

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 538842

(P2002 - 538842A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZCC	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	ZCC A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 81数)

(21)出願番号	特願2000 - 605794(P2000 - 605794)	(71)出願人	ダイナ - ファ-パー キャンサー インス ティチュ-ト, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセツ 0211 5, ボストン, ピニー ストリ-ト 44
(86)(22)出願日	平成12年3月16日(2000.3.16)	(72)発明者	マラスコ, ウェイン エイ. アメリカ合衆国 マサチューセツ 0218 1, ウェレスレイ, ライス ストリ-ト 43
(85)翻訳文提出日	平成13年9月11日(2001.9.11)	(72)発明者	オグエタ, サンドラ アメリカ合衆国 マサチューセツ 0214 6, ブルックライン, ビ-コン ストリ- ト 1440, アパートメント 205
(86)国際出願番号	PCT/US00/07064	(74)代理人	弁理士 山本 秀策
(87)国際公開番号	W000/55378		
(87)国際公開日	平成12年9月21日(2000.9.21)		
(31)優先権主張番号	60/124,641		
(32)優先日	平成11年3月16日(1999.3.16)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 大量のスクリーニングのためのレンチウイルスベクター系

(57)【要約】

潜在的な標的分子の群由来の標的分子についてのスクリーニング方法が記載される。本方法は、レンチウイルスベクターのライブラリーの使用を含む。ここでこの群は標的分子の群をコードし、次いで細胞の群を形質導入し、そして所望の表現型について形質導入された細胞をスクリーニングする。所望の表現型を示す細胞を選択し、そして標的分子を同定する。本発明の方法は、複数のレンチウイルスピリオンで複数の細胞を形質導入する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的分子の群から標的分子についてスクリーニングするための方法であって、以下：

(a) 複数のレンチウイルスビリオンで複数の細胞を形質導入する工程であって、ここで該レンチウイルスビリオンは、少なくとも以下：

(1) レンチウイルスgagタンパク質をコードするレンチウイルスgag遺伝子を含む、1つのベクターであって、ここで該レンチウイルスgag遺伝子は、プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結されている、1つのベクター；(2) 機能的エンベロープタンパク質をコードするenv遺伝子を含む、第2のベクターであって、ここで該env遺伝子は、プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結されている、第2のベクター；および(3) 初めの2つのベクターのうちの1つ、または少なくとも第3のベクター上に、レンチウイルスpolタンパク質をコードする、レンチウイルスpol遺伝子であって、ここで該レンチウイルスpol遺伝子は、プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結されている、レンチウイルスpol遺伝子であって、

ここで該ベクターは、単一のベクター上に、レンチウイルスgagおよびpolならびにエンベロープタンパク質をコードするのに十分なヌクレオチドを含まず；そして

ここで該ベクターは、レンチウイルスRNAを効率的にパッケージングするためのパッケージングセグメントと呼ばれるレンチウイルスゲノムのヌクレオチドを含まず；そしてここで、該レンチウイルスタンパク質およびエンベロープタンパク質が組み合わされて発現される場合、レンチウイルスカプシドの付近にエンベロープタンパク質を含むレンチウイルスビリオンを形成する；ならびに(4) 複数の標的分子より選択される標的分子をコードする核酸配列を含む、パッケージングベクターであって、ここで該核酸配列は、プロモーターおよびレンチウイルスパッケージング配列に作動可能に連結されており、該パッケージング配列は、該レンチウイルスビリオン内に該レンチウイルスRNAをパッケージングするために必要なレンチウイルス長末端繰り返し(LTR)配列の部分を含み；ここで該ビリオンがさらにマーカー遺伝子を含む、パッケージングベクター、

をプロデューサー細胞に同時トランスフェクトすることによって産生される工程；

(b) 該マーカー遺伝子によって発現されたマーカーの存在についてのスクリーニングによって形質導入された細胞を同定する工程；

(c) 所望の表現型を示す細胞についてスクリーニングする工程；ならびに

(d) 所望の表現型を示す細胞内に存在する標的分子を同定する工程、

を包含する、方法。

【請求項2】 前記env遺伝子がレンチウイルスゲノムに対して異種である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記標的分子が誘導プロモーターに作動可能に連結されている、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記レンチウイルスが、霊長類レンチウイルス、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ビスナウイルス、またはウマ伝染性貧血ウイルスである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記標的分子が、アンチセンス分子、リボザイム、抗体、レセプター、サイトカイン、新脈管形成モジュレーションまたは成長ホルモンである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記標的分子が細胞内での発現および結合のために適応された抗体である、請求項3に記載の方法。

【請求項7】 前記誘導プロモーターがtetR-tetOプロモーターである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記レンチウイルスがヒト免疫不全ウイルス(HIV)である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記リボザイムまたは前記アンチセンス分子がトランススプライシング可能である、請求項5に記載の方法。

【請求項10】 前記標的分子が、アンチセンス分子、リボザイム、抗体、レセプター、サイトカイン、新脈管形成モジュレーションまたは成長ホルモンである、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 前記標的分子が抗体である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記抗体が結合するタンパク質を同定する工程をさらに包

含する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記env遺伝子がエンドサイトーシス画分を標的化するエンベロープタンパク質をコードする、請求項2、5、6、8、10、11、または12に記載の方法。

【請求項14】 前記env遺伝子がVSV-G env遺伝子である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記レンチウイルスが霊長類レンチウイルスである、請求項4に記載の方法。

【請求項16】 前記霊長類レンチウイルスが、ヒト免疫不全ウイルスとSHIVと呼ばれるサル免疫不全ウイルスのハイブリッドである、請求項15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、国立衛生研究所助成金5PO HL59316-02および5P30 AI28691-10により一部資金提供された。米国政府は、本発明に対して一定の権利を有する。

【0002】**(発明の分野)**

本発明は、ベクター系に関する。このベクター系では、複数のレンチウイルスベクターが、宿主細胞に大量の核酸セグメント(ライブラリー)を移入するために使用される。好ましくは、この系は、核酸セグメントを発現するために誘導可能な発現系を使用し、そしてレンチウイルスベクターは、偽型(pseudotyped)レンチウイルスベクターである。なおより好ましくは、この系は、細胞内で発現されかつ細胞内でその標的抗原(イントラボディー(intrabody))に結合する抗体をコードする核酸セグメントを使用する。

【0003】**(発明の背景)**

近年、かなりの試みが遺伝子送達技術の適用に向けられている。この期間、種々の異なる物質を細胞に送達するために、生物工学的組換え技術を使用する広範な種々の方法が記載されている。これらの方法としては、例えば、ウイルスベクターのようなベクター、リポソーム、裸のDNA、アジュバント補助DNA(adjutant-assisted DNA)、遺伝子銃、カテーテルなどが挙げられる。使用される種々の技術は、移入される遺伝子およびそれ故の目的に、一部依存する。従って、例えば、より長い間永続的でさえある遺伝子発現が所望される状況とは対照的に、わずかに短期間の遺伝子発現が所望される状況が存在する。

【0004】

探求されていたベクターとしては、DNAウイルスベクターおよびRNAウイルスベクターの両方が挙げられる。例えば、DNAベクターとしては、以下が挙げられる：オルトボックスまたはトリボックスベクター(例えば、米国特許第5

、656、465号を参照のこと)のような、ポックスベクター；単純ヘルペスウイルスI(HSV)ベクターのような、ヘルペスウイルスベクター[Geller, A. I.ら、J. Neurochem. 64:487(1995); Lim, F.ら、DNA Cloning: Mammalian Systems、D. Glover編、Oxford Univ. Press、Oxford、England(1995); Geller, A. I.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:7603(1993)]; アデノウイルスベクター[Legal Lasalleら、Sci. 259-988(1993); Davidsonら、Nat. Genet. 3:219(1993); Yangら、J. Virol.、69:2004(1995)]; ならびに、アデノ随伴ウイルスベクター[Kaplitt, M. G.ら、Nat. Genet. 8:148(1994)]。レトロウイルスベクターとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)およびヒト免疫不全ウイルス(HIV)[米国特許第5,665,577号を参照のこと]が挙げられる。

【0005】

多くの注目が、特にインビボ治療(例えば、体細胞治療または直接的インビボ適用における)のためのウイルスベクターの使用に焦点をあててきたが、他の適用が存在する。

【0006】

例えば、レトロウイルスベクターは、宿主細胞に感染し、そして遺伝物質をその宿主細胞内に高い効率で組み込ませるために使用され得る。このようなベクターの1つの例が、改変モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)であり、これは、レトロウイルスゲノム全体のパッケージングを妨げるために、欠失されたそのパッケージング配列を有している。しかし、このレトロウイルスは、休止している細胞を形質導入しない。さらに、多くのレトロウイルスは代表的に、特定のレセプターを介して細胞に進入するので、その特定のレセプターが、細胞上に存在しないかまたは十分多数では存在しない場合、その感染は可能でないか、または非効率的であるかのいずれかである。懸念は、組換えMMLV産生細胞株からの野生型ウイルスの出現の結果(すなわち、復帰変異)としても表される。

【0007】

近年、注目は、霊長類レンチウイルス（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）およびサル免疫不全ウイルス（SIV））に基づくベクターのような、レンチウイルスベクターに焦点をあてている。HIVベクターは、分裂細胞に加えて休止細胞に感染し得る。さらに、偽型ベクター（すなわち、異なる種由来のエンベロープタンパク質を使用するベクター）を使用することにより、広範な細胞型に感染する際に遭遇する問題は、感染することが所望される細胞に基づいた特定のエンベロープタンパク質を選択することによって克服され得る。さらに、レンチウイルス（例えば、HIV）において見られる複雑な遺伝子スプライシングパターンを考慮すると、レンチウイルスコア（例えば、HIVコア）を有する多価ベクター（すなわち、複数遺伝子を発現するベクター）は、より効率的であると予期される。HIVに基づくベクターが提供するこの利点にも関わらず、HIV感染の重篤度の観点から、HIVベクターの使用に伴う懸念がなお存在する。従って、野生型ウイルスへの復帰の可能性が低い、さらなる弱毒化形態を提供するための手段が所望される。

【0008】

複数の改変をなすバリエーション（例えば、*nef*、*rev*、*vif*、および *vpr* 遺伝子の欠失）が、作製され得る。1つには、3'および5'のU3欠失LTRもまた有し得る。

【0009】

しかし、このような場合、ベクターは、単一の異種遺伝子または少群の遺伝子を送達することが意図される。

【0010】

近年では、発現配列タグ（EST）の使用のような進歩が、多数の遺伝子、推定遺伝子およびそれらの発現産物の同定へと導いた。ヌクレオチド配列とアミノ酸の比較は、これらの遺伝子、推定遺伝子、および発現産物の分類へと導き得るが、しばしば、この遺伝子産物の特定機能は未知なままである。このような遺伝子および遺伝子産物の機能を同定するための迅速な手段を有することが所望される。

【0011】

Marascoらは、細胞内で抗体を発現させ得、そしてその抗体をその細胞内の標的に結合させ得る方法を発見した [MarascoおよびHaseltineに対する米国特許第5,851,829号を参照のこと]。これらの細胞内で発現される抗体 (イントラボディー) は、機能ゲノム学 (functional genomics) の方法において使用され得る。この方法では、遺伝子産物を発現する特定の未知の遺伝子を採用し得、この遺伝子産物を使用してこの遺伝子産物に対する抗体を生成し得、そして細胞内でこの抗体を使用して細胞内の推定タンパク質を「ロックアウト」し得る。従って、インビボ系およびインビトロ系の両方において、その遺伝子産物の欠損が細胞に対して有する影響を決定するために、その細胞をコントロールと比較し得る。この方法は、特異的抗原およびその抗原に対する抗体の生成を必要とする。特定の群の多数のメンバーを用いて、このアプローチの効率を利用する方法を有することが所望される。

【0012】

近年では、関連した群の複数のメンバーからなる大きなライブラリーを開発することに関心が寄せられている。例えば、抗体 (代表的には、モノクローナル抗体) のライブラリー。例えば、抗原結合抗体フラグメントが、糸状ファージの表面において発現され [G. P. Smith, Science 228:1315 (1985)]、そしてこのような抗体の大きなライブラリー (例えば、 10^7 以上のメンバー) (ファージディスプレイライブラリーと呼ばれる) を作製するために使用されている。

【0013】

ファージディスプレイライブラリーでは、F_dまたはF_v領域のカルボキシル末端を、ファージコートタンパク質のフラグメントに固着し、このフラグメントが、例えば、Fabフラグメントをファージ表面に固定する。抗原結合部位は、V_H-ドメインおよびV_L-ドメインの組み合わせから形成される。ファージディスプレイライブラリーは、アフィニティークロマトグラフィーによって [R. P. Hawkinsら、J. Mol. Biol. 226:889 (1992)] または抗原をコーティングした表面に対してファージをパニングすることによ

て[C. F. Barbasら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363(1991)]、特異的抗原への結合について選択され得る。抗体は、特異的タンパク質へのアフィニティー結合によって選択される。しかし、抗原が未知の機能を有する場合、この方法論は、このタンパク質の機能の決定を可能としない。

【0014】

特定の機能を生じる任意の分子を探索し得、そしてその分子(例えば、タンパク質)を迅速に決定し得る方法を有することが、非常に所望される。上記のことを、所望の分子の迅速な同定を可能にする自動化された様式で実施し得ることが、非常に所望される。

【0015】

(発明の要旨)

本発明者らはここに、分子の大きなプールの中から、所望の機能を生じる分子を同定および獲得するための方法を発見した。本方法は、複数のベクターを使用することを包含し、ここでこのベクターの群は、複数の異なる標的分子を含む。この標的分子は、多様性(例えば、遺伝的多様性)を有する任意の分子であり得る。この分子は、抗体のようなタンパク質、増殖因子、レセプター、サイトカイン、ペプチド、リボザイム、およびアンチセンス分子であり得る。好ましくは、標的分子は、抗体のようなタンパク質をコードする遺伝子である。より好ましくは、核酸配列が、誘導可能なプロモーターに作動可能に連結される。このベクターは、複数の細胞を形質導入するために使用され得る。好ましくは、ベクターは、迅速な同定および形質転換細胞の選択を可能にするためのマーカー遺伝子を含む。その後、これらの細胞は、所望の表現型を示す細胞を同定するためにスクリーニングされる。所望の表現型を示す細胞が選択され、そしてこの表現型を生じる特定の標的分子が同定される。

【0016】

1つの好ましい実施形態では、複数のベクターは、レンチウイルスベクターである。これらのレンチウイルスベクターは、好ましくは選択可能マーカーを含む。

【0017】

レンチウイルスベクターとしては、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）（例えば、HIV-1およびHIV-2）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、またはビスナウイルスが挙げられる。このようなレンチウイルスコア（例えば、gag）を含むベクターは、分裂細胞および非分裂細胞の両方を形質導入し得る。

【0018】

レンチウイルスビリオン（粒子）は、ビリオン（ウイルス粒子）を生成するために必要なウイルスタンパク質をコードするベクター系によって発現される。好ましくは、プロモーターに作動可能に連結された、逆転写および組み込みに必要とされるレンチウイルスpolタンパク質をコードする核酸配列を含む少なくとも1つのベクターが存在する。好ましくは、polタンパク質は、複数のベクターによって発現される。プライマーに作動可能に連結された、ウイルスカプシド形成に必要とされるレンチウイルスgagタンパク質をコードする核酸配列を含むベクターもまた存在する。1つの実施形態では、gag-pol遺伝子は、同一ベクター上にある。好ましくは、gag核酸配列は、少なくともいくつかのpol核酸配列とは別個のベクターにあり、なおより好ましくは、polタンパク質をコードするすべてのpol核酸配列とは別個のベクターにある。

【0019】

1つの実施形態では、gag配列は、機能的MAタンパク質を発現しない（すなわち、ミリスチル化アンカーが提供される場合に、このベクターはなお、MA全体またはその部分の非存在下において細胞を形質導入し得る）。これは、MAをコードする領域の付加、置換、または欠失によって、MAをコードする「遺伝子」を不活化することによって達成され得る。好ましくは、これは欠失によって実施される。好ましくは、少なくとも25%のMAコード領域が欠失され、より好ましくは、少なくとも50%が欠失され、なおより好ましくは、少なくとも60%、さらにより好ましくは、少なくとも75%、なおより好ましくは、少なくとも90%、なおより好ましくは、少なくとも95%、そして最も好ましくはコード領域全体が欠失される。しかし、この実施形態において、ミリスチル化アン

カー（配列）はなお必要とされる。好ましくは、ミリスチル化配列は、異種（すなわち、非レンチウイルス）配列である。

【0020】

別の実施形態では、レンチウイルスベクターは、3'長末端反復領域（LTR）における欠失の結果として、自己不活化（SIN）ベクターのアンカー形態である。好ましくは、このベクターは、ウイルスプロモーターにおいて欠失を含む。レンチウイルスのLTR（例えば、HIV LTR）は、ウイルスプロモーターを含む。このプロモーターは比較的非効率的であるが、例えば、tatによってトランス活性化される場合には、このプロモーターは効率的である。なぜなら、tat-媒介トランス活性化が、約100倍転写率を増加させるからである。しかし、ウイルスプロモーターの存在は、導入遺伝子に作動可能に連結された異種プロモーターを干渉し得る。このような干渉を最小化するため、そして導入遺伝子の発現をより良好に調節するために、レンチウイルスプロモーターは、好ましくは欠失される。

【0021】

好ましくは、このベクターは、ウイルスプロモーター内に欠失を含む。そのウイルスプロモーターは、3'LTRのU3領域に存在する。好ましい欠失は、ScalI部位とPvuI部位との間の120塩基対である欠失である（例えば、HIV-1プロウイルスクローンHXB2のヌクレオチド9398-9518に対応し、HIV-1LTRプロモーターの必須コアエレメント（TATAボックス、SP1およびNF- κ B結合部位）を含む）。逆転写後、この欠失は、5'LTRへ転移されて、複製の次の回転（round）において5'LTRからのベクター転写物を合成し得るベクター/プロウイルスを得る。従って、本発明のベクターはウイルスタンパク質を発現し得ないので、そのベクターは、ウイルスが複製し得る機構を含まない。

【0022】

別の実施形態において、このベクターは、tat欠失ベクターである。これは、公知の技術（例えば、tatの少なくとも第1エキソンを欠失させること）によって、tatの少なくとも第1エキソンを不活化することによって達成され得

る。あるいは、TARエレメントを除去するために、U3LTR欠失をR領域へ伸長し得る。

【0023】

レンチウイルスベクターが、野生型レンチウイルスと比較して複数の改変を有する場合、バリエーションが作製され得る。例えば、HIVについては、nef-、rev-、vpu-、vif-およびvpr-である。さらに、MA-gag、3'および5' U3欠失LTRならびにそれらのバリエーションを有し得る。

【0024】

このベクターは、レンチウイルスRNAをパッケージするレンチウイルスゲノム（レンチウイルスパッケージング配列と呼ばれる）に由来するヌクレオチドを含まない。HIVにおいて、この領域は、5' 主要スプライドナーとgag遺伝子開始コドン（ヌクレオチド301～319）との間の領域に対応する。

【0025】

粒子を形成するenv、gagおよびpolベクターは、エンベロープタンパク質を発現するレンチウイルスゲノムに由来する核酸配列を好ましくは含まない。好ましくは、個々のベクターは、使用されるプロモーターと作動可能に連結されるエンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含む。このenvベクターはまた、レンチウイルスパッケージング配列を含まない。一つの実施形態において、このenv核酸配列は、レンチウイルスエンベロープタンパク質をコードする。

【0026】

別の実施形態において、このエンベロープタンパク質は、レンチウイルス由来ではないが、異なるウイルスに由来する。結果として生じる粒子は、偽型粒子と呼ばれる。エンベロープの適切な選択によって、実質的に任意の細胞に「感染」させ得る。従って、そのベクターは、特定の細胞に対して容易に標的化され得る。例えば、インフルエンザウイルス、VSV-G、ウイルス（セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス）アレナウイルス（リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス）、フラビウイルス（ダニ媒介脳炎ウイルス、デング熱ウイルス）、ラブドウイル

ス（水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）、およびオルトミクソウイルス（インフルエンザウイルス）の例えばエンドサイトーシス画分を標的とするエンベロープタンパク質をコードするenv遺伝子を使用し得る。

【0027】

好ましいレンチウイルスは、霊長類のレンチウイルス [米国特許第 5 , 6 6 5 , 5 7 7 号] またはネコ免疫不全ウイルス (F I V) [P o e s c h l a , E . M . ら、Nat . M e d i c i n e 4 : 3 5 4 - 3 5 7 (1 9 9 8)] である。pol / gag 核酸セグメントおよびenv核酸セグメントは、発現された場合に、空のレンチウイルス粒子を産生する。上記の改変（例えば、tatコード領域、MAコード領域、またはLTRのU3領域を欠失させること）をすることによって、野生型ウイルスへの先祖返りの可能性が減少される。

【0028】

異種核酸セグメントの所望のファミリー（しばしば、標的分子として言及される）は、各々が目的の核酸セグメントおよびレンチウイルス粒子内へレンチウイルスRNAをパッケージするために必要なレンチウイルスパッケージング配列を含む、複数のベクター（パッケージングベクター）の使用によって、空のレンチウイルス粒子内へ挿入され得る。好ましくは、パッケージングベクターは、5' および3' レンチウイルスLTRの間に挿入される所望の核酸セグメントを有する5' および3' レンチウイルスLTRを含む。核酸セグメントは、アンチセンス分子であり得るか、またはより好ましくは、抗体のようなタンパク質をコードする。パッケージングベクターは、好ましくは選択マーカを含む。これらは、当該分野において周知であり、そして例えば、栄養分、抗生物質などのような刺激物に対する細胞の感受性を変える遺伝子を含む。遺伝子は、neo、puro、tk、多重薬物耐性（MDR）などに対する遺伝子を含む。他の遺伝子は、例えば緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）、ルシフェラーゼ、LacZ、神経成長因子レセプター（NGFR）などについて容易にスクリーニングされ得るタンパク質を発現する。

【0029】

誘導性プロモーターが標的分子と共に使用される場合、標的分子が「沈黙」さ

せられる形質転換細胞に対して最少の選択圧が用いられる。従って、マーカーを表示する細胞の同定はまた、標的分子を発現し得る細胞を同定する。誘導性プロモーターが使用されない場合、「強制的発現」系を使用することが好ましく、ここで標的分子は、内部リボソームエントリ部位 (IRES) [Marascoら、PCT/US96/16531を参照のこと]の使用によって選択マーカーと連結される。

【0030】

IRES配列は、当該分野において公知であり、そして脳心筋炎 (encephalomyocarditis) ウイルス (EMCV) に由来する IRES 配列 [Ghattas, I. R. ら、Mol. Cell Biol., 11:5848-5849 (1991)]; BiPタンパク質 [MacejakおよびSarnow, Nature, 353:91 (1991)]; Drosophilaの Antennapedia遺伝子 (エキソンドおよびe) [Ohら、Gene & Dev., 6:1643-1653 (1992)]; ポリオウイルスにおける IRES 配列 [PelletierおよびSonenberg, Nature 334:320325 (1988)]; またMountfordおよびSmith, TIG, 11:179-184 (1985)を参照のこと]を含む。好ましくは、その標的分子は、誘導性プロモーターと作動可能に連結される。そのような系は、遺伝子発現の慎重な調節を可能にする。Miller, NおよびWhelan, J., Human Gene Therapy, 8:803-815 (1997)を参照のこと。そのような系としては、lacオペレーター保有哺乳動物細胞プロモーターに由来する転写を調節するための転写モジュレーターとしてE. coliに由来するlacリプレッサーを使用する系 [Brown, M. ら、Cell, 49:603-612 (1987)] およびテトラサイクリンリプレッサー (tetR) を使用する系 [Gossen, M. およびBujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551 (1992); Yao, Fら、Human Gene Therapy, 9:1939-1950 (1998); Shockelt, P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6522-6526 (1995)] が

挙げられる。他の系としては、エストラジオール、RU486、ジフェノールムリスレロン (mursilerone) またはラパマイシン [Miller および Whelan、図2にて前出] を使用するFK506ダイマー、VP16またはp65が挙げられる。誘導性系は、Invitrogen, Clontech およびAriadから入手可能である。オペロンを有するリプレッサーを使用する系が好ましい。標的細胞における導入遺伝子発現の調節は、遺伝子治療の重要な局面を表わす。例えば、転写活性化因子 (VP16) を有するテトラサイクリンリプレッサー (tetR) と結合したlacリプレッサーを使用して、哺乳動物細胞における遺伝子発現を制御するためのtetR-tetオペレーター系を作成するヒトサイトメガロウイルス (hCMV) 主要 (major) 即時性-初期プロモーターに由来するtetO-保有最少プロモーターを用いて、tetR-哺乳動物細胞転写活性化因子融合タンパク質、tTa (tetR-VP16) を作成し得る。最近、Yao およびその仲間 [F. Yaoら、Human Gene Therapy、前出] は、tetR-哺乳動物細胞転写因子融合誘導体よりもむしろテトラサイクリンリプレッサー (tetR) 単独が、テトラサイクリンオペレーターがCMVIEプロモーターのTATAエレメントに対して下流に適切に配置される場合、哺乳動物細胞における遺伝子発現を調節するための強力なトランス-モジュレーターとして機能し得ることを実証した。このテトラサイクリン誘導スイッチの一つの特定の利点は、それが、その調節可能な効果を達成するためにテトラサイクリンリプレッサー-哺乳動物細胞トランス活性化因子またはリプレッサー融合タンパク質 (これはいくつかの場合において細胞に対して毒性であり得る) の使用を必要としないということである [M. Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992); P. Shockettら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6522-6526 (1995)]。好ましくは、このリプレッサーは、IRES配列によって標的分子を連結される。好ましくは、誘導系は、tetR系である。より好ましくは、この系は、例えばCMVIEプロモーターを有するプロモーターのTATAエレメントの下流にテトラサイクリンオペレーターを有する。図4を参照のこと。

【0031】

使用される標的分子は、好ましくは、細胞内に発現されることが意図される抗体をコードする遺伝子を有する。抗体は、標的抗原の同定操作、精製操作および機能的操作のためのインビトロ手段として、生物医学科学において長い間使用されてきた。その上、抗体は、診断用途および治療用途のためにインビボで開発されてきた。抗体工学における最近の進歩は、現在、抗体をコードする遺伝子を操作することを可能にし、その結果、抗原結合ドメインが細胞内に発現され得る。ラージ (large) ヒト免疫グロブリンライブラリーの産物と結合される、抗体の特異的かつ高親和性結合特性および哺乳動物細胞内の正確な細胞内位置で安定に発現されるそれらの能力は、遺伝子治療用途のための強力な新しいファミリーの分子を提供してきた。これらの細胞内抗体は、「内抗体」と呼ばれる [W. Marascoら、Gene Therapy, 4:11-15 (1997)]。好ましくは、この遺伝子は、単鎖抗体をコードする。この分子は、好ましくはタグ (例えばHA) を含み、それゆえその分子は、後で同定され得る。

【0032】

この抗体は、好ましくは抗体のライブラリー (例えば、ファージディスプレイライブラリー) から得られる。

【0033】

その後、レンチウイルスベクターを使用して、宿主細胞を形質導入する。マーカーについてスクリーニングすることによって、形質導入された細胞を迅速に選択し得る。その後、形質導入された細胞を取得し得、そしてそれらを適切な条件下で増殖させるか、またはそれらの細胞 (例えば、脾臓細胞または生殖細胞) を宿主動物へ挿入し得る。

【0034】

プロモーターが誘導されて、次いで特定の表現型を表示する細胞および/または動物についてスクリーニングする。その分子上に含まれるタグを使用して (例えば、抗体)、その分子 (例えば、所望の表現型において生じた抗体) を獲得し得る。次いで、一つの例において、その抗体を使用してそれが結合する抗原を同定し得る (所望される場合)。

【0035】

この方法は、多数の分子を使用して任意のメンバーの特定の同一性を知るための第1の必要性 (n e e d i n g) を伴わずに、分子の多数の基に由来する所望の機能を提供する特定分子を同定し得る。

【0036】

(発明の詳細な説明)

本発明者らは、今や、分子の大きなプールから所望の機能を生じる分子を同定および得るための方法を見出した。この方法は、複数のベクターを使用する工程を包含し、ここでベクターの群は、複数の異なる標的分子を含む。標的分子は、多様性 (例えば、遺伝的多様性) を有する任意の分子であり得る。これらの分子は、タンパク質 (例えば、抗体、成長因子、レセプターおよびサイトカイン、ペプチドならびにアンチセンス分子) であり得る。好ましくは、標的分子は、タンパク質 (例えば、抗体) をコードする遺伝子である。より好ましくは、タンパク質は、誘導プロモーターに作動可能に連結されている。このベクターは、複数の細胞を形質導入するために使用され得る。好ましくは、ベクターは、形質転換された細胞の迅速な同定および選択を可能にするマーカー遺伝子を含む。従って、これらの細胞は、所望の表現型を示す細胞を同定するために、スクリーニングされる。所望の表現型を示す細胞を選択し、そしてその表現型において生じる特定の標的分子を同定する。

【0037】

1つの好ましい実施形態において、複数のベクターは、レンチウイルスベクターである。これらのレンチウイルスベクターは好ましくは、選択マーカーを含む。

【0038】

これらのレンチウイルスベクターとしては、例えば、ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、ネコ免疫不全ウイルス (F I V)、またはビスナウイルスが挙げられる。このようなレンチウイルスコア (例えば、g a g 遺伝子) を含むベクターは、分裂および非分裂細胞の両方を形質導入し得る。

【0039】

レンチウイルスのプレ統合 (preintegration) 複合体、レンチウイルスのファミリー (ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) を含む) は、核標的シグナルを保有することを示した。この核保有シグナルは、これらのウイルスがマクロファージを含む非分裂細胞を感染することを可能にする。非分裂細胞を安定に形質導入する HIV-1 ベクターの能力 [P. Lewis ら、EMBO J., 11:3053~3058 (1992); M. Burinsky ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6580~6584 (1992)] は、インビトロ [J. Reiser ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:15266~15271 (1996)]、またインビボ [L. Naldini ら、Science, 272:263~267 (1996)] で示された。従って、これらのベクターは、長期間の発現が可能である。

【0040】

HIV-1 に基づくベクターの第2の特徴は、HIV-1 エンベローブ糖タンパク質、gp160 を、他のウイルス (広がった宿主範囲を与え、その宿主範囲は、特的に標的化され得る) 由来のエンベローブタンパク質で置換することによって標的細胞の範囲を操作する能力である。例えば、小胞口のウイルス (VSV) - Gタンパク質のGタンパク質と HIV-1 ビリオンコアとの間の強い関連は、感染力の損失なしにウイルス粒子が濃縮されることを可能にし、そして HIV-1 ベクターストック (約 10^9 / ml の力価を有する) の産生を可能にした [J. Reiser ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:15266~15271 (1996); R. Akkina ら、J. Virol., 70:2581~2585 (1996); J. Yee ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:9564~9568 (1994)]。従って、レンチウイルスベクター (例えば、HIV-1 ベクター) を、臨床的に有用な程度まで開発し、そして分裂および非分裂細胞の両方の操作のためのインビボツールとしての注目に値する可能性を提供する。

【0041】

レンチウイルスビリオン (粒子) を、ビリオン (ウイルス粒子) を産生するた

めに必要なウイルスタンパク質をコードするベクター系によって発現する。好ましくは、逆転写および統合に必要なレンチウイルスp o l タンパク質をコードする核酸配列（プロモーターに作動可能に連結された）を含む少なくとも1つのベクターが存在する。好ましくは、このp o l タンパク質は、多重ベクターによって発現される。ウイルスカプシドの形成に必要なレンチウイルスg a g タンパク質をコードする核酸配列（プロモーターに作動可能に連結された）を含むベクターがまた存在する。好ましくは、このg a g 核酸配列は、少なくともいくつかのp o l 核酸配列とは、別のベクター上にあり、さらにより好ましくは、それはp o l タンパク質をコードする全てのp o l 核酸配列とは別のベクター上にある。

【0042】

多数の改変が、ベクターになされ、それらは野生型復帰突然変異体を得る機会をさらに最小化する粒子を作製するために使用され得る。これらは、L T R のU 3 領域の欠損、t a t 欠損およびマトリックス（M A ）欠損を含む。

【0043】

g a g、p o l およびe n v ベクターは、レンチウイルスゲノム由来のヌクレオチドを含まない。レンチウイルスゲノムは、レンチウイルスパッケージング配列と称されるレンチウイルスRNAをパッケージする。H I V において、この領域は、5' 主要スプライスライズドナーとg a g 遺伝子開始コドンとの間の領域（ヌクレオチド301～319）に一致する。

【0044】

粒子を形成するベクターは、好ましくは、レンチウイルスゲノム由来の核酸配列を含まない。このレンチウイルスゲノムは、エンベロープタンパク質を発現する。好ましくは、エンベロープタンパク質をコードする核酸配列（プロモーターに作動可能に連結された）を含む別のベクターが、使用される。このe n v ベクターはまた、レンチウイルスパッケージング配列を含まない。1つの実施形態において、このe n v 核酸配列は、レンチウイルスエンベロープタンパク質をコードする。

【0045】

別の実施形態において、このエンベロープタンパク質は、レンチウイルス由来

ではなく、異なるウイルス由来である。結果として起こる粒子は、偽型粒子と称される。エンベロープの適切な選択によって、実質的に全ての細胞を「感染」し得る。例えば、エンドサイトーシス区画（例えば、インフルエンザウイルス、VSV-G、ウイルス（Semliki forestウイルス、Sindbisウイルス）、アレナウイルス（リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス）、フラビウイルス（ダニ媒介脳炎ウイルス、デング熱ウイルス）、ラブドウイルス（水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）、およびオルトミクソウイルス（インフルエンザウイルス）のエンドサイトーシス区画）を標的化するエンベロープタンパク質をコードするenv遺伝子を使用し得る。好ましく使用され得る他のエンベロープとしては、Moloney Leukemia Virus（例えば、MLV-E、MLV-AおよびGALV由来のエンベロープ）が挙げられる。これらの後者のエンベロープは、宿主細胞が始原細胞である場合、特に好ましい。他のエンベロープタンパク質は、所望の宿主細胞に依存して選択され得る。例えば、標的的特異的レセプター（例えば、脳の送達についてのドパミンレセプター）。別の標的は、血管内皮であり得る。これらの細胞は、フィロウイルスエンベロープを使用して標的化され得る。例えば、エボラのGP（転写後修飾によってGP₁およびGP₂糖タンパク質となる）。別の実施形態において、偽型エンベロープを有する異なるレンチウイルスカプシドを使用し得る。例えば、FIVまたはSHIV [米国特許第5,654,195号]。SHIV偽型ベクターは、動物モデル（例えば、サル）において容易に使用され得る。

【0046】

好ましいレンチウイルスは、始原レンチウイルス [米国特許第5,665,577号] またはネコ免疫不全ウイルス (FIV) [Poeschla, E.M., ら、Nat. Medicine 4:354-357 (1998)] である。pol/gag核酸セグメントおよびenv核酸セグメントは、発現された際に、空のレンチウイルス粒子を産生する。上記の改変（例えば、LTRのtatコード領域の欠損、MAコード領域の欠損、またはU3領域の欠損）を作製することによって、野生型ウイルスへの復帰突然変異の可能性は、実質的にゼロまで減少した。

【0047】

異種核酸セグメントの所望のファミリー（ときどき標的分子と称される）は、空のレンチウイルス粒子に挿入され得る。各々が目的の核酸セグメントおよびレンチウイルスパッケージング配列（レンチウイルスRNAをパッケージングするために必要である）を含む複数のベクターの使用によってレンチウイルス粒子（パッケージングベクター）に挿入され得る。好ましくは、5'および3'レンチウイルスLTRを含むベクター（所望の核酸セグメントを含む）をそれらの間に挿入した。核酸セグメントは、アンチセンス分子であり得、より好ましくは、タンパク質（例えば、抗体）をコードする。このパッケージングベクターは、好ましくは選択マーカーを含む。これらは当該分野で周知であり、そして刺激（例えば、栄養物、抗生物質など）に対する細胞の感受性を変化させる遺伝子を含む。遺伝子としては、neo、puro、tk、多重薬剤耐性（MDR）などについての遺伝子が挙げられる。他の遺伝子は、容易にスクリーニングされ得るタンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）、ルシフェラーゼ、LacZ、神経成長因子レセプター（NGFR）など）を発現する。

【0048】

本明細書中に使用されるように、DNAの宿主細胞への導入は、形質導入と称され、ときどきトランスフェクションまたは感染としてもまた公知である。

【0049】

自動的にマーカーについて細胞をスクリーニングするための系を構築し得る。この方法において、形質導入されていない細胞から形質導入された細胞を容易に選択し得る。例えば、結果として生じる粒子を、約100万の細胞と接触させ得る。10～15%の形質導入効率でさえ、100～150,000の細胞を得る。マーカー（例えば、GFP）を示す細胞をスクリーニングし、そして選択する自動選別機を、本発明の方法において使用し得る。

【0050】

誘導プロモーターが標的分子と共に使用される場合、最小の選択圧力が、形質転換された細胞に対して、標的分子が「沈黙（silenced）」細胞のため

に発揮される。従って、マーカーを示す細胞の同定はまた、標的分子を発現し得る細胞を同定する。誘導プロモーターが使用されない場合、「強制的発現」系を使用することが望ましい。強制的発現系において、標的分子は、内部リボソーム侵入部位 (IRES) の使用によって選択マーカーに連結される (Marascoら、PCT/US96/16531を参照のこと)。この様式において、マーカーに基づいて選択された実質的に全ての細胞はまた、標的分子を含み、そして標的分子を発現し得る。

【0051】

IRES配列は当該分野で公知であり、そしてencephalomyocarditisウイルス(EMCV)のIRES配列 [Ghattas, I. R.ら、Mol. Cell. Biol., 11:5849~5849(1991)]; BiPタンパク質 [MacejakおよびSarnow、Nature、353:91(1991)]; DrosophilaのAntennapedia遺伝子(エキソンおよびe) [Ohら、Genes & Development、61:1643~1653(1992)]; ポリオウイルスのIRES配列 [PelletierおよびSonenberg、Nature、334:320~325(1988)]; またMountfordおよびSmith、TIG、11:179~184(1985)を参照のこと]を含む。

【0052】

好ましくは、標的分子は、誘導性プロモーターに作動可能に連結される。このような系は、遺伝子発現の注意深い調節を可能にする。Miller, N.およびWhelan, J., Human Gene Therapy、8:803-815(1997)を参照のこと。このような系には、lacオペレーターを有する哺乳動物細胞のプロモーターからの転写を調節するための転写モジュレーターとして、E. coli由来のlacリプレッサーを用いる系 [Brown, M.ら、Cell、49:603-612(1987)]、およびテトラサイクリンリプレッサー(tetR)を使用する系 [Gossen, M.およびBujard H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551(1992)]; Yao, F.ら、Human Gene Ther

apy, 9:1939-1950(1998); Shockelt, P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92:6522-6526(1995)]が含まれる。他の系には、FK506ダイマー、エステラジオールを使用するVP16またはp65、RU486、ジフェノール ムリスレロン(murislerone)またはラパマイシン[図2のMillerおよびWhelan、前出を参照のこと]が含まれる。誘導性の系は、Invitrogen、Clontech、およびAriadから入手可能である。オペロンとともにリプレッサーを使用する系が好ましい。例えば、Escherichia coli由来のlacリプレッサーは、lacオペレーターを伴う哺乳動物細胞のプロモーターからの転写を調節するための転写モジュレーターとして機能し得る[M. Brownら、Cell、49:603-612(1987)]。M. Gossenら[Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:5547-5551(1992)]は、テトラサイクリンリプレッサー(tetR)を転写アクチベーター(VP16)と合わせて、tetR哺乳動物細胞転写アクチベーター融合タンパク質、tTa(tatR-VP16)を作製し、ヒトサイトメガロウイルス(hCMV)主要前初期プロモーターに由来する、tetOを伴う最小のプロモーターと合わせて、哺乳動物細胞における遺伝子発現を制御するためのtetR-tetオペレーター系を作製した。Yaoおよび共同研究者(F. Yaoら、Human Gene Therapy、前出; Ohkawa, J.、Human Gene Therapy、11:577-585(2000))は、テトラサイクリンオペレーターが、プロモーター(例えば、CMVIEプロモーター)のTATAエレメントの下流に適切に配置される場合に、tetR哺乳動物細胞転写因子融合誘導体よりもむしろ、テトラサイクリンリプレッサー(tetR)単独が、哺乳動物細胞における遺伝子発現を調節するための強力なトランス調節因子として機能し得ることを実証した。このテトラサイクリンの誘導性スイッチの1つの特定の利点は、これが、その調節可能な効果を達成するために、いくつかの例においては細胞に対して毒性であり得るテトラサイクリンリプレッサー-哺乳動物細胞トランス活性化因子またはリプレッサー融合タンパク質の使用を必要としないことである[M. Gossenら、Proc. Nat

l . Acad . Sci . USA 89 : 5547 - 5551 (1992) ; P . Shockett ら、 Proc . Natl . Acad . Sci . USA 92 : 6522 - 6526 (1995)]。好ましくは、このリプレッサーは、IRES 配列によって標的分子に連結される。好ましくは、誘導性の系は tet R 系である。より好ましくは、この系は、プロモーターの TATA エlement (例えば、CMV IE プロモーターを用いる) の下流のテトラサイクリンオペレーターを有する。図4を参照のこと。

【0053】

いくつかの誘導性プロモーターの有効性は、時間とともに増大する。いくつかの場合において、複数のレプレッサーを直列に挿入すること(例えば、IRES によって Tet R に連結された Tet R) によって、このような系の有効性を増強し得る。あるいは、所望の機能についてのスクリーニングの少なくとも3日前に、待機し得る。好ましくは、 1×10^4 、より好ましくは少なくとも 1×10^5 、なおより好ましくは、少なくとも 1×10^6 、そしてさらにより好ましくは、少なくとも 1×10^7 の多くの細胞が使用される場合、いくつかのサイレンシングが発生し得るが、サイレンシングの効果は最小である。系の有効性を増大させるための公知の手段によって所望のタンパク質の発現を増大させ得る。例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後(port-transcriptional)調節Element(WPRC)を使用する。Loeb, J. E. ら、Human Gene Therapy、10:295-2305(1999); Zufferey, R. ら、J. of Virol., 73:2886-2892(1999); Donello, J. E. ら、J. of Virol. 72:5085-5092(1998)を参照のこと。

【0054】

使用される標的分子は、好ましくは細胞内で発現されることが意図される抗体をコードする遺伝子を有する。抗体は、標的抗原の同定、精製、および機能的操作のためのインビトロツールとして生物医科学において長く使用されてきた。抗体は、診断的適用および治療的適用のためにインビボで同様に利用されてきた。抗体工学における最近の進歩は、今や抗体をコードする遺伝子を操作することを

可能にし、その結果、抗原結合ドメインが細胞内で発現し得る。抗体の特異的かつ高親和性の結合特性は、大きなヒト免疫グロブリンライブラリーを作製する能力、および哺乳動物細胞内部で正確な細胞内位置で安定に発現するそれらの能力と組み合わせて、遺伝子治療適用のための強力な新規な分子のファミリーが提供された。これらの細胞内抗体は、「イントラボディー」と呼ばれる [W. Marascoら、Gene Therapy、4:11-15(1997)]。好ましくは、これらの遺伝子は、単鎖抗体をコードする。これらの分子は、好ましくは、HAのようなタグを含み、その結果、その分子は後で同定され得る。

【0055】

これらの抗体は、好ましくは、抗体のライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）から得られ得る。図6は、抗体を得、そしてそれをパッケージングベクターに挿入するための単純な方法を示す。

【0056】

その後、レンチウイルスベクターを使用して、宿主細胞に形質導入する。マーカーをスクリーニングすることによって、形質導入された細胞を迅速に選択し得る。その後、形質導入された細胞を取り、これらを適切な条件下で贈与させ得るか、またはこれらの細胞（例えば、脾臓細胞もしくは生殖細胞）を宿主細胞に挿入し得る。

【0057】

誘導性プロモーターが作動され、そして、特定の表現型を示す細胞および/または動物についてクリーニングする。例えば、特定のレセプターの増強された発現または発現の欠如、異常細胞の選択的殺傷など。所望の表現型を示す細胞は、表現型について、または表現型に依存して選択され、その選択は、高処理能力自動化スクリーニングによってなされ得る。FACS分析が使用されて、特定のレセプターの発現の変化を同定し得る。他の系は容易に同定され得る。分子（例えば、抗体）に含まれるタグを使用して、分子（例えば、所望の表現型を生じる抗体）を入手し得る。1つの例において、次いで、抗体は、所望される場合、それが結合する抗原を同定するために使用され得る。

【0058】

この方法は、任意のメンバーの特定の素性を最初に知る必要なしに、所望の機能を提供する特定の分子を分子の大きな群から同定するために、多数の分子を使用することを可能にする。

【0059】

好ましい構築物は、VSV-G偽型HIV-1ベクター系を使用する。この系では、標的分子は、クローニングされそして誘導性プロモーター（例えば、Yao、前出のテトラサイクリン誘導性プロモーター系）の制御下で発現される、非常に大きな（ 1×10^{10} メンバー）ヒトERを指向するsFvイントラボディーライブラリーを含む。例えば、ERの内腔に標的化されるイントラボディーは、細胞表面への原形質膜または分泌タンパク質の輸送を阻害するための単純かつ有効な機構を提供する；非常に大量の細胞表面レセプターが、この方法を使用して検出不可能なレベルに減少する。このベクター系は、所望の機能を生じる「表現型」ノックアウトを生じ得るsFvイントラボディーを同定するために使用され得る。例えば、悪性細胞（対応する正常細胞ではなく）を殺傷すること、あらかじめ選択された細胞表面分子の除去、病理生物学的プロセスの改変など[W. Marascoら、Gene Therapy, 4:11-15(1997)]。さらに、標的分子（例えば、sFvイントラボディー）がタグ化、HAタグ化されるので、sFvイントラボディーによってノックアウトされた遺伝子産物の発見および同定は、標準的な研究室における手順を通して容易に達成され得る。

【0060】

ERにおける局在化について意図されるイントラボディーは、好ましくは、リーダーペプチドおよびC末端ER保持シグナル（KDELアミノ酸モチーフ-Lys-Asp-Glu-Leu）[J. Richardsonら、Gene Therapy, 6:635-644(1998)；J. Richardsonら、Virology, 237:209-216(1997)]を備えるが、他の構築物は容易に作製され得る。中間体クローニングベクターは、sFVライブラリーが、sFvカセットと同様に、免疫グロブリンリーダー配列、sFvsについてのインフレームのクローニング部位、続いてHAタグ配列およびER保持配列SEKDELを含むベクターに、（例えば、同一のSfiI/NotI制限

部位を介して)直接クローニングされることを可能にする(図4)。エレクトロポレーションコンピテントなTGI細胞を使用して、sFv遺伝子カセットをクローニングし得、そしてこの中間体ベクター中の約 1×10^{10} 形質転換体を手し得る。これらの形質転換体から、適切なフラグメント(例えば、BamHI/XbaIフラグメント)が単離され、これは、誘導性カセット(例えば、CMVtetOプロモーター、ERを指向するsFVイントラボディーライブラリー、IRES、およびtetR)を含み得る。また、エレクトロポレーションコンピテントなTGI細胞を、BamHI/XbaIフラグメントをレンチウイルスベクター(例えば、HIVNtetOIR(図5)によって表される誘導性系)にクローニングするために使用して、約 1×10^{10} 形質転換体を手する。

【0061】

例えば、ER指向性イントラボディーライブラリーを発現するHIV-1ベクターは、Superfect(Oligen)を使用して、例えば、ベクターpCMVgag-pol、pRevおよびpVSV-G cDNAの、293T細胞への同時トランスフェクションによって産生される[J. Richardsonら、Gene Therapy、6:635-644(1998)]。細胞培養上清を、48~72時間後に収集する。超遠心分離を用いて、VSV-G偽型ベクターの力価を増加させ、そして1mlあたり $10^6 \sim 10^8$ 感染性粒子の力価の獲得を生じる。このベクターを、逆転写酵素活性について正規化する。形質導入効率は、形質導入48時間後にNGFR表面発現のFACS分析によって、CD4+SupT細胞および293細胞で測定され得る。例えば、293T細胞が好ましい。なぜなら、この細胞は、より高い力価のベクターを与える点においてCDSよりもより効率的であるからである。

【0062】

例えば、上記で産生された得られたHIVNtetOIRベクターは、ER(細胞表面を含む)を通して移行する分子および分泌分子の細胞内保持/分解に起因して、「表現型」および/または「機能的」ノックアウトを引き起こす能力を有するERを指向するsFvイントラボディーのライブラリーを含む。これらのベクターは、sFvイントラボディーのライブラリーをCD4+SupT細胞に

形質導入するために使用して、これらの細胞の表面上で発現されることが知られる特定の分子の表現型ノックアウトを引き起こす s F v イントラボディーを単離し得る。例えば、C D 4、C X C R 4、および M H C I は、S u p T 細胞の表面上に高いレベルで発現される。他のレセプターは、容易に選択され得る。これらの抗体もまた、削除されたリーダー配列を有することによって、E R - ゴルジ装置以外の細胞の区画にある抗原を標的するために使用され得る。さらに、例えば、核、ミトコンドリアなどについての標的配列は、容易に選択され得、そして標的分子を含むカセット中で使用され得る。

【0063】

その後、宿主細胞は形質導入され得る。例えば、S u p T 細胞は、最適に形質導入され、そしてマーカー（例えば、N G F R 発現）について選択される。好ましくは、少なくとも 10^7 の形質転換された細胞は、公知の手段によって単離（例えば、ビーズ、アフィニティークロマトグラフィーなど）される。細胞を、インデューサー（例えば、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリン）で処理し、そして2~4のさらなる倍加を経て、その結果、各 s F v イントラボディー遺伝子の1より多いコピーが安定に形質導入された細胞のプール中に存在する。1~2 ml 中約 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 細胞を、所望の表現型の同定のために染色する（例えば、適切な抗 C D 4、C X C R 4、または M H C I M a b、続いて F I T C 標識した抗マウス I g G を用いて）。細胞を、例えば、M o F l o フローサイトメーター（これは、高処理能力を有する（ $> 5 \times 10^7$ 細胞 / ml / 時間））で分別する。死滅した細胞、乏しく染色された細胞および表現型ノックアウト細胞を含む、最も低い F I T C 標識細胞の10%を収集し、そして組織培養において拡大する。この手順は、適切な表面分子の表面発現について少なくとも50%ネガティブである、細胞の集団が回収されるまで反復される。

【0064】

上記で言及した50%ネガティブプールからの細胞表面ネガティブ細胞は、限界希釈によってサブクローニングされ、そしてさらに生化学的および遺伝的分析のために使用される。抗 H A M a b を用いる放射免疫沈降実験を使用して、標的分子を同時免疫沈降させる。パルス - チェイス分析を使用して、s F v / 標的

タンパク質複合体の半減期を決定し得る。免疫蛍光を使用して、標的分子の細胞内局在化が変化したか否かを決定し得る。

【0065】

標的分子（例えば、sFv遺伝子）は、例えば、IgGリーダ領域およびSENDL領域に位置するプライマーを使用して、PCR増幅またはRT-PCR増幅によって容易に回収され得る。この分子は、最終的な標的（すなわち、抗体が結合するタンパク質）を同定するために使用され得る。これらのsFv遺伝子は、例えば、pelBリーダ配列を含むpSYN細菌発現プラスミドにクローニングされ、このプラスミドは、ペリプラスムにsFvを指向させるためのリーダ配列、sFvの直接的なクローニングのためのSfiI/NotI制限部位、続いてc-mycタグおよびHis6配列を含む。IMACカラム上で実質的に精製されるE.coliのTG1株のペリプラスム画分から回収されたsFvの代表的な収率は、振盪フラスコからの1リットルあたり160µg~2mgの間の範囲である。次いで、これらのsFvは、目的の細胞表面標的分子のsFv結合の直接的な染色（c-mycに対するMabを使用する）のために、または細胞抽出物のウェスタンブロット分析のために使用され得る。

【0066】

ナノ配列決定（nanosequencing）スペクトルまたはGC-質量スペクトルをまた使用して、ほんの少量の産物のみが存在する、配列またはタンパク質（例えば、標的）を同定し得る。例えば、Jin, Y.ら、J. of Biol. Chem. 274: 28301-28307 (1999)、28304-305を参照のこと。

【0067】

レンチウイルスビリオン（粒子）は、プロモーターに作動可能に連結する、ウイルスタンパク質発現のために必要なレンチウイルスpolタンパク質およびレンチウイルスgagタンパク質をコードする核酸配列を含む、少なくとも1つのベクターにより、発現される。好ましくは、複数のベクターが使用される。好ましくは、polタンパク質をコードするpol配列は、1より多いベクター上に存在する。逆転写および組込みのために必要なレンチウイルスgagタンパク質

をコードする核酸配列がプロモーターに作動可能に連結したベクターもまた、存在する。好ましくは、このg a g核酸配列は、p o l核酸配列とは別のベクター上に存在する。別個のベクターを種々の「遺伝子」のために使用することは、野生型への先祖返りの機会をさらに減少させる。

【0068】

1つの実施形態において、レンチウイルスベクターは、g a g配列が機能的MA、タンパク質を発現しないように、改変される(すなわち、これはMA'である)。このことは、MAをコードする「遺伝子」を、MAコード領域の付加、置換または欠失により不活化することによって、達成され得る。MAは、g a g遺伝子の一部であり、そして発現される場合に、前駆体タンパク質からプロセスされるので、MA遺伝子(またはコード領域)を参照する場合に、g a g遺伝子全体の、MAサブユニットをコードする部分を参照するのみである。好ましくは、この不活化は、欠失により達成される。好ましくは、MAコード領域の少なくとも25%が欠失され、より好ましくは、少なくとも50%が欠失され、さらにより好ましくは、少なくとも60%、なおより好ましくは、少なくとも75%、さらにより好ましくは、少なくとも90%、なおより好ましくは、少なくとも95%、そして最も好ましくは、コード領域全体が欠失される。

【0069】

MAは、ミリスチル化アンカーを有し、そしてこのミリスチル化アンカー(配列)は、必要とされる。好ましくは、ミリスチル化配列は、異種の(すなわち、非レンチウイルス)配列である。Src、MARCKS(ミリスチル化アラニン富化Cキナーゼ基質)、ARF(ADP-リボシル化因子)、回収および関連する(recovering and related)EF-ハンドカルシウム結合タンパク質(ビシニン神経カルシウム(visinin neurocalcium)およびその他)ならびに非レンチウイルスg a gタンパク質(例えば、モロニーマウス白血病ウイルス、マソン-ファイザーサルウイルス)。

【0070】

MA欠失ウイルスは、細胞外ウイルス粒子を放出する増加した能力を一貫して示し、このことは、安定な膜会合のために、MAの球状ドメインが必要とされな

いことを示す。驚くべきことに、MAの球状ヘッド（これは、推定上のMA核局在化シグナル（NLS）を保有する）の欠失はまた、マクロファージにおけるレンチウイルス複製サイクルの初期の段階を可能にする。

【0071】

1つの実施形態において、env核酸配列は、レンチウイルスエンベロープタンパク質をコードする。MA-gagベクターを使用する場合には、env配列が、短縮型細胞質テイルをコードするように、野生型配列から変更されることが好ましい。好ましくは、細胞質テイルの50%が欠失する。より好ましくは、少なくとも75%が欠失し、さらにより好ましくは、少なくとも90%が欠失し、なおより好ましくは、少なくとも95%が欠失する。最も好ましくは、このような実施形態において、細胞質テイルの全体が欠失する。

【0072】

別の実施形態において、レンチウイルスベクターは、3'長い末端反復領域（LTR）の欠失の結果としての、自己不活化（SIN）ベクターの別の形態である。好ましくは、このベクターは、ウイルスプロモーター内に欠失を含む。HIV LTRのような、レンチウイルスのLTRは、ウイルスプロモーターを含む。このプロモーターは比較的非効率的であるが、例えばtatによってトランス活性化される場合には、このプロモーターは効率的である。しかし、ウイルスプロモーターの存在は、導入遺伝子に作動可能に連結した異種プロモーターと干渉し得る。このような干渉を最小化し、そして導入遺伝子の発現をより良好に調節するために、レンチウイルスプロモーターは、好ましくは、欠失される。

【0073】

好ましくは、このベクターは、ウイルスプロモーター内に欠失を含む。このウイルスプロモーターは、3'LTRのU3領域に存在する。好ましい欠質は、ScalI部位とPvuI部位との間の120塩基対（例えば、HIV-1 LTRプロモーターの本質的なコアエレメント（TATAボックス、SP1およびNF-B結合部位）を含む、HIV-1 HXB2のヌクレオチド9398-9518に対応する）である欠失である。さらに5'側に進むと、「SIN」効果がより劇的となる。実際に、400塩基対までの欠失が、効果的であることが示さ

れている。Zufferey, r.ら、J. of Virol., 72:9873-9880 (1998)。逆転写の後に、この欠質は、5'LTRに移動され、ベクター/プロウイルスを与え、これは、複製の次の繰り返しにおいて5'LTRからベクター転写物を合成し得ない。従って、本発明のベクターは、ウイルスタンパク質を発現し得ないので、ウイルスが複製され得る機構を何も含まない。

【0074】

別の実施形態において、ベクターは、tat欠失ベクターである。これは、tatの少なくとも最初のエキソンを、公知の技術により、これが欠失するように不活化することによって、達成され得る。あるいは、U3LTR欠失をR領域に伸長して、TARエレメントを除去し得る。tat欠失ベクターは、より高い力価のウイルスを生じる。

【0075】

レンチウイルスベクターが、野生型レンチウイルスと比較して、複数の改変を有する場合には、変形物を作製し得る。例えば、HIVに関しては、nef-、rev-、vif-およびvpr-である。さらに、MA-gag、3'および5'のU3が欠失したLTRならびにその変形物を有し得る。

【0076】

より好ましい実施形態において、env配列は、レンチウイルスgagおよびpol遺伝子とは異なるウイルス由来のエンベロープタンパク質をコードする。得られる粒子は、偽型粒子と呼ばれる。エンベロープタンパク質の適切な選択により、事実上任意の細胞を形質転換し得る。好ましくは、エンベロープは、インフルエンザウイルスまたはVSVであり、より好ましくはVSV-Gである。

【0077】

env糖タンパク質は、それ自体で粒子製品に分散可能であるが、これらの組み込みは、感染性ビリオンの形成のために、所望される。

【0078】

レンチウイルスの大きなゲノムに起因して、ベクター系を使用して、広範にわたる所望のヌクレオチドセグメント(好ましくは、RNAセグメント)を、空の

レンチウイルス粒子にパッケージし得る。さらに、プロモーターおよびエンハンサーの使用もまた、インサートの長さを有意に追加し得る。好ましくは、この系は、遺伝多様性のような多様性を示す複数の分子を含む群とともに使用される。従って、本発明の系は、休止細胞ならびに分割細胞をトランスフェクトするために使用され得る多数のプロモーターおよび遺伝子を含み得るインサートを可能にすることによって、現在利用可能なベクターより有意な利点を提供する。

【0079】

ベクターは、使用されるヌクレオチドセグメントがいずれも、機能的パッケージング部位含有配列を含まないように、調製される。(この配列は、パッケージング配列と呼ばれる)。

【0080】

ベクターは、レンチウイルスRNAをパッケージするレンチウイルスゲノム由来のヌクレオチド(レンチウイルスパッケージング配列と呼ばれる)を含まない。HIVにおいて、この領域は、5'大スプライスドナーとgag遺伝子開始コドンとの間に領域に対応する(例えば、株HXB2においてはヌクレオチド301~319)。好ましくは、これらのベクターはまた、HIVLTRのようなレンチウイルスLTRを有さない。env、gagおよびpol遺伝子は、異種プロモーターに作動可能に連結される(図1を参照のこと)。

【0081】

パッケージング配列は、当業者に周知の種々の技術のいずれかによって、ベクターから排除され得る。例えば、配列全体を単に欠失させ得る。あるいは、配列の相当の部分を欠失して、この配列をパッケージング不可能にし得る。代替のストラテジーは、ヌクレオチドをこのような部位に挿入して、これを非機能的にすることである。最も好ましくは、この部位を全体的に欠失して、相同組換えを防止する。

【0082】

従って、レンチウイルスは、所望のウイルスタンパク質を発現し得るが、パッケージング部位が移動し、そしてレンチウイルスLTRが作動可能ではないので、これらのmRNAは、レンチウイルス粒子内に効果的にはパッケージされず、

そして組換えウイルスは、他の細胞を複製および感染し得ない。

【0083】

レンチウイルスベクターはまた、Tat、Revなどのような所望のレンチウイルス調節タンパク質をコードする配列を含み得る。しかし、多くの実施形態において、このような調節遺伝子を含まないことが好ましい。RRE配列およびCAR配列が遺伝子内に含まれる場合には、ウイルスが細胞質において発現されない限り、REVをコードする配列を含むことが必須である。これらの調節配列は、他のレンチウイルスベクター上（例えば、gagベクター、polベクター、gag-polベクター、もしくはenvベクター）または他のその独自のレンチウイルスベクター上に、存在し得る。あるいは、RREの代わりに構造的移送エレメント（CTE）を使用して、このベクターをREV非依存性にし得る。また、より小さな配列相同性が存在する。Srinivasakumar, S.ら、J. of Virol., 73:9589-9598 (1999)；Srinivasakumar, S.ら、J. of Virol., 71:5841-5848 (1997)。

【0084】

所望の異種核酸セグメントは、目的の核酸セグメント、およびレンチウイルスベクターが使用される時点でレンチウイルスRNAをレンチウイルス粒子内にパッケージするために必要なレンチウイルスパッケージング配列を含むベクターの使用により、空のレンチウイルス粒子内にカプセル化され得る。好ましくは、このベクターは、5'および3'レンチウイルスLTRを含み、所望の核酸セグメントが、これらの間に挿入されている。この核酸セグメントは、好ましくは、タンパク質をコードする。

【0085】

従って、本明細書中において使用される場合に、パッケージングベクターとは、レンチウイルスLTRにより隣接されるプロモーター（例えば、内部、組織特異的、または誘導的）の制御下で移入されるべき異種遺伝子、ならびにカプセル化（すなわち、パッケージング）のために必要なパッケージングおよびリーダー配列を含む、ベクターをいう。このベクターは、時々、文献において、移入ベク

ターと呼ばれ、そしてカプセル化のために必要とされるタンパク質および酵素をコードする構築物は、パッケージング構築物と呼ばれる。

【0086】

ウイルス複製タンパク質および酵素により認識される、DNA複製の起源 (ori) もまた、存在し得る。このベクターは、所望のヌクレオチドインサートの、偽型粒子内へのパッケージングを可能にする。このベクターは、時々、パッケージングベクターと呼ばれる。このパッケージングベクターを使用して、所望の異種核酸配列の任意の群 (好ましくは、RNA配列) を、粒子内にパッケージする。好ましくは、パッケージングベクターは、(a) 少なくとも1つの異種核酸配列に作動可能に連結する、プロモーター配列、および (b) mRNA (この転写は、発現されたタンパク質を生じる) の転写およびプロセッシングを可能にするに十分な、少なくとも1つの配列を含む。好ましくは、プロセッシング配列は、ポリアデニル化配列である。好ましくは、プロモーターは、誘導的系の一部である。なおより好ましくは、このベクターは、プロモーター配列に続く介在配列を含む。好ましくは、この配列は、プロモーター、標的分子を含み、そして必要に応じて、抑制配列はまた、HAのようなタグを含み、標的分子の手早い同定を可能にする。エレメントのこのグループ化は、時々、カセットとも呼ばれる。例えば、異種配列は、任意の所望のタンパク質 (好ましくは、治療的タンパク質または抗体) をコードし得る。これはまた、アンチセンスDNA、RNAまたは所望の免疫原 (例えば、抗原タンパク質) をコードし得る。これは、免疫原性反応を生じる特定のペプチド配列をコードし得る。このようなペプチド配列は、代表的に、少なくとも約6アミノ酸長である。

【0087】

異種ヌクレオチド配列は、治療的タンパク質 (すなわち、遺伝したかまたは後天性の欠損を補償するもの) のような、広範な種々のタンパク質をコードし得る。治療的タンパク質の例としては、神経伝達性生合成酵素 (例えば、パーキンソン病の処置のためのチロシンヒドロキシラーゼ) ; ニューロトロフィンを含む神経栄養因子 (例えば、アルツハイマー病の処置のための神経増殖因子であり、神経増殖因子レセプターおよびtrkレセプターもまた使用し得る) ; レッシュ-

ナイハン病の処置のための、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine - guanine phosphoribosyl transferase) (HGPRT) ; テイ - サックス病の処置のための、 - ヘキソサミニダーゼ (hexosaminidase) a鎖 ; 糖尿病の処置のためのインスリンが挙げられる。レセプター (例えば、神経増殖因子レセプター、trkレセプターなど) もまた調製され得る。インサートは大きくあり得るので、一連の異なるタンパク質をコードすることが可能である。例えば、レセプター - リガンド複合体を形成する一連のタンパク質を、コードし得る。

【0088】

他のタンパク質としては、例えば、シグナル伝達酵素 (例えば、タンパク質キナーゼc) ; 転写因子 (例えば、c - fos、NF - B) ; オンコジーン (例えば、erbB、erbB - 2/neu、ras) ; 神経伝達物質レセプター (例えば、グルタメートレセプター、ドパミンレセプター) などが挙げられる。

【0089】

タンパク質の1つの好ましいグループは、抗体である。dAb、単鎖抗体、Fabが、含まれる。単鎖抗体が好ましい。抗体のライブラリーは公知であり、そして本発明において使用され得る。例えば、ファージディスプレイライブラリーを使用して、一般化されたライブラリーおよび特殊化されたライブラリーの両方が、使用され得る。特殊化されたライブラリーは、そのメンバーの抗体が、特定のグループの抗原 (例えば、特定の腫瘍) に対して産生されているライブラリーである。特殊化されたライブラリーのメンバーの多様性は、一般化されたライブラリーの多様性に満たない。

【0090】

異種ヌクレオチド配列もまた、アンチセンス分子 (DNAまたはRNA) をコードし得る。これらの分子は、特定の疾患と関係がある遺伝子の発現を調節するために使用され得る。このアンチセンス分子は、プロモーターに対してコード領域の方向を反対にすることによって、ヌクレオチド配列から得られる。従って、このアンチセンスRNAは、対応するmRNAと相補的である。アンチセンス科

学の概説について、Greenら、*Ann. Rev. Biochem.* 55: 569~597 (1986) (本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。このアンチセンス配列は、改変された糖リン酸骨格を含んで、安定性が増加され得、かつRNA感受性に対してより敏感でないようにされ得る。この改変の例は、Rossiら、*Pharmacol. Ther.* 50(2): 245~354 (1991)により記載される。別の種類の分子としては、リボザイムが挙げられる。トランススプライシングに關与するリボザイムおよびアンチセンス分子、ならびにトランススプライシングを示さないリボザイムおよびアンチセンス分子が、使用され得る。

【0091】

異種ヌクレオチド配列は、好ましくは、所望の標的細胞においてその配列の転写を指示し得るプロモーター配列に、作動可能に連結される。霊長類レンチウイルスのようなレンチウイルスは、Tat調節タンパク質を含む。このタンパク質は、TARエレメントに作動可能に連結されたタンパク質を、トランス活性化する。このTARエレメントは、霊長類レンチウイルスの5'LTR中に存在する。従って、異種タンパク質の発現は、トランス活性化により増強され得る。このLTRはまた、プロモーターを含む。しかし、このプロモーターは、トランス活性化の不在下で、比較的效果がない。従って、他のプロモーターおよびエンハンサーの使用が、代表的には、好ましい。このプロモーターは、SV40プロモーター、CMVプロモーター、HSV-1 1Eプロモーター、1E 4/5プロモーターまたはRSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーターのような、プロモーターである。他としては、Src-プロモーター(HTLV-I LTR由来のR/U5配列に融合されたSV40初期プロモーターから構成される、非常に強力なハイブリッドプロモーター)、テトラサイクリンで調節可能なプロモーター、組織特異的プロモーター(例えば、 α -フェトプロテインプロモーター; および光受容体を標的とした発現のためのロドプシンプロモーター)が、挙げられる。特定の標的細胞にて異種配列の転写を指示し得る他のプロモーターもまた、その異種遺伝子の発現を所望の標的(宿主)細胞へとより特異的に向けるために使用され得る。実際、組織特異的プロモーターと、その誘導性プロモーター構築

物を連結し得る。例えば、その標的細胞がニューロン細胞である場合、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター [Forss - Petterら、J. Neurosci. Res. 16: 141~56 (1986)] のようなプロモーターが、使用され得る。ラットチロシンヒドロキシラーゼ (TH) プロモーターは、中脳における細胞型特異的発現を支持し得る [S. Songら、J. Neurochem. 68: 1792~803 (1997)]。さらに、当該分野で周知である、誘導性プロモーターまたは他の誘導性調節配列の使用が、いくつかの実施形態において好ましい。例えば、tetR - tetO系である。考察されたように、LTR中のプロモーターは、もう1つのプロモーターを妨害し得る。従って、特定の実施形態において、このウイルスLTRプロモーターを不活化することが、好ましい。

【0092】

所望の異種遺伝子を移入させるパッケージングベクターと、野生型レンチウイルスを生成するレンチウイルスベクターとの間の組換え事象の可能性を最小にするために、このパッケージングベクターは、このパッケージングベクターをコードするヌクレオチドセグメントと最小の程度の相同性を有することが望ましい。好ましくは、これらの異なるベクター中で異なるプロモーターを使用する。これらの目的は、本開示に基づいて、当該分野で公知の種々の手段によって達成され得る。例えば、いかなる組換えの機会をも最小にするために、複数のベクターを使用することが好ましい。さらに、配列の重複を最小にすることによって、相同組換えの機会を低減することが、好ましい。例えば、不必要なレンチウイルスを削除し得る。あるいは、またはさらに、そのベクターのヌクレオチド配列を変化させるために公知技術を使用し得る。このことを達成する1つの方法は、ヌクレオチド (例えば、DNA) シャッフリングと呼ばれる。コドンのヌクレオチドを、例えば、1つのベクターのレンチウイルス構築物内の各コドンの3番目の塩基を、変化させる。従って、ここで、第2のベクター中の同じコード配列が異なり、そして相同組換えを受けない。種々のベクターのコドンの変更が、ヌクレオチドの差異を最適にするためになされ得る。

【0093】

あるいは、または相同性を低減する上記のアプローチと組み合わせて、レンチウイルスセグメント由来の遺伝子の配列を、その配列が機能性タンパク質をコードしないように変更し得る。本明細書中で使用される場合、「機能性」とは、野生型の活性を有するタンパク質を意味する。

【0094】

その粒子についての特定の目的に依存して、粒子中に存在するタンパク質をコードする特定の効果を引き起こす遺伝子を不活化するように、そのレンチウイルスセグメントを変更するために、公知技術を使用し得る。例えば、複製を増強するタンパク質（例えば、*rev*および/または*tat*）を不活化すること。*vpr*は、感染性に影響する。*nef*もまた、そのウイルスに影響する。*nef*は、インビボで有効な複製に必要なようであると報告されている。

【0095】

細胞は、ウイルス粒子を調製するために、ベクターによりトランスフェクトされ得る。当該分野で周知の手段によって、インビトロでそれらのベクターを調製し得、次いで、その粒子を収集し、それを精製し、そしてその粒子を注入する。より好ましくは、その粒子を精製し、次いで所望の細胞を感染させるためにそれらを使用する。

【0096】

ビリオンを発現するプロデューサー細胞株を作製し得、そしてそのような細胞をパッケージングベクターで形質転換し得る。そのプロデューサー細胞株または任意の細胞を、標準技術によって形質転換し得る。1つの好ましい方法は、濃縮ポリカチオン（例えば、ポリリジンまたはポリエチレンジアミン（PEI））により、そのパッケージングベクターに連結された不活化アデノウイルスベクターを使用することである [Baker, A.ら、*Nucleic Acids Res.* 25(10):1950~1956(1997); Baker, A.ら、*Gene Ther.*, 4(8):773~782(1997); Scaria, A.ら、*Gene Ther.* 2:295~298(1995)を参照のこと]。PEI（濃縮ポリカチオン）の使用が、好ましい。

【0097】

これらのベクターは、アセンブルして粒子になるタンパク質およびmRNAを発現し、従って、大量のウイルス粒子を発現するために使用され得る。このことには、本明細書中で記載される粒子ベクター系（パッケージングベクター）で細胞をトランスフェクトすること、そしてそのウイルスタンパク質を発現するに十分な条件および時間の下でその細胞株を培養することが必要であり、次いでこのウイルスタンパク質は、粒子を形成する。その後、その粒子は、その粒子の構造が破壊されないことを確実にするように注意を払って、公知技術により精製され得る。この粒子は、種々の領域で使用され得る。例えば、この粒子は、所望の免疫反応を生成するため、異種核酸配列で細胞を形質転換するため、そして/または所望の宿主細胞に核酸配列を送達するために、使用され得る。

【0098】

本教示に基づいて、標準技術により、レンチウイルス粒子を発現する一過性細胞株または安定な細胞株を調製し得る。

【0099】

その後、安定な細胞株が所望される場合、標準技術によって安定にトランスフェクトされた細胞について、スクリーニングし得る。

【0100】

このような安定なプロデューサー細胞株が、パッケージングされた粒子を得るために好ましい供給源である。

【0101】

本発明の粒子は、異種DNAを標的細胞に送達するために使用し得る。標的細胞は、インビボ、インビトロ、またはエキソビボにあり得る。標的細胞は、分裂中の細胞であっても、または好ましくは静止細胞であってもよい。静止細胞は、非有糸分裂細胞または有糸分裂後の細胞を含む。好ましい非有糸分裂細胞は、マクロファージである。標的細胞はまた、神経系の細胞（例えば、神経細胞またはニューロン細胞）を含み得る。好ましい静止標的細胞またはゆっくり分裂する標的細胞は、グリア細胞、筋細胞、肝細胞、肺胞細胞、網膜細胞、および造血幹細胞を含む。ランゲルハンス島細胞もまた、好ましい標的である。

【0102】

本方法において、インビボでの細胞の使用が、現在好ましい。しかし、インビボまたはエキソビボでの投与が望ましい場合が存在する。

【0103】

標的細胞に送達されるべき異種遺伝子を保有するウイルス粒子の導入は、当業者に公知の任意の方法によって、達成され得る。例えば、インビボ投与とともに、以下の技術が好ましい。カテーテル、注入、乱切など。例えば、定位注入が、脳の所望の位置にウイルス粒子を向けるために使用され得る。定位手術が、標準的神経外科法を使用して、実施される [PellegrinoおよびClapp、Physiol. Behav. 7: 863~8 (1971)]。さらに、この粒子は、ミニポンプ注入システム(例えば、SynchroMed Infusion System)を使用して、脳室内(「icv」)注入によって送達され得る。バルクフローに基づく最近の方法(対流と称する)もまた、脳の広範な領域に大きな分子を送達するのに有効であることが示されており、そして標的細胞にウイルス粒子を送達する際に有用であり得る [R. Bobora、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076~80 (1994); P. Morrisonら、Am. J. Physiol. 266: R292~305 (1994)]。他の方法(カテーテル注入、静脈内注入、非経口注入、腹腔内注入および皮下注入、経口経路または他の公知の投与経路を含む)が、使用され得る。

【0104】

いくつかの場合において、これらのベクターを使用して、生存系における特定の遺伝子の効果を探るために、インビボで宿主を形質転換する。別個のベクターまたは好ましくはパッケージされたウイルス粒子の十分な量を注入して、その標的細胞を含む組織において約1 pg/ml ~ 20 µg/mlの間の範囲の治療タンパク質の血清濃度を得る。例えば、特定のタンパク質を発現することによってか、あるいは特定の配列に対する抗体を細胞内発現することなどによって、タンパク質の機能を停止することによる。より好ましくは、約0.1 µg/ml ~ 10 µg/mlの間である。なおより好ましくは、約0.5 µg/ml ~ 10 µg/mlである。

【0105】

例えば、経口投与に使用され得る固形用量形態としては、カプセル、錠剤、丸剤、散剤、および顆粒剤が、挙げられる。このような固形用量形態において、その活性成分（すなわち、空のウイルス粒子）が、スクロース、ラクトースまたはスターチのような、少なくとも1つの不活性キャリアと混合される。このような用量形態はまた、不活性希釈剤以外のさらなる物質（例えば、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム））を含み得る。さらに、カプセル、錠剤および丸剤の場合の容量形態はまた、緩衝剤も含み得る。この錠剤、カプセル、および丸剤はまた、所定の時間の間ずっとその粒子を放出するための、徐放性コーティングを含み得る。

【0106】

非経口投与のために、代表的には、滅菌した、水性または非水性の、溶液、懸濁液、または乳濁液を、薬学的に受容可能な非経口ビヒクルとともに含む。非水性の溶媒またはビヒクルの例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油およびトウモロコシ油）、ゼラチンおよび注入可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）である。これらの用量形態はまた、アジュバント（例えば、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤）を含み得る。それらは、例えば、細菌保持フィルターを通す濾過、組成物へと滅菌剤を組み込むこと、組成物を照射することなど、によって、ウイルス粒子を不活化しないように注意が払われる限り、滅菌され得る。それらはまた、滅菌水という媒体、または使用前の他のいくつかの注射可能な滅菌媒体中で、製造され得る。これらのビヒクルのさらなる例としては、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液および5%ヒト血清アルブミンが、挙げられる。リポソームもまた、キャリアとして使用され得る。添加剤（例えば、等張性および化学的安定性を増加させる物質（例えば、緩衝液および保存剤））もまた、使用され得る。

【0107】

このようなビヒクル中の活性成分の好ましい範囲は、約1 mg / ml ~ 約10 mg / mlの濃度である。より好ましくは、約3 mg / ml ~ 約10 mg / mlである。

【0108】

(実施例)

(単一プラスミドテトラサイクリン誘導系の構築)

(基本的な1プラスミド系)

本発明者らの単一誘導性カセット(図1Aに概説)を、脳心筋炎ウイルス(EMCV)由来の内部リボソーム進入部位(IRES)およびpcDNA3tetRから取り出したtetRフラグメントを、pCMVtetO-hEGFのNotI/ClaI部位へ3部分連結(three piece ligation)することにより構築した[F. Yaoら, Human Gene Ther. 9:1939-1950(1998)]。プラスミドpCMVtetO-hEGF(本発明者らの構築物全ての親ベクターとして使用した)は、ヒト表皮増殖因子(hEGF)遺伝子を含む。この遺伝子は、約650bpの前初期エンハンサーサイトメガロウイルスプロモーター(ieCMV)およびTATAボックスの10bp下流に配置されたテトラサイクリンオペレーター(tetO)の2つの直列反復を含むキメラプロモーターにより駆動される。IRES配列をコードするNotI-NheIフラグメントを、上記ベクターpCMV-Fab 105/21H(R. Levinら, Mol. Med. 3:96-110(1997))により以前に調製された)から除去した。サブクローニング工程(中間pGem7Zf(+))ベクター(Promega, Madison, WI)を使用する)は、pcDNA3tetR由来のXbaI-EcoRI tetR含有フラグメントをクローニングするために必要であった。このことは、最終クローニング工程に必要な隣接制限部位(NheI-ClaI)の導入および最初のATGの前にあるKozak配列[M. Kozak, J. Mol. Biol. 196:947-950(1987)]の挿入を可能にする。この工程の前に、pGEM7Zf(+))ベクターを、HindIII-NheI-Kozak(CCACC)-ATG-XbaI-EcoRI-Stop(TATTA)-SpeI-ClaI-SphI制限部位を含有する合成リンカーを組み込むことにより改変した。対応する配列を有するオリゴヌクレオチドの対を合成し、そして各当量(10µg)をハイブリダイズした後、pGEM7Zf(+))ベクターのHindIII-S

p h I 部位に最終的に連結した。得られた 0 . 6 5 K b の N h e I - C l a I - t e t R フラグメントを I R E S 配列の下流、かつ p C M V t e t O E G F ベクターのポリアデニル化部位の前に挿入した。この位置は、単一 mRNA 転写物からの t e t R のキャップ非依存性翻訳 (c a p - i n d e p e n d e n t t r a n s l a t i o n) を可能にする。最終的な 3 部分連結工程を、T a k a r a の DNA 連結キットを使用して、製造業者の手順に従って行った。同様に、t e t O を欠く p C M V h E G F プラスミドを改変して、I R E S 配列および調節可能でないコントロールプラスミドとして使用するための t e t R 遺伝子を組み込んだ。

【0109】

(核局在化シグナルの導入)

シミアンウイルスラージ T 抗原由来の核局在化シグナル (N L S) に対応する 3 つの直列反復配列 (配列番号 1 G A T C C A A A A A A G A A G A G A A A G G T A) を s t o p の前にある t e t R の 3 ' 末端に組み込んだ。n l s 配列を含む相補的オリゴヌクレオチドの対を合成して調製し、そしてハイブリダイゼーション後に、p G E M 7 Z f (+) - t e t R の E c o R I および S p e I 部位の間にインフレームでクローニングした。次いで、以前に記載した構築物を t e t R 遺伝子を t e t R . N L S フラグメントに代わって置き換えることにより改変した。

【0110】

(e G F P 遺伝子による h E G F レポーター遺伝子の置換)

h E G F 遺伝子を含む B a m H I / N o t I フラグメントを、基本的な誘導系から切り出し、そして増強緑色蛍光タンパク質 (e G F P) 遺伝子により置換した。e G F P をコードする 7 0 0 b p フラグメントを p e G F P . I R E S . n e o ベクター (C l o n t e c h , P a l o A l t o , C A) から取り出し、そして親構築物に直接連結した。

【0111】

最終的なプラスミドを、Q i a g e n I n c . (V a l e n c i a , C A) の E n d o t o x i n - f r e e M a x i K i t を用いて精製した。

【0112】

(元来の2成分誘導系に対する本発明者らの単一プラスミド系のインビトロ機能性)

(細胞培養およびトランスフェクション)

アフリカミドリザル腎臓細胞、Vero、Cos-1およびCos-7細胞株ならびにヒト腎臓293-T細胞を増殖させ、そして10%ウシ胎仔血清(Tissue Culture Biologicals, Tulare, CA)および抗生物質を補充したダルベッコ改変イーグル培地(D-MEM)(GIBCO-BRL, Grand Island, NY)中で維持した。10%のTet System承認ウシ胎仔血清(Clontech, Palo Alto, CA)を含むD-MEM培地を本発明者らの誘導系の機能的試験に使用した。

【0113】

トランスフェクションの前日、細胞を、 2×10^5 細胞/ウェルの密度で6ウェルプレート(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)にサブクローニングした。一過性トランスフェクションアッセイをSuperfect試薬(Qiagen, Valencia, CA)を用いて製造業者が記載するように行った。DNA複合体を、 $2.5 \mu\text{g}$ のプラスミドおよびSuperfect試薬(DNA対濃縮薬剤が1:2の比)を用いて調製し、次いで、10分間室温でインキュベートし、最終的に、細胞にこの複合体を添加した。2プラスミド系との比較を、 $0.5 \mu\text{g}$ のpCMVtetO hEGFまたはpCMV hEGFを用いて行った。この各々の場合において、単独または $2 \mu\text{g}$ のpcDNA3 tetRまたは空のベクターDNA(pcDNA3.1(-))との組み合わせで行った。5% CO₂の加湿雰囲気中で37°Cで18時間インキュベートした後に、細胞をPBSで洗浄し、そしてテトラサイクリン($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)を含有するかまたは含有しない新鮮培地を再供給した。レセプター遺伝子発現を、別の節で本発明者らが詳述したように、形質転換後の時間の関数として測定した。

【0114】

(レポーター遺伝子発現の評価)

培養培地におけるhEGFの発現を、ELISA技術により行った。簡潔には、96ウェルプレートに抗hEGFモノクローナル抗体(MAB236; R&D Systems, Minneapolis, MN)(100ng/ウェル)で室温(RT)で5時間コーティングし、次いで、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中の3%脱脂乳を使用してブロックした。9.7~5,000pg/mlの範囲の二倍段階希釈中で調製したサンプル、細胞外培地および組換えhEGF標準物質(234-EG; R&D Systems)を、4℃で一晩インキュベートした。次いで、hEGFに対して特異的な二次ポリクローナル抗体(sc275; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA)を添加し(100ng/ウェル)、そしてRTで2時間インキュベートした。セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合体化ヤギ抗ウサギポリクローナル抗体(sc2004; Santa Cruz)は、三次抗体であった(3.33ng/ウェル)。最終的に、ペルオキシダーゼアッセイを、製造業者の手順に従って行い(Bio-Rad, Hercules, CA)、そして反応物をマイクロプレートリーダーで分析した(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)。

【0115】

eGFP遺伝子を有する構築物からの緑色蛍光タンパク質の生成を、FACS分析および組織化学により検出した。

【0116】

(RNA抽出およびノザンプロット分析)

総細胞質RNAをTRIzol試薬(GIBCO-BRL)を使用して製造業者の手順に従って、トランスフェクト細胞から抽出した。RNA(20µg)を1.2%ホルムアルデヒド/アガロースゲル上で分離し、そしてナイロンHybond-Nフィルター膜(Amersham, Arlington Heights, IL)にプレッシャーブロッキング(pressure blotting)により転写した。Megaprime DNA標識系(Amersham)および[³²P]-dCTP(NEN, Boston, MA)を用いて標識したXbaI-EcoRI tetR DNAフラグメント(25ng)でプロット

をプローブした。0.5% [w/v] SDS、5×デンハルト溶液 [0.1% BSA、0.1% Ficoll、0.1% PVP] および5×SSPE [0.9M NaCl、50mM リン酸ナトリウム、5mM EDTA、pH7.7] を含有する溶液中の 4×10^7 cpmの標識プローブを使用して、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。0.1% SDS、0.1% SSPE、60℃の最終的なストリンジェンシーでプロットを洗浄し、次いで、-80℃に曝した後にオートラジオグラフィーにより可視化した。

【0117】

(トランスフェクト細胞におけるtetRの免疫学的位置決定 (immunolocalization))

Verob細胞 (5×10^4 / ウェル) をチャンバーガラススライド上でのトランスフェクションの前日にプレートした。構築物のトランスフェクションを上記のように行った。処理 ($1 \mu\text{g/ml}$ tetありまたはなし) の48時間後、細胞をPBS中の4%ホルムアルデヒドでRTで20分間固定した。固定の際に、細胞を0.2% TritonX-100を用いてRTで5分間透過性にし、そして10%正常ヤギ血清、PBS中の5% BSAで30分間ブロックした。tetRに対して惹起されたモノクローナル抗体 (Clontech) を1:100希釈で添加し、そして1~2時間インキュベートした。FITCをカップリングしたヤギ抗マウスIgG (Sigma, St. Louis, MO) またはPEで標識したヤギ抗マウスIgG (Boehringer Mannheim) を、1:250希釈で細胞に添加し、そして1時間インキュベーションを続けた。PBSで洗浄した後、カバースリップをSigma培地中でマウントし、そしてUV光下でFITCおよびローダミン交換フィルターを備えた蛍光顕微鏡 (Nikon Diaphot 300) を用いて検鏡した。スポット冷却 (spot cooled) カラーデジタルカメラ中に記録した画像を、Oncor Imageソフトウェアを用いて分析し、そしてAdobe Photoshop, V3.0 for Macintoshから印刷した。

【0118】

(HIV-1ベースのベクターの調製および評価)

使用したベクターは、HIV-1プロウイルスクローンHXB2(図1)に基づく。本発明者らのウイルスベクター構築物についての基礎のさらなる詳細は、Richardsonら, Gene Ther., 5:635-644(1998)で既に報告した。

【0119】

オリジナルの複数減弱ベクター(nef、rev、vifおよびvpr遺伝子が欠失している。HPV EB)を、ウイルスプロモーター領域からのサイレンス転写活性化に改変した(そうでなければ、内部プロモーターを使用した場合にトランスジーン発現の干渉を引き起こし得る(プロモーター干渉))。得られた自己不活化(SIN)移入ベクターまたはHPV EB LTRを、単一のScaI/部分的PvuII消化およびPacIリンカーの挿入により生成し、従って、3'LTR上にTATAボックス、SP1およびNF- κ B部位を含む120bpフラグメント(ヌクレオチド9398~9518)を排除する。移入プラスミド中の改変U3領域の配列を、DNA配列決定により確認した。

【0120】

新規な改変バージョンのオリジナルベクターを、残りのgag領域ならびにtatおよびrev遺伝子の最初のエキソンへの2.5Kb欠失(ヌクレオチド830~2096および5743~7041)により作製した(NVP EB tat)。このフラグメントを、ClaII/ClaI消化および引き続く再連結により除去し、tatベクターを得た。

【0121】

3つの開発したベクターの形質導入効率を決定するために、CMVプロモーターの制御下またはいずれの内部プロモーターもない条件下のいずれかで増強緑色蛍光タンパク質(eGFP)を移入ベクターに導入した。BamHI-MluI-NotI-XbaI-XhoI部位を含む合成リンカーをプラスミドベクターに導入して適切なクローニング部位を組み込み、次いで、MluI-NotI CMV EGFP(Clontech, Palo Alto, CA)またはBamHI-NotI EGFPフラグメントをベクターに移動させた。

【0122】

(ウイルスベクターパッケージングおよび形質導入)

偽型HIVベクター粒子を、Superfect試薬(Qiagen)を用いて製造業者の説明書に従って、移入ベクター(5 µg)、パッケージングプラスミド(2.5 µg)、VSV-Gエクスペッサープラスミド(expressor plasmid)(1 µg)およびrevエクスペッサープラスミドの一過性同時トランスフェクションにより、COS-1細胞(約 1.5×10^6 細胞/10mmディッシュ)で生成した。24時間後に培地を交換し、そしてウイルスを36~48時間後に採取した。馴化培地を逆転写酵素活性についてスクリーニングし、そして1mlを用いて 1×10^6 HeLa細胞を形質導入した。形質導入効率を蛍光活性化セルソーティング(FACS)分析により決定した。

【0123】

(誘導性HIV-1ベースのベクターの構築)

複製欠損VSV-G偽型HIV-1ベクターを、3つのプラスミドの組合わせを用いて293Tヒト腎臓細胞の一過性同時トランスフェクションにより作製した。それらは、レンチウイルス生成、エンベロープエクスペッサーおよび移入ベクターに必要なタンパク質および酵素をコードするヘルパー構築物からなる。

【0124】

トランスファーベクタープラスミドは、gag-pol遺伝子およびエンベロープ遺伝子のほとんどを欠いているが、被包、逆転写および組込みに必要なシスエレメントを維持する。pH1ibCMVeGFP(野生型)ベクターは、異種遺伝子の挿入を可能にし、ならびにウイルス非複製をもたらす、3.1Kbの欠失をgag-pol領域に、および2つの欠失をエンベロープ領域(1.5Kbおよび0.55Kb)を含む。感染するレンチウイルスベクターの能力を研究して、そして有効な遺伝子発現を提供するために、本発明者らは、マーカー遺伝子として増強された緑色蛍光タンパク質(eGFP)遺伝子を使用している。hEGFまたは任意の他のマーカーが、代わりに使用され得る。異種最初期CMVプロモーターまたはウイルス5'LTRのいずれかの制御下でeGFP遺伝子を含むベクターは、標準的な技術によって調製された。

【0125】

ベクターのバイオセーフティーにおける改善が、野生型ベクターの、3'LTR領域(9398~9518bp)において120bp欠失を導入することによって自己不活性化ベクター(SINベクター)を構築することにより、達成された。逆転写の間、失われたDNAフラグメントが、5'LTR領域に転移され、得られたプロウイルスDNAにおいてウイルスプロモーターの弱毒化を導く、TATAボックス、SP1およびNF-kBシス活性エレメントの欠失を生じる。

【0126】

本発明者らは、特定部位の突然変異誘発によって、tat独立ベクターもまた精製した。tat遺伝子の最初のエキソンの最初の2つのコドン内に3つの塩基変異が導入され、2つのアミノ酸置換を生じた(1番目のアミノ酸がMetからIleへ、および2番目のアミノ酸がGluから終止シグナルへ)。

【0127】

HIV-1に基づいたベクターを作製するのに必要とされる2つの他のプラスミドは、パッケージング構築物(pCMV R8.2)、およびエンベロープ発現プラスミドである。これらの2つのプラスミドは、被包および/または組み込みに必要とされるHIV-1パッケージングエレメント(パッケージングシグナルおよびLTR)のいずれも含まない。ヘルパーのタンパク質の発現は、最初期CMVプロモーターの制御下にあり、そして転写末端は、SV40ポリアデニル化シグナルによって提供される。異なる適用のために、本発明者らは、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSV-G)、あるいはエボラ糖タンパク質(Eb-GP)を含む偽型ウイルスを調製した。3つのプラスミドを同時トランスフェクトにより生成した組換えウイルスは、逆転写、組み込みおよび遺伝子発現のために必要とされるエレメントを含むが、複製を支持し得ない。

【0128】

293T細胞の一時的同時トランスフェクションが、従来のリン酸カルシウム技術により行われた。48~60時間のインキュベーション後に回収された上清が、0.45µmまたは0.22µmのフィルターに培養培地を通すことによって精製され、次いでウイルスは、2時間100,000xgの超遠心によって濃縮された。代替の濃縮手順は、従来の遠心工程の間に、100,000MWのカッ

トオフILTERの使用を含む。逆トランスクリプターゼ(RT)レベルが、ウイルス濃度のためのパラメーターとして、濃縮前および後で回収されたアリコートで試験され、そして平行して、293T細胞上またはHeLa細胞におけるeGFP発現により、最終調製において、実際の形質導入ユニットを確立することを決定する。

【0129】

(ウイルスベクター設計および調製)

複製欠陥VSV-G偽型SHIVベクターまたはHIV-1ベクターが、3つのプラスミドの組み合わせを用いて293Tヒト腎細胞の1次的な同時トランスフェクションによって生成される。

【0130】

トランスファーベクターである、pH1ibeGFP(10 μ g)は、レポーター遺伝子(増強された緑色蛍光タンパク質(eGFP))の挿入を可能にする、3.1Kbの欠失を、gag-pol領域に、および2つの欠失をエンベロープ遺伝子領域(1.5Kbおよび0.55Kb)中に含む。HIV-1ベクターのためのパッケージング構築物(最初期CMVプロモーターの制御下にあるHIV-1 gag遺伝子およびpol遺伝子をコードするpCMV R8.2(5 μ g))が、Didier Tronoから、快く贈られた。SHIVベクターの産生のために、エンベロープ領域およびvpr領域中に欠失を有するSIVmac1A11のサブゲノムフラグメントを、SV40由来発現ベクター中に含むSIVパック(5 μ g)構築物が、pCMV R8.2の代わりに用いられた(White SMら、J. Virol. 73:2832、1999)。第3の成分でエンベロープ発現プラスミドのpCMV VSV-G(2 μ g)は、CMVプロモーターの調節下で水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質遺伝子を含む。293Tの一時的な同時トランスフェクションが、従来のリン酸カルシウム技術により行われた(Sambrookら、:Molecular Cloning:A Laboratory manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)。トランスフェクション後48~60時間後に回収された上清は、0.22 μ mのFILTERに培

養培地を通すことによって精製され、次いで - 80 でアリコートにおいて維持した。逆トランスクリプターゼ (RT) レベルが、調製物の総粒子数を決定するために使用された。

【0131】

(HIV-1ベクターまたはSHIV GFPベクターを用いたCD8-欠失サルおよびヒトPBMC'sの感染)

細胞が、20 µg/mlのDEAEデキストランの存在下で4時間、VSV-G偽型HIV-1(67,000 RT/ml)またはSHIV(6,000 RT/ml) GFPウイルスを用いて感染された。次いで、細胞を、1×PBSを用いて洗浄して、そしてフレッシュ培地によって再培養した。緑色蛍光遺伝子発現が、FACS分析によって感染48時間後に分析された。

【0132】

(誘導性(inducible) HIV-1ベクターの構築)

本発明者らの1つのテトラサイクリン誘導カセットおよびコントロールビストロニック(bicistronic)カセットが、適切な制限部位を含む真核生物クローニングベクターから取り除かれ、そしてtat変異を運ぶSINベクター中にクローン化された。この方法で、Tatタンパク質の、内部CMVプロモーターによる任意の干渉が避けられた。

【0133】

(ベリーラージ(Very Large)、ナイーブ(naive)、ヒトsFvファージディスプレイライブラリーの構築)

ラージ、ナイーブ、ヒトsFvファージディスプレイライブラリーが、pFARBERファージミドベクターにおいて、1,600万個のV 遺伝子III融合物およびV 遺伝子III融合物の各々とランダムに組み合わせられた、2億7,500万個を越えるヒトV_H遺伝子の80回のエレクトロポレーションを実施することによって、構築された。これらの割合は、結合エネルギーの大半が、V_HCDR3により寄与されることから、最大のV_H多様性を維持するために選択された。総計1.63×10¹⁰個の形質転換株が単離された。制限酵素消化による分析は、92%を越えるsFv挿入効率を示し、150億個のメンバーのライブ

ラリーを生じる。このライブラリーは、ヘルパーファージを用いて容易にレスキューされ、そして感染されたTG1細菌全てが、予期された800bpのsFv挿入物を含んだ。形質転換された細菌のマスタバイアルは、グリセロールストックとして、アリコートされ、そして凍結された。

【0134】

(ナイーブヒトsFvファージディスプレイライブラリーの遺伝的多様性の分析)

33個のランダムに選択されたsFvは、 V_H 、 D 、 J_H 、 V 、 J 、 V および J 生殖細胞系列遺伝子セグメントならびに V_H CDR3の長さを同定し、そして回復されたsFv遺伝子のDFCIデータベースを作製するのに、遺伝的多様性を分析するために配列決定されたDNAであった。生殖細胞系列遺伝子セグメントの分析は、「V Base: A database of human immunoglobulin variable region genes. Ian M. Tomlinson, Samuel C. Williams, Simon J. Corbett, Jonathan P. L. Cox. and Greg Winter. MRC Center for Protein Engineering, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, UK」による。これらの分析からのデータは、表1~3において示される。

【0135】

表1は、本発明者らが指定 (assignment) し得る33個の V_H 遺伝子のためのヒト V_H 生殖細胞系列遺伝子の結果を示す。この多様性は、7個の V_H ファミリーのうちの5つを示す20個の異なる生殖細胞系列遺伝子を含む。複製 V_H 遺伝子(例えば、DP-875、DP-7、S12-14など)のうちどれも、同じ V_H 生殖細胞系列遺伝子由来の他のメンバーと同一ではない。遺伝的多様性の別の指標は、 V_H CDR3の長さである。表2において表されたデータは、この多様なセグメントの平均的長さが、10個と14個のアミノ酸との間の長さのCDR3を示している再配置された V_H 遺伝子の大部分を含む、6個のアミノ酸~18個のアミノ酸の範囲にわたることを示す。これは、天然の抗体による

、公開されたレポートとの優れた一致である。最終的に、28 V_L 遺伝子が、V およびV 系列遺伝子の指定のために分析された。ヒトにおいて、これら2つのクラスの軽鎖が、軽鎖の95%がファミリーメンバーであるマウスとは異なり、およそ1:1の頻度で使用される。表3において示され得るように、6つの異なるV ファミリーのうちの5つを表す、8個の異なるV 生殖細胞系列遺伝子が同定されて、そして10個の異なるV ファミリーのうち8個を表している、12個の異なるV 生殖細胞系列遺伝子が使用された。再び、複製V_L 生殖細胞系列遺伝子の利用が生じる場合、体の点突然変異は、この遺伝子が同一ではないことを確認する。

【0136】

従って、本発明者らは、このベリラーズ、ナイーブな、ヒトsFv抗体ファミリーディスプレイライブラリーにおいて、広い遺伝的多様性が存在すると考える。この主要な重鎖ファミリーおよび軽鎖ファミリーの各々が表されたが、少数ファミリーの全ては表されていなかった。後者の発見は、ほとんど、本発明者らが分析した小さいサンプルのサイズに起因しているようである。

【0137】

(1つのプラスミド誘導系のインビトロの機能性)

トランスフェクションアッセイが、方法において記載されたのと同様に実施された。本発明者らの実験のための内部比較として、本発明者らは、Yaoら、Human Gene Ther. 9:1939-1950(1998)によって記載されるツープラスミド(two plasmid)系を用いたトランスフェクションアッセイを含んだ。コントロールベクター、pcDNA3またはプラスミドを用いて同時トランスフェクションしたpCMtetO hEGFを得た結果は、Yaoの論文において報告されている知見と一致した(データは示されていない)。図3は、種々の濃度でテトラサイクリン誘導プラスミドを用いてトランスフェクトされたVero細胞の上清分析後に得られた結果を示す。2、5または10μgのプラスミドが感染のために使用される場合、本発明者らの系の効率という点では、有意な相違は存在しない。ツープラスミド系について記載されるように、hEGF発現は、時間依存様式で減少した。特に、hEGF発現が抑

制されて、そして72時間維持されて、感染後46~72時間で、約1,300分の1にまで抑制された。

【0138】

3つの遺伝的に改変されたHIV-Iに基づいたベクター(上記)が、インビトロにおけるHeLa細胞に感染するそれらの能力について試験された。eGFPは、レポーター遺伝子として用いられ、そして内部CMVプロモーターまたはウイルスプロモーター自体から駆動された遺伝子発現は、FACS分析によって評価された。表4は、6つの構築物によって得られた結果を示す。元々のレンチウイルスベクターが、自己不活性化された場合、またはgag遺伝子の有意な部分およびtat遺伝子の第1のエキソンが除去された場合、得られる力価の有意な減少はない。本発明者らの調製物を用いて得られた逆転写酵素の力価は、異なる構築物間で異ならなかった(データは示されていない)。この事実は、tatタンパク質の完全性が、ウイルス増殖の間にウイルス相互活性化を増幅するのに基本的に必要とされることを示したいくつかの以前の報告に関連する。本発明者らの場合において、tat遺伝子のエキソン1およびエキソン2の全配列は、トランスフェクションの間、パッケージング構築物へのトランスにおいて提供され、必要量のtatタンパク質を提供してウイルスを産生する。表1において、本発明者らはまた、eGFPの発現が、野生型ウイルスプロモーター(HVPEB)によって指向され得ることを観察し得る。さらに、自己不活性化のようなプロモーター領域の操作は、ウイルスプロモーターによって駆動された遺伝子発現をわずかに低減するが、強力なトランスアクチベーターである、tatタンパク質が存在しない場合、より有意に蛍光の百分率は減少し、いくつかのプロモーターの減弱化を示し得る。

【0139】

(tetRによるmRNA発現の転写制御)

レポーター遺伝子ならびにtetRをコードする、約2KbのポリシストロンmRNAは、誘導性および制御プラスミド両方由来の遺伝子転写の最初の1ラウンドの結果である(図2)。キャップ独立(cap-independent)翻訳によるtetRの最初の産生が、IRES配列を介して媒介される。IRE

Sエレメントの500個以下のヌクレオチドは、RNAの翻訳の内部の開始 (internal initiation) を促進する小さいリボソームのサブユニットを補充するために必要なシス作用エレメントを含む [E. Martinez-Salas, Curr. Opin. Biotechnol. 10:458-64]。tetR産生と同時に、転写の中断がテトラサイクリンの非存在下において起こる。このメカニズムは、tetRのダイマーとTATAボックスとCMVプロモーターの転写開始部位との間に位置する2つの縦列のtetO配列との間の高い親和性および有効な相互作用として説明され得、転写開始の妨害を生じる。テトラサイクリン (Tet) がこの系に添加される場合、tetRは、リプレッサーと抗生物質との間のより高い結合定数から、tetOに対する結合を生じる [W. Hinrichsら、Science 264:418-420 (1994)]。結果として、高レベルの発現が、キメラCMVプロモーターの活性化を通して達成され得る。

【0140】

トランスフェクションの後、48時間後の形質転換されたVERO細胞中に見出される転写レベルを、ノーザンブロットによって分析した。放射性標識したtetRプローブを使用し、コントロールおよび誘導可能なプラスミドから産生されたmRNAを可視化した (図2A中の下線)。トランスフェクトされていない細胞および空のコントロールプラスミドを用いてトランスフェクトされた細胞由来の総RNAを、本発明者らのネガティブコントロールとみなした (図2B、レーン1、2)。並行して、細胞をpcDNAtetRプラスミドを用いて形質転換し、そして、そのRNAを、本発明者らの実験のポジティブコントロールとして使用した (レーン3)。このプローブは、tetR遺伝子のmRNAサイズに対応する約0.6Kbの転写物を検出し得る。一部分 (one-piece) のコントロールプラスミド (1Pc) を用いて形質転換された細胞は、本発明者らの構築物の予想したサイズに一致するより高い分子量のmRNAの発現を示した。1mg/mlテトラサイクリンの非存在下または存在下における発現の差違は、示され得なかった (図2B、レーン4、5)。しかし、一部分の誘導可能なカセット (1Pi) を用いて形質転換された細胞に対応する転写物のレベルは、提

唱されるモデルに従う発現の調節を示した(図2B、レーン6、7)。抗生物質の非存在下かつトランスフェクト後48時間において、転写物は検出され得なかった。本発明者らが以前に記載したように、二倍シストロンの(bicistronic)mRNAのいくつかの分子は、抑制因子のキャップ非依存性翻訳に関する型としてはたらくために合成されることが必要である。最初のmRNA分子が、細胞から素早く分解されること、または、低いレベルのmRNAが、封じられている(silence)遺伝子転写を保持するために非常に基底レベルで産生されることは、可能である。別の可能性としては、細胞中のtetRの寿命が、この系の調節解除を保存するに十分な長さであることである。総RNAレベルを、図2Bの下のパネルに示し、等量のRNAが、ロード(load)されたことを示す。

【0141】

(単一カセット由来のhEGF発現の調節)

遺伝子発現の厳重な制御は、高い誘導性、誘導因子に対する特定かつ用量依存的な応答、ならびに誘導因子が除去された後に基底レベルに戻る能力を有する系が必要である。本発明者らは、インビトロトランスフェクション実験によって単一カセットのこれら3つの特性を試験した。

【0142】

有効性。本発明者らは、Yaoおよび共同研究者らによって記載された以前の系[F. Yaoら、Human Gene Ther. 9:1939-1950(1998)](ここで、発現制御および調節成分は、2つの別々のプラスミドに存在する)と比較した、本発明者らの単一カセットの有効性を分析した。この目的に関して、本発明者らは、両方の系の有効性について並行した機能の研究を実施し、これは、トランスフェクトされたVERO細胞の培養培地中へ分泌されたhEGFの量を測定することによる(図7)。実験条件は、2つのプラスミド系に関して記載された実験条件[F. Yaoら、Human Gene Ther. 9:1939-1950(1998)]と類似であった。レポーター遺伝子発現を、24時間毎に、細胞外培地を回収した後に分析し、そしてELISAによって産生されたhEGFの量を測定した。2つのプラスミド構築物を使用して

得られたデータは、Yaoら、Human Gene Ther. 9:1939-1950 (1998) によって以前に報告された結果と一致した。コントロールプラスミド由来のhEGFの発現は、抗生物質投与に対していずれの変化も示さなかった。pCMVtetOhEGF由来のhEGFの発現は、tetRが同時にトランスフェクトされない限り影響されず、テトラサイクリンの非存在下において、最初の24時間の間に約340倍の抑制を達成し、2つの継続的な時間点の間、それぞれ、600倍および950倍まで増加する。同様に、本発明者らの単一カセットを用いて、本発明者らは、1Pc構築物のCMVプロモーターから駆動されるhEGF発現のレベルにおいて差違を認めなかった。しかし、時間依存性tetR抑制が、1Pi系を用いて明確に観察された。55倍、100倍および900倍の抑制が、トランスフェクション後0~24時間、24~48時間、および48~72時間において検出された。十分なIRES媒介tetR合成が遺伝子活性化をブロックすることを達成するまで、両方の遺伝子が最初の回の転写の間に二倍シストロンのmRNAから同時に発現された。結果的に、第1のシストロンのキャップ媒介翻訳が生じ、これがテトラサイクリンの非存在下における、2つのプラスミド系と比較した1Pi系からのより高いレベルのhEGF産生に寄与した。本発明者らはまた、単一カセットを用いたtetR媒介抑制が、2つのプラスミド系を用いて観察された結果と比較して特定の遅延を示すことを観察した。これは、必要とされるレベルのtetRが、トランスフェクト後48時間までに達せず、そして/または最初に合成されたhEGFの完全なクリアランスが時間が経って生じるから、と説明され得る。48時間後、比較可能なレベルの抑制が、両方の系から得られ、本発明者らの系の有効性を提供する。

【0143】

用量応答。tetR媒介抑制の解除が、漸増する濃度のテトラサイクリンを1Pi系を用いてトランスフェクトされたVERO細胞の培養培地に添加した後に観察された(図8)。この系の完全な活性化は、50ng/mlのテトラサイクリンによって得られた。

【0144】

可逆性。本発明者らは、誘導後のテトラサイクリン除去に応答する1Pi系の

能力を試験した(図9)。1 P i 構築物を用いてトランスフェクトされた V e r o 細胞を、1 μ g / m l のテトラサイクリンの非存在下または存在下でインキュベーションした。24時間後、誘導因子に予め曝露された細胞のセットを、テトラサイクリンを欠く新鮮な培地で再び飼い、そして h E G F の濃度を、培養培地において分析した。図9に示すように、h E G F の分泌は次の24時間にわたってほとんど影響を与えないままであったが、テトラサイクリンの非存在下において48時間後、基底レベルまで劇的に低下した。遺伝子発現が前に起こっていた細胞における h E G F 遺伝子の転写開始が阻害され、少なくとも2日に関して2,500倍の抑制を達成した。誘導されていない状態に保持された細胞は、トランスフェクションの後、3日後に最大10,000倍の抑制を示した。

【0145】

(異なる細胞株における単一プラスミド系由来の e G F P 発現の調節)

t e t O 保有 C M V プロモーターが V E R O 細胞に加えた細胞株中のレポーター遺伝子の発現を制御する能力を測定した。この目的に関して、本発明者らは、本発明者らの構築物由来の h E G F 遺伝子を増強された緑色蛍光タンパク質 (e G F P) 遺伝子と置換し、そしてこのタンパク質の内在性発現に対して多様な細胞株をスクリーニングし、これには、異なる時間点において e G F P の発現を測定するために F A C S 分析を使用した(図10)。全ての場合において、コントロール細胞または空ベクターを用いてトランスフェクトされた細胞は、いずれの有意な蛍光バックグラウンドを示さなかった(図10は、V E R O 細胞からのデータを示す)。V E R O、C O S - 1 および C O S - 7 細胞は、蛍光強度によって測定した場合、1 P c プラスミドから類似したレベルの e G F P 発現を示した。ヒト細胞株 293 T における e G F P 発現は、サル細胞株よりも2倍高かった。全体的には、テトラサイクリンの非存在下または存在下において重要な蛍光という観点では、変化は観察されなかった。コントロール t e t O ユニットの性能は、細胞株の間で類似し、テトラサイクリンの非存在下で5倍の e G F P 強度の抑制に達した。t e t O 保有 C M V プロモーターの活性は、細胞の間で変化する。特に、テトラサイクリンの非存在下におけるより高い発現レベルおよびバックグラウンドが、ヒト 293 - T 細胞株において観察され；これはおそらく、アデ

ノウイルス由来のE1A/B遺伝子産物の存在に起因し、この遺伝子産物は、ウイルスCMVプロモーターの活性を促進することが示された。同様の結果が、トランスフェクション後、24時間、48時間および72時間で回収された細胞を分析した後に集められた(データには示さない)。

【0146】

実験された全ての細胞株は、テトラサイクリンの非存在下において有意なバックグラウンドレベルの発現を示した。基底レベルの発現が、この系の漏れの結果であるかまたは単にeGFPタンパク質のゆっくりとした代謝回転によって引き起こされたものであるか否かを調べるために、本発明者らは、免疫組織化学を使用して、テトラサイクリンの添加なしまたは添加ありで形質転換されたVERO細胞における、eGFP(FITCフィルター)およびtetR(PEフィルター)の産生を同時に見た(図11)。1Pcプラスミド由来の、キャップ媒介eGFP(図11A、11C)およびIRES媒介tetR(図11B、11D)産生は、誘導因子の非存在下または存在下において影響されないままであった。両方のタンパク質の細胞質分布および核分布を、異なる細胞で観察し、eGFPに関しては主に核であり、そして抑制因子に関しては主に細胞質であった。1Pi構築物を用いてトランスフェクトされた細胞は、異なる挙動を示した。テトラサイクリンの非存在下にもかかわらず、eGFPタンパク質は、視覚化し得(図11E)、tetRの発現が良好に観察された(図11F)。さらに、抑制がテトラサイクリンの添加によって解除される場合、eGFPおよびtetR陽性細胞が検出された(図11G、11H)。従って、tetR媒介抑制は、これらの細胞において効果的に作用するが、eGFPの長い寿命および安定性から、本発明者らは、短い期間におけるこのマーカー遺伝子を使用する系の活性化および抑制の程度を正確に決定できなかった。

【0147】

(核局在化シグナルの導入はtetR媒介抑制を促進する)

tetR分布が主に細胞質で観察されたので、核局在シグナル(NLS)をtetR遺伝子の3'末端に導入し、核への導入を促進し、そして結果的にtetR媒介の転写抑制を強化した。図12は、VERO細胞における一過性トランス

フェクション実験の結果を示し、これは、1 Pi系およびNLS配列を含む改変された変形を使用した。産生され培地中に分泌されたhEGFの測定により、24時間後、プラスミド間に有意な差違が見出されなかったことが示された。しかし、より早いtetR媒介抑制が、NLS構築物を用いて48時間後に観察され、テトラサイクリンの非存在下において、300倍の抑制または標的化されていないtetRよりも3倍高いtetRNLSタンパク質の有効性が得られた。48時間後、300倍および500倍の抑制が、それぞれ、1 Piおよび1 Pi NLSプラスミドから達成された。この系の導入という点に関しては、構築物の間に有意な差違は、観察されなかった。野生型CMVプロモーターを含む全ての構築物は、実験を通していずれの調節性の効果も示さなかった。

【0148】

異なる構築物におけるtetRの分布を免疫組織化学によって分析し、これは、細菌tetRに対するモノクローナル抗体を使用し、そしてFITCを用いて標識した2次抗体を用いた結合を検出した(図13)。空ベクターを用いてトランスフェクトされた細胞は、染色を示さなかった(図13A)。予想されたように、pcDNA tetRを用いてトランスフェクトされた細胞は、陽性であった(図13B)。tetR産生を検出するために、細胞を、固定の前に2日間テトラサイクリンで処理した。1 PiからのtetR発現が、細胞質および核の両方に存在したが(図13C)、tetRNLSタンパク質は、主に核の中に見出された(図13D)。

【0149】

図14は、HIV-1およびSHIV偽型VSV-GによるPPMCの感染の結果を示す。感染されたサル細胞からのGFP発現は、ヒトPBMCにおいてHIV-1ベクターを用いて得られた発現ほど明るくなく、蛍光細胞のより高いパーセンテージが、SHIVウイルスを用いて得ることができた(SHIVベクターを用いて約10%に対し、HIVベクターを用いて0.25%)。感染に使用された総ウイルスの量が、大体10倍異なることを強調することが重要である。感染の間の比較可能なウイルスロード(load)を使用することにより、サル由来PBMCを用いたインビトロ発現において、HIV-1ベクターと比較した

SHIVベクターの性能に関するより良い考えが提供される。

【0150】

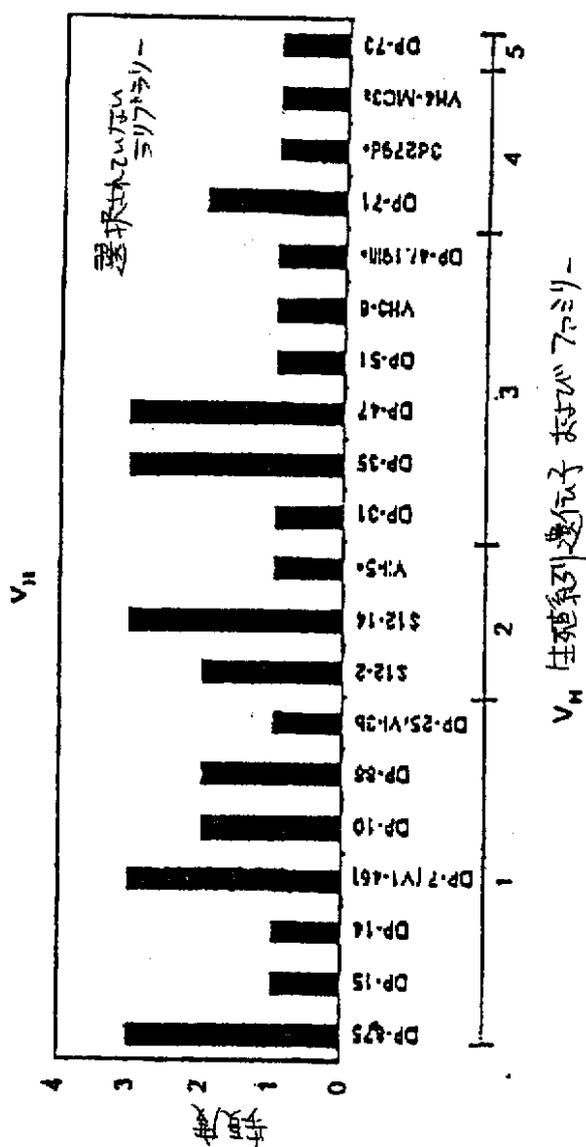
【表1】

	サル CD8-	ヒト CD8-	GFPの%	細胞/H	
非感染	48.5	26	0.02	1	
HIV C	40		0.37		
HIV GFP	166	1250	0.89	21	67
SHIV C	29.3	40	1.23	1.85	
SHIV GFP	169	90	9.2	12	7

本明細書に記載されるデータの参考が、本明細書に参考として援用される

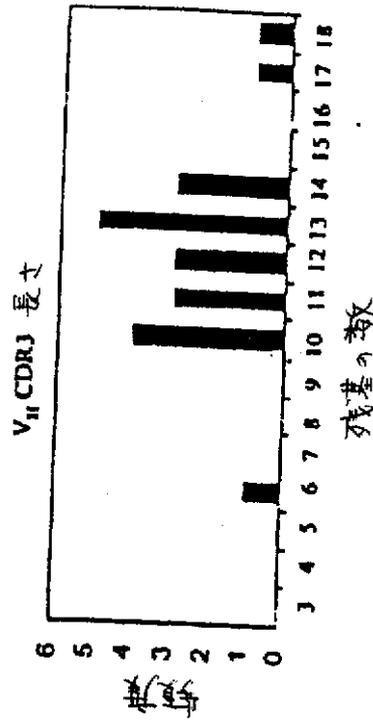
【0151】

【表2】



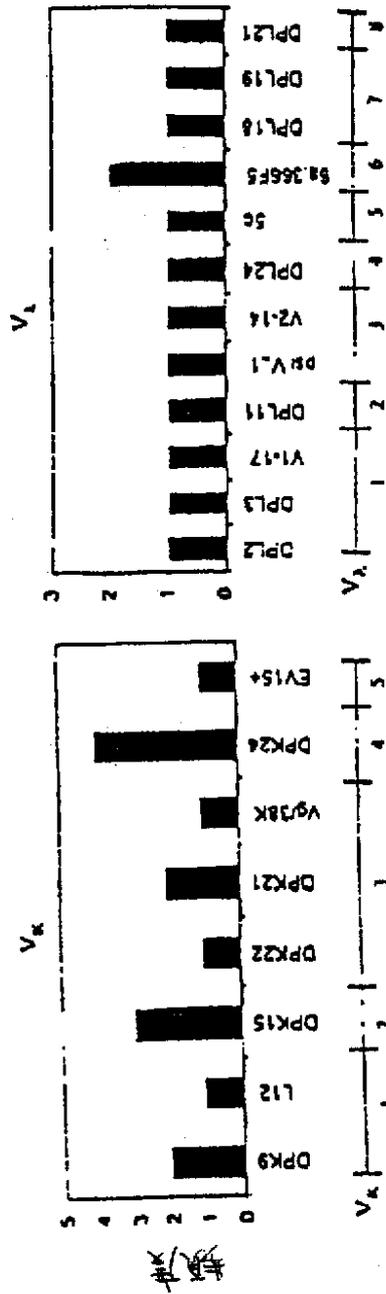
【0152】

【表3】



【0153】

【表4】



【0154】

【表5】

№79-	内部 プロモーター	Tat 発現	蛍光発現率%
HVP Δ EB	+	+	17
HVP Δ EB Δ LTR	+	-	16.3
HVP Δ EB Δ stat	+	-	13.3
HVP Δ EB	-	+	4.4
HVP Δ EB Δ LTR	-	-	3.8
HVP Δ EB Δ stat	-	-	2.1

本明細書中に記載されるすべての参考が、本明細書に参考として採用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、レンチウイルスベクター系の概略図を提供する。

【図2】

図2Aおよび2Bは、転写開始のtetR-媒介性抑制を示す。図2Aは、単一誘導性カセットおよび予期される多シストロン性mRNAの概要を説明する。図2Bは、ノーザンブロット分析を示す。モック(mock)処理されたベロ(Ver0)細胞ならびに空のベクター、pcDNAtetRプラスミド、ワンピースコントロール(1Pc)および誘導性ワンピース(1Pi)で独立にトランスフェクトされた細胞を、トランスフェクション後2日後に収集し、そしてRNA全体をTRIzol試薬を使用して分離し、続いてクロロホルム抽出をして、そしてイソプロパノールを用いて沈殿させた。RNA全体(20 μ g)を、変性条件において電気泳動し、そして放射標識されたtetRプローブ(2Aにおいて示されるXbaI-EcoRI DNAフラグメント)とハイブリダイズする特定のmRNAの存在を検出するためにハイボンド(hybrid)-N膜上にブロットした。tetR mRNAに対応する約0.6Kbの転写物が示される。誘導カセットに由来するビスシストロン性(bicistronic)mRNA発現のテトラサイクリン調節が観察される。

【図3】

図3は、種々の濃度(2.5または10 µg)におけるテトラサイクリン誘導性プラスミドを用いるトランスフェクトから得られた結果を表わす。

【図4】

図4は、標的分子のライブラリーをトランスフェクトするために使用されるクローニングベクター(pGEM-72f(t))の概略図である。

【図5】

図5Aおよび5Bは、パッケージングベクター(HIVNtetOIR)を含むHIV-Iベースのレトロウイルスベクター(図5A)およびパッキング欠損レンチウイルスベクター(図5B)の概略図である。

【図6】

図6は、ファージディスプレイ技術によって、単鎖抗体(sFv)の単離の方法を示す概略図である。

【図7】

図7は、2つの別個のプラスミドまたは単一コントロールカセットを使用するhEGF発現の調節の比較である。複製中のベロ細胞を、1 µg/mlのテトラサイクリンの非存在下(白棒および縞模様の棒)もしくは存在下(黒棒)のいずれかにおいて、0.5 µgのpCMVtetOhEGF(2Pi)もしくは非調節バージョンpCMVhEGF(2Pc)単独(白棒)を使用するか、あるいは2 µgのpcDNAtetR(縞模様の棒および黒棒)もしくは空のベクターpcDNA3.1(-)を組み合わせて使用して、2つのプラスミド系で独立にトランスフェクトした。ワンピースコントロール(1Pc)および誘導性プラスミド(1Pi)を試験するために、抗生物質の非存在下(縞模様の棒)または存在下(黒棒)において、2.5 µgの対応するDNAを用いて、細胞を3連で独立に試験した。細胞外の培地を、指示された時間においてトランスフェクトされた細胞から収集し、そしてhEGFの発現を、ELISAによって測定した。

【図8】

図8は、テトラサイクリンに対する用量-応答効果を示す。1Piカセットでトランスフェクトされたベロ細胞を処理し、そして培養培地において増加する濃

度のテトラサイクリンの存在下で増殖させた。48時間後、培地に放出されたhEGFの量を、ELISAによって分析した。

【図9】

図9は、ベロ(VERO)細胞における、本発明者らの単一カセットの可逆的効果を示す。トランスフェクトされた細胞を、実験全体の間(黒棒)あるいは24時間処理の後、テトラサイクリンの非存在下(白棒)または存在下において培養し、その細胞を、誘発因子を伴わずに培地中に維持した(斜線棒)。培養培地を、指示された時点におけるhEGF産生について分析した。

【図10】

図10は、異なる細胞株におけるeGFP発現の制御を示す。トランスフェクトされていない細胞、および空のベクター、pcDNA3.1(-)または本発明の1Pcあるいは1Piプラスミドでトランスフェクトされた細胞のいずれかを、トランスフェクションの48時間後にFACS分析によって分析し、異なる細胞株における内因性eGFP発現を決定した(1μg/mlテトラサイクリンの非存在下(ストライプのバー)または存在下(黒いバー))。

【図11】

図11A~Hは、トランスフェクトされたVerocellにおいてeGFPおよびtetRの共発現を示す。1Pc(図11A~D)または1Pi(図11E~H)でトランスフェクトされたVerocellを、分析の前に誘発因子(inducer)の非存在(11A、11B、11Eおよび11F)または存在(図11D、11D、11Gおよび11H)下で、2日間増殖させた。eGFP(図11A、11C、11Eおよび11G)およびtetR(図11B、11D、11Fおよび11H)発現の同時の観察を、tetRに対する第1抗体を使用してtetRタンパク質の免疫反応によって行った。そしてPEに結合した第2のヤギ抗マウスIgGは、異なる波長での免疫複合体の検出を可能にする。

【図12】

図12は、NLS配列を挿入することによってtetR媒介性抑制が増強されることを示す。コントロール(1PCまたは1Pc.NLS)または本発明の構築物の誘発性(1Piまたは1Pi.NLS)型(version)のいずれか

でトランスフェクトしたVero細胞を、テトラサイクリンの非存在（ストライプのバー）または存在下（黒いバー）で増殖させた。収集された上清のアリコートを分析し、培養培地に分泌されたhEGFの量を決定した。

【図13】

図13A～Dは、NLS配列の添加後のtetRの免疫学的局在決定を示す。異なるプラスミド構築物でのVERO細胞のトランスフェクション後のtetRタンパク質の局在化を、従来の免疫蛍光によって行った。テトラサイクリンの存在下でコントロールプラスミド（図13A）、pcDNAtetRプラスミド（図13B）、および1Pi（図13C）または1Pi.NLS（図13D）でトランスフェクトした細胞を、4%ホルムアミド/PBSで固定し、そして界面活性剤で透過処理し、その後tetRに対するモノクローナル抗体とインキュベートした。第1抗体との2時間のインキュベート後、FITCに結合したヤギ抗マウスIgGは、蛍光顕微鏡下での可視化を可能にした（最終拡大率は400倍）。

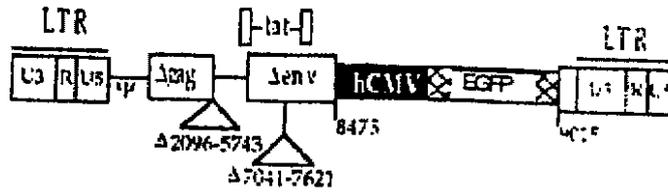
【図14】

図14は、2つの偽型霊長類レンチウイルス（HIVおよびSHIV）によって、感染されたCD8⁺（ストライプのバー）およびヒトCD8⁺（ベタの黒いバー）PBMCの感染の比較を示す。

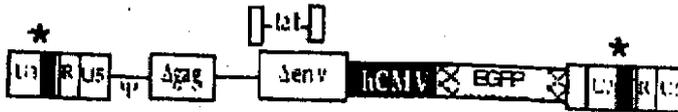
【図1】

転移ベクター:

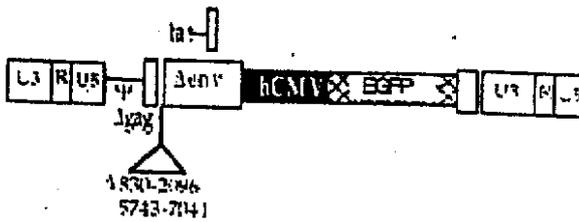
弱毒化された
HIVベクター
(Δ vif, nef, rev vpr)



自己不活化
HIVベクター

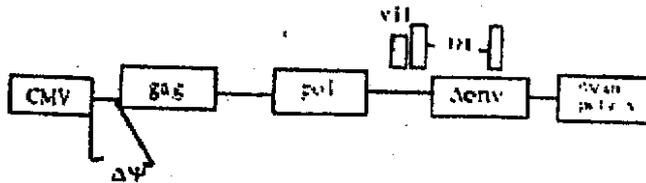


Tat-欠失化
HIVベクター



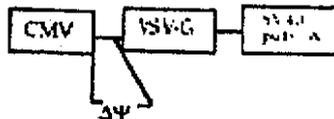
パッケージ構築物:

pCMVgag-pol



VSV-G-コードプラスミド:

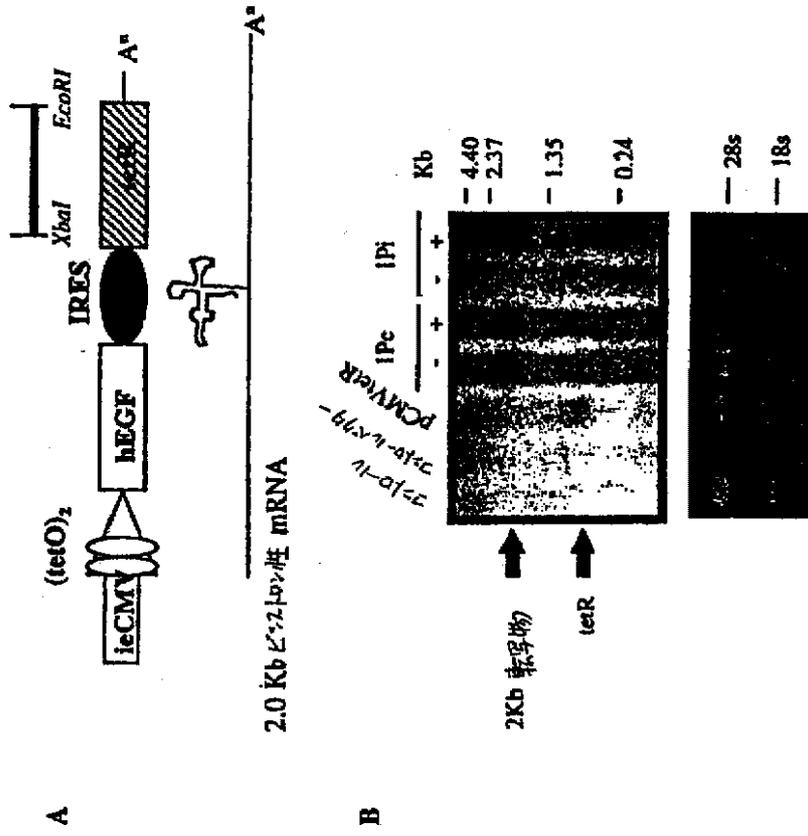
pCMV-VSV-G



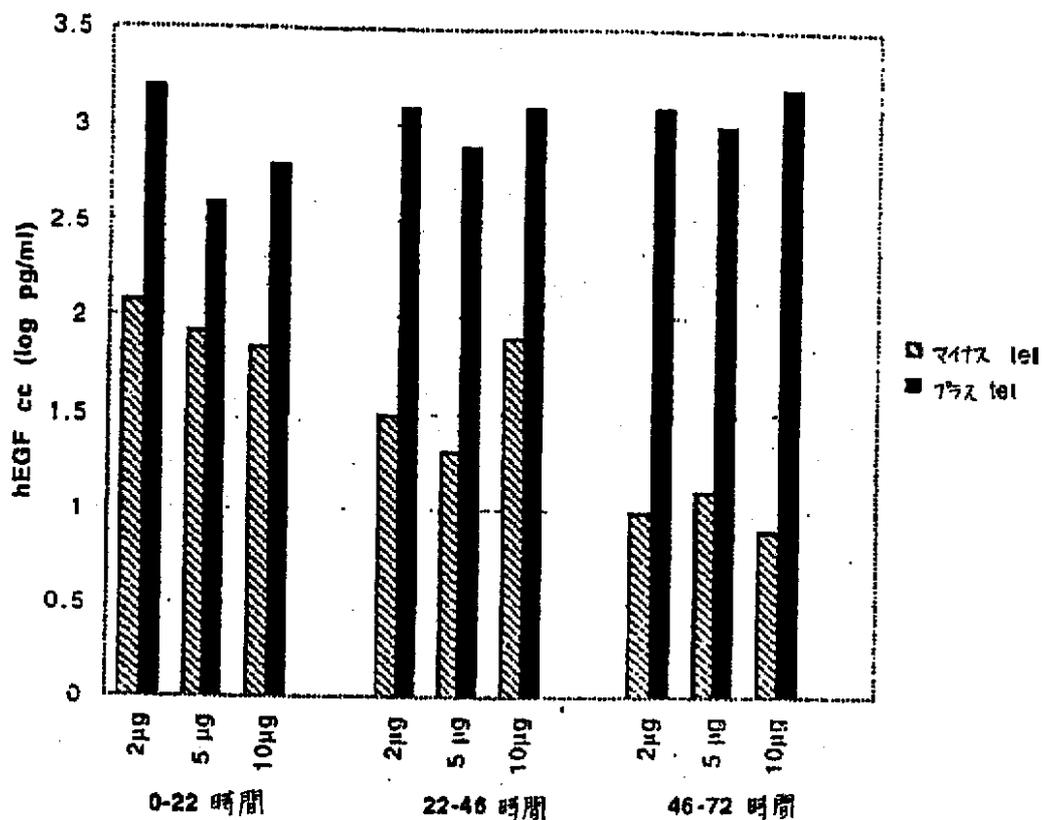
アクセサリプラスミド

Rev-コードプラスミド

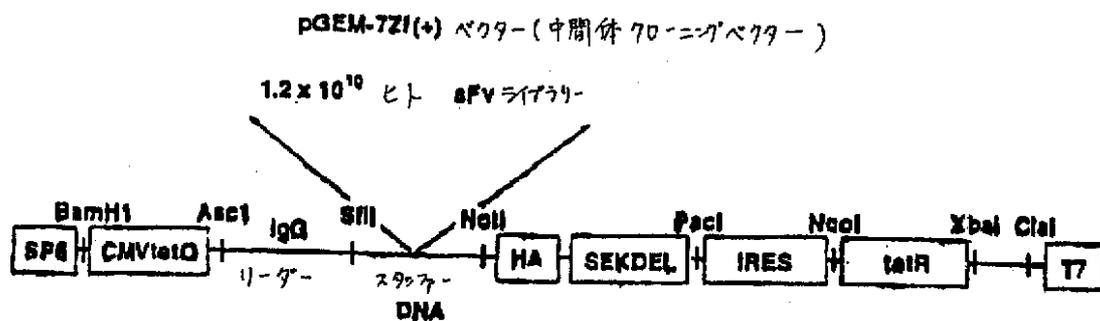
【图2】



【図3】

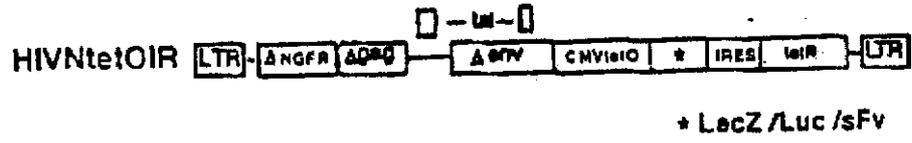


【図4】

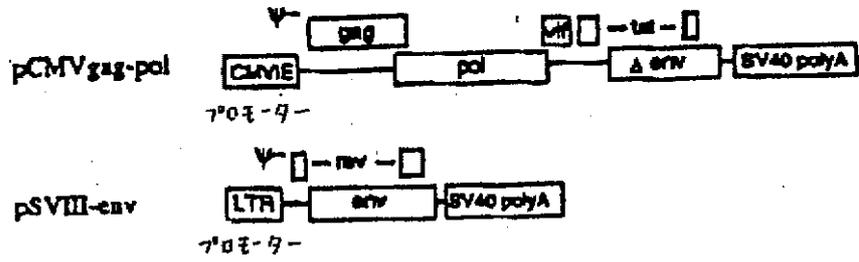


【図5】

5A

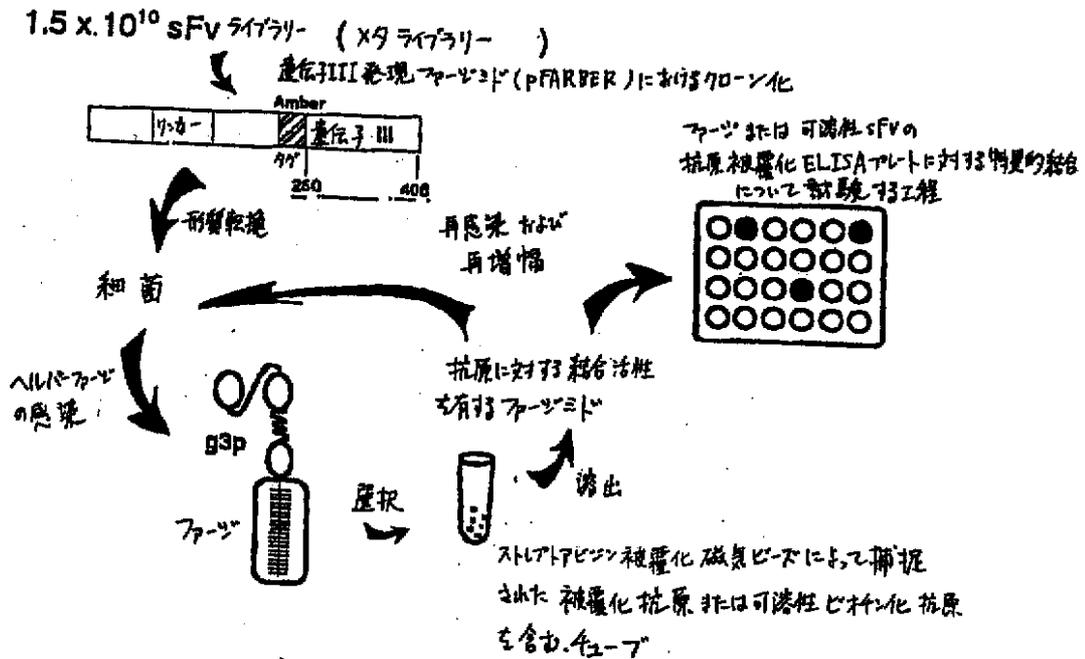


5B



【図6】

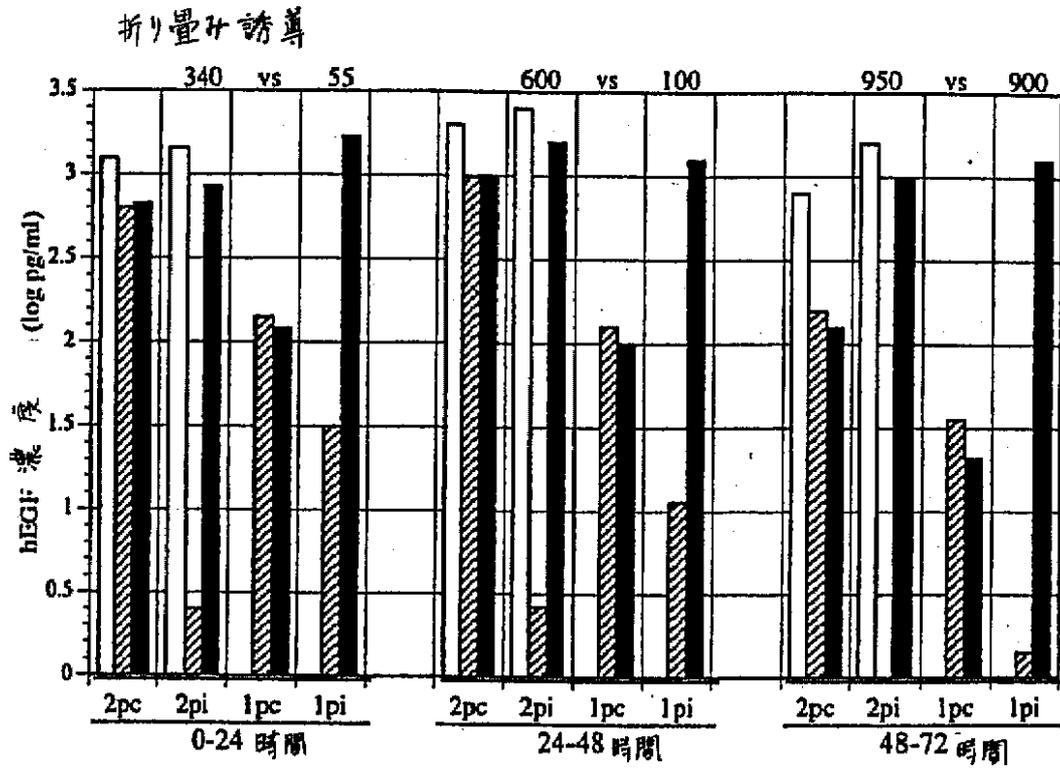
ファージディスプレイ技術によるヒト単鎖抗体(sFv)を単離する
ためのストラテジー (DFCI-ファージ抗体コアプティマーについて)



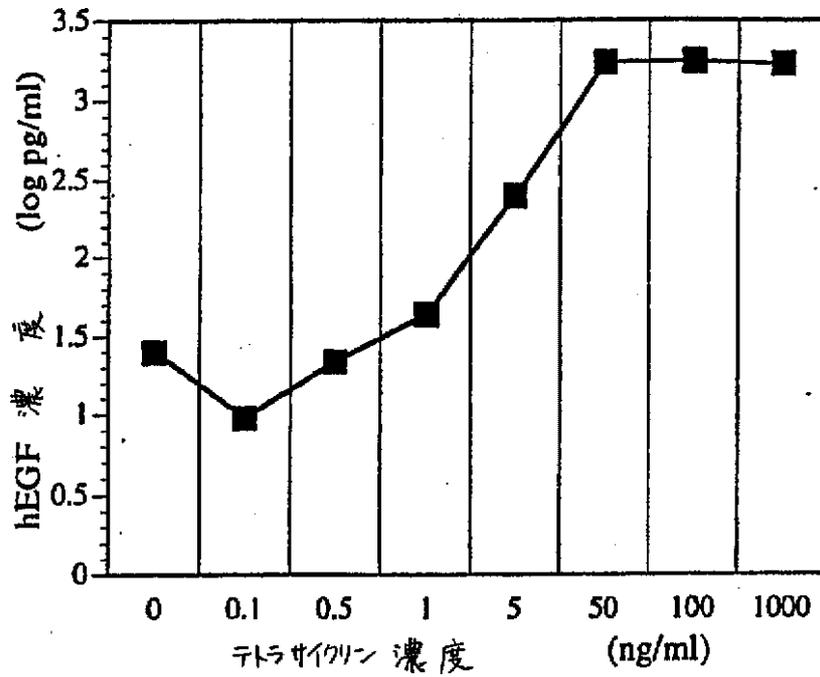
現在まで特徴付けられたバインダーの特異性:

1. ビオチン - CC5R
2. ビオチン - EBV LMP-44
3. ビオチン - BcLx
4. ビオチン - huE1
5. ストリプトアビジン

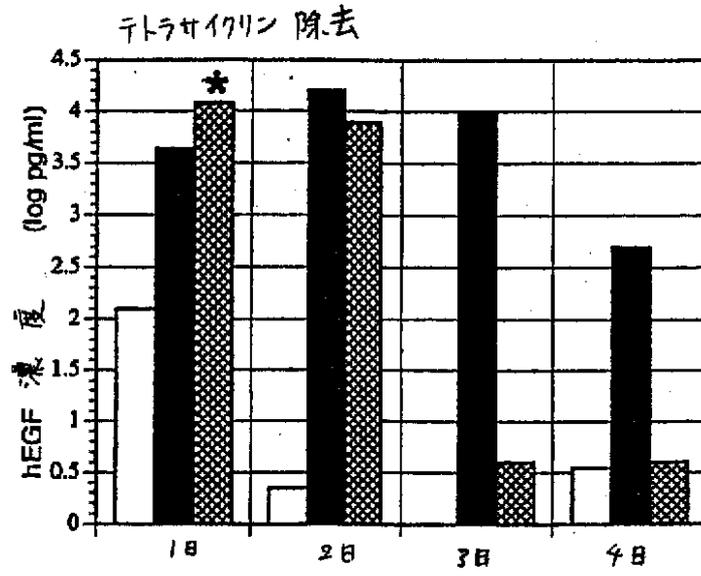
【図7】



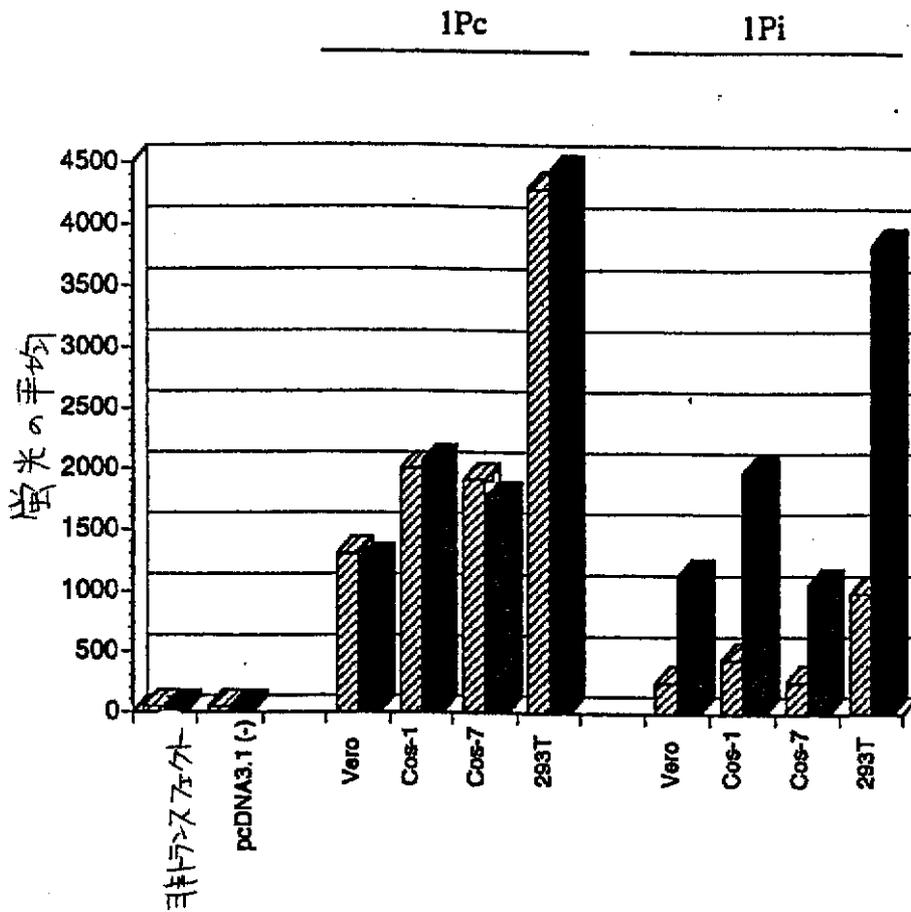
【図8】



【図9】



【図10】



【図11】

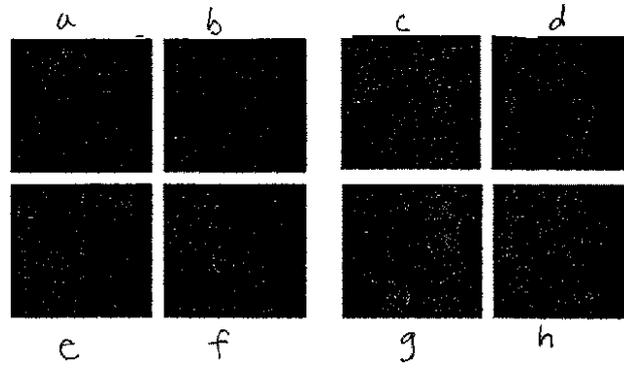
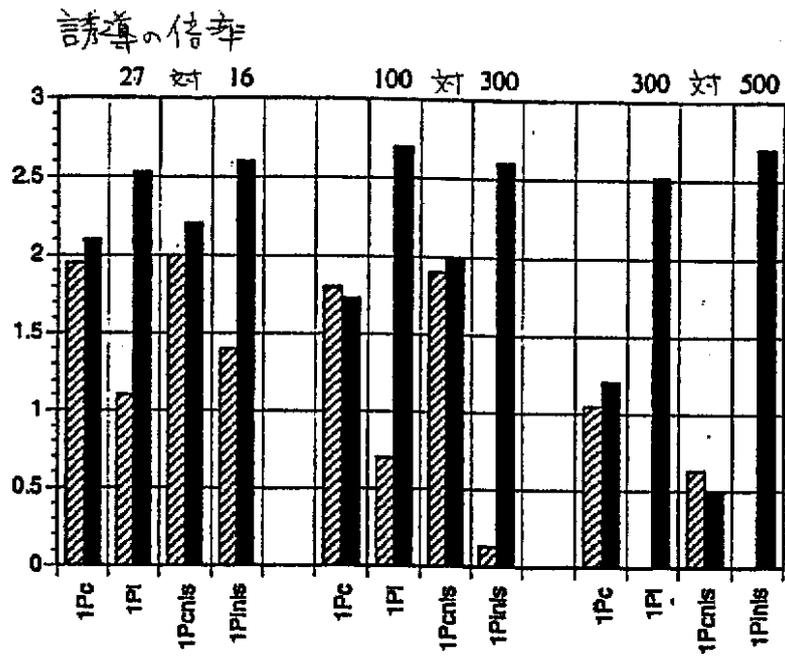


Figure 11

【図12】



【図13】

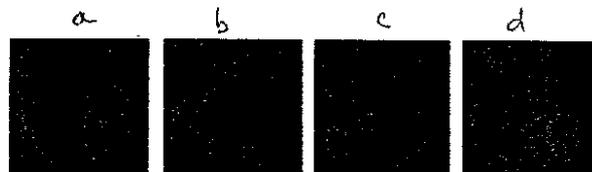
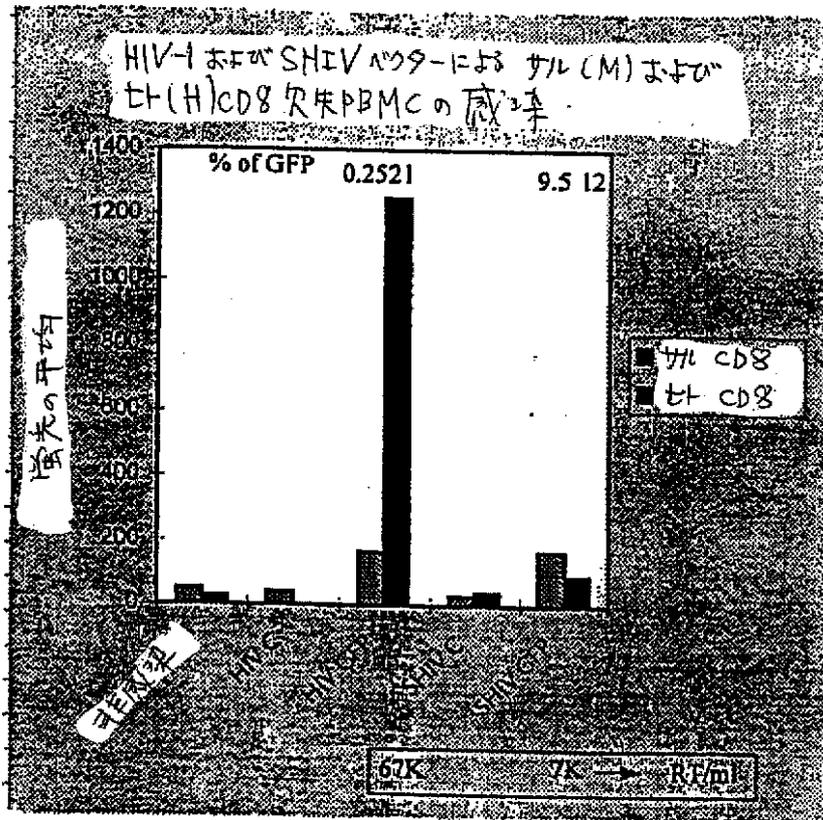


Figure 13

【図14】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US00/07064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC(7) : C12Q 1/70; C12N 15/00, 15/63; A61K 48/00; C07K 16/00 US CL : 435/5, 7.1, 69.1, 91.4, 320.1, 455, 236, 375; 514/44; 530/387.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5, 7.1, 69.1, 91.4, 320.1, 455, 236, 375; 514/44; 530/387.1	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
A	RONDON, I.J., et al. Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases. Annual Reviews of Microbiology, 1997. Vol. 51. pages 257-283, especially 274-276.
A,P	MHASHILKAR, A.M. Inhibition of Human Immunodeficiency virus type I replication in vitro in acutely and persistently infected human CD4+ mononuclear cells expressing murine and humanized anti-human immunodeficiency virus type I Tat single-chain variable fragment intrabodies. Human Gene Therapy. June 1999. Vol 10. pages 1453-1467, especially page 1453.
	Relevant to claim No.
	1-16
	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents:	
A	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
E	earlier document published on or after the international filing date
L	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
O	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
P	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
X	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
Y	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
Z	document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 MAY 2000	13 JUN 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer JON SHUMAN Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/07064

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, DIALOG, NTIS, CA, MEDLINE, BIOSIS, BIOTECH, BIOSCI, AUTHOR SEARCH
search terms: method, screen, library, antisense, antibody, intrabody, ribozyme, phenotype, phenocopy, knockout,
expressed sequence tag, lentivirus, lentiviral

フロントページの続き

(72)発明者 オグエタ, サンドラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02146, ブルックライン, ビーコン
ストリート 1440, アpartment
205

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA03 BA21 BA61
BA63 CA02 CA11 DA02 EA02
FA01 FA02 GA11 HA11
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ13 QQ52
QQ79 QQ91 QQ94 QR31 QR77
QR79 QR80 QS38

专利名称(译)	用于大型筛查的慢病毒载体系统		
公开(公告)号	JP2002538842A	公开(公告)日	2002-11-19
申请号	JP2000605794	申请日	2000-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究所有限公司		
[标]发明人	マラスコウエインエイ オグエタサンドラ		
发明人	マラスコ, ウェイン エイ. オグエタ, サンドラ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K48/00 C07K14/145 C07K14/155 C07K14/52 C12N7/04 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/867 C12Q1/02 C40B40/02		
CPC分类号	C40B40/02 A61K48/00 C07K14/005 C07K14/52 C12N7/00 C12N15/1037 C12N15/86 C12N2740 /15022 C12N2740/16043 C12N2740/16045 C12N2740/16052 C12N2740/16062 C12N2760/20222 C12N2810/50 C12N2810/60 C12N2810/6081 C12N2830/003 C12N2830/38 C12N2840/20 C12N2840 /203		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/53.D C12N15/00.ZCC.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA03 4B024/BA21 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024 /CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA01 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ13 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QQ94 4B063 /QR31 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS38		
优先权	60/124641 1999-03-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了从一组潜在的靶分子中筛选靶分子的方法。该方法涉及慢病毒载体文库的使用。该组现在编码一组靶分子，然后转导一组细胞，并针对所需表型筛选转导的细胞。选择表现出所需表型的细胞并鉴定靶分子。本发明的方法包括用多个慢病毒病毒体转导多个细胞。

