EGFPベクター。BSプラスミドに由来するRIP-pEGFPの制限酵素マップが示される。このプラスミド（4855bp）は、ラットインシュリンプロモーターに作動可能に連結する緑色蛍光タンパク質（GFP）コーディング領域を含む。このインシュリンプロモーターは、膵臓組織におけるGFPの発現の駆動のためにこの構築体において用いられた。

【図61】FVIIIカセットを含むエピソームミニアデノウイルスベクターの構造。このミニAdベクターは、このウイルスベクターが標的細胞に侵入した後に、エピソーム維持機構及びFVIII発現カセットを含む環状プラスミド構造が形成されるように設計される。このベクターの一般的な構造は以下の成分：（a）組換え発現カセット；（b）複製起点；（c）ヒトFVIII cDNA；（d）リコンビナーゼ標的部；（e）アデノウイルスITR；及び（f）スタファー（Stuffer）DNA配列を有する。

【図62】第1バージョンの抗癌性超Ad（super-Ad）ベクターの一般的な構造。このウイルスベクターはAdヘルパーと癌抑制及び抗癌性免疫調節のための複数の遺伝子とを含む超-Adからなる。送達のために選択された遺伝子が図中に示される。

【図63】第2生成抗癌性超Adベクターの一般的な構造。このウイルスベクターはAdヘルパーと癌抑制及び抗癌性免疫調節のための複数の遺伝子とを含む超Ad-からなる。その一般的な構造はこれらのベクターの第1バージョンに類似する。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/04	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 7
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/68	C 1 2 N 5/00	B

- (72)発明者 ラモン アレマニー
 アメリカ合衆国 6 0 0 3 0 イリノイ州 グレイスレイク ナンバー 2 0 4 カントリー ドライブ 1 9 0 4
- (72)発明者 イファン ダイ
 アメリカ合衆国 6 0 0 3 0 イリノイ州 グレイスレイク ナンバー 3 0 4 カントリー ドライブ 1 9 0 8
- (72)発明者 スティーブン ジョセフス
 アメリカ合衆国 6 0 0 3 0 イリノイ州 グレイスレイク クレアウッド サークル 3 6 6
- (72)発明者 クリステイナ バラーグ
 アメリカ合衆国 6 0 0 3 0 イリノイ州 グレイスレイク ナンバー 2 0 4 カントリー ドライブ 1 9 0 4
- (72)発明者 デイヴィッド アヤレス
 アメリカ合衆国 6 0 0 4 6 イリノイ州 リンデンハースト ハイ ポイント ドライブ 2 1 8 6
- (72)発明者 リチャード シュナイダーマン
 アメリカ合衆国 6 0 0 7 4 イリノイ州 パラタイン ナンバー 6 ペンシルヴェニア ドライブ 6 3 8

F ターム(参考) 2G045 AA13 CA25 DA36 FA11 FA18 FB12
 2G054 AA08 CA22 EA03 GA04
 4B024 AA01 AA20 BA80 DA02 DA03 DA20 EA02 FA02 FA10 FA20
 GA11 HA17 HA20
 4B063 QA01 QQ02 QQ08 QQ42 QQ79 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42
 QR56 QR62 QS16 QS25 QS34 QS36 QX01 QX02
 4B065 AA91X AA93X AA93Y AA95X AA95Y AB01 AC14 AC20 BA02 BA16
 BA25 BA30 CA24 CA43 CA44 CA46
 4C084 AA13 MA66 NA14 ZA532
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZA53
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA14 ZA53

专利名称(译)	迷你腺病毒载体		
公开(公告)号	JP2005000172A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2004199828	申请日	2004-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	巴克斯特国际公司		
申请(专利权)人(译)	巴克斯特国际公司		
[标]发明人	ウエイウェイザン ラモンアレマニー イファンダイ スティーブンジョセフス クリステイナバラーク デイヴィッドアヤレス リチャードシュナイダーマン		
发明人	ウェイ-ウェイ ザン ラモン アレマニー イファン ダイ スティーブン ジョセフス クリステイナ バラーク デイヴィッド アヤレス リチャード シュナイダーマン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/43 A61K48/00 A61P7/04 C07K14/755 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12N15/34 C12N15/85 C12N15/861 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C12N15/8509 A01K67/0278 A01K2207/15 A01K2217/00 A01K2217/05 A01K2217/075 A01K2217/20 A01K2267/0306 A61K38/00 A61K48/00 C07K14/755 C12N15/86 C12N2710/10343 C12N2800/108 C12N2800/30 C12N2810/859 C12N2830/003 C12N2830/008 C12N2830/38 C12N2830/85 C12N2840/20 C12N2840/203 C12N2840/206		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/711 A61K35/76 A61K48/00 A61P7/04 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/68 C12N5/00.B A61K35/761 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/85.P C12N15/85.Z C12N15/86.P C12N15/86.Z C12N5/00.102 C12N5/00.202.C C12N5/0735 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA18 2G045/FB12 2G054/AA08 2G054/CA22 2G054/EA03 2G054/GA04 4B024/AA01 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA20 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/HA17 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA16 4B065/BA25 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA532 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA53 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA53 4B065/AA29		
代理人(译)	三好秀		
优先权	08/658961 1996-05-31 US 08/791218 1997-01-31 US		

