

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4571306号  
(P4571306)

(45) 発行日 平成22年10月27日(2010.10.27)

(24) 登録日 平成22年8月20日(2010.8.20)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>7/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 7/00
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 2
<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 37/04

請求項の数 39 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-546035 (P2000-546035)	(73) 特許権者	593218462
(86) (22) 出願日	平成11年4月23日 (1999.4.23)		インスティテュート・パスツール
(65) 公表番号	特表2002-512804 (P2002-512804A)		I N S T I T U T P A S T E U R
(43) 公表日	平成14年5月8日 (2002.5.8)		フランス国、75724 パリ・セデュ・
(86) 国際出願番号	PCT/FR1999/000974		15、リュウ・デュ・ドクトール・ルー、
(87) 国際公開番号	W01999/055892		25-28
(87) 国際公開日	平成11年11月4日 (1999.11.4)	(74) 代理人	100078662
審査請求日	平成18年4月21日 (2006.4.21)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	98/05197	(74) 代理人	100075225
(32) 優先日	平成10年4月24日 (1998.4.24)		弁理士 篠田 文雄
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(72) 発明者	シャルノ, ピエール
			フランス国、エフ-75005 パリ、リ ユ・デ・エコール 6ビス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヌクレオチド配列の導入のためのトリプレックス構造のDNA配列の利用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

G A G、P O L 及び E N V ポリペプチド又はレトロウイルス粒子の形成を可能にするのに十分なこれらのポリペプチドの一部がトランスに提供されるように設計されていること及び

(a) シス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を含むレンチウイルス起源のポリヌクレオチドであって、これらの領域が逆転写の際にレンチウイルスゲノム内にトリプレックスDNA高次構造を採用できる、ポリヌクレオチド;

(b) 非ウイルス起源の転写及び発現のための調節シグナルの制御下に置かれたトランスジーン; 及び

(c) レンチウイルス起源の逆転写、発現及びパッケージングのための調節シグナルが含まれることを特徴とする、組換えベクター。

## 【請求項2】

シス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を含むDNAポリヌクレオチドがクローニング、増幅または合成によって得られる、請求項1記載の組換えベクター。

## 【請求項3】

G A G、P O L 及び E N V ポリペプチドをコードするレンチウイルス遺伝子が備わっていないことを特徴とする、請求項1又は2記載の組換えベクター。

## 【請求項4】

10

20

レンチウイルス起源のポリヌクレオチドがレンチウイルス C A E V、E I A V、V I S N A、H I V、S I V 又は F I V の中から選択されたウイルスに由来することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 5】

c P P T 及び C T S 領域が H I V - 1 又は H I V - 2 ウイルスに由来することを特徴とする、請求項 4 記載の組換えベクター。

【請求項 6】

トランスジーンが、転写及び発現のための調節シグナルを含む発現カセット内に収納されていることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 7】

ポリヌクレオチドが、H I V - 1 レンチウイルスのシス型活性中央開始領域 ( c P P T ) 及び終結領域 ( C T S ) を含む D N A 配列であることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 8】

c P P T 及び C T S 領域を含むポリヌクレオチドが、配列番号 9 ~ 1 4 に記載の配列の中から選ばれること又は、逆転写の際に該ポリヌクレオチドがトリプレックスの形成を可能にするという条件で単数又は複数のヌクレオチドの欠失又は挿入による突然変異を受けた前記配列のうちの 1 つであることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 9】

I - 2 0 0 5 という番号で 1 9 9 8 年 4 月 1 5 日付けで、C N C M に寄託されたプラスミドであることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 1 0】

I - 2 1 8 5 という番号で 1 9 9 9 年 4 月 2 0 日付けで C N C M に寄託されたプラスミドであることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 1 1】

G A G、P O L 及び E N V ポリペプチド又はレトロウイルス粒子の形成を可能にするのに十分なこれらのポリペプチドの一部が トランスに提供されるように設計されていること及び

( a ) シス型活性中央開始領域 ( c P P T ) 及びシス型活性終結領域 ( C T S ) を含むレトロトランスポゾン起源のポリヌクレオチドであって、これらの領域が逆転写の際にトリプレックス D N A 高次構造を採用できる、ポリヌクレオチド；

( b ) トランスジーン；及び

( c ) レトロトランスポゾン起源の逆転写、発現及びパッケージングのための調節シグナルが含まれることを特徴とする、組換えベクター。

【請求項 1 2】

レトロトランスポゾンが酵母のレトロトランスポゾンである、請求項 1 1 記載の組換えベクター。

【請求項 1 3】

逆転写及びパッケージングのための調節シグナルが

- レトロウイルス L T R 配列の全部または一部分；
- レトロウイルス部位 P B S ；
- P P T 3 ' 末端；及び
- ベクター粒子内のベクターゲノムのパッケージングに必要なレトロウイルス配列

によって構成されることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 1 4】

L T R 配列が一部分 U 3 領域内で欠失していることを特徴とする、請求項 1 3 記載の組換えベクター。

【請求項 1 5】

10

20

30

40

50

a) 請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の組換えベクター；及び  
 b) G A G、P O L 及び E N V ポリペプチド又はレトロウイルス粒子の形成を可能にするのに十分なこれらのポリペプチドの一部をコードする配列を提供する 1 個又は数個のベクター  
 を含む、レトロウイルス粒子の形成のための組換えベクターシステム。

【請求項 16】

そのゲノムが、転写及び発現のための調節シグナルの制御下に置かれたトランスジーンを含み、そしてレンチウイルス起源の逆転写、発現及びパッケージングのための調節シグナル、及びシス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を含むレンチウイルス起源のポリヌクレオチドを含む組換えヌクレオチド配列である組換えレンチウイルスベクター粒子であって、これらの領域は逆転写の際にレンチウイルスゲノム内にトリプレックス D N A 高次構造を採用でき；前記組換え配列に G A G、P O L 及び E N V ポリペプチドをコードする レンチウイルス遺伝子が備わっていない、組換えレンチウイルスベクター粒子。

10

【請求項 17】

そのゲノムが、転写及び発現のための調節シグナルの制御下に置かれたトランスジーンを含み、そして L T R 配列が一部分 U 3 領域内で欠失してるレンチウイルス起源の逆転写、発現及びパッケージングのための調節シグナルを含み、さらにシス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を含むレンチウイルス起源のポリヌクレオチドを含む組換え配列である組換えレンチウイルスベクター粒子であって、これらの領域が逆転写の際にレンチウイルスゲノム内にトリプレックス D N A 高次構造を採用できる、組換えレンチウイルスベクター粒子。

20

【請求項 18】

a) レンチウイルスの核タンパク質又は機能性誘導ポリペプチド (ポリペプチド G A G) に対応する g a g ポリペプチド、  
 b) レンチウイルスのタンパク質 R T、P R O、I N 又は機能性誘導ポリペプチド (ポリペプチド P O L) から構成される p o l ポリペプチド、  
 c) エンベロープポリペプチド又は機能性誘導ポリペプチド (ポリペプチド E N V) 、  
 d) 転写及び発現のための調節シグナルの制御下に置かれたトランスジーン、レンチウイルス起源の逆転写、発現及びパッケージングのための調節シグナルを含む配列、及びシス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を含むレンチウイルス起源のポリペプチドであって、これらの領域が逆転写の際にレンチウイルスゲノム内にトリプレックス D N A 高次構造を採用できるポリヌクレオチドを含む、G A G、P O L 及び E N V ポリペプチドをコードする レンチウイルス遺伝子が備わっていない組換えヌクレオチド配列  
 を含んで成る、組換えレンチウイルスベクター粒子。

30

【請求項 19】

a) レンチウイルスの核タンパク質又は機能性誘導ポリペプチド (ポリペプチド G A G) に対応する g a g ポリペプチド、  
 b) レンチウイルスのタンパク質 R T、P R O、I N 又は機能性誘導ポリペプチド (ポリペプチド P O L) から構成される p o l ポリペプチド、  
 c) エンベロープポリペプチド又は機能性誘導ポリペプチド (ポリペプチド E N V) 、  
 d) 転写及び発現のための調節シグナルの制御下に置かれたトランスジーン、L T R 配列が一部分 U 3 領域内で欠失してるレンチウイルス起源の逆転写、発現及びパッケージングのための調節シグナルを含む配列、及びシス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を含むレンチウイルス起源のポリペプチドであって、これらの領域が逆転写の際にレンチウイルスゲノム内にトリプレックス D N A 高次構造を採用できるポリヌクレオチドを含む組換えヌクレオチド配列

40

50

を含んで成る、組換えレンチウイルスベクター粒子。

【請求項 20】

シス型活性中央開始領域 (cPPT) 及びシス型活性終結領域 (CTS) を含むポリヌクレオチドが逆転写のための調節シグナルと共に機能しうる配向で挿入されている、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子。

【請求項 21】

配列 gag、pol 及び env が HIV レトロウイルスの配列に由来することを特徴とする、請求項 18 又は 19 記載の組換えレンチウイルスベクター粒子。

【請求項 22】

配列 gag 及び pol が HIV レトロウイルスの配列に由来し、配列 env が異なる HIV レトロウイルス又は異なるウイルスに由来することを特徴とする、請求項 18 又は 19 記載の組換えレンチウイルスベクター粒子。

10

【請求項 23】

配列 env が、アンフォトロピック ENV ポリペプチドをコードすることを特徴とする、請求項 18 又は 19 記載の組換えレンチウイルスベクター粒子。

【請求項 24】

配列 env が エコトロピック ENV ポリペプチドをコードすることを特徴とする、請求項 18 又は 19 記載の組換えレンチウイルスベクター粒子。

【請求項 25】

配列 env が、水疱性口内炎ウイルス (VSV) に由来することを特徴とする請求項 18 又は 19 記載の組換えレンチウイルスベクター粒子。

20

【請求項 26】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項記載のベクター又は請求項 16 ~ 25 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子で組換えられていることを特徴とする組換え細胞。

【請求項 27】

非有糸分裂の分化された真核細胞であることを特徴とする、請求項 26 記載の組換え細胞。

【請求項 28】

有糸分裂細胞であることを特徴とする、請求項 26 記載の組換え細胞。

30

【請求項 29】

初代真核細胞又は不死化された細胞系であることを特徴とする、請求項 26 記載の組換え細胞。

【請求項 30】

肺細胞、脳細胞、上皮細胞、星状細胞、小グリア細胞、オリゴデンドロサイト及びニューロン、筋細胞、肝細胞、樹状細胞、神経細胞、骨髄細胞、マクロファージ、線維芽細胞、造血細胞、リンパ球であることを特徴とする、請求項 26 記載の組換え細胞。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項記載の組換えベクター、請求項 16 ~ 25 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子又は請求項 26 ~ 30 のいずれか 1 項記載の組換え細胞を含んで成ることを特徴とする、治療目的の組成物。

40

【請求項 32】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項記載の組換えベクター、請求項 16 ~ 25 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子又は請求項 26 ~ 30 のいずれか 1 項記載の組換え細胞を含んで成ることを特徴とする、免疫原性組成物。

【請求項 33】

レンチウイルス起源のシス型活性中央開始領域 (cPPT) 及びシス型活性終結領域 (CTS) を含み、これらの領域が逆転写の際にトリプレックス DNA 高次構造を採用できるポリヌクレオチドの、組換えベクターの構築を目的とした使用。

【請求項 34】

50

真核細胞内に ex vivo でトランスジーンを核移入することを目的とした、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の組換えベクター又は請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子の使用。

【請求項 3 5】

非有糸分裂の分化された細胞の ex vivo でのトランスフェクション又は ex vivo での形質導入を目的とした、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の組換えベクター又は請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子の使用。

【請求項 3 6】

不死化した細胞系又は初代細胞の ex vivo でのトランスフェクション又は ex vivo での形質導入を目的とした、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の組換えベクター又は請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子の使用。

10

【請求項 3 7】

トランスジーンでの真核細胞の ex vivo でのトランスフェクション又は ex vivo での形質導入を目的とした、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の組換えベクター又は請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子の使用。

【請求項 3 8】

in vivo での形質導入における使用を目的とした、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の組換えベクター又は請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子。

【請求項 3 9】

治療又は予防用の免疫原性ワクチン組成物の作製を目的とした、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の組換えベクター又は請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか 1 項記載の組換えレンチウイルスベクター粒子。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本出願は、細胞内にヌクレオチド配列を導入するための、3本鎖構造又は組織（「トリプレックスDNA」と呼ばれる）を呈する可能性のあるDNA配列の利用、ならびにこれらのトリプレックス配列を含有する組換えベクターを目的としている。

【0002】

従って本発明は、例えば、遺伝子導入動物又は植物或いは又組換え細胞系又は細胞を創り出すための遺伝子療法又は遺伝子導入のプロトコールの枠内で使用することのできる新しい手段の定義づけ及び供給を目的とする。これらの手段は、ヌクレオチド配列特に治療上問題の配列をヒト又は動物の体内の標的細胞内に導入できる新しいベクターの作製をも含んでいる。

30

【0003】

これまでに知られている遺伝子療法のアプローチの重大な1つの制限は、治療向けの遺伝子のベクター化にある。オンコウイルス、主としてMoMLV由来のレトロウイルスベクターは、遺伝子導入のために広く用いられてきた。その利用分野は、オンコウイルスが活発な分裂状態にある標的細胞の中にしか組込まれないという事実によって著しく制限されている。反対に、レンチウイルスは、レトロウイルスの中でも独特の分裂していない分化細胞に感染する能力を有し、新しいベクターの開発のための有利なウイルス候補となっている。オンコウイルスがもつ長所（免疫原性の不在、安定した組込み）を保ちながら、レンチウイルスは、非有糸分裂の分化済み組織（脳、筋肉、肝臓、肺...）の in vivo 形質導入を可能にし、かくして遺伝子療法において多数の応用分野を見い出すことができるだろう。

40

【0004】

レンチウイルスからレトロウイルスベクターを構築するさまざまな試みが報告されたきた。この点において、HIV レトロウイルスから実施された Poznansky M. et al (J. Virology 1991, 65, 532-6), Naldini et al (Science, 1996, 272, p263-7) の研究及び FIV

50

レトロウイルスから実施された Poeschia EM et al (Nature Medecine, 1998, 4, p354-7) の研究が挙げられる。

【 0 0 0 5 】

発明人らは、感染した細胞の核内へのレトロウイルスゲノムの進入メカニズム（核移入メカニズム）に關与する決定因子を追究した。

【 0 0 0 6 】

移入に不可欠な決定因子トリプレックスDNAの同定により発明人らは、標的細胞内への遺伝子又より一般的にはヌクレオチド配列（以下では「トランスジーン」という表現で呼称される）の導入のために利用可能な新しい手段、特にベクターを定義するに至った。発明人らは、特にレンチウイルスファミリーの1員であるHIVレトロウイルス（「ヒト免疫不全症候群ウイルス」又はHIV）で研究を行ない、標的細胞内のHIVのプロウイルスDNAの核移入の原因であるウイルス決定因子：中央トリプレックスDNAを同定し分離した。このトリプレックスDNAは、標的細胞の核内のベクターゲノムの進入を可能にする核移入決定因子として、HIV1ゲノムの天然の状況以外でベクター内にて機能できることが明らかになった。

【 0 0 0 7 】

核内へのレトロウイルスDNAの進入メカニズムは、レトロウイルスのファミリー間で著しく異なっている。レンチウイルスゲノムは、核孔を横断してのその前組込み複合体（線状DNA及び結合するタンパク質）のアドレッシングとその後の移行を介して間期核の核膜を横断する能力をもつ。かくして、これらのウイルスは、標的細胞の分裂が無い状態でも複製する能力をもつ。これらは特に分化した組織マクロファージ及び、HIVの伝播、播種及び生理病理学の中心にある細胞である樹状細胞を感染させる。逆に、オンコウイルス及びスプーマウイルスは、核膜によって表わされる障壁を横断することができない。それらの前組込み複合体は有糸分裂そして核膜の組織崩壊を待ってから分裂染色体にアクセスし組込まれなくてはならない。

【 0 0 0 8 】

HIV1ウイルスのDNAの核移入の原因であるウイルス決定因子は、発明人らによって研究された。HIVの前組込み複合体の核移入の分子メカニズムを同定し機能的に理解することは、実際に重大な根本的利益を提供することになる。発明人らは、レンチウイルスのレトロ転写に特定の段階によって生成された線状DNA分子の中心にあるトリプレックスであるDNA構造がこの移入を支配することになるHIV-1ゲノムの核移入に独自のメカニズムを同定した。

【 0 0 0 9 】

レンチウイルスレトロ転写の際に生成された線状DNA分子の中心、特にHIVレトロウイルス内に存在するトリプレックスDNA構造については、該発明人により、異なる先行刊行物の中で記述されてきた（Charneau P. et al., J. Mol. Biol. 1994, 241, 651-662; Charneau P. et al. Journal of Virology, 1991年5月、p.2415-2421; Charneau P. et al. Journal of Virology, 1992, vol.66, p.2814-2820.

【 0 0 1 0 】

ウイルスレトロ転写の際にトリプレックスを形成するDNA構造は、シス型活性中央開始領域すなわちポリプリン領域（cPPT）、及びシス型活性終結領域（CTS）を有するポリヌクレオチドであり、これらの領域は、HIV又はその他のレンチウイルスのゲノムの中心に存在するPPT領域によりその合成が開始される1つのストランド<sup>+</sup>の転写の開始、及びレトロウイルスLTRの上流側のPPT3 部位のレベルでその合成が開始される第2のストランド<sup>+</sup>の合成の中断を可能にする（図1）。

【 0 0 1 1 】

トリプレックスDNA構造の形成は、CTS配列により遮断された、レトロウイルスゲノム内部での逐時的に部分的に位置が変わった結果である（Charneau et al, J. Mol. Biol, 1994）。

【 0 0 1 2 】

ここで利用されている「トリプレックスDNA」という語は、ストランド間の構造化に言及することなく、3本のストランドをもつDNA領域を意味する(変位した自由なストランド又は、3重らせん又はD-ループなどを形成するストランド)。

【0013】

レトロ転写の際にかくして形成されるトリプレックスDNA構造は、細胞の核の中へのレトロウイルスゲノムの進入を可能にするか又は少なくともそれに貢献し、このため非有糸分裂でない細胞の感染を可能にする。

【0014】

標的細胞の核内のレトロウイルスの進入のために必要とされるこのメカニズムの同定に基づいて、該発明人らは、トリプレックスDNA領域を内含するレンチウイルスベクターを新規に産出した。HIV-1ゲノムに由来し、シス型活性のcPPT及びCTS配列を含むDNAフラグメントをHIVベクター系内に導入することで、ベクターDNAの核移入率を刺激することにより細胞内の遺伝子の形質導入は増大する。このトリプレックスをもつレンチウイルスベクターの生成は、分裂しているか又は分裂していない細胞内での遺伝子の形質導入を著しく改善させる。

10

【0015】

本発明は、レトロ転写全般においてシス型活性のcPPT及びCTS領域、そして特に正常なレトロウイルスゲノム内に置かれた場合に結合させられ各々少なくとも10個のヌクレオチドを含有する2つのポリヌクレオチドを含む、合成により調製可能なレトロウイルス又はレトロウイルス様起源のヌクレオチド配列に関する。

20

【0016】

本発明に従ったヌクレオチド配列は、一方の側にはHIV1の場合「cPPT」と呼ばれる短かいヌクレオチド配列(最小10塩基対)そしてもう一方の側にはHIV1の場合少なくとも10塩基対の「CTS」と呼ばれる配列を含んで成る(問題のシス型活性配列がカッコ内に入った図11Gを参照のこと)。2つのシス型活性配列及び、レトロウイルスゲノムに由来しこれら2つのシス配列の間に位置づけされた2つの配列は、天然のHIV1ゲノムの場合において約120個のヌクレオチドに対応する。

【0017】

本発明は同様に、一方ではCTS領域(HIV1起源以外の使用ゲノムの起源の場合においては同等の領域ではあるもののただし Charneau et al, J. Mol. Biol., 1994によって公示されたCTS領域と同じ特性を有している領域)、そして他方ではCTSの上流側にてHIV1の場合においては約90~110個好ましくは99個のヌクレオチドを有する領域で構成されたDNAの3本のストランドを含むヌクレオチド配列にも関する。

30

【0018】

本発明は、HIV1のゲノムの中に天然に存在するポリヌクレオチド配列(或いは天然又は合成の同等の配列)に結びつけられたcPPT領域(「ポリプリン領域」)に対応する2本鎖のDNAフラグメント及び、最終的にレトロ転写後に3本鎖の領域の終りを構成する高次構造を採用するヌクレオチドCTS領域(3側)含むポリヌクレオチドにも関する。

【0019】

この3本鎖の高次構造は、「トリプレックス配列」と呼ばれる。

40

【0020】

一例を挙げると、トリプレックス配列はHIV1について図11Fに、又図11Gに記されている配列である。in vivo でトリプレックスは、それが真核細胞の核膜の侵入のために利用可能なベクター内に存在する場合、修飾又は形質導入すべき細胞の核内のDNA移入を刺激する。

【0021】

本発明は、レセプターである真核細胞の核内にトリプレックス配列が結びつけられているヌクレオチド配列を導入することを目的とする単独でか又はベクター内に入った状態でのこのトリプレックス配列の利用に関する。

50

## 【 0 0 2 2 】

かくして、本発明の目的は、シス型活性中央開始領域（c P P T）及びシス型活性終結領域（C T S）を有するポリヌクレオチドを含み、これらの領域がレトロウイルス又はレトロウイルス様起源のものであること及び、さらに規定のヌクレオチド配列（トランスジーンすなわち問題の配列）及びレトロウイルス又はレトロウイルス様起源のレトロ転写、発現及びカプシド化調節シグナルが含まれることを特徴とする組換えベクターにある。

## 【 0 0 2 3 】

利用された「ポリヌクレオチド」という語は、それが例えばc D N AといったようなD N AであるかR N Aであるかに関わらず、1本鎖又は2本鎖又は3本鎖の形をした全ての核酸配列のことを意味する。

10

## 【 0 0 2 4 】

一例を挙げると、本発明の目的は、内因性遺伝子の機能不良を補正するべく、1つの生体の体細胞の中に欠損活性をモジュレート又は回復するヌクレオチド配列を挿入するため、又は治療を目的として補足的機能特に1つの遺伝子の発現又は活性の抑制機能の発現を可能にするための、治療を目的とした、特に体細胞遺伝子治療プロトコールの枠内でのトランスジーンの導入を目的としている。

## 【 0 0 2 5 】

「治療の」という表現は、予防効果又は治癒効果を追求すること又は得ること、或いは、患者の病的状態の改善又は安定化を追求すること又は得ることを意味する。

## 【 0 0 2 6 】

従って本発明の枠内では、一例として、問題のヌクレオチド配列又はトランスジーンと呼ばれるヌクレオチド配列は、遺伝子又はその一部分又は遺伝子由来の配列、例えばc D N A又はR N Aでありうる。同様に、これは、アンチセンス配列、所定の遺伝子の負の突然変異体配列又は遺伝子の転写、発現、活性化機能に介入する配列であってもよく、さらには、プロドラッグ又は細胞障害性物質の活性化のための適切な配列でもあり得る。

20

## 【 0 0 2 7 】

本発明の枠内のトランスジーン配列は、例えばそれが抗原提示細胞を形質転換するために利用される場合、細胞又は体液性の免疫応答の、刺激又は誘発活性を有することができる。

## 【 0 0 2 8 】

かくして、本発明は、例えばデュシェーン筋障害、腓線維症などを含む、1つの遺伝子の変化を有する遺伝病、神経変性疾患さらには自然に免疫系の応答低下を導く悪性疾患といった後天性疾患のものといったようなさまざまな分野における遺伝子療法を目的として利用可能なベクターの調製に応用することができる。本発明は同様に、例えばガンといったような疾病又はエイズといったような疾病の場合においてC T Lの産生により病原性作用物質に対する応答を刺激するため、又は自己免疫疾患において自らの抗原に対する応答を減少させるため免疫療法での治療を考慮にすることも可能にする。

30

## 【 0 0 2 9 】

本発明は同様に、予防用又は治療用の免疫原性組成物又はワクチンの作製を可能にする手段又は免疫原性組成物の供給にも関する。

40

## 【 0 0 3 0 】

本発明に従ったトリプレックスD N Aを含有するレンチウイルスベクターは同様に、胚性細胞又は細胞系内の遺伝子の形質導入による、遺伝子導入動物の構築のためにも利用される。

## 【 0 0 3 1 】

本発明のベクターは、ウイルス又は非ウイルスの転写又は発現調節配列の制御下で挿入されたトランスジーンを含有している。

## 【 0 0 3 2 】

トランスジーンは、細胞内のその発現の調節にとって適切な配列を含む発現のカセットの中に内含され得る。

50

## 【 0 0 3 3 】

本発明の特に有利な第 1 の実施形態は、組換えベクターが、自ら含有するレトロウイルス由来の配列がレンチウイルスのゲノム由来のものであることを特徴としているようなものである。

## 【 0 0 3 4 】

本出願の枠内では、「誘導された」という語は、レトロウイルスのゲノム内に収納された配列と同一のあらゆる配列、又は本発明のベクターの内部でのその挿入を目的として自らレトロウイルスゲノム内で有する基本的機能を保存しているかぎりにおいて、突然変異、挿入、欠失、組換えにより修飾された全ての配列を包含する。

## 【 0 0 3 5 】

かかる配列は、特にクローニング及び/又は増幅工程を含む、その起源生体からのヌクレオチド配列の同定及び分離を可能にするそれ自体既知のあらゆる手段によってか又は利用可能なあらゆる技術に従った合成によって得ることができる。

## 【 0 0 3 6 】

代替的には、本発明に従ったベクターは、レトロウイルス様起源の配列がレトロトランスポゾンに由来することを特徴とする。この点で、例として酵母のレトロトランスポゾン T Y 1 を挙げることができる (Heyman T et al)。

## 【 0 0 3 7 】

このように記述した組換えベクターは、例えば、場合によっては発現カセット内に収納されたトランスジーン及びレトロウイルス又はレトロウイルス様の構成により組換えられたプラスミドであり得る。

## 【 0 0 3 8 】

組換えベクターは同様に、レトロトランスポゾン、細菌の中に導入され得る繊維状ファージ又はファージ といったようなファージ、又は、Y A C といったような酵母を形質転換する能力をもつベクターであってもよい。

## 【 0 0 3 9 】

かかるベクターは、トリプレックスをもつレンチウイルスベクターを含む A A V タイプのベクター又はアデノウイルスベクターによる形質導入又は感染又はトランスフェクションを含むそれ自体既知のあらゆる方法によって、細胞特に標的細胞及び/又はカプシド化細胞を形質導入するために利用可能である。

## 【 0 0 4 0 】

このように定義したベクターは、選択されたレトロウイルス特にレンチウイルスのゲノムの構造ポリペプチド又はレトロトランスポゾンの構造ポリペプチドをコードする配列をもたらず付加的な単数又は複数のベクターによってトランス相補されうる。

## 【 0 0 4 1 】

この点で、本発明のベクターは、ポリペプチド G A G、P O L 及び E N V 又は、ウイルス遺伝子が備わっておらず発現が探求をされているトランスジーンを有する組換えベクターをベクター化することを目的としたレトロウイルス粒子の形成を可能にするのに十分なこれらのポリペプチドの一部をコードする配列をもたらずことによって、トランス相補され得る。

## 【 0 0 4 2 】

本発明に従ったベクターは、トランスジーンすなわち問題の配列が転写及び発現調節シグナルを含む発現カセット内に収納されていることによって特徴づけされ得る。

## 【 0 0 4 3 】

一般的に言って、レトロウイルス又はレトロウイルス様タンパク質のトランス相補のために利用されるベクター (単複) には、カプシド化シグナルが備わっていない。

## 【 0 0 4 4 】

これに関しては、本発明に従った組換えベクターのトランス相補のために利用可能な Goldman et al (1997) の技術に従って調製されるベクターを挙げることができる。

## 【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

本発明は同様に、

- a) レンチウイルスの核タンパク質又は機能的誘導ポリペプチド (ポリペプチド G A G) に対応する g a g ポリペプチド、
  - b) レンチウイルスのタンパク質 P T、P R O、I N 又は機能的誘導ポリペプチド (ポリペプチド P O L) で構成された p o l ポリペプチド、
  - c) エンベロープポリペプチド又は機能的誘導ポリペプチド (ポリペプチド E N V)、
  - d) 転写及び発現調節シグナルの制御下に置かれた規定のヌクレオチド配列 (トランスジーンすなわち問題の配列)、レトロウイルス又はレトロウイルス様起源のレトロ転写、発現及びカプシド化を調節するシグナルを含む配列、及びシス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を有し、これらの領域がレトロウイルス又はレトロウイルス様起源のものであり、レトロウイルス又はレトロウイルス様起源の前記調節シグナルと共に機能しうる配向で挿入されているポリヌクレオチドを含む組換えヌクレオチド配列、
- を含んで成る組換えレトロウイルスベクター粒子をも目的とする。

【0046】

本発明は同様に、

- a) レンチウイルスの核タンパク質又は機能的誘導ポリペプチド (ポリペプチド G A G) をコードする g a g 配列と呼ばれるヌクレオチド配列、
  - b) レンチウイルスのタンパク質 R T、P R O、I N 及び R N 又は機能的誘導ポリペプチド (ポリペプチド P O L) をコードする P O L 配列と呼ばれるヌクレオチド配列、
  - c) g a g 及び p o l 配列の転写及び発現の調節シグナル、
  - d) エンベロープポリペプチド又は機能的誘導ポリペプチド (ポリペプチド E N V) についてコードし、転写及び発現の調節シグナルの制御下に置かれている e n v 配列と呼ばれるヌクレオチド配列、
  - e) 転写及び発現調節シグナルの制御下に置かれた規定のヌクレオチド配列 (トランスジーン)、レトロウイルス又はレトロウイルス様起源のレトロ転写、発現及びカプシド化を調節するシグナルを含む配列、及びシス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を有し、これらの領域がレトロウイルス又はレトロウイルス様起源のものであり、レトロウイルス又はレトロウイルス様起源の調節シグナルと共に機能しうる配向で挿入されているポリヌクレオチドを含む組換えヌクレオチド配列、
- を含んで成る組換えレトロウイルスベクター粒子をもその目的としている。

【0047】

1つの変形実施形態に従うと、本発明は、レトロウイルス又はレトロウイルス様起源のシス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を含むポリヌクレオチドを含むヌクレオチド配列において、これら2つの領域の各々が内部ヌクレオチドの連鎖をとり囲んでおり、前記シス型活性領域 c P P T 及び C T S が、レトロウイルス又はレトロウイルス様起源のレトロ転写調節シグナルと共に機能しうる配向でその内部で挿入されているヌクレオチド配列を目的とする。

【0048】

ポリペプチド G A G 及び P O L は、ウイルスプロテアーゼによって分割された前駆物質に由来する核タンパク質のポリペプチドである。ポリペプチド P O L は、レトロウイルスの逆転写酵素 (R T)、プロテアーゼ (P R O)、インテグラーゼ (I N) 及びリボヌクレアーゼ H (R N) を含む。場合によっては、レトロウイルスのその他のタンパク質も同様にベクター粒子の構築のために利用される。利用されているタンパク質又はポリペプチドという語は、問題のポリペプチドのグリコシル化されていない形又はグリコシル化された形を網羅するという点を指摘しておく。

【0049】

レトロウイルスベクター粒子の構築のために利用される配列 g a g、p o l 及び e n v は、場合によっては、例えば点突然変異といった突然変異によってか又は単数又は複数のヌクレオチドの欠失又は挿入によって修飾されていてもよいし、或いは、発現すべきトラン

10

20

30

40

50

スジーンをベクター化する能力をもつウイルス粒子の産生のための機能的ポリペプチドの産生を可能にするかぎりにおいて、例えばH I V 1及びH I V 2、又はH I V 1及びC A E V (ヤギ関節炎脳炎ウイルス)の中の異なるレトロウイルスに由来する組換えキメラに由来していてもよい。特に、このように産生されたレトロウイルスの安全性を増大させるよう突然変異された配列が利用されることになるだろう。

【 0 0 5 0 】

有利には、本発明の組換えベクター又は組換えベクター粒子は、トランスジーンが非レトロウイルス起源の転写及び発現調節シグナルの制御下にあるようなものである。トランスジーンを発現を制御するために利用される可能性のあるプロモータは、例えば、Tripathy, SK et al. (PNAS 1994, 91, p11557-11561)の中に記述されているC M Vのプロモータ、プロモータP G K又はE F 1 である。

10

【 0 0 5 1 】

しかしながら、本発明の1変形形態に従うと、トランスジーンは、先にレトロウイルス又はレトロウイルス様起源のものであるとして同定された調節シグナルの制御下、特にL T R配列の制御下に置くことが可能である。

【 0 0 5 2 】

本発明に従ったレトロウイルス構成を誘導するために利用されるレンチウイルスは、例えばH I V - 1、H I V - 2といったH I Vレトロウイルス又はこれら2つのタイプとは異なる全ての分離株の中からか、又は例えばC A E V (ヤギ関節炎脳炎ウイルス)、E I A V (ウマ感染性貧血ウイルス)、V I S N A、S I V (サル免疫不全症ウイルス)又はF I V (ネコ免疫不全症ウイルス)の中から選択できる。

20

【 0 0 5 3 】

本発明に従った特に有利なベクターは、ポリヌクレオチドが、H I V - 1レトロウイルス又はその他全てのレンチウイルスのゲノムのシス型活性中央開始領域 ( c P P T ) 及び終結領域 ( C T S ) を含むD N A配列であることを特徴とするベクターである。

【 0 0 5 4 】

中央P P Tつまりc P P T配列は、レンチウイルスの内部で比較的保存されている配列であり、図11Hに一部が示されている数多くの残基によって同定される。これらの領域のうちの1つの内部での突然変異は、たとえ点突然変異であっても、トリプレックスD N A構造の形式に結びつけられるそれらの機能的性質を消し去る可能性がある。

30

【 0 0 5 5 】

c P P T配列の同定は、全てのレンチウイルスにおけるL T R 3 の上流境界部 ( 5 ) に位置づけられたポリプリン配列の、レンチウイルスにおけるゲノム中央での反復が問題となっているという事実によって容易になっている。このc P P T配列は、H I V - 1ウイルスの場合のように正確な反復であってもよいし或いはその他のレンチウイルスにおいてはわずかに修飾されている可能性もある ( 図 1 H )。中央終結配列C T Sは、H I V - 1ウイルスのケースにおいて特徴づけられている ( Charneau et al, 1994 )。この配列は、c P P T配列の上流側約100ヌクレオチドのところにある。その他のレンチウイルスにおいては、ここでも又c P P T配列の下流側約100ヌクレオチド ( 80 ~ 120ヌクレオチド ) のところにC T S候補配列が見られる。C T S配列の確率の高い位置は、いくつかのレンチウイルスにおいて図11A - 11E上に表わされている。

40

【 0 0 5 6 】

レンチウイルス E I A VのC T S配列は、近年になって特徴づけられている ( Scott R. Stetor et al., Biochemistry 1998, 38, P3656-67 )、これらの著者によると、E I A Vにおいては、配列c P P T及びC T Sはそれぞれ5 A A C A A A G G G A G G G A 3及び5 A A A A A A T T T T G T T T T T A C A A A A T C 3 である。

【 0 0 5 7 】

本発明の枠内で利用可能な好ましいポリヌクレオチドとしては、例えば、図11に表わされている配列、より精確に言うと、2つの領域c P P TとC T Sの間に含まれるこれらの領域の配列を内含する配列が挙げられる。

50

## 【 0 0 5 8 】

場合によっては、c P P T、内部ポリヌクレオチド（つまりC T S配列までc P P Tを結合させるポリヌクレオチド）及びC T S配列を含むヌクレオチド配列は、点突然変異又はヌクレオチドの欠失又は挿入による突然変異を受ける可能性がある。一例を挙げると、H I V - 1のc P P T配列内で点突然変異が実施され、細胞内に残留感染力が維持されていることを示した（Charneau et al, J. Virol. 1992, 66, p.2814-2820）。

## 【 0 0 5 9 】

本発明は、起源である天然の相同なシス型活性ヌクレオチド配列と少なくとも60%の同一性をもつ、c P P T又はC T Sについて突然変異誘発を受けた全ての配列を網羅している。キメラシス型活性配列の場合、この百分率は、キメラの突然変異を受けた各々のヌクレオチド配列にあてはまる。

10

## 【 0 0 6 0 】

本発明に従ったトリプレックスDNAを構築するためにP P T又はc P P T又はC T S領域のヌクレオチド配列の修飾を、導入することができる。これらの修飾は、天然の配列の40%にまで達し得る。

## 【 0 0 6 1 】

天然と呼ばれる配列に対する変異体ヌクレオチド配列の同一性は、完全トリプレックスDNAのヌクレオチド配列との関係においてではなく厳密に個別にC T S又はc P P Tとの関係において計算される。

## 【 0 0 6 2 】

c P P TとC T Sの間に含まれる領域は、C T SとP P Tの間の起源のレトロウイルスゲノム内に見出されるものであってもよいし又はトリプレックスDNAが核内部に問題のヌクレオチド配列を導くことを可能にするポリヌクレオチドの核移入においてその特性を保存することを条件として前述のものとは異なるものであってもよい1つのポリヌクレオチドによって構成されている。

20

## 【 0 0 6 3 】

本発明に従ったポリヌクレオチドは、複製ベクター又は非複製ベクターの中に導入され得る。レトロウイルスベクターの場合、問題となるのは非複製タイプのベクターである。

## 【 0 0 6 4 】

レトロウイルスベクター粒子を大量に調製するためには、トリプレックスDNA配列及びg a g、p o l及びe n v遺伝子の配列を含むレトロウイルスゲノムに対応するポリヌクレオチドが導入されたアデノウイルスタイプのベクターを利用することが可能である。

30

## 【 0 0 6 5 】

これらのアデノウイルスのベクターは、場合によって、複製起点配列の導入により複製ベクターにすることができるものである。

## 【 0 0 6 6 】

図11Gにおいて、H I V - 1のc P P T及びC T S配列はカッコ内に入れられている。

## 【 0 0 6 7 】

いずれにせよ、標的細胞内のゲノムのレトロ転写の際にDNAトリプレックスを形成する能力を保持している突然変異を受けた配列が利用されることになる。

40

## 【 0 0 6 8 】

従って、本発明の特殊な一実施形態に従った組換えベクターは、レトロウイルス又はレトロトランスポゾンL T R配列の全部又は一部分、レトロウイルス部位P B S及びP P T 3末端、つまりベクター粒子内のベクターゲノムのカプシド化に必要なレトロウイルス配列を含むことができる、L T R配列は、一部分、特にU 3領域内で、欠失していてもよい。

## 【 0 0 6 9 】

本発明に従った特定のベクターは、1998年4月15日付でI - 2005という番号でC N C M（フランス国立パスツール研究所微生物培養収集機関）に寄託されたプラスミドp T R I P . E G F Pである。このベクターの制限地図は、図10に表わされている。

## 【 0 0 7 0 】

50

本発明に従ったもう1つのベクターは、1999年4月20日付でCNCMに寄託されたプラスミドpTRIP.MEL-IREGFPである。このベクターは、図14に表わされたプラスミドpTRIP.MEL-IREGFPである。

【0071】

本発明に従った特定の組換えのベクターは、配列gag、pol及びenvが同様にレンチウイルス、特にHIVREV特にHIV-1又はHIV-2の配列にも由来することを特徴とする。

【0072】

本発明のもう1つの実施形態に従うと、配列gag及びpolは、HIVREVから誘導されており、配列envは、HIVとは全く異なるREV又は例えば、水疱性口内炎ウイルス(VSV)といったようなウイルスに由来する。

10

【0073】

一般的に、求められているトランスジーンが発現に応じて、トランスジーンを発現したい宿主との関係におけるアンフォトリピックenvポリペプチドをコードするenv配列を利用することを選択するか又は反対に、エコトリピックenvポリペプチドをコードするenv配列を選択することになる。env配列の向性は、特異的にヒトの向性であってよい。

【0074】

本発明は同様に、転写及び発現調節シグナルの制御下に置かれた規定のヌクレオチド配列(トランスジーンすなわち問題の配列)、レトロ転写、発現及びカプシド化調節シグナル及びシス型活性中央開始領域(cPPT)及びシス型活性終結領域(CTS)を有するポリヌクレオチドを含む組換えヌクレオチド配列を含んで成る組換えベクター粒子をも目的とする。

20

【0075】

本発明は同様に、転写及び発現調節シグナルの制御下に置かれた規定のヌクレオチド配列(トランスジーン)、レトロトランスポゾンのレトロ転写、発現及びカプシド化を調節するシグナル及び、シス型活性中央開始領域(cPPT)及びシス型活性終結領域(CTS)を有するポリヌクレオチドを含む組換えヌクレオチド配列を含んで成る組換えベクター粒子において、前記領域がレトロトランスポゾンから誘導され、レトロトランスポゾンの調節シグナルと共に機能しうる配向で挿入されている、組換えベクター粒子にも関する。

30

【0076】

さらに、本発明は又

a) レトロトランスポゾンの核タンパク質又は機能的誘導ポリペプチドに対応するポリペプチドGAG、

b) レトロトランスポゾンのタンパク質PT、PRO、IN又は機能的誘導ポリペプチドに対応するポリペプチドPOL、

c) gag及びpol配列の転写及び発現調節シグナル、

d) 転写及び発現調節シグナルの制御下に置かれた規定のヌクレオチド配列(トランスジーン)、レトロトランスポゾンのレトロ転写、発現及びカプシド化を調節するシグナルを含む配列、及びシス型活性中央開始領域(cPPT)及びシス型活性終結領域(CTS)を有し、これらの領域がレトロトランスポゾン由来のものであり、レトロトランスポゾンの調節シグナルと共に機能しうる配向で挿入されているポリヌクレオチドを含む組換えヌクレオチド配列、

40

を含んで成る組換えレトロウイルスベクター粒子、  
をも目的とする。

【0077】

さらに、本発明は同様に、

a) レトロトランスポゾンの核タンパク質又は機能的誘導ポリペプチド(ポリペプチドGAG)をコードするgag配列と呼ばれるヌクレオチド配列、

b) レトロトランスポゾンのタンパク質RT、PRO及びIN又は機能的誘導ポリペ

50

チド（ポリペプチドPOL）をコードするpol配列と呼ばれるヌクレオチド配列、  
 c) gag及びpol配列の転写及び発現の調節シグナルの発現の結果として得られる  
 ベクター粒子において、

エンベロープポリペプチド又は機能的誘導ポリペプチド（ポリペプチドENV）について  
 コードし、転写及び発現の調節シグナルの制御下に置かれているenv配列と呼ばれるヌ  
 クレオチド配列、

e) 転写及び発現調節シグナルの制御下に置かれた規定のヌクレオチド配列（トランス  
 ジーン）、レトロトランスポゾンのレトロ転写、発現及びカプシド化を調節するシグナル  
 を含む配列、及びシス型活性中央開始領域（cPPT）及びシス型活性終結領域（CTS  
 ）を有し、これらの領域がレトロトランスポゾン由来のものであり、レトロトランスポゾ  
 ンの調節シグナルと共に機能しうる配向で挿入されているポリヌクレオチドを含む組換え  
 ヌクレオチド配列

を含んで成る組換えレトロウイルスベクター粒子をもその目的としている。

【0078】

本発明は同様に、a) シス型活性中央開始領域（cPPT）及びシス型活性終結領域（  
 CTS）を有するポリヌクレオチドであって、これらの領域がレトロトランスポゾンから  
 誘導されレトロトランスポゾンの調節シグナルと共に機能しうる配向で挿入されているポ  
 リヌクレオチド、

b) レトロトランスポゾンの核タンパク質又は機能的誘導ポリペプチド（ポリペプチド  
 GAG）に対応するポリペプチド、

c) レトロトランスポゾンのタンパク質RT、PRO、IN又は機能的誘導ポリペプチ  
 ド（ポリペプチドPOL）に対応するpolポリペプチド、

d) ウイルスエンベロープポリペプチド、

e) 転写及び発現調節シグナルの制御下に置かれた規定のヌクレオチド配列（トランス  
 ジーンすなわち問題の配列）、レトロ転写、発現及びカプシド化を調節するシグナルを含  
 んで成る組換えヌクレオチド配列、

を含んで成るレトロウイルス様組換え粒子をも目的とする。

【0079】

本発明は例えば、cPPT及びCTS領域を含むポリヌクレオチド及びレトロ転写、発現  
 及びカプシド化を調節するシグナルが例えば酵母レトロトランスポゾンといったレトロト  
 ランスポゾンに由来する、前述のような組換えベクターに関する。

【0080】

一般にベクター粒子の構造ポリペプチドをコードする配列又はトランスジーン  
 の転写及び発現調節シグナルは、それらがレトロウイルス又はレトロウイルス様起源のものでない場  
 合、有利には、組織特異的発現を導く可能性のある、条件付き又は誘発可能なシグナル。

【0081】

同様に本発明の枠内に入るのは、前述の定義づけのうちの1つに従ったベクターと組換え  
 られることを特徴とする組換え細胞である。組換えは、利用可能なあらゆる手段特にトラン  
 スフェクション又は感染、特にベクターによる形質導入又はトランスフェクションによ  
 って実施され得る。

【0082】

かくして、細胞は、一過的にトランスフェクションを受けることもできるし又は反対に安  
 定した形でトランスフェクションされることもある。ここで問題となっているのは、カプ  
 シド化細胞又は標的細胞、特にその中でトランスジーン  
 の発現による治療効果が求められているような細胞である。

【0083】

きわめて興味深いことに、本発明のベクターを用いた形質導入のおかげでトランスジーン  
 を発現できる組換え細胞は、非有糸分裂の分化された真核細胞である。

【0084】

しかしながら、本発明は同様に、非有糸分裂初代真核組換え細胞、或いは又有糸分裂細胞

10

20

30

40

50

の調製をも可能にする。

【0085】

一例としては、肺細胞、脳細胞、上皮細胞、星状細胞、小グリア細胞、オリゴデンドロサイト及びニューロン、筋細胞、肝細胞、樹状細胞、神経細胞、骨髄細胞、マクロファージ、線維芽細胞、リンパ球、造血細胞が挙げられる。

【0086】

従って本発明は、前述のようなベクター又は前記指示事項に記載の組換え細胞を含むことを特徴とする、治療目的の組成物を目的とする。

【0087】

本発明は同様に、上述のようなベクター又は上述の細胞を含み、規定の宿主内で免疫、細胞又は体液性応答を導く可能性のある免疫原性組成物にも関する。

【0088】

従って、本発明は、レトロウイルス又はレトロウイルス様の c P P T 及び C T S 領域を含む前述のようなポリヌクレオチドを提供し、特に規定の細胞内で *ex vivo* でのヌクレオチド配列 (トランスジーン) の核移入を目的としたその利用に門戸を開くものである。

【0089】

その上、本発明は、問題のヌクレオチド配列又はトランスジーンに結びつけられた上述のようなポリヌクレオチドを利用可能にする。

【0090】

最後に、本発明は、問題のポリヌクレオチド又はトランスジーンでの真核細胞のトランスフェクション又は形質導入を目的とする、シス型活性中央開始領域 (c P P T) 及びシス型活性終結領域 (C T S) を有しこれらの領域がレトロウイルス又はレトロウイルス様起源のものであるポリヌクレオチドの利用に関する。

【0091】

本発明は同様に、*in vivo* での形質導入のための本発明のポリヌクレオチド又は組換えベクターの利用にも関する。

【0092】

本発明のもう 1 つの特徴及び利点は、以下の実施例及び図面から明らかとなる。

【0093】

#### 材料と方法

##### ベクタープラスミドの構築

プラスミド p T R I P - L a c Z 及び p T R I P - E G F P は、p H R C M V l a c Z 構成に由来する (Naldini et al, 1996)。p H R C M V l a c Z のリポータ遺伝子 L a c Z は、自己蛍光タンパク質 E G F P の O R F によって置換された。E G F P 遺伝子は、忠実な熱安定性ポリメラーゼ P f u (Stratagene) を用いてプラスミド p E G F P - N 1 (Clotech) から P C R により増幅された。

利用された P C R プライマの配列は以下のとおりである：

Bam E G F P : 5 cc gga tcc cca ccg gtc gcc acc 3

Xho E G F P : 5 cc ctc gag cta gag tcg cgg ccg 3

【0094】

P C R 増幅は、以下の条件下で 30 サイクル実施された：

- 変性 95 、 30 秒

- ハイブリダイゼーション 50 、 1 分

- 伸長 75 、 30 秒

【0095】

制限部位 BamH I 及び Xho I には、それ自体 BamH I 及び Xho I によって消化されたベクターフラグメント p H R C M V の中で配向された形で挿入するように、フラグメント P C R F G F P がそれぞれ 5 及び 3 に付加された。組換え D N A の従来の技術 (Man iatis et al, 1983) によるフラグメント P C R F G F P の挿入によってプラスミド p H R - E G F P が生成された。

10

20

30

40

50

## 【0096】

H I V - 1 ゲノムの中央領域に対応し、H I V のレトロ転写中のトリプレックスの形成を担うシス型活性ボックスを含む 184 bp のフラグメントを、プロモータ C M V の上流側でプラスミド p H R - E G F P 及び p H R C M V i a c Z の C l a I 部位の中に挿入した。トリプレックス中央領域は、野生型トリプレックス配列を含む H I V - 1 L A I ゲノムの完全プロウイルスプラスミドから P C R により増幅されるか ( p B R U 3 ; Charneau et al, 1991 )、又はシス型活性終結配列 C T S 内で突然変異を受けるか ( p C T S : Charneau et al, 1994 )、或いはシス型活性中央開始配列内で突然変異を受けている ( p225; Charneau et al, 1992 )。

利用された P C R プライマの配列は以下の通りである：

Nar / Eco T R I P<sup>+</sup> : 5 gtc gtc ggc gcc gaa ttc aca aat ggc agt att cat cc3

Nar T R I P<sup>-</sup> : 5 gtc gtc ggc gcc cca aag tgg atc tct gct gtc c3

## 【0097】

P C R 反応条件は、前述のものと同じであった。

## 【0098】

連結の間に自らの上に再環状化したベクターを除去する目的で、競合連結 / 消化 T 4 / D N A リガーゼ / C l a I により、プラスミド p H R G F P 及び p H R C M V L a c Z の C l a I 部位に、Nar I によって消化されたフラグメント P C R Triplex を挿入した。部位 Eco R I がプライマ P C R 5 Nar T R I P<sup>+</sup> の中に導入された状態で、Xho I / Eco R I 消化によって、挿入の配向を分析した。

## 【0099】

結果として得られたプラスミドは、トリプレックスの正しい配向では p T R I P . E G E P と命名され、非機能的な逆配向では p T R I P inv. E G F P と命名された。トリプレックスの突然変異を受けたバージョンを含むベクターは、X が出発突然変異体ウイルスのコード ( A G、D、C T S 又は 2 2 5 ) に対応するものとして、p T R I P X . E G F P . と命名されている ( Charneau et al J. Mol. Biol, 1994, Charneau et al J. Virol 1992 )。異なるプラスミド p T R I P . E G F P 又は p T R I P X . E G F P . から出発して、遺伝子 E G F P を、配向転換 Xho I / Bam H I により Lac Z で置換した。結果として得たプラスミドは、それぞれ p T R I P . Z , p T R I P inv. Z , p T R I P C T S . Z , p T R I P 2 2 5 . Z . と命名されている。

## 【0100】

ベクター H R luc 及び T R I P luc の構築

ベクター R H G F P 及び T R I P G F P のフラグメント Bam H I - E G F P - Xho I を、ルシフェラーゼをコードするプラスミド p G E M - luc ( Promega ) のフラグメント Bam H I - Luc - Xho I によって置換した。

## 【0101】

非感染性ベクター粒子の産生

H I V ベクターの産生は、Naldini et al. 1996 中に記述されたプロトコールの修正版に従って実施された。D M E M ( I C N ) 培地、F V S 10 %、ペニシリン、ストレプトマイシン中で培養されたヒト細胞 2 9 3 T ( A T C C ) のリン酸カルシウムでの一過的同時トランスフェクションによって、ベクター粒子を産生した。175 cm<sup>2</sup> の半集密性ボックスを、次の3つのプラスミドによって同時にトランスフェクションさせた：

- ・ 水疱性口内炎ウイルス ( V S U ) p M D . G のエンベローブをコードするプラスミド 15 µg ( Naldini et al. 1996 )、
- ・ カプシド化プラスミド p C M V R 8 . 2 ( Naldini et al, 1996 ) 又は p C M V R 8 . 9 1 ( Zufferey et al, 1997 ) 30 µg、
- ・ 及び異なるベクタープラスミド p H R 又は p T R I P 30 µg。

## 【0102】

リン酸カルシウム / D N A の同時沈降物を 24 時間細胞と接触した状態に放置し、次に培地を、トランスフェクション後 3 日目まで 24 時間毎に収集した。上清の細胞デブリを低

10

20

30

40

50

速遠心分離によって除去した。ベクター上清を - 80 で冷凍保存した。

【0103】

ベクター粒子の濃度

ベクター粒子を、偽似類型化するために非常に安定したエンベロープ V S V - G を利用することにより、これらの粒子を超遠心法により濃縮することが可能となる。上述の方法に従って収集されたベクター上清を、30 ml 入りの円錐底試験管 (Beckman) に入れて、ローター S W 2 8 (Beckman) 内で + 4 、 1 7 0 0 0 rpm で 9 0 分超遠心分離に付した。その後 P B S 1 9 0 t μ l 中に沈渣物を取り込み、2 0 0 0 rpm で 5 分間遠心分離して再懸濁不能のデブリを除去し、アリコートにし、- 8 0 で冷凍した。

【0104】

培養中の細胞の形質導入

D E A E デキストラン 1 0 μ g / m l の存在下で、超遠心分離を受けた又は受けていないベクター上清を添加することによって HeLa 細胞 ( A T C C ) を形質導入した。HeLa 細胞を、ウシ胎児血清 ( F V S ) 1 0 % を補足した D M E M 培地 ( I C N ) 中で培養する。HeLa 細胞は感染の前夜に 9 6 ウェルの平板にウェルあたり 2 0 0 0 0 個の細胞の割合で展延され、その後最終的に 2 0 0 μ l の体積で形質導入された。ベクター接種材料は、市販の E L I S A 試験 ( DuPont ) に従って計算されたカプシドタンパク質濃度 ( p 2 4 ) に従って標準化された。感染から 2 4 ~ 4 8 時間後の実験に従って、遺伝子導入効率を測定した。リポータ遺伝子 L a c Z を発現するベクターの形質導入率は、in situ での X Gal 染色 ( Charneau et al, 1992 )、又は市販のキット ( Boehringer ) を供給業者の指示に従って用いた光度測定反応によって顕示された。リポータ遺伝子 E G F P を発現するベクターの場合には、形質導入率は、F I T C チャネル上で、蛍光顕微鏡で生存細胞を直接観察することによって定性的に評価された。マーカー E G F P を発現する細胞数の定量化は、フラックス血球測定法 ( F I T C チャネル ) によって実施された。タンパク質 E G F P の秤量は、細胞抽出物上で蛍光測定によって実施することができた。9 6 ウェル付きの培養平板を P B S で 2 度洗い流し、その後 1 0 0 μ l の P B S 1 % N P 4 0 により溶解させた。E G F P 蛍光は 4 7 5 nm の励起フィルタ及び 5 1 0 nm の発光フィルタと共に平板蛍光光度計を利用することによって読み取られた。

【0105】

遷移中のその細胞サイクルの中で停止させられた HeLa 細胞 G 1 / S を、4 μ M のアフィジコリン ( Sigma ) による形質導入に先立つ 2 4 時間の予備処理を伴って前述のものと同じ条件に従って調製した。これらの条件下では、9 5 % 以上のトリチウム標識チミジンの取込みが阻害されていた。

【0106】

初代細胞の ex vivo 形質導入

ラットの脊髄細胞の一次培養を以下の要領で調製した：すなわち 1 3 ~ 1 4 日目のラット胎児骨髄を、双眼ルーペ下で解剖した。全段階にわたり、組織は、グルコース 3 . 6 mg / m l を補足した培地 L 1 5 ( Gibco ) 中に維持した。神経細胞を、3 7 で 1 5 分間トリプシン ( 0 . 0 5 % , w / v ) 中でのインキュベーションにより解離させた。トリプシン消化を、ウシ胎児血清 ( F V S ) 1 0 % の添加及び低速遠心分離によって阻害した。細胞沈渣は、穏やかな機械的攪拌により、1 0 0 μ g / m l のデオキシリボヌクレアーゼ 1 ( Boehringer ) を含むグルコース 3 . 6 mg / m l の培地の中に取り上げられた。4 % ( w / v ) の B S A クッションを通して低速遠心分離により細胞を収集した。

【0107】

ポリ - D L - オルニチン ( 6 μ g / m l ) 及びラミニン ( 3 μ g / m l ) で被覆された直径 1 2 m m のガラス小薄片を含む 2 4 ウェルを有する平板内に脊髄細胞を入れた。補足物 B 2 7 . 2 % の S V F 、 0 . 5 m M の L - グルタミン、2 5 μ M のベーターメルカプトエタノール及び 2 5 μ M の L - グルタミン酸塩を含む神経基底培地中に、細胞培養を維持した。非神経細胞による培養のコロニー化を予防するため、2 4 時間後に培養を 1 0 μ g / m l の 5 フルオロデオキシウリジンで処理した。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 8 】

ラット脳内の E G F P の *in vivo* 形質導入

E G F P マーカータンパク質を発現するベクターを、*in vivo* 実験のために利用した。

## 【 0 1 0 9 】

生後5週目のSDラットについて、ベクターHR・EGFP又はTRIP・EGFP 2 µlを用いたラット脳内注入を実施した。最初、Imagene 500 (Rhone Merieux)を腹腔内注入することによってラットを眠らせた。5分あたり2 µlの速度で5 µlのハミルトン針を用いて脳定位固定ガイドを用いて各半球の線条体内に注入を行なった。注入から1週間以上後に、まずはPBSそして次に2%のパラホルムアルデヒド(PFA)の灌流により、ラットを屠殺した。次に脳を採取し、切断して、針が残した外傷により目に見える注入点を含む部分のみを保存した。一晩中PFA 2%での後固定を行ない、その後、まずは20%次に30%のスクロースでの凍結保護を施した。脳を次にtek組織で被覆し、carboglace内で凍結させ、-80で保存した。クリオスタットを用いて14 µmの分類された切片を製作し、その後、共焦点顕微鏡で観察した。

10

## 【 0 1 1 0 】

ベクターHR I u c及びTRIP I u cの*in vitro*及び*in vivo*での比較。

HeLa細胞を、形質導入の一日前に、96ウェル平板にて1ウェルあたり細胞20000個の割合で展延させた。DEAE-デキストラン10 µg/mlの存在下で同一条件で3回1ウェルあたりp24 1ngといったように、調製物のp24含有量について標準化された同量のベクター粒子を用いて、形質導入を実施した。形質導入から2日後に、ルシフェラーゼ活性を、Promegaキット(メーカーの指示に従う)及びWallacマイクロプレート測定装置(Victor)を用いて測定した。

20

## 【 0 1 1 1 】

SD OFAラット及びC57B16マウスの脳の線条体内のベクター注入を実施した。

p24を25ng含むHR I u c又はTRIP I n cの調製物2 µlを注入した(n=4)。その4日後に動物を屠殺し、線条体を採取し、ルシフェラーゼ活性を、前述のものと同じ技術により測定し、並行して合計タンパク質量を測定した(Pierceキット)。

## 【 0 1 1 2 】

例

1. 基本的側面・前組込み複合体の核移入。

30

HIV-1: 中央トリプレックスの役目

HIVウイルスのレトロ転写メカニズムは、全く異なる2つの半分へのプラスストランド(ストランド<sup>+</sup>(brint<sup>+</sup>))の合成により、オンコジーンレトロウイルスのものと異なっている(図1)。下流側セグメントは、レンチウイルスゲノムの特徴であるポリプリン領域の中央コピー(cPPT)で開始されている。上流側プラスストランドの合成は、ゲノムの中央への逐時的ストランドの変位の後に終結する。逆転写酵素によるストランドの変位の遮断は、HIVゲノムの新しいシス型活性配列すなわちCTS(Central Termination Sequence)によって支配されている。従ってレンチウイルスのレトロ転写の最終産物は、約100個のヌクレオチド上にまたがったストランド中央構造(中央トリプレックス)を支持するDNAである(Charneau et al. 1994)。cPPT又はCTSの管理された突然変異誘発は、プラスストランドの合成の中央での開始又は終結を取消す可能性がある。両方の場合において、DNAに中央トリプレックスが無い突然変異体ウイルスは、複製にとって欠陥のあるものである。

40

## 【 0 1 1 3 】

中央開始及び終結突然変異体の複製欠陥の分析により、レトロ転写の中央開始又は終結突然変異体の複製サイクルが、ウイルスDNAの合成の後及び核エンベロープに向かったレトロ転写複合体の経路指定の後の段階に際して中断するということが示された。感染を受けた細胞内に存在するウイルスDNAの構造を分析した場合、開始及び終結突然変異体の表現型が類似しているということに気がつく。両方のケースにおいて、実際、レトロ転写されたDNAの包括的量は、cPPT又はCTSの中の突然変異によって影響されない

50

。その代り、組込まれていない線状DNAの蓄積が観察されると同時に、極くわずかのプロウイルスしか組込まれないか、又は1個又は2個のLTRをもつ環がごくわずかし形成されないこともわかる。次に核/細胞質の分画化及び核の透過性付与の実験は、これらの線状DNA分子が核に結びつけられていること、ただしその組込み及び/又はその環化が、核エンベロープの溶解の後にしか発生し得ず、このことは突然変異体のウイルスDNAがこのエンベロープの外部で保持されることをよく表わしている、ということを示した。さらに全ビーズ上に固定化されたデオキシリボヌクレアーゼIによる感染を受けた細胞の精製された核のヌクレアーゼ攻撃実験は、核膜の細胞質面での突然変異体線状DNAの蓄積をも実証している。最後に、未変性トリプレックスが備わった又は備わっていない線状DNA分子の組込み能力の精確な定量化により、近年、中央トリプレックスが、*in vitro* での非相同DNA標的の内への線状DNAの組込みに影響を及ぼさないということが示された。

10

## 【0114】

従ってレトロ転写の中央開始又は終結のための突然変異ウイルスの複製欠陥は、それらの前組込み複合体の核移入、そしてより精確には、核孔を通しての転座段階に関係するものである。レンチウイルス、そして特にHIVウイルスは、間期の細胞の核内へのウイルスゲノムの進入に不可欠な決定因子である、組込まれていないDNA分子の中心にトリプレックスを作り出すことを目的とするレトロ転写の独創的な戦略を開発した。このメカニズムは、その組込み部位へのDNAのアクセスが有糸分裂中の核膜の崩壊によって左右されるその他全てのレトロウイルスからレンチウイルスを区別するものである。

20

## 【0115】

2. トリプレックスの形成を担うシス型活性配列を含むレンチウイルスベクターの生成

## 2-1 レンチウイルスベクターの原理と利点

有効なレンチウイルスベクターの生成は、活性な核移入ひいては非有糸分裂細胞の感染を担う決定因子がわかっていることを想定している。

## 【0116】

HIV-1ゲノムの核移入におけるトリプレックスの関与を発見したことは、効率の良いレンチウイルスベクターの構築のために重大な影響をもたらした。ここでは、レンチウイルスのレトロ転写の際にDNAトリプレックスの形成を担うシス型活性配列がベクター構成内部で保存されていることが想定されている。この基本的研究のベクター学での応用は、レンチウイルスベクターの構成の中に中央領域cPPT-CISを付加しかくしてベクターゲノムのレトロ転写の際にトリプレックスDNA構造を作り出すことから成る。ここで、オンコウイルス(一般にはMoMLV)由来のベクターと同じ原理に基づくレンチウイルスベクターの構築の数多くの試みが、少なくとも感染力価の面できわめて失望させられるものであることが判明したという点に留意されたい。これらのベクターは、置換用ベクターである。すなわち、レトロウイルスゲノム全体は、2つのLTRとカプシド化配列の間で、治療向けの遺伝子又はリポータ遺伝子により欠失させられ、次に置換される(Miller et al. 89)。発明人によると、このタイプの構成は、ウイルスDNAの核移入のために中央領域cPPT-CISが必要となることから、レンチウイルスの場合には最適でない。しかしながら、オンコウイルス由来のレトロウイルスベクターと同じ原理に基づいて構築されたものの、水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)の非常に融合誘発性あるエンベロープにより偽似類型化され超遠心分離により濃縮されたHIVベクターは、ラットニューロン(Naldini et al, 1997; Blomer et al. 1997)、肝臓及び分化した筋肉(Kafri et al, 1997)の*in vivo*での形質導入を可能にする。しかしながら、CFTR遺伝子(腭線維症)をコードするこれらのHIVベクターによるヒトの肺上皮細胞の異種移植片の相補実験は、非常に失望させられるものであることが明らかになった。この組織中のベクターDNAの主要部分は、組込まれなかった線状DNAの形にとどまることになり、かくして核移入の欠陥の確率が高いことが明らかになる(Goldman et al, 1997:「ベクターDNAの核移入率に対する中央トリプレックスの影響」の章を参照のこと)。

30

40

## 【0117】

50

## 2.2 「トリプレックスをもつ」HIVベクターの構築及び産生

ベクター系内でのトリプレックス構造の重要性をテストするため、発明人は、Naldini et al. によって記述された構成を基礎にした。この系（図2）においては、HIVベクター粒子は3つのプラスミドすなわちHIVのエンベロープを除いてウイルスタンパク質全体を発現するカプシド化プラスミド、エンベロープを発現するプラスミドVSV-G及びHIVのLTR、HIVのカプシド化2連シグナル及びLacZの発現カセットを含むベクタープラスミドpHR-CMV LacZの一過的同時トランスフェクションによって産生される。最初に、リポータ遺伝子LacZは、in vivoでの形質導入研究のためにより実用的であるEGFP（Eグリーン蛍光タンパク質）の非常に蛍光の強いバージョンをコードする遺伝子によって置換された。トリプレックスの形成を担うシス型活性配列cPPT及びCTSを含むHIV-1 LAIゲノムの中央領域は、PCRにより増幅され、次に部位ClaIにおいてベクター構成pHR-EGFPの中に挿入された。正しい配向での野生型トリプレックスの挿入は、ベクターpTRIP-EGFPを生成する。逆の配向では（非機能的）、ベクターpTRIPinv-EGFPが生成される。

【0118】

## 2.3 レンチウイルスベクターの調製物中のヘルパーウイルスの検出の高速かつ感応性の高い試験「ベクター上清」内のヘルパー感染性ウイルスの不在

相同な配列を最低限有する独立した3つのプラスミドに基づくベクター粒子の産生は、複製に対する応答能あるヘルパーウイルスを生成する確率を最小限におさえることを可能にする。その上、カプシド化構成は、HIVのエンベロープ及び複製に結合する遺伝子と呼ばれる遺伝子全体（Vif、Vpr、Vpu、Nef）について欠失させられた。カプシド化されたベクターゲノムは、もはや2個のLTR、カプシド化に必要な配列及びトリプレックス配列以外HIVを含んでいなかった。しかしながら、各々のベクター株は感染性ヘルパーウイルスの存在についてテストされた。MT4細胞を、一晩中、マイクロプレート上で同一条件下で三回感染させ、次に徹底的に洗浄し、接種材料を増幅する目的で5日間再度培養させた。その後、指標細胞P4（HeLa CD4 LTR-LacZ）を、産生された感染性粒子を検出する目的で、3日間、MT4細胞及びその上清を用いて感染させた。最後に、in situでのX-gal染色を実施した。この要領で、産生された全ての感染性粒子は、青色シンシチウムの形で検出可能である。この感応性の高いプロトコールは、p24 0.25 pgのHIV接種材料つまり約3200個の物理的粒子の検出を可能にする。HIVの場合、1000さらには10000個のうち唯一1つの粒子が感染性をもつことが推定されることがわかっているため、このプロトコールは恐らく唯一の感染性粒子の検出を可能にするはずであった。

【0119】

ベクター上清は一貫して、HIV感染性粒子を有していない。

【0120】

## 2.4 in vitroでのベクターによる形質導入の効率に対するトリプレックスの効果

最初（図3）、HeLa細胞の形質導入に対して中央トリプレックスの挿入がもつ効果を測定した。野生型中央トリプレックス（TRIP GFP）ベクターのトランスフェクション上清、この配列無しのベクター又は突然変異体トリプレックス配列（TRIP GFP D）を用いて、HeLa細胞を感染させた。突然変異体Dは、ストラント<sup>+</sup>の中央開始ひいては中央トリプレックスの形成を妨げるcPPTの突然変異体である（図3）。感染は、カプシドタンパク質p24の量に基づいて標準化された粒子を同量含む上清を用いて実施された。

【0121】

HeLa細胞内のGFPの形質導入は、野生型トリプレックスの存在下で増大させられ、非機能的なトリプレックスの存在下では基底の率まで戻された。

【0122】

この力価利得は、リポータ遺伝子LacZを利用することによって定量化可能である（図4）。これらの細胞は、タンパク質p24の量を基準にして標準化することによって同一

10

20

30

40

50

条件で3回形質導入された。形質導入は、G1/Sで細胞を遮断するアフィジコリンで分裂が遮断された又はされていない細胞について実施された。利用されたベクターは、HRZ(トリプレックス無し)、TRIPZ(トリプレックス有り)、TRIPZinv(TRP配列は逆配向に配向され、非機能的で、中央トリプレックスの形成を導かない)であった。

【0123】

図4A: トリプレックスを含むベクターによるgalの形質導入の利得は6~10倍である。これは、トリプレックスが形成されない場合失なわれる(TRIPZinv)。

【0124】

図4B: gal形質導入に対するトリプレックスの効果は、細胞分裂とは無関係である: 分裂中の細胞又はアフィジコリンで遮断された細胞について類似の結果が得られる。

10

【0125】

なお、Hela細胞については、ベクター粒子の産生の際に利用されたカプシド化プラスミドが付属遺伝子Vif、Vpr、Vpu、Nef内で欠失しているか否かに関わらず同じ結果が得られる。

【0126】

2.5 ex vivoでのベクターによる形質導入の効率に対するトリプレックスの効果  
非有糸分裂初代細胞内でのEGFPの形質導入に対するトリプレックスの影響が、その後測定された。ニューロンが富化されたラットの脊髄初代体外移植組織が、超遠心分離されたベクターの上清を用いて形質導入された。形質導入は、カプシドタンパク質p24のng数に基づいて標準化された、同数の粒子を含む遠心分離された10μl未満のベクターを用いて実施された。

20

【0127】

図6: トリプレックス配列を有するベクターは、トリプレックスを伴わないベクターに比べはるかに多くのラット骨髄初代体外移植組織細胞を形質導入する。

【0128】

2.6 脳内の in vivo 形質導入に対するトリプレックスの影響  
次に in vivoでのEGFPの形質導入に対するトリプレックスの効果が、ラットの脳内への直接注入によって測定された。同量のp24タンパク質を含むトリプレックスを伴う又は伴わないベクター上清を同じ量(2μl)だけ、線条体内に注入した。トリプレックスを伴うベクターを注入したラットにおいては、形質導入された細胞が多数検出されたのに対し(図7a)、針が残した外傷により目に見える正確な注入点においてさえ、トリプレックスを伴わないベクターの注入を受けたラットの脳内ではEGFPを発現する細胞はほとんど検出できなかった。

30

【0129】

図7bでは、ルシフェラーゼリポータ遺伝子(HRLuc及びTRIP.Luc)を発現するHIVベクター(トリプレックスDNA配列を伴う又は伴わない)の構築により、脳内の遺伝子の形質導入に対する影響を正確に定量化することが可能になった。In vitroで、8倍の増大がHela細胞内で観察された(図7-b1)。ラット(図7-b2)又はマウス(図7-b3)の脳の線条体内で in vivoの直接的注入の後にも、類似の利点が見られる。

40

【0130】

ベクターゲノムの核移入に対するトリプレックスの影響  
形質導入された細胞内のベクターDNAの形態、すなわち線状DNA、1個又は2個のLTRを有する環ならびに組込まれたプロウイルス全体を経時的に追跡することを可能にするテストが、発明人によって完成された。このテストは、レトロウイルスDNAの異なる形態を区別することを可能にするプローブの選択及び切断の戦略に従った、ウイルスDNAのサザン法による検出に基づいている(図8参照)。感染を受けた細胞又はベクターにより形質導入された細胞の合計DNAは、細胞内に存在するベクターDNA又はレトロウイルスDNAの全ての形態(組込まれていない線状DNA、1個又は2個のLTRをもつ

50

環状DNA及び組込まれたプロウイルスに共通の内部フラグメントを放出するような形で、1つ又は2つの制限酵素によって消化される。ベクターの場合、選択される酵素はEcoNI及びAvaIIである。プローブとして、EcoNI部位に正確にまたがるPCRにより生成されたフラグメントを利用することによって、異なる形態のDNAに対応する複数のバンドが現われる。内部フラグメントは、細胞内に存在するベクター合計DNAを蛍光画像装置での定量化の後で計算することを可能にするはずである。1.16 kbのフラグメントは、組込まれていない線状DNAの遠位フラグメントに対応し、3.3 kbのもう一つのフラグメントは、組込まれていない環に対応する。蛍光画像装置を用いたシグナルの定量化の後、核移入率は、細胞質線状DNAとの関係において環形状の組込まれたウイルスDNA(核ウイルスDNA)の百分率によって表わされる。第1の予備プロットは、トリプレックスが無いか又はそのHIV-1ゲノムの中央領域が逆に挿入されたベクターの場合における核移入の欠陥に特徴的である細胞内DNAプロフィールを示した。実際、線状DNAに対応するシグナルの強度は、感染から48時間後の合計DNAシグナルの強度と同等であった。換言すると、DNAベクターのプロセッシングは、組込まれていない線状の段階で大部分が遮断され、極くわずかな分子しか組込まれない(図9)。逆に、トリプレックスを有するベクターの場合には、48時間の時点でほとんど線状DNAは存続しておらず、その大部分が、形質導入細胞の核内に移入されてその後組込まれたということを表わしている。

10

【0131】

## 2.8 ベクター構成内のDNAトリプレックスの位置の効果の研究

20

全てのレンチウイルスにおいて、レトロ転写の際のトリプレックスの形成を担うシス型活性配列cPPT及びCTSが見い出される。あらゆる場合において、このトリプレックスは、線状DNAゲノムの中心近くヌクレオチド数個のところにある。トリプレックスがこのように中央に位置することは、核孔を通しての転座のこの決定因子の最適な機能にとって重要でありうる。ベクター構成が実現された時点で、リポータ遺伝子の転写単位のすぐ上流側で、トリプレックス配列を挿入した。リポータ遺伝子のサイズに応じて、このトリプレックスは、ベクター線状DNAゲノムの中心に対し多少の差こそあれ近いところにあった。EGFPリポータ遺伝子の場合(0.7 kb)、トリプレックスは構成の中心にきわめて近く、一方LacZ(3.1 kb)の場合、それは、中心からさらに遠くにある(図2)。両方の場合において、トリプレックスの存在は、ベクター上清の大きな力価増加を誘発した。従って、ベクターゲノム上でのトリプレックスの位置に関して幾分かの「柔軟性」が存在する。しかしながら、EGFPをコードするベクターは、LacZをコードするものよりも有効であることが明らかにわかっている。従って、理想的に置かれたトリプレックスにより補足的な力価増加が得られる可能性がある。この仮定をテストするため、発明人らは、リポータ遺伝子に代って、任意のサイズのフラグメントバンクをクローニングすることに着手し(部分消化Sau3A)、クローニングされたフラグメントのサイズ分布は、標的細胞の形質導入の前後に分析された。トリプレックスの中心的位置がその機能にとって重要である場合、トリプレックスとの関係における対称的ベクターの構築の制約も重要となるだろう。U3領域内にベクターの転写単位を挿入することによってこの障害を迂回することが可能である。レトロ転写の後、トランスジーンは、組込まれる前にトリプレックスの両側で重複させられ、かくしてトリプレックスの正確に中央の位置を遵守することになる。

30

40

【0132】

## 2.9 分化された異なる組織内のin vivo 導入

さまざまな遺伝病において、罹患した分化組織を有効かつ安定した形で形質導入する「トリプレックス」レンチウイルスベクターの能力が研究される。ラット又はマウスにおける脳内及び筋肉、肺上皮及び肝臓といった異なる組織内でのこれらのベクターの潜在性。EGFPリポータ遺伝子を利用することによって、定性応答を比較的迅速に得ることができる。これらの組織の形質導入率に対するトリプレックスの影響の定量的測定が、ルシフェラーゼリポータ遺伝子を利用することによって可能となる。なお、ヒト造血組織の全能株

50

細胞を形質導入するこれらのベクターの能力は、精製されたCD34+細胞からか又は小さい帯血細胞から評価することができる。

【0133】

#### 2.10 トリプレックスをもつHIVベクターによる造血株細胞内の効率の高い遺伝子導入

造血株細胞は、血液に関係する又は筋肉の又は神経学的な多数の遺伝子障害及び感染症の治療にとってきわめて重要な標的である。これらの細胞内のMOMLVといったようなオンコウイルス由来のレトロウイルスベクターによる遺伝子導入に関する主たる問題点は、これらの細胞がごくわずかしか分裂せず、サイトカイン処理による有糸分裂の誘発には一般にその全能性の喪失が伴うという点にある。図16では、ベクターTRIP-GFPによる株細胞CD34内のGFP遺伝子の形質導入の結果が、85%以上の細胞におけるGFPの発現を示している。トリプレックス無しのベクターHR-GFPによるCD34株細胞の形質導入の効率はきわめて劣っている(Miyishi H et al., Science 1999, 283, p 682-6)。CD34株細胞はその精製後直ちに形質導入されるため、そのクローン原性能力は無傷のままにとどまっている。

10

【0134】

胎児細胞の形質導入のためのトリプレックス配列をもつレンチウイルスベクターの利用：遺伝子導入動物又は修飾された細胞系の構築への応用。レトロウイルスベクターは潜在的に、卵(Rubenstein et al., 1986, PNAS, 83, p366~368)又はES細胞(Friedrick 及び Soriano, 1991, Genes Dev, 5, p1513~1523)の形質導入を介しての遺伝子導入動物の構築にとって有利な手段である。レンチウイルスベクターの利用は、これらの全能細胞の形質導入の効率を増大させる可能性がある。ベクターTRIP-GFPによるマウスの胎児細胞の形質導入についての我々の予備的結果は、GFP遺伝子の高い導入効率のみならず、GFPトランスジーン転写の完全な消失をも示している。一部のウイルス配列、特にプライマ結合部位(PBS)は、この発現消失に介入する疑いがもたれている。この障害を回避するため、特異的組換え系CRE/Loxに基づく、これらのウイルス配列のための自己欠失性ベクター(Choulike et al., 1996, J. VIROL, 70, p1792-98)が構築された。

20

【0135】

#### 予防及び/又は治療的利用分野をもつ免疫原性組成物

30

##### 新しい免疫化戦略： トリプレックスをもつレンチウイルスベクター序

抗腫瘍及び抗ウイルス応答における細胞障害性Tリンパ球の役割が、数多くのマウス実験系のみならず人間においても報告されている。異なるワクチン戦略が、腫瘍又は感染作用因子に対する保護を与える細胞障害性応答を誘発することを目的としている。レンチウイルスは、核孔を横断する能力をもち、その結果、はるかにすぐれた細胞形質導入ベクターである。in vitro 及び/又は in vivo での細胞の形質導入は、その後特異的細胞免疫性を誘発することになる腫瘍及び/又はウイルス抗原エピトープのこれらの細胞による提示を導くことができる。これらの理由から、発明人らは、in vitro で形質導入された樹状細胞又はHLA-A2.1の発現により「ヒト化」されたマウスにおける in vivo での直接的投与を利用することにより、組換えトリプレックスをもつレンチウイルスベクターの免疫原性を研究した(Pascolo S. et coll. 1997)。このHHDマウス「純粋HLA-A2.1」は、制限されたHLA-A2.1細胞障害性応答の研究にとって最高の動物モデルであり、免疫療法の前臨床研究を実施するために提案された。我々の結果全体は、明らかに、腫瘍エピトープを含むトリプレックスを伴うレンチウイルスベクターの免疫原性を明確に示しており、そのため、トリプレックスを伴うレンチウイルスは、新しい免疫療法戦略となっている。

40

【0136】

#### 初期研究：異なるワクチン戦略の比較

HHDマウスを利用することにより、異なるワクチン戦略が予め比較された。任意に5つ

50

の腫瘍エピトープを選択して、発明人らは、ヒトにおいて臨床応用可能な免疫化戦略を5つ比較した：すなわち、(i)フロイントの不完全アジュバンドでの合成ペプチド、(ii)リポペプチド、(iii)C末端でタンパク質P1に対しエピトープが独立した形で融合されている酵母の組換え粒子Ty、(iv)そのS2前部分内でエピトープに融合したB型肝炎ウイルスの糖タンパク質をコードする裸のDNAの筋肉投与、(v)骨髄細胞からの *in vitro* での拡張及び分化の後のペプチドが充てんされた樹状細胞の静脈内注射。粒状構造(酵母の組換えTy)又はB型肝炎ウイルスの糖タンパク質Sをコードする組換え裸DNA(1995年4月25日に公示された参考文献WO95/11307号)の注入が、細胞溶解応答誘発の最も効果的な戦略であることを考察した発明人らは、黒色腫由来のポリエピトープモチーフ(全く異なる10個のエピトープ)をこの糖タンパク質内に挿入することによりテスト対象の全てのマウスにおいて同時に、エピトープペプチド10個のうち5個に対する細胞溶解応答を同時に誘発する可能性を裏づけ報告した。

10

## 【0137】

Ty又は裸DNA粒状抗原は、細胞障害性応答の効率の良い誘発戦略であることがわかった。しかしながら、粒子Tyの大規模産生は困難である。その上、B型肝炎ウイルスの糖タンパク質のS2前セグメント内への多重の疎水性エピトープの導入がCHO細胞による粒子の産生(現在の肝炎ワクチンの調製方法)の著しい減少をひきおこすおそれもある。大規模に欠失を受けた偽似類型の形で産生されているもののトリプレックスDNA配列は保存している組換えレンチウイルス(HIV-1)は、分裂しない細胞の核膜を横断する能力をもち、上述のワクチン戦略に比べて潜在的により効率の良い新しいワクチン戦略

20

## 【0138】

材料、方法及び結果遺伝子導入マウス

HHDマウスは、分子HLA-A2.1のペプチド提示ドメイン(a1、a2)がヒト2-マイクログロブリンにN末端で共有結合により結合させられているようなモノカテナリー構成を発現する。分子HLA-A2.1のa3ドメイン及び細胞質内部分は、分子H-2D<sup>b</sup>(Pascolo, et coll. 1997)の等価物で置換される。これらのマウスは、エピトープペプチドの免疫原性及び異なるワクチン戦略を比較研究することを可能にしている。

## 【0139】

ベクターTRIP-MEL-IRES-GFPの構築

まず最初に2-シストロンベクターTRIP-IRES-GFPが構築された。ベクターTRIP-IRES-GFPのEcoRI部位は、T4ポリメラーゼDNAで満たされ、ベクターTRIP-DeltaE-GFPを作り出す。次に、約1.2kbのフラグメント BamHI - BstXI - SriaBI - EcoRI - IRES - EGFP - XhoI が、フラグメント BamHI - EGFP - XhoI の代りにクローニングされた。IRES-EGFP (Internal Ribosome Entry Site) を含むフラグメントは、Dr Yongwon Choi (Rockefeller University, N.Y., USA) の無償贈与物である。Kozacコンセンサス配列及び黒色腫CTLポリエピトープを含むフラグメントが、pfuポリメラーゼ及びオリゴヌクレオチド：5 BgIMlu Mel：6 cc agatct acgcgt gcc acc atg gct ggt 3 3 RIMel：5 CGGAATT C G A C C T A A A C G C A A C G G A T G 3 を用いてマトリクスpBS mel poly上でPCRにより生成された。その後、PCR melフラグメントが、BgIII及びEcoRIによって消化され、ベクターTRIP-DeltaE-IRES-GFPの部位BamHI及びEcoRIにクローニングされ、ベクターTRIP-MEL-IRES-GFPを作り出した。

30

40

## 【0140】

トリプレックスを伴う又は伴わないレンチウイルスベクターGFPによる樹状細胞(CD)の *in vitro* 形質導入効率

IL4及びGM-CSFの存在下で遺伝子導入マウスHHDの骨髄からマウスCDを得た。ヒトCDは、健康なハプロタイプ供与体HLA-A2.1(以下参照)から得た。これ

50

らの細胞は、異なる濃度 ( $5 \cdot 10^5$ 個の細胞に対してレンチウイルスベクター75、150及び300 ng - p 24) を用いてトリプレックスを伴う又は伴わないLVベクターによって形質導入された。

【0141】

2日目、5日目及び10日目にFACSによりCD内のGFPの発現を測定した。細胞の形質導入効率に対応する蛍光平均強度で表わした値は、トリプレックスを有するレンチウイルスベクターがトリプレックスの無いレンチウイルスベクターに比べ、5~7倍高いヒトCDの形質導入能力をもつことを示した。

【0142】

ベクターTRIP-MEL-IRES-GFPにより形質導入されたヒト樹状細胞を利用することによる初代CTL応答の誘発

10

未成熟のヒトCDは、GM-CSF及びIL13 (IDM、フランス、パリ)の存在下で健康なハプロタイプ供与体HLA-A2.1から得た。CD1、CD4、HLA-ABC、HLA-DR、CD80、及びCD86に対するモノクローナル抗体によるこれらの細胞の免疫表現型決定は、91%を上回るCD純度でのその未成熟な性質を示した。

【0143】

かくして得られたCDを、 $1 \cdot 10^6$ 個の細胞について100 ng p 24 / ベクターの濃度でベクターTRIP-MEL-IRES-GFPにより形質導入させた。FACSによるGFPの発現を測定することによってTRIP-MEL-IRES-GFPによるCDの形質導入効率を検討した。予め形質導入されたCDにより、同じ供与体由来する単核細胞(CMN)を刺激した。3回の刺激の後、4時間の従来CTL試験を利用して、4つのエピトープペプチドにより個別に充てんされたT2細胞について、これらの細胞の細胞障害性活性をテストした。以前の実験においてその免疫原性が高かったことから、エピトープペプチドMAGE-3、gp100.154、GnTV/NA17/A、Tyrosinase 368-Dを選択した。

20

【0144】

特異的細胞障害性応答を、テスト対象の全てのエピトープに対して観察した。各エピトープについて観察された溶解百分率は、図12に表わされている。

【0145】

ベクターTRIP-MEL-IRES-GFPによるHHDマウスの直接的免疫化  
HHDマウスは、皮下(SC)、静脈内(IV)及び腹腔内(IP)でマウス1匹あたりベクターTRIP-MEL-IRES-GFPを2.5  $\mu$  / p 24 ずつ投与して免疫化させた。免疫化から11日目に、各マウスの脾細胞を、10%のTCGFの存在下での2日間を含めて6日間、黒色腫エピトープペプチドにより個別に刺激した。次にこれらの細胞の溶解活性を、対応するペプチドの充てんを受けたRMA S細胞上又はベクターTRIP-MEL-IRES-GFPにより形質導入されたHela-HHD細胞上でテストした。

30

【0146】

各々のマウスについて得られた結果は、RMA S細胞(表1)及び形質導入されたHela-HHD(表2)について特異的溶解という観点から表わされている。最高の結果は、一定の与えられたマウスにおいて同時に誘発された応答の数と同時に溶解の観点からみて、ベクターのSC及びIP投与の後に得られた。特記すべき点は、IP投与により免疫化されたマウスの大部分が、全てのエピトープペプチドに対し細胞溶解応答を発生させるということである(図13)。

40

【0147】

【表1】

黒色腫のポリエピトープを含有するLVによるHHDマウスの免疫後に得られた特異的溶解現象  
TCGF及びペプチドの存在下での8回目の個別のSCマウス 各々についてのIn vitro刺激

マウス	gp154	gp209	gp280	gp457	G-nTV	Mage-3	Mart1.27	Mart1.32	Iyrol-1	Iyrol368-D
S.C.										
1	25	4	13	8	54	17	17	4	4	10
2	44	1	5	11	89	10	11	4	3	6
3	39	0	19	21	81	29	26	6	4	0
I.V.										
1	7	7	1	8	25	5	8	3	4	3
2	10	8	0	13	70	13	16	5	9	14
3	24	6	5	5	65	15	16	3	11	10
4	5	3	13	12	14	10	5	0	3	0
I.P.										
1	30	10	2	3	57	9	6	4	3	2
2	63	8	7	17	72	11	19	9	7	7
3	21	7	8	16	72	14	32	0	7	7

表1: ベクター-TRIP-MEL-IRES GFPによる免疫後の特異的細胞障害性応答  
標的細胞:対応するペプチドでの充てんを受けたRMAS  
エフェクタ/標的比=30

【 0 1 4 8 】

【 表 2 】

10

20

30

40

	gp154	gp209	gp280	gp457	C-nIV	Mage-3	Mart1.27	Mart1.32	Tyro-1	Tyro368
S.C.	2	18	15	24	62	15	20	12	20	18
I.V.	8	10	15	23	50	14	29	10	10	18
I.P.	24	18	15	25	62	15	32	14	18	20

表2:ベクター-TRIP-MEL-IRES GFPによる免疫後の特異的細胞障害性応答  
 標的細胞:ベクター-TRIP-MEL-IRES-GFPにより形質導入されたHeLa-HHD  
 エフェクタ/標的比:30

10

20

30

40

【 0 1 4 9 】

結論

結果は、きわめて効果的な免疫応答を誘発するトリプレックスを伴うレンチウイルスベクターの能力を実証している。それらの免疫原性能は、ヒト樹状細胞上で *in vitro* で示されただけでなく、異なる投与様式に従って遺伝子導入マウスHLA-A2.1のモデルにおいても評価された。注目すべきことに、特異的CTL応答が、黒色腫のポリエピトープ内に含まれた2つのCTLEピトープについて得られた。黒色腫の抗原に対する溶解百分率は同様に、HBV偽似粒子でのDNAワクチン接種又は組換えワクチン、リポペプチド

50

といったようなその他のワクチン戦略を用いて同じHHDマウスで得られるものよりも高いものである。従って、トリプレックスを伴うレンチウイルスベクターに基づくワクチン戦略は、腫瘍又は感染性のさまざまな疾病に応用することができる。

【 0 1 5 0 】

#### 4- BIBLIOGRAPHIE

- Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol.* 1997 Sep; 71(9): 6641-6649.
- Charneau P, F. Clavel. 1991. A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *J. Virol.*, vol. 65, N° 5, 2415-2421. 10
- Charneau P., Alizon M. and Clavel F. (1992). A second origin of plus strand synthesis is required for optimal HIV replication. *J. Virol.* 66: 2814-2820.
- Charneau P, G. Mirambeau, P. Roux, S. Paulous, H. Buc, F. Clavel. 1994. HIV-1 reverse transcription : a termination step at the center of the genome. *J. Mol. Biol.*, vol. 241, 651-662.
- Goldman MJ, Lee PS, Yang JS, Wilson JM. Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis. *Hum Gene Ther.* 1997 Dec 10; 8(18): 2261-2268.
- Heyman T., Agoutin B., Friant S., Wilhelm F.X., Wilhelm M.L., 1995, Plus-Strand DNA Synthesis of the Yeast Retrotransposon Ty1 is Initiated at Two Sites, PPT1 Next to the 3' LTR and PPT2 Within the pol Gene. PPT1 is sufficient for Ty1 Transposition. *J. Mol. Biol.*, vol. 253, 291-303. 20
- Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet.* 1997 Nov; 17(3): 314-317.
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15; 93(21): 11382-11388.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996 Apr 12; 272(5259): 263-267. 30
- Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* (1989), Vol 7, p 980-990.
- Pascolo S., N. Bervas, J.M. Ure, A.G. Smith, F.A. Lemonnier and B. Perarnau. 1997. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from 2 microglobulin (2m) HLA-A2.1 monochain transgenic, H-2D<sup>b</sup>, 2m double knockout mice. *J. Exp. Med.* 185, 2043-2051.
- Poeschla E.M., Wong Staal F., Looney D.J. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vector - *Nature Medicine*, vol. 4, n° 3: 354-357. 40
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.* 1997 Sep; 15(9): 871-875.

【図面の簡単な説明】

【図 1】 レンチウイルスのレトロ転写

レンチウイルスゲノムのレトロ転写は、2つの全く異なる半分へのストランド<sup>+</sup>の合成という点で、オンコジーンレトロウイルスのものと異なっている。上流セグメントは、レン

チウイルスゲノムの特徴であるポリプリン領域 (c P P T) の中央コピーレベルで開始される。上流側ストランド<sup>+</sup>の合成は、ゲノムの中央での逐時的ストランドの変位の後に終結する。逆転写酵素によるストランド変位の遮断は、H I V ゲノムシス型活性配列すなわち C T S (中央終結配列) によって支配される。レンチウイルスのレトロ転写の最終産物は、ヌクレオチド約 100 個の長さにより、3 本鎖中央 D N A 構造 (中央トリプレックス) を支持する線状 D N A である。

【図 2】 H I V ベクター粒子産生のために利用されるプラスミド

ベクター粒子は、トリプレックスの形成を担うシス型活性配列を含む (p T R I P) が又は含まない (p H R) ベクタープラスミド、粒子の酵素及び構造タンパク質をトランスで供給するカプシド化プラスミド (p C M V R 8.2 又は p C M V R 8.91、Naldini et al, 1996 及び Zufferey et al, 1997) 及び V S V ウイルスのエンベロープの発現プラスミド (V S V - G) という 3 つのプラスミドの同時トランスフェクションによって産生される。

HeLa 細胞内の同時トランスフェクションされたプラスミドに関連する部分のみが提示されている (Naldini et al P N A S 1996 年 10 月、Zafferey et al Nature Biotech, 1997)。

カプシド化プラスミド p C M V R 8.2 又は p C M V 8.91 は、g a g 及び p o l 由来のタンパク質の発現を可能にする。

p M D . G は、V S V 非相同性エンベロープをコードする。ベクタープラスミド p H R - T R I P は、プラスミド p H R C M V l a c Z (Naldini et al) に由来する：すなわち、野生型又は突然変異体トリプレックス配列が挿入され、リポータ遺伝子 lacZ は E G F P で変更された又は変更されなかった。

【図 3】 HeLa 細胞内の E G F P の形質導入に対するトリプレックスの影響、

8 チャンバ付き Labtek で培養された HeLa 細胞が、自己蛍光タンパク質 E G F P を発現する異なるベクターによって形質導入される。感染は、接種材料あたり 2 ng の P 2 4 でカプシドタンパク質量 (Dupont 社 E L I S A キット P 2 4) に従って標準化される。感染から 48 時間後に、細胞を P B S P F A 1 % で固定し、mowiol 状態に取付けて、その後蛍光顕微鏡で観察した。トリプレックスを伴わないものベクターについて (H R . E G F P、上)、トリプレックスを伴うベクターについて (T R I P . E G F P、中) 又は非機能的で突然変異を受けたトリプレックス配列について (T R I P D . E G F P、下)、独立した 3 つのフィールドが示されている。右に示されているのは、H I V - 1 のレトロ転写酵素の阻害物質であるネビラピンの存在下での異なる形質導入である。

【図 4】 トリプレックスを伴う又は伴わない、H I V ベクターによる E G F P 遺伝子の形質導入率の定量化、

トリプレックスを伴う又は伴わない 2 ng の E G F P ベクター P 2 4 により形質導入された HeLa 細胞を、感染から 48 時間後にトリプシン処理する。E G F P の発現について陽性の細胞の百分率を、フラックス血球計算法によって計算する (F I T C チャンネル)。あらゆる場合において形質導入は、H I V - 1 のレトロ転写酵素の阻害物質であるネビラピンの存在下で阻害される。図 4 C においては、有糸分裂状態の細胞又は非有糸分裂細胞内の G F P (又はその他の問題の遺伝子) の形質導入によって刺激されたベクター内のトリプレックス D N A の存在が見られる。この形質導入は、トリプレックス配列無しのベクターで得られる結果との関係において 20 倍になっている (例えば Naldini et al, Science, 1996 参照)。

【図 5】 トリプレックスを伴うか又は伴わない H I V ベクターによる L a c Z 遺伝子の形質導入率の定量化。

形質導入に対するトリプレックスの影響は、L a c Z リポータ遺伝子を発現する異なるベクターによる、96 ウェルの平板で培養された HeLa 細胞の感染によって計算される。感染から 48 時間後に、培養平板を溶解させ、ベクターガラクトシダーゼ活性を、発光反応キット (Boehringer) に従って測定する。各々の形質導入は 2 ng の P 2 4 で標準化された接種材料を用いて、同一条件下で三回実施する。

10

20

30

40

50

上方パネル：増殖中の H e l a 細胞

下方パネル：アフィジコリンにより環状に遮断された H e l a 細胞。

L a c Z 遺伝子の形質導入は、トリプレックス配列無しのベクターと比べ、トリプレックス配列を含むベクターでは 6 倍となっている。

【図 6 a】 ラットの初代脊髄細胞内の E G F P 遺伝子の *ex vivo* 形質導入に対するトリプレックスの影響

ラットの脊髄の初代体外培養組織を、トリプレックスを伴う又は伴わない各々のベクターについて 3 0 0 ng の P 2 4 で感染させ、前述の場合と同様に蛍光顕微鏡で観察する。

【図 6 b】 ラットの初代脊髄細胞内の E G F P 遺伝子の *ex vivo* 形質導入に対するトリプレックスの影響

ラットの脊髄の初代体外培養組織を、トリプレックスを伴う又は伴わない各々のベクターについて 3 0 0 ng の P 2 4 で感染させ、前述の場合と同様に蛍光顕微鏡で観察する。

【図 7 a 1】 図 7：ラットの脳内のルシフェラーゼ遺伝子及び E G F P 遺伝子の *in vivo* 形質導入に対するトリプレックスの影響

図 7 a 1： 感染部位レベルでの形質導入

E G F P 遺伝子の導入は、5 0 ng の P 2 4 に対応する 2 0 マイクロリットルのベクターをラットの脳の線条体に直接注入することによって実施される。

蛍光顕微鏡での切片の観察は、トリプレックスの存在下での E G F P の多大な形質導入（左パネル）及び、トリプレックス不在でのきわめて低い形質導入（右パネル）を示している。

【図 7 a 2】 図 7：ラットの脳内のルシフェラーゼ遺伝子及び E G F P 遺伝子の *in vivo* 形質導入に対するトリプレックスの影響

図 7 a 2： 上述の実験を表わすもう 1 つの切片。

【図 7 b 1】 図 7：ラットの脳内のルシフェラーゼ遺伝子及び E G F P 遺伝子の *in vivo* 形質導入に対するトリプレックスの影響

脳内の *in vivo* での形質導入に対するトリプレックスの影響の定量化

図 7 b 1： *in vitro* での H e l a 細胞内のルシフェラーゼをコードする遺伝子の形質導入に対するトリプレックスの影響。グラフは、発光測定により定量化されたルシフェラーゼの産生を示す（Promega R キット）。ベクター内のトリプレックスの存在により、ルシフェラーゼの遺伝子の形質導入の 8 倍の増大を得ることができる。

【図 7 b 2】 図 7：ラットの脳内のルシフェラーゼ遺伝子及び E G F P 遺伝子の *in vivo* 形質導入に対するトリプレックスの影響

図 7 b 2： トリプレックスを伴うか又は伴わないルシフェラーゼをコードするベクターの注入後のラットの脳内のルシフェラーゼ活性の *in vivo* の定量化。トリプレックスの存在は、ルシフェラーゼの形質導入を 8 倍刺激する。

【図 7 b 3】 図 7：ラットの脳内のルシフェラーゼ遺伝子及び E G F P 遺伝子の *in vivo* 形質導入に対するトリプレックスの影響

図 7 b 3： マウスにおいて実施された、7 - b - 2 と同じ実験。

【図 8 A】 ベクター D N A の核移入速度の分析戦略

形質導入された細胞内でのベクター D N A のレトロ転写、核移入及び組込み又は環状化の反応速度を追跡できるようにする定量試験が完成された。この試験は有利にも、感染を受けた細胞の核内のウイルス D N A の核移入マーカーである L T R 2 個を有する環の P C R 増幅による検出に置換わるものである（Bukrinsky et al, Nature 1993, 365, p666-669）。組込まれていない線状ベクター D N A、1 個又は 2 個の L T R を有する環状 D N A 及び組込まれたベクター D N A は、サザンブロットにより検出され、次のとおり制限消化戦略に従って Phosphor imager で定量化される：すなわち形質導入された細胞の合計 D N A は、E c o N I 及び A v a l I（ベクターゲノム内の 2 つのユニーク部位）により消化され、次に、正確に E c o N I 部位にまたがる P C R によって生成された D N A プローブとハイブリッド形成させられる。このプローブは、異なるフラグメント、すなわち、全てのベクター D N A 形状に共通でありその Phosphor imager による定量化がレトロ転写されたベクタ

10

20

30

40

50

ーDNAの合計量を示す、0.77 kbの内部フラグメント、組込みされていない線状DNAの量を特異的に示す1.16 kbの遠位フラグメントと反応する。XhoI 酵素による補足的消化の後、1個又は2個のLTRをもつ環は、それぞれ1.4 kb及び2 kbで現われる。組込まれたベクターDNAの量は、組込まれていないベクターDNA、線状及び環状DNAに対応するシグナルを、レトロ転写された合計DNAに対応するシグナルから差し引くことによって計算される。核移入が無い場合、形質導入された細胞内のベクターDNAの予想上のプロフィールは、組込まれていない線状DNAの蓄積である。反対に、ベクター線状DNAが細胞の核区画にアクセスしたならば、その線状DNAの主要な部分は、細胞クロマチンの中に組込まれ、環状化される。

【図8B】 ベクターDNAの核移入速度の分析戦略

形質導入された細胞内でのベクターDNAのレトロ転写、核移入及び組込み又は環状化の反応速度を追跡できるようにする定量試験が完成された。この試験は有利にも、感染を受けた細胞の核内のウイルスDNAの核移入マーカーであるLTR2個を有する環のPCR増幅による検出に置換わるものである (Bukrinsky et al, Nature 1993, 365, p666-669)。組込まれていない線状ベクターDNA、1個又は2個のLTRを有する環状DNA及び組込まれたベクターDNAは、サザンプロットにより検出され、次のとおり制限消化戦略に従って Phosphor imagerで定量化される：すなわち形質導入された細胞の合計DNAは、EcoNI及びAvaII (ベクターゲノム内の2つのユニーク部位)により消化され、次に、正確にEcoNI部位にまたがるPCRによって生成されたDNAプローブとハイブリッド形成させられる。このプローブは、異なるフラグメント、すなわち、全てのベクターDNA形状に共通でありその Phosphor imager による定量化がレトロ転写されたベクターDNAの合計量を示す、0.77 kbの内部フラグメント、組込みされていない線状DNAの量を特異的に示す1.16 kbの遠位フラグメントと反応する。XhoI 酵素による補足的消化の後、1個又は2個のLTRをもつ環は、それぞれ1.4 kb及び2 kbで現われる。組込まれたベクターDNAの量は、組込まれていないベクターDNA、線状及び環状DNAに対応するシグナルを、レトロ転写された合計DNAに対応するシグナルから差し引くことによって計算される。核移入が無い場合、形質導入された細胞内のベクターDNAの予想上のプロフィールは、組込まれていない線状DNAの蓄積である。反対に、ベクター線状DNAが細胞の核区画にアクセスしたならば、その線状DNAの主要な部分は、細胞クロマチンの中に組込まれ、環状化される。

【図9a】 ベクターDNAの核移入率の分析。

HeLa細胞内で形質導入から48時間後のサザンプロットによる分析は、トリプレックスを伴わないベクターの場合 (HR - GFP) 又は非機能的で逆の配位のトリプレックス配列を含むベクターの場合 (TRIP、GFP inv) に標準的核移入の欠如を示している。これらのベクターの場合、組込まれていない線状DNAに対応するシグナルは合計DNAシグナルと等価であり、ベクターDNAの主要な部分が組込まれることなく線状の形にとどまっていることを表わしている。ベクターTRIP - GFPの場合、線状DNAに対応するシグナルの強度は、合計DNAシグナルよりもかなり低く、大きな割合のベクターDNAが核内に移入されそこに組込まれたことを表わしている。

【図9b】 トリプレックスを伴う (TRIP - GFP) か又はトリプレックス配列を伴わない (HR - GFP、TRIP inv - GFP) ベクターDNAの核移入率の反応速度論的分析。

【図9c】 形質導入された細胞内のベクターDNAの状態の定量化。

図9bに示されたサザンプロットの 蛍光画像装置での定量化は、形質導入から48時間後に、トリプレックスを伴わないベクターのDNAの大部分が、組込まれていない線状DNAの形をしており、ベクターDNAのほとんどが組込まれたり環状化されないことを示している。トリプレックスを伴わないベクター (HR - GFP及びTRIP inv - GFP) は、標準的な核移入の欠如を示す。逆に、ベクターTRIP - GFPの場合、DNAの60%以上が形質導入済み細胞のゲノムの中に組込まれ、組込まれていない線状DNAの形で存続するベクターDNAはほとんどない。ベクター内へのトリプレックス配列の導

10

20

30

40

50

入は、HR - GFPベクターの核移入の欠如を野生レベルまで補足した。実際、ベクターTRIP - GFPの場合に得られたベクターDNAのプロフィールは、野生型HIV - 1ウイルスのものに匹敵する。

この結果は、トリプレックス配列が、HR - GFP構成の中に欠如している核移入の唯一の決定因子であることを立証している。唯一ベクターDNAの組込まれた形態のみが活性である。

【図10】 ベクターpTRIP . EGFPの制限地図。

【図11A】 CAEV、EIAV、VISNA、SIV<sub>AGM</sub>、HIV - 2<sub>ROD</sub>、HIV - 1<sub>LAI</sub> ウイルスのcPPT及びCTS領域を含むポリヌクレオチド配列。

【図11B】 CAEV、EIAV、VISNA、SIV<sub>AGM</sub>、HIV - 2<sub>ROD</sub>、HIV - 1<sub>LAI</sub> ウイルスのcPPT及びCTS領域を含むポリヌクレオチド配列。

【図11C】 CAEV、EIAV、VISNA、SIV<sub>AGM</sub>、HIV - 2<sub>ROD</sub>、HIV - 1<sub>LAI</sub> ウイルスのcPPT及びCTS領域を含むポリヌクレオチド配列。

【図11D】 CAEV、EIAV、VISNA、SIV<sub>AGM</sub>、HIV - 2<sub>ROD</sub>、HIV - 1<sub>LAI</sub> ウイルスのcPPT及びCTS領域を含むポリヌクレオチド配列。

【図11E】 CAEV、EIAV、VISNA、SIV<sub>AGM</sub>、HIV - 2<sub>ROD</sub>、HIV - 1<sub>LAI</sub> ウイルスのcPPT及びCTS領域を含むポリヌクレオチド配列。

【図11F】 CAEV、EIAV、VISNA、SIV<sub>AGM</sub>、HIV - 2<sub>ROD</sub>、HIV - 1<sub>LAI</sub> ウイルスのcPPT及びCTS領域を含むポリヌクレオチド配列。

【図11G】 HIV1ウイルスのトリプレックスDNAの配列を表わす。シス型活性のある領域cPPT及びCTSは、境界が示され太い大文字で印刷されている。

【図11H】 一部のレンチウイルスにおけるcPPT及びPPT3配列の整列体を表わす。上部のラインは、LTR3の上流側の全てのレトロウイルスに存在する配列PPT3に対応する。下部ラインは、レンチウイルスにおけるcPPTと呼ばれるPPT配列の内部反復に対応する。

【図12】 有利な種類として、図15にその配列が記述されているエピトープで構成された黒色腫のCTLポリエピトープを有するトリプレックスベクターにより形質導入されたヒト樹状細胞からの*in vitro*でのCTLの産生を表わす。

これらの樹状細胞は、単核細胞(PBL0)と接触させられる。CTL活性は、対応する抗原ペプチドによる再刺激の後に測定される。

横座標軸上には、エフェクター細胞/標的細胞比が表わされている。

【図13】 ベクターTRIP、MEL - IRES - GFPでのマウスの免疫後の細胞障害性応答。

【図14】 ベクターpTRIP . MEL - IRES - GFPの制限地図。

ベクターpTRIP - MEL - IRES - GFPを含有するE. Coli菌株は1999年4月20日付でCNCMに寄託されており、受託番号I - 2185を有している。

【図15】 ベクターTRIP . MEL - IRES - GFPのポリエピトープ構成中に含まれる黒色腫に特異的なエピトープCTLs HLA A2 . 1の配列。

ポリエピトープの配列の下線強調は、各エピトープを個別化することを目的とするものである。

【図16A】 トリプレックスを有するHIVベクターによるCD34<sup>+</sup>株細胞のきわめて効率の高い形質導入。

TRIP - GFPベクターによるCD34<sup>+</sup>造血株細胞内のGFP遺伝子の形質導入のフラックス血球計算法FACSによる分析。TRIP - GFPベクターにより形質導入されたCD34<sup>+</sup>細胞の百分率は85%を上回る。この効率は、CD34<sup>+</sup>細胞内でトリプレックスを伴わないHIVベクター(HR - GFP)で以前に得られた形質導入率よりもはるかに高いものである。(Miyoshi H et al., Science 1999, 283, p682-6)。

【図16B】 トリプレックスを有するHIVベクターによるCD34<sup>+</sup>株細胞のきわめて効率の高い形質導入。

TRIP - GFPベクターによるCD34<sup>+</sup>造血株細胞内のGFP遺伝子の形質導入のフ

10

20

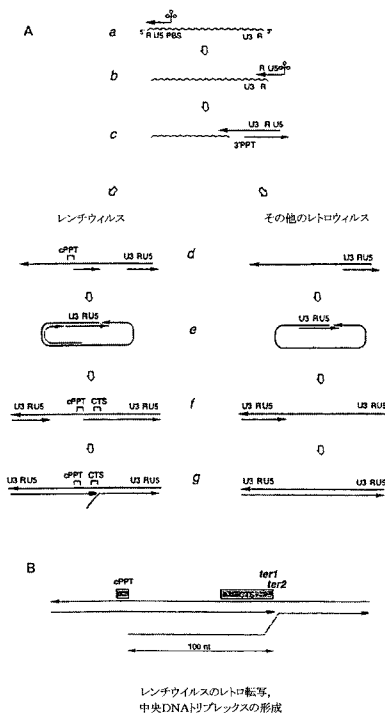
30

40

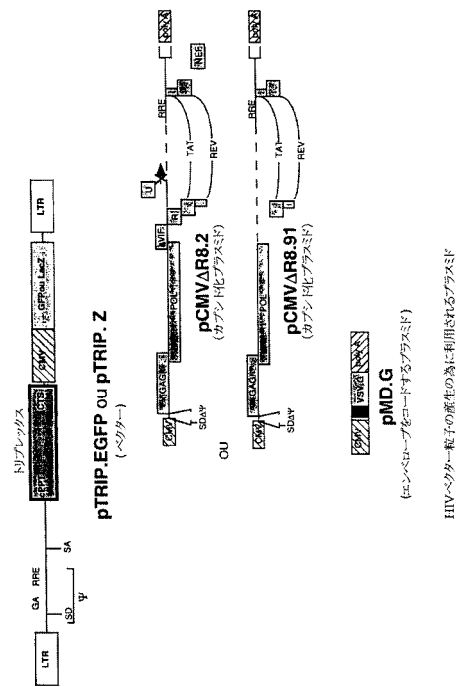
50

ラックス血球計算法 FACS による分析。TRIP - GFP ベクターにより形質導入された CD34<sup>+</sup> 細胞の百分率は 85% を上回る。この効率は、CD34<sup>+</sup> 細胞内でトリプレックスを伴わない HIV ベクター (HR - GFP) で以前に得られた形質導入率よりもはるかに高いものである。(Miyoshi H et al., Science 1999, 283, p682-6)。

【 図 1 】

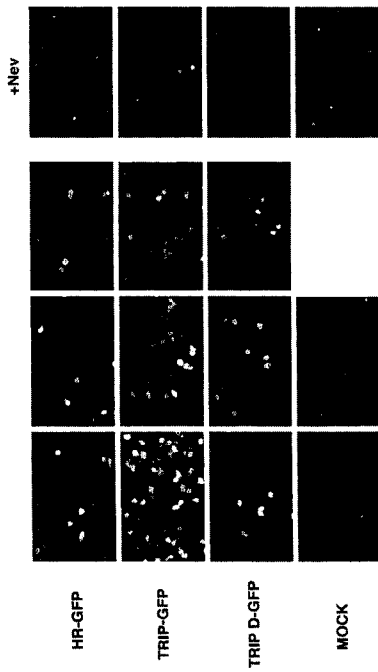


【 図 2 】



HIV ベクター粒子の産生の為にご利用されるプラズミド

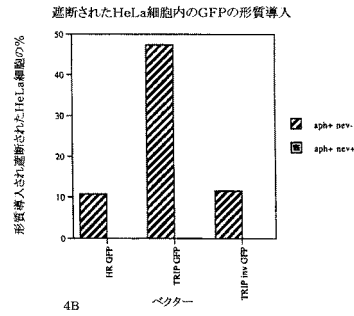
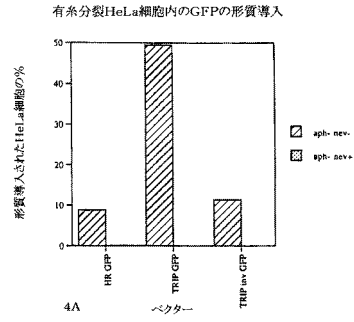
【 図 3 】



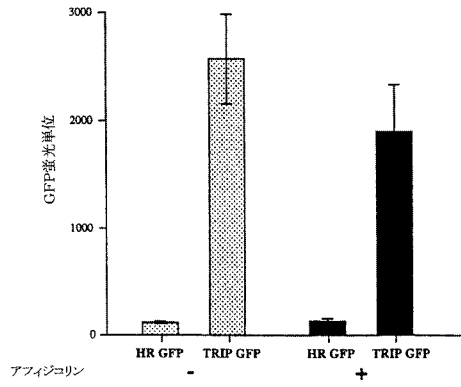
HeLa細胞内のEGFPの形質導入に対するトリプレックスの影響

【 図 4 】

トリプレックスを伴う又は伴わないHIVベクターによる遺伝子EGFPの形質導入率の定量化



GFPを伴う、分裂状態の又は分裂の無い状態のHeLa細胞の形質導入に対するトリプレックスの影響

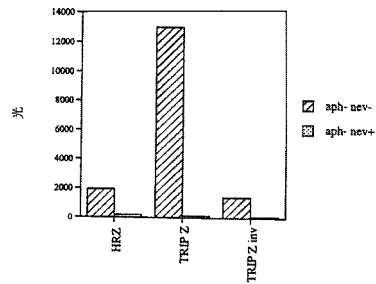


4C

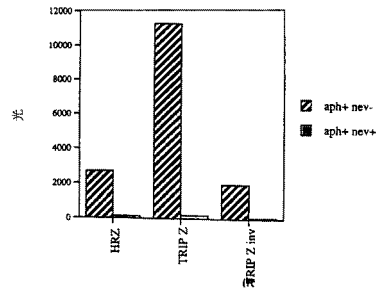
【 図 5 】

トリプレックスを伴う又は伴わないHIVベクターによるLacZ遺伝子の形質導入率の定量化

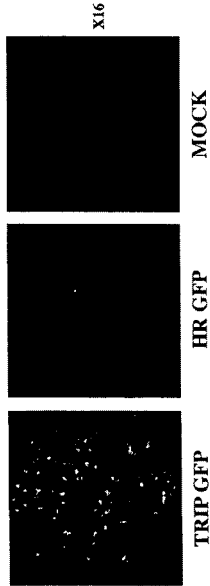
5A: 有糸分裂HeLa細胞内のβ galの形質導入



5B: 非有糸分裂HeLa細胞内のβ galの形質導入

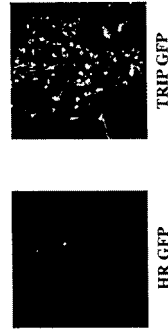


【 図 6 a 】



ラットの胎原幹細胞内のGFP遺伝子の形質導入に対する中央トリプレックスの影響

【 図 6 b 】



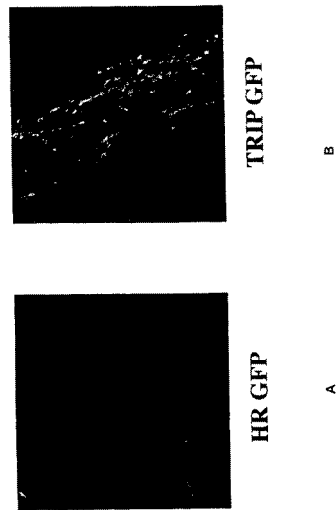
ラットの胎原幹細胞内のGFP遺伝子の形質導入に対する中央トリプレックスの影響

【 図 7 a 1 】



ラットの胎内のEGFP遺伝子の in vivo形質導入に対するトリプレックスの影響  
感状部位レベルでの形質導入

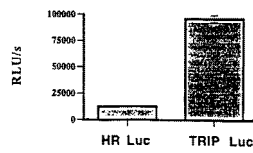
【 図 7 a 2 】



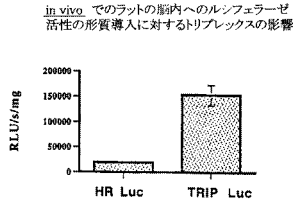
ラットの胎内のGFP遺伝子の in vivo形質導入に対するトリプレックスの影響

【 図 7 b 1 】

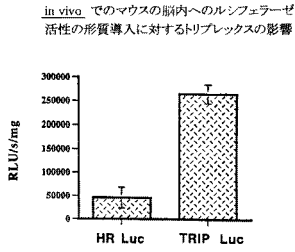
in vitroでのHeLa細胞内へのルンフェラーゼ  
活性の形質導入に対するトリプレックスの影響



【 図 7 b 2 】

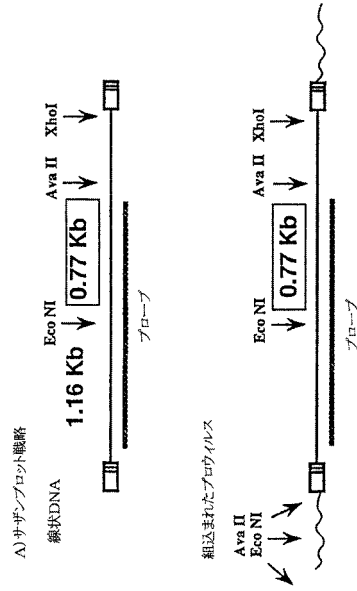


【 図 7 b 3 】

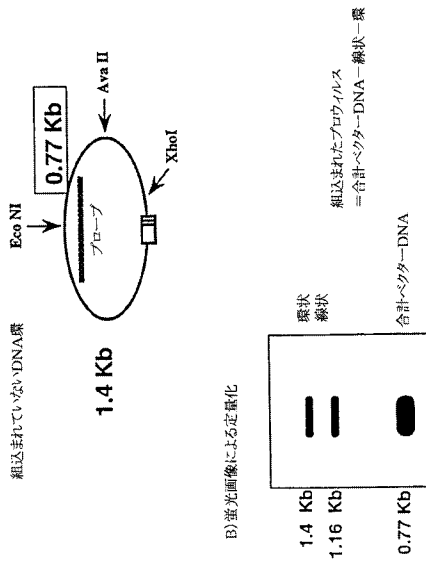


【 図 8 A 】

ベクター-DNAの成熟の定量分析用方法



【 図 8 B 】



【 図 9 a 】

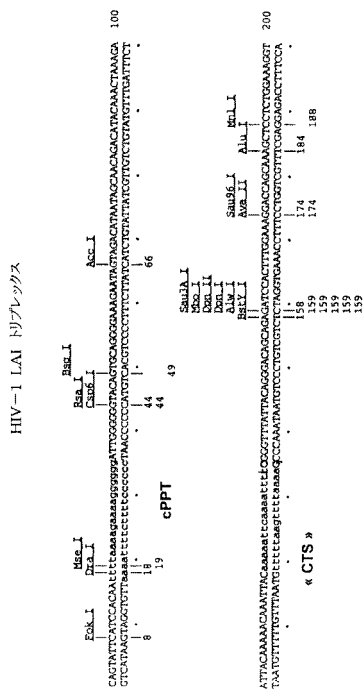


ベクター-DNAの各移入率の分析

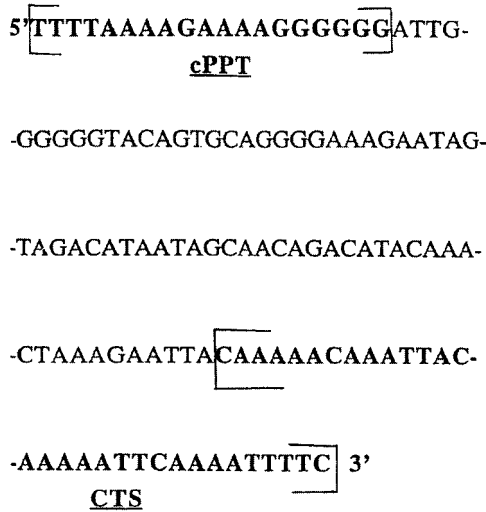




【 図 1 1 F 】



【 図 1 1 G 】



HIV-1 ウイルスのトリプレックスDNA領域

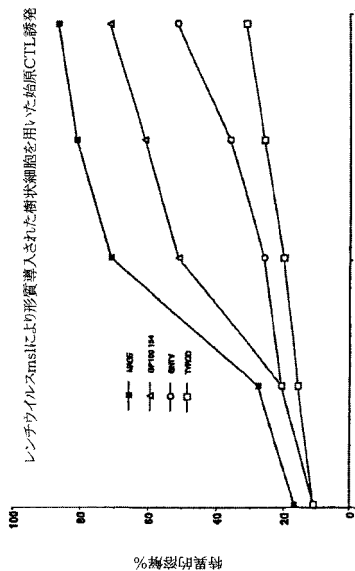
【 図 1 1 H 】

一部のレンチウイルスにおけるcPPT及びpPPT3'配列の整理図

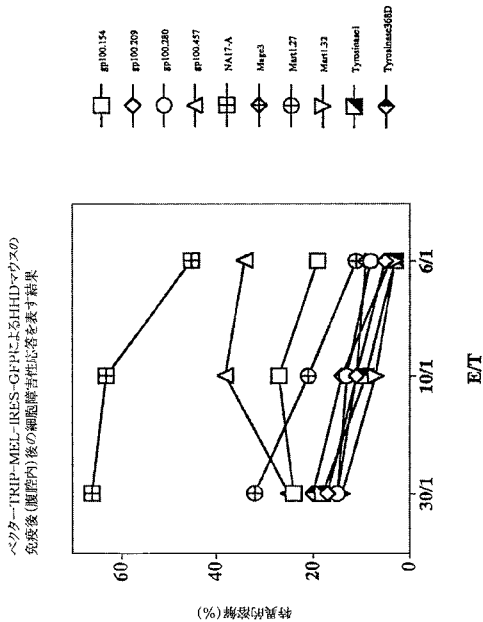
3' PPT	AAAAGAAAAGGGGGG	HIV-1
PPT 中央	*****	
	AAAACAAGGGGGG	HIV-2 <sub>ROO</sub>
	***G*****	
	AAAAGAAAAGGGGGG	SIV <sub>mac</sub> & HIV-2 <sub>HR2</sub>
	*****GG**A**A	
	AAAAGAAAAGGGAGG	SIV <sub>sgm</sub>
	*****G**AC**A	
	AAAAAGAAAAAGAAAGGGTGG	VISNA
	***T**T*****	
	AAAAATAAAAAAGAAAGGGTG	CAEV
	***T*****	
	AACAAGGGGGGAA	EIAV
	**AGG**A**A**	

【 図 1 2 】

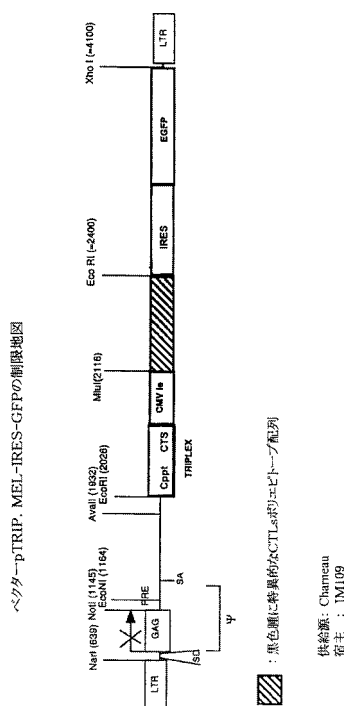
TRIP-MEL-IRE5-GFPベクターにより形質導入されたヒト樹状細胞を利用することによるCTL一次応答の誘発



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



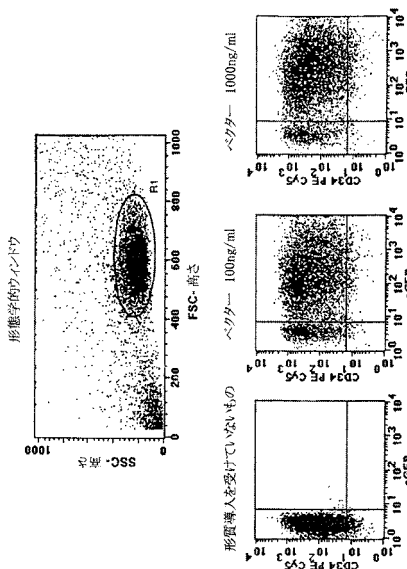
【 図 1 5 】

黒色腫ペプチド	配列	参考文献
gp100	154-162: KTWGQYWQV 209-217: ITDQVFSV 280-288: YLEPCFVTA 457-466: LLDGTATLR 27-35: AAGIGLTV 32-40: ILTVLGYL 1-9: MLLAVLYCL 368-376-D: YMDGTSQV n38-40: VLPVFRIC 271-279: FLWGFRLV	Kawakami, Y. et coll. J. Immunol. 1995. 154: 3961-8. Kawakami, Y. et coll. J. Immunol. 1995. 154: 3961-8. Cox, AL. Et coll. Science. 1994. 264: 716-9. Kawakami, Y. et coll. J. Immunol. 1995. 154: 3961-8. Kawakami, Y. et coll. J. Immunol. 1995. 154: 3961-8. Castelli, C. et coll. J. Exp. Med. 1998. 181: 363-8. Wojcik, T. et coll. Eur. J. Immunol. 1994. 24: 739-44. Moses, C.A. et coll. J. Exp. Med. 1998. 187: 37-48. Gullens, Y. et coll. J. Exp. Med. 1996. 183: 1173-83. van der Bruggen, P. et coll. Eur. J. Immunol. 1994. 24: 3038-43.

黒色腫抗原ペプチドのアミノ酸配列

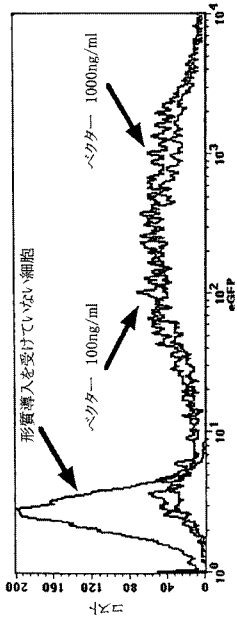
AAGIGLTVLEWGFRLVMLAVLYCLLDGTATLRKTWGQYWQVYMDGTSQVITDQVFSVYLEPCFVTAFLTVLGYLWLPVFRICV

【 図 1 6 A 】



トリプレックスを有する HIV-1ベクターによる  
CD34+株細胞のきわめて高率の形質導入  
形質導入後5日目の分析

【図16B】



トリプレックスを有する HIV-ベクターによる  
CD34+株細胞のきわめて効率の高い形質導入

形質導入後5日目の分析

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 14/16 (2006.01) C 0 7 K 14/16

(72)発明者 ゼンヌー, ヴェロニク  
フランス国、エフ - 7 5 0 0 3 パリ、リュ・グレネタ 4 8

(72)発明者 フィラ, ユゼイヤン  
フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 2 4 5

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第97/012622(WO, A1)  
Science, 1996年, Vol.272, p.263-267  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997年, Vol.94, p.79-84  
Journal of Molecular Biology, 1995年, Vol.253, p.291-303  
Nature Biotechnology, 1997年, Vol.15, No.9, p.871-875  
Journal of Molecular Biology, 1994年, Vol.241, p.651-662  
Journal of Virology, 1998年 1月, Vol.72, No.1, p.811-816

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N1/00-15/90  
C07K1/00-19/00  
C12P1/00-41/00  
C12Q1/00-1/68  
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
JSTPlus(JDreamII)  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq  
PubMed