

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/24916 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/48, 15/867, C07K 14/15 (74) 代理人: 青山 稔, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08090
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 18 日 (18.09.2001) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-285857 2000 年 9 月 20 日 (20.09.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 寶酒造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 蝶野英人 (CHONO, Hideto) [JP/JP]; 〒524-0036 滋賀県守山市伊勢町465-7 Shiga (JP). 松村 肇 (MATSUMURA, Hajime) [JP/JP]; 〒520-2134 滋賀県大津市瀬田3丁目8-8 宝酒造瀬田研修寮203号 Shiga (JP). 上野充博 (UENO, Mitsuhiro) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目6-28 Shiga (JP). 加藤郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPLEX

(54) 発明の名称: 複合体

(57) Abstract: A complex comprising a double-stranded DNA containing a terminal repeated sequence originating in a retrovirus and a DNA having a base sequence which does not occur in this retrovirus and a retrovirus-origin protein component.

(57) 要約:

レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体。

WO 02/24916 A1

明 細 書

複合体

5 技術分野

本発明は医学、薬学、農林水産学、食品学の分野において有用な真核生物に外来遺伝子を導入して形質転換する方法およびそれに関連する一連の技術に関する。

背景技術

- 10 真核生物への遺伝子導入法としては、ウイルスベクターを用いる方法、裸のDNAをエンドサイトーシスや電気穿孔法、遺伝子銃によって導入する方法等が知られている。ウイルスベクターは、遺伝子治療の分野で基礎から臨床まで幅広く利用されている技術であり、例えばアデノウイルスベクターは標的細胞で目的遺伝子を一過性に大量発現させるのに適している。一方、レトロウイルスベクター
- 15 は、宿主染色体への安定な組み込み機能により長期安定発現が可能であり、遺伝病の遺伝子治療の分野で期待されているベクターであり、また、トランスジェニック動物作製の分野でも期待されているベクターである。

- しかし、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法では、ウイルス感染を介して遺伝子導入されることからウイルスの指向性が問題となり、該ウイルスに対するレセプターを細胞表面に発現していない細胞には遺伝子導入することができない。この欠点を克服するため、水疱性口内炎ウイルスの外皮糖蛋白質VSV-Gを利用した広範な宿主域に感染可能なシュードタイプレトロウイルスベクターが開発されている。該ベクターは哺乳類のみならず、魚類、鳥類、昆虫、両生類等に遺伝子導入可能で、トランスジェニック動物作製への応用が試みられているが、
- 20 レトロウイルスの特性上、標的細胞に1コピーしか入らないこと、及び感染から染色体への組み込みまでに少なくとも7時間を要すること等の問題点を有している。

- 25 裸のDNAを用いた遺伝子導入の場合、DNAは大腸菌等で容易に大量に調製することが可能であり、また、遺伝子導入は例えばリン酸カルシウムやカチオニ

ックリポソームを介したエンドサイトーシスや、電気穿孔法、遺伝子銃、あるいはマイクロインジェクション技術によって可能である。この場合、一部のDNAが組換えにより染色体に取り込まれるが、その効率はきわめて悪く、ほとんどの場合一過性の遺伝子発現を期待した場合にのみ用いられている技術であり、長期安定発現には不適である。しかしながら、トランスジェニック生物作製においては、現時点では専ら裸のDNAをマイクロインジェクション等によって導入する技術が採用されてきており、上記したように染色体への遺伝子の組み込みは偶然の組換えによってしか成立せず、トランスジェニック生物の作製効率はきわめて悪く、そのため多大なコストと時間がかかっているのが現状である。

発明の目的

本発明の目的は、レトロウイルスベクターの持っている特性である染色体への安定な遺伝子の組み込み機能を生かしつつ、宿主域を選ばずに遺伝子を導入し、幅広い範囲の細胞を形質転換する方法、及び該方法に使用される遺伝子導入用組成物、形質転換用組成物を提供することにある。これにより、幅広くトランスジェニック生物作製が可能な技術を確立し、また、遺伝子治療の分野での新規ベクターを開発することが出来る。

発明の概要

本発明者らは鋭意研究の結果、組換えレトロウイルスベクターが宿主染色体に組込まれる直前に形成される組換えプレインテグレーション複合体

(recombinant pre-integration complex : r P I C) を調製して標的細胞に導入した場合、この r P I C に含まれる遺伝子が驚くべきことに元のウイルスの指向性に関係なく標的細胞の染色体上に組込まれることを見出した。

更に本発明者らは、この知見に基づき、幅広い範囲の標的細胞に遺伝子導入可能な複合体、及びその製造方法を開発し、該複合体を用いた細胞への遺伝子導入方法、細胞の形質転換法を開発し、本発明を完成した。

即ち、本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する

2 本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体に関する。

本発明の第2の発明は、第1の発明の複合体の製造方法に関する。

本発明の第3の発明は、第1の発明の複合体を細胞に導入する工程を包含することを特徴とする遺伝子導入方法に関する。

5 本発明の第4の発明は、レトロウイルス由来タンパク質成分と、レトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAを細胞に導入することを特徴とする遺伝子導入方法に関する。

10 本発明の第5の発明は、第1の発明の複合体を含有することを特徴とする遺伝子導入用組成物に関する。

本発明の第6の発明は、第3または第4の発明の遺伝子導入方法を行なうための遺伝子導入用キットに関する。

15 本発明の第7の発明は、包装材と該包装材に封入された遺伝子導入用試薬からなる製造品に関し、該遺伝子導入用試薬が第1の発明の複合体及び／又は該複合体を調製するための試薬を含有し、前記遺伝子導入用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工程を含まない遺伝子導入に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなる、細胞への遺伝子導入用試薬の製造品に関する。

20 本発明の第8の発明は、包装材と該包装材に封入された遺伝子導入用試薬からなる製造品に関し、該遺伝子導入用試薬が第4の発明の遺伝子導入を行うための試薬を含有し、前記遺伝子導入用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工程を含まない遺伝子導入に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなる、細胞への遺伝子導入用試薬の製造品に関する。

25 本発明の第9の発明は、第1の発明の複合体を細胞に導入する工程を包含することを特徴とする細胞の形質転換方法に関する。

本発明の第10の発明は、第4の発明の方法によって遺伝子を導入する工程を包含することを特徴とする細胞の形質転換方法に関する。

本発明の第11の発明は、第1の発明の複合体を含有することを特徴とする細

胞の形質転換用組成物に関する。

本発明の第12の発明は、第3または第4の発明の遺伝子導入方法を包含することを特徴とする細胞の形質転換に使用されるキットに関する。

5 本発明の第13の発明は、包装材と該包装材に封入された形質転換用試薬からなる製造品に関し、該形質転換用試薬が第1の発明の複合体及び／又は該複合体を調製するための試薬を含有し、前記形質転換用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工程を含まない形質転換に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなる、細胞の形質転換用試薬の製造品に関する。

10 本発明の第14の発明は、包装材と該包装材に封入された形質転換用試薬からなる製造品に関し、該形質転換用試薬が第10の発明の形質転換を行うための試薬を含有し、前記形質転換用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工程を含まない形質転換に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなる、細胞の形質転換用試薬の製造品に関する。

15

発明の詳細な説明

以下、さらに詳細に本発明を説明する。

20 本発明の複合体は、標的細胞に遺伝子を導入するための複合体であって、具体的には少なくともレトロウイルス由来の末端反復配列（long terminal repeat : LTR）と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNA（すなわち、当該レトロウイルスとは異なる起源のDNA）とを含有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含有する複合体であり、レトロウイルスとしての構造を持たない複合体である。即ち、本発明の複合体は、レトロウイルスのRNAゲノムやエンベロープを持たず、あるいはレトロウイルスのRNAゲノムやエンベロープが感染能を失っており、感染性をもたない複合体である。1つの実施態様において、上記レトロウイルス由来の末端反復配列および当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAは組換えレトロウイルスに由来する。該複合体を使用することによって該複合体中の組換えレトロウイルス由来2本鎖DNAに

25

含まれる遺伝子、或いは当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAを標的細胞に導入することが出来る。ここで、組換えレトロウイルスとは、天然のレトロウイルスのゲノムの塩基配列の一部が改変されたものを言い、例えば、外来遺伝子が挿入されたレトロウイルスや、ウイルスゲノム上に存在する遺伝子、またはその一部に欠損、置換、挿入、付加を有するレトロウイルス等があげられる。該組換えレトロウイルスに特に限定はなく、エコトロピックであってもアンフォトロピックであってもシュードタイプであっても良く、例えば、市販の組換えレトロウイルスベクターを使用することが出来る。

ここで、レトロウイルス由来の末端反復配列 (long terminal repeat : LTR) と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとしては、特に限定はないが、好適にはレトロウイルス由来の2つのLTRの間に当該ウイルスに存在しない塩基配列のDNAが挿入されたものが挙げられる。

当該ウイルスに存在しない塩基配列のDNAには特に限定はなく、細胞中に導入することが望まれる任意のDNAを使用することができる。例えば、酵素、増殖因子やその他のタンパク質をコードする遺伝子を含有するDNAの他、アンチセンス核酸、リボザイム、等をコードする遺伝子を含有するDNAを使用することができる。

また、上記のDNAは、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を含有していてもよい。マーカー遺伝子としては、例えば、細胞に抗生物質に対する耐性を付与する薬剤耐性遺伝子や、酵素活性によって遺伝子導入された細胞を見分けることができるレポーター遺伝子等が利用できる。

本発明において、細胞に導入しようとする遺伝子は適当なプロモーター、例えば、レトロウイルスベクター中に存在するLTRのプロモーターや外来プロモーターの制御下に、本発明の複合体の2本鎖DNAに含有させて使用することができる。また、効率よい外来遺伝子の転写を達成するためにプロモーターや転写開始部位と共同する他の調節要素、例えばエンハンサー配列やターミネーター配列等を2本鎖DNA内に含有させてもよい。また、染色体へのポジションエフェクトを回避するために、インスレーター配列等を2本鎖DNA内に含有させてもよ

い。導入される外来遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子が、ライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。

5 本発明において、レトロウイルス由来タンパク質成分とは、宿主DNAにウイルスDNAを組み込む活性を有するものを言い、特に限定はないが、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するDNAを染色体に組み込む活性を有する酵素、例えばレトロウイルス由来のインテグラーゼを含有するものが挙げられる。さらに、レトロウイルス由来タンパク質成分には、レトロウイルスによる染色体への遺伝子の組み込みに際して形成されるプレインテグレーション複合体（PIC）に含まれることが知られている他のタンパク質が含まれていてもよい。そのようなタンパク質としては逆転写酵素、核酸結合蛋白質、カプシド蛋白、マトリックス蛋白が挙げられる。その他、細胞内に存在する因子、例えば非ヒストン蛋白であるHMG I、BAF-1やDNA依存性蛋白リン酸化酵素（DNA-PK）等が含まれていても良い。また、本発明に使用されるレトロウイルス由来タンパク質成分
10 には、宿主染色体へのウイルスのDNAの組み込む活性を有する範囲で天然のレトロウイルス由来タンパク質成分に欠損、置換、挿入、付加を有するものも含まれる。

レトロウイルスは分裂増殖している細胞に感染し、そのウイルス遺伝子は宿主細胞の染色体に組み込まれる。レトロウイルスによる染色体への遺伝子の組み込みは、
20 （1）レセプターを介したウイルス粒子の標的細胞表面への吸着、（2）コアの放出による細胞質内への侵入、（3）コア内に存在する逆転写酵素によるcDNAの合成、（4）同酵素のRNase H活性とDNA依存DNA合成活性による2本鎖DNAの合成、（5）プレインテグレーション複合体（pre-integration complex：PIC）の形成、（6）PICの核への移行、（7）組み込み活性を有する酵素の作用による宿主染色体への安定な組み込み、の一連の過程により成立
25 する。

遺伝子の染色体への組み込みのためには、宿主細胞の核膜の崩壊によってPICが宿主の核内へ移行することが必要であり、この移行は宿主細胞がG2/M期を通過することによって成立する。即ち、分裂していない細胞ではPICは核内

に移行できず、遺伝子は染色体に組込まれない。従って、レトロウイルスが感染した細胞をG 1期で停止しておく、核内に移行できないP I Cが細胞質に蓄積する。蓄積したP I Cは細胞質より調製することが出来る。

5 本発明の複合体は、好適には上記したメカニズムを利用して、例えば以下のようにして調製することが出来る。

組換えレトロウイルスをアフィディコリン等の細胞周期調節剤で処理してG 1期で停止した細胞に感染させ、感染細胞を培養する。本明細書において培養とは、細胞数の増加を目的として細胞のインキュベートを行なうことのみに限定されず、細胞を細胞周期を停止した状態で維持する行為をも包含する。感染から7～11
10 時間程の間に、細胞質内では逆転写、2本鎖DNA合成、組換えプレインテグレーション複合体 (recombinant pre-integration complex: r P I C) 形成が進行するが、細胞周期がG 1期で停止されているため、生成したr P I Cは染色体内に組込まれることはなく、細胞質に蓄積する。細胞質に蓄積したr P I Cは、界面活性剤で細胞膜を分解することによって容易に抽出でき、抽出したr P I C
15 は本発明の方法に使用することが出来る。また、抽出されたr P I Cは遠心分離やクロマトグラフィー等の公知の方法によって精製することが出来、このようにして得られた精製r P I Cも本発明の方法に使用することが出来る。

本発明の複合体を調製するための培養細胞は、用いるレトロウイルスが感染しうる細胞であれば何でもよく、例えばN I H / 3 T 3細胞 (A T C C C R L - 1 6 5 8)、H T - 1 0 8 0細胞 (A T C C C C L - 1 2 1)、2 9 3細胞 (A T C C C R L - 1 5 7 3) 等を使用することが出来る。
20

組換えレトロウイルスをG 1期で停止した細胞に感染させる際には、ポリブレン等、適当な補助剤や、国際公開WO 9 5 / 2 6 2 0 0号公報やWO 9 7 / 1 8 3 1 8号公報に記載の機能性物質を使用することによって、効率よく感染させることが出来る。上記機能性物質としては、フィブロネクチンのフラグメントを使用することが出来、特にレトロネクチン (宝酒造社製) を好適に使用することが出来る。
25

組換えレトロウイルスの粒子内には2本鎖DNAの合成に必要な逆転写酵素活性とDNA合成酵素活性が存在し、また、染色体への組み込みに必要なインテグ

ラーゼ等のタンパク質成分が存在する。従って本発明の複合体は、組換えレトロウイルス粒子を試験管内で崩壊したものに、デオキシリボヌクレオチドを添加してインキュベートすることによっても、調製することが出来る。

5 即ち、組換えレトロウイルス粒子を試験管内で適当な条件で崩壊し、ここにデオキシリボヌクレオチドを添加することによって試験管内でcDNAの合成及び2本鎖DNAの合成反応が進行し、合成された2本鎖DNAはインテグラーゼ等のタンパク質成分と会合し、rPICが形成される。このようにして形成されたrPICは本発明の方法に使用することが出来る。また、形成されたrPICは遠心分離やクロマトグラフィー等の公知の方法によって精製することが出来、このようにして得られた精製rPICも本発明の方法に使用することが出来る。

また、本発明の複合体はレトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配列とを有する2本鎖DNAと、レトロウイルス由来タンパク質成分を別々に調製し、両者を試験管内で混合することによって、ウイルス粒子を使用することなく調製することもできる。

15 ここで使用されるレトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配列のDNAを有する2本鎖DNAには特に限定はないが、例えば、レトロウイルス由来の2つのLTRの間に当該ウイルスに存在しない塩基配列のDNAが挿入されたものが挙げられる。ここで、当該ウイルスに存在しない塩基配列のDNAのサイズに限定はなく、目的に応じて任意のサイズのものを使用することが出来る。

20 レトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配列のDNAを有する2本鎖DNAの調製法に特に限定はなく、例えば、レトロウイルス由来のLTRと当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAのカセットを有するプラスミドを構築し、該プラスミドで形質転換した大腸菌等の宿主細胞を培養し、
25 該培養物から単離されたプラスミドより大量に調製することが出来る。該プラスミドにおいて、レトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配列のDNAを有する2本鎖DNAの両側に制限酵素切断部位を配しておけば、該制限酵素を作用させることによって目的の2本鎖DNAを容易に調製することが出来る。また、レトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配

列のDNAを有する2本鎖DNAは、上記したカセットを有するプラスミドを鋳型として、PCR等の遺伝子増幅法にて増幅することによっても調製することも出来る。

5 一方、本発明に使用されるレトロウイルス由来タンパク質成分の調製法に特に限定はないが、例えばウイルス粒子より調製したもの、遺伝子工学的に調製したもの、或いはパッケージング細胞より調製したもの等が挙げられる。本発明に使用されるレトロウイルス由来タンパク質成分、例えばインテグラーゼをコードする遺伝子を発現ベクターにクローニングし、該発現ベクターを用いて大腸菌等を宿主として遺伝子工学的に発現することによって容易に該成分を調製することが
10 可能である。

パッケージング細胞を培養して得られる培養上清にDNAの組込み活性を有する成分が含まれており、該培養上清より本発明に使用されるレトロウイルス由来タンパク質成分を調製することが出来る。例えば、パッケージング細胞を培養して得られた培養上清を超遠心にかけることにより、該成分を含む蛋白質複合体を
15 調製することが出来る。また、該成分を含む蛋白質複合体は、パッケージング細胞抽出液より得ることができる。該蛋白質複合体は、本発明に使用できる。また、該蛋白質複合体より、公知の方法でDNAの組込み活性を有する成分を精製することができ、このようにして精製されたものも本発明に使用できる。

ここで、用いられるパッケージング細胞に特に限定はなく、例えばBOSC 2
20 3細胞等が好適に使用される(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:8392-8396 (1993))。

以上のようにしてインビトロで別々に調製したレトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配列を有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分をインビトロで混合することによって、ウイルス粒子を用いること
25 なくインビトロで本発明の複合体を調製することが出来る。このようにして調製された複合体は、本発明の方法に使用できる。また、該複合体は必要に応じて遠心分離やクロマトグラフィー等の公知の方法によって精製することが出来、精製された複合体も本発明の方法に使用することが出来る。

また、このようにインビトロで本発明の複合体を調製する場合、上記したよう

に複合体中の2本鎖DNAの大きさには限定はなく、該複合体を用いれば、従来のレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法では導入が不可能であった8 kb以上の遺伝子の導入が可能である。

さらに、上記の複合体は、当該複合体の細胞への導入、DNAの染色体への組み込みを妨げない範囲で他の要素を含むことが出来る。

また、本発明の複合体はレトロウイルス粒子にパッケージングされている必要はない。

本発明の複合体は、調製後、直ちに遺伝子導入に使用することが出来る。また、凍結保存しておき、必要な時に融解して使用することも出来る。凍結保存の方法に特に限定はないが、例えば、ドライアイスで急凍したのち-80℃で保存することが出来る。

上記の方法によって調製した複合体を標的細胞に導入することにより、標的細胞の染色体へ遺伝子を導入することが出来、また標的細胞を形質転換することが出来る。

複合体の標的細胞への導入方法に特に限定はなく、例えば、カチオニックリポソーム法やリン酸カルシウム法等のエンドサイトーシスを利用した方法、電気穿孔法や遺伝子銃法やマイクロインジェクション法等の公知の方法で導入することが出来る。穿孔法を用いて導入を行なう場合には、国際公開WO 96/17073号公報に記載のように、導入後の標的細胞を細胞接着活性を有する物質の存在下にて培養することで効率良く形質転換された細胞を得ることが出来る。

また、レトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配列を有する2本鎖DNAと、レトロウイルス由来タンパク質成分を、それぞれ標的細胞に導入することにより、標的細胞の染色体へ遺伝子を導入することが出来、また標的細胞を形質転換することができる。

レトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配列を有する2本鎖DNAと、レトロウイルス由来タンパク質成分の導入の順序に限定はなく、レトロウイルス由来のLTRと当該ウイルスに存在しない塩基配列を有する2本鎖DNAを先に導入しても良いし、レトロウイルス由来タンパク質成分を先に導入しても良く、また、両者を同時に導入しても良い。レトロウイルス由来のLTR

Rと当該ウイルスに存在しない塩基配列を有する2本鎖DNAと、レトロウイルス由来タンパク質成分の標的細胞への導入方法に特に限定はなく、例えば、カチオニックリポソーム法やリン酸カルシウム法等のエンドサイトーシスを利用した方法、電気穿孔法や遺伝子銃法やマイクロインジェクション法等の穿孔法等の公知の方法で導入することが出来る。穿孔法を用いて導入を行なう場合には、国際公開WO 96/17073号公報に記載のように、導入後の標的細胞を細胞接着活性を有する物質の存在下にて培養することで効率良く形質転換された細胞を得ることが出来る。

本発明の遺伝子導入方法、形質転換方法の標的細胞の由来に特に限定はなく、本発明の複合体の由来する組換えレトロウイルスの指向性に限定されることなく、幅広く任意の真核細胞を標的とすることが出来、例えば、哺乳類、鳥類、魚類、昆虫、植物等の真核生物の細胞を標的とすることが出来る。

また、標的細胞の種類にも特に限定はなく、例えば、造血幹細胞、胚性幹細胞等の幹細胞の他、卵、精子等の生殖細胞、各種体細胞等あらゆる種類の細胞を標的とすることが出来る。

また、標的細胞は、培養細胞であっても生物個体であっても良く、脊椎動物の受精卵、生殖細胞系列を標的とすることでトランスジェニック動物の作製も可能である。

従来のレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入ではウイルスの感染から遺伝子の染色体への組込みまでに少なくとも7時間を有していたが、これは細胞質内でプレインテグレーション複合体が形成されるのに時間を要していたためであり、この間に標的細胞の細胞分裂が起こり、その結果として遺伝子が導入される細胞と遺伝子が導入されない細胞が生じるモザイク化がおこり、トランスジェニック動物の作製において、大きな問題点となっていた。

一方、本発明の遺伝子導入法においては、導入後直ちに遺伝子は染色体に導入され、モザイク化を引き起こすことはない。即ち、本発明の遺伝子導入方法、形質転換方法はトランスジェニック生物の効率の良い作製をも可能とするものである。

また、従来のレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入では標的細胞1個あ

たり 1 コピーの遺伝子しか導入できなかったが、本発明の導入方法では、導入する複合体の量を調節することによって、標的細胞 1 個あたり複数コピーの遺伝子を導入することが可能である。

5 本発明の遺伝子導入用組成物、形質転換用組成物とは、本発明の遺伝子導入方法、形質転換方法に使用される遺伝子導入用組成物、形質転換用組成物を指し、本発明の複合体、またはレトロウイルス由来タンパク質成分を含有することを特徴とする。該組成物には、適当な緩衝液、塩類等を含有させることが出来、更に遺伝子導入を促進させる任意の物質を含有させることも出来る。

10 本発明の遺伝子導入用キット、形質転換用キットとは、本発明の遺伝子導入方法、形質転換方法に使用されるキットを指し、パッケージされた形態において、該方法に使用される試薬類に加え、本発明の複合体を細胞に導入することを指示した指示書、もしくはレトロウイルス由来タンパク質成分と、レトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列の DNA とを含有する 2 本鎖 DNA とを細胞に導入することを指示した指示書を含むことを特徴とする。ここで指示書とは、本発明の実施方法を指示する書面を指す。例えば本発明の遺伝子導入方法、形質転換方法、該方法における本発明の複合体、レトロウイルス由来タンパク質成分の使用法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。

15 20 さらに、インターネットのような電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。

本発明のキットは、本発明の複合体調製のための細胞、細胞培養のための培地、試薬、培養器、複合体やレトロウイルス由来タンパク質成分やレトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列の DNA とを含有する 2 本鎖 DNA の標的細胞への導入に使用される試薬類等を含めることが出来る。

25

該キットを用いることで、本発明の遺伝子導入方法、形質転換方法を簡便に行なうことが出来る。

本発明の遺伝子導入用試薬の製造品又は形質転換用試薬の製造品とは、包装材

と該包装材に封入された遺伝子導入用試薬又は細胞の形質転換用試薬からなる製造品であって、該遺伝子導入用試薬又は形質転換用試薬がレトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体及び／又は該複合体を調製するための試薬を含有し、前記遺伝子導入用試薬又は形質転換用試薬が、目的とする細胞へのレトロウイルスの感染の工程を含まない遺伝子導入又は形質転換に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなることを特徴とする。

また、本発明の遺伝子導入用試薬の製造品又は形質転換用試薬の製造品とは、包装材と該包装材に封入された遺伝子導入用試薬又は形質転換用試薬からなる製造品であって、該遺伝子導入用試薬又は形質転換用試薬がレトロウイルス由来タンパク質成分を含有する組成物を含有し、前記遺伝子導入用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工程を含まない遺伝子導入又は形質転換に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなることを特徴とする。

本発明によれば、従来のレトロウイルスベクターによる遺伝子導入方法の欠点であった宿主域の限定は克服され、あらゆる真核細胞への遺伝子導入が可能である。即ち、従来のレトロウイルスベクターによる遺伝子導入は、該ウイルスに対するレセプターを介した感染によるものであり、該レセプターの有無により宿主域は限定される。一方、本発明の複合体は、エンドサイトーシスを利用した方法、即ち、電気穿孔法、遺伝子銃法、マイクロインジェクション法等の公知の方法によってレセプターの有無に関わりなく導入することが出来、その結果、宿主域の限定なく広く任意の細胞に遺伝子を導入することが出来る。また、本発明の方法によれば、目的の標的細胞に導入すると直ちに遺伝子が染色体に組込まれるため、従来のトランスジェニック生物の作製法において問題となっていたモザイク化は起こらず、効率の良いトランスジェニック生物の作製も可能である。

また、従来のウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法では、使用されるウイルス粒子の作製に煩瑣な操作を必要し、また力価の高いウイルスベクターを作製することは難しいとの欠点があった。しかしながら、本発明の複合体は、ウイル

ス粒子を用いることなくインビトロで調製することも可能であり、この場合、煩瑣な操作を行なうことなく、短時間で大量の複合体を調製することが出来、従来に比べ、はるかに簡便に効率の良い遺伝子導入が可能となった。

5 このように、本発明は従来の技術の欠点を克服した優れた技術であり、例えば、従来の方法の限界により効果が限定されていたあらゆる遺伝子治療に応用することで、顕著な治療効果を期待できる等、優れた有用性を示す。

実施例

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

10 実施例 1

組換えプレインテグレーション複合体 (rPIC) の調製

1. ecoGFPウイルス液の調製

15 グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を含有するプラスミドをパッケージング細胞GP+E-86 [ジャーナル オブ ウイロロジー (Journal of Virology)、第62巻、第1120~1124頁 (1988年)] に導入したecoGFPウイルス産生細胞は10%ウシ胎児血清 (バイオウィターカー社製) ならびに50単位/mlのペニシリン (ギブコ社製) 及び50 µg/mlのストレプトマイシン (ギブコ社製) を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、シグマ社製) 中で37℃、5%CO₂にて培養した。なお、以降の
20 操作に使用したDMEMはすべて50単位/mlのペニシリンおよび50 µg/mlのストレプトマイシンを含んだものである。ecoGFPウイルス液は上記産生細胞をセミコンフルエントに生育させた10cm径のプレートに10%ウシ胎児血清を含有する7mlのDMEMを添加し、32℃、5%CO₂にて24時間培養した後に培養上清を0.45ミクロンのフィルター (ミリポア社製) でろ過してウイルス上清液ストックとし、使用するまでは-80℃で保存した。
25

2. ウイルス上清液の力価の測定

ウイルス上清液の力価の測定はNIH/3T3細胞 (ATCC CRL-1658) を使用して標準的な方法 [ジャーナル オブ ウイロロジー、第62巻、第1120~1124頁 (1988年)] に従って測定した。すなわち、6ウェルの組織培養用

プレート（岩城硝子社製）の1ウェルあたり 5×10^4 個のNIH/3T3細胞を含む10%ウシ血清（ギブコ社）を含有するDMEM 2mlを添加し、37℃、5%CO₂にて一晩培養した後、培地を吸引除去し、各ウェルに系列希釈したウイルス上清液1mlを加え、更にヘキサジメトリン・ブロミド（ポリブレン：アルドリッチ社製）を終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ となるよう加えた。これを37℃で4時間培養し、さらに10%ウシ血清を含有するDMEMを1ml添加して20時間培養した後、培地を終濃度 0.5mg/ml のG418（ギブコ社製）と10%ウシ血清を含有するDMEM 2mlと交換しさらに培養を続けた。3～4日毎にG418含有培地を交換し10～12日後に生育したG418耐性コロニーを0.2%メチレンブルーを含むメタノール溶液で染色しその数を計測した。ウェルあたりのコロニー数にウイルス上清液の希釈倍率を乗じた値より、上清1mlあたりの感染性粒子数（c.f.u./ml）を算出し、ウイルス力価とした。調製したecoGFPウイルス液の力価は 1×10^7 c.f.u./mlであった。

3. rPICの調製

NIH/3T3細胞 2×10^6 個を10cm径のプレートで10%ウシ血清を含有する10mlのDMEMで24時間、37℃、5%CO₂で培養し、培地を $2 \mu\text{g/ml}$ のアフィディコリン（和光純薬社製）と10%ウシ血清を含有する7mlのDMEMに交換しさらに14時間、37℃、5%CO₂で培養した。アフィディコリンを添加してから14時間後に、培地を吸引除去し、ecoGFPウイルス液2mlと10%ウシ血清を含有するDMEM 3mlを混和し、更にアフィディコリンを終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$ となるよう、およびポリブレンを終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ となるよう加えた液をNIH/3T3細胞に添加して32℃、5%CO₂でウイルス感染を開始した。感染開始から3時間後にウイルス液を除去し、培地を $2 \mu\text{g/ml}$ のアフィディコリンと10%ウシ血清を含有する7mlのDMEMに交換しさらに7時間（ウイルス感染開始から10時間）、32℃、5%CO₂で培養した。この間に、NIH/3T3細胞に感染したウイルスは逆転写、DNA合成反応が進行し、rPICを形成するが、NIH/3T3細胞はアフィディコリンでG1期に細胞周期が停止しているためレトロウイルス遺伝子が染色体に組込まれることはなく細胞質に蓄積する。

細胞質に蓄積した r P I C は以下の方法によって抽出した。すなわち、感染から 10 時間後の細胞を 5 m l の P B S で洗浄し、2 m l のトリプシン-EDTA 液（バイオウィターカー社製）で細胞を分散し、10%ウシ血清を含有する 5 m l の DMEM を添加して細胞を遠心分離（200×g、5 分）し、沈殿した細胞を 9 m l のバッファー A（10 mM T r i s、225 mM K C l、5 mM M g C l₂、1 mM D T T、20 μg/ml アプロチニン、pH 7.4）で洗浄して遠心分離（200×g、5 分）し、沈殿を 250 μl のバッファー A に懸濁した。細胞懸濁液に 1.25 μl の 5%ジギトニン/DMSO 溶液を添加し、25℃にて 5 分間静置して細胞質画分を抽出した。抽出液を 1000×g で 3 分間遠心分離し、上清をさらに 5000×g で 3 分間遠心した。得られた上清は r P I C 液として 50 μl ずつ分注し、-80℃にて保存した。

4. 2 本鎖 DNA の検出

上記 3 にて、抽出し、凍結保存した r P I C 液を希釈したものを鋳型とし、G F P 遺伝子特異的プライマーを使用した P C R 反応により組換えレトロウイルス由来の G F P 遺伝子の検出を行った。タカラ タック（TaKaRa Taq、5 u n i t s / μ l、宝酒造社製）0.5 μl、10×P C R バッファー（宝酒造社製）5 μl、1.25 mM d N T P 混合液 8 μl、鋳型 1 μl、P r i m e r 1（配列番号 1）20 p m o l、P r i m e r 2（配列番号 2）20 p m o l を混合し、蒸留水で 50 μl にメスアップして調製した P C R 反応液にミネラルオイルを重層して 94℃、1 分間加熱の後、94℃で 30 秒、59℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 1 サイクルとする反応を 30 回繰り返した。反応後、P C R 反応液 10 μl を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、増幅断片を確認した。鋳型には、r P I C を希釈したもの、および r P I C よりフェノールクロロホルム抽出で精製した DNA を用い、対照としてウイルス感染していない N I H / 3 T 3 細胞から同様の操作で抽出した画分を用い P C R 反応に供した。陽性コントロールとして G F P 発現プラスミドベクターを用いた。その結果、r P I C を希釈したもの、r P I C よりフェノールクロロホルム抽出で精製した DNA を鋳型とした場合、G F P 遺伝子由来の 316 b p の断片の増幅が確認され、上記 3 で調製された r P I C に組換えウイルス由来の G F P 遺伝子が含まれているこ

とが示された。

実施例 2

r P I C の培養細胞への導入

マウス N I H / 3 T 3 細胞は 1 0 % ウシ血清を含む DMEM 培地を増殖培地とし、ヒト 2 9 3 細胞 (A T C C C R L - 1 5 7 3) は 1 0 % ウシ胎児血清を含む DMEM 培地を増殖培地とし、3 7 ° C 、 5 % C O ₂ の条件下で培養を行った。

1 0 c m 径プレートでコンフルエントに増殖したマウス N I H / 3 T 3 細胞、ヒト 2 9 3 細胞はトリプシン処理でプレートから剥がした後、血清を含まない DMEM で洗浄し、7 0 0 μ l の DMEM に懸濁した。7 0 0 μ l の細胞懸濁液と実施例 1 で調製した r P I C 1 0 0 μ l を 0 . 4 c m 幅のエレクトロポレーションキュベット (バイオラッド社製) に入れ、ジーンパルサー I I (バイオラッド社製) で 2 5 0 V 、 9 7 5 μ F 、室温の条件でエレクトロポレーションを行い、マウス N I H / 3 T 3 細胞は 1 / 1 0 量を、ヒト 2 9 3 細胞は 1 / 4 量を 1 0 c m 径のゼラチンコート (岩城硝子社製) に播き、エレクトロポレーションの翌日から G 4 1 8 を 0 . 5 m g / m l 含有する増殖培地で培養した。

エレクトロポレーションから 7 日目に蛍光顕微鏡にて観察したところ、マウス N I H / 3 T 3 細胞、ヒト 2 9 3 細胞の何れにおいても緑色の蛍光を発する細胞が観察され、マウス由来細胞、ヒト由来細胞を問わず導入した G F P 遺伝子が発現していることが示された。

また、更に培養を続け、エレクトロポレーションから 2 週間、G 4 1 8 選択培地で培養した後、出現したネオマイシン (G 4 1 8) 耐性コロニーをメチレンブルーで染色したところ、マウス N I H / 3 T 3 細胞からは 4 6 個の耐性コロニーが得られ、ヒト 2 9 3 細胞からは 1 9 6 個の耐性コロニーが得られ、導入した遺伝子が安定的に発現していることが示された。

以上の結果は、マウス由来の細胞にしか感染することが出来ないエクトロピックウイルスから調製した r P I C が、従来の方法では遺伝子導入できなかったヒト由来の細胞へ遺伝子を安定的に導入できたことを示し、r P I C が宿主域を選ばず安定的に遺伝子導入可能なベクターであることを示すものである。

実施例 3

高力価 r P I C の調製と r P I C のインテグレーション効率の評価

1. 高力価 r P I C の調製

ecoGFPウイルス液250mlを、4℃、2900 x g、16時間低速遠心し、沈殿を10%ウシ血清含有DMEM5mlで懸濁することにより、高力価ecoGFPウイルス液を調製した。このウイルス液の力価は4 x 10⁸ cfu/mlであった。このウイルス液を使用し、M. O. I. = 200の条件でNIH/3T3細胞に感染し、実施例2の方法でrPICを調製した。

2. r P I C のインテグレーション効率の評価

高力価rPICを用いて、293細胞にエレクトロポレーション法で遺伝子導入した。対照として、GFP遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドベクターをエレクトロポレーション法、およびトランスフェクション法で293細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入から3日後の293細胞をフローサイトメーターFACS Vantage (Becton Dickinson社) に供し、GFP発現293細胞を選択的に回収した。回収後の293細胞のGFP発現率は、rPIC導入実験区が94.3%、プラスミドベクターエレクトロポレーション実験区が94.3%、プラスミドベクタートランスフェクション実験区が98.8%、であり、一過性に遺伝子導入された細胞が選択的に回収された。この一過性GFP発現293細胞をG418+およびG418-培地中で2週間培養し、[G418含有プレートのコロニー数] ÷ [G418不含プレートのコロニー数] から長期安定遺伝子発現効率を算出し、インテグレーション効率とした。rPICのインテグレーション効率は98.7%、プラスミドベクターエレクトロポレーション実験区のインテグレーション効率は7.5%、プラスミドベクタートランスフェクション実験区のインテグレーション効率は1.4%であった。rPICはインテグレーション効率に優れたベクターであることが示された。

実施例4

rPICのメダカ受精卵への導入

成熟したヒメダカ オス、メス各1尾を一組として、3Lの水道水で水温25℃、14時間照明、10時間暗条件にて飼育し、一日3~5回、テトラフィン

(テトラベルケ社) を 3～5 分で食べ切る量を与え、産卵させた。産卵直後の卵を採取し、8 p p m のメチレンブルー水溶液中で、ピンセットでほぐし、同水溶液で洗浄した。実施例 3 で調製した高力価 r P I C をゲルろ過カラム S u p e r o s e 6 (アマシャムファルマシア社) で精製し、r P I C 含有画分 5 μ l を
5 マイクロインジェクションピペット (ナリシゲ社製芯入硝子管 モデル G D - 1 より作製) に入れ、顕微鏡下で観察しながら 1 細胞期のメダカ受精卵の細胞 1 個あたりに約 5 0 p l の r P I C 液を注入した。6 9 個の卵にマイクロインジェクションを行い、9 6 ウェルプレートの各ウェルに卵を 1 個ずつ入れ、8 p p m のメチレンブルー水溶液中で 2 5 $^{\circ}$ C で培養した。産卵後 8 日目以降、ふ化してきた
10 稚魚を順次水槽に移し最終的に合計 4 7 匹の稚魚がふ化した。孵化直後の稚魚 1 6 匹をサンプリングし、1. 5 m l 容マイクロチューブに入れ、- 2 0 $^{\circ}$ C で保存した。ふ化した稚魚からは以下の方法でゲノム DNA を抽出し、P C R 法でネオマイシン耐性遺伝子の検出を行った。すなわち、稚魚 1 匹が入っているマイクロチューブに 1 0 0 μ l の抽出バッファー (1 0 m M T r i s、1 0 0 m M
15 N a C l、1 0 m M E D T A、3 9 m M D T T、2 % S D S、5 0 μ g / m l P r o t e i n a s e K、p H 8) を添加し、6 0 $^{\circ}$ C にて 4 時間インキュベートした。なお、インキュベート開始の 3 0 分後、6 0 分後に攪拌を行った。次にチューブあたり 5 μ g の R N a s e A を添加し、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし、さらに、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿を
20 施し、得られたゲノム DNA をそれぞれ 5 0 μ l の蒸留水に溶解した。

得られたゲノム DNA 溶液の内、1 μ l を鋳型とし、ネオマイシン耐性遺伝子特異的プライマーを使用して P C R 反応により導入遺伝子の検出を行った。反応は T a K a R a T a q (宝酒造社製) を用いて、T a K a R a T a q 0. 5 μ l、1 0 x P C R バッファー 5 μ l、d N T P 混合液 8 μ l、希
25 釈した鋳型 1 μ l、P r i m e r 3 (配列番号 3) 2 0 p m o l、P r i m e r 4 (配列番号 4) 2 0 p m o l、蒸留水で 5 0 μ l にメスアップし、ミネラルオイルを重層して 9 4 $^{\circ}$ C 1 分間加熱の後、9 4 $^{\circ}$ C 3 0 秒、5 6 $^{\circ}$ C 3 0 秒、7 2 $^{\circ}$ C 3 0 秒の反応を 3 0 回繰り返した。P C R 反応液 1 0 μ l を 2 % アガロースゲルで電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、マイクロインジェク

クションにより r P I C を導入したメダカ 16 匹中 16 匹から導入遺伝子が検出され、遺伝子導入効率は 100% であった。メダカ受精卵は受精後 1 時間は 1 細胞期であるが、以後は 35 分に一度分裂していく。このように非常に早い速度で分裂する細胞においては、V S V - G レトロウイルスベクターを用いた場合は逆転写のプロセスが律速となり、発生がかなり進んだ段階でしか遺伝子が組込まれない。また、プラスミドベクターは偶然の組換えによってのみ、宿主染色体に組込まれる。一方、r P I C は N I H / 3 T 3 細胞のゲノムに組込まれる直前に抽出しているため、インテグレーション効率の高い状態で調製されており、細胞分裂の初期段階でゲノムに組込まれることが期待でき、トランスジェニック動物作製用ベクターなど多方面で応用可能なベクターであることを示すものである。

実施例 5

B O S C 2 3 細胞上清を利用した培養細胞への遺伝子導入

レトロウイルス g a g - p o l 遺伝子とエコトロピック e n v 遺伝子が導入されたパッケージング細胞 B O S C 2 3 を 10% ウシ胎児血清ならびに 50 単位 / m l のペニシリン及び 50 μ g / m l のストレプトマイシンを含有するダルベッコ改変イーグル培地中で 37°C、5% C O₂ の条件下で培養した。

10 c m 径プレートで B O S C 2 3 細胞を培養し、セミコンフルエントに生育したところで新しい 10% ウシ胎児血清を含有する 5 m l の D M E M 培地と交換し、37°C、5% C O₂ にて 24 時間培養した。

その培養上清を 0.45 ミクロンのフィルター（ミリポア社製）でろ過したものを、超遠心機により、30000 r p m、4°C、2 時間遠心した。

得られた沈殿物を D M E M にて洗浄後、再度、超遠心機により、30000 r p m、4°C、2 時間遠心し、得られた沈殿物を 50 μ l の D M E M に懸濁し、S D S 含有試薬を加え、99°C、5 分間、加熱処理後、蛋白質電気泳動（S D S - P A G E）を行なった。

その結果、沈殿物中に g a g 蛋白（p 30、p 15）が含まれていることが確認できた。

このことから、B O S C 2 3 細胞の培養上清には、g a g - p o l - e n v 蛋白を含む蛋白複合体の存在が示唆された。この蛋白複合体は e n v 蛋白の機能に

より、細胞への感染能も有すると予想される。この、BOSC 23細胞の培養上清に存在する蛋白複合体を利用した培養細胞ゲノムへのプラスミドDNA組込み能について実験を行なった。

1. BOSC 23細胞上清サンプルの調製

5 BOSC 23細胞上清サンプルとは、10 cm径プレートでセミコンフルエントに生育したBOSC 23細胞を、新しい10%ウシ胎児血清を含有する10 mlのDMEM培地と交換し、32℃、5%CO₂にて24時間培養し、得られた培養上清を0.45ミクロンのフィルター（ミリポア社製）でろ過したものである。

10 2. BOSC 23細胞上清サンプルを利用した遺伝子の導入

マウスNIH/3T3細胞は10%ウシ血清を含むDMEM培地を増殖培地とし、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。マウスNIH/3T3細胞を10 cm径プレートでセミコンフルエントに生育させたものに対し、レトロウイルスLTR遺伝子に挟まれたGFP遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を含有するレトロウイルス産生用プラスミドベクター pDON-AI-rsGFPをリポフェクトアミン2000（ギブコ社製）にて遺伝子導入し、10 mlの10%ウシ血清を含むDMEM培地で37℃、5%CO₂の条件下で5時間培養したものを試験サンプルとした。尚、pDON-AI-rsGFPは、rsGFPをコードするプラスミドpQBI25（宝酒造社製）より調製したrsGFPをオードする遺伝子をレトロウイルスベクターpDON-AIに組み込んだものである。試験サンプルは、5時間培養後、培地を吸引除去し、1.で調製したBOSC 23細胞上清サンプル4 mlを加え、更にヘキサジメトリン・ブロミド（ポリブレン：アルドリッチ社製）を終濃度8 μg/mlになるように加え、32℃で16時間培養した。16時間培養後、BOSC 23細胞上清サンプルを吸引除去し、10 mlの10%ウシ血清を含むDMEM培地を加え、37℃、5%CO₂の条件下で24時間培養した。24時間培養後、細胞を回収し、内20000個の細胞を6 cm径のゼラチンプレートに播き、終濃度が0.5 mg/mlになるようにG418（ギブコ社製）を加えた10%ウシ血清を含むDMEM培地にて培養を行なった。14日後に生育したG418耐性コロニーを0.2%メチレンブルーを

含むメタノール溶液で染色し、その数を計測した。加えて、コントロールとして
500個の細胞を6cm径のゼラチンプレートに播いたものも用意し、G418
を含まない通常の培地にて、37℃、5%CO₂の条件下で14日間培養後、生
育したコロニーを0.2%メチレンブルーを含むメタノール溶液で染色し、その
5 数を計測した。

対照として、トランスフェクションによる遺伝子導入後、5時間後に、培地を
吸引除去し、通常の培地を加え、37℃、5%CO₂の条件下で培養を行なった。

40時間後に細胞を回収し、内20000個の細胞を6cm径のゼラチンプレ
ートに播き、終濃度が0.5mg/mlになるようにG418（ギブコ社製）を
10 加えた10%ウシ血清を含むDMEM培地にて培養を行なった。14日後に生育
したG418耐性コロニーを0.2%メチレンブルーを含むメタノール溶液で染
色しその数を計測した。加えて、コントロールとして500個の細胞を6cm径
のゼラチンプレートに播いたものを用意し、通常の培地にて、37℃、5%CO
2の条件下で14日間培養後、生育したコロニーを0.2%メチレンブルーを含
15 むメタノール溶液で染色し、その数を計測した。

長期遺伝子発現効率（インテグレーション効率）は、[G418含有プレートの
コロニー数] ÷ [G418不含プレートのコロニー数] にて算出した。試験
サンプルにて得られたインテグレーション効率は、5.00%であった。これに
対し、対照実験区より得たインテグレーション効率は、0.76%であった。こ
20 のことから、プラスミドベクターを細胞に導入後、BOSC23細胞上清サンプ
ルをその導入細胞に感染させることで、BOSC23細胞上清サンプル中のgag-
pol-env蛋白を含む蛋白複合体の働きにより、プラスミドベクターを
宿主細胞ゲノムに約7倍の高い効率で組込ませることができることが示された。
これは、LTRを有するプラスミドベクターと、レトロウイルス構造タンパク質
25 が標的細胞内で複合体を形成していることを示すものである。

産業上の利用の可能性

本発明によって、幅広く宿主域を選ばずに遺伝子を効率よく導入する方法が提
供された。また、本発明の遺伝子導入法によれば、導入された遺伝子は速やかに

宿主の染色体に組込まれるため、効率良いトランスジェニック生物の作製を可能にするものである。

配列表フリーテキスト

- 5 SEQ ID NO:1: PCR primer to amplify a portion of GFP gene.
SEQ ID NO:2: PCR primer to amplify a portion of GFP gene.
SEQ ID NO:3: PCR primer to amplify a portion of neo^r gene.
SEQ ID NO:4: PCR primer to amplify a portion of neo^r gene.

請 求 の 範 囲

1. レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体。

5

2. レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAが組換えレトロウイルスに由来する請求項1記載の複合体。

3. 組換えレトロウイルスが当該組換えレトロウイルスに対する感受性を有する細胞に当該組換えレトロウイルスを感染させて得られる請求項2記載の複合体。

10

4. 組換えレトロウイルスに対する感受性を有する細胞が細胞周期を停止している請求項3記載の複合体。

5. 単離された、レトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNA、および単離された、レトロウイルス由来タンパク質成分を混合して得られる請求項1記載の複合体。

15

6. レトロウイルス由来タンパク質成分がパッケージング細胞の培養上清由来及び／又はパッケージング細胞の抽出物由来であることを特徴とする請求項1記載の複合体。

7. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するDNAを染色体DNAに組込む活性を有する酵素を含有することを特徴とする請求項1記載の複合体。

20

8. 下記工程を包含することを特徴とする複合体の製造方法：

(a) レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列とを含有する組換えレトロウイルスを当該組換えレトロウイルスに対する感受性を有する細胞に感染させる工程；

25

(b) (a) 工程で得られる感染細胞を培養する工程；及び

(c) (b) 工程で得られる培養細胞より、組換えレトロウイルス由来の2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体を採取する工程。

9. 組換えレトロウイルスに対する感受性を有する細胞が細胞周期を停止して

いることを特徴とする請求項 8 記載の複合体の製造方法。

10. 下記工程を包含することを特徴とする複合体の製造方法：

(a) レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列とを含有する組換えレトロウイルス粒子を破壊し、ウイルスの構成成分を含有する混合液を調製する工程、

(b) (a) 工程で得られる混合液にデオキシリボヌクレオチドを添加し、組換えレトロウイルス由来の 2 本鎖 DNA を調製し、当該 2 本鎖 DNA とレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体を形成させる工程；及び、

(c) (b) 工程で得られる当該複合体を採取する工程。

10 11. 下記工程を包含することを特徴とする複合体の製造方法：

(a) レトロウイルス由来の末端反復配列及び当該レトロウイルスに存在しない塩基配列の DNA を含有する 2 本鎖 DNA を単離する工程；

(b) レトロウイルス由来タンパク質成分を単離する工程；

15 (c) 前記工程で得られる 2 本鎖 DNA 及びレトロウイルス由来タンパク質成分を混合し、複合体を形成させる工程；及び、

(d) 前記工程で形成される複合体を採取する工程。

12. レトロウイルス由来タンパク質がパッケージング細胞の培養上清及び／又パッケージング細胞の抽出物であることを特徴とする請求項 11 の製造方法。

20 13. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列を有する DNA を染色体 DNA に組込む活性を有する酵素を含有することを特徴とする請求項 8、10 および 11 のいずれか 1 項記載の複合体の製造方法。

25 14. レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列の DNA とを含有する 2 本鎖 DNA とレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体を細胞に導入する工程を包含することを特徴とする細胞への遺伝子導入方法。

15. 複合体が請求項 8、10 および 11 のいずれか 1 項に記載の製造方法により得られる請求項 14 記載の細胞への遺伝子導入方法。

16. レトロウイルス由来タンパク質成分と、レトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列の DNA とを含有する 2 本鎖 D

NAを細胞に導入することを特徴とする、細胞への遺伝子導入方法。

17. レトロウイルス由来タンパク質成分が、パッケージング細胞培養上清由来であることを特徴とする請求項16記載の細胞への遺伝子導入方法。

18. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するDNAを染色体DNAに組込む活性を有する酵素を含有することを特徴とする請求項16記載の遺伝子導入方法。

19. レトロウイルス由来タンパク質成分を含有することを特徴とする細胞への遺伝子導入用組成物。

20. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAと複合体を形成していることを特徴とする請求項19記載の細胞への遺伝子導入用組成物。

21. 複合体が請求項8、10および11のいずれか1項に記載の製造方法により得られることを特徴とする請求項20記載の細胞への遺伝子導入用組成物。

22. さらに、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するベクターを含有することを特徴とする請求項19の遺伝子導入用組成物。

23. ベクターが、組換えレトロウイルスを作製するためのベクターであることを特徴とする請求項22記載の遺伝子導入用組成物。

24. ベクターがプラスミドベクターであることを特徴とする請求項22記載の遺伝子導入用組成物。

25. レトロウイルス由来タンパク質成分が、パッケージング細胞の培養上清由来及び／又はパッケージング細胞の抽出物由来であることを特徴とする請求項19記載の遺伝子導入用組成物。

26. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するDNAを染色体DNAに組込む活性を有する酵素を含有することを特徴とする請求項19記載の遺伝子導入用組成物。

27. レトロウイルス由来タンパク質成分を含有する細胞への遺伝子導入用組成物を包含する細胞への遺伝子導入用キット。

28. 細胞への遺伝子導入方法に使用されるキットであって、パッケージされ

た形態において、レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体を細胞に導入することを指示した指示書を含むことを特徴とする細胞への遺伝子導入用キット。

5 29. 細胞への導入方法に使用されるキットであって、パッケージされた形態において、レトロウイルス由来タンパク質成分と、レトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとを細胞に導入することを指示した指示書を含むことを特徴とする細胞への遺伝子導入用キット。

10 30. 包装材と該包装材に封入された遺伝子導入用試薬を含む製造品であって、該遺伝子導入用試薬がレトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体及び／又は該複合体を調製するための試薬を含有し、前記遺伝子導入用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工
15 程を含まない遺伝子導入に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなる、細胞への遺伝子導入用試薬の製造品。

 31. 包装材と該包装材に封入された遺伝子導入用試薬を含む製造品であって、該遺伝子導入試薬がレトロウイルス由来タンパク質成分を含有し、前記遺伝子導
20 入用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工程を含まない遺伝子導入に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなる、細胞への遺伝子導入用試薬の製造品。

 32. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するDNAを染色体DNAに組込む活性を有する酵素を含有することを
25 特徴とする請求項30又は31記載の製造品。

 33. レトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体を細胞に導入する工程を包含することを特徴とする細胞の形質転換方法。

34. 複合体が請求項8、10および11のいずれか1項に記載の製造方法により得られることを特徴とする請求項33記載の細胞の形質転換方法。

35. レトロウイルス由来タンパク質成分と、レトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとを細胞に導入することを特徴とする、細胞の形質転換方法。

36. レトロウイルス由来タンパク質成分が、パッケージング細胞の培養上清由来及び／又はパッケージング細胞の抽出物由来であることを特徴とする請求項35記載の細胞の形質転換方法。

37. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するDNAを染色体DNAに組込む活性を有する酵素を含有することを特徴とする請求項35記載の細胞の形質転換方法。

38. レトロウイルス由来タンパク質成分を含有することを特徴とする細胞の形質転換用組成物。

39. レトロウイルス由来タンパク質成分がレトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAと複合体を形成していることを特徴とする請求項38記載の細胞の形質転換用組成物。

40. 複合体が請求項8、10および11のいずれか1項に記載の製造方法により得られることを特徴とする請求項38記載の細胞の形質転換用組成物。

41. さらに、レトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAを作製するためのベクターを含有することを特徴とする請求項38記載の細胞の形質転換用組成物。

42. ベクターが、組換えレトロウイルス作製用であることを特徴とする請求項41記載の細胞の形質転換組成物。

43. ベクターがプラスミドベクターであることを特徴とする請求項41記載の細胞の形質転換用組成物。

44. レトロウイルス由来タンパク質成分が、パッケージング細胞の培養上清由来及び／又はパッケージング細胞の抽出物由来であることを特徴とする請求項38記載の細胞の形質転換用組成物。

45. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するDNAを染色体DNAに組込む活性を有する酵素を含有することを特徴とする請求項38記載の細胞の形質転換用組成物。

5 46. レトロウイルス由来タンパク質成分を含有する細胞の形質転換用組成物を包含する細胞の形質転換用キット。

47. 細胞の形質転換方法にレトロウイルス由来の末端反復配列と、当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体を細胞に導入することを指示した指示書を含むことを特徴とする細胞の形質転換用キット。

10 48. 細胞の形質転換方法に使用されるキットであって、パッケージされた形態において、レトロウイルス由来タンパク質成分と、レトロウイルス由来の末端反復配列と当該レトロウイルスに存在しない塩基配列のDNAとを含有する2本鎖DNAとを細胞に導入することを指示した指示書を含むことを特徴とする細胞の形質転換用キット。

15 49. 包装材と該包装材に封入された形質転換用試薬を含む製造品であって、該形質転換用試薬が組換えレトロウイルス由来の2本鎖DNAとレトロウイルス由来タンパク質成分を含む複合体及び／又は該複合体を調製するための試薬を含有し、前記形質転換用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工程を含まない形質転換に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は
20 該包装材に添付された指示書に表示されてなる、細胞への形質転換用試薬の製造品。

50. 包装材と該包装材に封入された形質転換用試薬を含む製造品であって、該形質転換用試薬がレトロウイルス由来タンパク質成分を含有し、前記形質転換用試薬が、目的とする細胞への組換えレトロウイルスの感染の工程を含まない形
25 質転換に使用できることが、該包装材に付されたラベル又は該包装材に添付された指示書に表示されてなる、細胞の形質転換用試薬の製造品。

51. レトロウイルス由来タンパク質成分が、レトロウイルス由来の末端反復配列を有するDNAを染色体DNAに組込む活性を有する酵素であることを特徴とする請求項49又は50記載の製造品。

5 2. 遺伝子を導入する対象が真核細胞である請求項 1 4 又は 1 6 記載の遺伝子導入方法。

5 3. 遺伝子を導入する対象が真核細胞由来の培養細胞である請求項請求項 1 4 又は 1 6 記載の遺伝子導入方法。

5 5 4. 遺伝子を導入する対象が真核生物個体である請求項請求項 1 4 又は 1 6 記載の遺伝子導入方法。

5 5. 遺伝子を導入する対象が脊椎動物受精卵である請求項請求項 1 4 又は 1 6 記載の遺伝子導入方法。

10 5 6. 遺伝子を導入する対象が脊椎動物生殖細胞系列である請求項請求項 1 4 又は 1 6 記載の遺伝子導入方法。

5 7. 形質転換する対象が真核細胞である請求項 3 3 又は 3 5 記載の形質転換方法。

5 8. 形質転換する対象が真核細胞由来の培養細胞である請求項請求項 3 3 又は 3 5 記載の形質転換方法。

15 5 9. 形質転換する対象が真核生物個体である請求項請求項 3 3 又は 3 5 記載の形質転換方法。

6 0. 形質転換する対象が脊椎動物受精卵である請求項請求項 3 3 又は 3 5 記載の形質転換方法。

20 6 1. 形質転換する対象が脊椎動物生殖細胞系列である請求項請求項 3 3 又は 3 5 記載の形質転換方法。

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

5 <120> Complexes

<130> 662777

<150> JP 2000-285857

10 <151> 2000-09-20

<160> 4

<210> 1

15 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> PCR primer to amplify a portion of GFP gene

<400> 1

caccctcgtg accaccctga c 21

25 <210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2/2

<220>

<223> PCR primer to amplify a portion of GFP gene

<400> 2

5 caccttgatg cgtttcttct gctt 24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify a portion of neo^r gene

15 <400> 3

gcttgatccg gctacctgcc catt 24

<210> 4

<211> 24

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify a portion of neo^r gene

25

<400> 4

gccacagtcg atgaatccag aaaa 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/48, C12N15/867, C07K14/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/48, C12N15/867, C07K14/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 611822 A2 (Wisconsin Alumni Res. Found.), 24 August, 1994 (24.08.94),	19, 22-27, 31, 32, 38, 41-46, 50, 51
A	& US 5554524 A & JP 6-261764 A	1-18, 20, 21, 28-30, 33-37, 39, 40, 47-49, 52-61
T	Hajime MATSUMURA et al., "Kumikae Retrovirus kara no pre-integration complex(PIC) no Chousei to Idenshi Dounyuu ", Dai 24kai Nippon Bunshi Seibutsu Gakkai Nenkai, Program Kouen Youshishuu, November, 2001, page 853, 4P-699	1-61
X	WO 98/28417 A (Gene-Cell), 02 July, 1998 (02.07.98),	19, 22, 24-27, 31, 32, 38, 41, 43-46, 50, 51
A	& AU 9858121 A & EP 946718 A1 & JP 2001-507230 A	1-18, 20-23, 28-30, 33-37, 39, 40, 42, 47-49, 52-61

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 December, 2001 (11.12.01)

Date of mailing of the international search report
25 December, 2001 (25.12.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08090

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	WO 00/75342 A (Nippon Institute for Biological Science), 14 December, 2000 (14.12.00), & EP 1103614 A1 & AU 200043150 A & JP 2001-46081 A	1-61
A	Cherepanov P., et al., "Activity of recombinant HIV-1 integrase on mini-HIV DNA", Nucleic Acids Res., (1999), Vol.27, No.10, pages 2202 to 2210	1-61

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/48, C12N15/867, C07K14/15		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/48, C12N15/867, C07K14/15		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICST (JOIS), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	EP 611822 A2 (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 24. 8月. 1994 (24. 08. 94) & US 5554524 A & JP 6-261764 A	19, 22-27, 31, 32, 38, 41-46, 50, 51 1-18, 20, 21, 28-30, 33-37, 39, 40, 47-49, 52-61
T	松村 肇他, 組換えレトロウイルスからのpre-integration complex(PIC)の 調製と遺伝子導入, 第24回日本分子生物学会年会 プログラム・公演要旨 集, 11月. 2001, p. 853, 4P-699	1-61
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
11. 12. 01	25.12.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一	4N 9839
	電話番号 03-3581-1101	内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO 98/28417 A (GENE-CELL) 2.7月.1998 (02.07.98) & AU 9858121 A & EP 946718 A1 & JP 2001-507230 A	19, 22, 24-27, 31, 32, <u>38, 41, 43-46, 50, 51</u> 1-18, 20-23, 28-30, 33-37, 39, 40, 42, 47-49, 52-61
P A	WO 00/75342 A (財団法人 日本生物科学研究所) 14.12月.2000 (14.12.00) & EP 1103614 A1 & AU 200043150 A & JP 2001-46081 A	1 - 6 1
A	Cherepanov P., et.al., Activity of recombinant HIV-1 integrase on mini-HIV DNA., Nucleic Acids Res. (1999), Vol. 27, No. 10, p. 2202-2210	1 - 6 1