(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4860886号
(P4860886)

(45)発行日　平成24年1月25日(2012.1.25)　(24)登録日　平成23年11月11日(2011.11.11)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 7/00	(2006.01)	C12N	7/00	
A61K 35/76	(2006.01)	A61K	35/76	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	

請求項の数 64　(全 43 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-500743 (P2002-500743)
(86)(22)出願日　平成13年5月31日 (2001.5.31)
(65)公表番号　特表2004-500858 (P2004-500858A)
(43)公表日　平成16年1月15日 (2004.1.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/017587
(87)国際公開番号　WO2001/092551
(87)国際公開日　平成13年12月6日 (2001.12.6)
審査請求日　平成20年5月15日 (2008.5.15)
(31)優先権主張番号　60/208,604
(32)優先日　平成12年6月1日 (2000.6.1)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(73)特許権者　500282209
ユニヴァーシティ・オヴ・ノース・キャロライナ・アト・チャペル・ヒル
アメリカ合衆国ノースカロライナ州２７５９９－４１０５，チャペル・ヒル，キャンパス・ボックス　４１０５，バイナム・ホール　３０８
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山　尚一
(74)代理人　100096769
弁理士　有原　幸一
(74)代理人　100107319
弁理士　松島　鉄男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】二本鎖パルボウイルスベクター

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
パルボウイルスキャプシドと、
５’から３’方向に、
（ｉ）５’パルボウイルス末端反復配列と、
（ｉｉ）第１の異種ヌクレオチド配列と、
（ｉｉｉ）パルボウイルスのＲｅｐタンパク質により分離不能な非分離末端反復配列と、
（ｉｖ）前記第１の異種ヌクレオチド配列に相補的である別個の異種ヌクレオチド配列と、
（ｖ）３’パルボウイルス末端反復配列と
を含むベクターゲノムであって、パルボウイルスキャプシドから放出されたとき、適切な条件において異種ヌクレオチド配列間で鎖内塩基対合することができる、ベクターゲノムと
を含む、二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２】
パルボウイルスキャプシドと、
５’から３’方向に、
（ｉ）５’パルボウイルス末端反復配列と、
（ｉｉ）第１の異種ヌクレオチド配列と、

（ｉｉｉ）パルボウイルスのＲｅｐタンパク質により分離不能な非分離末端反復配列と、
（ｉｖ）別個の異種ヌクレオチド配列と、
（ｖ）３’パルボウイルス末端反復配列と
を含むベクターゲノムであって、各末端反復配列と非分離末端反復配列との間のヌクレオチド配列が少なくとも９０％互いに相補的であり、さらに前記ベクターゲノムはパルボウイルスキャプシドから放出されたとき、適切な条件において異種ヌクレオチド配列間で鎖内塩基対合することができる、ベクターゲノムと
を含む、二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項３】
前記パルボウイルス末端反復配列がアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）末端反復配列である、請求項１又は２に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項４】
前記ＡＡＶ末端反復配列が、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５およびＡＡＶ６の末端反復配列からなる群から選択される、請求項３に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項５】
前記ＡＡＶ末端反復配列が、ＡＡＶ２の末端反復配列である、請求項４に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項６】
前記非分離末端反復配列が、パルボウイルスの分離不能な末端反復配列である請求項１又は２に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項７】
前記非分離末端反復配列が、ＡＡＶの分離不能な末端反復配列である請求項６に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項８】
末端分離部位（ｔｒｓ）が、パルボウイルスの分離不能な末端反復配列から欠失している、請求項６又は７に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項９】
Ｄエレメントの少なくとも一部が、前記パルボウイルスの分離不能な末端反復配列から欠失している、請求項６～８のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項１０】
前記分離不能な末端反復配列のＤエレメントにおける欠失が、Ａ／Ｄ接合部を超えてＡエレメント内に及ぶ、請求項９に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項１１】
前記分離不能なパルボウイルス末端反復配列が、Ｄエレメントに挿入物を含む、請求項６又は７に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項１２】
前記分離不能なパルボウイルス末端反復配列が、末端分離部位（ｔｒｓ）配列に挿入物を含む、請求項６又は７に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項１３】
前記分離不能なパルボウイルス末端反復配列が、末端分離部位（ｔｒｓ）配列に１つ以上のヌクレオチド塩基置換を含む、請求項６又は７に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項１４】
前記分離不能なパルボウイルス末端反復配列が、ＡＡＶ２のＲｅｐタンパク質により認識されないＡＡＶ血清型からの末端反復配列である、又は、ＡＡＶのＲｅｐタンパク質により認識されない自律パルボウイルスからの末端反復配列である、請求項６～１３のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。

【請求項１５】
前記ベクターゲノムのサイズが、野生型ＡＡＶゲノムの８０～１０５％である、請求項

１～１４のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項１６】
ポリペプチドが前記ベクターゲノムにコードされている、請求項１～１５のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項１７】
前記ポリペプチドが治療用ポリペプチドである、請求項１６に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項１８】
前記ポリペプチドが免疫原性ポリペプチドである、請求項１６に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項１９】
前記ポリペプチドが、エンドスタチン、アンギオスタチン、スーパーオキシドジスムターゼ、エリスロポイエチン、モノクローナル抗体、第ＩＸ因子、第Ｘ因子、リソソーム酵素（ヘキソサミニダーゼＡ及びイズロン酸スルファターゼを含む）、グロビン、レプチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、サイトカイン（α－インターフェロン、β－インターフェロン、インターフェロン－γ、インターロイキン－２、インターロイキン－４、インターロイキン－１２、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子及びリンホトキシンを含む）、ペプチド成長因子又はホルモン（ソマトトロピン、インスリン、インスリン様成長因子１、インスリン様成長因子２、血小板由来成長因子、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子、神経成長因子、神経栄養因子－３、神経栄養因子－４、脳由来神経栄養因子、グルア由来成長因子、トランスフォーミング成長因子－αおよびトランスフォーミング成長因子－βを含む）、受容体（腫瘍壊死因子受容体を含む）、自殺遺伝子産物（チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクロームＰ４５０、デオキシシチジンキナーゼ、および腫瘍壊死因子を含む）、癌治療薬に対する耐性を与えるタンパク質、および腫瘍サプレッサー遺伝子産物からなる群から選択される請求項１７に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２０】
前記ポリペプチドが、がん抗原又は腫瘍抗原である請求項１８に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２１】
前記ポリペプチドが、細菌抗原、ウイルス抗原、原生動物抗原、又は寄生性生物抗原である請求項１８に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２２】
前記ベクターゲノムが、アンチセンス核酸、リボソーム、スプライセオソーム介在性トランススプライシングを生じさせるＲＮＡ、干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）、又はガイドＲＮＡをコードする、請求項１～１５のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２３】
前記パルボウイルスキャプシドが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）キャプシドである、請求項１～２２のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２４】
前記パルボウイルスキャプシドが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５およびＡＡＶ６キャプシドからなる群から選択される、請求項２３に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２５】
鎖内塩基対合により形成される二本鎖異種ヌクレオチド配列が、プロモーター又はエンハンサーエレメントと機能的に関連している、請求項１～２４のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２６】
各末端反復配列と分離不能な末端反復配列の間のヌクレオチド配列が、少なくとも９５％互いに相補的である、請求項１～２５のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒

子。
【請求項２７】
ハイブリッドパルボウイルス粒子である、請求項１～２６のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２８】
キメラパルボウイルス粒子である、請求項１～２７のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項２９】
一以上の特定の細胞型に指向性をもつパルボウイルス粒子である、請求項１～２８のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子。
【請求項３０】
薬理学的に許容可能な担体中に請求項１～２９のいずれか１項に記載の複数の二本鎖パルボウイルス粒子を含む医用製剤。
【請求項３１】
パルボウイルスキャプシドにパッケージングされるビリオンＤＮＡを産生するための鋳型を含む核酸であって、前記鋳型が、パルボウイルス末端反復配列およびパルボウイルスのＲｅｐタンパク質により分離されることができない分離不能な末端反復配列に挟まれた異種ヌクレオチド配列を含む、核酸。
【請求項３２】
パルボウイルスキャプシドにパッケージングされるビリオンＤＮＡを産生するためのダイマー鋳型を含む核酸であって、前記鋳型が、５’から３’方向に、
５’パルボウイルス末端反復配列と、
第１の異種ヌクレオチド配列と、
パルボウイルスのＲｅｐタンパク質により分離不能な非分離末端反復配列と、
前記第１の異種ヌクレオチド配列に相補的である、別個の異種ヌクレオチド配列と、
３’パルボウイルス末端反復配列と
を含み、
前記ビリオンＤＮＡが、パルボウイルスキャプシドから放出されるとき、適切な条件下で、異種ヌクレオチド配列間で鎖内塩基対合することができる、核酸。
【請求項３３】
パルボウイルスキャプシドにパッケージングされるビリオンＤＮＡを産生するためのダイマー鋳型を含む核酸であって、前記鋳型が、５’から３’方向に、
５’パルボウイルス末端反復配列と、
第１の異種ヌクレオチド配列と、
パルボウイルスのＲｅｐタンパク質により分離不能な非分離末端反復配列と、
別個の異種ヌクレオチド配列と、
３’パルボウイルス末端反復配列と
を含み、
各末端反復配列と非分離末端反復配列との間のヌクレオチド配列が、少なくとも９０％互いに相補的であり、さらに前記ベクターゲノムはパルボウイルスキャプシドから放出されたとき、適切な条件において異種ヌクレオチド配列間で鎖内塩基対合することができる、核酸。
【請求項３４】
前記パルボウイルス末端反復配列が、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）末端反復配列である、請求項３１～３３のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項３５】
前記ＡＡＶ末端反復配列が、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５およびＡＡＶ６の末端反復配列からなる群から選択される、請求項３４に記載の核酸。
【請求項３６】
前記ＡＡＶ末端反復配列が、ＡＡＶ２である、請求項３５に記載の核酸。

【請求項３７】
前記非分離末端反復配列が、パルボウイルスの分離不能な末端反復配列である請求項３１～３３のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項３８】
前記パルボウイルスの非分離末端反復配列が、ＡＡＶの分離不能な末端反復配列である請求項３７に記載の核酸。
【請求項３９】
末端分離部位（ｔｒｓ）が、パルボウイルスの分離不能な末端反復配列から欠失している、請求項３７又は３８に記載の核酸。
【請求項４０】
Ｄエレメントの少なくとも一部が、前記パルボウイルスの分離不能な末端反復配列から欠失している、請求項３７～３９のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項４１】
前記パルボウイルスの分離不能な末端反復配列のＤエレメントにおける欠失が、Ａ／Ｄ接合部を超えてＡエレメント内に及ぶ、請求項４０に記載の核酸。
【請求項４２】
前記分離不能なパルボウイルス末端反復配列が、Ｄエレメントに挿入物を含む、請求項３７又は３８に記載の核酸。
【請求項４３】
前記分離不能なパルボウイルス末端反復配列が、末端分離部位（ｔｒｓ）配列に挿入物を含む、請求項３７又は３８に記載の核酸。
【請求項４４】
前記分離不能なパルボウイルス末端反復配列が、末端分離部位（ｔｒｓ）配列に１つ以上のヌクレオチド塩基置換を含む、請求項３７又は３８に記載の核酸。
【請求項４５】
前記分離不能なパルボウイルス末端反復配列が、ＡＡＶ２のＲｅｐタンパク質により認識されないＡＡＶ血清型からの末端反復配列である、又は、ＡＡＶのＲｅｐタンパク質により認識されない自律パルボウイルスからの末端反復配列である、請求項３７～４４のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項４６】
前記異種ヌクレオチド配列又はその相補的な配列が、ポリペプチドをコードする、請求項３１、又は請求項３１に従属する場合の請求項３４～４５のいずれか１項に記載された核酸。
【請求項４７】
前記鋳型がポリペプチドをコードする、請求項３２若しくは３３、又は請求項３２若しくは３３に従属する場合の３４～４５のいずれか１項に記載された核酸。
【請求項４８】
前記ポリペプチドが、治療用ポリペプチド又は免疫原性ポリペプチドである請求項４６又は４７に記載の核酸。
【請求項４９】
前記ポリペプチドが、エンドスタチン、アンギオスタチン、スーパーオキシドジスムターゼ、エリスロポイエチン、モノクローナル抗体、第ＩＸ因子、第Ｘ因子、リソソーム酵素（ヘキソサミニダーゼＡ及びイズロン酸スルファターゼを含む）、グロビン、レプチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、サイトカイン（α－インターフェロン、β－インターフェロン、インターフェロン－γ、インターロイキン－２、インターロイキン－４、インターロイキン－１２、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子及びリンホトキシンを含む）、ペプチド成長因子又はホルモン（ソマトトロピン、インスリン、インスリン様成長因子１、インスリン様成長因子２、血小板由来成長因子、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子、神経成長因子、神経栄養因子－３、神経栄養因子－４、脳由来神経栄養因子、グルア由来成長因子、トランスフォーミング成長因子－αおよびトランスフォーミング

成長因子－βを含む）、受容体（腫瘍壊死因子受容体を含む）、自殺遺伝子産物（チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクロームＰ４５０、デオキシシチジンキナーゼ、および腫瘍壊死因子を含む）、癌治療薬に対する耐性を与えるタンパク質、および腫瘍サプレッサー遺伝子産物からなる群から選択される請求項４８に記載の核酸。

【請求項５０】

前記ポリペプチドが、がん抗原又は腫瘍抗原である請求項４８に記載の核酸。

【請求項５１】

前記ポリペプチドが、細菌抗原、ウイルス抗原、原生動物抗原、又は寄生性生物抗原である請求項４８に記載の核酸。

【請求項５２】

前記異種ヌクレオチド配列又はその相補的な配列が、アンチセンス核酸、リボソーム、スプライセオソーム介在性トランススプライシングを生じさせるＲＮＡ、干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）、又はガイドＲＮＡをコードする、請求項３１、又は請求項３１に従属する場合請求項３４～４５のいずれか１項に記載の核酸。

【請求項５３】

前記鋳型が、アンチセンス核酸、リボソーム、スプライセオソーム介在性トランススプライシングを生じさせるＲＮＡ、干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）、又はガイドＲＮＡをコードする、請求項３２若しくは３３、又は請求項３２若しくは３３に従属する場合請求項３４～４５のいずれか１項に記載の核酸。

【請求項５４】

前記核酸が、プラスミド、裸のＤＮＡベクター、細菌の人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）又はウイルスベクターからなる群から選択される、請求項３１～５３のいずれか１項に記載の核酸。

【請求項５５】

前記核酸が、哺乳動物細胞の染色体に安定して組み込まれる、請求項３２～５３のいずれか１項に記載の核酸。

【請求項５６】

請求項３１～５５のいずれか１項に記載のヌクレオチド配列から産生されるビリオンＤＮＡ。

【請求項５７】

請求項３１～５５のいずれか１項に記載の核酸を含む培養細胞。

【請求項５８】

二本鎖パルボウイルス粒子をインビトロで産生する方法であって、

（ａ）請求項３１～５５のいずれか１項に記載の鋳型をコードする核酸と、

（ｂ）ベクターゲノムを産生するための鋳型の複製に十分な核酸と、

（ｃ）ベクターゲノムをパルボウイルスキャプシドにパッケージングするのに十分なヌクレオチド配列と

を、前記ベクターゲノムの複製、および前記ベクターゲノムの前記パルボウイルスキャプシドへのパッケージングに十分な条件で、細胞に提供することを含み、

それによって、パルボウイルスキャプシド内に包まれているベクターゲノムを含む二本鎖パルボウイルス粒子が細胞内で産生される、方法。

【請求項５９】

前記鋳型を含む核酸が、プラスミド又はウイルスベクター、好ましくはヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はバキュロウイルスベクターである請求項５８に記載の方法。

【請求項６０】

前記鋳型を含む核酸が、哺乳動物細胞の染色体に安定して組み込まれる、請求項５８に記載の方法。

【請求項６１】

二本鎖パルボウイルスが細胞内に入る条件下で、細胞に請求項１～２９のいずれか１項に記載の二本鎖パルボウイルス粒子を接触させることを含む、細胞にヌクレオチド配列を送達するためのインビトロの方法。

【請求項６２】

前記細胞が、がん細胞、腫瘍細胞、神経細胞（末梢神経系および脳細胞を含む中枢神経系の細胞を含む）、肺細胞、筋細胞、上皮細胞（腸管および呼吸器上皮細胞を含む）、肝細胞、樹状細胞、眼細胞（網膜細胞を含む）、膵細胞（島細胞を含む）、心筋細胞、骨細胞、脾細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、前立腺細胞、生殖細胞、前駆細胞、神経幹細胞及び臓幹細胞からなる群から選択される請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】

嚢胞性線維症および他の肺疾患、Ａ型血友病、Ｂ型血友病、サラセミア、貧血および他の血液障害、ＡＩＤＳ、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、癲癇および他の神経学的障害、がん、糖尿病、筋ジストロフィ（デュシェンヌ型筋ジストロフィ、ベッカー型筋ジストロフィを含む）、ゴーシェ病、フルラー病及びその他の代謝欠損症、及び網膜変性疾患（および他の眼疾患）からなる群から選択される疾患の治療ための、請求項３０の医用製剤。

【請求項６４】

がん又は腫瘍の治療のための請求項３０に記載の医用製剤。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

［関連出願情報］

本出願は、２０００年６月１日提出の米国特許仮出願第６０/２０８，６０４号（参照することによりその全体を本明細書の一部をなすものとする）の利益を請求する。

【０００２】

［連邦政府支援に関する記述］

本発明は、一部、米国国立衛生研究所から、ＨＬ５１８１８、ＨＬ４８３４７、およびＤＫ５４４１９の助成金番号で支援を受けて行われた。合衆国政府は、本発明に対して、ある一定の権利を有する。

【０００３】

［発明の分野］

本発明は、遺伝子送達用試薬に関する。さらに詳細には、本発明は、改良されたパルボウイルス系遺伝子送達ベクターに関する。

【０００４】

［発明の背景］

アデノ随伴ウイルス(ＡＡＶ）は、パルボウイルスファミリーの、非病原性ヘルパー依存的メンバーである。このグループを同定できる特徴の１つは、一本鎖ＤＮＡ(ｓｓＤＮＡ）ゲノムのキャプシド形成である。ＡＡＶの場合、別々の、プラスまたはマイナス方向性の鎖は、同じ頻度でパッケージされ、いずれも感染性である。ｓｓＤＮＡゲノムの各端にて、パリンドローム末端反復（ＴＲ）構造は、それ自身上で塩基対合して、ヘアピン立体配置をとる。これが、宿主細胞内で脱コート後、細胞性ＤＮＡポリメラーゼが相補鎖を合成するためのプライマーの役割を果たす。アデノ随伴ウイルスは、概して、増殖性感染にヘルパーウイルスを必要とする。アデノウイルス(Ａｄ）は、通例、この目的に役立つが、ＡＡＶ感染細胞をＵＶ照射またはヒドロキシ尿素(ＨＵ）で処理することにより、限定された複製が可能になる。

【０００５】

組換えＡＡＶ(ｒＡＡＶ）遺伝子送達ベクターも、プラス方向性またはマイナス方向性のｓｓＤＮＡをパッケージし、相補鎖合成のための細胞複製因子を頼みにしなければならない。当初、このステップは、細胞のＤＮＡ複製または修復経路によって、自発的に行われると考えられたが、これは、事実ではないようである。細胞をアデノウイルスに共感染させるとき、または遺伝毒性の薬剤で一時的に前処理するとき、マーカー遺伝子を発現でき

る能力が劇的に増強されることが、ｒＡＡＶベクターを用いた初期の研究で明らかにされた。この増強は、一本鎖ビリオンＤＮＡ(ｖＤＮＡ）からの二本鎖ＤＮＡの形成と相関関係がある。Ａｄ、電離放射線、またはトポイソメラーゼインヒビターで処理した後、ｒＡＡＶベクターの同様の誘導が、ｉｎ　ｖｉｖｏで確認されている。しかし、その作用は、異なる組織間および細胞型間で極めて多様である。別々の感染性ｒＡＡＶ粒子からの相補的ｖＤＮＡの再アニーリングが、ｒＡＡＶ形質導入に重要な経路であることが、つい最近、判明した。

【０００６】

相補鎖合成の必要条件、すなわち動員は、現在、ｒＡＡＶベクターの効率における制限因子であると考えられている。マウス肝臓におけるｒＡＡＶの形質導入率は、４．２×10^{10}粒子の門脈注入後、肝細胞のおよそ５％であると見積もられている。その後の実験で、ｒＡＡＶ　ｖＤＮＡが、肝細胞の実質的に全ての核に取込まれたこと、およびこれらのゲノムの形質導入潜在能力は、アデノウイルスに共感染させることにより、レスキューできることが明らかになった。このことは、共感染性アデノウイルスの存在下で、マウス肝細胞の最高２５％が10^{10}粒子のｒＡＡＶで形質導入されたという、初期の報告と一致する。肝臓組織におけるｒＡＡＶからの発現は、二本鎖ＤＮＡの形成と同時に起こり、また、５～１３週以内に二本鎖に変換されなければ、ｖＤＮＡはなくなるようである。マウス肝細胞の亜集団は、ｉｎ　ｖｉｖｏで、ｒＡＡＶ形質導入に対して一時的に寛容であることが、さらなる実験から示唆される。

【０００７】

従って、本発明は、当技術分野における改良されたパルボウイルス遺伝子送達ベクターの要求に対処する。特に、本発明は、従来のＡＡＶ遺伝子送達ベクターによる相補鎖合成の要求に対処する。

【０００８】

［発明の概要］

ＡＡＶゲノムの一本鎖特性は、他のどの生物学的特徴よりも、ｒＡＡＶベクターの発現に影響を与えると考えられる。潜在的に変化しやすい細胞機構に頼ってｒＡＡＶベクターに相補鎖を提供するのではなく、両鎖を１つのＤＮＡ分子としてパッケージすることによって、この問題を回避できることが現在では分かっている。本明細書に記載の研究で、従来のｒＡＡＶより高い、二本鎖ベクターからの形質導入の効率がＨｅＬａ細胞で確認された(５～１４０倍）。さらに重要なことは、従来の一本鎖ＡＡＶベクターと違って、ＤＮＡ複製のインヒビターが、本発明の二本鎖ベクターからの形質導入に影響を与えなかったことである。加えて、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターは、ｒＡＡＶベクターがｉｎ　ｖｉｖｏにおいてマウス肝細胞で示すより、速やかな導入遺伝子発現の開始、およびより高いレベルの導入遺伝子発現を示した。こうした生物学的特質の全てによって、進行中の、パルボウイルス系遺伝子送達システムの開発に著しく貢献する、新しいクラスのパルボウイルスベクター(送達用二本鎖ＤＮＡ）の生成および特性決定が裏付けられる。

【０００９】

総じて、結果として１つの分子に一緒に繋留されたプラス方向性およびマイナス方向性の鎖を共パッケージすることになる、二本鎖ゲノムを担持する新規なタイプのパルボウイルスベクターが構築されており、本明細書に記載の調査研究によって特性決定されている。従って、本発明は、パルボウイルスキャプシド(たとえば、ＡＡＶキャプシド）および異種ヌクレオチド配列をコードするベクターゲノムを含み、このベクターゲノムが自己相補的である、すなわち、このベクターゲノムが、ダイマー逆方向反復である、パルボウイルス粒子を提供する。ベクターゲノムは、好ましくは、ベクターゲノムが中にパッケージされるパルボウイルスキャプシドに対応する野生型パルボウイルスゲノム(たとえば、ＡＡＶゲノム）のサイズくらいであり、且つ適切なパッケージングシグナルを含む。本発明は、さらに、上述のベクターゲノムおよびそれをコードする鋳型を提供する。

【００１０】

さらなる態様として、本発明は、パルボウイルスキャプシド、および５’から３’に向か

って、(ｉ）５’パルボウイルス末端反復配列；(ｉｉ）第１の異種ヌクレオチド配列；(ｉｉｉ）分離不能なパルボウイルス末端反復配列；(ｉｖ）第１の異種ヌクレオチド配列に本質的に完全に相補的である、別個の異種ヌクレオチド配列；および(ｖ）３’パルボウイルス末端配列を含むベクターゲノムであって、適切な条件で、パルボウイルスキャプシドから放出されるとき、異種ヌクレオチド配列間で鎖内塩基対合することができる、ベクターゲノムを含む、二本鎖パルボウイルス粒子を提供する。二本鎖配列は、遺伝子発現(すなわち、転写、および任意に、翻訳）に適した基質、または、ベクターゲノムを二本鎖形に変換させるために宿主細胞機構を必要としない宿主細胞における宿主組換えの基質(すなわち、ｄｓＤＮＡ鋳型）である、相補的異種ヌクレオチド配列間の塩基対合によって形成される。

【００１１】

ベクターゲノム(またはそれを作製するための鋳型、以下参照）に関して、５’および３’という呼称は、２つの相補的異種配列の間に形成された二本鎖配列からの転写の特定の方向を示すものではない。「コード鎖」は、ビリオンＤＮＡの５’半分または３’半分のいずれの上にあってもよい。用語「コード鎖」は、所望の転写物をコードする鎖を示すために、その最も広い意味で使用されており、また、アンチセンス配列を含む非翻訳配列も含むことを、当業者は理解するであろう。従って、転写は、ベクターゲノムの５’半分における第１の異種ヌクレオチド配列の５’末端から開始してもよく、あるいはベクターゲノムの３’半分の、相補的ヌクレオチド配列の５’末端から開始してもよい。

【００１２】

言い換えれば、鎖内塩基対合で形成される二本鎖ｖＤＮＡの場合、転写は、ヘアピン構造の開放末端から開始してもよく、あるいは閉鎖末端(すなわち、分離不能な　ＴＲに最も近い末端）から開始してもよい。

【００１３】

この実施形態によれば、パルボウイルスキャプシドは、ＡＡＶキャプシドであることが好ましい。パルボウイルス末端反復配列および／または分離不能な末端反復配列は、ＡＡＶ配列であることが、さらに好ましい。

【００１４】

ある特定の実施形態では、二本鎖パルボウイルス粒子は、自己相補的ｖＤＮＡにおける鎖内塩基対合によって形成される二本鎖配列の発現に十分な発現調節配列(たとえば、プロモーター）を含む。

【００１５】

このベクターゲノムは、さらに、鎖内塩基対合によって形成される二本鎖配列から２つ以上の転写物を発現することが可能である。

【００１６】

さらなる態様として、本発明は、ビリオンＤＮＡを作製するための鋳型であって、パルボウイルス末端反復配列と分離不能なパルボウイルス末端反復配列に挟まれた異種ヌクレオチド配列を含む鋳型を含む、ヌクレオチド配列を提供する。

【００１７】

またさらなる態様として、本発明は、適切な条件で、パルボウイルスキャプシドから放出されるとき、異種ヌクレオチド配列間で鎖内塩基対合してｄｓＤＮＡを形成することができることを特徴とする、ビリオンＤＮＡを作製するためのダイマー鋳型であって、５’から３’に向かって、５’パルボウイルス末端反復配列；第１の異種ヌクレオチド配列；分離不能なパルボウイルス末端反復配列；第１の異種ヌクレオチド配列に本質的に完全に相補的である、別個の異種ヌクレオチド配列；および(ｖ）３’パルボウイルス末端配列を含む鋳型を含むヌクレオチド配列を提供する。

【００１８】

好ましくは、このパルボウイルス末端反復配列および／またはパルボウイルス分離不能な末端反復配列は、ＡＡＶ配列である。

【００１９】

本発明は、さらに、本発明の創意に富む二本鎖パルボウイルスベクターを作製および投与する方法を提供する。ある特定の実施形態において、本発明は、薬学的に許容できる担体内の、本発明による二本鎖パルボウイルス粒子を被検対象に投与することを含む、ヌクレオチド配列を被検対象に投与する方法を提供する。好ましくは、この二本鎖パルボウイルス粒子は、それを必要としている被検対象に、治療有効量で投与されることが好ましい。

【００２０】

さらなる態様として、本発明は、二本鎖パルボウイルス粒子と：パルボウイルスキャプシド、および(ｉ）５’パルボウイルス末端反復配列；(ｉｉ）第１の異種ヌクレオチド配列；(ｉｉｉ）中心に位置するパルボウイルス末端反復配列；(ｉｖ）第１の異種ヌクレオチド配列に本質的に完全に相補的である、別個の異種ヌクレオチド配列；および(ｖ）３’パルボウイルス末端配列を含むベクターゲノムであって、適切な条件で、パルボウイルスキャプシドから放出されるとき、異種ヌクレオチド配列間で鎖内塩基対合することができる、二本鎖ベクターゲノムを含む、二本鎖パルボウイルス粒子と、細胞を接触させるステップを含む、ヌクレオチド配列を細胞に送達する方法を提供する。

【００２１】

この実施形態によれば、パルボウイルスキャプシドは、ＡＡＶキャプシドであり、ベクターゲノムは、野生型ＡＡＶゲノムのサイズくらいであることが好ましい。パルボウイルス末端反復配列が、ＡＡＶ配列であることは、さらに好ましい。細胞は、二本鎖パルボウイルス粒子と、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで接触させてもｉｎ　ｖｉｖｏで接触させてもよい。

【００２２】

これらの態様および本発明の他の態様を、下記の発明の詳細な説明に、さらに詳細に説明する。

【００２３】

［発明の詳細な説明］

次に、本発明の好ましい実施形態を示す、添付の図面を参照しながら、本発明を説明する。しかし、本発明は、異なる形態で具象化することが可能であり、本明細書に記載の実施形態に限定されるものと考えてはならない。むしろ、これらの実施形態は、この開示内容が周到で完全になるように、また、当業者に本発明の範囲を十分に伝えるために、提供するものである。

【００２４】

特に規定がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野において通常に熟練した者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書で、本発明の説明に使用される専門用語は、個々の実施形態を説明するために限られ、本発明を限定する意図はない。本発明の説明および添付のクレームで使用される、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、前後関係から、そうではないことが明白に示されない限り、複数形も含むことを意図する。本明細書に記載の、全ての出版物、特許出願、特許、および他の参考文献を、参照することにより本明細書の一部に組み込むものとする。

【００２５】

具体的に記載がない限り、本明細書では、ヌクレオチド配列を、１本の鎖のみによって、５’から３’に向かって、左から右に、示す。本明細書では、ヌクレオチドおよびアミノ酸を、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎが推奨する方法で、または(アミノ酸の場合）、一文字コードまたは三文字コード（両者とも、３７　ＣＦＲ　１．８２２および確立された用法に準拠する）のいずれかによって示す。たとえば、Ｐａｔｅｎｔｉｎ　Ｕｓｅｒ　Ｍａｎｕａｌ，９９－１０２(Ｎｏｖ．１９９０）（Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　ａｎｄ　Ｔｒａｄｅｍａｒｋ　Ｏｆｆｉｃｅ）を参照されたい。

【００２６】

特に記載がない限り、組換えパルボウイルスおよびｒＡＡＶ構築物、パルボウイルスｒｅｐおよび／またはｃａｐ配列を発現するパッケージングベクター、ならびに一時的におよ

びしっかりとトランスフェクトされたパッケージング細胞の構築に、当業者に周知の標準方法を使用することができる。このような技術は、当業者に周知である。たとえば、ＳＡＭＢＲＯＯＫ ｅｔ ａｌ，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ 第2版（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９）；Ｆ．Ｍ．ＡＵＳＵＢＥＬ ｅｔ ａｌ．ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ)を参照されたい。

【００２７】

パルボウイルスは、比較的小さいＤＮＡ動物ウイルスであり、線状の一本鎖ＤＮＡゲノムを含む。本明細書で使用される用語「パルボウイルス」は、自律増殖パルボウイルスおよびディペンドウイルス(dependvirus)を含む、Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ科を含む。自律増殖パルボウイルスには、パルボウイルス属、エリスロウイルス属、デンソウイルス属、イテラウイルス属、およびコントラウイルス属のメンバーが含まれる。代表的な自律パルボウイルスとしては、マウス微小ウイルス、ウシパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ニワトリパルボウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコパルボウイルス、ガチョウパルボウイルス、およびＢ１９ウイルスなどがあるが、それらに限定されない。他の自律パルボウイルスは、当業者に周知である。たとえば、ＢＥＲＮＡＲＤ Ｎ．ＦＩＥＬＤＳ ｅｔ ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ、２巻、６９章（第３版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を参照されたい。

【００２８】

ディペンド属ウイルスには、ＡＡＶ１型、ＡＡＶ２型、ＡＡＶ３型、ＡＡＶ４型、ＡＡＶ５型、ＡＡＶ６型、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、およびヒツジＡＡＶなどを含むがその限りではない、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）が含まれる。たとえば、ＢＥＲＮＡＲＤ Ｎ．ＦＩＥＬＤＳ ｅｔ ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ、２巻、６９章（第３版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を参照されたい。

【００２９】

本明細書で使用される用語「ベクター」または「遺伝子送達ベクター」は、遺伝子送達媒体の役割を果たし、且つパルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）キャプシド内にパッケージされたｖＤＮＡ（すなわち、ベクターゲノム）を含む、パルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）粒子を指すことがある。あるいは、状況によっては、用語「ベクター」は、ベクターゲノム/ｖＤＮＡを指すのに使用されることもある。

【００３０】

「異種ヌクレオチド配列」は、一般に、ウイルス中に自然発生的に存在しない配列であってもよい。あるいは、異種ヌクレオチド配列は、（たとえば、ウイルスでは、自然には関連のないプロモーターとの関連で）非天然の環境に置かれるウイルスの配列を指すこともある。

【００３１】

本明細書で使用される「組換えパルボウイルスベクターゲノム」は、異種（たとえば、外来の）ヌクレオチド配列（たとえば、導入遺伝子）が中に挿入されているパルボウイルスゲノム（すなわち、ｖＤＮＡ）である。「組換えパルボウイルス粒子」は、パルボウイルスキャプシド内にパッケージされた組換えパルボウイルスベクターゲノムを含む。

【００３２】

同様に、「ｒＡＡＶベクターゲノム」は、異種ヌクレオチド配列を含むＡＡＶゲノム（すなわち、ｖＤＮＡ）である。ｒＡＡＶベクターは、ウイルス生成に、シスで１４５塩基末端反復のみを必要とする。全ての他のウイルス配列は、不必要であり、トランスで供給されてもよい（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，（１９９２）Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７）。ベクターが効率よくパッケージすることができる導入遺伝子のサイズを最小限に抑えるために、一般に、ｒＡＡＶベクターゲノムは、最

小限の末端反復（ＴＲ）配列を保持するに過ぎない。「ｒＡＡＶ粒子」は、ＡＡＶキャプシド内にパッケージされたｒＡＡＶベクターゲノムを含む。

【００３３】

本発明のパルボウイルス粒子は、ウイルスのＴＲおよびウイルスのキャプシドが、異なるパルボウイルスに由来する「ハイブリッド」粒子であってもよい。好ましくは、ウイルスのＴＲおよびキャプシドは、（たとえば、国際公開ＷＯ００/２８００４号、米国特許仮出願第６０/２４８，９２０号、およびＣｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２：６１９（それらの開示内容全てを、本明細書に組み込むものとする）に記載されている）異なる血清型のＡＡＶに由来する。同様に、パルボウイルスは、（たとえば、異なるパルボウイルス、好ましくは異なるＡＡＶ血清型に由来する、配列を含む）「キメラ」キャプシド、または国際特許公開公告ＷＯ００/２８００４号に記載の「標的（ｔａｒｇｅｔｅｄ）」キャプシド（たとえば、方向付けられた親和性(directed tropism)）を具有してもよい。

【００３４】

好ましくは、本発明の二本鎖パルボウイルス粒子は、ＡＡＶキャプシドを有し、これは、上述のキメラまたは標的キャプシドによって促進することが可能である。

【００３５】

本発明の「二本鎖」パルボウイルス粒子およびベクターゲノムは、本明細書では、「ダイマー」または「自己相補的」ベクターと互換可能に表すことがある。本発明の二本鎖パルボウイルス粒子は、ビリオンＤＮＡ（ｖＤＮＡ）を含むパルボウイルスキャプシドを含む。このｖＤＮＡは、ウイルスキャプシドから放出されたとき、ヘアピン構造を形成することができるように、自己相補的である。この二本鎖ｖＤＮＡは、従来のパルボウイルスベクターでは必要な、第２鎖合成を必要とせずに、宿主細胞により発現され得る（すなわち、転写され、また、任意に、翻訳される）ことが可能な二本鎖ＤＮＡを宿主細胞に提供するようである。

【００３６】

二本鎖パルボウイルスベクターゲノムは、選択されたパルボウイルスキャプシド（たとえば、ＡＡＶキャプシド）内に、キャプシド形成に十分なパッケージング配列を含むことが好ましい。

【００３７】

二本鎖ｖＤＮＡは、全ての条件において二本鎖形で存在しないかもしれないが、相補的ヌクレオチド塩基のアニーリングに有利な条件で、二本鎖形で存在できる能力を有することを、当業者は理解するであろう。従って、用語「二本鎖パルボウイルスベクター」は、ｖＤＮＡが必ず二本鎖または二本鎖形（たとえば、自己相補鎖の間に塩基対合がある）でパルボウイルスキャプシド内に存在することを示すものではないしない。事実、ｖＤＮＡは、パルボウイルスキャプシド内にパッケージされている間、二本鎖形でない公算が高いことを当業者は理解するであろう。

【００３８】

本発明の二本鎖パルボウイルスベクターからの異種ヌクレオチド配列（下記の通り）の発現は、比較可能なパルボウイルス（たとえば、ｒＡＡＶ）ベクターと比較して、「増強される」ことが好ましい。二本鎖パルボウイルスベクターによる遺伝子発現は、比較可能なモノマーパルボウイルスベクターからより実質的に速やかに、検出されることが好ましい。たとえば、遺伝子発現は、二本鎖パルボウイルスベクターの投与後、約２週未満で検出でき、好ましくは約１週未満、さらに好ましくは約７２時間未満、なおいっそう好ましくは、約４８時間未満、なおいっそう好ましくは、約２４時間未満で検出することができる。遺伝子発現は、当技術分野で周知の任意の方法で、たとえば、転写、翻訳、または生物学的活性または異種ヌクレオチド配列発現の結果として生じる表現型作用（たとえば、血液凝固時間）によって、検出することができる。

【００３９】

あるいは、二本鎖パルボウイルスベクターからの遺伝子発現は、比較可能なモノマーパル

ボウイルスベクター（たとえば、ｒＡＡＶベクター）と比較するとき、より高いレベルの遺伝子発現が検出される（前段に記載の通り）点で「増強されて」いてもよい。ウイルスの投与後、同時点における遺伝子発現レベルで比較してもよい。あるいは、各ベクターで達成される最高レベルの遺伝子発現間で比較してもよい。

【００４０】

本発明の二本鎖パルボウイルスベクターは、従来のパルボウイルスベクターと比較して、改良された形質導入単位（ｔｕ）と粒子との比率を都合よく有することが可能である。従って、本発明は、従来のパルボウイルスベクター（たとえば、ｒＡＡＶベクター）の組成物と比較して改良されたｔｕ／粒子比を有する新規なパルボウイルスベクター組成物も含む。好ましくは、ｔｕ／粒子比は、約５０：１未満、約２０：１未満、約１５：１未満、約１０：１未満、約８：１未満、約７：１未満、約６：１未満、約５：１未満、約４：１未満、またはそれ以下である。ｔｕ／粒子比の特定の下限はない。一般に、ｔｕ／粒子比は、約１：１、２：１、３：１または４：１より大きい。

【００４１】

用語「鋳型」または「基質」は、本書では、一般に、本発明の二本鎖パルボウイルスｖＤＮＡを作製するために複製することが可能なポリヌクレオチド配列を指すのに使用される。ベクター作製のために、一般に、プラスミド、裸のＤＮＡベクター、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）またはウイルスベクター（たとえば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、エプスタインバーウイルス、ＡＡＶ、バキュロウイルスベクター、レトロウイルスのベクター等々）を含むがその限りではない、大きいヌクレオチド配列または構築物内に、鋳型を包埋する。あるいは、鋳型をパッケージング細胞の染色体にしっかり組み込んでもよい。

【００４２】

本明細書で使用される用語「ポリペプチド」は、特に記載がなければ、ペプチドとタンパク質の両者を含む。

【００４３】

本明細書で使用される、ＡＡＶによる細胞「形質導入」または「感染」は、それぞれ、ＡＡＶが細胞に入って、不顕性のまたは活性な（すなわち、溶菌性の）感染を確立することを意味する。たとえば、ＢＥＲＮＡＲＤ Ｎ．ＦＩＥＬＤＳ ｅｔ ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ，２巻、６９章（３章、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を３章されたい。ヌクレオチド配列を細胞に送達するために、ｒＡＡＶベクターを細胞に導入する本発明の実施形態では、ＡＡＶがゲノムに統合されて不顕性感染を確立することが好ましい。

【００４４】

＜二本鎖パルボウイルスベクター＞

本発明は、ある程度、（上述の）「二本鎖」ＤＮＡパルボウイルスベクターを、遺伝子送達に都合よく使用できるという発見に基づく。さらに、この研究は、これらの二本鎖パルボウイルスベクターは、たとえば、改良された形質導入と粒子との比、より速やかな導入遺伝子発現、より高いレベルの導入遺伝子発現、および／またはより持続的な導入遺伝子発現など、ＡＡＶベクターより効率がよい可能性があることを証明した。本発明者は、さらに、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターを、一般にＡＡＶ形質導入に抵抗する宿主細胞への遺伝子送達に使用できることを証明した。従って、これらの二本鎖パルボウイルスベクターは、ＡＡＶベクターと異なる（たとえば、より広い）宿主範囲を有する。

【００４５】

本発明に開示の二本鎖パルボウイルスベクターは、ウイルスキャプシド内、好ましくは、パルボウイルスキャプシド内、さらに好ましくは、ＡＡＶキャプシド内にパッケージされたダイマー自己相補的（ｓｃ）ポリヌクレオチド（一般に、ＤＮＡ）である。幾つかの点で、キャプシド内にパッケージされるウイルスゲノムは、プラスおよびマイナス方向性パルボウイルスＤＮＡ鎖を作製するために分離することができない、本質的に「捕捉」された複製中間生成物である。従って、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターは、従来の組

換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）ベクターにおける固有の宿主細胞仲介相補的ＤＮＡの合成の必要性を回避し、その結果、ｒＡＡＶベクターの制限の１つに対処するようである。

【００４６】

一端で接合した両鎖が、１つの感染性キャプシド内に含まれるように、ウイルスに、一本鎖パルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）ベクターゲノムの本質的にダイマーの逆方向反復をパッケージさせることによって、この結果が得られる。キャプシドから放出されるとき、相補的配列が再アニーリングして、標的細胞内で、転写的に活性な二本鎖ＤＮＡを形成する。

【００４７】

本明細書に開示の二本鎖パルボウイルスベクターは、ｖＤＮＡが鎖内塩基対合によって二本鎖ヘアピン構造を形成できる点、および両ＤＮＡ鎖がキャプシドに包まれている点で、従来のパルボウイルス（たとえば、ｒＡＡＶ）ベクター、および親パルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）と本質的に異なる。従って、この二本鎖パルボウイルスベクターは、二本鎖パルボウイルスベクターが由来するパルボウイルスよりむしろ、二本鎖ＤＮＡウイルスベクターに機能的に似ている。この特徴は、所望の標的細胞が、通常は、Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅによってキャプシドに包まれている一本鎖ゲノムに対する相補的ＤＮＡを合成する傾向が欠乏しているｒＡＡＶ仲介遺伝子導入の、以前に確認された欠点に対処する。

【００４８】

ウイルスのキャプシドは、上述の、自律パルボウイルスかまたはディペンドウイルスのいずれのパルボウイルスからであってもよい。好ましくは、ウイルスキャプシドは、ＡＡＶキャプシド（たとえば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５またはＡＡＶ６キャプシド）である。概して、ＡＡＶ１キャプシド、ＡＡＶ５キャプシド、およびＡＡＶ３キャプシドが好ましい。パルボウイルスキャプシドの選択は、当技術分野で周知の多数の考慮すべき要件、たとえば、標的細胞型、所望の発現レベル、発現させる異種ヌクレオチド配列の性質、ウイルス産生に関する問題点等々に基づいてもよい。たとえば、ＡＡＶＩキャプシドは、骨格筋、肝臓および中枢神経系（たとえば、脳）の細胞に；ＡＡＶ５は、気道および肺における細胞に；ＡＡＶ３は、骨髄細胞に；ＡＡＶ４は、脳内細胞に（たとえば、アペンダブル（ａｐｐｅｎｄａｂｌｅ）細胞）に、都合よく使用することができる。

【００４９】

パルボウイルス粒子は、ウイルスＴＲおよびウイルスキャプシドが、異なるパルボウイルスに由来する「ハイブリッド」粒子であってもよい。好ましくは、ウイルスのＴＲおよびキャプシドは、ＡＡＶの異なる血清型に由来する（たとえば、国際公開ＷＯ００／２８００４号、米国特許仮出願第６０／２４８，９２０号；およびＣｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２：６１９（それらの開示内容を、全て本明細書に組み込むものとする）に記載）。同様に、パルボウイルスは、これらの出版物に記載されている通り、「キメラ」キャプシド（たとえば、異なるパルボウイルスからの配列を含む）または「標的」キャプシド（たとえば、方向付けられた親和性）を具有してもよい。

【００５０】

本明細書で使用される「二本鎖パルボウイルス粒子」は、ハイブリッド、キメラおよび標的イルス粒子を含む。好ましくは、二本鎖パルボウイルス粒子は、ＡＡＶキャプシドを有し、これは、上述のキメラまたは標的キャプシドによって促進することができる。

【００５１】

本発明による二本鎖パルボウイルスベクターは、任意の適当な方法で作製することができる。好ましくは、ｖＤＮＡを作製するための鋳型は、二本鎖ｖＤＮＡを形成することができる能力を備えたモノマーｖＤＮＡ（すなわち、産生されるｖＤＮＡの大半が二本鎖である）よりむしろ、優先的に二本鎖を生じるものである。好ましくは、鋳型からの複製産物の少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％またはそれ以上が二本鎖である。

【００５２】
ある特定の実施形態において、鋳型は、１つ以上の末端反復（ＴＲ）配列を含むＤＮＡ分子である。この鋳型は、パルボウイルスＲｅｐタンパク質によって分離（すなわち、ニック）することができない、修飾されたＴＲも含む。複製中、Ｒｅｐタンパク質が、修飾されたＴＲを分離できない結果として、分離不能ＴＲによって共有的に結び付いた２つの「モノマー」を有する、安定した中間生成物を生じる。この「二本鎖」分子を、パルボウイルス（ＡＡＶ）キャプシド内にパッケージして、新規な二本鎖パルボウイルスベクターを作製することができる。
【００５３】
発明の特定の理論に捕われたくないが、ビリオンゲノムは、ウイルスのキャプシド内にパッケージされている間、一本鎖形で保持される公算が高い。ウイルスの感染中に、キャプシドから放出されるとき、ダイマー分子は、鎖内塩基対合によって「跳ね返る（ｓｎａｐ　ｂａｃｋ）」か、またはアニーリングして、二本鎖分子を形成し、分離不能なＴＲ配列は共有的に閉鎖したヘアピン構造を一端に形成するようである。この二本鎖ｖＤＮＡによって、ＡＡＶ形質導入の律速段階であるとみなされてきた、宿主細胞仲介第２鎖合成が不用になる。
【００５４】
好ましい実施形態において、この鋳型は、標的細胞に送達するためにパッケージされる異種ヌクレオチド配列（後述する）をさらに含む。この実施形態によれば、異種ヌクレオチド配列は、基質の両端のウイルスＴＲの間に位置する。さらなる好ましい実施形態では、パルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）ｃａｐ遺伝子およびパルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）ｒｅｐ遺伝子が鋳型（およびそれから作製されるｖＤＮＡ）から欠失している。この立体構造によって、パルボウイルスキャプシドが運ぶ異種核酸配列のサイズが最大になる。
【００５５】
ある特定の実施形態において、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターを作製するための鋳型は、（後述する）関心のある異種ヌクレオチド配列を挟む５’末端および３’末端に、少なくとも１つのＴＲを含む。基質の一端にあるＴＲは分離不能である、すなわち、Ｒｅｐタンパク質で分離（ニック）することができない。複製中、複製中、Ｒｅｐタンパク質が、ＴＲの１つを分離できない結果として、非機能的（すなわり、分離不能な）ＴＲによって共有的に結び付いた２つの「モノマー」を有する、安定した中間生成物を生じる。この異種ヌクレオチド配列は、分離不能なＴＲに関して、いずれの方向であってもよい。
【００５６】
用語「挟まれた」は、その配列が必ずしも隣接していることを示す意図はない。たとえば、前段の例では、異種ヌクレオチド配列とＴＲとの間に介在配列があってもよい。２つの他のエレメントによって「挟まれた」配列は、一方のエレメントが５’からその配列までに位置し、他方が３’からその配列までに位置することを示すが、介在配列がその間に存在していてもよい。
【００５７】
この実施形態によれば、本発明の二本鎖パルボウイルスｖＤＮＡを作製するための鋳型は、好ましくは、ｖＤＮＡが中にパッケージされるキャプシドに対応する野生型パルボウイルスゲノム（たとえば、ＡＡＶ）のサイズの約半分である。言い換えれば、この鋳型は、好ましくは、野生型の約４０％～約５５％、さらに好ましくは、野生型の約４５％～約５２％である。従って、この鋳型から作製される二本鎖ｖＤＮＡは、好ましくは、ｖＤＮＡが中にパッケージされるキャプシドに対応する野生型パルボウイルスゲノム（たとえば、ＡＡＶ）のサイズくらいの、たとえば、野生型の約８０％～約１０５％である、全サイズを有する。ＡＡＶの場合、ＡＡＶキャプシドが、野生型ＡＡＶゲノムから、実質的にサイズが外れたｖＤＮＡのパッケージングに不利であることは、当技術分野で周知である。ＡＡＶキャプシドの場合、二本鎖ｖＤＮＡは、好ましくはおよそ５．２ｋｂ以下のサイズである。他の実施形態では、二本鎖ｖＤＮＡは、好ましくは、約３．６、３．８、４．０

、４．２、または４．４ｋｂより長く、且つ／または約５．４、５．２、５．０５または４．８ｋｂ未満の長さである。

【００５８】

言い換えれば、パルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）キャプシドで二本鎖鋳型をパッケージしやすくするために、異種ヌクレオチド配列は、一般に、約２．５ｋｂ未満の長さ（さらに好ましくは約２．４ｋｂ未満、なおいっそう好ましくは約２．２ｋｂ未満の長さ、さらに好ましくは約２．１ｋｂ未満の長さ）である。

【００５９】

別の実施形態では、鋳型それ自体が二本鎖である。すなわち、ダイマー自己相補的分子である。この実施形態によれば、鋳型は、分離可能なＴＲを両端に含む。この鋳型は、中心に位置する（上述の）分離不能なＴＲをさらに含む．言い換えれば、分離不能なＴＲの両側の鋳型の各半分は、ほぼ同じ長さである。鋳型の各半分は（すなわち、分離可能なＴＲと分離不能なＴＲとの間に）、関心のある１つ以上の異種ヌクレオチド配列を含む。分子の各半分における異種ヌクレオチド配列は、分離可能なＴＲと中心の分離不能なＴＲに挟まれている。

【００６０】

鋳型からの複製産物が、相補的配列間の塩基対合によって二本鎖分子を形成できるように、鋳型の半分における配列は、実質的に相補的である（すなわち、少なくとも約９０％、９５％、９８％、９９％またはそれ以上のヌクレオチド配列相補性）。言い換えれば、この鋳型は、分離不能なＴＲでつながれた２つの半分と本質的に逆方向反復である。

【００６１】

好ましくは、鋳型の各半分における異種ヌクレオチド配列は、本質的に完全に自己相補的である（すなわち、取るに足りない数のミスマッチ塩基を含むか、またはミスマッチ塩基対を全く含まない）。ヌクレオチド配列の２つの半分が、本質的に完全に自己相補的であることも好ましい。

【００６２】

この実施形態によれば、鋳型（およびそれから作製されるｖＤＮＡ）は、パルボウイルスキャプシド内に効率よくパッケージしやすくするために、好ましくは、パルボウイルスキャプシド（たとえば、ＡＡＶ）で自然に包まれた野生型ゲノムとほぼ同じサイズである。たとえば、ＡＡＶキャプシドの場合、鋳型は、好ましくは野生型ＡＡＶゲノムのサイズくらいである。ある特定の実施形態では、鋳型は、およそ５．２ｋｂ以下のサイズである。他の実施形態では、鋳型は、好ましくは、約３．６、３．８、４．０、４．２、または４．４ｋｂより長く、且つ／または約５．４、５．２、５．０または４．８ｋｂ未満の長さである。言い換えれば、鋳型は、好ましくは、野生型パルボウイルスゲノム（たとえば、ＡＡＶ）の８０％～１０５％の範囲内である。

【００６３】

（分離可能なおよび分離不能な）ＴＲは、好ましくは、ＡＡＶ配列であり、血清型１、２、３、４、５および６が好ましい。用語「末端反復」は、Ｓａｍｕｌｓｋｉらに付与された米国特許第５，４７８，７４５号（その開示内容全てを、参照することにより本明細書の一部をなすものとする）に記載の「二重Ｄ配列」等の、ＡＡＶ逆方向末端反復の役割をする合成配列を含む。ＴＲが、所望の機能たとえば、ウイルスパッケージング、組み込み、および／またはプロウイルスレスキュー等々を仲介する限り、本発明による分離可能なＡＡＶ　ＴＲは、野生型ＴＲ配列を具有する必要はない（たとえば、野生型配列は、挿入、欠失、末端部の切断(truncation)またはミスセンス突然変異によって変えることが可能である）。一般に、ＴＲは、同一パルボウイルスに由来する、たとえば、両ＴＲ配列ともＡＡＶ２に由来するが、必ずしもそうではない。

【００６４】

当業者は、本発明の二本鎖ベクターの作製に使用されるウイルスのＲｅｐタンパク質は、ウイルスＴＲのソースを考慮して選択されることを理解するであろう。たとえば、ＡＡＶ５　ＴＲは、ＡＡＶ５　Ｒｅｐタンパク質と、より効率よく相互に作用する。

【００６５】
様々な自律パルボウイルスおよび異なる血清型のＡＡＶのゲノムの配列、ならびにＴＲ、キャプシドサブユニット、およびＲｅｐタンパク質の配列は、当技術分野で周知である。このような配列は、文献またはＧｅｎＢａｎｋ等の公的データベースで見つけられる。たとえば、たとえば、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＣ　００２０７７、ＮＣ　００１８６３、ＮＣ　００１８６２、ＮＣ　００１８２９、ＮＣ　００１７２９、ＮＣ　００１７０１、ＮＣ　００１５１０、ＮＣ　００１４０１、ＡＦ０６３４９７、Ｕ８９７９０、ＡＦ０４３３０３、ＡＦ０２８７０５、ＡＦ０２８７０４、Ｊ０２２７５、Ｊ０１９０１、Ｊ０２２７５、Ｘ０１４５７、ＡＦ２８８０６１、ＡＨ００９９６２、ＡＹ０２８２２６、ＡＹ０２８２２３、ＮＣ　００１３５８、ＮＣ　００１５４０（その開示内容全てを、参照することにより本明細書の一部をなすものとする）。たとえば、Ｃｈｉｏｒｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ，（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７３：１３０９；Ｘｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７３：３９９４；Ｍｕｒａｍａｔｓｕ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　２２１：２０８；国際特許公開ＷＯ　００／２８０６１，ＷＯ　９９／６１６０１，ＷＯ　９８／１１２４４；米国特許第６，１５６，３０３号（それらの開示内容全てを、参照することにより本明細書の一部をなすものとする）も参照されたい。ＡＡＶ１、ＡＡＶ２およびＡＡＶ３　ＴＲ配列に関する初期の説明は、Ｘｉａｏ，Ｘ．，（１９９６），「Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒｕｓ　（ＡＡＶ）　ＤＮＡ　ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ」Ｐｈ．Ｄ．Ｄｉｓｓｅｒｔａｔｉｏｎ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，ＰＡ（参照することによりその全体を本明細書の一部をなすものとする）により提供されている。

【００６６】
分離不能なＴＲは、当技術分野で周知の任意の方法で作製することができる。たとえば、ＴＲへの挿入によって、ニッキング部位（すなわち、ｔｒｓ）が移動し、その結果、分離不能なＴＲが生じる。ＴＲ内の様々な領域またはエレメントの呼称は、当技術分野で周知である。図６に、ＡＡＶ　ＴＲ内の領域を図示する（ＢＥＲＮＡＲＤ　Ｎ．ＦＩＥＬＤＳ　ｅｔ　ａｌ，ＶＩＲＯＬＯＧＹ，２巻，６９章，図５，３章，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｆｆ－Ｒａｖｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓも参照のこと）。挿入は、末端分離部位（ｔｒｓ）の配列に行うことが好ましい。あるいは、Ａエレメント内のＲｅｐ結合エレメント（ＲＢＥ）と、Ｄエレメントに隣接したｔｒｓとの間の部位に挿入を行ってもよい（図６参照）。ＡＡＶ　ｔｒｓ部位のコア配列は当技術分野で周知であり、Ｓｎｙｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９０）Ｃｅｌｌ　６０：１０５；Ｓｎｙｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９３）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　６７：６０９６；Ｂｒｉｓｔｅｒ　＆　Ｍｕｚｙｃｚｋａ，（２０００）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７４：７７６２；Ｂｒｉｓｔｅｒ　＆　Ｍｕｚｙｃｚｋａ，（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７３：９３２５（その開示内容全てを、参照することにより本明細書の一部をなすものとする）により説明されている。たとえば、Ｂｒｉｓｔｅｒ　＆　Ｍｕｚｙｃｚｋａ，（１９９９）Ｊ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７３：９３２５には、Ｄエレメントに隣接した３－ＣＣＧＧＴ／ＴＧ－５’のコアｔｒｓ配列が記載されている。Ｓｎｙｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９３）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　６７：６０９６は、最小ｔｒｓ配列を、３’－ＧＧＴ／ＴＧＡ－５’であると同定し、これは、Ｂｒｉｓｔｅｒ　＆　Ｍｕｚｙｃｚｋａにより同定された配列と実質的にオーバーラップする。

【００６７】
好ましくは、挿入は、ｔｒｓ部位の領域である。挿入は、ＴＲの分離を減少または実質的に排除する適当な長さ（たとえば、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上）のものであってもよい。好ましくは、挿入は、少なくとも約３、４、５、６、１０、１５、２０または３０ヌクレオチドまたはそれ以上である。適当なレベルのウイルス複製およびパッケージングが達成される限り、挿入される配列のサイズに特定の上限はない（たとえば、５０、１００、２００または５００ヌクレオチドまたはそれ以上長くても、挿入できる）。

【００６８】
別の好ましい実施形態では、ｔｒｓ部位の欠失によって、ＴＲを分離不能にさせることが可能である。鋳型が所望の機能を保持する限り、欠失は、ｔｒｓ部位を超えて、１、３、５、８、１０、１５、２０、３０ヌクレオチドまたはそれに及んでもよい。ｔｒｓ部位に加えて、Ｄエレメントの一部または全部が欠失していてもよい。欠失は、さらに、Ａエレメント内に及んでもよいが、当業者は、ＲＢＥをＡエレメント内に保持することは、たとえば、効率のよいパッケージングを促進するのに好都合であることを理解するであろう。分離不能なＴＲが、他の所望の機能を保持する限り、Ａエレメント内への欠失は、２、３、４、５、８、１０、または１５ヌクレオチドまたはそれ以上の長さであってもよい。変化したＴＲを修正するために、ＴＲ配列外のＤエレメントを超えて（たとえば、図６におけるＤエレメントの右まで）パルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）配列の一部または全部を欠失させて、遺伝子変換を防止することはさらに好ましい。

【００６９】
またさらなる代替として、Ｒｅｐタンパク質による分離が減少または実質的に排除されるように、ニッキング部位の配列を突然変異させることも可能である。たとえば、ニッキング部位またはその付近のＧおよび／またはＴ塩基を、Ａおよび／またはＣ塩基に代えてもよい。末端分離部位における置換がＲｅｐ切断に与える影響は、Ｂｒｉｓｔｅｒ　＆　Ｍｕｚｙｃｚｋａ，（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７３：９３２５（その開示内容を参照により本明細書に援用する）に記載されている。さらなる代替として、ステム－ループ構造を形成するとみなされてきた、ニッキング部位を取り巻く領域におけるヌクレオチド置換を使用して、末端分離部位（ｌｄ．）におけるＲｅｐ切断を減少させることも可能である。

【００７０】
もしあれば、変化したＴＲの望ましい機能（たとえば、パッケージング、Ｒｅｐ認識、部位特異的組み込み等々）を維持するように、分離不能なＴＲにおける変更を選択できることを、当業者は理解するであろう。

【００７１】
さらに好ましい実施形態において、ＴＲは、Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８３）Ｃｅｌｌ　３３：１３５に記載の遺伝子変換方法に抵抗する。分離不能なＴＲにおける遺伝子変換は、ｔｒｓ部位を回復させ、それによって分離可能なＴＲを生じ、結果としてモノマー複製産物の頻度が上昇する。遺伝子変換は、分離可能なＴＲと変化したＴＲとの間の相同組換えによって生じる。

【００７２】
遺伝子変換を減少させる一つの方策は、当技術分野で周知の、ＤＮＡ修復に欠陥がある細胞系（好ましくは、哺乳動物）を使用して、ウイルスを産生することであるが、それは、これらの細胞系は、ウイルスの鋳型に導入された突然変異を修正する能力が障害されているためである。

【００７３】
あるいは、分離不能なＴＲに非相同領域を導入することによって、遺伝子変換率が実質的に低下した鋳型を作製することができる。鋳型上の分離不能なＴＲと不変のＴＲとの間のｔｒｓエレメントを取り囲む領域における非相同は、遺伝子変換を減少させるか、または実質的に排除する。

【００７４】
遺伝子変換を減少または実質的に排除するのであれば、適当な挿入または欠失を分離不能なＴＲに導入して、非相同領域を作成してもよい。欠失を使用して非相同を作成する方策が好ましい。欠失は、複製および鋳型のパッケージングを不当に損なわないことが、さらに好ましい。欠失の場合、ｔｒｓ部位の分離の障害、ならびに遺伝子変換の減少には、同一欠失で十分であろう。

【００７５】
さらなる代替として、分離不能なＴＲに、または、代わりに、ＲＢＥとｔｒｓ部位との間

のＡエレメントに挿入することによって、遺伝子変換を減少させてもよい。挿入は、一般に、少なくとも約３、４、５、６、１０、１５、２０または３０ヌクレオチドまたはそれ以上の長さである。挿入される配列のサイズに特定の上限はなく、５０、１００、２００または５００ヌクレオチドまたはそれより長くてもよいが、挿入によって、複製および鋳型のパッケージングが不当に損なわれないことが好ましい。

【００７６】

代替実施形態では、分離不能なＴＲは、使用条件で分離不能な天然のＴＲ（またはその変形）であってもよい。たとえば、分離不能なＴＲは、鋳型からｖＤＮＡを作製するのに使用するＲｅｐタンパク質によって認識されなくてもよい。たとえば、分離不能なＴＲは、ＡＡＶＲｅｐタンパク質によって認識されない自律パルボウイルス配列であってもよい。別の説明に役立つ例として、分離可能なＴＲおよびＲｅｐタンパク質が１つのＡＡＶ血清型（たとえば、ＡＡＶ２）に由来してもよく、分離不能なＴＲがＡＡＶ２Ｒｅｐタンパク質によって認識されない別のＡＡＶ血清型（たとえば、ＡＡＶ５）に由来してもよい。

【００７７】

またさらなる代替として、分離不能な配列は、ヘアピン構造を形成し、且つＲｅｐタンパク質によって切断されない逆方向反復配列であってもよい。

【００７８】

またさらなる代替として、本明細書の実施例およびＨｉｒａｔａ　＆　Ｒｕｓｓｅｌｌ，（２０００）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７４：４６１２に記載の通り、ゲノム半分のサイズの鋳型から作製される、二本鎖ｖＤＮＡを担持するパルボウイルス粒子を作製するために、ゲノムの半分のサイズ鋳型を使用してもよい。このレポートは、ＡＡＶゲノムをｗｔＡＡＶゲノムの半分未満のサイズ（<２．５ｋｂ）に減少させたときの、対合モノマーおよび一過性ＲＦ中間生成物のパッケージングについて説明している。これらの研究者は、モノマーゲノムは、相同組換えによる遺伝子訂正の好ましい基質であること、また、二本鎖ゲノムは、このアッセイでモノマーゲノムが機能したほど十分に機能しないことを確認した。このレポートでは、二本鎖ゲノムを遺伝子送達用ベクターとして使用することについて調査研究または提唱を行っていない。

【００７９】

この実施形態によれば、鋳型は、パルボウイルスキャプシドでパッケージすることができるｖＤＮＡのサイズのおよそ１／２であることが好ましい。たとえば、ＡＡＶキャプシドの場合、上述の通り、この鋳型は、野生型ＡＡＶゲノムのおよそ１／２の長さであることが好ましい。

【００８０】

適切な条件で二本鎖ＤＮＡを形成することができる、本発明の二本鎖ベクターゲノム（ｖＤＮＡ）を作製するために、鋳型（上述の）を複製する。二本鎖分子は、二本鎖ウイルスＤＮＡを形成することができるように、実質的に自己相補的である（すなわち、少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％またはそれ以上のヌクレオチド配列相補性）。個々のヌクレオチド塩基またはポリヌクレオチド配列の間の塩基対合は、当技術分野で十分に理解されている。好ましくは、二本鎖パルボウイルスＤＮＡは本質的に完全に自己相補的である（すなわち、ミスマッチ塩基を全く含まないか、または取るに足りない数のミスマッチ塩基を含む）。特に、異種ヌクレオチド配列（たとえば、細胞により転写される配列）は、本質的に完全に自己相補的であることが好ましい。

【００８１】

概して、二本鎖パルボウイルスは、二本鎖パルボウイルスベクターからの異種ヌクレオチド配列の発現が、対応するモノマーベクターからより効率がよい程度まで、非相補性を含んでもよい。

【００８２】

本発明の二本鎖パルボウイルスは、ｒＡＡＶベクターの欠点、すなわち、宿主細胞が、一本鎖ｒＡＡＶ　ｖＤＮＡを二本鎖ＤＮＡに変換する必要に対処する二本鎖分子を宿主細胞に提供する。ビリオンＤＮＡ内、特に、異種ヌクレオチド配列内に、かなりの非相補性領

域が存在することによって、宿主細胞によって認識される公算が高く、結果として、ミスマッチ塩基を訂正するためにＤＮＡ修復機構が動員され、それによって、二本鎖パルボウイルスベクターの都合のよい特徴を相殺する、たとえば、本発明のベクターは、宿主細胞が、ウイルスの鋳型を処理する必要性を減少または排除する。

【００８３】

＜二本鎖パルボウイルスベクターの作製＞

概して、ＡＡＶベクターを作製する方法は、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターの作製に適用できる；方法間の主な違いは、パッケージする鋳型または基質の構造である。本発明による二本鎖パルボウイルスベクターを作製するためには、上述の鋳型を使用して、キャプシドに包まれたウイルスゲノムを作製する。

【００８４】

上述の鋳型は、好ましくはＤＮＡ基質であり、プラスミド、裸のＤＮＡベクター、細菌の人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）またはウイルスベクター（たとえば、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、エプスタインバーウイルスベクター、ＡＡＶベクター、バキュロウイルスベクターベクター、レトロウイルスベクター等々）を含むが、それらに限定されることのない、当技術分野で周知のいずれかの形態で提供することが可能である。あるいは、この鋳型は、パッケージング細胞のゲノムにしっかり組み入れることが可能である。

【００８５】

ある特定の一実施形態において、本発明のパルボウイルスベクターは、本明細書の実施例に記載の通り、二本鎖の１/２ゲノムサイズのモノマーｖＤＮＡを担持してもよい。この、細胞に二本鎖パルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）ビリオンＤＮＡを提供する方法は、モノマーｖＤＮＡがダイマー逆方向反復中間生成物から生成される複製の回転ヘアピン方式を利用する（Ｃａｖａｌｉｅｒ－Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，（１９７４）Ｎａｔｕｒｅ ２５０：４６７；Ｓｔｒａｕｓ ｅｔ ａｌ．，（１９７６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７３：７４２）。ゲノムが十分に小さいとき、このダイマー逆方向反復それ自体を、キャプシドに包んでビリオン内に入れることができる。この方法を使用すると、モノマー分子とダイマー分子との混合集団が生じる。二本鎖パルボウイルスベクターは、既知の技術、たとえば、塩化セシウム密度勾配による分離によって単離することが可能である。

【００８６】

本発明による二本鎖パルボウイルス粒子は、当技術分野で周知の任意の方法、たとえば、複製される鋳型を、許容細胞またはパッケージング細胞に導入してパッケージすることによって作製することができるが、これらの用語は、当技術分野で理解される通りである（たとえば、「許容」細胞は、このウイルスで感染または遺伝子導入することができ；「パッケージング」細胞は、ヘルパー機能を提供する、しっかりと形質転換された細胞である）。

【００８７】

１つの実施形態では、二本鎖パルボウイルス粒子を作製する方法であって、パルボウイルス複製を許容する細胞に、（ａ）本発明のベクターゲノムを作製するための鋳型をコードするヌクレオチド配列（詳細に上述した通り）；（ｂ）ベクターゲノムを作製するための鋳型の複製に十分なヌクレオチド配列；（ｃ）複製およびベクターゲノムのパルボウイルスキャプシド内へのパッケージングに十分な条件で、このベクターゲノムを、パルボウイルスキャプシド内にパッケージするのに十分なヌクレオチド配列を提供するステップを含み、それによって、パルボウイルスキャプシド内に包まれたベクターゲノムを含む二本鎖パルボウイルス粒子が細胞内で産生される方法が提供される。好ましくは、パルボウイルス複製コード配列および／またはキャプシドコード配列は、ＡＡＶ配列である。

【００８８】

エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈澱、マイクロインジェクション、陽イオン性または陰イオン性リポソーム、および核局在化シグナルと組み合わせたリポソームを含

むがその限りではない、複製およびパッケージングのための鋳型を担持するヌクレオチド配列を、細胞宿主に導入するいずれかの方法を使用することができる。ウイルスベクターが鋳型を提供する実施形態では、ウイルス感染を生じさせる標準法を使用することが可能である。

【００８９】

当技術分野で周知の適当な許容細胞またはパッケージング細胞を使用して、二本鎖ベクターを作製することが可能である。哺乳動物の細胞が好適である。複製欠陥ヘルパーウイルスから欠失している機能を提供するトランス相補性パッケージング細胞系、たとえば、２９３細胞または他のＥ１ａトランス相補性細胞も好適である。当技術分野で周知のＤＮＡ修復が欠損している哺乳動物細胞または細胞系は、ウイルスの鋳型に導入された突然変異を訂正できる能力が損なわれるため、好適である。

【００９０】

この鋳型は、一部または全部のパルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）ｃａｐ遺伝子およびｒｅｐ遺伝子の一部または全部を含んでもよい。しかし、キャプシドおよび／またはＲｅｐタンパク質をコードするパッケージングベクターを細胞に導入することによって、ｃａｐ機能およびｒｅｐ機能の一部または全部が、トランスで提供されることが好ましい。最も好ましくは、この鋳型は、キャプシドまたはＲｅｐタンパク質をコードしない。あるいは、ｃａｐおよび／またはｒｅｐ遺伝子を発現するようにしっかり形質転換されたパッケージング細胞系を使用する（たとえば、Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ，（１９９８）ＨｕｍａｎＧｅｎｅＴｈｅｒａｐｙ　９：２３５３；Ｉｎｏｕｅ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：７０２４；米国特許第５，８３７，４８４号；ＷＯ　９８／２７２０７；米国特許第５，６５８，７８５号；ＷＯ　９６／１７９４７を参照）。

【００９１】

加えて、ヘルパーウイルス機能は、ベクターが、新しいウイルス粒子を増殖させるように提供されることが好ましい。アデノウイルスも単純ヘルペスウイルスも、ＡＡＶに対してヘルパーウイルスの役割を果たすことができる。たとえば、ＢＥＲＮＡＲＤ　Ｎ．ＦＩＥＬＤｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＶＩＲＯＬＯＧＹ，２巻，６９章（３章、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ）を参照されたい。代表的なヘルパーウイルスとしては、単純ヘルペス（ＨＳＶ）水痘帯状疱疹、サイトメガロウイルス、およびエプスタインバーウイルスなどがあるが、その限りではない。感染の多重度（ＭＯＩ）および感染の持続期間は、使用されるウイルスのタイプおよび使用されるパッケージング細胞系によって異なる。任意の適当なヘルパーベクターを使用してもよい。好ましくは、ヘルパーベクターは、たとえば、Ｘｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７２：２２２４により記載された、プラスミドである。上述の、当技術分野で周知の適当な方法で、このベクターを、パッケージング細胞に導入することができる。

【００９２】

１つの方法では、ＡＡＶパッケージング機能をコードするｒｅｐ／ｃａｐベクターおよびＡＡＶ　ｖＤＮＡをコードする鋳型を、アデノウイルスに感染させたヒト細胞に、共トランスフェクトことによって、この本発明の二本鎖パルボウイルスベクターを作製することが可能である（Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８９）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　６３：３８２２）。最適化条件で、この手順によって、最高、10^9感染ユニットのウイルス粒子／ｍｌが得られる。しかし、この方法の１つの欠点は、混入する野生型アデノウイルスが共産生することである。幾つかのアデノウイルスタンパク質（たとえば、線維、ヘキソン等々）は、ヒトで、細胞障害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答を引き起こすことが知られており（Ｙａｎｇ　ａｎｄ　Ｗｉｌｓｏｎ，（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５５：２５６４；Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９５）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　６９：２００４；Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ，（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９１：４４０７）、このことは、これらのｒＡＡＶ調製物を使用するとき、重大な欠点を示す（Ｍｏｎａｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　５：４０）。

【００９３】
混入するヘルパーウイルスがないベクターストックは、当技術分野で周知のいずれかの方法で得ることができる。たとえば、二本鎖ウイルスとヘルパーウイルスは、サイズに基づいて容易に識別することができる。二本鎖ウイルスは、ヘパリン基質に対する親和性に基づいて、ヘルパーウイルスと分離することも可能である（Ｚｏｌｏｔｕｋｈｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：９７３）。混入するいずれのヘルパーウイルスも複製コンピテントでないように、欠失した複製欠陥ヘルパーウイルスを使用することが好ましい。さらなる代替として、後期遺伝子発現を欠くアデノウイルスヘルパーは、二本鎖ウイルスのパッケージングを仲介するために、アデノウイルス初期遺伝子発現のみを必要とするため、使用することが可能である。後期遺伝子発現に欠陥のあるアデノウイルス突然変異体は、当技術分野で周知である（たとえば、ｔｓ１００Ｋおよびｔｓ１４９アデノウイルス突然変異体）。

【００９４】
ヘルパー機能を提供する好ましい方法は、効率の良いＡＡＶ産生に必要なヘルパー遺伝子の全てを担持する非感染性アデノウイルスミニプラスミドを使用する（Ｆｅｒｒａｒｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．３：１２９５；Ｘｉａｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ７２：２２２４）。アデノウイルスミニプラスミドを用いて得られるｒＡＡＶ力価は、従来の野生型アデノウイルス感染法で得られるものより４０倍高い（Ｘｉａｏ ｅｔ ａｌ，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ７２：２２２４）。この方法を使用すると、アデノウイルスによる共トランスフェクションを実施する必要がなくなる（Ｈｏｌｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９４），Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ６８：７１６９；Ｃｌａｒｋ ｅｔ ａｌ，（１９９５）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．６：１３２９；Ｆｉｆｔｈ Ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ Ｗｏｒｋｓｈｏｐ，Ｃｒｙｓｔａｌ Ｒｉｖｅｒ，ＦＬ中のＴｒｅｍｐｅ ａｎｄ Ｙａｎｇ（１９９３））。

【００９５】
複製コンピテントＡＡＶの発生を防止するために、ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子を別々の発現カセット上に分ける方法（たとえば、Ａｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７１：６８１６参照）、パッケージング細胞系を使用する方法（たとえば、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ９：２３５３；Ｉｎｏｕｅ ｅｔ ａｌ，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７２：７０２４；米国特許第５，８３７，４８４号；ＷＯ ９８／２７２０７；米国特許第５，６５８，７８５号；ＷＯ ９６／１７９４７参照）、およびその他の、無ヘルパーウイルス系（たとえば、Ｃｏｌｏｓｉに付与された米国特許第５，９４５，３３５号参照）を含むが、その限りではない、ｒＡＡＶストックを作製する他の方法が記載されている。

【００９６】
ＡＡＶパッケージング方法におけるヘルパーウイルスとして、ヘルペスウイルスを使用してもよい。ＡＡＶ Ｒｅｐタンパク質をコードするハイブリッドヘルペスウイルスは、より拡張可能なＡＡＶベクター産生計画を都合よく促すことが可能である。ＡＡＶ－２ ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子を発現するハイブリッド単純ヘルペスウイルスＩ型（ＨＳＶ－１）ベクターが記載されている（Ｃｏｎｗａｙ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：９８６およびＷＯ００／１７３７７（その開示内容全てを本明細書に組み込むものとする））。

【００９７】
要約すると、二本鎖ゲノムを担持するパルボウイルス粒子を産生する（すなわち、ウイルスの脱コート後、ゲノムが、「跳ね返る」、すなわち自己相補的ＤＮＡを形成することができる）ように、複製され、パッケージされるウイルスの鋳型、パルボウイルスｃａｐ遺伝子、適切なパルボウイルスｒｅｐ遺伝子、および（好ましくは）ヘルパー機能が、細胞（たとえば、許容細胞またはパッケージング細胞）に提供される。鋳型および／またはパッケージングベクターおよび／またはしっかり形質転換されたパッケージング細胞にコードされたｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子の併合発現によって、パルボウイルスキャプシ

ドは、本発明による二本鎖パルボウイルスゲノムをパッケージするパルボウイルス粒子を産生する結果となる。この二本鎖パルボウイルス粒子を細胞内に集合させ、次いで、当業者に周知のいずれかの方法で回収することが可能である。

【００９８】

あるいは、当技術分野で周知のｉｎ　ｖｉｔｒｏパッケージング法を使用して、本明細書に記載のダイマーｖＤＮＡ鋳型を作製してもよい。たとえば、一本鎖Ｍ１３ファージを使用して、二本鎖ｖＤＮＡ配列を細菌内で増幅することが可能である。Ｍ１３が担持するｖＤＮＡの各端における分離可能なＴＲは、アニーリングして二本鎖配列を形成するが、これを適当な制限酵素で切断して、Ｍ１３バックボーンからダイマーｖＤＮＡを切除してもよい。さらなる代替として、ＰＣＲまたは他の適当な増幅技術を使用して、上述のダイマー自己相補的鋳型から二本鎖ｖＤＮＡ配列を増幅してもよい。

【００９９】

本明細書に開示の試薬および方法を使用して、この本発明のパルボウイルスベクターの高力価、好ましくは、本質的に野生型力価で、ストックを作製することができる。パルボウイルスストックが、少なくとも約10^5形質導入ユニット（ｔｕ）／ｍｌ、さらに好ましくは、少なくとも約10^6ｔｕ／ｍｌ、さらに好ましくは、少なくとも約10^7ｔｕ／ｍｌ、なおさらに好ましくは、少なくとも約10^8ｔｕ／ｍｌ、なおさらに好ましくは、少なくとも約10^9ｔｕ／ｍｌ、なおいっそう好ましくは少なくとも約10^{10}ｔｕ／ｍｌ、またさらに好ましくは、少なくとも約10^{11}ｔｕ／ｍｌ、またはそれ以上の力価を有することも好ましい。

【０１００】

言い換えれば、パルボウイルスストックは、好ましくは、少なくとも約１ｔｕ／細胞、さらに好ましくは少なくとも約５ｔｕ／細胞、またさらに好ましくは、少なくとも約２０ｔｕ／細胞、なおさらに好ましくは、少なくとも約５０ｔｕ／細胞、またさらに好ましくは、少なくとも約１００ｔｕ／細胞、さらに好ましくは、少なくとも約２５０ｔｕ／細胞、最も好ましくは少なくとも約５００ｔｕ／細胞、またはそれ以上の力価を有する。

【０１０１】

さらに、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターは、従来のパルボウイルスベクターより改良された形質導入ユニット（ｔｕ）／粒子比を有することが可能である。好ましくは、ｔｕ／粒子比は約５０：１未満、未満約２０：１未満、約１５：１未満、約１０：１未満、約８：１未満、約７：１未満、約６：１未満、約５：１未満、約４：１未満、またはそれ以下である。ｔｕ／粒子比に、特定の下限はない。一般に、ｔｕ／粒子比は約１：１、２：１、３：１または４：１より大きい。

【０１０２】

＜本発明の用途＞

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載の二本鎖パルボウイルスベクターを使用して、ヌクレオチド配列を細胞に送達する方法である。このベクターは、当技術分野で周知の適当な方法で、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に、またはｉｎ　ｖｉｖｏで被検対象に、送達することができる。あるいは、当技術分野で周知の通り、このベクターを、ｅｘ　ｖｉｖｏで細胞に送達し、その細胞を被検対象に投与してもよい。

【０１０３】

本方法は、ｗｔＡＡＶベクターより効率の良い標的細胞の形質導入を実現するために、有利に使用することができる。たとえば、二本鎖パルボウイルスベクターは、野生型ＡＡＶベクターより高い率で形質導入することができる。あるいは、またはさらに、二本鎖パルボウイルスベクターは、ＡＡＶベクターより速やかな導入遺伝子発現の開始、より高レベルの導入遺伝子発現、および／またはより長い導入遺伝子発現の持続を提供することができる。

【０１０４】

さらに、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターおよび方法は、一般に、ＡＡＶによる形質導入を許容しないかまたはＡＡＶによって非能率的に形質導入されるに過ぎない細胞に

、ヌクレオチド配列を、投与する方法で有用である。代表的な細胞としては、樹状細胞、ある特定のタイプの癌細胞または腫瘍細胞、星状細胞、および骨髄幹細胞などがあるが、それらに限定されない。さらに、本明細書に開示の方法は、第２鎖ＡＡＶ合成を非能率的に支持するに過ぎない非複製またはゆっくり複製する細胞、たとえば、肝臓、中枢神経系（たとえば、脳）、および筋内のある特定の細胞集団（たとえば、速筋線維）を用いて有利に実行することが可能である。

【０１０５】

従って、本明細書に開示の二本鎖パルボウイルスベクターは、ｒＡＡＶベクターと比較して、異なる標的細胞範囲（たとえば、より広範囲の標的細胞）を有することができる。本発明の特定の理論に捕われたくないが、ｒＡＡＶによる形質導入に抵抗する細胞は、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターを許容し、その結果、二本鎖分子を宿主細胞に提供すると考えられる。従って、本発明は、従来のｒＡＡＶベクターを許容しないか、またはウイルスＤＮＡの第２鎖合成を効率良く支持することができないため、ｒＡＡＶベクターによる形質導入が不十分に過ぎない細胞に、ヌクレオチド配列を送達するのに有用である。

【０１０６】

ｗｔＡＡＶベクターの特徴の１つは、高レベルの導入遺伝子発現が確認される前の長引く誘導期である。本明細書に開示の二本鎖パルボウイルスベクターを使用すると、相補鎖合成ステップが不要になるため、ｗｔＡＡＶベクターより急速且つ攻撃的な遺伝子送達システムを実現することができる。

【０１０７】

従って、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターは、たとえば、抗癌剤または癌抗原の送達によって、癌または腫瘍を治療する方法にも有用である。ある特定の実施形態では、転移を防止するために、たとえば、原発性腫瘍の外科的除去後に、本発明の方法を使用して、抗癌剤または癌抗原が投与される。

【０１０８】

本発明の方法および二本鎖パルボウイルスベクターは、代謝障害（たとえば、オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ欠乏症）患者の治療に都合よく使用することも可能である。このような障害は、一般に、遺伝子送達ベクターによる治療用ポリペプチドの発現の比較的急速な開始を必要とする。またさらなる代替として、移植生存率を改善する薬剤（たとえば、スーパオキシドジスムターゼ）や敗血症と闘う薬剤を提供するために、本発明のベクターを投与することも可能である。

【０１０９】

さらに、樹状細胞（ＤＣ）は、ｗｔＡＡＶベクターに抵抗する（Ｊｏｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）７２：４２１２）が、本明細書に開示の二本鎖パルボウイルスベクターを許容することを、本発明者は発見した。従って、またさらなる態様として、本発明は、たとえば、ヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドに対する免疫応答を誘導するために、ヌクレオチド配列をＤＣに送達する方法を提供する。好ましくは、このヌクレオチド配列は、感染因子からの抗原または癌抗原をコードする。

【０１１０】

またさらなる態様として、導入遺伝子発現のレベルを調節することが望ましい状況で（たとえば、以下に記載の、ホルモン類または成長因子をコードする導入遺伝子）、本発明を使用して、異種ヌクレオチド配列を送達することが可能である。本明細書に開示の二本鎖パルボウイルスベクターによる、導入遺伝子発現の開始がより急速なため、これらの遺伝子送達媒体は、ｒＡＡＶベクターよりも、このような治療方針を実施しやすい。

【０１１１】

任意の異種ヌクレオチド配列（上述）を、本発明に従って送達することが可能である。関心のある核酸としては、ポリペプチド、好ましくは、治療用（たとえば、医学または獣医学向け）ポリペプチドまたは免疫原性（たとえば、ワクチン用）ポリペプチドをコードする核酸などがある。

【０１１２】

「治療用ポリペプチド」は、細胞または被検対象におけるタンパク質の欠如または欠乏に起因する症状を緩和または低減することが可能なポリペプチドである。あるいは、「治療用ポリペプチド」は、他の方法で被検対象に利益を、たとえば、抗癌作用または移植生存率の改善を、与えるものである。

【０１１３】

好ましくは、パルボウイルス（たとえば、ＡＡＶ）キャプシドによる二本鎖鋳型のパッケージングを容易にするために、この異種ヌクレオチド配列は、約２．５ｋｂ未満の長さ（さらに好ましくは、約２．４ｋｂ未満、またさらに好ましくは、約２．２ｋｂ未満、またさらに好ましくは、約２．０ｋｂ未満の長さ）である。代表的なヌクレオチド配列は、第ＩＸ因子、第Ｘ因子、リソソーム酵素（たとえば、テイ＝サックス病と関連したヘキソースアミニダーゼＡ、またはハンター症候群／ＭＰＳ　ＩＩと関連したイズロン酸スルファターゼ）、エリスロポイエチン、アンギオスタチン、エンドスタチン、スーパーオキシドジスムターゼ、グロビン、レプチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、ならびにサイトカイン類（たとえば、α－インターフェロン、β－インターフェロン、インターフェロン－γ、インターロイキン－２、インターロイキン－４、インターロイキン１２、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシン、等々）、ペプチド成長因子およびホルモン類（たとえば、ソマトトロピン、インスリン、インスリン様成長因子１および２、血小板由来成長因子、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子、神経成長因子、神経栄養因子－３および－４、脳由来神経栄養因子、グルア由来成長因子、トランスフォーミング成長因子－αおよび－β等々）、受容体（たとえば、腫瘍壊死因子受容体）をコードする。他の代表的実施形態では、異種ヌクレオチド配列は、モノクローナル抗体、好ましくは一本鎖モノクローナル抗体、または癌または腫瘍抗原に対して向けられるモノクローナル抗体（たとえば、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、および下記の通り）。その他の例示的な異種ヌクレオチド配列は、自殺遺伝子産物（チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクロームＰ４５０、デオキシシチジンキナーゼ、および腫瘍壊死因子）、癌治療で使用される薬剤に対する耐性を与えるタンパク質、および腫瘍サプレッサー遺伝子産物をコードする。

【０１１４】

さらなる代替として、この異種核酸配列は、レポーターポリペプチド（たとえば、緑色蛍光性のタンパク質、アルカリホスファターゼ等の酵素）をコードしてもよい。

【０１１５】

あるいは、本発明のある特定の実施形態では、関心のある核酸が、アンチセンス核酸、リボザイム（たとえば、米国特許第５，８７７，０２２号に記載）、スプライセオソーム介在トランススプライシングを行うＲＮＡ（Ｐｕｔｔａｒａｊｕ　ｅｔ　ａｌ，（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：２４６；米国特許第６，０１３，４８７号；米国特許第６，０８３，７０２号参照）、遺伝子サイレンシングを仲介する妨害ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）（Ｓｈａｒｐ　ｅｔ　ａｌ．，（２０００）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８７：２４３１参照）または他の非翻訳ＲＮＡ、たとえば、「ガイド」ＲＮＡ（Ｇｏｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９５：４９２９；Ｙｕａｎ　ｅｔ　ａｌに付与された米国特許第５，８６９，２４８号）等々をコードしてもよい。

【０１１６】

パルボウイルスベクターは、宿主染色体上の遺伝子座と相同性を共有し、また宿主染色体上の遺伝子座と組み換える、異種ヌクレオチド配列をコードすることも可能である。この方法は、宿主細胞における遺伝的欠陥を訂正するのに使用することができる。

【０１１７】

本発明は、たとえば、ワクチン接種のために、免疫原性ポリペプチドを被検対象で発現させるのに使用することも可能である。この核酸は、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、ｇａｇタンパク質、腫瘍抗原、癌抗原、細菌抗原、ウイルス抗原等々からの免疫原を含むが、それらに限定されない、当技術分野で周知の関心のある免疫原を含んで

もよい。

【０１１８】

パルボウイルスをワクチンとして使用することは、当技術分野で周知である（たとえば、Ｍｉｙａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ，（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ９１：８５０７；Ｙｏｕｎｇらに付与された米国特許第５，９１６，５６３号、Ｍａｚｚａｒａらに付与された第５，９０５，０４０号、Ｓａｍｕｌｓｋｉらに付与された米国特許第５，８８２，６５２号、米国特許第５，８６３，５４１号（それらの開示内容全てを、参照することにより本明細書に組み込むものとする）を参照）。抗原は、パルボウイルスキャプシド内に与えてもよく、あるいは、抗原は、組換えベクターゲノムに導入された異種核酸から発現させてもよい。関心のある免疫原を、パルボウイルスベクターにより提供することができる。関心のある免疫原は当技術分野で周知であり、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、ｇａｇタンパク質、腫瘍抗原、癌抗原、細菌抗原、ウイルス抗原等々からの免疫原を含むが、それらに限定されない。

【０１１９】

免疫原性ポリペプチド、すなわち免疫原は、微生物性疾患、細菌性疾患、原性動物性疾患、寄生虫性疾患、およびウイルス性疾患を含むがそれらに限定されない疾患から、被検対象を保護するのに適した任意のポリペプチドであってもよい。たとえば、免疫原は、オルソミクソウイルス免疫原（たとえば、インフルエンザウイルス血液凝集素（ＨＡ）表面タンパク質またはインフルエンザウイルス核タンパク質遺伝子等の、インフルエンザウイルス免疫原、またはウマ・インフルエンザウイルス免疫原）、またはレンチウイルス免疫原（たとえば、ウマ感染性貧血ウイルス免疫原、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）免疫原、またはＨＩＶ等のヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）免疫原、またはＳＩＶエンベロープＧＰ１６０タンパク質、ＨＩＶまたはＳＩＶマトリックス／キャプシドタンパク質、およびＨＩＶまたはＳＩＶ ｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖ遺伝子産物）であってもよい。また、免疫原は、アレナウイルス免疫原（たとえば、ラッサ熱ウイルスヌクレオカプシドタンパク質遺伝子およびラッサ熱エンベロープ糖タンパク質遺伝子等の、ラッサ熱ウイルス免疫原）、ポックスウイルス免疫原（たとえば、ワクシニアＬ１またはＬ８遺伝子等の、ワクシニア）、フラビウイルス免疫原（たとえば、黄熱病ウイルス免疫原または日本脳炎ウイルス免疫原）、フィロウイルス免疫原（たとえば、エボラウイルス免疫原、またはＮＰおよびＧＰ遺伝子等のマールブルグウイルス免疫原）、ブニヤウイルス免疫原（たとえば、ＲＶＦＶ、ＣＣＨＦ、およびＳＦＳウイルス）、またはコロナウイルス免疫原（たとえば、ヒト・コロナウイルスエンベロープ糖タンパク質遺伝子等の、伝染性ヒトコロナウイルス免疫原、またはブタ伝播性胃腸炎ウイルス免疫原、またはトリ伝染性気管支炎ウイルス免疫原）であってもよい。さらに、免疫原は、ポリオ免疫原、ヘルペス抗原（たとえば、ＣＭＶ、ＥＢＶ、ＨＳＶ免疫原）流行性耳下腺炎免疫原、麻疹免疫原、風疹免疫原、ジフテリア毒素または他のジフテリア免疫原、百日咳抗原、肝炎（たとえば、Ａ型肝炎またはＢ型肝炎）免疫原、または当技術分野で周知の他のワクチン免疫原であってもよい。

【０１２０】

あるいは、免疫原は、腫瘍抗原または癌細胞抗原であってもよい。腫瘍抗原または癌抗原は、癌細胞の表面上に発現されることが好ましい。Ｓ．Ａ．Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １０：２８１には、代表的な癌および腫瘍細胞抗原が記載されている。他の例示的な癌抗原および腫瘍抗原として以下のものが挙げられるが、その限りではない：ＢＲＣＡ１遺伝子産物、ＢＲＣＡ２遺伝子産物、ｇｐ１００、チロシナーゼ、ＧＡＧＥ－１／２、ＢＡＧＥ、ＲＡＧＥ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＣＤＫ－４、β－カテニン、ＭＵＭ－１、カスパーゼ－８、ＫＩＡＡ０２０５、ＨＰＶＥ、ＳＡＲＴ－１、ＰＲＡＭＥ、ｐ１５、ＭＡＲＴ－１（Ｃｏｕｌｉｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８０：３５）、ｇｐ１００（Ｗｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｊ．Ｃｕｔａｎ．Ｐａｔｈｏｌ．４：２０１）およびＭＡＧＥ抗原、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２およびＭＡＧＥ－３（Ｖａｎ ｄｅｒ Ｂｒｕｇｇｅｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５４：１６４３）を含む、黒色腫腫瘍抗原（Ｋａｗａｋａｍｉ ｅｔ

ａｌ．，（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９１：３５１５）；Ｋａｗａｋａｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９４）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１８０：３４７）；Ｋａｗａｋａｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９４）ＣａｎｃｅｒＲｅｓ．５４：３１２４）；ＣＥＡ、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、Ｐ－１５およびチロシナーゼ（Ｂｒｉｃｈａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９３）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７８：４８９）；ＨＥＲ－２／ｎｅｕ遺伝子産物（米国特許第４，９６８，６０３号）、ＣＡ　１２５、ＬＫ２６、ＦＢ５（エンドシアリン（ｅｎｄｏｓｉａｌｉｎ））、ＴＡＧ　７２、ＡＦＰ、ＣＡ１９－９、ＮＳＥ、ＤＵ－ＰＡＮ－２、ＣＡ５０、ＳＰａｎ－１、ＣＡ７２－４、ＨＣＧ、ＳＴＮ（シアリルＴｎ抗原）、ｃ－ｅｒｂＢ－２タンパク質、ＰＳＡ、Ｌ－ＣａｎＡｇ、エストロゲン受容体、乳脂肪グロブリン、ｐ５３腫瘍サプレッサータンパク質（Ｌｅｖｉｎｅ，（１９９３）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：６２３）；ムチン抗原（国際公開ＷＯ　９０／０５１４２）；テロメラーゼ；核マトリックスタンパク質；前立腺酸ホスファターゼ；乳頭腫ウイルス抗原；および以下の癌と関連した抗原：黒色腫、転移、腺癌、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、結腸癌、非ホジキン型リンパ腫、ホジキン型リンパ腫、白血病、子宮癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頚癌、膀胱癌、腎臓癌、膵臓癌等々（たとえば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，（１９９６）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．４７：４８１－９１参照）。

【０１２１】

あるいは、異種ヌクレオチド配列は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ，ｅｘ　ｖｉｖｏ，またはｉｎ　ｖｉｖｏで、細胞内で好ましく産生されるポリペプチドをコードしてもよい。たとえば、本発明のベクターを、培養細胞に導入し、それから遺伝子産物を単離することが可能である。

【０１２２】

関心のある異種ヌクレオチド配列は、適切な調節配列と操作可能に関連していてもよいことを、当業者は理解するであろう。たとえば、異種核酸は、発現調節エレメント、たとえば、転写／翻訳調節シグナル、複製起点、ポリアデニル化シグナル、および内部リボソームエントリー部位（ＩＲＥＳ）、プロモーター、エンハンサー等々と操作可能に関連していてもよい。

【０１２３】

所望のレベルおよび組織特異的発現に応じて、様々なプロモーター／エンハンサーエレメントを使用してもよいことを、当業者は理解するであろう。プロモーター／エンハンサーは、所望の発現パターンに応じて、構成的であってもよく、誘導性であってもよい。プロモーター／エンハンサーは、生来のものであっても外来のものであってもよく、また、天然の配列であっても合成の配列であってもよい。外来は、転写開始領域が導入される野生型宿主に、転写開始領域が見出さないことを意味する。

【０１２４】

標的細胞生来のプロモーター／エンハンサーエレメントまたは治療を受ける被検対象が最も好ましい。また、異種核酸配列に生来のプロモーター／エンハンサーエレメントも好ましい。プロモーター／エンハンサーエレメントは、関心のある標的細胞で作用するように選択される。哺乳動物のプロモター／エンハンサーエレメントも好ましい。プロモーター／エンハンサーエレメントは構成的であってもよく、誘導性であってもよい。

【０１２５】

異種核酸配列の発現を制御することが望ましい用途では、誘導可能な発現調節エレメントが好ましい。遺伝子送達のための誘導性プロモーター／エンハンサーエレメントは、好ましくは、組織特異的プロモーター／エンハンサーエレメントであり、筋肉特異的（心筋、骨格筋、および／または平滑筋を含む）、神経組織特異的（脳特異的を含む）、肝臓特異的、骨髄特異的、膵臓の特異的、脾臓特異的、網膜特異的、および肺特異的プロモーター／エンハンサーエレメントなどがある。他の誘導可能なプロモーター／エンハンサーエレメントとしては、ホルモン誘導性および金属誘導性エレメントなどがある。代表的な誘導性プロモーター／エンハンサーエレメントとしては、Ｔｅｔオン／オフエレメント、ＲＵ

４８６－誘導性プロモーター、エクジソン誘導性プロモーター、ラパマイシン誘導性プロモーター、およびメタロチオネインプロモーターなどがあるが、その限りではない。

【０１２６】

異種核酸配列が転写され、次いで、標的細胞で翻訳される、本発明の実施形態では、挿入されたタンパク質コード配列の効率の良い翻訳には、特異的開始シグナルが必要である。ＡＴＧ開始コドンおよび近隣の配列を含んでもよいこうした外因性翻訳調節配列は、天然および合成の、様々な起源のものであってもよい。

【０１２７】

さらなる利点として、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターは、分離可能なＴＲに関して、コード配列の方向が一定であり、且つ調節可能である点で、ｒＡＡＶベクターと区別することが可能である。従って、たとえば、導入遺伝子の方向および発現は、分離可能なＴＲ内の推定上の転写調節エレメントに関して、調節することが可能である。さらに、分離不能なＴＲに関して、導入遺伝子の方向を制御することによって、より大きいレベルの、共感染ベクターのゲノム間の組換え産物を提供することが可能である。ゲノムの閉鎖末端（すなわち、分離不能なＴＲ付近）または開放末端のいずれかが、分子間組換えに好ましい基質であれば、組換え産物内のコード配列の方向を予測し、制御することができる。

【０１２８】

最後に、ｒＡＡＶベクターと違って、本発明の二本鎖パルボウイルスベクターは、プラス鎖およびマイナス鎖の両者を１つの分子内に共パッケージする点で、一様である。安定した臨床等級の試薬を製造する観点から、この特徴は望ましい。

【０１２９】

＜遺伝子導入技術＞

本発明の方法は、異種ヌクレオチド配列を、分裂細胞および非分裂細胞を含む広範囲の細胞内に送達する手段も提供する。たとえば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでポリペプチドを製造するために、またはｅｘ　ｖｉｖｏ遺伝子療法のために、本発明を使用して、関心のあるヌクレオチド配列を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に送達することも可能である。本発明の細胞、医用製剤、および方法は、さらに、ヌクレオチド配列を必要とする被検対象に、ヌクレオチド配列を送達して、たとえば、免疫原性または治療用ポリペプチドを発現する方法で有用である。従って、この方式では、ポリペプチドを、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて被検対象内で産生することができる。被検対象は、ポリペプチドが欠乏しているため、または被検対象におけるポリペプチドの産生が、治療方法または他の方法として、また、以下にさらに説明する通り、治療効果を与えるため、被検対象は、ポリペプチドを必要としている可能性がある。

【０１３０】

概して、本発明を使用して、遺伝子発現に関連した疾患に付随する症状を治療または改善するために、生物学的作用を有する外来核酸を送達することが可能である。例示的な疾患状態としては、嚢胞性線維症（および他の肺疾患）、Ａ型血友病、Ｂ型血友病、サラセミア、貧血および他の血液障害、ＡＩＤｓ、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、筋萎縮性側索硬化症、癲癇、および他の神経学的障害、癌、糖尿病、筋ジストロフィ（たとえば、デュシェンヌ、ベッカー）、ゴーシェ病、フルラー病、アデノシンデアミナーゼ欠乏症、グリコーゲン貯蔵病ｓおよび他の代謝欠陥、網膜変性疾患（および他の眼疾患）、充実臓器（たとえば、脳、肝臓、腎、心臓）の疾患等々があるが、その限りではない。

【０１３１】

遺伝子導入は、疾患状態の理解および治療に、かなりの潜在的用途がある。多数の遺伝性疾患は、欠陥遺伝子が分かっており、またクローニングされている。概して、上記疾患状態は、一般に劣勢様式で遺伝する、通常は、酵素の欠乏状態および、一般に優性様式で遺伝する、制御タンパク質または構造タンパク質を含む可能性のある、不均衡な状態という、２クラスに分類される。欠乏状態疾患の場合、置換療法のために、冒された組織に正常な遺伝子を持ち込むために、また、アンチセンス突然変異を使用した疾患動物モデルを作

成するために、遺伝子導入を使用することが可能であろう。不均衡な疾患状態の場合、遺伝子導入を使用して、モデル系で疾患状態を作り、次いで、疾患状態の相殺を図って使用することも可能であろう。従って、本発明の方法は、遺伝病の治療を可能にする。本明細書で使用される疾患状態は、疾患を引き起こしたり、疾患をより重症にしたりする、欠乏症または不均衡を部分的にまたは完全に治療することによって治療される。突然変異を引き起こしたり、欠陥を修正したりするために、核配列の部位特異的組換えを使用することも可能である。

【０１３２】

本発明を使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで、アンチセンス核酸を細胞に提供することも可能である。標的細胞でアンチセンス核酸を発現させることにより、細胞による、特定のタンパク質の発現を減少させることができる。従って、アンチセンス核酸を投与して、特定のタンパク質を必要としている被検対象において、そのタンパク質の発現を減少させることが可能である。細胞生理機能を制御するために、たとえば、細胞培養系または組織培養系を最適化するために、アンチセンス核酸をｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に投与してもよい。

【０１３３】

最後に、本発明は、細胞培養系、またはあるいは、トランスジェニック動物モデルで、関心のある遺伝子が一時的にまたはしっかりと発現される、診断方法、およびスクリーニング方法で有用である。

【０１３４】

概して、本発明を使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、またはｉｎ　ｖｉｖｏで、異種核酸を細胞に送達することができる。

【０１３５】

＜被検対象、医用製剤、ワクチン、および投与方式＞

本発明は、獣医学用途および医学用途で有用である。上述のｅｘ　ｖｉｖｏ遺伝子送達方法に適した被検対象としては、鳥類および哺乳動物であり、哺乳動物が好適である。本明細書で使用される用語「鳥類」としては、ニワトリ、カモ、ガチョウ、ウズラ、シチメンチョウおよびキジなどがあるが、その限りではない。本明細書で使用される用語「哺乳動物」としては、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギなどがあるが、その限りではない。ヒト対象が最も好適である。ヒト対象としては、新生児、幼児、若年者、および成人などがある。

【０１３６】

ある特定の実施形態において、本発明は、薬学的に許容できる担体中の本発明のウイルス粒子、および／または他の医薬品、調合薬、担体、助剤、助剤、希釈剤、等々を含む医用組成物を提供する。注射の場合、担体は、一般に、液体である。他の投与方法の場合、担体は固体または液体のいずれであってもよい。吸入投与の場合、担体は、吸入可能であり、好ましくは、固体または液体の微粒子形態である。注射液に通常使用される添加物、たとえば、安定剤、塩類、または食塩水、および／または緩衝液を含有する水を、注射媒体として使用することが好ましい。

【０１３７】

一般に、「生理学的に許容できる担体」は、細胞に対して毒性または不当に有害でないものである。代表的な生理学的に許容できる担体としては、滅菌した無発熱物質水および滅菌した無発熱物質リン酸緩衝食塩水などがある。生理学的に許容できる担体には、薬学的に許容できる担体が含まれる。

【０１３８】

「薬学的に許容できる」は、生物学的にまたはほかの点で望ましくなくない材料、すなわち、望ましくない生物学的作用を引き起こさずに、被検対象に投与することが可能な材料を意味する。従って、このような医用組成物は、たとえば、ｅｘ　ｖｉｖｏ細胞トランスフェクションで、または被検対象にウイルス粒子または細胞を直接投与する際に、使用することができる。

【０１３９】
本発明のパルボウイルスベクターは、免疫原性応答を誘発するために（たとえば、ワクチンとして）投与することができる。一般に、本発明のワクチンは、本明細書に開示の感染性ウイルス粒子の免疫原性量を、薬学的に許容できる担体と組み合わせて含む。「免疫原性量」は、医用製剤が投与される被検対象で免疫応答を誘起するのに十分な感染性ウイルス粒子の量である。一般に、治療を受ける被検対象の年齢および種、および免疫応答が望まれる免疫原に応じて、１回量当たり約10^3～約10^{15}ウイルス粒子、好ましくは、約10^4～約10^{10}、さらに好ましくは、約10^4～10^6ウイルス粒子の量が適当である。被検対象および免疫原は上述の通りである。

【０１４０】
さらに、本発明は、核酸を細胞に送達する方法を提供する。一般に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法の場合、当技術分野で周知の標準的なウイルス形質導入方法で、ウイルスを細胞内に導入することができる。個々の標的細胞に適した標準的な形質導入方法に従って、適切な感染多重度でウイルス粒子を細胞に加えることが好ましい。標的細胞型および個々のウイルスベクターに応じて、投与するウイルス価は様々であってもよく、当業者は過度の実験なしで決定することができるであろう。

【０１４１】
組換えウイルスベクターは、生物学的に有効な量で細胞に投与することが好ましい。ウイルスベクターの「生物学的に有効な」量は、結果として感染（または形質導入）して、細胞で異種核酸配列を発現するのに十分な量である。ウイルスをｉｎ　ｖｉｖｏで細胞に投与する（たとえば、下記の通りに、ウイルスを被検対象に投与する）のであれば、「生物学的に有効な」量のウイルスベクターは、結果として形質導入され、標的細胞で異種核酸配列が発現するのに十分な量である。

【０１４２】
本発明のウイルスベクターが投与される細胞は、神経細胞（末梢神経系および中枢神経系の細胞を含む、特に、脳細胞）、肺細胞、網膜細胞、上皮細胞（たとえば、腸管および呼吸器上皮細胞）、筋細胞、樹状細胞、膵細胞（島細胞を含む）、肝細胞、心筋細胞、骨細胞（たとえば、骨髄幹細胞）、造血幹細胞、脾細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、前立腺細胞、生殖細胞等々を含むがその限りではない、任意の型であってもよい。あるいは、細胞は、前駆細胞であってもよい。さらなる代替として、細胞は、幹細胞（たとえば、神経幹細胞、臓幹細胞であってもよい）。またさらなる代替として、細胞は、癌細胞または腫瘍細胞であってもよい。さらに、細胞は、上記の、任意の種を起源としてもよい。

【０１４３】
本発明のある特定の実施形態では、細胞を被検対象から摘出し、パルボウイルスベクターを中に導入し、その細胞を被検対象に戻す。ｅｘ　ｖｉｖｏ治療のために、被検対象から細胞を除去し、続いて被検対象に導入し戻す方法は、当技術分野で周知である（たとえば、米国特許第５，３９９，３４６号（その開示内容全てを、本明細書に援用する）参照）。あるいは、ｒＡＡＶベクターを、別の被検対象からの細胞、培養細胞、または他の適当なソースからの細胞に導入し、その細胞を、それを必要としている被検対象に導入する。

【０１４４】
ｅｘ　ｖｉｖｏ遺伝子療法に適当する細胞は、上述の通りである。

【０１４５】
本発明のベクターを用いて形質導入された細胞を、製薬用担体と組み合わせて、「治療有効量」で被検対象に投与することが好ましい。本明細書で使用される「治療有効」量は、幾らかの改善または利益を被検対象に提供するために、ベクターによって送達された異種ヌクレオチド配列を発現させるのに十分な量である。言い換えれば、「治療有効」量は、被検対象における少なくとも１つの臨床症状の幾らかの軽減、緩和、または減少を実現する量である。幾らかの利益が被検対象に提供される限り、治療有効量は完全または治癒的である必要はないことを、当業者は理解するであろう。

【０１４６】
代替実施形態では、本発明によるベクターを用いて形質導入された細胞を投与して、送達されたポリペプチドに対する免疫原性応答を誘発することが可能である。一般に、免疫原性量のポリペプチドを発現する量の細胞が、薬学的に許容できる担体と組み合わせて投与される。「免疫原性量」は、医用製剤が投与される被検対象で、能動的な免疫応答を誘発するのに十分な、発現されたポリペプチドの量である。免疫原性ポリペプチドを投与する利益がその不利な点より勝っている限り、能動的な免疫応答により与えられる保護の程度は、完全または永続的である必要はない。
【０１４７】
被検対象に投与する細胞の投与量は、被検対象の年齢状態および種、細胞型、細胞により発現される核酸、投与方式等々によって異なる。一般に、１回量当たり、少なくとも約10^2～約10^8、好ましくは約10^3～約10^6細胞が投与される。「治療有効量」で細胞が投与されることが好ましい。
【０１４８】
本発明のさらなる態様は、本発明のウイルス粒子を用いて、ｉｎ　ｖｉｖｏで被検対象を治療する方法である。本発明のパルボウイルス粒子の、必要としているヒト対象または動物への投与は、ウイルスベクターの投与に関する技術分野で周知のいずれの方法であってもよい。
【０１４９】
代表的な投与方式としては、経口、直腸、経粘膜、局所、経皮、吸入、非経口（たとえば、静脈内、皮下、皮内、筋内、および関節内）投与、等々、ならびに、直接組織または器官注射、あるいは、くも膜下、直接筋内、心室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注射などがある。注射用剤は、液体溶液剤または懸濁剤のいずれかとして、注射前に液体に溶解または懸濁するのに適した固体の形態で、またはエマルジョンとして、従来の形態で調製することができる。あるいは、全身性様式よりむしろ局所様式で、たとえば、デポー、すなわち、徐放性製剤で、ウイルスを投与してもよい。
【０１５０】
被検対象に投与されたパルボウイルスベクターは、許容細胞または組織を形質導入することが可能である。本発明のパルボウイルスベクターによる形質導入に適した細胞は、上述の通りである。
【０１５１】
本発明の特に好ましい実施形態では、関心のあるヌクレオチド配列が被検対象の肝臓に送達される。肝臓への投与は、静脈内投与、門脈内投与、胆汁内投与、動脈内投与、および肝臓実質への直接注射を含むが、その限りではない、当技術分野で周知のいずれかの方法で行うことが可能である。
【０１５２】
他の好ましい実施形態では、本発明のパルボウイルス粒子が筋内に、さらに好ましくは筋内注射または局所投与によって（上述の通り）、投与される。脳への送達も好適である。他の好ましい実施形態では、本発明のパルボウイルス粒子が肺に投与される。
【０１５３】
本明細書に開示のパルボウイルスベクターを、適当な方法で、被検対象の肺に投与することができるが、被検対象が吸入する、本発明のパルボウイルスベクターを含む、呼吸可能な粒子のエアロゾル懸濁剤を投与することによって、投与することが好ましい。この呼吸可能な粒子は、液体であってもよく、固体であってもよい。本発明のパルボウイルスベクターを含む液体粒子のエアロゾルは、当業者に周知の加圧式エアロゾルネブライザーまたは超音波式ネブライザー等を用いて、適当な方法で製造することが可能である。たとえば、米国特許第４，５０１，７２９号を参照されたい。同様に、本発明のウイルスベクターを含む固体粒子のエアロゾルは、固体微粒子医薬エアロゾル発生器を用いて、製薬技術で周知の技術によって製造することができる。
【０１５４】

本発明のパルボウイルス粒子の投与量は、投与方式、治療すべき疾患または病態、個々の被検対象の状態、個々のウイルスベクター、および送達すべき遺伝子によって異なり、定型的な方法で決定することができる。治療有効量を達成するための代表的な１回量は、少なくとも約10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}形質導入ユニットまたはそれ以上、好ましくは、約10^8～10^{13}形質導入ユニット、またさらに好ましくは、10^{12}形質導入ユニットのウイルス価である。

【０１５５】

ある特定の実施形態では、抗癌剤（たとえば、サイトカイン類）または癌または腫瘍抗原を投与することによって癌または腫瘍を治療する方法の一部として、本発明のパルボウイルス粒子を投与する。パルボウイルス粒子は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に投与してもよく、ｉｎ　ｖｉｖｏで、または、本明細書に記載されている当技術分野で周知のｅｘ　ｖｉｖｏ方法を使用することによって、被検対象に投与してもよい。

【０１５６】

用語「癌」は、当技術分野で理解されている意味、たとえば、身体の遠い部位まで広がる（すなわち、転移する）潜在能力を有する組織の制御されない増殖、を有する。代表的な癌としては、白血病、リンパ腫、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、黒色腫、等々があるが、その限りではない。腫瘍形成癌を治療および予防する方法が好ましい。用語「腫瘍」も、たとえば、多細胞生物内の、異常な未分化細胞の塊として、当技術分野で理解される。腫瘍は悪性であってもまたは良性であってもよい。本明細書に開示された本発明の方法を使用して、悪性腫瘍を予防および治療することが好ましい。

【０１５７】

本発明による癌および腫瘍抗原は、上述した通りである。用語「癌を治療すること」または「癌の治療」は、癌の重症度を低下させるか、または癌を少なくとも部分的に消失させることを意味する。これらの用語は、癌の転移を減少させるか、または少なくとも部分的に消失させることを示すことが好ましい。これらの用語は、転移性結節の成長（たとえば、原発性腫瘍の外科的除去後）を減少させるか、または少なくとも部分的に消失させることを示すことがさらに好ましい。用語「癌の予防」または「癌を予防すること」は、本発明の方法が、癌の発生率または発生を、少なくとも部分的に排除または減少させることを意味する。言い換えれば、本方法は、被検対象における癌の進行を引き伸ばす、癌を管理する、癌の可能性または確率を低減させる、または癌の発生を遅らせる。

【０１５８】

同様に、用語「腫瘍を治療すること」または「腫瘍の治療」は、腫瘍の重症度を低下させるか、腫瘍を少なくとも部分的に消失させることを意味する。好ましくは、これらの用語は、腫瘍の転移を減少させるか、または少なくとも部分的に消失させることを意味することが好ましい。また、これらの用語は、転移性結節の成長（たとえば、原発性腫瘍の外科的除去後）を減少させるか、または少なくとも部分的に消失させることを示すことがさらに好ましい。用語「腫瘍の予防」または「腫瘍を予防すること」は、本発明の方法が、癌の発生率または発生を、少なくとも部分的に排除または減少させることを意味する。言い換えれば、本方法は、被検対象における腫瘍の進行を引き伸ばす、腫瘍を制御する、腫瘍の可能性または確率を低減させる、または癌の発生を遅らせる。

【０１５９】

他の実施形態では、癌または腫瘍を有する被検対象から細胞を除去し、本発明のパルボウイルス粒子と接触させてもよい。次いで、修飾された細胞を被検対象に投与し、それによって、癌または腫瘍抗原に対する免疫応答を誘起する。この方法は、ｉｎ　ｖｉｖｏで十分な免疫応答を備えることができない（すなわち、十分な量の促進抗体を産生することができない）免疫無防備状態の被検対象の場合に特に都合よく使用される。

【０１６０】

免疫調節性サイトカイン類（たとえば、α－インターフェロン、β－インターフェロン、γ－インターフェロン、ω－インターフェロン、τ－インターフェロン、インターロイキン－１α、インターロイキン－１β、インターロイキン－２、インターロイキン３、イン

ターロイキン－４、インターロイキン５、インターロイキン－６、インターロイキン－７、インターロイキン－８、インターロイキン－９、インターロイキン－１０、インターロイキン－１１、インターロイキン１２、インターロイキン－１３、インターロイキン－１４、インターロイキン－１８、Ｂ細胞成長因子、ＣＤ４０リガンド、腫瘍壊死因子－α、腫瘍壊死因子－β、単球化学誘引物質プロテイン１、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子、およびリンホトキシン）によって、免疫応答を増強できることは、当技術分野で周知である。従って、本発明のある特定の実施形態では、免疫応答を引き起こすための、すなわち、免疫療法を提供するための、本明細書に記載の方法と併せて、免疫調節性サイトカイン類（好ましくは、ＣＴＬ誘導性サイトカイン類）が被検対象に投与される。

【０１６１】

サイトカイン類は、当技術分野で周知のいずれかの方法で投与することができる。外因性サイトカイン類を被検対象に投与してもよく、あるいは、適当なベクターを使用して、サイトカインをコードするヌクレオチド配列を被検対象に送達し、ｉｎ　ｖｉｖｏでサイトカインを産生してもよい。

【０１６２】

本発明を説明してきたので、実施例を参照しながら、本発明を説明するが、この実施例は、例を挙げて説明するだけの目的により本明細書に含まれるものであり、本発明を限定する意図することを意図しない。

【０１６３】

［実施例１］

＜材料と方法＞

プラスミド。緑色蛍光性タンパク質（ＧＦＰ）を発現するｒＡＡＶプラスミドを、既述のpTR_{BS}ＵＦ－２（Ｎｉｃｋ　Ｍｕｚｙｃｚｋａからの寄贈品）から構築した。最初に、ヒト化ＧＦＰコード配列を、強化ＧＦＰ（ｅＧＦＰ）（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ）と置換して、プラスミド、ｐＴＲ－ＣＭＶ-ＧＦＰｎｅｏを作成した。このプラスミドからｒＡＡＶ－ＧＦＰｎｅｏベクターを作成した。第２に、ｎｅｏコード領域およびＳＶ４０プロモーターを含むＳａｌＩ断片を削除して、ｐＴＲ－ＣＭＶ－ＧＦＰを作成した。このレポートでは、このプラスミドからのベクターをｒＡＡＶ－ＧＦＰと呼んだ。

【０１６４】

プラスミドｐ４３ｍＥｐｏ（Ｂａｒｒｙ　Ｂｙｒｎｅからの寄贈品）は、ＣＭＶプロモーターの制御下にあるマウスエリスロポイエチン遺伝子を含み、ｗｔＡＡＶの半分未満の長さのｒＡＡＶレプリコン（ｒＡＡＶｍＥｐｏ）を作成した。λファージから、２．３ｋｂのＨｉｎｄ　ＩＩＩ断片を、ポリアデニル化シグナルと下流のＡＡＶ末端反復との間のＣｌａ　Ｉ部位に挿入することによって、この構築物の長いバージョン（ｐｍＥｐｏ－ｋ）を作成した。他所（ＭｃＣｏｗｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｂｒａｉｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　７１３：９９）に記載のｐＤＸ１１－ＬａｃＺから、ｒＡＡＶ－ＬａｃＺベクターを作成した。

【０１６５】

ウイルスベクター。１）特異的ｒＡＡＶ構築物、２）ＡＡＶｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子（ｐＡＣＧ）、または３）必須アデノウイルスヘルパー遺伝子（ｐＸＸ－６；Ｘｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７２：２２２４）を含む３プラスミドを共トランスフェクトすることによって、２９３細胞（プレップ当たり10^{8}～10^{9}細胞）でウイルスベクターを作成した。トランスフェクション後４０時間に、細胞を擦り取って培地に入れ、３サイクルの凍結－解凍によって溶解した。毛房状の塊からなる細片が分散するまで、この溶解産物を２μｇ／ｍｌのＤＮａｓｅＩと共に３７℃にてインキュベートした。遠心分離で溶解産物を一掃し、硫酸アンモニウムを使用してｒＡＡＶを沈澱させた（Ｄｒａｃｏｐｏｌｉら編。Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ　Ｌｔｄ．：　１９９６．ｐ．１２．１．１－１２．２．２３中の、Ｓｎｙｄｅｒら、Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ａｄｅｎｏ-ａｓｓｏｃｉａｔｅ

ｄ ｖｉｒｕｓ ｖｅｃｔｏｒｓ）。ウイルスｐｐｔを、８ｍｌ１０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０、１ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$で再懸濁し、塩化セシウムを加えて、最終密度１．４ｇ／ｃｍ^{3}および最終体積１２．５ｍｌとした。この溶液を、ＳＷ４１ローターで、３８ｋｒｐｍにて３６時間遠心分離した。各管の底を皮下針で穿刺し、液体をフラクションコレクターにポンピングすることによって、分画（０．７５ｍｌ）を回収した。ベクターを塩化セシウム中、４０℃にて保存した。

【０１６６】

０．４ｍｇ／ｍｌプロテアーゼＫ、１％サルコシル、および１０ｍＭ ＥＤＴＡを含む５０μ反応中、５０℃で１時間消化し、続いて、フェノール／クロロホルムで抽出することにより、ビリオンＤＮＡ（ｖＤＮＡ）を各分画１０μｌから抽出した。アルカリアガロースゲル電気泳動およびサザンブロットハイブリダイゼーションで分析するために、このサンプルを水で３倍希釈し、エタノールで沈澱させた。

【０１６７】

細胞および感染。ＨｅＬａ細胞およびＨＥＫ２９３細胞を、１０％ＦＢＳおよびＰｅｎ／Ｓｔｒｅｐを含むＤＭＥＭ培地で増殖させた。ウイルスベクターストックを培地で希釈してから、コンフルエント未満の培養に加え、感染後２４時間にＧＦＰ形質導入が蛍光顕微鏡で確認されるまで、細胞上に残しておいた。

【０１６８】

マウス肝臓でエリスロポイエチンを発現させるために、従来のｒＡＡＶまたは二本鎖ウイルス（ｓｃＡＡＶ）のいずれかの物理的粒子2×10^{10}を含む生理食塩水２００μｌを、１０週齢のＢａｌｂ－ｃＢｙＪマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）の門脈に直接注入した。ヘマトクリットを測定するために、感染時および７日間隔で、眼窩後静脈切開により、血液サンプルを採取した。

【０１６９】

［実施例２］

＜二本鎖ベクターの作成＞

レプリコンサイズの２２９９ヌクレオチドを有する、ＡｒＡＡＶプラスミド構築物（ｐＴＲ－ＣＭＶ－ＧＦＰ）を使用して、従来の方法で、ウイルスベクターストック（ｒＡＡＶ－ＧＦＰ）を作成した。このベクターのダイマー複製型の予測されるサイズは、４４７４ヌクレオチドであり（図１）、これは、野生型ＡＡＶゲノムの長さの９５．６％であった。このウイルスベクターを、ＣｓＣｌにおける等密度勾配遠心分離で分画し、各分画のｖＤＮＡ含量をアルカリアガロースゲルで分析した（図２）。ホスホイメージャースキャンを使用して、各分画からｖＤＮＡ特異的バンドを定量化した。変性条件で、モノマーゲノムのおよそ２倍の長さの自己相補的ダイマーＤＮＡ（図２、パネルａ、分画１０～１３）で実行した。分画２～４中のハイブリダイジング材料は、勾配の底に沈澱する、パッケージされていない複製型ＤＮＡである。ベクター精製にＤＮａｓｅステップを含めた（方法参照）が、この処理は、網羅的であることを意図するものではなく、また、この材料は、ＤＮａｓｅ感受性であるが、分画１０～１４中の材料は、ＤＮａｓｅ抵抗性である（データ示さず）ことが次の実験で分かった。主としてダイマーＤＮＡゲノムを含むベクター（分画１０および１１）を、二本鎖または「自己相補的」ウイルス（ｓｃＡＡＶ）と呼んだ。こうした分子の逆方向反復構造を、制限酵素消化で確認した（データ示さず）。

【０１７０】

２つの補足的ｒＡＡＶベクター（図１）を作成し、並行して精製し、同じ方法で分析した（図２、パネルｂおよびｃ）。最初の、ｒＡＡＶ－ＧＦＰｎｅｏは、ＧＦＰに加えてｎｅｏ遺伝子を含み、長さ３３９８ヌクレオチドの複製ゲノムを有していた。これは、ｗｔＡＡＶゲノムサイズの７２．６％であり、ダイマーとしてパッケージするには大き過ぎた。第２は、４８９８ヌクレオチドのｒＡＡＶ－ＣＭＶ－ＬａｃＺ構築物であり、これはｗｔＡＡＶゲノムサイズより僅かに大きかった（１０４．７％）が、効率の良いパッケージングの範囲内であった（Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：２１０１）。分画１４および１５における、密度が低く、移動性が高

いハイブリダイジング材料（図２、パネルｃ）は、欠失を受けたゲノムを含んでいたため、これらの分画は、次の実験で使用しなかった。

【０１７１】

［実施例３］

＜二本鎖ベクターとモノマーベクターを用いた形質導入およびＡｄ共感染の作用＞

ｓｃＡＡＶ－ＧＦＰ（図２、パネルａ、分画１１）の形質導入効率を、低多重度で感染させたＨｅＬａ細胞で、相同なモノマー（分画１３）、ならびに、ＧＦＰｎｅｏおよびＬａｃＺベクター（図２、パネルｂおよびｃ、それぞれ、分画１３および１２）と比較した（図３）。モノマーとダイマーＤＮＡコピー数を補正した後、サザンブロットを用いて、各分画の特異的、全長ｖＤＮＡホスホイメージャーシグナルから粒子数を算出した。従って、各二本鎖ウイルスは、逆方向反復方向で、導入遺伝子の２コピーを１つの分子として含み、各モノマー粒子は１つの一本鎖コピーを含む。

【０１７２】

およそ９０％のダイマーウイルスを含むｓｃＡＡＶ－ＧＦＰベクター（分画１１）は、５．９：１の比率の物理的粒子と形質導入ユニットを生じ、従って、高い形質導入効率の予測が裏付けられた。およそ８０～９０％のモノマーウイルスを逆に含む、同一勾配からの分画１３は、２４．６：１の粒子と形質導入ユニットとの比率であった。モノマー分画中にダイマーが混入していることが、モノマー成分がダイマー分画に与えるであろう影響より大きな影響を、その形質導入潜在能力に与えると考えられるとき、この効率の４倍の差は、最低限の差を表す。対照的に、モノマーｓｓＤＮＡ　ＧＦＰｎｅｏおよびＬａｃＺベクターは、それぞれ、既に報告されたこれらのベクターの効率に類似した、１２５：１および８２８：１という、粒子と形質導入ユニットとの比率を有していた（Ｆｉｓｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７０：５２０；Ｚｏｌｏｔｕｋｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　６：９７３）。

【０１７３】

従来のｒＡＡＶベクターの形質導入効率は、Ａｄとの共感染によって、またはＤＮＡ損傷剤または他のタイプの細胞ストレスで処理することによって、大幅に増強することができる（最高１００倍）。この増強は、活性なｄｓ－ＤＮＡ転写鋳型への、ｓｓＤＮＡゲノムの、細胞介在形質転換と関連していた。二本鎖ベクターは、１つの分子としてパッケージされた２つの相補鎖を含むため、形質導入は、アデノウイルスによる増強と関係がないことが予期される。ＨｅＬａ細胞を二本鎖ベクター、および細胞当たり５感染ユニットのアデノウイルスに共感染させたとき、これは、概ね真実である（図３）。既報の通り、ＣＭＶプロモーターの活性に対するアデノウイルス感染の転写作用に原因があると考えられる作用である、二本鎖ウイルス感染培養中のＧＦＰ陽性細胞数は、１．６倍増加したに過ぎなかった（Ｃｌｅｓｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　５：１７４；Ｌｏｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７２：１８０）。モノマーベクター形質導入率は、Ａｄ共感染によって２．４倍上昇したが、ＧＦＰｎｅｏおよびＬａｃＺベクターは、それぞれ、６．０倍および１２．８倍誘導した。

【０１７４】

要約すると、培養ＨｅＬａ細胞の場合、二本鎖ベクターは、モノマーｓｓ－ＤＮＡゲノムのみを含む相同なベクターより４倍以上、効率が良かった。モノマー分画に、およそ１０～２０％のダイマーベクターの混入がなければ、この差は、もっと大きくなるであろう。この解釈と一致して、二本鎖ベクターは、従来のｒＡＡＶ－ＧＦＰｎｅｏベクターより２０倍効率が良く、ｒＡＡＶ－ＬａｃＺベクターより１４０倍効率が良かった。

【０１７５】

［実施例４］

＜宿主細胞ＤＮＡ合成の非存在下で、二本鎖ベクターによる形質導入＞

二本鎖ベクターのｖＤＮＡは、１分子上に両ＤＮＡ鎖を含んでいたため、脱コートしたとき、効率の良い再アニーリングが可能になり、これらのベクターを使用することによって、形質導入における宿主細胞ＤＮＡ合成の役割が不要になることが予期される。宿主細胞

ＤＮＡ合成を阻害するために、感染の２４時間前にヒドロキシ尿素（ＨＵ）で前処理したＨｅＬａ細胞で、ｓｃＡＡＶ－ＧＦＰベクターと、相同なモノマー、およびＧＦＰｎｅｏベクターとを比較した。ヒドロキシ尿素処理は、感染後、連続的で、途切れなく、同一濃度であり、ＧＦＰ形質導入を採点するまでの次の２４時間、細胞で維持した。

【０１７６】

ｓｃＡＡＶ－ＧＦＰからの形質導入は、ＨＵの濃度上昇に応答して、最高１．９倍刺激された（図４）。この刺激は、Ａｄ共感染で観察されたものと大きさが似ており、細胞ストレスによって誘発されるＣＭＶプロモーターの転写的トランス活性化と、非分裂細胞におけるＧＦＰの蓄積との組み合わせによる影響を受けたと考えられる。対照的に、相同なモノマーベクター分画からの形質導入は、最低のＨＵ濃度で刺激され、最高濃度で阻害された。二本鎖ウイルス分画よりおよそ５倍低いレベルである、高いＨＵ濃度におけるモノマーベクターからの残留形質導入活性は、モノマー分画に、粒子を含むダイマーが１０～２０％混入していることと一致する（図２、パネルａ）。ｒＡＡＶＧＦＰｎｅｏベクター形質導入は同一条件で、１０倍以上阻害された。ポリメラーゼα／δ特異的インヒビターであるアフィディコリン処理によって、全く同じ結果が得られた（図４、パネルｂ）。このことから、二本鎖ベクター形質導入は、宿主－細胞ＤＮＡ合成と関係がないという仮設が裏付けられた。

【０１７７】

［実施例５］

＜二本鎖ベクターによるｉｎ　ｖｉｖｏ形質導入＞

二本鎖および従来の一本鎖ｒＡＡＶのｉｎ　ｖｉｖｏ効率を比較するために、異なるレポーターを使用した。ダイマー産生構築物は、ＣＭＶプロモーターから転写されたマウスエリスロポイエチン遺伝子（ｍＥｐｏ）を含んでいた。この最小ベクターの複製エレメントのサイズは、２２４８ヌクレオチドであった。この分子のダイマー形は、４３７２ヌクレオチドの長さであって（図１）、ｗｔＡＡＶゲノムサイズの９３％であり、容易にパッケージされた。第２の構築物は、同一導入遺伝子に、下流異種配列（λファージ）を加えて、組換えベクターのサイズを４５７０ヌクレオチド、すなわち、ｗｔＡＡＶゲノムサイズの９８％とした。先の研究で、λファージＤＮＡをｓｔｕｆｆｅｒとして使用したが、ベクターに有害な作用はなかった（Ｍｕｚｙｃｚｋａ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９２）Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７）。両ベクターをヘパリン－アガロースクロマトグラフィーで精製した。小さい方のベクターをＣｓＣｌ勾配でさらに精製して、ダイマーＤＮＡ含有ビリオンを単離した（表示せず）。ＤＮＡ含有粒子数を決定するために、アルカリアガロースゲルからのサザンブロットを使用して、この２つのベクターストックを定量化した。この場合、ダイマー分画における粒子のおよそ２５％が、別々のモノマーゲノム２個を含んでいた。これらを、密度によって、真のダイマーと分けることはできなかったため、また、それらの挙動が特性決定されていなかったため、ダイマー効果が、過大評価されるよりむしろ過少評価されるに過ぎないように、全長ベクターと比較する目的で、これらを、ダイマー粒子として計数した。

【０１７８】

同数の物理的ｒＡＡＶ粒子（生理食塩水２００μｌ中、動物当たり2×10^{10}個）を門脈注入によりマウスに投与した。７日間隔で、ヘマトクリットの変化を観察することにより、ｍＥｐｏ遺伝子の発現を評価した。対照マウスには、門脈内食塩水注入を投与するかまたは操作しなかったが、７日間隔で採血した。二本鎖ベクターを投与したマウスは、応答して、ヘマトクリットが急速に上昇し（図５）、その後２週間にわたって上昇し続けた。エリスロポイエチンの発現と、赤血球産生との間の時間のずれを考慮すると、第１週以内に、二本鎖ベクターが高レベルで発現されたと考えられる。全長ｓｓＤＮＡベクターを投与したマウスは、注入後２１日まで、ヘマトクリットの有意な上昇を示さず、実験の間に、二本鎖ベクターを投与した動物と比較可能なレベルに到達しなかった。

【０１７９】

ｓｃＡＡＶｍＥｐｏに感染したマウスは、同じ遺伝子を担持する全長ｓｓＤＮＡベクター

より速やかな応答、およびヘマトクリットの大幅な上昇を来たした。こうした結果は、我々の培養細胞での観察結果を裏付け、またダイマーベクターは、脱コートおよび核への進入後、直ちに導入遺伝子を発現する用意ができているという考えと一致している。最終的に、より高レベルの発現を達成したことは、多くの感染細胞が、従来のｒＡＡＶからｄｓＤＮＡを形成できないことおよび／または二本鎖の形成前に、ｓｓｖＤＮＡが喪失／分解することを表す（Ｍｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１９：１３）。

【０１８０】

細胞をＨＵで前処理することによって証明した通り、ｓｃＡＡＶベクターを用いた形質導入は、宿主細胞ＤＮＡ合成と無関係である。ＤＮＡ合成の非存在下で細胞を形質導入できる能力は、生物学における、ｓｃＡＡＶベクターの親ウイルスからの根本的離脱を表し、従来のｒＡＡＶベクターであればできないであろう環境で、ｓｃＡＡＶベクターを、機能できるようにさせる。ある細胞型は、明らかに相補鎖を合成または動員できないために、ｒＡＡＶ形質導入の効率が極めて悪い（Ｆｉｓｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ７０：５２０；Ａｌｅｘａｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ７：８４１；Ｍｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１９：１３）。ｓｃＡＡＶは、このような制限を受けず、全ての他のステップで、ＤＮＡ合成と関係なく、マーカー遺伝子と共に使用して、細胞がｒＡＡＶ形質導入を許容するかどうかを直接決定することができる。

【０１８１】

標的細胞がｒＡＡＶ相補鎖を作れる能力と関係なく、こうした試薬が、速やかな開始を必要とする遺伝子の代替ＡＡＶ送達システムを提供することは明白である。もっと重要なことは、同数の粒子を投与するとき、ｓｃＡＡＶベクターの方が、総体的に高レベルの治療用産物をもたらすことが、我々のデータから示唆されることである。従って、ｓｃＡＡＶベクターは、ベクター投与に対して、よりタイムリーな、頑強な、または定量的な応答が要求される場合に、有用である。臨床治験のために、また患者のウイルス曝露を最小限に抑えるために、最小用量で臨界レベルの導入遺伝子発現を獲得できる潜在能力も、ベクター作成要件に関して重要である。

【０１８２】

［実施例６］

＜二本鎖パルボウイルスベクターを作成するための、改良された基質＞

二本鎖ベクターストックの産生を合理化するために、また、二本鎖ゲノムとモノマーゲノムとの混合集団の複雑な状態を排除するために、ダイマーゲノムのみを生成する突然変異体ベクターを作成した（図６）。この構築物は、Ｒｅｐニッキング部位（ｔｒｓ）が除去されるように、１つのＴＲに突然変異を有するが、他のＴＲは野生型である。この作用は、回転ヘアピン複製がゲノムの野生型末端から開始し、末端分離せずに、突然変異体末端を通って進行し、次いで、ゲノムを横切って再び戻り続け、ダイマーを作成する。最終生成物は、真中に突然変異体ＴＲを有し、各端に野生型ＴＲを有する自己相補的ゲノムである。次いで、各巡でダイマー構造が維持されること以外は、通常通り、この分子の複製およびパッケージングが野生型ＴＲから進行する。

【０１８３】

この突然変異体バックグラウンドを使用して、ｒＡＡＶ－ＣＭＶ－ＧＦＰ－Ｈｐａ－ｔｒｓおよびｒＡＡＶ－ＣＭＶ－ｍＥｐｏ－Ｈｐａ－ｔｒｓの両者のベクターストックを作成し、上述の通り、その生成物をＣｓＣｌ勾配で分析した（図７）。これらの構築物は、およそ９０％の二本鎖ベクターを作成する。これによって、二本鎖パルボウイルスベクターを高収量で作成することが可能になり、また、ＣｓＣｌ密度勾配精製のさらなるステップなしに、これらのベクターにイオジキサノール／ヘパリン精製を使用することができる。

【０１８４】

これらのベクターの作成に使用されるプラスミド構築物は、発現される導入遺伝子のコード鎖と比較して、５’ＴＲに欠失を含んでいた。この欠失は、Ｄエレメント全部と、３ｂ

ｐのＡエレメントを含んでおり、従って、ニッキング部位が伸びている（図６）。Ａエレメントの残りと導入遺伝子との間の全てのＡＡＶ配列が欠失している。Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８３）Ｃｅｌｌ　３３：１３５に記載の通り、このことは、突然変異させたＴＲおよび野生型ＴＲを挟む配列間の相同組換えを妨げ、従って、遺伝子変換の確率を減少させる。この欠失は、５’から導入遺伝子（Ｋｐｎｌ）までおよび細菌プラスミド配列のＡｍｐ遺伝子内（Ｘｍｎｌ）のユニーク制限部位で切断することによって構築した。１つのＴＲを含む、除去された断片を、Ａｍｐ遺伝子内の同一部位、および先にＡ／Ｄ接合部の左方のＢａｌＩ部位に挿入した合成のＨｐａｌ部位で切断しておいた、第２のｒＡＡＶプラスミドからの断片と置き換えた。

【０１８５】

代替実施形態では、一端に分離可能なＡＡＶ　ＴＲを有する二本鎖ベクターを優先的に作成するための鋳型を作成し、また、修飾されたＡＡＶ　ＴＲを、ある配列をＴＲに挿入することによって作成する。ある特定の実施形態では、野生型ＡＡＶプラスミドｐｓｕｂ２０１を使用して、この鋳型を作成する（Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　６１：３０９６）。この構築物は、ウイルスＴＲを挟む、ユニークな一対のＸｂａＩ部位ならびにＰｖｕＩＩ部位を含む。ｐｓｕｂ２０１、Ｈｐａ７およびＨｐａ９に由来する２つのＡＡＶプラスミド中間生成物は、ＡＡＶゲノムのＴＲ配列における、それぞれ、ヌクレオチド１２１と１２２との間（Ｈｐａ９）および４５５４と４５５５との間（Ｈｐａ７）のＢａｌＩ部位に挿入されたユニークなＨｐａｌリンカー（ＣＣＡＡＴＴＧＧ）を有する（Ｘｉａｏ，Ｘ．，（１９９６），「Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｄｅｎｏ-ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒｕｓ（ＡＡＶ）ＤＮＡ　ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ」，Ｐｈ．Ｄ．Ｄｉｓｓｅｒｔａｔｉｏｎ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，ＰＡ）。これらのリンカーを挿入することによって、野生型ＡＡＶニッキング部位を生来の位置から内側に離れた位置に移し、その結果、複製後、ＡＡＶ　Ｒｅｐタンパク質で分離させることができなくなる。

【０１８６】

これらの基質は、遺伝子変換が起こるまでダイマー中間生成物を蓄積する。Ｈｐａｌ制限酵素によるＨｐａ７またはＨｐａ９の消化と、ＸｂａＩによる部分的消化を加えると、野生型ＡＡＶニッキング部位ならびにＤエレメントを欠く（Ｈｐａ９の場合、左から、Ｈｐａ７の場合右から）、新規なＴＲが生じる。Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ，（１９８３）Ｃｅｌｌ３３：１３５に記載の通り、この基質は、Ｄエレメントがないため、遺伝子変換に適さず、ウイルスの感染後、ダイマー複製中間生成物が蓄積し続ける。ｗｔＡＡＶゲノムの半分以下のサイズの分子で出発するとき、この中間生成物は、ＡＡＶキャプシドで優先的にパッケージされる。これらの分子は、ダイマーの形であり（修飾されたＴＲを介して共有的に連結している）、さらに詳細には、これらの分子は、自己相補的であるため、二本鎖基質を担持するパルボウイルスベクターのユニークなソースである。これらのベクター粒子は、現在使用されている全てのＡＡＶベクターに必要な律速段階、すなわち、第２鎖合成を回避する（Ｆｅｒｒａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７０：３２２７－３４参照）。

【０１８７】

［実施例７］

＜樹状細胞の形質導入＞

樹状細胞（ＤＣ）は、抗原提示および幾つかのＴ細胞依存性免疫応答の開始において重要な役割を果たすとみられる。ＤＣは、マクロファージまたは単球より強力な抗原提示細胞（ＡＰＣ）であることが証明されている。さらに、ＤＣは、単球より最高１０倍効率良くＴ細胞増殖を刺激する（Ｇｕｙｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．４５：１４６，１４７　ｃｏｌ．２）。従って、より効果的な免疫応答を引き起こすために、樹状細胞を標的としてベクターを送る多数の努力がなされている。ＤＣが、ＡＡＶベクターに応じないことは既報の通りである（Ｊｏｏｓ

ｓ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７２：４２１２）。

【０１８８】

ヒト患者２例からのＤＣを入手し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養した。ｗｔＡＡＶ－ＧＦＰベクターまたはｐＨｐａ７ＧＦＰ（実施例１に記載の二本鎖ベクター）を用いて、各患者からの細胞を、１０というＭＯＩで、形質導入した。７日後、ｗｔＡＡＶ－ＧＦＰを用いて形質導入した細胞では、ＧＦＰ発現は検出されなかった。対照的に、ダイマーｐＨｐａ７ＧＦＰベクターを用いて形質導入したＤＣの５～１５％で、ＧＦＰ発現が確認された。

【０１８９】

以上の結果から、ＤＣのｗｔＡＡＶ形質導入の律速段階は、宿主細胞が第２鎖合成を仲介できる能力のレベルであることが示唆される。本発明のパルボウイルスベクターを使用すると、細胞に二本鎖基質を提供することによって、このステップが不要になると考えられる。従って、本発明のダイマーパルボウイルスベクターは、ｗｔＡＡＶベクターと異なる（たとえば、より広い）親和性および標的細胞範囲を有する。

【０１９０】

［実施例８］

＜ｐＨｐａ７ＧＦＰのＩｎ　ｖｉｖｏ投与＞

ｉｎ　ｖｉｖｏで二本鎖ベクターの向性を評価するために、実施例７に記載のｗｔＡＡＶ－ＧＦＰベクターまたはｐＨＰＡ７ＧＦＰベクター、およそ１．５×10^{11}を、マウスに筋内投与（ｉｍ）する。投与後、様々な時刻（たとえば、４、８、１６、３２、６４日等々）に、マウスを屠殺して剖検を実施し、様々な宿主細胞および組織における導入遺伝子発現を決定する。発現の開始、反応速度論および持続性も評価し、ｗｔＡＡＶおよび二本鎖ベクターに関して比較した。特に関心があるのは、一般に、ｗｔＡＡＶベクターに応じない細胞、たとえば、骨髄幹細胞、星状細胞、および肺上皮細胞である。非複製細胞または第２鎖ＡＡＶ合成を非能率的に支持するゆっくり複製する細胞、たとえば、筋肉、肝臓および中枢神経系の細胞も、やはり関心がある。

【０１９１】

前述の発明を、明瞭にし、また理解するために、実例および実施例として、かなり詳細に説明してきたが、添付のクレームおよびその同等物の範囲内で、ある一定の変更および修飾を行っても良いことは、明白になるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図１】　ｒＡＡＶおよび二本鎖ベクターのビリオンＤＮＡ含量を示す図である。この図面は、本研究で使用したベクターのＤＮＡ含量、およびビリオンから放出されたときにベクターがとる、予測されるコンフォメーションを示す。サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）初期プロモーターから発現される導入遺伝子を以下に示す：緑色蛍光性タンパク質（ＧＦＰ）、βガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、マウスエリスロポイエチン（ｍＥｐｏ）。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（ｎｅｏ）は、ＳＶ４０初期プロモーター（ＳＶ４０）から発現される。パッケージされた各ＤＮＡ分子のヌクレオチド（ｎｔ）で、サイズを示す。自己相補的または二本鎖（ｓｃＡＡＶ）ＧＦＰダイマーおよびｍＥｐｏベクターは、末端反復の余分のコピー１つと共に、完全な二本鎖ＤＮＡに折り重なるが、ＧＦＰｎｅｏ、ＬａｃＺ、およびｍＥｐｏｋベクターは、相補鎖の細胞介在性ＤＮＡ合成を必要とする。

【図２】　ＣｓＣｌ勾配によるベクター分画を示す図である。ビリオンＤＮＡ（ｖＤＮＡ）を、ＣｓＣｌ勾配分画ＣＭＶ－ＧＦＰ（パネルａ）、ＧＦＰｎｅｏ（パネルｂ）、およびＬａｃＺ（パネルｃ）ｒＡＡＶベクターから抽出した。ｖＤＮＡのアルカリアガロースゲルをサザンブロットし、ＣＭＶ－ＧＦＰＤＮＡ断片とハイブリダイズした。パネルの左端のマーカーは、ウイルスベクターの作成に使用したプラスミドから切除したベクター配列であった（結果参照）。

単位長、ｓｓＤＮＡ、分子あたりのベクターコピーの数を、１×、２×、および４×で示す。図３および４に示す、実験で使用したウイルスベクターは、ＣＭＶ－ＧＦＰは、分画ａ－１１またはａ－１０からであり（図のレジェンドに示す通り）、ＧＦＰｎｅｏは分画

ｂ－１３からであり、ＬａｃＺは分画ｃ－１２からであった。

【図３】　共感染アデノウイルスの非存在下および存在下における、二本鎖ベクターと従来のｒＡＡＶベクターの形質導入効率を示す図である。ｓｃＡＡＶ－ＧＦＰ分画１１（細胞当たり０．５粒子）、ｒＡＡＶ－ＧＦＰｎｅｏ分画１３（細胞当たり２粒子）、またはｒＡＡＶ－ＬａｃＺ分画１２（細胞当たり０．５粒子）に感染させた、急速に分裂しているＨｅＬａ細胞で、３つのＣｓＣｌ分画ベクター（図１）の効率を比較した。感染後２４時間に、蛍光顕微鏡を使用して、または細胞を固定してＸ－Ｇａｌ染色することによって、ＧＦＰ陽性細胞を計数することにより、形質導入を定量化した。ＧＦＰ発現またはＬａｃＺ発現に関して陽性を得点した細胞数で決定した、形質導入ユニット当たりの物理的粒子数として、形質導入効率をグラフ化した。濃い灰色のバーは、５ｐｆｕ／細胞でＡｄ共感染が存在する条件での形質導入効率を示す。

【図４】　ＤＮＡ合成インヒビターの存在下で、二本鎖ベクターおよび従来のｒＡＡＶベクターを用いた形質導入（パネルａ）を示す図である。３．８×１０^{6}粒子のｓｃＡＡＶ－ＧＦＰ（黒菱形）（図２ａ、分画１０）、同なモノマー（黒丸）（図２、パネルａ、分画１４）、またはｒＡＡＶ－ＧＦＰｎｅｏ、（図２、パネルｂ、分画１３）に感染させる２４時間前に、３０％コンフルエンスのＨｅＬａ細胞培養を、表示濃度のヒドロキシ尿素で処理した。ＨＵ処理は、感染後２４時間に形質導入を分析するまで維持した。全細胞数と関係なく、１０の確率場におけるＧＦＰ陽性細胞数の平均値から各データポイントを算出したが、これは、ヒドロキシ尿素が細胞分割に影響を及ぼすため、変わりやすい（パネルｂ）。表示濃度のアフィディコリンの存在下で、同一手順を使用して、形質導入を評価した。二本鎖および相同なモノマー（分画１０および１４）のみを比較した。

【図５】　二本鎖または一本鎖ｒＡＡＶベクターを用いた、マウス肝臓組織のｉｎ　ｖｉｖｏ形質導入を示す図である。生理食塩水２００μｌ中に含まれる２×１０^{10}粒子のｓｃＡＡＶ－ＣＭＶ－ｍＥｐｏ（黒菱形）（ｎ＝４）、または全長一本鎖ｒＡＡＶ－ＣＭＶ－ｍＥｐｏλ（黒三角）（ｎ＝５）のいずれかを、１０週齢のＢａｌｂ－ｃ　ＢｙＪマウスに、門脈注射によって注入した。対照マウスの１群に生理食塩水（白四角）（ｎ＝４）を注入し、事前に外科的処置をせずに、同じ７日間隔で、マウス１匹（白丸）を瀉血した。血液ヘマトクリットをｍＥｐｏ発現の範関数測度として使用した。

【図６】　本発明の二本鎖パルボウイルスベクターを作成するのに好適な鋳型を示す図である。

【図７】　ｒＡＡＶ－ＣＭＶ－ＧＦＰＨｐａ－ｔｒｓ突然変異体ベクターのＣｓＣｌ密度勾配を示す図である。

【図１】

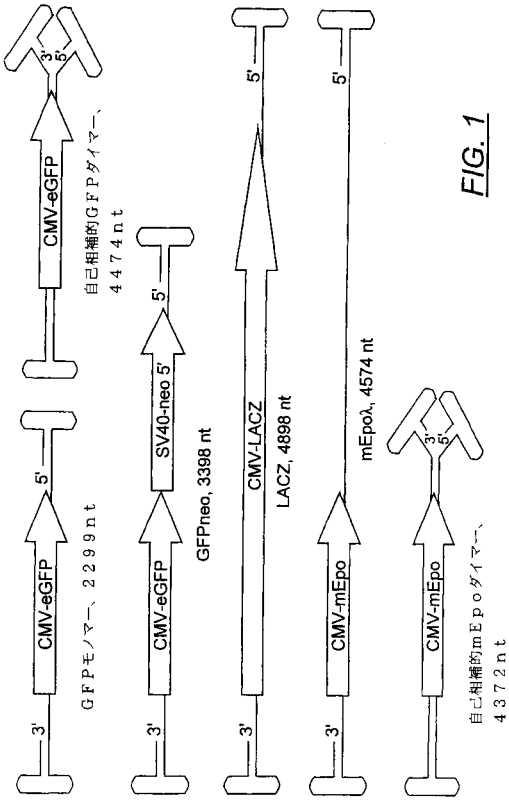

FIG. 1

【図２】

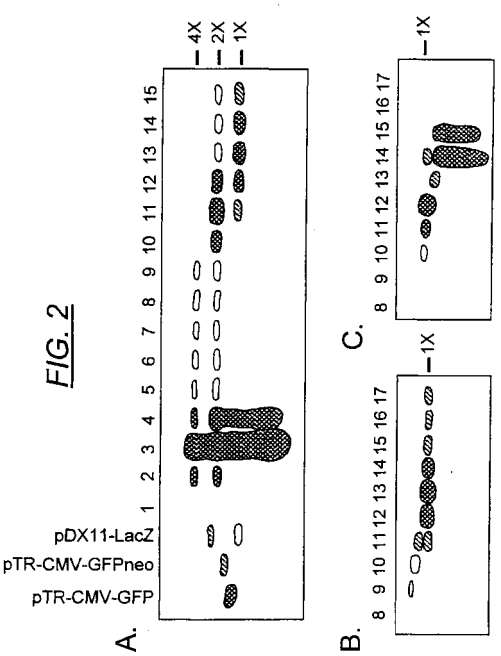

FIG. 2

【図３】

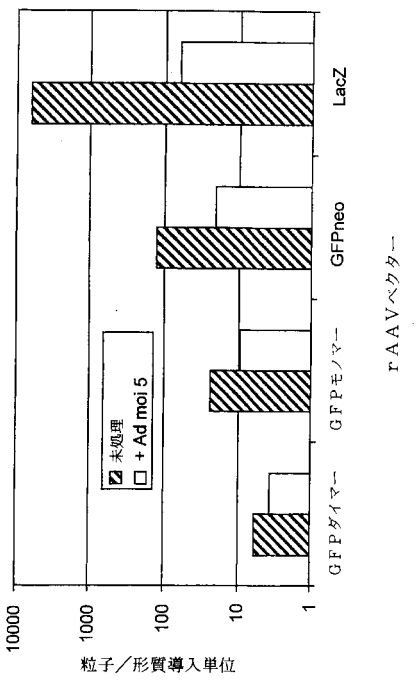

FIG. 3

【図４】

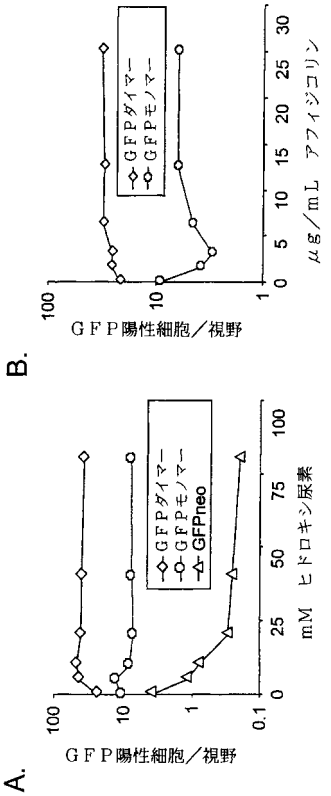

FIG. 4

【図５】

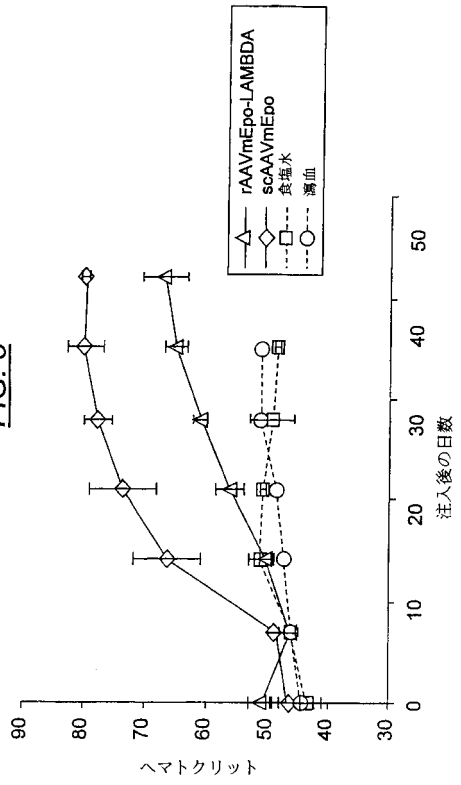

FIG. 5

【図６】

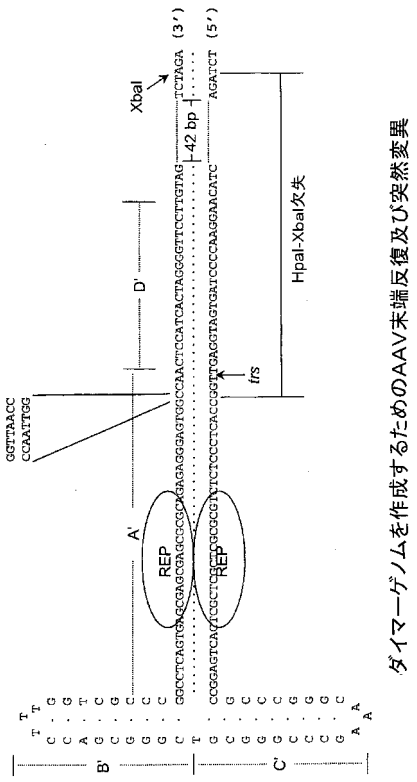

FIG. 6

ダイマーゲノムを作成するためのAAV末端反復及び突然変異

6/7

【図７】

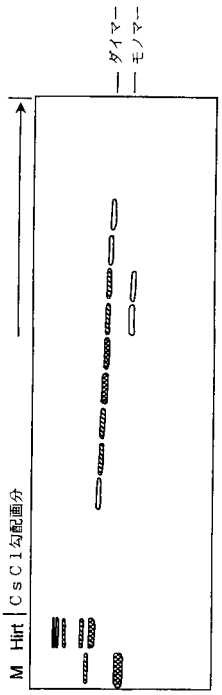

FIG. 7

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61K	*31/7088*	*(2006.01)*	A61K	31/7088	
A61P	*31/00*	*(2006.01)*	A61P	31/00	
A61P	*33/00*	*(2006.01)*	A61P	33/00	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P	*37/00*	*(2006.01)*	A61P	37/00	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	102
C12N	*7/02*	*(2006.01)*	C12N	7/02	

(72)発明者 サムルスキー，リチャード・ジュード
アメリカ合衆国ノースカロライナ州２７５１４，チャペル・ヒル，ダーリン・サークル １０２
(72)発明者 マッカーティ，ダグラス・エム
アメリカ合衆国ノースカロライナ州２７５１４，チャペル・ヒル，スランシス・ストリート １５

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第０１／０１１０３４（WO，Ａ１）
FEBS Lett.，１９９６年，Vol.397，P.97-100
BLOOD，２０００年１１月１６日，Vol.96，No.11. PART1，P.432a
J. Virol.，１９９６年，Vol.70，No.1，P.520-532
J. Virol.，１９９６年，Vol.70，No.5，P.3227-3234

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09
C12N 7/00-7/04
C12N 5/10
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed