

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成18年4月6日(2006.4.6)

【公表番号】特表2002-503459(P2002-503459A)

【公表日】平成14年2月5日(2002.2.5)

【出願番号】特願2000-531540(P2000-531540)

【国際特許分類】

C 12 N	15/09	(2006.01)
A 61 K	35/76	(2006.01)
A 61 K	48/00	(2006.01)
A 61 P	35/00	(2006.01)
C 12 N	7/00	(2006.01)
A 61 K	38/45	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/00	Z N A A
A 61 K	35/76	
A 61 K	48/00	
A 61 P	35/00	
C 12 N	7/00	
A 61 K	37/52	

【手続補正書】

【提出日】平成18年2月13日(2006.2.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】ファイバー置換タンパク質を含有する修飾されたアデノウィルス

【特許請求の範囲】

【請求項1】アデノウィルスファイバータンパク質をファイバー置換タンパク質で置換することにより修飾されたアデノウィルス。

【請求項2】前記ファイバー置換タンパク質が、

a) アデノウィルスファイバー尾部領域を含むアミノ末端部、

b) キメラファイバー置換タンパク質、および

c) ターゲッティングリガンドを含むカルボキシ末端部、

を含むことを特徴とする請求項1記載のアデノウィルス。

【請求項3】前記ファイバー置換タンパク質が、アデノウィルスのペントンベースと結合することを特徴とする請求項2記載のアデノウィルス。

【請求項4】前記ファイバー置換タンパク質が、杖状の三量体タンパク質であることを特徴とする請求項2記載のアデノウィルス。

【請求項5】前記杖状の三量体タンパク質が、野生型アデノウィルスの天然ファイバータンパク質に匹敵する直径を有することを特徴とする請求項4記載のアデノウィルス。

【請求項6】前記ファイバー置換タンパク質が、ターゲッティングリガンドをコードする配列がカルボキシ末端に組み込まれたときに三量体性を維持することを特徴とする請求項2記載のアデノウィルス。

【請求項7】前記ファイバー置換タンパク質が、可溶性であることを特徴とする請

求項2記載のアデノウイルス。

【請求項8】 前記ファイバー置換タンパク質が、T4バクテリオファージフィブリチンタンパク質であることを特徴とする請求項2記載のアデノウイルス。

【請求項9】 前記ファイバー置換タンパク質が、三量体構造タンパク質、三量体ウイルスタンパク質および三量体転写因子からなる群より選択されることを特徴とする請求項2記載のアデノウイルス。

【請求項10】 前記ファイバー置換タンパク質が、イソロイシン三量体化モチーフであることを特徴とする請求項2記載のアデノウイルス。

【請求項11】 前記ファイバー置換タンパク質が、ヒト肺サーファクタントDからのネック領域ペプチドであることを特徴とする請求項2記載のアデノウイルス。

【請求項12】 前記ファイバー置換タンパク質が、高次コイル二次構造を有する人工タンパク質であって、該二次構造が多数の分子間鎖相互作用のために安定であることを特徴とする請求項2記載のアデノウイルス。

【請求項13】 前記ターゲッティングリガンドが、生理的リガンド、抗レセプター抗体、細胞特異的ペプチドおよび一本鎖抗体からなる群より選択されることを特徴とする請求項2記載のアデノウイルス。

【請求項14】 前記アデノウイルスが、ゲノム中で治療遺伝子を運搬することを特徴とする請求項1記載のアデノウイルス。

【請求項15】 前記治療遺伝子が、単純疱疹ウィルスチミジンキナーゼ遺伝子であることを特徴とする請求項14記載のアデノウイルス。

【請求項16】 腫瘍細胞を殺すための組成物であって、請求項15記載のアデノウイルスを含有し、該組成物を個体に投与した後、該個体にガンシクロビルが投与されることを特徴とする組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

関連出願の説明

本出願は、現在は放棄された、1998年2月17日に出願された米国仮特許出願第60/074,844号の恩恵を主張する。

【0002】

連邦基金

本発明は、国立衛生研究所からの自由準備金を使用して一部補助された。したがって、連邦政府は本発明に特定の権利を有する。

【0003】

発明の背景

本発明は、通常、ベクター生物学および遺伝子治療の分野に関する。さらに特定すると、本発明は、内因性親和性除去を伴う細胞特異的ターゲッティングのためにファイバーが置換された組換えアデノウイルスベクターの產生に関する。

【0004】

関連技術の説明

二十面体のキャプシドの12の頂点のそれから突き出すファイバータンパク質(21-23)のノブ部分中の領域の特異的なレセプター認識により、アデノウイルスは真核細胞と相互作用する。組換えアデノウイルスベクターは、多くの遺伝子治療用途に使用される(21, 35, 38)。この事実は主に、インビトロおよびインビボの両方におけるこのベクターアプローチにより達成可能な高レベルの遺伝子転移に由来する。

【0005】

組換えアデノウイルスベクターは、様々の器官中の分化した標的細胞にインサイチュで遺伝子を供給できる独特の能力により、他のシステムと区別される(5, 6, 9, 10, 12, 20, 25, 27, 29, 31)。これにより、供給されたベクターが標的器官内に含有される、囊胞性線維症のような遺伝性遺伝子病を治療するためのアプローチとして、組換えアデノウイルスベクタ

ーを利用することが可能になった(4-13)。さらに、アデノウィルスベクターがインサイチュで腫瘍形質導入できることにより、移動局所病 (loco-regional disease) のための様々な抗癌遺伝子治療アプローチが開発された(14-18)。

【 0 0 0 6 】

アデノウィルスベクターは、静脈注射後様々な器官にインピボで遺伝子を供給できる。これらの例において、遺伝子転移の頻度は、様々な免疫モデル中で遺伝性代謝異常を治療するのに十分高い。したがって、アデノウィルスベクターは、遺伝子治療のために静脈投与されるベクターの2つの必要条件を満たす：系統的安定性および高い効率の筋肉細胞の形質導入に続き長期間の遺伝子発現を達成する能力。

【 0 0 0 7 】

しかしながら、アデノウィルスには、アデノウィルス細胞レセプターが広く分布しているために、特定の細胞系のターゲッティングが妨げられるという不利な点がある。アデノウィルスベクターのこの親和性の欠失により、標的細胞への供給に利用できるウィルス粒子の数が非標的細胞による壊死巣分離により減少するので、形質導入の効率が減少するであろう。さらに、これにより、未知のおよびおそらく有害な結果を伴って、供給された遺伝子が異所的に発現するであろう。したがって、アデノウィルスベクターの親和性を標的細胞へ特異的に向け直し、感染した器官へのみ遺伝子を供給する方法が開発されなければならない。

【 0 0 0 8 】

この目的のために、いくつかのグループが、アデノウィルスファイバータンパク質のノブ領域への遺伝的修飾およびそのようなキメラファイバーのビリオン中への組み込みを報告した。例えば、Stevenson等(35)および他(24)は、それぞれAd5ファイバーの尾部およびシャフト領域とAd3のノブ領域とから成るファイバーを含有するAd5ビリオンの產生に成功したことを報告した。さらに、Michael等(30)は、組換えAd5ファイバーのカルボキシ末端中へのガストリン放出ペプチドの組み込みを示した。この発見は、そのようなファイバーを含有する組換えアデノウィルスベクターの救出(rescue)を達成したLegrand等(30a)により拡張された。Wickham等(41)は、カルボキシ末端ポリリシン配列を有するファイバーを含有する組換えウィルスの產生を記載した。これらの研究により、この遺伝的アプローチに関して重要な実行可能性の問題が確立されたが、ファイバータンパク質の正確なひだ形成を混乱させ得る、リガンドのサイズを含む多くの制限因子もまた示された。

【 0 0 0 9 】

従来技術は、新しいターゲッティングと天然の親和性の除去とを組み合わせて組換えアデノウィルスベクターを產生する効果的な方法がない点で不十分なままである。本発明は、当該技術におけるこの長年の必要および要求を満たす。

【 0 0 1 0 】

発明の概要

本発明には、組換えの、細胞特異的アデノウィルスベクターの次の世代が記載される。さらに特定すると、本発明の明細書には、アデノウィルスの親和性の修飾において考慮すべき2つの態様があることが開示される：(1)内因性親和性の除去；および(2)新しい親和性の導入。遺伝子治療用途のための組換えアデノウィルスの有用性を拡大するために、天然のベクターの親和性を変化させて細胞特異的形質導入を達成する方法が必要である。そのようなターゲッティングを達成するために、アデノウィルスファイバータンパク質中ヘリガンドを組み込み、細胞表面レセプターへのアデノウィルスの一次結合を媒介させることができる。ここに記載されるように、本発明には、アデノウィルスファイバータンパク質の置換により產生される標的化アデノウィルスの開発が開示される。本発明には、ファイバー尾部領域、バクテリオファージT4からのフィブリチン(fibritin)遺伝子の一部およびリガンド領域からなるファイバー置換または置換タンパク質を含む組換えアデノウィルスベクターが開示される。組換えアデノウィルスベクターはまた、ガンシクロビルの存在下で、治療遺伝子すなわち単純疱疹ウィルスチミジンキナーゼ遺伝子をコードしてもよく、アデノウィルスは、標的化レセプターを発現する細胞の特異的な殺害を媒介でき

る。したがって本発明により、非アデノウィルス細胞レセプターを媒介とする組換えアデノウィルスベクターの再ターゲッティングが証明される。

【 0 0 1 1 】

本発明のある実施の形態において、内因性ウィルス親和性を欠失するが新しい親和性を有する組換えアデノウィルスベクターであって、該アデノウィルスベクターがウィルス親和性を修飾するように修飾されて置換アデノウィルスファイバータンパク質を產生し、該置換されたファイバー遺伝子が尾部領域、T4バクテリオファージフィブリチンのカルボキシ末端部およびリガンドを含むアデノウィルスファイバー遺伝子のアミノ末端部を含み、前記置換されたアデノウィルスファイバーが三量体化する能力および天然生合成特性を保有し、前記リガンドが生理的リガンド、抗レセプター抗体および細胞特異的ペプチドからなる群より選択され、前記アデノウィルスベクターがさらに治療遺伝子を含有し、該治療遺伝子が単純疱疹ウィルスチミジンキナーゼ遺伝子である、組換えアデノウィルスベクターが提供される。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の実施の形態において、そのような治療が必要な個体中の腫瘍細胞を殺す方法であって、有効な量の組換えアデノウィルスベクターで前記個体を前処理し、前記個体にガンシクロビルを投与する、各工程を含む方法が提供される。

【 0 0 1 3 】

本発明の他のおよびさらなる態様、特徴、および利点は、開示の目的のために与えられた本発明の目下好ましい実施の形態の以下の記載から明らかとなるであろう。

【 0 0 1 4 】

図面の簡単な説明

上述された、並びにこれから明らかになるであろう本発明の特徴、利点および目的が達成され詳細に理解されるように、添付の図面に示されるある実施の形態を参照して上記で簡単に要約された本発明をより特定して記載する。これらの図面は明細書の一部を形成する。しかしながら、添付の図面は本発明の好ましい実施の形態を示し、したがって本発明の範囲において制限するものと考慮すべきではないことに留意すべきである。

【 0 0 1 5 】

図1は、ファイバー-フィブリチン-6-ヒスチジンキメラからなる置換ファイバーの図を示す。

【 0 0 1 6 】

図2は、E.coli中で発現されたファイバー-フィブリチン-6ヒスチジンキメラタンパク質のSDSゲル電気泳動を示す。タンパク質を4-10%のSDS-PAAゲル上で分離し、次にクマシーブリリアントブルーで染色した。レーン1、煮沸により変成したファイバー-フィブリチン-6ヒスチジン；レーン2、ファイバー-フィブリチン-6ヒスチジン天然三量体；レーン3、タンパク質分子量標準。

【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、ファイバー置換タンパク質でアデノウィルスファイバータンパク質を置換することにより修飾されたアデノウィルスに関する。好ましい実施の形態において、ファイバー置換タンパク質は、a)アデノウィルスファイバー尾部領域を含むアミノ末端部；b)キメラファイバー置換タンパク質；およびc)ターゲッティングリガンドを含むカルボキシ末端部、を含む。

【 0 0 1 8 】

以下の記載により、当業者は、推定のファイバー置換タンパク質が本発明の組成物および方法において所望なように機能するか否かを決定できる。通常、ファイバー置換タンパク質は、アデノウィルスのペントンベースと結合する。構造的には、ファイバー置換タンパク質は好ましくは、杖状の、三量体タンパク質である。杖状の、三量体タンパク質の直径は、野生型アデノウィルスの天然ファイバータンパク質に匹敵することが所望である。ターゲッティングリガンドをコードする配列をカルボキシ末端に組み込む場合、ファイバ

一置換タンパク質が三量体性(trimerism)を維持することが重要である。好ましい態様において、ファイバー置換タンパク質の代表例は、T4バクテリオファージフィブリチンタンパク質である。より一般的に、ファイバー置換タンパク質は、三量体構造タンパク質、三量体ウィルスタンパク質および三量体転写因子からなる群より選択できる。ファイバー置換タンパク質の他の代表例には、ヒトの肺サーファクタントDからのイソロイシン三量体化モチーフおよびネック領域ペプチドが含まれる。好ましくは、ファイバー置換タンパク質は、高次コイル二次構造を有する。二次構造は、複合的な分子間鎖相互作用により安定性を提供する。

【0019】

ファイバー置換タンパク質は、天然タンパク質である必要はない。実際、当業者は、人工タンパク質を作成することが可能であろう。好ましくは、そのような人工ファイバー置換タンパク質は、高次コイル二次構造を有する。

【0020】

本発明のアデノウィルスにおいて、ターゲッティングリガンドは、生理的リガンド、抗レセプター抗体、細胞特異的ペプチドおよび一本鎖抗体からなる群より選択される。ある実施の形態において、アデノウィルスは、そのゲノム中で治療遺伝子を運搬する。治療遺伝子の代表例は、単純疱疹ウィルスチミジンキナーゼ遺伝子である。

【0021】

本発明はまた、そのような治療を必要とする個体中の腫瘍細胞を殺す方法であって、効果的な量の本発明のアデノウィルスで前記個体を前処理し；前記個体にガンシクロビルを投与する、各工程を含む方法に関する。

【0022】

Ad5ファイバーの修飾により得られた従来の結果により、天然ファイバータンパク質の三量体構造は、長いインサートを収容するのに十分安定ではなく、分子は大きいリガンドの組み込みに耐えられないであろうということが示される。ノブは、分子の残りの部分がノブにより開始される三量体化過程に“受動的に”従う一方で、ファイバーの三量体構造を維持するファイバーの主要な(または唯一の)構造構成要素であると考えられる。内因性ファイバー親和性を欠失し新しい親和性を有する組換えビリオンを產生するために、通常、ノブを置換する2つの異なるタンパク質成分の間のノブ領域により、アデノウィルスファイバーの機能を“分離させる”ことができる。このことは、ノブを体外三量体化モチーフで置換してノブのないファイバーの三量体化を維持し、同時に新しいレセプターへビリオンを標的付けることができるリガンドをファイバー中に導入することにより、達成できる。

【0023】

ファイバーの役割はおそらく、ビリオンの表面から離れて細胞結合部位を配置することであるので、ファイバーは別の杖状三量体タンパク質で置換してもよい。三量体であることに加えて、タンパク質は、アデノウィルスのペントンベースと結合しふリオン中に組み込まれる能力を有する必要がある。不適合性の問題を防ぐために、キメラタンパク質のアミノ末端を、アデノウィルスファイバーの尾部領域中に組み込んでもよい。さらに、推定ファイバー置換タンパク質は、ターゲッティングリガンドに対応する(相対的に)大きい付加配列をカルボキシ末端中に組み込むことに耐えなければならない。

【0024】

バクテリオファージT4のフィブリチンは、ファージ粒子の“カラー”および“ホイスカ- (whiskers)”を形成し、上述の基準の多くを満たすタンパク質である。フィブリチンの486アミノ酸配列は、アミノ末端領域(47残基)、大きい中心領域およびカルボキシ末端領域(29残基)からなる。中心領域は、様々の長さの12のセグメントを有し、それぞれが -らせん高次コイル構造を有する。広範囲の生物物理学的および配列の分析により、フィブリチンは平行三本鎖 -らせん高次コイルとして表された。フィブリチンの三量体は、65までの温度で安定である。重大なことに、アミノ末端において残基が欠失しているフィブリチンおよびアミノ末端伸長を含有する組換えフィブリチンの両方が、正しく三量体を

組み立てる。フィブリチンのカルボキシ末端領域は、三量体化および安定な三量体を形成するためのAd5ファイバーのノブとのフィブリチンのカルボキシ末端融合に必要である。さらに、E.coli中で過発現された場合には、組換えフィブリチンおよびその誘導体は可溶性である。ファイバー置換のための魅力ある候補になるフィブリチンの別の特徴は、それが柔軟であるという事実である。したがって、ファイバーの性質により定められる長さの必要条件は、ウシAd3およびCELOウィルスの柔軟なファイバーに類似する、フィブリチンにより容易に満たされる。

【 0 0 2 5 】

定義

本発明によると、当該技術の範囲内で従来の分子生物学、微生物学および組換えDNA技術を使用してもよい。そのような技術は、文献中で十分に説明されている。例えば、Maniatis,Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982); " DNA Cloning:A Practical Approach," Volumes I and II(D.N.Glover ed.1985); " Oligonucleotide Synthesis"(M.J.Gait ed.1984); "Nucleic Acid Hybridization"[B.D.Hames & S.J.Higgins eds.(1985)]; "Transcription and Translation"[B.D.Hames & S.J.Higgins eds.(1984)]; "Animal Cell Culture"[R.I.Freshney,ed.(1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes "[IRL Press,(1986)]; B.Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning"(1984)参照。したがって、ここで使用される場合、以下の用語は以下に記載される定義を有するものとする。

【 0 0 2 6 】

“DNA分子”とは、一本鎖形態、または二本鎖ヘリックスにあるデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）の重合形態を称する。この用語は、分子の一次および二次構造のみをさし、いかなる特定の三次形態にも制限されない。したがって、この用語には、とりわけ、線状DNA分子（例えば制限断片）、ウィルス、プラスミド、および染色体中で見られる二本鎖DNAが含まれる。ここで通常の慣例により構造について論ずると、DNAの非転写鎖に沿う5'から3'方向への配列のみを与える（すなわち、この鎖はmRNAと相同的の配列を有する）。

【 0 0 2 7 】

“ベクター”とは、別のDNA断片がそれに結合されて、結合された断片を複製する、プラスミド、ファージまたはコスミドのようなレプリコンである。“レプリコン”とは、インビオにおけるDNA複製の自律単位として機能する；すなわち自分自身のコントロールのもとで複製可能な、任意の遺伝要素（例えば、プラスミド、染色体、ウィルス）である。“複製起点”とは、DNA合成に関係するDNA配列を称する。“発現制御配列”とは、別のDNA配列の転写および翻訳を制御および調節するDNA配列である。コーディング配列は、RNAポリメラーゼがコーディング配列をmRNAに転写し、次にこれがコーディング配列によりコードされるタンパク質に翻訳される場合に、“機能できるように結合され”、細胞中の転写および翻訳制御配列の“制御下”にある。

【 0 0 2 8 】

通常、挿入されたDNA断片の有効な転写および翻訳を促進するプロモーター配列を含有する発現ベクターは、宿主とともに使用される。発現ベクターは通常、複製起点、プロモーター、ターミネーター、並びに形質転換された細胞中で表現型選択を提供できる特定遺伝子を含有する。形質転換された宿主は、当該技術において知られる方法により発酵させ、かつ培養し、最適の細胞増殖を達成できる。

【 0 0 2 9 】

DNA“コーディング配列”とは、適切な調節配列の制御下に置かれると、インビオにおいて転写されポリペプチドに翻訳される二本鎖DNA配列である。コーディング配列の境界線は、5'（アミノ）末端における開始コドンおよび3'（カルボキシル）末端における翻訳停止コドンにより決定される。コーディング配列には、原核生物の配列、真核生物mRNAからのcDNA、真核生物（例えば哺乳類）DNAからのゲノムDNA配列、および合成DNA配列が含まれてもよいが、それに限定されない。ポリアデニル化シグナルおよび転写終止配列は

通常、コーディング配列の3'側に位置する。“cDNA”は複製DNAまたは相補的DNAとして定義され、mRNA転写物からの逆転写反応の産物である。

【0030】

転写および翻訳制御配列は、宿主細胞中でコーディング配列を発現させる、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター等のようなDNA調節配列である。“シス・エレメント”とは、ヌクレオチド配列であり、特定の遺伝子座の発現をアップレギュレートまたはダウンレギュレートできる他のタンパク質と相互作用する、“コンセンサス配列”または“モチーフ”とも称される。“シグナル配列”もまたコーディング配列に含まれてもよい。この配列は、宿主細胞に情報伝達しポリペプチドを適切な細胞位置に方向付ける、ポリペプチドのN末端側のシグナルペプチドをコードする。シグナル配列は、原核生物および真核生物に固有の様々なタンパク質と結合することもある。

【0031】

“プロモーター配列”とは、細胞中でRNAポリメラーゼを結合させ、下流(3'方向)コーディング配列の転写を開始することができるDNA調節領域である。本発明を定義するために、プロモーター配列は、転写開始部位により3'末端に結合され、上流(5'方向)まで広がってバックグラウンド以上の検出できるレベルで転写を開始するのに必要な塩基またはエレメントの最小数を含む。プロモーター配列内には、転写開始部位、並びにRNAポリメラーゼの結合の原因であるタンパク質結合領域(コンセンサス配列)が見られる。真核生物のプロモーターはしばしば、“TATA”ボックスおよび“CAT”ボックスを含有するが、常にではない。原核生物のプロモーターは、-10および-35コンセンサス配列に加えて、シャイン・タルガーノ配列を含有する。

【0032】

“オリゴヌクレオチド”という用語は、2つ以上、好ましくは3つ以上のデオキシリボヌクレオチドを含む分子として定義される。その正確なサイズは、オリゴヌクレオチドの根本的な機能および用途に依存する、多くの要因に依存するであろう。ここで用いたように、“プライマー”という用語は、精製された制限消化物中で天然に発生するまたは合成により產生されたオリゴヌクレオチドであって、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘発される条件下に、すなわちヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼのような誘発物質の存在下および適切な温度とpHに置かれると合成の開始点として作用できる、オリゴヌクレオチドを称する。プライマーは、一本鎖または二本鎖のいずれでもよく、誘発物質の存在下で所望の伸長産物の合成を開始するのに十分長くなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの供給源および使用する方法を含む、多くの要因に依存するであろう。例えば、診断の用途については、標的配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは通常、15-25またはそれより多くのヌクレオチドを含有するが、それより少ないヌクレオチドを含有してもよい。

【0033】

ここでプライマーは、特定の標的DNA配列の異なる鎖に“実質的に”相補的であるよう選択される。このことは、プライマーが、それぞれの鎖とハイブリッド形成するのに十分相補的でなければならないことを意味する。したがって、プライマー配列は、テンプレートの正確な配列を反映する必要はない。例えば、非相補的なヌクレオチド断片は、鎖に相補的なプライマー配列の残りの部分により、プライマーの5'端に結合されてもよい。あるいは、プライマー配列が配列と十分な相補性を有し、それとともにおよびそれによってハイブリッド形成して伸長産物の合成のためのテンプレートを形成するならば、非相補的塩基またはより長い配列を、プライマー中に散在させてよい。

【0034】

ここで用いたように、“制限エンドヌクレアーゼ”および“制限酵素”という用語は、特定のヌクレオチド配列においてまたはその近くで二本鎖DNAを切断する酵素を称する。

【0035】

“組換えDNA技術”とは、通常、異なる生体からのDNAのインビトロにおけるライゲーションの結果として、2つの異種DNA分子を結合する技術を称する。組換えDNA分子は通常、

遺伝子工学における実験により產生される。同義語には、“遺伝子スプライシング”、“分子クローニング”および“遺伝子工学”が含まれる。これらの操作の產物は、“組換え体”または“組換え分子”となる。

【0036】

外因性または異種DNAを細胞内に導入すると、細胞はそのようなDNAにより“形質転換される”または“形質移入される”。形質転換DNAは、細胞のゲノム中に組込まれても（共有結合しても）組込まれなくてもよい。例えば原核細胞、酵母、および哺乳類細胞において、形質転換DNAは、ベクターまたはプラスミドのようなエピソームエレメント上に維持されてもよい。真核細胞に関して、安定して形質転換された細胞とは、形質転換DNAが染色体中に組込まれ、染色体複製を通して娘細胞により受け継がれる細胞である。この安定性は、形質転換DNAを含有する娘細胞の個体群からなる細胞系またはクローンを確立する真核細胞の能力により示される。“クローン”とは、有糸分裂による単一の細胞または祖先に由来する細胞の個体群である。“細胞系”とは、何世代にもわたりインビトロで安定して増殖できる始原細胞のクローンである。外因性DNAにより形質転換された、植物または動物のような生体は、“トランスジェニック”と称される。

【0037】

ここで用いたように、“宿主”という用語には、原核細胞、並びに酵母、植物および動物細胞のような真核細胞が含まれるものとする。原核細胞宿主には、*E.coli*、ストレプトミセスチンフィムリウム(*S.typhimurium*)、靈菌および枯草菌が含まれてもよい。真核細胞宿主には、ピチアパストリス(*Pichia pastoris*)のような酵母、哺乳類細胞および昆虫細胞およびアラビドブシスタリアナ(*Arabidopsis thaliana*)とタバカムニコチアナ(*Tobacum nicotiana*)のような植物細胞が含まれる。

【0038】

2つのDNA配列は、ヌクレオチドの少なくとも約75%（好ましくは少なくとも約80%、および最も好ましくは少なくとも約90%または約95%）がDNA配列の限定した長さにおいて一致する場合、“実質的に相同”である。配列データバンク中の利用可能な標準ソフトウェアを使用して配列を比較することにより、または例えば特定のシステムについて定められるストリングエントな条件下におけるザザンハイブリダイゼーション実験において、実質的に相同的な配列が同定できる。適切なハイブリダイゼーション条件の決定は、当該技術の範囲内である。例えば、Maniatis et al.,*supra*; DNA Cloning, Vols. I & II,*supra*; Nucleic Acid Hybridization,*supra*参照。

【0039】

DNA構成物の“異種”領域とは、大きいDNA分子に関しては天然では見られない該分子内のDNAの同定可能なセグメントである。したがって、異種領域が哺乳類遺伝子をコードする場合、通常、供給源の生体のゲノム中では哺乳類ゲノムDNAの側部に位置しないDNAが該遺伝子の側部に位置する。別の実施例において、コーディング配列は、天然ではコーディング配列自身が見られない構成物である（例えば、ゲノムコーディング配列がイントロンを含有するcDNA、または天然の遺伝子と異なるコドンを有する合成配列）。対立変異または天然発生突然変異イベントでは、ここに定義されるDNAの異種領域は生じない。

【0040】

さらに、本発明には、ファイバーまたはフィブリチン遺伝子の部分または断片が含まれてもよい。ここに用いたように、遺伝子またはポリペプチドに適用される“断片”または“部分”は、普通少なくとも10残基であり、さらに通常は少なくとも20残基であり、好ましくは少なくとも30（例えば50）残基の長さであるが、全体の完全な配列よりは短い。これらの遺伝子の断片は、例えば、天然発生または組換えファイバーまたはフィブリチン遺伝子の制限分解、ファイバーまたはフィブリチン遺伝子の限定された断片をコードするベクターを使用する組換えDNA技術、または化学的合成などの、当業者に知られる方法により、产生できる。

【0041】

ここに用いたように、“キメラ”または“キメラの”とは、必ずではないがしばしば異

なる生体からの、複合的な成分を有する单一の転写単位を称する。ここで用いたように、“キメラの”は、遺伝的に処理されて個々のコーディング配列の機能または活性に対応する領域を有するタンパク質になった、一列に整合されたコーディング配列（この場合は、通常アデノウィルスファイバー遺伝子をコードする配列）を称するのに使用される。

【0042】

ここで用いたようにキメラのファイバータンパク質の“天然生合成特性”は、正確な三量体化、アデノウィルスキャプシドとの適切な結合、標的に結合するリガンドの能力等を示すものとして定義される。キメラのファイバー-フィブリチン-リガンドタンパク質断片の候補が“天然生合成特性”を示す能力は、ここに記載される方法により評価できる。

【0043】

当業者に知られる従来のノザンハイブリダイゼーション技術により、細胞または組織中のmRNAの相対的な量を確かめるために、標準ノザンプロット分析を使用できる。あるいは、等業者に知られる従来のサザンハイブリダイゼーション技術により、関心のある遺伝子の存在およびコピー数を確かめるために、標準サザンプロット分析を使用してもよい。ノザンプロットおよびサザンプロットはどちらも、例えば少なくとも20（好ましくは少なくとも30、より好ましくは少なくとも50、および最も好ましくは少なくとも100の長さの連続的なヌクレオチド）の放射性同位元素標識されたcDNAまたはオリゴヌクレオチドのようなハイブリダイゼーションプローブを使用する。DNAハイブリダイゼーションプローブは、当業者に知られる多くの異なる方法のいずれによっても標識できる。

【0044】

これらの研究に最も一般的に使用される標識は、紫外線にさらされると蛍光を発する放射性元素、酵素、化学物質等である。多くの蛍光物質が知られており、標識として利用できる。これらには、例えばフルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサスレッド、AMCAブルーおよびLucifer Yellowが含まれる。特定の検出物質は、ヤギの中で調製されイソチオシアネートによりフルオレセインと結合された抗ウサギ抗体である。タンパク質もまた、放射性同位元素または酵素により標識できる。放射性標識は、現在利用可能な計数法のいずれによっても検出できる。好ましいアイソトープは、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、および¹⁸⁶Reから選択されてもよい。

【0045】

酵素標識もまた有用であり、現在利用される比色分析技術、分光光度分析技術、蛍光分光光度分析技術、電流滴定技術または気体定量技術のいずれによっても検出できる。カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド等のような架橋分子との反応により、酵素を選択された粒子に結合する。これらの工程で使用できる多くの酵素は、既知であり利用可能である。好ましいのは、ペルオキシダーゼ、-グルクロニダーゼ、-D-グルコシダーゼ、-D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼとペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼである。米国特許第3,654,090号、同第3,850,752号、および同第4,016,043号には、実施例により代わりの標識物質および方法が開示されている。

【0046】

ここで用いたように、“ファイバー遺伝子”および“ファイバー”という用語は、アデノウィルスファイバータンパク質をコードする遺伝子を称する。ここで用いたように、“キメラのファイバータンパク質”とは、上述のように定義された修飾されたファイバー遺伝子を称する。

【0047】

ここで用いたように、“生理的リガンド”という用語は、細胞表面レセプターに対するリガンドを称する。

【0048】

本発明は、投与後に予め定められた細胞系へインビオで遺伝子を供給するために、非常に有効で特異的なアデノウィルスベクターのターゲッティングを提供するベクター系に関する。本発明の組換えアデノウィルスベクターにおいて、ファイバー-フィブリチン-リ

ガンドを含むファイバー置換タンパク質を使用して、アデノウィルスベクターを遺伝子治療のために特定の細胞へ標的付ける。このことは、ファイバー-フィブリチン-リガンドキメラを含有するアデノウィルスベクターの構造により達成される。これらのアデノウィルスベクターは、ファイバー-フィブリチン-リガンドキメラのリガンド成分を認識するレセプターを発現する細胞に、高い効率および特異性で遺伝子産物を供給することができる。例えば、標的とされる特定の細胞系に独特の細胞表面タンパク質を特異的に認識するレセプターリガンドまたは抗体フラグメントをコードする非常に様々の遺伝子を利用してよいことを、当業者は認識するであろう。

【 0 0 4 9 】

“ファイバー置換タンパク質”とは、ファイバーを置換し、3つの実質的な特徴：ファイバーのように三量体化し、アデノウィルス親和性を消失し、新しい親和性を有する、を提供するタンパク質である。

【 0 0 5 0 】

以下の実施例は、本発明の様々な実施の形態を説明するために与えられたものであり、決して本発明を制限することを意図するものではない。

【 0 0 5 1 】

実施例 1実験の計画

組換えAd5ビリオン中でファイバーを置換するのにフィブリチンが使用できることを示すために、以下の実験方法を使用した。まず、ファイバー尾部、ファイバーシャフト領域の第1および第2モチーフをコードするキメラのファイバー-フィブリチン遺伝子、並びにフィブリチンタンパク質のセグメントと融合したファイバーノブ領域を作成した。この構成物において、フィブリチンコーディング配列が、ファイバーシャフトコーディング配列の大部分を置換した。したがって、この組換え遺伝子によりコードされるキメラタンパク質は、シャフト領域のほとんど全てがフィブリチンで置換されたAd5ファイバータンパク質と類似するであろう。

【 0 0 5 2 】

実施例 2ファイバー-フィブリチンタンパク質を含有する組換えアデノウィルスベクターの構造

その後、新しく作成されたファイバー遺伝子をAd5ゲノム中へ転移するのを容易にするために、遺伝子を、予め作成されたファイバーシャトルベクターpNEB.PK.RGD-4C中に集めた。このために、pNEB.PK.RGD-4CをNaeIおよびNcoIで切断して、Gly-76から始まりHis-363までのファイバーシャフトコーディング配列の大部分を除去した。次にこのベクターを使用して、アミノ酸Ser-229からカルボキシ末端Ala-487までをコードするT4フィブリチン遺伝子のセグメントをクローン化した。フィブリチン遺伝子のセグメントを、プライマーF1(5' GGG AAC TTG ACC TCA CAG AAC GTT TAT AGT CGT TTA AAT G 3')(配列番号1)およびプライマーR1(5' AGG CCA TGG CCA ATT TTT GCC GGC GAT AAA AAG GTA G 3')(配列番号2)を使用してPCR増幅した。フィブリチン配列に加えて、PCR産物もまた、5'端においてファイバーGly-79からThr-82までに対応する4つのコドンを含有し、3'端においては、ファイバーのLys-360からGly-362までに対応する3つのコドンが付加された。このように、PCRにより產生されたDNAフラグメントをNcoIで切断し、NaeI-NcoI切断されたpNEB.PK.RGD-4Cでライゲーションすると、pNEB.PK.FF_{BB}が生じた。

【 0 0 5 3 】

pNEB.PK.FF_{BB}中に集められた遺伝子は、完全な尾部領域、シャフトの第1および第2の（および小さい第3の）反復、並びにファイバーの最後の222カルボキシ末端アミノ酸を含むファイバータンパク質のアミノ末端部をコードする。カルボキシ末端アミノ酸には、反復20および反復22と21の大部分であるノブ全体が含まれる。ファイバータンパク質のアミノ末端およびカルボキシ末端部は、フィブリチンオープンリードィングフレームのSer-229から始まるフィブリチンのカルボキシ末端セグメントにより、結合される。

【 0 0 5 4 】

ファイバー-フィブリチン遺伝子を含有する組換えアデノウィルスゲノムを産生するために、プラスミドpNEB.PK.FF_{BB}を、pVK50との相同組換えに使用し、pVK510を産生した。関心のあるウィルスを回収するために、pVK510をPacIで切断し、293細胞を形質移入するのに使用した。新しく産生されたウィルスである、Ad5FF_{BB}は、ファイバー-フィブリチンタンパク質を含有する。このウィルスの産生により、フィブリチン配列と遺伝子融合したファイバータンパク質のアミノ末端部が、Ad5ペントンベースと有効に結合することができ、それにより成熟ビリオンが形成されることが示された。

【0055】

実施例3

ノブのないファイバー-フィブリチンタンパク質を含有する組換えアデノウィルスベクターの構造

フィブリチン分子が、ノブの非存在下でファイバー-フィブリチンキメラ全体の三量体構造を維持できることを立証するために、キメラの3'末端部を、2つのアミノ酸残基リンカーニン酸と6-Hisタグをコードする短い配列で置換した(図1)。新しく産生された遺伝子を使用して、E.coli中でノブのないファイバー-フィブリチンの発現を管理した。まず、予めpNEB.PK.FF_{BB}(ファイバー尾部およびシャフトの開始部と融合したフィブリチン配列をコードする)中に集めたファイバー-フィブリチン遺伝子の5'末端セグメントを、プライマーF2(5' CCC CTC ATG AAG CGC GCA AGA CCG TCT GAA GAT ACC 3')(配列番号3)およびプライマーR2(5' CCC CGG ATC CTG CCG GCG ATA AAA AGG TAG AAA GCA ATA CCC 3')(配列番号4)を使用してPCR增幅し、BspHIおよびBamHIで切断し、NcoIおよびBamHIで切断された細菌発現ベクターpQE60中にクローニングすることにより、pQE.FF_{BB}を産生した。

【0056】

実施例4

ノブのないファイバー-フィブリチンキメラを含有する組換えアデノウィルスの効力

上述のクローニングの結果として、ファイバー-フィブリチン-6Hisキメラをコードする修飾されたファイバー遺伝子を含有する組換えアデノウィルスが得られた。このタンパク質の三量体構造を確かめるために、pQE.FF_{BB}が宿るE.coli細胞からNi-NTA-アガロースを使用してビリオンを精製し、次にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。この分析により、実際にファイバー-フィブリチンキメラは三量体のタンパク質であることが示され(図2)、したがって、ノブのないファイバーの三量体化にフィブリチントンパク質を利用するという考えが強く支持された。これらの結果は、ファイバー分子の尾部領域内に位置するエピトープを認識する抗6-Hisタグモノクローナル抗体テトラ-Hisおよび抗ファイバーモノクローナル4D2を利用するキメラタンパク質のウェスタンプロット分析により支持された：両方のモノクローナル抗体により、クマシーカラーチェックしたゲル上で見られるバンドは、ファイバー-フィブリチン-6-Hisキメラと同定された(データは図示せず)。

【0057】

重大なことに、カルボキシ末端6-Hisタグを含有するファイバー-フィブリチンキメラはNi-NTA-アガロースに有効に結合するという事実により、6-Hisタグがファイバー-フィブリチンキメラ中の結合に利用できたことが示される。これらの結果により、標的とされたリガンドによるこのタグの置換によりキメラファイバー-フィブリチン-リガンドを運搬する組換えアデノウィルスとリガンド特異的細胞レセプターとの間の有効な相互作用が生じることが示される。

【0058】

当業者によく知られるように、ファイバー置換タンパク質により、例えばターゲッティングリガンド、ターゲッティング抗体のような様々なターゲッティングモチーフが組み込まれる。

【0059】

【参考文献】

1. Jolly, D., in *Cancer Gene Therapy*, eds. Appleton & Lange, pp. 51-64, (1994).
2. Trapnell, B.C., et al., *Current Opinion in Biotechnology* **5**:617-625, (1994).
3. Siegfried *Exp Clin Endocrinol* **101**:7-11, (1993).
4. Bout, A., et al., *Human Gene Therapy* **5**:3-10, (1994).
5. La Salle, G.L.G., et al., *Science* **259**:988-990, (1993).
6. Csete, M.E., et al., *Transplantation Proceedings* **26**(2):756-757, (1994).
7. Maeda, H., et al., *Gastroenterology* **106**:1638-1644, (1994).
8. Jaffe, H.A., et al., *Nature Genetics* **1**:372-378, (1992).
9. DeMatteo, R.P., et al., *Annals Of Surgery* **222**(3):229-242, (1995).
10. Mastrangeli, A., et al., *Am J Physiol* **266**:G1146-G1155, (1994).
11. Moullier, P., et al., *Kidney International* **45**:1220-1225, (1994).
12. Mitani, K., et al., *Human Gene Therapy* **5**:941-948, (1994).
13. Crystal, R.G., et al., *Nature Genetics* **8**:42-51, (1994).
14. Clayman, G.L., et al., *Cancer Gene Therapy* **2**(2):105-11, (1995).
15. Liu, T.-J., et al., *Cancer Research* **54**:3662-3667, (1994).
16. Smythe, W.R., et al., *Ann Thorac Surg* **57**:1395-1401, (1994).
17. Fujiwara, T., et al., *Cancer Research* **54**:2287-2291, (1994).
18. Addison, C.L., et al., *Proc Natl Acad Sci* **92**:8522-8526, (1995).
19. Stratford-Perricaudet, et al., *J Clin Invest* **90**:626-630, (1992).
20. Huard, J., et al., *Gene Therapy* **2**:107-115, (1995).
21. Henry, L.J., et al., *Journal of Virology* **68**:5239-5246, (1994).
22. Stevenson, S.C., et al., *J. of Virology* **69**:2850-2857, (1995).
23. Louis, N., et al., *Journal of Virology* **68**:4104-4106, (1994).
24. Michael, S.I., et al., *Gene Therapy* (1995).

本明細書中に記載される特許または刊行物は、いずれも本発明が関する当業者のレベルを示すものである。これらの特許および刊行物は、それぞれの刊行物が明確におよび個別に引用されるのと同じ程度まで、ここで引用される。

【 0 0 6 0 】

本発明を、目的を達成するためにおよび上述の目的および利点、並びにそれに固有のものを得るために適合させることができることは、当業者にとって自明である。ここに記載される方法、手順、処理、分子、特定の化合物とともに本発明の実施例は、好ましい実施の形態の目下代表例であり、具体例であり、本発明の範囲を制限することを意図するものではない。特許請求の範囲により定められる本発明の意図に含まれる本発明の変化および

他の用途を、当業者は思いつくであろう。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ファイバー - フィブリチン - 6 - ヒスチジンからなる置換ファイバーを示す図

【図 2】

E.coli中で発現されたファイバー - フィブリチン - 6ヒスチジンキメラタンパク質のSDS
ゲル電気泳動を示す図

【手続補正 2】

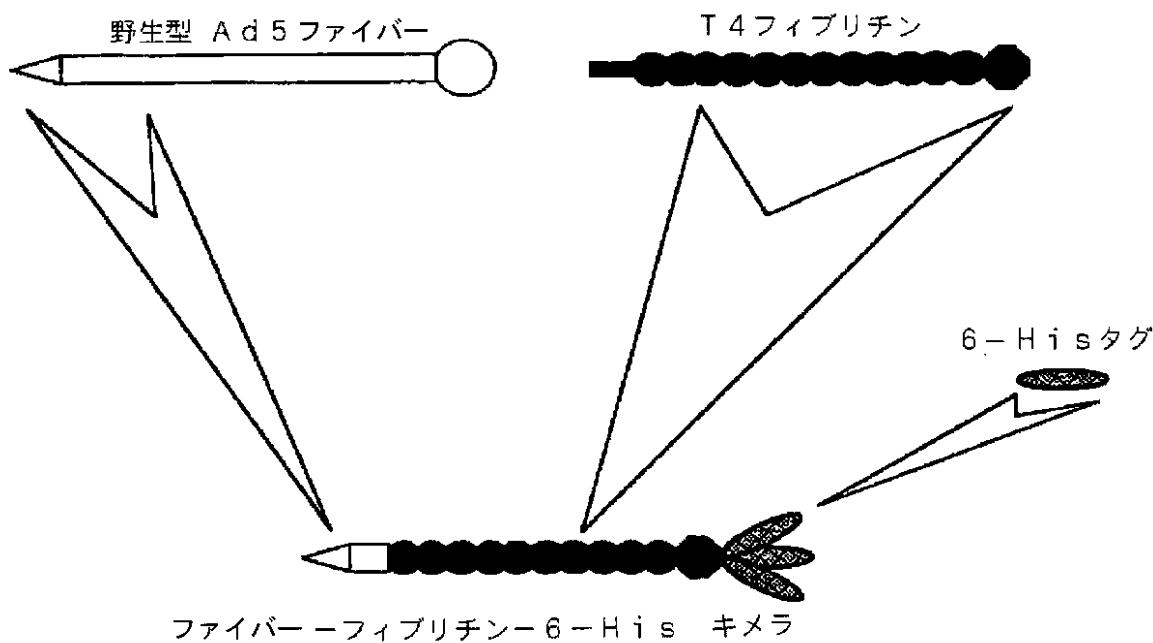
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 1】



【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2】

