

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4214239号
(P4214239)

(45) 発行日 平成21年1月28日(2009.1.28)

(24) 登録日 平成20年11月14日(2008.11.14)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/00

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 9 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願平10-523855
 (86) (22) 出願日 平成9年11月19日(1997.11.19)
 (65) 公表番号 特表2001-509009(P2001-509009A)
 (43) 公表日 平成13年7月10日(2001.7.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/021169
 (87) 国際公開番号 WO1998/022143
 (87) 国際公開日 平成10年5月28日(1998.5.28)
 審査請求日 平成16年6月8日(2004.6.8)
 (31) 優先権主張番号 60/031, 323
 (32) 優先日 平成8年11月19日(1996.11.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/037, 081
 (32) 優先日 平成9年2月4日(1997.2.4)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

ザ ユーナヴァーサティ オブ アラバマ
 アト バーミングハム リサーチ ファ
 ンデーション
 アメリカ合衆国 35294-0011
 アラバマ, バーミングハム, サウス 20
 ス ストリート 701

(74) 代理人

弁理士 五十嵐 和壽

(72) 発明者

キュリエル, デビッド ティ.
 アメリカ合衆国 35222 アラバマ,
 バーミングハム, リンウッド ドライブ
 824

審査官 山中 隆幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二機能性レトロウイルス／アデノウイルス系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

二機能性(chimeric)アデノウイルス／レトロウイルスベクターシステムであって、前記システムが下記(a)及び(b)：

(a) レトロウイルスの長末端反復(LTR)が両側に配置された異種遺伝子を含む第1の複製不全アデノウイルスベクター、及び

(b) 1つ又はそれ以上の第2の複製不全アデノウイルスベクターであって、前記第2の複製不全アデノウイルスベクターはレトロウイルス遺伝子gag、pol及びenvを一緒にコード化するものである、

を含んでいることを特徴とするベクターシステム。

【請求項 2】

第2の複製不全アデノウイルスベクターが、gag、pol及びenvをコード化するアデノウイルスベクター、gag及びpolをコード化するアデノウイルスベクター、及びenvをコード化するアデノウイルスベクターから構成されるグループから選択され、前記第2の複製不全アデノウイルスベクターがレトロウイルス遺伝子gag、pol及びenvと一緒にコード化することを特徴とする請求項1記載のベクターシステム。

【請求項 3】

env遺伝子が小水泡性口内炎ウイルスG-糖蛋白質である請求項1又は2記載のベクターシステム。

【請求項 4】

10

20

異種遺伝子が、治療用蛋白質をコード化する遺伝子、選択可能なマーカー及びレポータ遺伝子から構成されるグループから選択されることを特徴とする請求項1記載のベクターシステム。

【請求項5】

インビボで、心臓、肺、及び血液の疾患に関する柔組織細胞の遺伝子修正を達成するための二機能性アデノウイルス/レトロウイルスベクターシステムを含有する組成物であって、前記二機能性アデノウイルス/レトロウイルスベクターシステムが下記(a)及び(b)：

(a) レトロウイルスの長末端反復(LTR)が両側に配置された異種遺伝子を含む第1の複製不全アデノウイルスベクター、及び

(b) 1つ又はそれ以上の第2の複製不全アデノウイルスベクターであって、前記第2の複製不全アデノウイルスベクターはレトロウイルス遺伝子gag、pol及びenvを一緒にコード化するものである、

を含んでいることを特徴とする組成物。

【請求項6】

第2の複製不全アデノウイルスベクターが、gag、pol及びenvをコード化するアデノウイルスベクター、gag及びpolをコード化するアデノウイルスベクター、及びenvをコード化するアデノウイルスベクターから構成されるグループから選択されことを特徴とする請求項5記載の組成物。

【請求項7】

env遺伝子が小水泡性口内炎ウイルスG-糖蛋白質である請求項5又は6記載の組成物。

【請求項8】

異種遺伝子が、治療用蛋白質をコード化する遺伝子、選択可能なマーカー及びレポータ遺伝子から構成されるグループから選択されることを特徴とする請求項5記載の組成物。

【請求項9】

第1及び第2の複製不全アデノウイルスベクターが、宿主細胞に共形質導入され、そうすることによって、前記第1の複製不全アデノウイルスベクターによってコード化された治療用遺伝子を含むレトロウイルス粒子の産出をもたらし、前記レトロウイルス粒子が隣接細胞に感染し、前記治療用遺伝子を宿主細胞のゲノムDNA内に安定して統合させる請求項5～8のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

関連出願

本願は1996年11月19日出願の仮出願60/031,323及び1997年2月4日出願の仮出願60/037,081に基づくものである。

発明の分野

本願は一般的にはベクターの分子生物学及び遺伝子治療の分野に関するものである。より具体的には、本発明は二機能性アデノウイルス・ベクター系及びその利用法に関するものである。

関連技術の説明

心臓、肺、及び血液の疾患に対する多数の遺伝子治療は関連柔組織細胞の安定した遺伝子修正に基づいている。多くの場合、これはそれによって安定した形質導入が特定の箇所で達成される直接のイン・ビボ遺伝子伝達によってのみ達成することができる。この目的のために、種々のウイルス性ベクターが、安定した遺伝子性形質導入を達成するための手段としてその結合能力を向上させるために開発されている。このタイプのベクターとしては遺伝子組換えレトロウイルス及びアデノ関連ウイルス(AAV)などがあり、標的細胞の安定した遺伝子性修正を達成するためにイクス・ビボ遺伝子伝達方式によって用いられている。

これらのイクス・ビボ例でのレトロウイルス及びAAVベクターの利用性にも拘らず、直

10

20

30

40

50

接イン・ピボ遺伝子伝達のためにこれらのベクターを用いるにはいくつかの問題がある。これに関連して、有効な力価及びイン・ピボでの安定性という問題が柔組織の直接特定箇所形質導入が必要となる多くの方式のためのこれらのベクターの利用性に限られたものになっている。一方、遺伝子組換えアデノウイルス性ベクターは高力価に調製することが可能で、イン・ピボでの安定性を有しており、両方の要素とも種々の標的細胞に対する直接イン・ピボ遺伝子伝達のためにそれらを用いることを可能にしている。しかしながら、アデノウイルス性ベクターの制約は誘導される異種遺伝子表現が一過性に過ぎないことである。これは、部分的にはアデノウイルス性ベクターによって形質導入された細胞が免疫的に宿主によって根絶されてしまうという事実に基づいている。加えて、親のアデノウイルスがそのゲノムを宿主クロモソームに結合させる能力を有していない。

10

先行技術は直接のイン・ピボでのベクター投与後の安定した遺伝子による細胞の修正を可能にしてくれるような有効なベクター系を欠いている点で不十分である。本発明はこの技術分野における長年望まれていたニーズと望みに応えるものである。

発明の要約

イン・ピボでの標的細胞の効率的で安定した形質導入を行うことができる系を誘導するために、アデノウイルス性ベクターで、レトロウイルス性結合機能をつくりだすことができる。本発明はレトロウイルス性ベクターの組み込み及びレトロウイルス性ベクター機能がアデノウイルス性ベクター構成物の中で機能することができ、結合性の子孫レトロウイルス性ベクターをうまく誘導することを示すものである。この方式においては、標的細胞はアデノウイルス性ベクターが媒介するレトロウイルス性ベクター配列の伝達とレトロウイルス性組み込み機能のアデノウイルス性ベクター表現との組み合わせによる一過性レトロウイルス性『プロデュース細胞』として機能するように誘導される。このイン・ピボ状況では、レトロウイルス組み込み及びベクター機能の高効率な伝達は本来の場所でこれを達成するアデノウイルス性ベクターを介して柔組織個所で達成されるであろう。従って、その場所で行きわたるレトロウイルス性ベクターは隣接細胞には二次的な影響を及ぼすだけで暗転した遺伝子形質導入を達成することができるであろう。従って、各成分ベクターの好ましい性質をつくりだす『二機能性 (chimeric)』ベクター系が開発されたのである。

20

本発明の目的はレトロウイルス性結合機能を含むアデノウイルス性ベクターを開発して、標的細胞の安定した形質導入のためにイン・ピボでのその利用を最適化することである。

30

本発明の他の目的はこれらの二機能性ベクターを用いて心臓、肺、及び血液の疾患に関連した柔組織細胞の安定したイン・ピボでの遺伝子修正を行うことである。

結合能力を有するアデノウイルス性ベクターの開発はこれらのベクターがイン・ピボで導入遺伝子の安定した結合を可能にしてくれるであろう。こうした戦略は、従って、柔組織標的個所での安定した遺伝子表現を可能にする上で好ましい特性をつくりだし、心臓、肺及び血液の病気のための遺伝子治療に応用する上で効果的な遺伝子補正を行う可能性を大幅に改善してくれるであろう。

本発明のひとつの実施の形態においては、レトロウイルス性配列を含む少なくとも1つのアデノウイルス性ベクターで構成される二機能性のアデノウイルス性/レトロウイルス性ベクターが提供される。

40

本発明のひとつの実施の形態においては、本発明による上記の二機能性のアデノウイルス性/レトロウイルス性ベクターをそうした治療を必要とする個人に投与するステップを含む標的細胞に安定して形質導入する方法が提供される。

本発明の他の、そしてさらなる側面、特徴、及び利点は開示の目的で提供される本発明の現段階で好ましい実施の形態についての以下の説明を参照することで明らかになるであろう。

図面の説明

上に述べた、およびこれから明らかになる本発明の特徴、利点、及び目的を詳細に理解できるように、上に要約して述べた発明について、添付図面に示すそのいくつかの実施の形

50

態を参照して、以下に具体的に説明する。これらの図面は明細書の一部を構成する。なお、添付図面は本発明の好ましい実施の形態を示すものであって、その範囲を限定することは意図していない。

図1は標的器官個所でのレトロウイルス性ベクターの局所的発生の図を示している。レトロウイルス性ベクター及び組み込み機能をコード表現するアデノウイルス性ベクターは標的柔組織細胞に対するイン・ピボでの遺伝子伝達を高効率で達成して、それらを一過性のレトロウイルス性プロデューサ細胞にしてしまう。局所的につくりだされるレトロウイルス性粒子は従って隣接細胞に直接影響を及ぼす場合がある。

図2Aはレトロウイルス性組み込み機能を含むアデノウイルス性シャトル・プラスミドのマップを示し、図2Bはレトロウイルス性ベクター機能を含むアデノウイルス性シャトル・プラスミドのマップを示す。

10

図3は分子分析を介してのアデノウイルス性ベクターの構造的検証を示す。

図4はイン・ピボでの標的細胞増殖を誘発するためのHGF及びKGFをコード表現する構成化アデノウイルス性ベクターのマップを示す。

図5は上記アデノウイルス性/レトロウイルス性の二機能性ベクター系を介して達成された持続性のある遺伝子表現を示す。標的細胞はAdLNCMVGF P + AdCMVmpgあるいはAdLNCMVGF Pだけで感染されて、安定した遺伝子性形質導入が行われたかどうかについての分析が行われた。W162細胞におけるGF P表現はアデノウイルス性ベクターの感染後示されている時点で蛍光顕微鏡で分析された。

図6は、持続性のある遺伝子表現を示している。標的細胞はAdLNCMVGF P + AdCMVmpgあるいはAdLNCMVGF Pだけで感染されて、安定した遺伝子性形質導入が行われたかどうかについての分析が行われた。図6Aは感染後の示された時点でのW162細胞におけるGF P表現のFAS C分析を示している。図6Bは感染後30日目に取り出されたW162細胞から抽出されたゲノム性DNAの分析を示している。細胞のHMWDNAをMunIで消化して、レトロウイルス性ベクター部分でプローブした。レーン1のDNAはAdLNCMVGF P + AdCMVmpgで感染した細胞から取り出したもので、レーン2のDNAはAdLNCMVGF Pだけで感染された細胞から抽出されたものであり、そしてレーン3はMunIで消化したAdLNCMVGF Pゲノム性DNAを含む比較例である。

20

図7はアデノウイルス/レトロウイルス二機能性ベクターを介しての形質導入レトロウイルス粒子の誘導を示している。図に示されている細胞はAdLNCMVGF Pだけか、あるいはAdLNCMVGF P + AdCMVmpgで処理され、上澄液をNIH-3T3細胞上に滴下してレトロウイルス性ベクターについて調べた。上澄液を処理した細胞は蛍光顕微鏡で20日目に分析した。

30

図8はアデノウイルス/レトロウイルス二機能性ベクターを介してのイン・ピボでの遺伝子伝達を示している。SKOV3_{ip1}細胞を腹膜内に移植した。図8Aはヘマトサイクリンで染色した腹膜内腫瘍塊である。供試動物は図8Bに示すようにAdLNCMVGF Pだけか、あるいは(図8Cに示すように)AdLNCMVGF PとAdCMVmpgで刺激を与えて、16日目にGF Pが表現されているかどうかを蛍光顕微鏡で分析した。

図9はアデノウイルス/レトロウイルス二機能性ベクターを介してのイン・ピボ遺伝子伝達を示している。SKOV3_{ip1}細胞をAdLNCMVGF P(図9B)又はAdLNCMVGF P + AdCMVmpg(図9C)で感染させて、バージン腫瘍細胞と混合し、ヌード・マウスの皮下に移植した。20日目に、腫瘍を取り出して、蛍光顕微鏡で分析した。(図9A)ヘマトサイクリンで染色された部分を2つのウイルス皮下塊から取り出した。SKOV3_{ip1}を腹膜内に移植して、動物にAdLNCMVGF Pだけか(図9E)、あるいはAdLNCMVGF P + AdCMVmpg(図9F)で刺激を与えた。16日目にGF Pの表現があるかどうかを蛍光顕微鏡で分析した。(図9D)ヘマトサイクリンで染色した腹膜内腫瘍塊。

40

発明の詳細な説明

本発明は血管投与後に効率的にイン・ピボ遺伝子伝達を行うと同時に異種遺伝子配列を結

50

合して、形質導入後の安定した細胞の遺伝子的修正を行う能力を有するベクター系に関するものである。本発明の二機能性ベクターにおいては、細胞内にレトロウイルス性粒子を局所的に、本来の場所で作くりだす目的で、レトロウイルス性機能を伝達するためにアデノウイルス性ベクターが用いられる。これはレトロウイルス性『組み込み』機能（レトロウイルス性遺伝子 *gag*, *pol*, *env*）かレトロウイルス性『ベクター』機能（『治療用』遺伝子を側鎖しているレトロウイルス性LTR配列）のいずれかを含んでいる複製不全アデノウイルス性・ベクターの構成によって達成される。これらのアデノウイルス性ベクターは血管を通じてのベクター投与後に効率的なイン・ビボ形質導入を達成することが知られているアデノウイルス性ベクターの能力に基づいて非常に効率的に細胞に対して遺伝子生成物を共伝達することができる。

10

これらのアデノウイルス性ベクターによって形質導入された肝臓細胞などの細胞は、その後、一過性のレトロウイルス性ベクター『プロデューサ細胞』にされる。これらの細胞はレトロウイルス性ベクターの機能を一過性的に表現する。従って、これらの細胞は治療用遺伝子を含んだレトロウイルス性粒子を作くりだすことができる。レトロウイルス性粒子の『局所的』で本来の場所での産出のおかげで、この作くりだされたレトロウイルス性粒子によって、隣接細胞の効率的な形質導入が達成される。従ってこうした方法は『遠位』血管投与に伴って起きるレトロウイルス性ベクターの損失を克服することができる。加えて、形質導入された『隣接』細胞はレトロウイルス性ベクターが形質導入を行うという事実のせいで、安定して修正される。この方法は、従って結合による形質導入イベントを可能にすることによってアデノウイルス性ベクターの重要な限界性を克服するものでもある。

20

この二機能性ウイルス・ベクター系の1つのユニークな特性は、有効な、本来の場所でのレトロウイルス性形質導入を達成するためのアデノウイルス性ベクター伝達要素を作くりだす点である。こうした考え方は『局所的に』作くりだされたレトロウイルス性ベクターに対して細胞をさらに敏感にしてしまう可能性のある他の遺伝子の伝達にも拡張して適用することができる。

本発明は、レトロウイルス性配列を含む少なくとも1つのアデノウイルス性ベクターで構成される二機能性アデノウイルス性／レトロウイルス性ベクターに関するものである。好ましくは、この二機能性アデノウイルス性／レトロウイルス性ベクターは、(a)レトロウイルス性ベクター機能を含む複製不全アデノウイルス性ベクターと、そして(b)少なくとも1つのレトロウイルス性組み込み機能を含む複製不全アデノウイルス性ベクターとを含んでいる。好ましくは、このレトロウイルス性ベクター機能は異種遺伝子を含んでおり、そうした遺伝子がレトロウイルスの長い末端反復によって側鎖されている。一般的に、このレトロウイルス性組み込み機能は *gag*, *pol* 及び *env*、あるいはそれらの組み合わせで構成されるグループから選択される。当業者であれば、ひとつの細胞により具体的に狙いをつけるために別の *env* 遺伝子を用いることができることは容易に分かるであろう。例えば、以下に詳細に述べるような小水泡性口内炎ウイルスG-糖蛋白は利用が可能な *env* 遺伝子である。好ましくは、異種遺伝子は治療用蛋白質をコード表現する遺伝子、選択可能なマーカー、そしてレポータ遺伝子で構成されるグループから選択される。当業者であれば、そうした蛋白質を置換したり、あるいは特定の生化学活性を増強したり抑制するために、例えば治療用蛋白質などの蛋白質をコード表現するいろいろな遺伝子を用いることができよう。

30

40

本発明はまた、そうした治療を必要とする個人に対して本発明による二機能性アデノウイルス性／レトロウイルス性ベクターを投与するステップを含む標的細胞を安定して形質導入する方法にも関連している。好ましくは、この二機能性アデノウイルス性／レトロウイルス性ベクターは、(a)レトロウイルス性ベクター機能を含む複製不全アデノウイルス性ベクターと、そして(b)少なくとも1つのレトロウイルス性組み込み機能を含む複製不全アデノウイルス性ベクターとを含んでいる。好ましくは、レトロウイルス性ベクター機能は異種遺伝子を含んでおり、そうした遺伝子はレトロウイルス性の長い末端反復によって側鎖されている。一般的に、レトロウイルス性組み込み機能は *gag*, *pol* 及び *e*

50

n vあるいはそれらの組み合わせで構成されるグループから選択される。当業者であれば、ひとつの細胞により具体的に狙いをつけるために別のe n v遺伝子を用いることができることは容易に分かるであろう。例えば、以下に詳細に述べるような小水泡性口内炎ウイルスG - 糖蛋白は利用が可能なe n v遺伝子である。好ましくは、異種遺伝子は治療用蛋白質をコード表現する遺伝子、選択可能なマーカー、そしてレポータ遺伝子で構成されるグループから選択される。当業者であれば、そうした蛋白質を置換したり、あるいは特定の生化学活性を増強したり抑制するために、例えば治療用蛋白質などの蛋白質をコード表現するいろいろな遺伝子を用いることができよう。以下に述べるような方法を用いて、レトロウイルス性ベクター機能を含む複製不全アデノウイルス性ベクターを投与することができ、そうしたレトロウイルス性組み込み機能を含む複製不全アデノウイルス性ベクターは宿主細胞内に形質導入されて、その内部でそうしたアデノウイルス・シャトル・ベクターによってコード表現された遺伝子の表現は上に述べた治療用遺伝子を含むレトロウイルス性粒子の産出をもたらし、さらにそのレトロウイルス性粒子は隣接細胞に感染し、その内部でレトロウイルス性粒子は上記宿主細胞のゲノム性DNA内にその治療遺伝子を結合させる。

10

当業者であれば種々の操作によって本発明による二機能性アデノウイルス性ノレトロウイルス性ベクターを標的により特殊的に向かわせることができることは分かるであろう。例えば、細胞表面受容体を個別的に認識するリガンドを組み込むことによって、アデノウイルス性ベクターの繊維あるいはノブ成分を遺伝子的に修正することができる。また、この技術分野で知られているFabフラグメントの単鎖抗体を用いて免疫的にアデノウイルスを標的に向かわせることも可能であろう。

20

以下の実施例は本発明の種々の実施の形態を示すために提供されるものであって、いかなる意味でも本発明を限定することは意図していない。

実施例 1

標的細胞の安定した形質導入のための、レトロウイルス性結合機能を含んだアデノウイルス性ベクターの利用

効率的なイン・ピボ遺伝子伝達の結果としての長期にわたる異種遺伝子表現を達成するために、レトロウイルスの結合特性をアデノウイルス性ベクター系に結合することができる。これは、複製不全アデノウイルス性ベクターを用いて細胞にその場所でレトロウイルスの組み込み機能としてレトロウイルス性ベクター配列の両方を伝達することによって行うことができる。そうすると、共形質導入された細胞はレトロウイルス性プロデュース細胞として機能する。こうした方式においては、局所的につくりだされるレトロウイルス性粒子がそれを取り囲んでいる柔組織内の『隣接細胞』を安定して形質導入し、従って、遺伝子治療のために関連標的器官の導入遺伝子配列の効率的な統合を達成する。アデノウイルス性ベクターが標的遺伝子の効率的な形質導入のための適切なレトロウイルス性機能を伝達してレトロウイルス性プロデュース細胞として機能する能力が示されている。

30

実施例 2

プラスミド・ベクター及び細胞

アデノウイルスノレトロウイルス・キメラをつくりだすために、レトロウイルスのゲノム成分の個々の要素を最初にpCA Amp g及びpΔE1 LNC Xと命名されている2つの別のアデノウイルス性シャトル・ベクターに組み込んだ。シャトル・ベクターはレポータ遺伝子も含むようにつくられ、pΔE1 LNC MV GF Pとなったが、これは緑色蛍光蛋白質(GFP) cDNAとエスケリチア・コリβ - ガラクトシダーゼ(LacZ)をコード表現するpΔE1 LNC MV LacZをコード表現する。

40

pCA Amp gの場合、レトロウイルス性gag/polと両性env遺伝子をコード表現するDNAフラグメントをpPAM3 (Dusty A. Miller博士、Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA提供)から、以下のような二段階手順で単離した。つまり、gag/pol転写開始箇所を含む133bp PCRフラグメントを、HindIIIサイトを含む上流プライマ、5' - gggaagccttatgggccagacctgttaccac (SEQ ID No. 1)と、内部PstIサイトにまたがる下流プライマー、5'

50

- c a a g g c t t c c c a g g t c a c g a t g t a g g (S E Q I D N o . 2)
を用いて p P A M 3 から増幅した。このフラグメントを HindIII と Pst I とを用いて消化
してからクローニングを行った。残りの 7.0kb の g a g / p o l / e n v セグメントは Pst
I - Hpa I 消化によって p P A M 3 から得た。これら 2 つのレトロウイルス性フラグメン
トを HindIII - EcoR V サイトでアデノウイルス性シャトル・ベクター p C A 13 (Micro
bix Biosystems Inc., Ontario, Canada) に三重結紮させて、 p c A A m p g ベクター (1
3.9kb) を得た。

レトロウイルス性統合配列、ネオマイシン抵抗性 c D N A、C M V プロモータ、及び多重
クローニング・サイトを含んだアデノウイルス性シャトル・ベクターを構成するために、
レトロウイルス性ベクター p L N C X (A. Dusty Miller 博士提供) を EcoR I と HindIII
I サイトで部分的に消化して、3.6kb フラグメントを得た。このフラグメントをその後、p
Z e r o - 1 TM (Invitrogen, La Jolla, CA, USA) の修正版にサブクローンしたところ、
EcoR V サイトと Not I サイトの間に沈黙突然変異によって ClaI サイトが導入された。
得られた構成物は p E H 3.6 と標識された。残りのレトロウイルス性ベクター配列は Apa I
及び HindIII 消化で得、得られたフラグメントを HindIII 及び EcoR V サイトでサブクロ
ーンして p H A 0.9 を得た。p E H 3.6 からのこの 3.6kb の ClaI - HindIII フラグメントと p
H A 0.9 からの 1.0kb の HindIII - Xho I フラグメントを ClaI 及び Xho I サイトで p Δ E
1 S P 1 A (Microbix, Biosystems Inc.) に三重結紮して p Δ E 1 L N C X をつくった。
0.9kb の G F P c D N A セグメントを HindIII - Hpa I 消化で p E G F P - N I (Clont
ech Inc., Palo Alto, CA, USA) から切り出して、HindIII 及び Hpa I サイトで p Δ E 1
L N C X にサブクローンした。p Δ E 1 L N C X から p Δ E 1 L N C M V L a c Z を構成
するために同様の方式を用いた。制限酵素分析によってシャトル・ベクター、p C A A m
p g , p Δ E 1 L N C X , p Δ E 1 L N C M V G F P , p Δ E 1 L N C M V L a c Z が確
認され、U S B 70770 配列キット (Amersham, Cleveland, Ohio, USA) を用いて部分的に
配列決定を行った。

N I H - 3 T 3 線維芽腫、293 細胞、E J 膀胱癌細胞 (A T C C , Rockville, Maryland)
、W162 (Gary Ketner, Princeton University) 及び S K O V 3 _{ip1} 細胞 (Janct Price 博
士、M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX) を、10% 仔ウシ血清 (F B S、Hyclo
ne; Logan, UT)、2 mM グルタミン (Mediatech)、及びペニシリン / ストレプトマイシン
(Cellgro Mediatech) で補強したダルベッコの修正イーグル Medium / Ham ' s F 12 (D M
E M / F 12、Mediatech, Inc.; Washington, D. c) で構成された完全培養液内に保持した
。すべての細胞は 5 % C O ₂ 下で 37 ° の温度で保持された。

実施例 3

遺伝子組換えアデノウイルス性ベクターの生成

イン・ビトロ同種遺伝子組換え法によって E 1 A / B 及び E 3 消去複製不全遺伝子組換え
アデノウイルス性ベクターを生成させた。これらの研究で、p C A A m p g , p Δ E 1 L
N C M V L a c Z あるいは p Δ E 1 L N C M V G F P シャトル・プラスミドを p B G H 11
(Microbix Biosystems Inc.) と共に 293 細胞内に共感染させてそれぞれ A d C M V A m
p g , A d L N C M V L a c Z あるいは A d L N C M V G F P をつくりだした。各アデノ
ウイルスをブランク精製を三回通過させて、その後、P C R 分析及び制限酵素マッピング
で確認した。遺伝子組換えアデノウイルスを許容 293 細胞株上で増殖させて、C s C l 勾
配遠心分離で二度精製して、標準的な方法でブランク滴定した。

実施例 4

レトロウイルス性粒子の生成と検出

細胞を 10% F B S を含む完全培養液内で 100 - mm 組織培養プレートに置いて (1 0 ⁶ 細胞 /
プレート)、5 % C O ₂ 下で 37 ° の温度で一昼夜培養した。プラスミド構成物を最初にテ
ストするために、293 細胞を p Δ E 1 L N C M C L a c Z + p C A A m p g か、あるいは
p L N C X 及び p P A M 3 のいずれかを用いて燐酸カルシウム沈殿によってトランスフェ
クトさせた。翌日、細胞に新鮮な完全培養液を与えた。トランスフェクションから 48 時間
後に、上澄液を取り出して、N I H - 3 T 3 細胞上でレトロウイルスの力価を判定するた

10

20

30

40

50

めに用いた。アデノウイルス感染を行うために、培養液を抜き取って、D M E M / F 12 + A d C M V A m p と A d L N C M V G F P、あるいは A d L N C M V G F P だけを含んだ 2 % F B S で、各グループあたり 50 プラーク形成単位 (p f u) / 細胞の割合で置換した。3 時間培養した後、培養液を抜き取って、細胞を P B S で数回洗浄してから、完全培養液を与えた。感染 48 時間後に上澄液を滴下することによって直接的に、あるいはレトロウイルス感染に関して隣接細胞を観察することで間接的に判定した。安定した統合を行わせるための長期培養は 8 日間の間隔をおいて行われた。レトロウイルスの滴定は N I H - 3 T 3 細胞上で行われた。この分析のために、レトロウイルスプロデュース細胞からの培養上澄液を取り出して、ろ過し (0.45 μ m)、受容細胞に 1 : 1 の割合で完全培養液 + 10mg / ml ポリブレンに加えた。48 時間後、L a c Z を表現している細胞を X - g a l 組織化学で視覚化し、総青色細胞 / 皿の定量で力価を判定した。力価は、感染性グリオン / m l として表した。

10

実施例 5

L a c Z , G F P 及び複製可能レトロウイルス (R C R) アッセイ

L a c Z の細胞表現について X - g a l (5 - プロモ - 4 - コロル - 3 - インドリリル - β - D - ガラクトシド) で染色して定量分析を行った。細胞を 0.25 % グルタルアルデヒド / 0.1 M リン酸ナトリウムで 15 分間室温で固定してから、P B S で洗浄して、X - g a l 染色溶液 (0.2 % X - g a l / 2 m M M g C l ₂ / 4 m M K ₄ F e (C N) ₆ / 4 m M K ₄ F e (C N) ₆ 3 H ₂ O を P B S に溶解したもの) で室温で一昼夜培養した。X - g a l 陽性 (青色) の細胞を光学顕微鏡で数えた。細胞の G F P 表現 F A C S 分析及びメーカー (Clontech, CA, USA) の指示する手順で蛍光顕微鏡を用いて視覚化することで定量的に分析した。

20

フェリン S ⁺ L ⁻ (P G - 4) 細胞を M c C o y の 5 A 培養液 (BioWhittaker, Walkersville, MD) + 15 % F B S 内に蒔種し、60mm 培養皿で約 24 時間培養してから接種した。5 つの複製皿にサンプル希釈液を 0.2ml ずつ入れ、ポジティブ・コントロールとして両性ネズミ・レトロウイルス 4070 A を 1 及び 10 核形成単位として用い、そして培養液はネガティブ・コントロールとして機能した。36 $\pm$ 2 で 2 時間吸収させ、新鮮な培養液を加えた後、必要に応じて 4 - 5 日培養すると、形質変換された細胞の核がポジティブ・コントロールの皿には十分に形成された。これらの皿を顕微鏡で調べて、核を数えた。ネガティブ・コントロールに核が観察されず、ポジティブ・コントロール希釈液がポジティブ・コントロール・ウイルス・ロットの有効平均力価の 1 ログ以内で平均力価を持っている場合に、アッセイは有効と考えられた。

30

実施例 6

イン・ビボ実験及びプロウイルス統合

雌のヌード・マウス (生後 4 - 6 週間) に 1 $\times$ 10⁷ S K O V 3_{i p l} 細胞の割合で腹膜接種した。5 日後、供試動物に A d C M V A m p g + A d L N C M V G F P か、あるいは A d L N C M V G F P だけを腹膜内接種した (各ウイルスあたりネズミー匹につき 1 $\times$ 10⁹)。動物はアデノウイルス接種から 16 日目に致死させた。腫瘍結節を取り出して、4 % パラホルムアルデヒド / P B S 内で固定して、分解し、蛍光顕微鏡で分析した。皮下での混合を調べるために、S K O V 3_{i p l} 細胞を細胞 1 個あたり 50 p f u の割合でイクス・ビボで感染させた。感染から 16 時間後に、細胞を P B S で二度洗浄してから、トリプシン化し、取り出して、数え、そして感染していない S K O V 3_{i p l} 細胞と 1 : 4 の割合で混合した。全部で 5 $\times$ 10⁶ の混合細胞がヌード・マウスのわき腹に皮下接種された。動物は接種後 20 日目に致死された。腫瘍結節を取り出して蛍光顕微鏡で分析した。

40

プロウイルス統合を検出するために、アデノウイルスで処理した細胞から高分子量画分 D N A を取り出した。この D N A を M u n I で消化して、0.8 % アガロース・ゲルに溶解し、4.8 kb から 6.2 kb の A d L N C M V G F P の P C R 増幅によって得たレトロウイルス性ベクター配列を含む³² P でラベルした 1.4 kb フラグメントでプローブした。メーカー (Amersham) の決めた手順に従って、D N A ラベリング、薄膜透過、交雑、そして洗浄手順を行った。

実施例 7

50

隣接細胞を安定して形質導入するための柔組織標的部位でのレトロウイルス粒子の作成

本発明は遺伝子組換えアデノウイルス性ベクターの高効率イン・ビボ遺伝子伝達とレトロウイルスから誘導される結合能力とを合わせ持った『複合』ベクター系を開発した。これはアデノウイルス性ベクターに感染された標的細胞をアデノウイルス性ベクターに媒介されたレトロウイルスの組み込み機能とレトロウイルス・ベクター配列の伝達を介して一過性の『レトロウイルス・プロデューサ細胞』内に送り込むことによって達成される。こうした方法で、局所的につくりだされたレトロウイルス性ベクターは結合性ベクターを介して隣接柔組織細胞に感染することができる。こうした方式の概念的基礎を図1に示す。

こうした方式を実施するための最初のステップとして、レトロウイルス性ベクター配列とレトロウイルス性組み込み機能をコード表現するアデノウイルス性ベクターを誘導した。これらのアデノウイルス性ベクターの誘導は、その導入遺伝子を含んだアデノウイルス『シャトル』ベクターをアデノウイルス性組み込みプラスミド pJM17 と共感染させる方法に基づいている。これらのプラスミド内部の同種領域の遺伝子組換えによって複製不全、EIA/B 消去、アデノウイルス性ベクターがもたらされる。アデノウイルス・シャトル・プラスミドはアデノウイルス性ベクターの組み込み特性を有している無傷の表現カセットを含んでいるので、それらはアプリアリな導入遺伝子配列の機能的有用性検証を行うための手段を提供してくれる。こうした考え方に基づいて、適切なレトロウイルス性導入遺伝子配列を含んだ一連のアデノウイルス性シャトル・ベクターが誘導された。このようにして、アデノウイルス性シャトル・ベクター pCA13 (図2) のポリリンカーにクローンされたレトロウイルス性機能 gag/pol/env, gag/pol あるいは env を有する一連のプラスミドが誘導された。

これらのベクターは従って CMV 中間/初期エンハンサー・プロモータを介してレトロウイルス性組み込み機能の表現を可能にしてくれるであろう。加えて、レトロウイルス性ベクター配列をコード表現するアデノウイルス性シャトル・プラスミドが誘導された。この例では、その表現されたアデノウイルス性ベクターはコード表現された導入遺伝子配列の高効率伝達媒体としての機能を果たすであろう。これらのレトロウイルス性ベクター配列はの場合レトロウイルス性粒子内に組み込まれ、そのプロセスには標的細胞内でのベクター表現は必要とされないであろう。従って、これらの例においては、ネオマイシン選択可能マーカーと組み合わせられた E. coli β -ガラクトシダーゼ (LacZ) か、あるいはこれもネオマイシン選択可能なマーカーと組み合わせられたレポータ遺伝子緑色蛍光蛋白質 (GFP) のいずれかをコード表現するレトロウイルス性ベクター配列が『プロモータを持たない』アデノウイルス性シャトル・ベクター (図2) のポリリンカーにクローンされた。

これらのレトロウイルス性ベクター遺伝子構成物は完全なレトロウイルス性長末端側面 (LTR) で側鎖されたマーカー/レポータ配列を含んでいる。これが達成されたのは、これらの機能がレトロウイルス性ベクターの統合に in cis で必要となる最低限の配列だからである。これらのプラスミドはすべて構成後に制限エンドヌクレアーゼ消化による間接的分析と、ジデオキシ鎖末端配列決定による直接的分析の両方で確認された。

アデノウイルス性シャトル・プラスミドでのレトロウイルス性組み込み機能が発揮されることを確認するために、機能分析が行われた。この調査のために、レトロウイルス性組み込み機能を含むアデノウイルス性シャトル・プラスミド (pCA Amp^r) の利用可能性を、マロニー白血病ウイルス (MLV) LTR の制御下でエコトロピックはレトロウイルス遺伝子 gag/pol/env を含む標準組み込みプラスミド、pPAM3 と比較した。これらのプラスミドをそれによって LacZ レポータ遺伝子がレトロウイルス性 LTR によって側鎖されるレトロウイルス性ベクター・カセットを含むコントロールのレトロウイルス性ベクター・プラスミド pLNC LZ からレトロウイルス性ベクター配列を取り出す能力があるかどうかについての分析を行った。これらのプラスミドの293細胞への共感染後、上澄液を取り出して標準的な方法でネズミ線維芽腫細胞株 NIH-3T3 を感染するために用いた。これらの細胞は、その後、X-gal 免疫化学的方法で LacZ 生成物に対する染色を行ってから、感染後48時間で視覚化された。

10

20

30

40

50

レトロウイルス性組み込み機能を含んでいるアデノウイルス性シャトル・プラスミドの機能性検証を行ったところ、293細胞がCaPO₄によってそのプラスミドで形質導入されたことが示され、上澄液を用いて標的NIH-3T3細胞を感染し、LacZ遺伝子の生成物を調べるために48時間後にX-gal染色を行った。トランスフェクションはa) pPAM3及びpLNC LZ, b) pPAM3, c) pLNC LZ、及びd) pCA Amp g及びpLNC LZで行われた。pPAM3及びpLNC LZによるトランスフェクションの結果はポジティブであった。pPAM3及びpLNC LZによるトランスフェクションの結果はネガティブであった。pCA Amp g及びpLNC LZによるトランスフェクションの結果はネガティブであった。

コントロールのpPAM3及びpLNC R Zの共トランスフェクションはLacZポジティブNIH-3T3細胞の存在で示されるように、レトロウイルス性形質導入性粒子をつくりだした。対照的に、これらのプラスミドのどちらか一方だけでトランスフェクションを行った場合には形質導入性レトロウイルス性粒子はつくりだされなかった。次に、レトロウイルス性組み込み機能をコード表現するアデノウイルス性シャトル・ベクターとレトロウイルス性ベクター・プラスミドpLNC LZによる共トランスフェクションを行った。コントロール・プラスミド(pPAM3及びpLNC LZ)の両方を用いた共トランスフェクションに関しては、この分析でLacZレトロウイルス性粒子が誘導された。従って、レトロウイルス性組み込み機能をアデノウイルス性シャトル・プラスミドの存在下でのレトロウイルス性粒子誘導のためにつくりだすことができる。

レトロウイルス性ベクター配列をアデノウイルス性シャトル・ベクターから取り出すことができるかどうかについての研究が行われた。この分析のために、レトロウイルス性粒子が誘導され、形質導入性粒子を上記述べた方法で分析した。この分析のために用いられた組み込みプラスミドはpPAM3である。これは、レトロウイルス性LTRで側鎖されたLacZ遺伝子を含む通常のレトロウイルス性ベクター・プラスミド、pLNC LZか、あるいは同じLTR-neo-CMV-LacZ-LTRセグメント(pΔE1LNCMV LacZ)を含むアデノウイルス性シャトル・プラスミドのいずれかからレトロウイルス性粒子を取り出すために用いられた。上にも述べたように、pPAM3とpLNC LZによる293の共トランスフェクションはNIH-3T3インジケータ細胞のX-gal細胞によって示されるように、LacZ形質導入性レトロウイルス性粒子を発生させた。さらに、いずれのプラスミドも単独ではこの能力を示さなかった。重要なことは、レトロウイルス性ベクター配列を含んだアデノウイルス性シャトル・プラスミド、pΔE1LNCMV LacZとコントロールのレトロウイルス性組み込みプラスミド、pPAM3による共トランスフェクションがLacZ形質導入性レトロウイルス性粒子を発生させることが実証できたことである。

レトロウイルス性ベクター機能を含んだアデノウイルス性シャトル・プラスミドの機能検証が行われた。この分析の目的のために、293細胞をCaPO₄によって示されたプラスミドでトランスフェクトし、上澄液を用いて標的のNIH-3T3細胞を感染して、48時間後にLacZ遺伝子の存在を確認するためにX-gal染色を行った。トランスフェクションはa) pPAM3及びpLNC LZ, b) pPAM3, c) pLNC LZ及びd) pPAM3及びpΔE1LNCMV LacZのいずれかで行った。pPAM3とpLNC LZによるトランスフェクションの結果はポジティブであり、pPAM3によるトランスフェクションの結果はネガティブであり、pLNC LZによるトランスフェクションの結果はネガティブであり、そしてpPAM3及びpΔE1LNCMV LacZによるトランスフェクションの結果はポジティブであった。従って、形質導入性粒子の誘導のためにレトロウイルス性ベクターをレトロウイルス性シャトル・プラスミドから誘導することができる。

これらの研究はそれぞれ個別的に、レトロウイルス性組み込み及びベクター機能がアデノウイルス性シャトル・プラスミドの存在下で発揮されてイン・ビボのレトロウイルス性粒子の発生を可能にしてくれる。これらの機能が、両方ともアデノウイルス性シャトル・プラスミドの存在下で存在している場合に、これらの機能がレトロウイルス粒子を生み出す機能も発揮することは実証できたことは重要である。この分析のために、アデノウイルス

10

20

30

40

50

性シャトル・ベクター・プラスミド、 $p\Delta E1LNCMV LacZ$ の存在下でレトロウィルス性ベクター機能を取り出すレトロウィルス性組み込み機能の能力を評価した。 $pPAM3$ 及び $pLNC LZ$ によるコントロール（比較）実験はこのアッセイで粒子を誘導する能力を実証した。さらに、 $pCA Amp g$ と $p\Delta E1LNCMV LacZ$ による比較のためのトランスフェクションも独立で粒子を生み出すことはできなかった。しかしながら、これら2つのプラスミドの共トランスフェクションはポジティブ・コントロール研究で示されたように、 $LacZ$ 形質導入性レトロウィルス性粒子をつくりだした。

レトロウィルス性ベクター機能を含んだアデノウィルス性シャトル・プラスミドの機能的検証を行った。トランスフェクション及び上澄液アッセイは上に述べた通りである。トランスフェクションは、a) $pPAM3$ と $pLNC LZ$ 、b) $pCA Amp g$ 、c) $p\Delta E1PLCMVLacZ$ 及びd) $pCA Amp g$ 及び $p\Delta E1LNCMV LacZ$ によって行われた。 $pPAM3$ と $pLNC LZ$ によるトランスフェクションの結果はポジティブであり、 $p\Delta E1PLCMVLacZ$ によるトランスフェクションの結果はネガティブであり、そして $pCA Amp g$ と $p\Delta E1PLCMVLacZ$ によるトランスフェクションの結果はネガティブであった。従って、この実験は必要最小限のレトロウィルス性機能を含んだアデノウィルス性シャトル・プラスミドからアデノウィルス性粒子が発生されることを確認した。この知見は従って、これをベースとして構成されるアデノウィルス性ベクターを誘導できる根拠を実証している。

こうした結果に基づいて、組み込み機能あるいはレトロウィルス性ベクター機能をコード表現するアデノウィルス性ベクターが構成された。これらのベクターは、上に述べたようなアデノウィルス性組み込みプラスミド $pJM17$ で示されたシャトル・プラスミドを共トランスフェクションすることを介して通常の方法で発生された。取り出されたブランクを拡大して、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）でその同一性を確認した後、3つのシリアル・パッセージでブランク精製を行った。拡大後、ベクターの同一性をアデノウィルス性ゲノムのE1A領域の異種DNAセグメントの制限酵素による消化及びPCR分析で確認した。この確認の一例を図4に示す。これらのベクターはすべてE1A/B消去、複製不能アデノウィルス性ベクターであった。これらのベクターがレトロウィルス性組み込み及びベクター機能に関して利用できるかどうかを調べるために対応するシャトル・プラスミドに対して行ったのと同様にイン・ピトロで特徴付けを行った。アデノウィルス性ベクターの存在下でのこれらレトロウィルス性ベクターの機能的利用性の実証はイン・ビボ研究の実行を可能にしてくれる。

こうした考え方に基づき、本発明は増殖を誘発させるために関連する標的柔組織に成長因子を提供するためにアデノウィルス性ベクターが用いられる戦略を開示する。こうした方法はレトロウィルス性ベクター及び/又は組み込み機能のアデノウィルス媒介遺伝子伝達を介してのレトロウィルス性ベクターのその場所での発生と組み合わせて用いることができる。この方法では、アデノウィルスは適切な成長因子遺伝子の標的柔組織に対しての高効率のイン・ビボ遺伝子伝達を達成する。関連のあるサイトでの高効率伝達は成長因子の高い局所的濃縮を可能にしてくれ、標的細胞の増殖をさらに誘発してくれる。

アデノウィルス/レトロウィルス二機能性ベクターを構成して、その機能について検証した。レトロウィルス性ベクター配列、 $AdLNCMV LacZ$ を含む遺伝子組換えアデノウィルスを構成して、機能的な検証を行った。アデノウィルス性ゲノムからレトロウィルス性ベクター配列を取り出せたかどうかを判定するためにレトロウィルス性組み込み機能を有する非293細胞の高度の、そして一過性のトランスフェクションを達成するための方針が考えられた。この必要性のために、アデノウィルス・ポリリシン・ベクター（ $AdpL$ ）を用いた。この研究のために、HeLa細胞をプラスミド $pPAM3$ を含む $AdpL$ 複合体でトランスフェクトしたところ、レトロウィルス性組み込み機能の表現がもたらされ、その後、 $AdLNCMV LacZ$ で感染された。比較のための実験は、 $AdpL$ を介しての $pPAM3$ と $pLNC LZ$ でのHeLaの共トランスフェクションはレトロウィルス性粒子の産出をもたらした。対照的に、プラスミド $pLNC LZ$ の $AdpL$ -トランスフェクションは何の結果ももたらさなかった。 $pPAM3$ による $AdpL$ トランスフェクションの後

10

20

30

40

50

に A d L N C M V L a c Z での感染を行ったところ、L a c Z 形質導入性レトロウイルス性粒子を得ることができた。HeLa細胞を A d p L / p P A M 3 で前処理しない場合は、そうしたレトロウイルス性粒子を得ることができなかったことは注目に値する。従って、標的細胞へのプロデューサ細胞からの L a c Z コード表現アデノウイルスの『キャリア・オーバー』（譲り渡し）はこの結果を説明することにはならない。従って、レトロウイルス性ベクター配列をアデノウイルス性ベクターから取り出して、形質導入性レトロウイルス性粒子をうまく誘導することができる。

A d L N C M V L a c Z の機能的検証を行った。この分析を行うために、HeLa細胞を A d p L 法でレトロウイルス性組み込み及び／又はベクター・プラスミドでトランスフェクトした。いくつかの例で、細胞は A d L N C M V L a c Z で感染させた。その後、上澄液を取り出して、前に述べたのと同様に、L a c Z 形質導入性レトロウイルス性粒子の存在に関する分析を行った。形質導入／感染条件は、a) p P A M 3 及び P L N C L Z での ' A d p L トランスフェクション、b) P L N C N Z での A d p L トランスフェクション、c) p P A M 3 で A d p L 感染に続いての A d L N C M V L a c Z による感染、d) A d L N C M V L a c Z だけでの A d 感染であった。p P A M 3 及び P L N C L Z での A d p L トランスフェクションによる形質導入／感染の結果はポジティブであり、P L N C L Z での A d p L トランスフェクションの結果はネガティブであり、p P A M 3 で A d p L トランスフェクションを行い続いて A d L N C M V L a c Z による感染を行った結果はポジティブ、そして A d L N C M V L a c Z のみによる A d 感染の結果はネガティブであった。これらの研究に用いられたすべてのベクターは E 1 A / B 消去、複製不能アデノウイルス性ベクターであつた。

実施例 8

アデノウイルス性ベクターで媒介された伝達で誘発されたレトロウイルス性プロデューサ細胞内での遺伝子表現のパターン

この戦略の基礎は、アデノウイルス性ベクター粒子からのレトロウイルス性ベクター配列の取り出しを可能にするための標的細胞内でのレトロウイルス性組み込み機能の効率的な表現である。レトロウイルス性組み込み機能 g a g / p o l / e n v の遺伝子表現のパターンを種々の『従来』の組み込みシステムで評価して、これらの機能をコード表現するアデノウイルス性ベクター A d C M V A m p g によって達成されたパターンとの比較を行った。この点で、組み込み細胞株 G P + A m 12 は安定して形質導入され、両性レトロウイルス性機能を表示し、レトロウイルス性ベクター組み込みのための効率的な媒体として確認されている。加えて、CaP O₄ 微結晶粒子を介してのヒト胎児腎臓細胞 293 の kat 組み込みプラスミド p K a t 2 a m p a c 及び P L N C L Z による一過性トランスフェクションは共形質導入されたレトロウイルス性ベクター・プラスミドを効率的に組み込むことが示されている。これら 2 つの細胞系をアデノウイルス性ベクター A d C M V A m p g で形質導入された HeLa 細胞と比較して、達成された組み込み機能の強度とパターンの分析を行った。これらの分析のために、組み込み細胞株 G P + A m 12、プラスミド p K a t 2 a m p a c で CaP O₄ を介して形質導入された 293 細胞、及びアデノウイルス性ベクター A d C M V A m p g で感染された HeLa 細胞に対して誘導後のいろいろな時点でノーザン・ブロット分析を行った。比較可能な量の抽出総細胞 R N A をニトロセルロース薄膜上に移して、得られたブロットをレトロウイルス g a g , p o l あるいは e n v 遺伝子に対応する³²P でラベルしたオリゴヌクレオチドでプローブした。得られたブロットはアデノウイルス伝達を介して達成されたレトロウイルス性組み込み遺伝子機能の強度及びパターンと従来の組み込み技術で達成されたレベルとの比較を可能にしてくれる。このデータを用いることによって、アデノウイルス性媒体を介しての標的細胞の一過性トランスフェクションからのレトロウイルス性ベクター産出を最適化することが可能になる。

実施例 9

アデノウイルス性ベクターの媒介による遺伝子伝達によって誘発される一過性プロデューサ細胞を介してのレトロウイルス性ベクターの産出

レトロウイルスの遺伝子 g a g / p o l / e n v をコード表現するアデノウイルス性ベクタ

ーから適切なレベルとパターンのレトロウイルス性組み込み機能を引き出すことができることを確認した後、形質導入性レトロウイルス粒子の産出を行った。プラスミド p L N C L Z による両性レトロウイルス・プロデューサ株 G P + A m 12 の形質導入によってつくられた安定したレトロウイルス性プロデューサ細胞株を含む『従来の』レトロウイルス性組み込み系との比較が行われた。この株は L a c Z / ネオマイシンをコード表現するレトロウイルス粒子を安定してつくりだす。さらに、レトロウイルス性ベクターが両性レトロウイルス性組み込みプラスミド p P A M 3 をレトロウイルス性ベクター・プラスミド P L N C L Z と組み合わせる用いる C a P O₄ 手順での 293 細胞の一過性共トランスフェクションを介してつくりだされた。比較のために、H e L a 細胞を正規の量のレトロウイルス性組み込み機能カレトロウイルス性ベクター機能 (A d L N C M V L a c Z) をコード表現するアデノウイルス性ベクター (A d C M V m p g) を用いて共形質導入した。

導入 48 時間後に、標的細胞から上澄液を取り出して、つくられたレトロウイルス性粒子の中身を分析した。つくられたレトロウイルス性粒子の力価と機能を判定するために多数の分析が行われた。つくられた粒子の強度はノーザン・プロットで直接判定してレトロウイルス性ベクター配列を調べるために c D N A を介してプローブで上澄液の分析を行った。各上澄液のシリアル希釈液を公知の量のレトロウイルス性ベクター・プラスミドを含んだ標準と比較した。このアッセイは従って各組み込み系で産出されたレトロウイルス性粒子に組み込まれたレトロウイルス性ベクター配列のレベルに関する情報をつくりだす。さらに、つくりだされたレトロウイルス性ベクターの力価は 2 つの方法で直接判定された。第一に、上澄液を標準的な方法でインジケータ細胞株 N I H - 3 T 3 に移した。48 時間後に、これらの細胞を染色して、F D G による L a c Z 遺伝子の生成物について調べ、形質導入頻度について F A C S で分析した。さらに、同様に感染された N I H - 3 T 3 細胞をネオマイシン類似物 G 418 の存在下で安定した選択にかけた。21 日後、生き残っているコロニーを結晶性バイオレットで染色してスコアをとった。加えて、それらコロニーの一部を拡大して宿主ゲノム内でのレトロウイルス性ベクター D N A セグメントの状態を分析した。限定分析で D N A が統合しているか、あるいはエピソームとして存在しているかについて調べた。

これらの研究は従って一過性レトロウイルス性プロデューサ細胞がレトロウイルス性組み込み及びベクター機能のアデノウイルス性ベクターの媒介による伝達で誘導され得ることを裏づけている。さらに、プロウイルス性配列を含む導入遺伝子に基づいて標的細胞内に長期的な遺伝子表現を達成することができる形質導入能力を有するレトロウイルス性粒子をつくりだすことができる。加えて、レトロウイルス性組み込み株のアデノウイルス性ベクターが媒介する誘導を介して多数の機能性形質導入レトロウイルス性ベクターの比較を標準的な方法で行うことができる。

実施例 10

アデノウイルス / レトロウイルス二機能性システムを介してのレトロウイルス性粒子の最適な産出のためのパラメータ

組み込み細胞からのレトロウイルス産出に影響を及ぼすパラメータは宿主細胞の因子、及び達成可能なレトロウイルス性組み込み / ベクター機能などである。この点で、アデノウイルス性ベクターが媒介する異種遺伝子表現のレベルは一般的には入力粒子数の線形関数である。この関係はアデノウイルス性ベクターに関連する毒性が形質導入された細胞によってつくられる異種遺伝子を減衰するまで続く。アデノウイルス / レトロウイルス二機能性システムを介しての最適化されたレトロウイルス産出の決定因子が示される。H e L a 細胞は等分子量のレトロウイルス性組み込み機能 (A d C M V A m p g) とレトロウイルス性ベクター機能 (A d L N C M V L a c Z) をコード表現するアデノウイルス性ベクターによって共形質導入された。前にも述べたのと同様に、上澄液を取り出してレトロウイルス性粒子が産出されているかどうかを調べた。レトロウイルス性ベクター産出との関連を調べるために入力アデノウイルス性ベクターの量は変えることができる。従って、H e L a 細胞は細胞 1 個あたり、1, 10, 100, 500 及び 1,000 個の割合でアデノウイルス性ベクターによって感染された。レトロウイルス性プロデューサ細胞 (H e L a) におけるアデノウイ

ルス媒介細胞毒性は細胞増殖に関するMTTアッセイを用いて直接判定された。この分析に基づいて、毒性の制限及び／又は反応の線形性から示されるような入力アデノウイルス性ベクターと出力レトロウイルス性ベクターとの関係が判定された。

ウイルス粒子の出力に影響を及ぼす可能性のある別の要因はレトロウイルス性組み込み機能とレトロウイルス性プロデューサ細胞内につくりだされるレトロウイルス性ベクター配列の比率である。これは最高のレトロウイルス性力価を有するプロデューサ細胞を判定することで安定したレトロウイルス性プロデューサ細胞の存在下で経験的に達成される。この系の両方の成分を独立に調節することができるので、レトロウイルス性ベクター産出を可能にする組み込み及びベクター機能の最適の比率を判定することができる。HeLa細胞をレトロウイルス性組み込み機能 (AdCMV Amp^r) をコード表現するアデノウイルス性ベクターとレトロウイルス性ベクター機能 (AdLNCMV LacZ) をコード表現するアデノウイルス性ベクターの両方を用いて共感染し、生成物のレトロウイルス性粒子の分析を行った。二つの粒子の線形比率 (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 など) で共感染を行って、形質導入性レトロウイルス性粒子の最終的な分析を行った。これらの研究はアデノウイルス／レトロウイルス二機能性システムの存在下でのベクター産出に最も適合したレトロウイルス性機能の正確な比率の判定を可能にした。

実施例11

マウス細胞株内でのアデノウイルス／レトロウイルス二機能性システムを介してのレトロウイルス産生

長期間の遺伝子表現をもたらす細胞固有伝達を行うための方法が気道上皮 (肺)、血管上皮 (心臓)、及び肝臓 (代謝血液、血友病) に関して調べられた。レトロウイルス・プロデューサ細胞として機能するマウス肝臓細胞の能力について判定した。この分析のために、安定したレトロウイルス・プロデューサ細胞、レトロウイルス組み込み及びベクター・プラスミドで一過性的にトランスフェクトされた293細胞、及び組み込み及びベクター機能を有する等量のアデノウイルス・レトロウイルス・ベクターによって感染されたHeLa細胞及びマウス肝臓癌細胞の両方との間の直接的な比較が行われた。誘導されたレトロウイルス性粒子を分析した。この分析は関連する柔組織器官標的からのマウス細胞が一過性のレトロウイルス・プロデューサ細胞として機能できるレベルに関する直接の判定を示している。

マウス細胞は自己指向性及び両性レトロウイルス性ベクターによって感染させることができる。しかしながら、マウス細胞が自己指向性レトロウイルス性ベクターと両性レトロウイルス性ベクターに対してそれぞれ違って機能するかどうかについてはまだはっきり分かっていない。本発明による方法はマウス柔組織細胞の存在下でのレトロウイルスの局所的産出を伴うので、アデノウイルス／レトロウイルス二機能性戦略による自己指向性レトロウイルス性ベクターと両性レトロウイルス性ベクターを産出するマウス肝臓癌細胞の能力が示された。これを達成するために、レトロウイルス粒子内のエンベロープ糖蛋白質を変性するための柔軟な方式が開発された。レトロウイルス組み込み機能 gag 及び pol (AdCMVG P) をコード表現するアデノウイルス性ベクターを開発した。さらに、自己指向性あるいは両性 env 糖蛋白質のいずれかをコード表現する別のアデノウイルス性ベクターを開発した。従って、AdLNCMV LacZ と gag / pol (AdCMVG P) 及び両性 env (AdCMV Env a) をコード表現するアデノウイルス性ベクターによる標的細胞の共トランスフェクションによって両性レトロウイルス粒子を誘導したり、あるいは AdLNCMV LacZ と gag / pol (AdCMVG P) 及び自己指向性 env (AnCMV Env e) をコード表現するアデノウイルス性ベクターによる標的細胞の共トランスフェクションによって本発明によるアデノウイルス／レトロウイルス二機能性システムを介して自己指向性レトロウイルス粒子を誘導することは実行可能である。

この分析のために、マウス肝臓癌細胞株をアデノウイルス性ベクターの適切な組み合わせで感染させて、遺伝子組換え自己指向性あるいは両性レトロウイルス性ベクターのいずれかの一過性プロデューサとして機能させた。誘導されたベクターはNIH-3T3に対する力価で分析して、LacZ 遺伝子表現および新しい選択可能なクローンをスコアした。こ

10

20

30

40

50

の分析はレトロウィルス・プロデューサ細胞として機能するマウス細胞に関する細胞の制約因子を明らかにする。この分析は自己指向性及び両性レトロウィルス性ベクターの産出に関連する具体的な問題の直接的判定についても寄与するであろう。

実施例12

マウス一次細胞でのアデノウィルス／レトロウィルス二機能性システムを介してのレトロウィルス性ベクター産出

肝臓細胞のマウス一次培養体をコラーゲナーゼ消化及び精製という標準的な方法で作りだした。これらの細胞のレトロウィルス産出に関連するパラメータ、つまり、1) アデノウィルス／レトロウィルス二機能性システムによって誘発されるレトロウィルス組み込み機能のパターンと強度；2) アデノウィルス／レトロウィルス二機能性システムによって誘発されるレトロウィルス性ベクターの産出の強度、3) アデノウィルス／レトロウィルス二機能性システムによって誘発されるレトロウィルス性ベクターの産出に関するパラメータの最適化、4) アデノウィルス／レトロウィルス二機能性システムを介しての自己指向性及び両性レトロウィルス性ベクターの異なった産出などについての評価を行った。これらの研究は末端アッセイとしてLacZ組織化学陽性及びネオマイシン抵抗で評価される形質導入性レトロウィルス粒子の産出を用いる。これによって、イン・ビボ状況と最高度の類似性を有する適切な標的細胞の存在下のレトロウィルス性ベクター産出に関連した最適パラメータの判定が可能になる。

10

実施例13

アデノウィルス／レトロウィルス二機能性システムを介してのレトロウィルス形質導入を補強する手段としてレトロウィルス受容体の誘導

20

隣接柔組織細胞を形質導入するレトロウィルス性ベクターをその場所で発生させることはその安定した遺伝子修正を可能にしてくれる。一度アデノウィルス／レトロウィルス二機能性方式でアデノウィルス性ベクターの高度の局所的発生が行われると、他の因子が周辺の標的細胞の実際の形質導入に関与してくる。この点に関して、標的器官サイトでの安定したプロデューサ細胞がレトロウィルス性ベクターを介して起きるようにするためには、形質導入される細胞が増殖状態にあることが必要である。つくられるレトロウィルスに対する受容体の局所集中も隣接細胞が形質導入される有効性を示す因子であろう。自己指向性あるいは両性ベクターのための受容体レベルはこのベクターによる感染に対する標的細胞の全体的な感受性を示す限定的な因子である。さらに、同族レトロウィルス受容体の異種表現は、1) 受容体 - env相互作用に基づく有効な形質導入イベントの数を増大することにより標的細胞の感受性を増大し、そして/又は2) 受容体 - env相互作用を可能にする従来は不全であった機能を提供することによって、レトロウィルス感染に従来は抵抗性を示していた細胞をそれに対して感受性を示すようにしてくれる。レトロウィルス受容体群の調節はこれらのベクターによる形質導入の有効性の重要な決定因子であろう。

30

自己指向性レトロウィルス (eco - R) のエンベロープ糖蛋白質に対応する受容体と両性レトロウィルス (ampho - R) のエンベロープ糖蛋白質に対するcDNAクローンを得た。これらはアデノウィルス性ベクター内に組み入れられ、それによってレトロウィルス性ベクターがE1A/B消去、複製不能アデノウィルス性ベクターの存在下でCMV中間初期プロモータ/エンハンサを介して表現された。これらのベクターを用いて標準的な手順で一次マウス肝臓細胞に感染させた。これらの標的肝臓細胞は、その後、LacZ/neocasettをコード表現する自己指向性及び両性ベクターによって感染させられた。レトロウィルスがコード表現したcDNAによって形質導入されていないマウス一次肝臓細胞との比較が行われた。上にも述べた通り、インジケータ細胞をスコアしてLacZ組織化学活性とネオマイシン抵抗性とのレトロウィルスによる誘発について調べた。さらに評価可能なパラメータとしてはレトロウィルス性ベクターの感受性に対する標的レトロウィルス受容体数の影響がある。加えて、ecoRとamphoR誘発のそれぞれの能力の比較が可能である。これらの調査はレトロウィルス受容体誘発が関連標的細胞のレトロウィルス形質導入を強化することが可能かどうかについて明らかにしてくれる。この戦略はその場所でのレトロウィルス受容体誘発を達成するためのアデノウィルス性ベクターの効率的なイン・ビ

40

50

が遺伝子伝達特性をもたしてくれる。従って、アデノウイルス性ベクターはつくりだされたレトロウイルス粒子を介して隣接細胞を感染させるために標的器官サイトでプロデュース細胞を発生させるために用いられる。隣接細胞でのレトロウイルス受容体の誘導を介してこのプロセスを強化することもアデノウイルス性ベクターが媒介する遺伝子伝達を可能にしてくれる。

実施例14

アデノウイルス／レトロウイルス二機能性システムによるVSV-G偽型化レトロウイルス性ベクターの産出

レトロウイルス性ベクターを介しての効率的な遺伝子伝達を達成するという流れのなかでの標的細胞レトロウイルス受容体の制約を克服するために偽型化レトロウイルスが用いられた。この点で、最も一般的には小水泡性口内炎ウイルスG-糖蛋白質(VSV-G)から誘導される、交互に繰り返されるenv糖蛋白質を含む二機能性レトロウイルス粒子を発生させることができる。そして、これらの二機能性レトロウイルス粒子はVSV-G糖蛋白質と標的細胞受容体との相互作用の効能によって細胞に感染するかもしれない。交互細胞侵入を可能にするこの手段は両性あるいは自己指向性env糖蛋白質に対する標的受容体の欠如を回避してくれる。こうしたやり方はレトロウイルス抵抗性細胞を感染させる目的と、形質導入効率を向上させるのとの両方の目的で用いられている。さらに、これら偽型化ベクターはイン・ピボでのより高いレベルの安定性を有しており、イン・ピボ伝達状況でのその場所でのより高いレベルの形質導入を可能にしてくれるであろう。これらのVSV-G偽型化レトロウイルスは両性あるいは自己指向性gag/polとVSV-G糖蛋白質との協調表現によって発生される。集合レトロウイルス粒子は両性あるいは自己指向性env対応物の代わりにVSV-Gを取り込む。この目的を達成するひとつの手段はレトロウイルス性gag/polをコード表現するプラスミド及びVSV-G+レトロウイルス性ベクター・プラスミドによる細胞の共トランスフェクションである。形質導入された細胞はレトロウイルス性偽型の一過性プロデュースにされる。この方法は望ましい偽型化レトロウイルス粒子をつくりだすことができるが、VSV-G糖蛋白質に関連した毒性がプロデュース細胞内で示され、このことは産出量の低下、ひいては全体的な力価の低下という結果をもたらす。組み込み細胞株方式は調節可能な表現単位をつくりだすことで開発されてきている。構成的にレトロウイルスgag/polを表現し、同時に誘導可能な表現カセットにVSV-Gを含んだ安定した細胞が開発されている。レトロウイルス性ベクター・プラスミドによるこれらの細胞の形質導入に続いて、偽型化ベクターの誘導を可能にすべくVSV-G表現が誘発された。こうしたやり方は偽型化粒子を発生できる細胞株の安定した維持と向上されたレベルのベクター産出を可能にしてくれる。

標的細胞をVSV-G偽型の一過性プロデュース内に入れるためにアデノウイルス／レトロウイルス二機能性システムを用いた。こうしたやり方はイン・ピボで隣接細胞を感染させる際に利点を有している。そうした補強された形質導入効率性は改良された標的細胞感染効率に反映する可能性がある。それとは別に、そうしたことは偽型化レトロウイルス粒子のより大きなイン・ピボ安定性に反映する可能性もある。この分析のために、標的細胞をより厳密さを向上させたモデル・システムとして用いた。従って、HeLa細胞、マウス肝臓細胞株BNL CL-2、そして最終的にマウス一次細胞をアデノウイルス／レトロウイルス二機能性システムによって一過性VSV-G偽型化レトロウイルス・プロデュースとして誘発した。

偽型化レトロウイルスの発生のために、細胞をレトロウイルス性gag/polを含むアデノウイルス性ベクター、CA dCMVGP、レトロウイルス性ベクター配列をコード表現するアデノウイルス(AdLNCMV LacZ)+VSV-G糖蛋白質をコード表現するアデノウイルスで共感染した。この後者のベクターはL. Prevec (McMaster University, Ontario, Canada) から入手した。これは種々の高レベルの真核性標的細胞でVSV-Gを表現することはできるE1A/B消去、複製不能アデノウイルス性ベクターである。これらの細胞はそれぞれAdCMVE_{env}⁺及びAdCMVE_{env}⁻を用いてアデノウイルス／レトロウイルス二機能性システムを介しての自己指向性及び両性レトロウイルス性ベ

10

20

30

40

50

クターの発生のためにも誘発された。感染後、細胞上澄液を取り出して、標的細胞を感染するために用いられた。最初に、NIH 3T3細胞を感染して、LacZ誘発及びネオマイシン選択可能性クローンをスコアした。この分析は、VSV-G偽型化に対して相対的な力価指数をつくりだして、それを両性及び自己指向性ベクターと比較する方法を可能にしてくれる。さらに、上澄液を用いてマウス肝臓一次細胞を感染させてLacZをスコアした。この分析は、偽型化方式がVSV-G標的細胞受領体相互作用に基づいて柔組織標的の感染性を増大させるかどうかを明らかにする。相関的研究は、VSV-G形質導入がベクターのプロウイルス性の統合に関連しているのかどうかについて反転した。VSV-Gは『偽形質導入』と関連づけられており、そのことによって異種遺伝子生成物の移送が標的細胞の安定した遺伝子修正の過程で起きるのであるから、これは重要なことである。さらに、VSV-G糖蛋白質の誘発された表現がアデノウイルス/レトロウイルス二機能性システムを介してベクター産出をさらに最適化することができるかどうかについて調べられた。この誘発性がより高い力価のVSV-G偽型の誘導を可能にするかどうかについての評価が行われた。これらの研究は、従ってアデノウイルス/レトロウイルス二機能性システムがVSV-G偽型化レトロウイルス粒子を生み出すように機能できるのかどうかについての判断を可能にしてくれる。さらに、これらの粒子がイン・ビトロでの関連柔組織標的のより増強された形質導入能力を有しているかどうかについても調べられた。

10

実施例 15

イン・ビボで柔組織細胞を修正するアデノウイルス/レトロウイルス二機能性ベクター

本発明は標的細胞をアデノウイルス・プロデューサ細胞として機能させるためにアデノウイルス性ベクターを用いる方法を提供する。さらにこの方法は心臓、肺、及び血液の病気のモデルに関連した標的組織に対して最適化することができる。この方式をイン・ビボで用いて、標的柔組織サイトでの長期間の安定した統合を達成することができる。1) 全身血管伝達による肝臓細胞形質導入と、そして2) 内腔気道伝達による気道上皮の2つの状況で、イン・ビボ研究が行われた。これらのルーティング方式は関連柔組織の高効率のイン・ビボ形質導入が達成できる伝達ルートを示している。従って、イン・ビボでの遺伝子機能のレトロウイルスによる伝達効率は人をまごつかせるような要因ではない。標的細胞をレトロウイルス・プロデューサとして機能させるためにアデノウイルス性ベクターが用いられた。つくりだされたレトロウイルスは周囲の柔組織細胞に形質導入するように機能した。

20

30

実施例16

柔組織サイトでのレトロウイルス産出のイン・ビボ誘発後の標的細胞のその場所でのレトロウイルス感染

レトロウイルスがイン・ビボでつくりだされる程度及び範囲について調べた。つくりだされるウイルス粒子はその場所では発生後に実際的な方法で検出することはできないので、この分析では隣接細胞がレトロウイルス性ベクターによって安定的に形質導入された程度を強化することで、その結果を間接的に判定した。これらの研究のために、気道上皮か、あるいは肝臓細胞上皮のいずれかでの伝達を実現するためにレトロウイルス性ベクター機能をコード表現するアデノウイルス性ベクターとレトロウイルス性ベクター配列をコード表現するアデノウイルス性ベクターの両方でマウスに刺激を与えた。組み込み機能の表現と、誘導されたレトロウイルス性ベクター(LacZ/neo)の表現された生成物はmRNAトランスクリプト(gag/pol/env)の定量的ポリメラーゼ鎖反応及び/又はDNAコピー数(LTR LacZ/neo)によって標的器官でそれぞれ独立に確認された。さらに、特にこれらのレトロウイルス性成分をつくりだす標的細胞は肺及び肝臓から誘導されるこれらの部分のその本来の場所での雑種形成によって判定された。これらの研究はアデノウイルス性ベクターの伝達が標的器官サイトでレトロウイルス組み込み機能の表現を達成することができることを裏づけている。さらに、レトロウイルス・プロデューサ細胞として強力に機能する特定の細胞サブセットも識別することができる。つくりだされるレトロウイルスによる標的細胞の形質導入によって統合が行われる程度の判定は宿主器官ゲノム性DNAの存在下でのプロウイルス性DNAの状態の分析によって

40

50

行われる。レトロウイルス粒子の局所的な産出の後、周辺の細胞の形質導入はレトロウイルス・プロウイルス性ゲノムの統合化コピーを発生された。総DNAはアデノウイルス/レトロウイルス二機能性システムによる誘発の後に抽出されて、プロウイルス性DNAの状態の分析にかけられた。最初、組織物質に対してHirt DNA抽出が行われた。誘導されたDNAがサザン・ブロットで分析されて、アデノウイルス誘導配列の存在とその状態について調べられた。レトロウイルス性ベクターDNAの大部分はHirt画分内で非統合エピソームとして検出されるはずである。これはAdCMVAmpgゲノムと、少なくともAdLNCMV LacZゲノムの一部にも当てはまるであろう。次に、高分子量DNAを同様の方法で分析した。2つのアデノウイルス性ベクターのゲノムは、それらがエピソーム性で、Hirt抽出可能なDNAの存在する場所に移行するので、HMW DNA画分で検出されるはずである。対照的に、統合がいずれかの程度で行われるのであれば、AdLNCMV LacZのプロウイルス性成分はサザン・ブロット分析で高分子量画分で検出される。このことは、これら2つの標的器官サイトから誘導されたDNAのHirt画分及びHMW画分のサザン・ブロットと組み合わせた制限エンドヌクレアーゼ消化によって確認された。比較対照との比較が行われ、それによってレトロウイルス組み込み機能、あるいはレトロウイルス・ベクター機能のいずれか1つだけのアデノウイルスを介しての伝達が行われた。この分析は統合イベントがアデノウイルス/レトロウイルス二機能性システムによるその本来の場所でのレトロウイルス性ベクター形質導入の結果として起きたのかどうかを判定する感受性『スクリーン』として機能する。

その本来の場所でのレトロウイルス感染の追加的アッセイを標的サイトでのベクター・プロウイルス性DNAあるいはDNAコード表現配列の長さである。安定して、長期間の表現がこれらの表現の器官からその本来の場所でのレトロウイルス感染から誘導される。最初の例で、標的器官の柔組織細胞でのベクター・プロウイルスDNAの統合は宿主ゲノムDNAの存在下でのDNA配列の長期的持続として示されるであろう。従って、ベクター・プロウイルスDNAの一時的パターンについて検査した。この点で、前にも述べたのと同様、肺及び肝臓の形質導入についてAdCMVAmpg及びAdLNCMV LacZによって動物を検査した。処理後特定の時間的間隔をおいて、その器官を取り出して、Hirt DNA抽出及びHMW DNA抽出の両方を行った。アデノウイルス性ベクター・ゲノム性DNAとレトロウイルス性プロウイルスDNAの両方の分析を定量性PCRを用いて行って、各時点での宿主HMWゲノム性DNA内の統合レトロウイルス性ベクターDNAの絶対量を判定した。HMW画分内部の持続性プロウイルス性ベクター配列を示す一時的な特徴は安定した統合が起きた程度を示す。ベクター・プロウイルス統合に基づく持続性の別の指数が組織化学レポートを用いて求められた。LacZとGFPの両方を、その表現が適切に処理された組織部分の組織化学分析によって消去することができるレポートとして用いられた。レトロウイルス性ベクターの形質導入後に気道上皮及び肝臓に存在するこれらレポート遺伝子の一過性表現特性についてはかなり資料として発表されている。従って、レポート遺伝子の一時的パターンはその本来の場所でのレトロウイルス発生及びその結果としてのベクター・プロウイルス性DNAを示すものである。動物に肝臓及び肺での形質導入を行うためにAdLNCMV LacZ又はAdLNCMV GFPを用いて実験を行った。処理後のいろいろな時点で、関連する器官を取り出して、コード表現されたLacZ及びGFP遺伝子の生成物に関する組織化学分析を行った。この分析を補強するために、これらレポート遺伝子のmRNA産出を調べるために組織部分の、その本来の場所での雑種形成を行って、追加的な定量的指数を得た。この分析では、アデノウイルスだけをコード表現するレポートとは比べて、その本来の場所のレトロウイルス性ベクター・グループ内で持続性パターンの違いが明らかにされるであろう。

実施例17

レトロウイルス組み込み及びベクター機能のイン・ピボでのアデノウイルスによる伝達を介しての、その本来の場所でのレトロウイルス感染の増強

局所的につくられたレトロウイルス性ベクターが標的細胞に安定して形質導入できる能力は局所的な細胞因子によって影響を受ける。これらの因子には標的細胞の増殖状態と、そ

10

20

30

40

50

の局所的につくりだされたレトロウィルス性ベクターに対する受容体の数などがある。細胞増殖を調節するために、成長因子に基づく戦略が用いられた。標的細胞の増殖を強化するために成長因子誘発の戦略が用いられたが、成長因子K F G及び肝臓細胞成長因子(H G F)をコード表現する遺伝子成長物の肺及び肝臓に対する効率的なイン・ピボ伝達を達成するためにアデノウィルス性ベクターが用いられた。この方法によって達成されたこれら成長因子の高い局所的濃度はこれらの器官サイトで柔組織増殖の最適化された誘発をもたらした、これらの増殖誘発は局所的につくられたレトロウィルス性ベクターによる標的細胞の形質導入強化を可能にしてくれる。

動物に対して、初めに、その肺あるいは肝臓に対してK G FあるいはH G Fをコード表現するアデノウィルス性ベクターを伝達することで刺激を与えた。増殖の最適な誘発のための一時的な特性が確立した後、動物に対してその本来の場所でのレトロウィルス発生のためにアデノウィルス/レトロウィルス二機能性ベクターA d C M V A m p g及びA d L N C M V L a c Zを与えた。その後、これらの動物を分析して統合されたプロウィルス性ベクター配列を判定した。これらの調査には肺と肝臓のH M W D N A画分内での統合プロウィルス配列の定量と、安定して形質導入された細胞の数を判定するための、その本来の場所での雑種形成とが含まれていた。相関的な研究は誘発された増殖がどの程度に本来の場所でのレトロウィルス形質導入の成功に寄与するかについて判定するものである。これらの研究をまとめると、成長因子遺伝子のアデノウィルス・ベクターに媒介された伝達を介して誘発される増殖が柔組織標的の安定した形質導入を達成する上で本来の場所で発生されたレトロウィルス性ベクターの能力にどの程度好ましい影響を及ぼすかを明らかにしてくれる。

実施例18

アデノウィルス性ベクターは標的細胞をレトロウィルス・プロデューサとして機能させることができる

標的細胞をアデノウィルス・ベクター、A d C M V A m p g及びA d L N C M V G F Pの組み合わせ、あるいはA d L N C M V G F Pだけで感染させた。標的細胞はサル・ベロ細胞株W162、マウス腺維芽細胞株N I H - 3 T 3、ヒト膀胱癌細胞株E J、あるいはヒト卵巣癌細胞株S K O V 3_{i p 1} (データ示さず)であった。細胞は3時間適切なアデノウィルス性ベクターで感染させてから、洗浄してすべての遊離アデノウィルスを取り除いた。これらの細胞をいろいろな期間組織培養に入れて、蛍光活性化細胞ソーティング(F A C S)あるいは蛍光顕微鏡で緑色蛍光蛋白質(G F P)の表現について分析した。

感染2日目のアデノウィルス性ベクター感染細胞の分析の結果、比較対称と推定されるレトロウィルス・プロデューサは高い頻度でG F Pレポータ遺伝子の表現を示した(図5)。これは両方のグループで起きたA d L N C M V G F P感染の初期の高い頻度とも一致しており、その後のG F P遺伝子表現も両方のグループで同様に発生した。各グループのサブセットを8日間毎に通過させて、30日目と60日目に分析した。アデノウィルス性ベクター(A d C M V A m p g及びA d L N C M V G F P)の両方に露出させた細胞グループのF A C S分析はA d L N C M V G F Pだけに露出させた細胞と比較してかなり多い数のG F P - ポジティブ細胞を示した(図6 A)。両方のウィルスに感染させたグループからのG F P - ポジティブ細胞は密集した状態で成長しており、これはレトロウィルスが局所的に分布していること、及び/又はクローンの発生原点を示している(図5)。これはG F P表現を失ってしまったA d L N C M V G F Pだけで感染された細胞と著しい対称を示しており、標準的なアデノウィルス方式(図5及び6 A)で伝達される遺伝子の公知の一過性表現と一致した傾向を示している。高分子量細胞D N Aのレトロウィルス配列が示されたことでプロウィルス統合が確認された(図6 B)。

実施例19

形質導入性レトロウィルス粒子の産出

N I H - 3 T 3あるいはW162細胞をA d C M V A m p gとA d L N C M V G F P、あるいはA d L N C M V G F Pだけで感染させて、その後、上に述べたような手順で洗浄した。上澄液を感染後48時間に取り出して、その後、レトロウィルスの力価を調べるためにN

I H - 3 T 3 細胞を感染するために用いた。上澄液で感染された細胞を培養内に20日間保持して、G F P 表現に関する分析を行った。A d L N C M V G F P ウイルスから誘導された上澄液は標的細胞内で長期 G F P 表現を誘発することはできなかった(図7)。対称的に、A d C M V A m p g 及び A d L N C M V G F P 上澄液で感染された細胞は20日目で高い割合の G F P 表現を示した。この研究は G F P 誘発が最初のアデノウイルスで感染された標的細胞から誘導されたレトロウイルスによる感染からもたらされたことを裏づけるものである。これら長期的な G F P 表現に関する調査はレトロウイルス産出によって媒介される安定した形質導入からの移転アデノウイルス一過性遺伝子表現(<2週間)を明確にするために考案されたものである。これらの結果は形質導入性レトロウイルス粒子が実際に標的内のアデノウイルス性ベクター伝達遺伝子によって発生されたことを示している。10
こうした方法が複製能力を有するレトロウイルス(R C R)の有意な産出に関連しているかどうかについて判定するため、プラスミドに基づくトランスフェクション方法を介して誘導される R C R 発生とアデノウイルス/レトロウイルス二機能性ベクターの使用との比較が行われた。従って、HeLa細胞を p P A M 3 + p L N C L Z でトランスフェクトするか、あるいは A d C M V A m p g 又は A d L N C V G F P、又は A d C M V A m p g + A d L N C M V G F P によって感染された。これらの上澄液はその後複製能力を有するレトロウイルスがあるかどうかについて調べた。アデノウイルス/レトロウイルス二機能性によっては複製能力を有するレトロウイルスは検出されなかった(データ示さず)。従って、この方法による複製能力を有するレトロウイルスの発生は通常の方法を上回っているとは思われない。20

実施例20

安定した統合によるイン・ビボ遺伝子伝達

こうした基本的な考え方を確立した後、安定した統合をもたらすイン・ビボ遺伝子伝達を行うためにこの方法を用いた。これは最も厳しい伝達状況でのこの方式の全体的な実用性について判定したために行われた。この分析のために、ヒト卵巣癌のマウス・モデルを用いた。無胸腺ヌード・マウスをヒト卵巣癌細胞株 S K O V 3_{i p i} によってオルソトピックな方法で異種間移植した。腹膜腫瘍ブランクを確立した後、動物に腹膜ルートでベクターを与えた。動物のいくつかのグループにアデノウイルス/レトロウイルス二機能性ベクターかこのベクター+アデノウイルス/レトロウイルス二機能性組み込み機能のいずれかを与えた。前者のグループでは、用いられたベクター、A d L N C M V G F P は G F P レポータ遺伝子を含むレトロウイルス性ベクター配列を含んでいた。後者のグループでは、p C A A m p g から誘導されたアデノウイルス性ベクター A d C M V A m p g は、機能的に検証された組み込み機能を含んでいた。一方のウイルス・グループでは、G F P 表現力セットのアデノウイルス性ベクター媒介伝達はイン・ビボ遺伝子表現をもたらし、非統合性異種遺伝子伝達に基づく急速な消滅という一時的な特性を有している。対称的に、これら2つのウイルスは腫瘍細胞の本来の場所での誘発を達成してレトロウイルス・プロデュース細胞として機能させることが予想された。局所的につくられたレトロウイルス性ベクターは増殖性の隣接細胞、この場合には S K O V 3_{i p i} 腫瘍標的の安定した形質導入を行うことが予想されるであろう。これらの考察に基づけば、2つのオリジナル・グループは安定した形質導入を達成する別の能力に基づいて G F P レポータ遺伝子の表現の明確に異なった一時的特性を示すことが予想されるであろう。アデノウイルス/レトロウイルス二機能性ベクター A d L N C M V G F P によって処理された動物を伝達後の早い時点と時間が経ってから G F P 表現を示す腫瘍細胞があるかどうかを示すために蛍光顕微鏡で分析した。この分析で、単一のベクターを受けた動物のグループは図8に示すように遅い時点では稀にしかポジティブ細胞を示さなかった。対称的に、アデノウイルス/レトロウイルス二機能性ベクター+アデノウイルス/レトロウイルス二機能性組み込み機能を与えられた動物は遅い時点ではっきりと異なったパターンを示した。この点で、このグループの分析はクラスター内でポジティブな細胞はより多く検出されている点が注目になる。この知見は標的細胞の安定した形質導入がクローン表現で起きたとする考え方と一致している。40

実施例21

アデノウイルス／レトロウイルス二機能体のイン・ピボでの有効性

卵巣癌細胞株 S K O V_{3ip1} を A d C M V A m p g + A d L N C M V G F P、あるいは A d L N C M V G F P だけのいずれかでイン・ピボで感染させた。感染されたレトロウイルス粒子のイン・ピボでの発生と隣接細胞の感染を確認するために、感染された細胞を未感染の細胞と、アデノウイルス性ベクターによって感染された細胞25%、そして未処理 S K O V_{3ip1} 細胞75%の割合で混合して、腫瘍形成が行われるように無胸腺ヌード・マウス内に皮下接種した。移植から20日目に、両方の動物グループとも明白な腫瘍を有しており、この腫瘍を取り出して G F P レポータ遺伝子の持続性および表現を分析した。A d L N C M V G F P だけで感染されたグループは、稀に、孤立した蛍光細胞だけを有していた（図 9 B）。対照的に、2 - ウイルス・グループから誘導された腫瘍は G F P ポジティブ細胞の大きな膨張性クラスターを持っていた（図 9 C）。複数のフィールドでのポジティブ細胞を数えることによって、1 - ウイルス・グループが80%以上の G F P - ポジティブ細胞を有しているという形質導入された細胞の推定を可能にしてくれた。従って、このグループでは、ポジティブ細胞の数は最初の移植混合体内のアデノウイルスで感染された細胞の割合よりかなり大きかった。2 - ウイルス・グループでの G F P - ポジティブ細胞がかなり広く分布していることは、本来の場所のレトロウイルス性ベクターによる隣接細胞の安定した遺伝子修正を示唆している。

イン・ピボでのアデノウイルス性ベクター形質導入と本来の場所でのレトロウイルス・プロデュース発生と結合させる可能性について検査した。ヌード・マウスにオルソトピックな方法でヒト卵巣癌細胞株 S K O V_{3ip1} を移植した。移植後5日目に動物に A d L N C M V G F P だけか、あるいは A d L N C M V G F P + A d C M V A m p g のいずれかで腹膜内接種した。アデノウイルス接種16日後、動物を致死させて、腫瘍を分析した。1 - ウイルス・グループでは G F P - ポジティブ細胞は検出されなかった（図 9 E）。対照的に、両方のアデノウイルス性ベクターを受けたグループでは G F P - ポジティブ細胞の島が検出された（図 9 F）。複数の顕微鏡フィールドの分析は1 - ウイルス・グループの場合全体的な形質導入率が1%以下、そして2 - ウイルス・グループの場合10 - 15%であることが示された。レトロウイルス組み込みの十分な誘発を可能にする2つのアデノウイルス性ベクターを受けたグループでのイン・ピボでの G F P 表現の持続性は二次的に作りだされるレトロウイルス性ベクターに基づいて発生する安定した形質導入に関するイン・ピボでの知見と一貫している。

実施例22要約

イン・ピボで標的細胞の効率的で安定した遺伝子修正を行うための新しいベクター方式が開発された。これはアデノウイルスをレトロウイルス性ベクター及び組み込み成分のための伝達システムとして用い、それによって標的細胞に一過性の、本来の場所でのレトロウイルス性ベクターの一過性プロデュースとして機能させることによって達成された。従ってこの方式は、隣接細胞を感染させ、安定した形質導入を達成することができるレトロウイルス性ベクター粒子の発生を可能にした。この方式においては、2つの重要な要因がこのレベルの安定したイン・ピボでの形質導入を可能にしてくれた。第一に、標的細胞のサイトでのレトロウイルス性ベクターの局所的産出がレトロウイルス粒子の、その不活性化につながるような体液因子への露出による不都合な影響を克服してくれる。第二に、アデノウイルス性ベクターの能力を利用して本来の場所でのレトロウイルス・プロデュース細胞の効率的なアデノウイルス性ベクターに標的細胞への有効なイン・ピボ伝達を達成させた。この戦略は成分ベクター系の望ましい諸側面を遺伝子伝達という目的のために結合させるという新しい概念に基づく方式を示している。

本明細書で述べられている特許あるいは出版物は本発明が関連する技術分野の当業者のレベルを示している。これらの特許及び出版物はそれらを参照することによって、個々の出版物が具体的、個別的に組み込まれるのと同じ程度に、全体として本明細書に組み込まれる。

当業者であれば、本発明がここで述べられている目的や利点や、それと本質的に関連して

いる目的や利点を実行、達成するのによく適合していることは容易に理解できるであろう。ここに述べられた実施例は、その方法、手順、処理、分子、及び具体的な化合物も含めて好ましい実施の形態を示すものであり、具体例であって、本発明の範囲の限定を意図するものではない。その変更やその他の利用法は、権利請求の範囲で述べられるような本発明の範囲に含まれる技術分野の当業者なら容易に想起できるであろう。

配列リスト

- (1) 一般的情報
 - (i) 出願人: Curiel, D.
 - (ii) 発明の名称: 二機能性レトロウイルス / アデノウイルス系
 - (iii) 配列番号: 2 10
 - (iv) 連絡住所
 - (A) 住所: Benjamin A. Adler, Ph. D, J. D.
 - (B) 通り: 8011 Candle Ln.
 - (C) 都市: Houston
 - (D) 州: T X
 - (E) Z I P: 77071
 - (v) コンピュータ読み取り形式
 - (A) メディア・タイプ: フロッピー・ディスク
 - (B) コンピュータ: Apple Macintosh
 - (C) オペレーティング・システム: Macintosh 20
 - (D) ソフトウェア: Microsoft WORD6.0
 - (vi) 現行出願データ
 - (A) 出願番号
 - (B) 出願日:
 - (C) 分類
 - (vii) 前回出願日
 - (A) 出願番号
 - (B) 出願日:
 - (viii) 弁理士に関する情報 30
 - (A) 氏名: Benjamin A. Adler
 - (B) 登録番号: 35,423
 - (C) 参照・ドケット番号: D 6015
 - (ix) 通信情報
 - (A) 電話: (713) 777 - 2321
 - (B) F A X: (713) 777 - 6908
 - (C) T E L E X:
- (2) 配列識別番号 N o . 1 に関する情報
 - (i) 配列特性:
 - (A) 長さ: 29bp
 - (B) タイプ: 核酸 40
 - (C) ストランド性: 単一ストランド
 - (D) トポロジ: 線形
 - (ii) 分子タイプ:
 - (A) 説明: 他の核酸
 - (iii) 仮定: なし
 - (iv) 抗センス: なし
 - (v) フラグメント・タイプ
 - (vi) オリジナル・ソース
 - (vii) 緊急ソース:
 - (viii) ゲノムでの位置 50

(ix) 特徴

(x) 刊行物情報

(xi) 配列説明：配列識別番号：1

GGGAAGCTTA TGGGCCAGAC TGTTACCAC 29

(3) 配列識別番号：2に関する情報

(i) 配列特性

(A) 長さ：26

(B) タイプ：核酸

(C) ストランド性：単一ストランド

(D) トポロジー：線形

(ii) 分子タイプ

(iv) 抗センス：なし

(v) フラグメント・タイプ

(vi) オリジナル・ソース

(vii) 緊急ソース：

(viii) ゲノムでの位置

(ix) 特徴

(x) 刊行物情報

(xi) 配列説明：配列識別番号：2

CAAGGCTTCC CAGGTCACGA TGTAGG 26

10

20

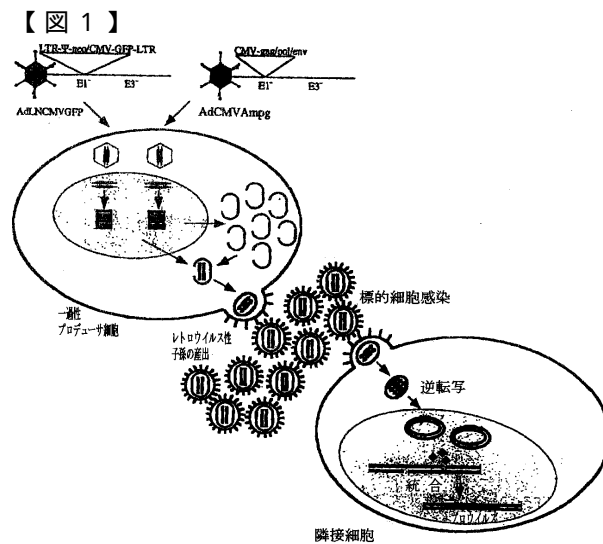


FIGURE 1

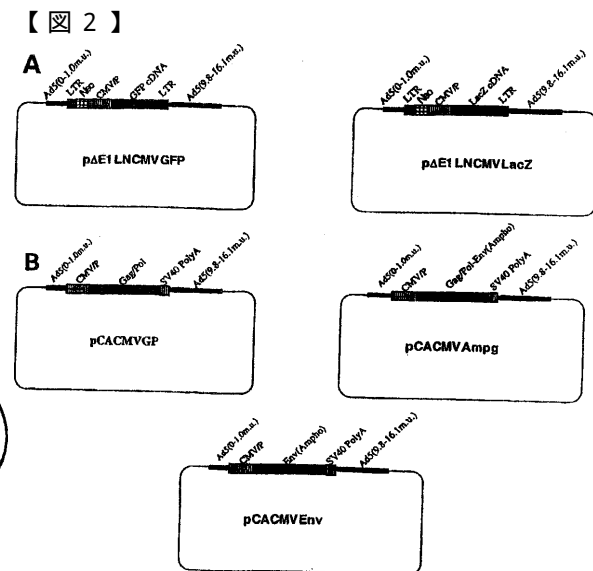
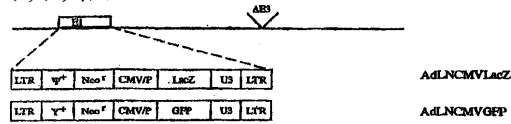


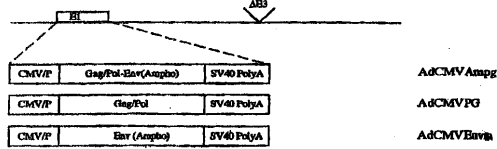
FIGURE 2

【図 3】

A. Maloneyマウス白血病レトロウイルス・ベクター成分を
及び遺伝子表現カセットをコード表現するE1置換遺伝子組換え
アデノウイルス



B. レトロウイルス組込み成分を表現するE1置換遺伝子組換え
アデノウイルス



C. AdCMVAmpgウイルス・ゲノム性DNAの分析
a) PCR確認の結果 b) 制限酵素消化分析

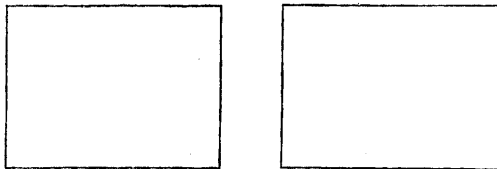


FIGURE 3

【図 4】

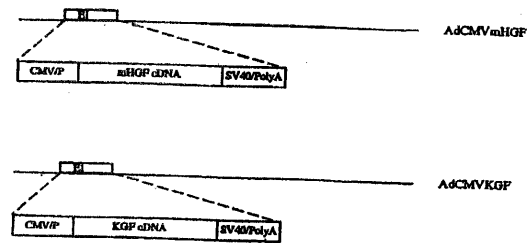


FIGURE 4

【図 5】

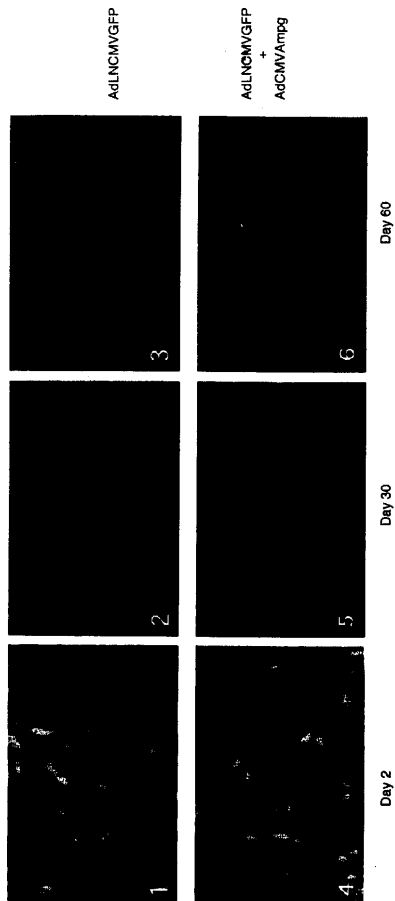


FIGURE 5

【図 6】

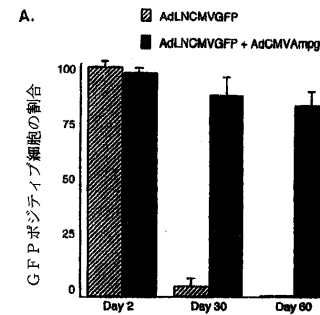


FIGURE 6

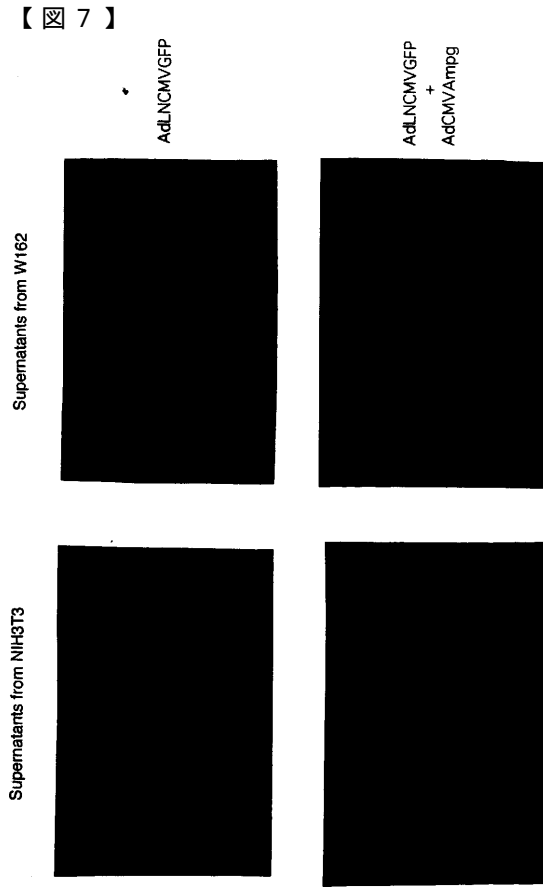


FIGURE 7

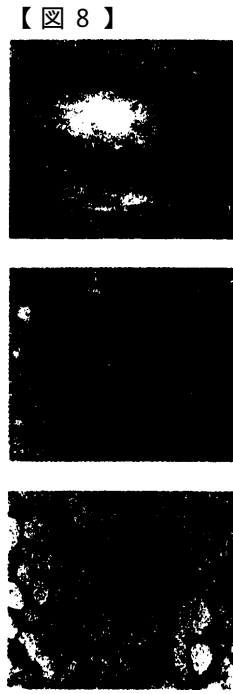


FIGURE 8

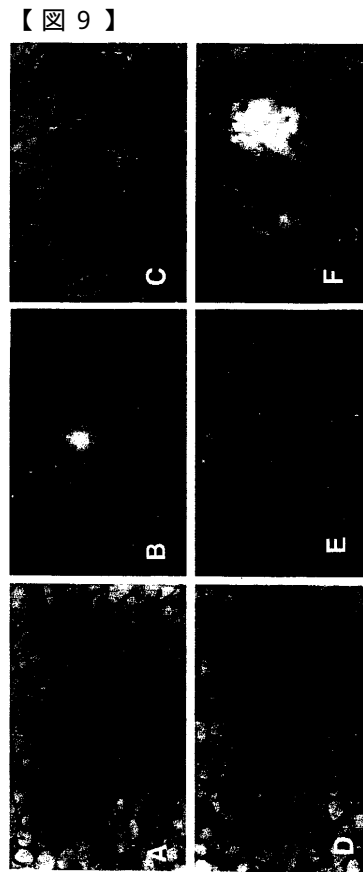


FIGURE 9

フロントページの続き

(56)参考文献 特表 2 0 0 0 - 5 0 3 5 3 4 (J P , A)

特開平 1 0 - 0 8 0 2 7 4 (J P , A)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 5 年, vol.92, p.6210-6214

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

JSTPlus(JDreamII)