

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4509780号
(P4509780)

(45) 発行日 平成22年7月21日 (2010. 7. 21)

(24) 登録日 平成22年5月14日 (2010. 5. 14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N	7/00	(2006. 01)	C 1 2 N	7/00	Z N A
A 6 1 K	35/76	(2006. 01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	(2006. 01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	19/02	(2006. 01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	35/00	(2006. 01)	A 6 1 P	35/00	

請求項の数 40 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-520853 (P2004-520853)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月11日 (2003. 7. 11)
 (65) 公表番号 特表2005-532075 (P2005-532075A)
 (43) 公表日 平成17年10月27日 (2005. 10. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/003012
 (87) 国際公開番号 W02004/007735
 (87) 国際公開日 平成16年1月22日 (2004. 1. 22)
 審査請求日 平成18年5月23日 (2006. 5. 23)
 (31) 優先権主張番号 0216081.0
 (32) 優先日 平成14年7月11日 (2002. 7. 11)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 500165809
 インペリアル・イノベーションズ・リミテッド
 イギリス・ロンドン・SW7・2 A Z・エグジビション・ロード・インペリアル・カレッジ・エレクトリカル・アンド・エレクトロニック・エンジニアリング・ビルディング・レベル・1 2
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変した細胞結合活性を有するウィルス粒子の調製方法およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変した細胞結合活性を有するウィルス粒子を調製する方法であって、

(i) 第一の細胞結合活性を有するウィルス粒子をコードするウィルス核酸を含むウィルスパッケージング細胞を供給すること；

(ii) 前記ウィルスパッケージング細胞が、パッセンジャーペプチド結合部分をコードする核酸も含むこと（ただし、前記パッセンジャーペプチド結合部分は、キメラまたは融合ペプチドではない）；

(iii) 前記ウィルス核酸およびパッセンジャーペプチド結合部分をコードする核酸を発現し、第一の細胞結合活性を改変するために、前記パッセンジャーペプチド結合部分がウィルス粒子へと組み込まれるように、パッセンジャーペプチド結合部分が細胞の膜で供給され、ウィルス粒子がパッケージング細胞の膜から出芽すること；

を含むウィルス粒子を調製する方法。

【請求項 2】

前記ペプチド結合部分が、細胞の外側の原形質膜で供給される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ウィルス粒子がレトロウィルスベクターに由来する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記パッセンジャーペプチド結合部分が細胞増殖因子である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記増殖因子が、膜結合幹細胞因子である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記パッセンジャーペプチド結合部分が、抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ペプチド結合部分が、標的細胞に特異的な表面抗原を認識する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記ペプチド結合部分が、標的細胞に特異的な細胞表面受容体およびそのリガンドを含む結合ペアのメンバーの少なくとも一部である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記ウィルスパッケージング細胞ラインが、標的細胞内でまたは標的細胞上で活性である生物活性物質を供給するために発現することができる付加的な核酸を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記生物活性物質が、病気または疾患の予防および/または治療および/または診断において使用される、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記生物活性物質が、直接または間接的な細胞毒性機能を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記生物活性物質が、リシン；腫瘍壊死因子；インターロイキン-2；インターフェロン-ガンマ；リボヌクレアーゼ；デオキシリボヌクレアーゼ；シュードモナスエキソトキシンA；およびカスパーゼのうちのいずれか1つである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記生物活性物質が、比較的に非毒性のプロドラッグを細胞毒性ドラッグへと変換することができる酵素である、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記細胞活性物質が、シトシンデアミナーゼまたはチミジンキナーゼのいずれかである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記改変した細胞結合活性により、ウィルス粒子を標的細胞へと結合させることができる、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記標的細胞が哺乳類の細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記標的細胞がヒトの細胞である、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記標的細胞が静止状態の細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記標的細胞がヒトの造血幹細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

前記標的細胞が癌細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

前記標的細胞が哺乳類のT細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 22】

50

請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、改変された生物結合活性を有するウィルス粒子であって、前記改変した生物結合活性が、キメラ状のウィルスの外被ポリペプチド以外のペプチドによって付与されるウィルス粒子。

【請求項 2 3】

請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法によって得られる改変した細胞結合活性を有するウィルス粒子。

【請求項 2 4】

(1) 標的細胞に対して改変した結合活性を有する、請求項 2 2 または 2 3 に記載のウィルス粒子を、標的細胞タイプを含む細胞の集団に曝して、ウィルス粒子に結合させ；

(2) その後、標的細胞に結合したウィルス粒子を、細胞集団から分離し；

(3) 任意に、ウィルス粒子を、その後で、標的細胞から除去する；

大集団の細胞から濃縮された標的細胞タイプの集団を調製する方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法によって得ることができるウィルス粒子の集団に由来する、パッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子のタイターを増す方法であって、

i) パッセンジャーペプチド結合部分が結合する支持体を供給すること；および

ii) 前記支持体にウィルス粒子の集団を曝すこと；および、任意に、

iii) 前記支持体に結合しないウィルス粒子から支持体に結合するウィルス粒子を単離すること；

を含む、ウィルス粒子のタイターを増す方法。

【請求項 2 6】

パッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子を増幅した、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法によって得ることができるウィルス粒子の調製物であって、タイターが少なくとも 10^5 ifu/ml であるウィルス粒子を有する調製物。

【請求項 2 7】

更に医薬的に許容できる賦形剤および/または担体を含む、請求項 2 6 に記載の調製物。

【請求項 2 8】

病気または疾患の診断および/または予防および/または治療のための医薬品の製造における、請求項 2 2 または 2 3 に記載のウィルス粒子、または請求項 2 6 または 2 7 に記載のウィルス粒子の調製物の使用。

【請求項 2 9】

関節炎の予防および/または治療のための医薬品の製造における、請求項 2 2 または 2 3 に記載のウィルス粒子、または請求項 2 6 または 2 7 に記載のウィルス粒子の調製物の使用。

【請求項 3 0】

前記ウィルス粒子が、パッセンジャーペプチド結合部分として、CD5 に結合する結合分子を組み込んでいる、請求項 2 9 に記載の使用。

【請求項 3 1】

前記ウィルス粒子が、パッセンジャーペプチド結合部分として、膜結合幹細胞因子を組み込んでいる、請求項 2 9 に記載の使用。

【請求項 3 2】

癌の診断および/または予防および/または治療のための医薬品の製造における、請求項 2 2 または 2 3 に記載のウィルス粒子、または請求項 2 6 または 2 7 に記載のウィルス粒子の調製物の使用。

【請求項 3 3】

前記癌が卵巣癌である、請求項 3 2 に記載の使用。

【請求項 3 4】

前記ウィルス粒子が、パッセンジャーペプチド結合部分として、膜結合幹細胞因子を組

10

20

30

40

50

み込んでいる、請求項 3 2 または 3 3 に記載の使用。

【請求項 3 5】

前記ウィルス粒子が、OPCMLポリペプチドをコードする遺伝子を含む、請求項 3 2 から 3 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 3 6】

請求項 2 2 または 2 3 に記載のウィルス粒子、または請求項 2 6 または 2 7 に記載のウィルス粒子の調製物を含む遺伝子運搬用組成物。

【請求項 3 7】

請求項 3 2 から 3 5 のいずれか一項に記載のウィルス粒子、または請求項 2 6 または 2 7 に記載のウィルス粒子の調製物を含む欠陥遺伝子を有する哺乳類を治療するための医薬組成物であって、in vivoで骨髄へと移植することによって、または、血液へと注入することによって、病気または疾患を診断および/または予防および/または治療するための生物活性物質をコードする核酸物質が、細胞集団のゲノムへと挿入される、組成物。

10

【請求項 3 8】

ワクチンの製造における、請求項 2 2 または 2 3 に記載のウィルス粒子、または請求項 2 6 または 2 7 に記載のウィルス粒子の調製物の使用。

【請求項 3 9】

哺乳類のT細胞に抗原性ペプチドを提示するのに使用するための調製物の製造における、請求項 2 2 または 2 3 に記載のウィルス粒子、または請求項 2 6 または 2 7 に記載のウィルス粒子の調製物の使用。

20

【請求項 4 0】

請求項 1 0 から 2 3 のいずれか一項に記載のウィルス粒子、または請求項 2 6 または 2 7 に記載のウィルス粒子の調製物、および医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ウィルス粒子表面の1つまたはそれ以上のペプチドがパッケージング細胞に由来するように、ウィルス粒子をパッケージする方法に関する。特定のペプチドを組み込むことによって、ウィルス粒子を特異的な細胞タイプへと導くことができる。このようなシステムは、例えば、遺伝子治療に使用できる。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

1つの遺伝子による病気および幾つかの後天的な症状、例えばあるタイプの癌の治療としての体細胞遺伝子治療の発展は、医療における、最も重要な技術の進歩の1つである。

【0 0 0 3】

X染色体連鎖型免疫不全または慢性肉芽腫症（CGD）のような血液に関連した病気は、この手法を評価するためのモデルシステムとして最も好ましい候補の1つである。このタイプの病気のための遺伝子治療の一般的な実行可能性は、末梢血液T細胞を用いた、アデノシンデアミナーゼ欠損重症複合免疫不全症（ADA-SCID）の治療において得られる結果によって、大いに実証されてきた。

40

【0 0 0 4】

しかしながら、この手法の実現には多くの問題が存在する。例えば、前記の実験において、患者に必要な遺伝子を含むT細胞は不死ではなく、一定の期間において繰り返して治療する必要がある。更には、永遠に改変した効果を与えるための試みは（例えば、多能性造血幹細胞（PHSC）へと遺伝子を移すことによる）、成功していない。

【0 0 0 5】

今までに始められている大部分の遺伝子治療の治験は、細胞を体の外部において遺伝子的に改変し再度戻すというex vivo方法を使用している。in vivoで遺伝子を正確かつ効果的に特異的な標的細胞群に伝達する能力により、遺伝子療法の範囲は飛躍的に拡大するであろうが、現在のベクターでは、この役割に十分に適していない。

50

【0006】

レトロウィルスベクターは、大変高い確率で染色体に組み込まれ、それゆえ、遺伝子治療に非常に適している。なぜならば、遺伝子治療は、治療の対象である遺伝子が標的細胞の更なる子孫に対しても安定して受け継がなければならない必要があるからである。組換えレトロウィルスは、それゆえ、培養したTリンパ球、繊維芽細胞、ケラチノサイト、肝細胞、造血幹細胞および腫瘍細胞のex vivoでの形質導入のための多くの臨床的な遺伝子療法のプロトコールにおいて用いられている。

【0007】

腫瘍堆積物への直接接種または壁が腫瘍によって浸潤されているキャビティ（例えば、膀胱、腹膜、胸膜スペース）への点滴注入によって、レトロウィルスベクターまたはベクター産生細胞を腫瘍細胞のin vivoでの形質導入のために用いた、数少ない意欲的な臨床試験がある。しかしながら、リンパ球、造血幹細胞および他の幹細胞、血管内皮細胞および播種性悪性腫瘍のin vivoでの形質導入のためには、投与時、特に点滴による投与時に、標的細胞群へと選択的に付着するレトロウィルスベクターの開発が必要である。標的へと向わせる事ができないベクターは、血流に流されて標的でない細胞に圧倒的に付着し、多くのベクターが浪費され、そして、副作用に類似する症状が増すので不適切である。

【0008】

最近、特異的な細胞タイプへと導くことができるレトロウィルスベクターを開発する幾つかの試みに多大な関心がもたれている。

【0009】

ヒトの標的細胞へと容易に取り込ませるために、レトロウィルス粒子を化学的に改変することが可能である。ラクトースをコートした β -ガラクトシダーゼ-形質導入レトロウィルス粒子は、ヒトのHepG2細胞上のアシアロ糖タンパク質に特異的に結合することができる。しかしながら、当該方法は、あまり効率がよくなく、この化学的改変の形態は、広い範囲の試みに用いることができないようである(Neda et al., 1991)。標的細胞と形質導入ウィルス粒子との間の分子架橋によっても効果はなく(Goud et al., 1998)、または、形質導入の効率が大変低いという代償があった(Roux et al., 1989; Etienne-Juan et al., 1992)。

【0010】

代わりの方法として、一定の標的細胞特異性を付与する新規のポリペプチド配列を提示するように、ウィルスの外被糖タンパク質結合部位を改変することによって、ウィルスの特異性を設計する方法がある。このような方法は、ウィルス親和性の拡張をもたらすが、ウィルスの外被糖タンパク質を改変することの欠点は、ウィルス粒子形成効率（タイター）を減少させることである(Valsesia-Wittmann et al., 1994)。

【0011】

代わりに、レトロウィルスに対する完全な新規の標的細胞結合活性を付与する新規の結合ドメインを有する完全なレトロウィルス結合部位を置換することができる(Kasahara et al., 1994; Han et al., 1995; Matano et al., 1995)。しかしながら、この方法は、まだ繰り返して成功していない(Cosset and Russell, 1996)。

【0012】

表面糖タンパク質をコードするウィルス遺伝子を遺伝子組み換え的に改変することによって、ウィルス外被へ新規のポリペプチド配列を加える試みもなされている。この方法においては、元のレトロウィルス結合ドメインは無傷のままであり、新規の標的細胞特異的結合ドメインがウィルスに加わる。今や、複数の一本鎖抗体およびポリペプチド成長因子を含む、多くのポリペプチド結合ドメインが、マウスのモロニー白血病ウィルス (MLV) のSU糖タンパク質のN末端伸長として発現されている(Cosset et al., 1995; Schnierle et al., 1996; Somia et al., 1995; Russell et al., 1994; Marin et al., 1996; Valsesia-Wittmann et al., 1996)。しかしながら、このようなキメラのウィルスへの導入は、通常、野生型の外被と比較して何倍か少なく、恐らく、フォールディングおよび/またはオリゴマー形成の効率を下げることに影響を及ぼす(Cossett and Russell, 1996)。そ

10

20

30

40

50

れゆえ、この方法によっては、ウィルスのタイターが減少すると思われる。

【0013】

後者の方法の最近の例として、GollanおよびGreen (2002)は、インテグリン受容体リガンドをウィルス外被へと導入することによって、MLVの親和性を改変しようとしていた。著者らは、短いリガンドは導入するのに成功したと結論付けていたが、この方法は大変困難である；40を越えるキメラ外被誘導体が合成された。

【特許文献1】 WO 92/00376

【特許文献2】 WO 97/12049

【特許文献3】 WO 88/07378

【特許文献4】 WO 91/11201

【特許文献5】 米国特許第4,675,187号

【特許文献6】 WO 94/10323

【特許文献7】 WO 01/72336

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、改変した細胞結合活性、すなわち、元のウィルス結合活性の細胞結合活性とは異なる細胞活性を呈するウィルス粒子の提供を目指したものである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

最初の態様においては、本発明は、改変した細胞結合活性を有するウィルス粒子を調製する方法を提供する。当該方法は、

(i) 第一の細胞結合活性を有するウィルス粒子をコードするウィルス核酸を含むウィルスパッケージング細胞を提供する工程；

(ii) 前記ウィルスパッケージング細胞は、また、パッセンジャーペプチド結合部分をコードする核酸を含み；

(iii) パッセンジャーペプチド結合部分がウィルス粒子に導入されて第一の細胞結合活性を改変するように、ウィルス粒子がパッケージング細胞の膜から出芽し、パッセンジャーペプチド結合部分が細胞の膜で供給されるように、前記ウィルス核酸および前記パッセンジャーペプチド結合部分をコードする核酸を発現する工程；

を含む。

【0016】

驚くべきことに、ウィルスパッケージング細胞内で望んだ膜結合ペプチドをただ単に発現させることで、誰にでも、ウィルスパッケージング細胞膜から出芽するウィルス粒子へと前記ペプチドを導入することができ。それ故、本発明の方法には、ウィルス粒子の表面で1つまたは複数のタンパク質との融合としてペプチドを発現するようにウィルス粒子を遺伝子組み換え的に改変する必要が無い（例えば、レトロウィルススタンパク質のenvタンパク質）。従って、本発明のウィルス粒子は、また、標的細胞に生物活性な物質を伝達する手段も提供する。

【0017】

本発明の方法の更に驚くべき利点として、ウィルスタイターが顕著に減少しないということがある。前記したように、改変した細胞結合活性を有するウィルスベクターの現在の調製方法においては、ウィルスタイターが顕著に減少し、望ましくない。

【0018】

特定の理論に縛られるのを希望するわけではないが、我々は、ウィルス粒子が、ウィルスの出芽の間に「パッセンジャー」ペプチドをウィルスの外被へと導入すると考えている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明の方法は、1つのタイプのウィルス粒子が、細胞タイプに特異的な方法で、多く

10

20

30

40

50

の細胞タイプに共通の効果を及ぼすことができるという更なる利点を有する；単純に、ウィルス粒子の出芽を通して細胞表面の膜上に1つの標的細胞特異的ポリペプチドを発現する、異なるパッケージング細胞ラインへと、1つのタイプのウィルス粒子を移すことによって、それぞれが異なる細胞タイプに特異的であり、ウィルス外被へと導入されたパッセンジャーペプチドによって付与される親和性を有する、一連のウィルス粒子を調製することができる。言い換えれば、異なるウィルス粒子を遺伝子組み換え的に調製することを含む現在の方法とは異なり、本発明により、誰でも、ウィルスパッケージング細胞を選択することによって、標的細胞特性を選択することができる。

【0020】

パッセンジャーペプチド結合部分は、通常、膜結合ペプチドに対する結合部分であることが好ましい。しかしながら、以下に示すように、膜に存在していないペプチドに対する結合部分も、原形質膜挿入、すなわち「アンカー」領域を導入するポリペプチドとの融合体として発現させることができる。

【0021】

パッケージング細胞は、ウィルス粒子へと導入される1つまたは複数のパッセンジャーペプチド結合部分を導入するように改変することができる。例えば、パッケージング細胞は、同じ標的細胞タイプに作用することができるペプチド結合部分を有する2つ以上の異なるペプチドを発現させることができる（例えば、ヒトの造血系の細胞）。この方法により、ウィルス粒子を標的細胞タイプへと導く効率を増すことができる。

【0022】

「ウィルスパッケージング細胞」について、我々は、ウィルスペクターを発現することができる細胞であり、ウィルス粒子を産生することができる細胞を意味する。パッケージング細胞は、ウィルスに許容的な任意の動物細胞、または、ウィルスに許容的になるように改変された細胞；または、例えば、リン酸カルシウムのような形質転換試薬を用いた、パッケージング細胞コンストラクトとすることができる。レトロウィルスのためのパッケージング細胞として使用することができる細胞ラインには、NIH/3T3細胞のようなげっ歯類細胞および他のマウスの細胞；Chinese Hamster Ovary細胞（CHO）またはL929細胞のようなサスペンション細胞ライン；Cosset et al (1995) J Viro 69, 7430-7436に記載されているFLYウィルスパッケージング細胞システムを含む。

【0023】

例えば、本発明においては、好ましいレトロウィルスのパッケージング細胞ラインは、実施例2において更に論じる、Phoenix(Grignani et al., 1998; Kinsella and Nolan, 1996)と呼ばれる。付随する実施例で用いるPhoenixにエコトロピックおよびアンホトロピックなパッケージング細胞ラインは、Dr Gray Nolan, Stanford University, California, USAにより頂いた。これらの細胞ラインは、ヘルパー不用のエコトロピックおよびアンホトロピックなレトロウィルスを産生するための、第二世代のレトロウィルス産生ラインである。当該ラインは、293T細胞ライン、ヒトの初期腎臓細胞ラインに基づく。

【0024】

更に好ましいレトロウィルスのパッケージング細胞ラインは、Cosset et al (1995) J Viro 69, 7430-7436に記載されているFLYウィルスパッケージング細胞システムである。

【0025】

好ましい実施態様においては、ウィルス粒子はエンベロープウィルスに由来する。例えば、ラウス肉腫ウィルス、ヒトおよびウシのT細胞白血病ウィルス（HTLVおよびBLV）並びに、ヒトおよびサル免疫不全ウィルス（HIVおよびSIV）およびMason-Pfizerサルウィルスのようなレンチウィルスを含むレトロウィルス；泡沫状のウィルス；ヘルペスウィルス（HSV、varicella-zoster、ワクシニア）；Poxウィルス；インフルエンザを含むオルソミクソウィルス；パラインフルエンザウィルス、呼吸器合胞体ウィルス、Sendaiウィルス、ムンプスウィルスおよび麻疹ウィルスを含むパラミキソウィルス；コロナおよびフラビウィルス；アルファウィルス；水疱性口炎ウィルスおよび狂犬病ウィルスを含むラブドウィルス；ワクシニアウィルス；ブニavirus、並びに、大部分のRNAウィルス（例えば、ラ

10

20

30

40

50

ブドウィルスVSV(水胞性口炎ウィルス))。図18および以下の文献:Dimmock and Primrose, (1987), Bodem et al., (1997), Strauss et al., (1995), Griffiths and Rottier (1992), Garoff et al., (1998) and Cadd et al., (1997)に開示されているエンベロープウィルスも含む。

【0026】

「第一の細胞結合活性」について、我々は、ウィルスの天然の宿主細胞範囲を規定するウィルスの結合活性を意味する。ウィルスの宿主の範囲は、一般的には、ウィルス粒子の表面上のウィルス表面受容体部分の一部によって部分的に決定される。ウィルスの宿主の範囲は、更に、遺伝子発現を制御するエンハンサー/プロモーターによって、感染細胞の特徴的な分子生物学によって定義される。いくつかのウィルスは、特異的な細胞タイプに付着する。パッケージング細胞ラインによって産生されるウィルスも、天然の表面の受容体部分を用いて、特異的な細胞タイプに付着する。

10

【0027】

「結合部分」について、我々は、ウィルス粒子の表面上で利用できる、標的細胞上の分子に結合する分子を意味する。「結合部分」は、その結合特異性を変化させるように改変したウィルスまたはウィルス様粒子上の分子とすることができ、または、新規の結合特異性を付与するために、ウィルス粒子に付加し、そしてウィルス粒子の表面上で曝露させた分子とすることができる。

【0028】

「パッセンジャーペプチド結合部分」について、我々は、細胞膜からのウィルスの出芽の間にウィルス粒子へと導入される、ウィルスパッケージング細胞によって発現される結合部位を有するペプチドを意味する。

20

【0029】

用語「ペプチド」は、ポリペプチドおよびタンパク質も含むことを意図する。

【0030】

「改変した細胞結合活性」について、我々は、ウィルス粒子が、改変していないウィルス粒子と比較して、1つまたは複数の異なる細胞タイプと相互作用することができることを意味する。この方法においては、ウィルス粒子の細胞結合活性（または「親和性」）は、ウィルス粒子が、改変していないウィルス粒子より、広い範囲の細胞タイプ（または狭い範囲の細胞タイプ）と結合することができるように改変することができる。

30

【0031】

従って、本発明の方法は、ウィルスが特異的な細胞タイプに結合できるように改変した細胞結合活性を有するウィルス粒子を産生するのに用いることができる。

【0032】

「パッケージング細胞の膜」について、我々は、表面（外側の）原形質膜、核酸エンベロープ、小胞体および/またはゴルジ体の膜を含む、ウィルス粒子が出芽する任意の膜を意味する。大部分のエンベロープウィルスは、外側の原形質膜から出芽することによってエンベロープを獲得するが、ヘルペスウィルスのような幾つかは本出願で記載する核膜を利用する（Dimmock and Primroseから出典した、図18を参照）。

【0033】

好ましい実施態様においては、ペプチド結合部分を導くパッケージング細胞の膜は外側の膜である。

40

【0034】

「膜結合ポリペプチド」について、我々は、細胞の膜へと導入されたポリペプチドを意味する。ポリペプチドは、大部分の膜へと導入することができる。これは、ポリペプチドを含むアミノ酸の幾つかが疎水性であり、それ故、脂質環境へと安定して組み込まれるからである。

【0035】

膜に結合していないポリペプチドは、膜結合領域を有するポリペプチドの領域に融合させるならば、本発明において使用することができる。例えば、本発明の1つの実施態様で

50

使用され、実施例1でより詳細に記載する膜結合幹細胞因子は、膜に結合していないポリペプチドを融合することができるアミノ酸の領域（「アンカー」）として使用することができる。この場合、ハイブリッドポリペプチドは、細胞の原形質膜へと導入され、それゆえ、本発明のウィルス粒子へと導入される。他の膜結合増殖因子の膜貫通領域は、例えば、Flt-3リガンド、M-CSFも使用することができる(Lyman et al., 1995; Cosman et al., 1988)。

【0036】

用いることができる他のポリペプチドは、インフルエンザの赤血球凝集素がある(Hatziioannou et al., 1999; Hatziioannou et al., 1998)。

【0037】

前記したように、本発明の方法は、ウィルス粒子の細胞結合活性を改変するのに使用することができる。細胞結合活性を巧みに操作することで、本発明の方法によって産生されるウィルス粒子は特異的な細胞タイプに結合することができる。それゆえ、本発明の方法の1つの適用は、1つまたは複数の生物活性な物質を特異的な細胞タイプへと誘導することができるウィルス粒子を産生することである。

【0038】

それゆえ、本発明の好ましい実施態様においては、ウィルスパッケージング細胞ラインは、標的細胞内または標的細胞上で活性である生物活性物質を供給するように発現することができる付加的な核酸を含む。

【0039】

「生物活性物質」について、我々は、ウィルスゲノムへと挿入された核酸によってコードされる分子であって、宿主細胞または器官（好ましくは、哺乳類の細胞を含む、哺乳類）に対して生物学的な効果を有することができる分子を意味する。このような生物学的な効果は、治療効果だけでなく、非治療の適用に利用できる他の効果も含む。例えば、当該分子は、ウィルス粒子が感染する任意の細胞にいくつかの治療特性を付与することができる。更なる例として、望ましい分子は、ウィルス粒子が感染した任意の細胞に対する、直接的なまたは間接的な細胞毒性効果を有する。好ましい生物活性物質の例としては、以下に示す。非治療効果は、例えば、望む細胞タイプを容易に検出できる生物活性物質（例えば、 β -ガラクトシダーゼ）の生物学的機能を含むことができる。このような検出は、診断への適用に有用であるだけでなく、標的細胞の研究にも有用である。

【0040】

「感染」について、我々は、ウィルス粒子が標的細胞タイプと接触した時に、そのゲノム物質が細胞タイプへと入ることを意味する。そして、「感染」は、ウィルス粒子のタイプに従って進行する。例えば、レトロウィルス粒子が標的細胞タイプに感染した場合、レトロウィルスのゲノムは、RNAからDNAへと転換され、その後、標的細胞のゲノムへと挿入される。この点から、感染は、宿主ゲノムからレトロウィルス核酸の新たなコピーが合成されることによって進展し、レトロウィルス核酸は、その後、ウィルスタンパク質により封入され、標的宿主細胞の外側の原形質膜から出芽する。

【0041】

本発明の方法に適したウィルスを以下に論ずる。

【0042】

Garoff et al., (1998)に、アルファウィルス、レトロウィルス、ラブドウィルス、オルソミクソウィルスおよびパラミクソウィルスは、（外側の）原形質膜の表面から出芽する；コロナウィルスは、小胞体とゴルジ体との間の膜から出芽する；対して、ヘルペスウィルスは小胞体膜から出芽することが開示されている。特に、レトロウィルス、ラブドウィルス、オルソミクソウィルスおよびパラミクソウィルスは、出芽中に宿主細胞タンパク質に導入され、特に本発明の方法に適している。当該文献の開示は、リファレンスによって本出願に組み込まれる。

【0043】

Bodem et al., (1997)は、ヒトの泡沫状ウィルス(HFV)、細胞質のビヒクルへの優先

10

20

30

40

50

的な出芽およびゲノムを運ぶベクターとしての潜在能力の原因となる因子を開示する。当該文献の開示は、リファレンスによって本出願に組み込まれる。

【0044】

Griffiths and Rottier, (1992)は、生合成経路に沿った異なるコンポーネントへと出芽する、またはそのコンポーネントから構築する、5つのグループ、ヘルペスウィルス、ロタウィルス、コロナウィルス、ブニavirusおよびポックスウィルスについて記載している。当該記載は、ウィルス構築部位を決定する原因となる、ウィルス性のコード糖タンパク質に焦点を当てている。当該文献の開示は、リファレンスによって本出願に組み込まれる。

【0045】

10

「核酸」について、我々は、DNAまたはRNAのいずれかを意味する。本発明のウィルス粒子がDNAウィルスであるならば、好ましくは、核酸はDNAである。本発明のウィルス粒子が、レトロウィルスのようなRNAウィルスであるならば、好ましくは核酸物質はRNAである。

【0046】

核酸をウィルスゲノムへと挿入するための方法は、この業界で良く知られており、更に以下に示す（例えば、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2001, 3rd edition）。

【0047】

本発明のウィルス粒子は、任意のエンベロープウィルスに由来することができるが、好ましくは、ウィルス粒子はレトロウィルスに由来する。このようなウィルスは、ウィルスゲノムが完全にかつ安定に任意の感染した宿主細胞へと組み込まれるので、遺伝子治療に一般的に用いられている。それゆえ、生物活性物質をコードする任意の核酸を、宿主細胞のゲノムへと導入することができる。

20

【0048】

都合の良いことには、ウィルス粒子は、「複製欠陥」である。「複製欠陥」について、我々は、感染した細胞内で、自分自身により分裂または増殖できないように調整されたゲノム物質を有するウィルスを意味する。このようなウィルス粒子の利点は、宿主細胞内で増殖することができず、または、他の細胞に感染し続けることができないことである。

【0049】

好ましい実施態様においては、ウィルス粒子は、レトロウィルスであるマウスの白血病ウィルス（MLV）に由来する。

30

【0050】

MLVをコードするレトロウィルスベクターは、PINCO(Grignani et al., 1998)またはpBabeベクターシリーズ(Morgenstern and Land, 1990)のように、この業界の当業者に広く利用されている。代わりに、本発明は、ヒト免疫不全ウィルス（HIV）、ヤギ関節炎脳炎ウィルス（CAEV）またはVirus-Maediウィルス（VMV）に基づくような、レンチウィルスベクターを使用することができる。本出願に記載されている方法に使用される更なるベクターは、当業者によって容易に同定および/または調製することができる。

【0051】

他の好ましい実施態様においては、ウィルス粒子は、ヒト免疫不全ウィルス（HIV）に由来する。HIVベクターは、良く知られており、この業界の当業者に利用されている。

40

【0052】

本発明の方法は、生物活性物質を標的細胞タイプへと伝達するために、ウィルス粒子の細胞結合活性を改変するのに使用することができる。1つのそのような特異的な細胞タイプへと導く方法は、ウィルス粒子上に細胞増殖因子ポリペプチドを導入することである。従って、本発明の更なる実施態様では、1つまたは複数のパッシンジャーペプチド結合部分が細胞増殖因子である。

【0053】

「細胞増殖因子」について、我々は、前記ペプチドが結合する細胞の増殖を誘導するまたは抑えるように作用するペプチドを意味する。このような増殖因子は、例えば、特異的

50

な細胞タイプが認識するまたは認識することができるリガンドを含むことができる。このような場合、リガンドは細胞タイプの増殖を促進するように作用する。このような増殖因子の例は、制限するわけではないが、血小板由来増殖因子（PDGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、インターロイキン3（IL-3）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子GM-CSF、上皮細胞増殖因子（EGF）、FLT-リガンドおよび幹細胞増殖因子（SCF）（肥満細胞増殖因子、kit ligand因子、Steel因子としても知られている）を含む。幹細胞因子をコードする核酸配列はW092/00376に開示されている（例えば、 Δ 28MGF幹細胞因子）。

【0054】

本発明の特に好ましい態様は、特異的な幹細胞タイプに結合することができるようにウィルス粒子を改変する方法である。この方法において、広い範囲の他の細胞とは異なる幹細胞群に生物活性物質を伝達することができる。

10

【0055】

従って、特に好ましい増殖因子は、膜結合幹細胞因子である。

【0056】

「膜結合幹細胞因子」について、我々は、Sehgal et al (1996)において論じられているペプチド結合部分を意味する。幹細胞因子をコードする核酸配列は、W092/00376に記載されている（例えば、 Δ 28MGF幹細胞因子）。

【0057】

幹細胞因子（SCF）は、静止状態の幹細胞の表面上に見られるc-kit受容体タンパク質に結合するリガンドである(Hamel and Westphal, 1997)。SCFは、2つの型で存在し、長い可溶性型と短い膜結合型が存在する。2つの型は、異なるmRNAスプライシングから得られる。可溶性型が、エキソン6によってコードされているタンパク質切断部位を有するのに対して、膜結合型は、エキソン6を有しておらず、それ故タンパク質切断部位も有していない。

20

【0058】

それゆえ、本発明の好ましい実施態様は、ウィルスの外被内に膜結合幹細胞因子を含むウィルス粒子を産生する方法である。それ故、ウィルス粒子は、膜結合幹細胞因子が結合することができる表面上の分子を有する、任意の細胞タイプと相互作用することができる結合部分を有する。このような分子の例は、c-kit受容体である。c-kit受容体を有する細胞タイプの1つの例は、多能性造血幹細胞（PHSC）（造血幹細胞（HSC）としても知られている）である。

30

【0059】

それゆえ、好ましい実施態様においては、本発明は、ウィルス粒子を造血幹細胞へと導く方法を提供する。このようなウィルス粒子は、前記細胞へと生物活性物質を伝達する手段（「ベクター」）を構成する。

【0060】

当然、ウィルス粒子の細胞結合活性を改変する方法として、増殖因子として作用するペプチドを使用することは、このようなタイプのパッセンジャーペプチド結合部分の1つにすぎない。本発明の方法は、また、抗体、またはその抗原結合フラグメントを加えることによって、ウィルス粒子の細胞結合活性を改変するのに使用することができる。当該場合において、ウィルス粒子は、抗体またはそのフラグメントの細胞結合活性を有するであろう。ウィルス粒子において抗体由来細胞結合部分を用いるのに適した方法は、この業界の当業者に良く知られている(Ager et al., 1996; Russell et al., 1993)。

40

【0061】

それゆえ、本発明の更に好ましい実施態様は、前記したように、ペプチド結合部分が抗体またはその抗原結合フラグメントであるウィルス粒子の細胞結合活性を改変する方法である。

【0062】

1つの好ましい実施態様においては、結合部分は、モノクローナル抗体、ScFv（一本鎖Fvフラグメント）、dAb（単ドメイン抗体）または抗体の哺乳類認識ユニットのうちの1

50

つの細胞活性を有する。

【0063】

結合部分は、モノクローナル抗体とすることができる。多くのこれら抗原と結合するモノクローナル抗体は、既に知られているが、どうであろうとも、モノクローナル抗体技術に関連した今日の方法を用いて、大部分の抗原に対して抗体を調製することができる。結合部分は、抗体の一部（例えば、Fabフラグメント）または合成抗体フラグメント（例えば、ScFv）とすることができる。選択した抗原に適したモノクローナル抗体は、既知の手法によって調製することができる（例えば、「Monoclonal Antibodies: A manual of techniques」, H Zola (CRC Press, 1988)および「Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications」, J G R Hurrell (CRC Press, 1982)）。

10

【0064】

調製するのに適した非ヒト抗体は、既知の方法（例えば、マウス抗体のCDR領域をヒト抗体のフレームワークへと挿入することによって）で「ヒト化」することができる。

【0065】

抗体の重鎖可変領域 (V_H) および軽鎖可変領域 (V_L) ドメインは、抗原認識に関与しており、これは、早期に行われたプロテアーゼによる分解実験によって最初に見出された事実である。更なる確証は、げっ歯類の抗体の「ヒト化」によって見出された。げっ歯類起源の可変領域ドメインは、得られた抗体がげっ歯類の親抗原の抗原特異性を保持するように、ヒト起源の定常領域ドメインに融合することができる (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6351-6855)。抗原特異性は可変領域ドメインによって付与され、定常領域ドメインに依存していないことは、1つまたは複数の可変領域ドメインを全て含む抗体フラグメントを細菌によって発現させたことを含む実験によって知られている。これらの分子は、Fab様分子 (Better et al (1988) Science 240, 1041) ; Fv分子 (Skerra et al (1988) Science 240, 1038) ; V_H および V_L パートナードメインがフレキシブルなオリゴペプチドを介して結合したScFv分子 (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) および単離したVドメインを含むdAb (Ward et al (1989) Nature 341, 544) を含む。特異的な結合部位を保持する抗体フラグメントの合成に関する方法の一般的なレビューは、Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299において見ることができる。

20

【0066】

「ScFv」について、我々は、 V_H および V_L パートナードメインがフレキシブルなオリゴペプチドを介して結合している分子を意味する。

30

【0067】

完全な抗体よりむしろ、抗体フラグメントを使用することが有用であり得る。補体結合のような、完全な抗体のエフェクター機能は取り除かれる。ScFvおよびdAb抗体フラグメントは、他のポリペプチドとの融合体として発現させることができる。

【0068】

最小認識ユニットは、Fvフラグメントの1つまたは複数の相補性決定領域 (CDR) の配列に由来することができる。完全な抗体および $F(ab')_2$ フラグメントは、「二価」である。「二価」について、我々は、前記抗体および $F(ab')_2$ フラグメントが、2つの結合結合部位を有することを意味する。対照的に、Fab、Fv、ScFv、dAbフラグメントおよび最小認識ユニットは単価であり、唯一1つの抗原結合部位を有する。

40

【0069】

前記から、本発明の1つの適用は、抗体によって付与される細胞結合活性を有するウィルス粒子を産生する方法である。この場合、産生されるウィルス粒子は、抗体またはそのフラグメントが結合する任意の細胞タイプに結合することができる。それゆえ、本発明の更なる実施態様においては、ウィルス粒子のペプチド結合部位は、標的細胞に特異的な表面抗原を認識する。

【0070】

ポリペプチドである結合部位が、都合の良いことに、組換えDNA技術を用いて調製する

50

ことができることは、この業界の当業者にとっては明らかであろう。結合部分は、前記のパッケージング細胞の膜上に発現されたタンパク質に融合することができる。

【0071】

多くの標的部分をコードする核酸配列が知られており（例えば、ペプチドホルモン、増殖因子、サイトカニン等の配列）、EMBLおよびGenBankのような公にアクセス可能なヌクレオチド配列データベースを参照することにより容易に見出すことができる。いったんヌクレオチド配列がわかると、この業界の当業者にとっては、例えば、キメラDNA合成方法、または、必要なDNAをゲノムDNAまたは組織特異的なcDNAから増幅させるポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって、選択した結合部分をコードするDNAを調製することは決まりきった手法である。

10

【0072】

ペプチドホルモン、増殖因子、サイトカニン等をコードする多くのcDNA（全てが結合部分として有用である）は一般的に購入可能である（例えば、British Biotechnology Ltd, Oxford, UKから）。

【0073】

本発明の方法を使用して産生されたウィルス粒子によって結合することができる細胞表面抗原の例は、以下の表に示す。これらの抗原に結合することができる抗体も示す。

【0074】

【表 A】

表 1 : 標的のための細胞表面抗原

a) 腫瘍関連抗原

抗原	抗体	現在の使用方法
癌胎児性抗原	C46 (Amersham) 85A12 (Unipath)	結腸/直腸の腫瘍の画像化および治療
胎盤性アルカリフォスファターゼ	H17E2 (ICRF, Travers & Bodmer)	睾丸および卵巣癌の画像化および治療
パンカルチノーマ (Pan Carcinoma)	NR-LU-10 (NeoRx Corporation)	小細胞肺癌を含む様々なカルチノーマの画像化および治療
多型性上皮ムチン (ヒト乳脂肪グロブリン)	HMFG1 (Taylor-Papadimitriou, ICRF)	卵巣癌および胸水の画像化および治療
ヒト絨毛性ゴナドトロピン	W14	ヌードマウスにおけるヒト異種移植片絨毛性癌に対するカルボキシペプチダーゼの標的化 (Searle et al., (1981) Br. J. Cancer 44, 137-144)
ヒトカルチノーマ上の糖質	L6 (IgG2a) ¹	アルカリフォスファターゼの標的化 (Senter et al (1988) PNA USA 85, 4842-4846)
B リンパ球上 (通常および腫瘍性) の CD20 抗原	1F5 (IgG2a) ²	アルカリフォスファターゼの標的化 (Senter et al (1988) PNA USA 85, 4842-4846)

¹Hellstrom et al (1986) Cancer Res. 46, 3917-3923²Clarke et al (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1766-1770

【0075】

他の抗原は、アルファ-フェトプロテイン、Ca-25および前立腺特異的抗原を含む。

【0076】

【表 B】

b) 免疫細胞抗原

抗原	抗体	現在の使用方法
Pan T リンパ球表面抗原 (CD3)	OKT-3 (Ortho)	腎臓移植のための拒絶反応を抑えた治療
B リンパ球表面抗原 (CD22)	RFB4 (Janossy, Royal Free Hospital)	B リンパ球の免疫毒素治療
Pan T リンパ球表面抗原 (CD5)	H65 (Bodmer and Knowles, ICRF; licensed to Xoma Corp., USA)	急性移植片対宿主病、関節リウマチの免疫毒素治療

10

c) 感染性物質-関連抗原

抗原	抗体	現在の使用方法
おたふく風邪ウィルス関連	抗おたふく風邪ポリクローナル抗体	おたふく風邪治療のためのジフテリア毒素コンジュゲート抗体
B 型肝炎表面抗原	抗 HBs Ag	肝臓癌に対する免疫毒性

【0077】

20

本発明の方法を用いて、特異的な細胞タイプに結合することができるウィルス粒子を生産することができることから、本発明の1つの適用は、標的細胞に関連した病気の検出、防止および/または治療において有益である生物活性物質を標的細胞タイプへと誘導するために、ウィルス粒子を使用することである。特異的な病気を媒介する細胞タイプの例は、前記表において示す。

【0078】

本発明によるウィルス粒子によって治療することができる病気および疾患のタイプの更なる例を以下に記す。

【0079】

本発明の更なる態様は、前記の本発明の方法によって得ることができる改変した細胞結合活性を有するウィルス粒子である。改変した細胞結合活性は、ウィルスペプチドの天然のenv部分をペプチド結合部分と融合させることによって調製されるキメラウィルスポリペプチド以外の非ウィルスペプチドによって付与される。このような排除されるウィルス粒子には、とりわけ、W097/12049（中身はリファレンスによって本出願に挿入される、とりわけ、可能な補正のために）に開示されているものが含まれる。

30

【0080】

「キメラウィルス外被ポリペプチド以外の」について、我々は、ウィルス粒子の改変した細胞結合活性が、一般的な遺伝子組み換え手法を用いてウィルス核酸によってコードされるウィルス外被ポリペプチドに融合したポリペプチドによっては供給されないことを意味する。正確には、前記したように、本発明は、ウィルスパッケージング細胞によって発

40

【0081】

好ましい実施態様においては、ウィルス粒子が結合する特異的な標的細胞タイプは哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞、より好ましくは静止状態の細胞である。それゆえ、本発明のウィルス粒子は、哺乳類の静止状態の細胞に結合することができる。

【0082】

有利なことには、ウィルス粒子が結合する特異的な標的細胞タイプは、ヒトの造血幹細胞である。

【0083】

本出願においては、「静止状態」とは、適切な増殖刺激がなければ24時間たっても有糸

50

分裂をおこさないような細胞を指す。好ましくは、静止状態の細胞群は、例えば、Beradi et al (1995) Science 267: 104-108に記載された、骨髓細胞を用いる単離方法を使用することによって、造血幹細胞内で濃縮される。本発明に用いられるのに適した他の静止状態の細胞タイプは、静止状態のTリンパ球、Bリンパ球および単球、肝臓および筋肉のような非造血性の組織、皮膚、腸、膀胱および気道の上皮幹細胞、血管上皮細胞、静止状態の腫瘍性細胞および精子前駆体のような生殖細胞を含む。

【0084】

1つの好ましい実施態様においては、ウィルス粒子は、標的細胞に対する直接的または間接的な細胞毒性効果を有する生物活性分子をコードする核酸を含む。「直接的または間接的」な細胞毒性について、我々は、分子がそれ自体で毒性であること（例えば、ヒマ毒

10

；腫瘍壊死因子；インターロイキン-2；インターフェロン- γ ；リボヌクレアーゼ；デオキシリボヌクレアーゼ；シュードモナス菌体外毒素A；カスパーゼ等）または、毒性物質を形成するように代謝されること、または毒性物質を形成するために何か別のものに作用を及ぼすことを意味する。ヒマ毒cDNAの配列は、Lamb et al (1985) Eur. J. Biochem. 148, 265-270に開示されており、当該文献は、レファレンスによって本願に導入される。

【0085】

例えば、本発明のウィルスまたはウィルス様粒子を用いて、比較的非毒性のプロドラッグを毒性ドラッグへと変換する酵素をコードするDNA配列を標的とすることが望ましい。酵素シトシンデアミナーゼは、5-フルオロシトシン(5FC)を5-フルオロウラシル(5FU)へと変換する(Mullen et al (1992) PNAS 89, 33)；ヘルペスシンプレックス酵素チミジンキ

20

ナーゼは、抗ウィルス剤ガンシクロビル(GCV)またはアシクロビルを用いて、処理細胞に毒性をもたらす(Moolten (1986) Cancer Res. 46, 5276; Ezzedine et al (1991) New Biol 3, 608)。任意の生物（例えばE.coliまたはSaccharomyces cerevisiae）のシトシンデアミナーゼを用いることができる。

【0086】

それゆえ、本発明の好ましい実施態様においては、遺伝子は、シトシンデアミナーゼをコードし、同時に、患者は5FCが投与される。「同時に」について、我々は、腫瘍細胞の形質転換に関連して、前記遺伝子から発現したシトシンデアミナーゼにより、5FCを標的細胞内で5FUへと変換させるような時に、5FCを投与することを意味する。投与量は、約0.001から100.0mg 5FC/kg体重/日、好ましくは0.1から10.0mg/kg/日が適する。

30

【0087】

酵素の作用により比較的非毒性型から毒性型に転換させる、5FCのような成分は、「プロドラッグ」と称する。

【0088】

プロドラッグ/酵素の組み合わせの他の例は、Bagshawe et al (WO 88/07378)によって開示されているもの（すなわち、様々なアルカリ化試薬および/またはPseudomonas spp.C PG2酵素）およびEpenetos & Rowlinson-Busza (WO 91/11201)に開示されているもの（すなわち、シアンプロドラッグ（例えば、アミグダリン）および植物由来 β -グルコシダーゼ）を含む。

【0089】

40

本発明のこの実施態様において有用である酵素は、これに制限されないが、リン酸含有プロドラッグを遊離型ドラッグへと変換するのに用いるアルカリフォスファターゼ；硫酸含有プロドラッグを遊離型ドラッグへと変換するのに用いるアリアルスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルへと変換するのに用いるシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離型ドラッグへと変換するのに用いる、セラシプロテアーゼ、サーモリシン、スブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン（カテプシンBおよびLのような）のようなプロテアーゼ；D-アミノ酸置換体を含むプロドラッグを変換するのに用いるD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグを遊離型ドラッグへと変換するのに用いる β -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼのような糖鎖切断酵素； β -ラクタムで誘導化されたドラッグを遊離型ドラッグへ

50

と変換するのに用いる β -ラクタマーゼ；および、それぞれフェノキシアセチルまたはフェニルアセチルでアミン窒素を誘導化したドラッグを遊離型ドラッグへと変換するのに用いる、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼのようなペニシリンアミダーゼを含む。

【0090】

同様に、この発明のプロドラッグは、ここに制限されないが、前記リストのプロドラッグ、例えば、コンジュゲートの酵素によってより活性で細胞毒性を有する遊離型ドラッグへと変換されることができるリン酸含有プロドラッグ、チオリン酸含有プロドラッグ、硫酸含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換したフェノキシアセトアミドを含むプロドラッグまたは任意に置換したフェニルアセトアミドを含むプロドラッグ、5-フルオロシトシンおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。この発明で使用するために、プロドラッグ型へと誘導化されることができる細胞毒性ドラッグの例は、これに制限されないが、エトポシド、テニポシド、アドリアマイシン、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、シスプラチナムおよびシスプラチナムアナログ、ブレオマイシン、エスペラマイシン(米国特許第4,675,187号参照)、5-フルオロウラシル、メルファランおよび他の関連するナイトロジェンマスタードを含む。

10

【0091】

更なる実施態様においては、標的細胞へと伝達される遺伝子は、RNAまたはDNAを切断することができるリボザイムをコードする。切断する標的RNAまたはDNAは、細胞の機能に不可欠であり、その切断が細胞死をもたらすRNAまたはDNAであり、または切断するRNAまたはDNAは、望ましくないタンパク質(例えば癌遺伝子産物)をコードし、このRNAまたはDNAの切断により細胞が癌になることを防ぐRNAまたはDNAである。

20

【0092】

本出願で開示されているウィルスまたはウィルス様粒子のゲノムにコードされているリボザイムは、Cech and Herschlag "Site-specific cleavage of single stranded DNA" US 5,180,818; Altman et al "Cleavage of targeted RNA by RNase P" US 5,168,053, Cantin et al "Ribozyme cleavage of HIV-1 RNA" US 5,149,796; Cech et al "RNA ribozyme restriction endonucleases and methods", US 5,116,742; Been et al "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and methods", US 5,093,246; and Been et al "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and methods; cleaves single-stranded RNA at specific site by transesterification", US 4,987,071に開示されている。当該文献の開示は、リファレンスによって本出願に組み込まれる。

30

【0093】

より更なる実施態様においては、標的細胞へと伝達される遺伝子は、アンチセンスRNAをコードする。

【0094】

「アンチセンスRNA」について、我々は、蛋白質をコードするmRNA分子、または、pre-mRNAまたはtRNAまたはrRNAのような細胞内の他のRNA分子にハイブリダイズしてそのRNAからの発現を干渉するRNA分子、または、ハイブリダイズして遺伝子からの発現を干渉するRNA分子を意味する。

40

【0095】

便利なことに、RNAがmRNAに相補的となるように適切な方向に、プロモーターに近接してタンパク質をコードするコード配列を挿入することによって、アンチセンスRNAを発現する遺伝子を構築することができる。適切に、アンチセンスRNAは、癌遺伝子(例えばras、bcl、srcまたはp53およびRbのような腫瘍抑制遺伝子)のような望ましくないポリペプチドの発現をブロックする。

【0096】

50

望ましくないポリペプチドの発現を止めるよりもかえって、その発現を減少させることで十分であることは明らかであろう。

【0097】

アンチセンスRNAとして発現するのに適したDNA配列が、GenBankおよびEMBLのような公にアクセス可能なヌクレオチド配列データベースから容易に入手できることは更に明らかであろう。

【0098】

本発明の他の実施態様においては、前記遺伝子により、標的細胞内で欠陥遺伝子の機能を置換する。

【0099】

ヒトを含む哺乳類には、欠陥遺伝子によって生じる、数千の生まれつきの遺伝病が存在する。このような遺伝病の例には、CFTR遺伝子の変異として知られている嚢胞性線維症；ジストロフィン遺伝子の変異として知られているデュシェンヌ型筋ジストロフィー；HbA遺伝子の変異として知られている鎌状赤血球病が含まれる。多くのタイプの癌が、欠陥遺伝子、特に、変異を受けている腫瘍抑制遺伝子および癌原遺伝子によって引き起こされる。

【0100】

それゆえ、癌治療に使用することができる、本発明のウィルス粒子は、欠陥を有する癌原遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の機能を置き換えるために、癌原遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の機能を含むことが好ましい。

【0101】

癌原遺伝子の例は、ras、src、bcl等であり；腫瘍抑制遺伝子の例は、p53およびRbである。

【0102】

一般的に、望ましいタンパク質またはポリペプチドは、患者が自分の体内で合成できないもの、または、必要な量を合成しないものであろう。この例としては、アデノシンデアミナーゼ欠損重症複合免疫不全症(ADA-SCID)を治療するための遺伝子治療での使用がある。しかしながら、本出願で記載するコンセプトは、核酸が、患者の体内で過発現する基質（例えば、有害な生理的影響を引き起こす）に結合するタンパク質またはポリペプチドをコードする、または、不活性型で患者の体内で産生されるポリペプチドに結合して活性化（または、活性型から不活性型へと導く）タンパク質またはポリペプチドをコードする状況で適用できる。好ましいことに、これらの適用における本発明の使用は、幹細胞に形質移入することによる治療の効果が長く続きまたは永遠に続き、それにより、繰り返して治療する必要を避けることができるという利点を有する。

【0103】

本出願で記載される方法および物質を用いて治療することができる病気は、慢性肉芽腫症（CGD）、全ての型の重症複合免疫不全症（SCID）、高 γ グロブリン症候群(hyper IgM)、Wiskott-Aldrich病（WAS）、サラセミア、鎌状赤血球貧血症、赤血球タンパク質の欠損による他の貧血症、顆粒因子を合成できないことによる好中球欠損症、例えばミエロペルオキシダーゼ欠損症、補体欠損症のような血友病および血液凝固障害、Gaucher病、Hurler病、およびムコ多糖症のようなlysosomal storage disorders、白血球接着不全症(LAD)、不全リンパ球症候群、癌およびエイズが含まれる。

【0104】

本発明の他の適用には、HIVに抵抗性を示す遺伝的に改変されたTリンパ球を用いて免疫システムを再構築するための造血幹細胞の遺伝的改変、細胞毒性化学療法 of 骨髄抑制効果に抵抗性を示す造血前駆細胞を用いて骨髄を再生産するための造血幹細胞の遺伝的改変、および、腫瘍またはウィルス感染細胞に細胞障害性T細胞を導くためのキメラT細胞受容体を有するTリンパ球の遺伝的改変を含む。

【0105】

更なる態様において、本発明は、適した担体と組み合わせて、前記のウィルス粒子を含

10

20

30

40

50

む組成物を供給する。この態様においては、本発明は、in vitroで生物活性物質をコードする核酸を幹細胞群へと伝達するのに適した（例えば、患者への移植用の人工的に加工した幹細胞を調製するための）医薬組成物を供給する。代わりに、核酸を患者自身の肝細胞へと直接伝達する組成物をin vivoで使用することができる。この場合、組成物は、好ましくは、生物活性物質をコードする核酸を組み込み、その表面に増殖因子を提示するウィルスベクターを含む。

【0106】

「遺伝子」について、我々は、イントロン、またはそのフラグメント、またはcDNA、またはそのフラグメントを含みうる配列をコードする核酸を意味する。

【0107】

ウィルス粒子に含まれている核酸によってコードされている生物活性物質およびウィルス粒子の表面上のパッセンジャー結合ペプチド部分は、両方とも、遺伝子組み換え技術によって得ることができる。

【0108】

生物活性物質をコードするヌクレオチド配列は、好ましくは、ウィルスゲノムの変更によって調製される。同様に、パッケージング細胞に発現するパッセンジャーペプチド結合部分は、以下の方法を用いて調製することができる。

【0109】

ヌクレオチド配列は、固相ホスホロアミダイト法を用いて、de novoで合成することができるが、ヌクレオチド配列を、2つの部分（1つは望む分子をコードする部分、もう1つはウィルスまたはウィルス様粒子をコードする部分）から構築するのが、より通常である。同様に、パッケージング細胞で発現させたペプチド結合部分は、本出願で開示する方法を用いて、膜結合ポリペプチド領域に融合することができる。前記2つの部分は、エンドヌクレアーゼによる制限酵素切断によって、または、ポリメラーゼ連鎖反応のようなこの業界の当業者に知られた他の方法によって、それぞれ別の遺伝子に由来することができる。

【0110】

相補的な付着末端を介して、2つのヌクレオチド配列を動作可能に結合できるように、様々な方法が開発されている。例えば、1つまたは複数の制限酵素部位を含む合成リンカーにより、2つのDNAセグメントを結合する方法を用いることができる。エンドヌクレアーゼ制限酵素切断によって生じた、それぞれのDNAセグメントは、バクテリオファージT4のDNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼI（3'-5'エキソヌクレアーゼ活性により突出している3'-一本鎖末端を除去し、ポリメラーゼ活性により陥凹した3'末端を埋める酵素）で処理する。

【0111】

それゆえ、これらの活性の組合せにより、平滑末端DNAセグメントが得られる。平滑末端セグメントを、その後、平滑末端DNAのライゲーションを触媒することができる酵素（例えば、バクテリアファージT4 DNAリガーゼ）の存在下で、過多のリンカー分子と反応させる。それゆえ、この反応の生成物は、その末端にポリマー状のリンカーを有するDNAセグメントである。これらのDNAセグメントを、その後、適切な制限酵素で切断し、これらのDNAセグメントと適合する末端を得ることができる酵素で切断された発現ベクターに組み込む。

【0112】

様々なエンドヌクレアーゼ制限酵素部位を含む合成リンカーは、International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, USAを含む多くの所から購入することができる。

【0113】

パッケージング細胞において発現させるペプチド結合部位および本発明の望む分子をコードするDNAを産生する望ましい方法は、Saiki et al (1988) Science 239, 487-491によって開示されているポリメラーゼ連鎖反応を使用することである。

【0114】

当該方法においては、各DNA分子が、それぞれが増幅したDNAに組み込まれる、2つの特

10

20

30

40

50

異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、酵素的に増幅される。前記特異的なプライマーは、その後に前記したT4 DNAリガーゼを用いて前記2つのDNA分子を結合するのに使用することができるエンドヌクレアーゼ制限酵素認識部位を含むことができる。

【0115】

本発明は、また、本発明の遺伝子コンストラクト（好ましくはDNAコンストラクト）で形質転換した宿主細胞に関する。宿主細胞は、原核生物または真核生物のいずれかとすることができる。細菌細胞は、好ましい原核宿主細胞であり、一般的には、大腸菌（例えば、Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USAから入手できる大腸菌DH5株）およびAmerican Type Culture Collection (ATCC) of Rockvill, MD, USA (No ATCC 31343)から入手できるRR1株）である。好ましい真核宿主細胞は、酵母および哺乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒトの繊維芽細胞ラインのような脊椎動物の細胞を含む。酵母宿主細胞は、一般的に、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USAから入手できるYPH499、YPH500およびYPH501を含む。好ましい哺乳類の宿主細胞は、ATCCからCCL61として入手できるChinese hamster ovary (CHO)細胞、ATCCからCRL1658として入手できるNIHスィスマウスの胚細胞、および、ATCCからCRL1650として入手できるアカゲザル由来のCOS-1細胞を含む。

10

【0116】

本発明のDNAコンストラクトを用いた適切な細胞宿主の形質転換は、一般的に用いるベクターのタイプに依存する。よく知られた方法によって達成される。真核宿主細胞の形質転換については、例えば、Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 and Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYを参照せよ。酵母細胞の形質転換は、Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NYに記載されている。Beggs (1978) Nature 275, 104-109の方法も使用できる。脊椎動物の細胞に関しては、細胞を形質移入するのに使用される試薬（例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストランまたはリポソーム調剤）は、Stratagene Cloning Systems, or Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USAから入手できる。

20

【0117】

エレクトロポレーションも、細胞を形質転換するのに使用でき、酵母細胞、細菌細胞および脊椎動物の細胞を形質転換するのにもこの業界で良く知られている。

30

【0118】

例えば、Luchansky et al (1998) Mol. Microbiol. 2, 637-646（リファレンスによって本出願に組み込まれる）に記載されている方法によって、多くの細菌種を形質転換することができる。25 μ FDでcm当り6250Vを用いて、2.5XPEBで懸濁させたDNA-細胞混合液を以下のエレクトロポレーションで、多くの数の形質転換体が回収される。

【0119】

エレクトロポレーションによる酵母を形質転換のための方法は、Becker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182で開示されている。

【0120】

形質転換を成功した細胞（すなわち、本発明のDNAコンストラクトを含む細胞）は、よく知られた方法で同定することができる。例えば、本発明の発現用コンストラクトを組み込んで得られた細胞は増殖して、本出願で定義した細胞毒性遺伝子産物を産生することができる。細胞を集めて溶菌させて、Southern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503またはBrent et al (1985) Biotech 3, 208に記載されたような方法を使用して、DNAの存在を調べる。代わりに、下記の抗体を用いて、上清のタンパク質の存在を検出することができる。

40

【0121】

リコンビナントDNAの存在を直接調べるアッセイに加えて、形質転換が成功したかどうかは、リコンビナントDNAがタンパク質の発現を導く時に、よく知られた免疫学的方法によって確認することができる。例えば、発現ベクターを用いて形質転換が成功した細胞は、適切な抗原性を提示するタンパク質を産生する。形質転換したかどうか疑われる細胞

50

サンプルを集めて、適した抗体を用いてタンパク質のためにアッセイを行う。

【0122】

それゆえ、形質転換した宿主細胞それ自身に加えて、本発明は、また、栄養培地における、これらの細胞の培養液、好ましくはモノクローナル（クローン的に均一）な培養液、またはモノクローナルな培養液に由来する培養液も意図する。

【0123】

遺伝子コンストラクトがプラスミドDNAコンストラクトである場合、精製することができる。本発明のDNAコンストラクトは、良く知られた方法を用いて宿主細胞から精製される。

【0124】

例えば、Clewell & Helinski (1970) Biochemistry 9, 4428-4440およびClewell (1972) J. Bacteriol. 110, 667-676の方法に従って、CsCl勾配中でバンドを形成させることによって、切断した溶菌液から、プラスミドベクターDNAをラージスケールで調製することができる。この方法で抽出されたプラスミドDNAは、ピスキングチューブを介して滅菌した発熱物質を含まないバッファーに対して透析することによって、または、サイズ排除クロマトグラフィーによって、CsClを含まないようにすることができる。

【0125】

代わりに、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Qiagenによって供給されるもの）を用いて、澄んだ溶菌液からプラスミドDNAを精製することができる。ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーも使用することができる。

【0126】

本発明の方法を用いて産生されるウィルス粒子は、前記したように、特異的な細胞タイプに結合するように改変することができる。ウィルス粒子のこの特性の1つの適用は、より大きな集団の細胞から標的細胞タイプを濃縮/精製する方法である。

【0127】

それゆえ、本発明の更なる態様においては、より大きな集団の細胞から濃縮した標的細胞タイプの集団を調製する方法として、本発明のウィルス粒子を使用することができる。当該方法においては、（1）標的細胞に特異的に結合するように改変された本発明のウィルス粒子を、ウィルス粒子に結合できる標的細胞タイプを含む細胞の集団に曝し、（2）その後、標的細胞に結合したウィルス粒子を細胞の集団から分け、（3）任意に、その後、ウィルス粒子を標的細胞から取り除く。

【0128】

「濃縮」について、我々は、サンプル細胞中に存在する標的細胞の集団が、前記に要点を述べた方法を使用した後、実質的に、サンプル細胞の元の集団に存在する標的細胞の集団に比較して実質的に増加していることを意味する。

【0129】

本発明のウィルス粒子は、例えば、リガンドまたは増殖因子または標的細胞タイプと結合する抗体を含むように、人工的に加工することができる。このようなウィルス粒子は、その後、当業者に精通した一般的な免疫アッセイと似ている、前記で要点を述べた濃縮方法の一部として使用することができる。

【0130】

本発明の更なる態様は、得ることができるウィルス粒子の集団から、パッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子のタイターを増す方法である。当該方法は、
i) パッセンジャーペプチド結合部分が結合する支持体を提供すること；
ii) ウィルス粒子の集団を前記支持体に曝すこと；および、任意に、
iii) 前記支持体に結合しないウィルス粒子から、前記支持体に結合するウィルス粒子を単離することを含む。

【0131】

「タイターを増す」について、我々は、パッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子を少なくとも 10^9 ifu/mlまで、好ましくは 10^{10} ifu/mlまで、より好ましくは1

10

20

30

40

50

0^{11} ifu/ml (「ifu」は「感染形成単位(infection forming units)」または「感染単位(infectious units)」を意味する)まで増すことを意味することを含む。本発明のウィルス粒子のタイターを増すために、高いタイターのウィルスパッケージング細胞システム、例えば、Cosset et al (1995) J Virol 69, 7430-7436に要点が述べられているFLY systemを使用することができる。

【0132】

「ウィルス粒子の集団」について、我々は、本発明の方法により産生したウィルス粒子を意味する。

【0133】

本発明のウィルス粒子は、本発明の当該態様を用いて、より大きな集団のウィルス粒子（そのうちのいくつかは、パッセンジャーペプチド結合部分を組み込んでいない）から増幅することができる。例えば、この業界の当業者に良く知られている手法であるイムノアフィニティカラムのようなシステムを使用して、パッセンジャーペプチドに対する抗体は、パッセンジャーペプチドを組み込んだウィルス粒子に結合することができる。いったん結合したら、パッセンジャーペプチド結合部分を組み込まなかったウィルス粒子は、結合したウィルスから分離することができる。結合したウィルス粒子を、次にカラムから遊離させる。この例においては、イムノアフィニティカラムは、パッセンジャーペプチド結合部分が結合する支持体として機能する。

【0134】

本発明の当該態様において含まれている、本発明のウィルス粒子のタイターを増す他の方法は、マグネティックマイクロビーズ（例えば、Miltenyi Biotechが販売しているマグネティックビーズ(カタログおよび製品はwww.miltenyibiotec.comにおいてオンラインで注文できる)）の使用である。当該方法においては、本発明のウィルス粒子を、最初に、パッセンジャーペプチドを認識する抗体によって結合させる。その後、抗体/ウィルス粒子複合体をマグネティックマイクロビーズに結合させる：これは、マグネティックマイクロビーズと抗体の間で、ストレプトアビジン/ビオチン結合を介することができる、または、マグネティックマイクロビーズによる抗体/ウィルス粒子のプロテインGコンジュゲートを介することができる。いったん、マグネティックマイクロビーズ/抗体/ウィルス粒子複合体が形成されると、この業界の当業者によって明らかなように、結合しないウィルス粒子の集団からマグネティックマイクロビーズを分けることができ、本発明のウィルス粒子を回収することができる。この例においては、マイクロビーズは、パッセンジャーペプチド結合部分が結合する支持体として機能する。

【0135】

本発明のウィルス粒子のタイターを増す他の方法は、ウィルス粒子のより大きな集団から本発明のウィルス粒子を増す手段として、パッセンジャーペプチド結合部分が結合することができる構成成分（例えば、膜結合幹細胞増殖因子（SCF）によって結合するSCF受容体(c-kit)）を含む標的細胞を使用することができる。この例においては、標的細胞は、パッセンジャーペプチド結合部分が結合する支持体として機能する。

【0136】

パッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子を増す他の方法は、この業界の当業者に容易に明らかであろう。

【0137】

パッセンジャーペプチド結合部位が結合する支持体の更なる例も、この業界の当業者に容易に明らかであろう。

【0138】

本発明の更なる態様は、本発明の前記の任意の方法によって得ることができる、パッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子のために増幅したウィルス粒子の調製である。この調製物は、少なくとも 10^5 ifu/mlのウィルス粒子のタイターを有する。

【0139】

選択性が増す順に、ウィルス粒子の調製物は、少なくとも 10^5 ifu/ml、 10^6 ifu/ml、 10^7 i

10

20

30

40

50

fu/ml、 10^8 ifu/ml、 10^9 ifu/ml、 10^{10} ifu/ml以上のウィルスタイターを有する。

【0140】

本発明のこの側面の更なる実施態様においては、ウィルス粒子の調製物は、更に、医薬的に許容できる賦形剤および/または担体を含む。適した賦形剤の例は、pH7.2のリン酸バッファーのような等張性のバッファーであり、他の適した賦形剤は、この業界の当業者に良く知られている。

【0141】

例えば、前記に定義したウィルスの集団から、パッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子のタイターを増す方法によって、本発明のこの態様の調製物を調製することができる。

10

【0142】

本発明の方法を用いて、本発明のウィルス粒子の表面上に、抗原性ペプチドであるパッセンジャーペプチド結合部分を組み込むことができる。それゆえ、本発明の更なる態様により、ワクチンとして使用するための本発明のウィルス粒子が供給される。

【0143】

ワクチンは、患者、影響を及ぼす組織または全身へと直接投与することができ、または、患者由来の細胞または患者に実質的に投与されるヒトの細胞ラインにex vivoで適用することができ、または、患者に由来する免疫細胞からサブ集団を選択するのにin vitroで使用する事ができ、その後、当該細胞は患者に再度投与される。

【0144】

20

本発明のウィルス粒子をin vitroで細胞に投与する場合、インターロイキン-2のような免疫刺激サイトカインを共発現するように細胞を形質移入することができる。本発明のウィルス粒子は、実質的に純品とすることができ、または、Detoxのような免疫刺激アジュバンドと組み合わせることができ、または、免疫刺激サイトカインとの組合せで使用することができる。適したことに、患者に投与される任意のウィルス粒子は、滅菌され発熱物質を含んでいない。

【0145】

ワクチンは、アジュバンドなしで投与することができる。ワクチンは、また、BCGまたはミョウバンのようなアジュバンドとともに投与することができる。他の適したアジュバンドは、サポニンに由来するAquila's Q21 stimulon (Aquila Biotech, Worcester, MA, USA)、放線菌抽出物および合成細菌細胞壁類似物、およびRibi's Detoxのような独自に開発されたアジュバンドを含む。Quil A (他のサポニンに由来するアジュバンド) も、使用することができる (Superfos, Denmark)。もしアジュバンドなしでワクチンを投与するならば好ましい。Freund'sのような他のアジュバンドも使用できる。

30

【0146】

T細胞に対する抗原性のペプチドを提示するウィルス粒子の使用は、本発明のウィルス粒子の前記適用に関する。T細胞の抗原認識には、細胞表面で主要組織適合抗原 (MHC) 分子と関連して抗原フラグメント (ペプチド) を提示する抗原提示細胞 (APC) が必要である。T細胞は、APCによって提示された抗原フラグメントを認識するために、抗原特異的T細胞受容体 (TCR) を使用する。このような認識は、認識された抗原を根絶する反応を生じさせる免疫システムの引き金として機能する。

40

【0147】

本発明の方法を使用して、抗原性ペプチドはウィルス粒子の外被に挿入されることができる。

【0148】

それゆえ、本発明の更なる態様は、哺乳類のT細胞に対する抗原性のペプチドを提示する、本発明のウィルス粒子の使用である。

【0149】

本発明の更なる態様により、標的細胞に間接的な細胞毒性機能を有する分子をコードする遺伝子を含むウィルス粒子を伝達する方法が供給される。

50

【0150】

適したことに、間接的な細胞毒性機能は、毒性ドラッグへとプロドラッグを変換する酵素によりもたらされる。このようなウィルス粒子を用いて、ウィルス粒子が、標的細胞に結合し、細胞へと核酸を伝達し、一般的には1日かそこらかかって、間接的に細胞毒性を及ぼす機能物を発現すると、プロドラッグを投与する。ウィルス粒子の投与とプロドラッグの投与の間のタイミングは、非発明的な方法で最適化できる。

【0151】

プロドラッグの投与量は、通常の手法に従い、医者によって選択されるであろう。ウィルス粒子の投与量は、腫瘍の治療の場合、特に、腫瘍のタイプ、ステージおよび部位および患者の体重を参照して、通常の手法に従って同様に選択されるであろう。治療の期間は、ウィルスまたはウィルス様粒子に対する任意の免疫反応の迅速性および拡張性にいくぶんか依存するであろう。

10

【0152】

ウィルス粒子のいくつかは（それ自身または適切なプロドラッグとともに）、基本的に、認識できる（表面）物質を選択的に提示する任意の腫瘍中の細胞または他の明確なクラス of 細胞の死滅に適する。ウィルス粒子を用いて治療することができる癌のタイプの例は、乳癌、前立腺癌、直腸癌、結腸癌、卵巣癌、睾丸癌および脳腫瘍である。本発明のウィルス粒子は、基本的に、ヒトへの使用を意図しているが、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタおよびヒツジを含む他の哺乳類の治療にも使用することができる。

20

【0153】

本発明の更なる態様は、卵巣癌の治療および/または予防のための、医薬品の製造における本発明によるウィルス粒子の使用である。

【0154】

本発明のウィルス粒子は、細胞表面上で提示している細胞表面抗原に結合することによって、卵巣癌細胞を標的とすることができる。そのように結合したウィルス粒子は、生物学的物質を標的細胞へと伝達する手段として機能することができる。そのような標的システムがどのように機能するか例、および、生物活性物質の例を、前記および更には下記で説明する。

【0155】

卵巣癌細胞を含む、多くの癌細胞の集団は、細胞表面上にSCF受容体(c-kit)を提示する。細胞表面上にSCF受容体(c-kit)を提示する他の癌細胞は、小細胞肺癌細胞、消化管間葉系腫瘍(GIST)、生殖細胞腫瘍(例えば、睾丸)、急性骨髄性白血病(AML)および肥満細胞腫を含む。それゆえ、本発明の方法によって産生されるウィルス粒子へと膜結合幹細胞増殖因子(SCF)を組み込むことによって、卵巣癌細胞を含む癌細胞を標的とすることができる。本発明の方法によって産生されるウィルス粒子へと膜結合幹細胞増殖因子(SCF)を組み込むことは、前記および付記する実施例で論じる。それゆえ、卵巣癌を含む、癌の予防および/または治療でのウィルス粒子の使用の更なる実施態様は、パッセンジャーペプチド結合部分として、膜結合幹細胞増殖因子(SCF)をウィルス粒子へと組み込むことである。

30

【0156】

最近の研究により、OPCML(オピオイド結合タンパク質/細胞接着分子用遺伝子)が、たびたび体細胞において上皮卵巣癌を不活性化することが示された(Shellar et al (2003) OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. Nat Genet. 34(3):337-43)。著者らは、OPCMLが腫瘍抑制遺伝子であり、OPCMLの減少が細胞間の接着を減じ、卵巣表面の上皮で細胞増殖を促進させ、それにより卵巣癌の発癌の早期工程を促進すると提案している。

40

【0157】

前記したように、本発明の実施態様において、ウィルス粒子は、標的細胞中の欠陥遺伝子の機能を置き換える遺伝子(例えば、欠陥を有する腫瘍抑制遺伝子の機能を置き換える腫瘍抑制遺伝子)を含む。それゆえ、卵巣癌を含む癌の予防および/または治療における

50

、ウィルス粒子の使用の更なる実施態様においては、ウィルス粒子はOPCMLポリペプチドをコードする遺伝子を含む。OPCMLをコードする遺伝子の例は、GenBank Accession Number NM002545で開示されているポリヌクレオチド配列を含む。

【0158】

本発明の更なる態様は、本発明のウィルス粒子および医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物である。医薬調合物は、患者への投与に適した形態で調製され、滅菌され発熱性物質を含まない。

【0159】

ウィルス粒子を単独で投与することができる一方で、医薬調合物として、1つまたは複数の許容できる担体とともに与えることも好ましい。担体は、受領した者に有害でなく、化合物に適合できるという意味で、「許容」できなければならない。一般的に、担体は、滅菌して発熱性物質を含まない水または生理食塩水である。

【0160】

調合物は、便利なことに、投与単位の形態で提供することができ、医薬業界で良く知られた任意の方法によって調製することができる。このような方法には、1つまたは複数の補助的な成分を構成する担体と、活性成分を組み合わせる工程を含む。一般的に、調合物は、液体の担体と活性成分を一様に十分に組み合わせることによって調製される。

【0161】

経口投与に適した本発明による調合物は、カプセル、カセットまたはタブレットのような別々の単位として与えることができ、それぞれは、活性成分を圧倒的な量で含む；粉末または顆粒として与えることができ；水溶性の液体または非水溶性の液体中の懸濁液または溶液として与えることができ；または、水中油型液体エマルジョンまたは油中水型液体エマルジョンとして与えることができる。活性成分は、丸薬、舐剤またはペーストとしても与えることができる。

【0162】

任意に1つまたは複数の補助的な成分とともに、圧縮または型に入れて製造することによって、タブレットを調製することができる。圧縮して製造するタブレットは、適した機械において、任意にバインダー（例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性な希釈剤、防腐剤、錠剤分割物質（例えば、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋ポビドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、表面活性剤または分散剤と混合した、流れない形態の活性成分（例えば、粉末または顆粒）を圧縮することによって調製することができる。型に入れて製造するタブレットは、適した機械において、不活性液体希釈剤で湿らした粉末状化合物の混合物を型に入れることによって調製することができる。タブレットは、任意にコーティングまたは刻み目をつけることができ、望ましい放出特性を付与するために、例えば様々な割合でヒドロキシプロピルメチルセルロースを使用して、活性成分をゆっくりとまたは制御して放出するように調合することができる。

【0163】

口への局所的な適用に適した調合物は、風味のついたベース（通常スクロースおよびアカシアまたはトラガカント）で活性成分を含む薬用ドロップ；ゼラチンおよびグリシンまたはスクロースおよびアカシアのような不活性なベースで活性成分を含む錠剤；適した液体担体で活性成分を含むマウスウォッシュを含む。

【0164】

非経口投与に適した調合物は、抗酸化剤、バッファー、静菌剤および溶液（調合剤に対象とするレシピエントの血液との等張性をもたせる）を含む水溶性および非水溶性の滅菌注入溶液；並びに、懸濁剤および増粘剤を含むことができる水溶性および非水溶性の滅菌懸濁液を含む。調合物は、一回の投与量または複数の投与量の容器（例えば、シールしたアンプルおよびバイアル）で調製することができ、使用前に直接滅菌した液体担体（例えば注入のための水）を加えることのみが必要なフリーズドライ（凍結乾燥）した条件で保存することができる。即座に注入できる溶液および懸濁液は、前記の様々な滅菌した粉末

10

20

30

40

50

、顆粒およびタブレットから調製できる。

【0165】

好ましい一回の投与量を有する調合物は、活性成分を一日の投与量または一回分、一日のサブ投与量または適切なその一部を含む調合物である。

【0166】

前記に特に示した成分に加えて、本発明の調合物は、対象とする調合物のタイプに関連してこの業界の一般的な他の剤（その例は経口投与に適した剤には風味付与剤を含む）を含むことができることは理解されるであろう。

【0167】

本発明の更なる実施態様は、ウィルス粒子の核酸によってコードされる生物活性物質により、病気または疾患の診断および/または治療および/または予防のための医薬品の製造における、本発明によるウィルス粒子の使用である。

10

【0168】

この態様において、ウィルス粒子を含む医薬品は、好ましくは、患者の骨髄へと移植することによって投与され、または、患者の血液へと注入することによって投与される。注入によって投与した場合にウィルス粒子を骨髄へと導くために、有利なことには、インテグリンのような受容体を、ウィルス粒子の表面に組み込むことができる。代わりにまたは加えて、表面上にFASリガンドのような免疫抑制因子（結合し、T細胞のFAS受容体を活性化して、T細胞をアポトーシスによって死へと導く）を組み込むことによって、ウィルス粒子の免疫原性を減少させることができる。

20

【0169】

FASリガンドを発現する同種細胞移植片は、以前から、免疫媒介拒絶反応に抵抗を示すことが示されている。

【0170】

更なる態様において、本発明は、関節炎の治療および/または予防のための医薬品の製造における、本発明のウィルス粒子の使用を提供する。

【0171】

本発明のウィルス粒子は、細胞表面に存在する細胞表面抗原に結合することによって、関節炎細胞を標的とすることができる。いったんそのように結合すると、ウィルス粒子は、標的細胞へと生物活性物質を伝達する手段として働くことができる。このような標的システムがどの様に働くかの例および生物活性物質の例は、前記に記載した。

30

【0172】

前記に要点を述べたように、本発明の方法によって産生されるウィルス粒子によって結合される関節炎細胞に見られる細胞表面抗原の例は、Pan Tリンパ球表面抗原(CD5)である。CD5を結合する結合分子（例えばH65抗体）を、本発明の方法によって産生されるウィルス粒子へと組み込むことによって、細胞表面抗原を結合させることができる。それゆえ、本発明のこの側面の実施態様は、パッセンジャーペプチド結合部分として、ウィルス粒子が、CD5を結合する結合分子を組み込むことである。

【0173】

代わりに、CD5を結合する他の結合分子（例えば他の抗体）を、この業界の当業者に明らかでないような一般的な方法を用いて調製することができ、本発明の方法によってウィルス粒子へと組み込むことができる。本発明の方法によって産生されるウィルス粒子へと抗体を組み込むことは前記に記載されている。

40

【0174】

これに加えて、関節を攻撃するリンパ球と関節細胞それ自身の間を連結するものとして働くことができる非関節炎細胞を標的とすることができる。このような非関節炎細胞タイプの例は、Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. Science. 2002 Sep 6; 297 (5587):1689-92に記載されている肥満細胞である。当該論文では、活性化肥満細胞の集団を根絶するならば、炎症性の反応が抑えられ、関節を攻撃するT細胞

50

も少なくなることを示唆している。

【0175】

SCFは、SCF受容体(c-kit)を過剰発現する肥満細胞の増殖の主要な制御因子である。それゆえ、本発明の方法によって産生されたウィルス粒子へと、膜結合幹細胞増殖因子(SCF)を組み込むことによって、肥満細胞を標的とすることができる。本発明の方法によって産生されるウィルス粒子へと膜結合幹細胞増殖因子(SCF)を組み込むことは前記および付記する実施例で論じる。それゆえ、本発明のこの側面の更なる実施態様は、パッセンジャーペプチド結合部分として、膜結合幹細胞増殖因子(SCF)をウィルス粒子に組み込むことである。

【0176】

更なる態様においては、本発明は、核酸を細胞のゲノムへと組み込むために、生物活性ポリペプチドをコードする核酸で静止状態の細胞の集団を形質転換する方法を供給し、当該方法は、前記ウィルス粒子に細胞を曝すことを含む。そして、当該方法においては、病気または疾患の治療、予防および/または診断のための生物活性ポリペプチドをコードする核酸を細胞のゲノムへと組み込むように、表面結合増殖因子が細胞の分割を誘導する。

【0177】

この態様においては、好ましくは、静止状態の細胞は、任意に造血幹細胞を濃縮した、骨髓細胞の集団である。

【0178】

更なる態様において、本発明は、欠陥遺伝子を有する哺乳類の診断および/または治療するための医薬品の製造において、本発明によるウィルス粒子の使用を供給する。当該使用においては、病気または疾患を治療するための分子をコードする核酸を、本発明のウィルス粒子の骨髓への移植またはウィルス粒子の血液への注入によって、in vivoで細胞のゲノムに挿入する。

【0179】

更なる態様において、本発明のウィルス粒子は、遺伝子運搬物として使用できる。「遺伝子運搬物」について、我々は、本発明のウィルス粒子が、標的細胞のゲノムへと生物活性物質をコードする核酸を運搬するのに使用することができることを意味する。

【0180】

本発明の実施態様を、以下に示す限定しない図および実施例を参照して、更に詳細に記載する。

【実施例】

【0181】

(実施例1) ヒトの膜結合SCFのcDNAのクローニング

本実施例では、膜結合ポリペプチドをコードするヒト遺伝子をクローニングする方法を明示する。幹細胞増殖因子(SCF)は、静止状態の肝細胞の表面に見出されるc-kit受容体に結合するリガンドである(Hamel and Westphal, 1997)。SCFは、2つの型で存在し、長い可溶性型と短い膜結合型である。2つの型は、異なるmRNAスプライシングから得られる。可溶性型が、エキソン6によってコードされているタンパク質切断部位を有するのに対して、膜結合型は、エキソン6を有しておらず、それ故タンパク質切断部位も有していない(Hamel and Westphal, 1997)。我々は、ウィルス粒子の外被へとリガンドを挿入するための最初の工程として、パッケージング細胞ラインの表面上で、膜結合SCFを発現させることを望んだ。

【0182】

1. SCF-発現ヒト細胞ライン

ヒトの間質細胞ラインL88.5(幹細胞増殖因子(SCF)の膜結合型および可溶型の両方を発現する細胞ライン)は、血液学的に正常な患者の骨髓から増殖させた、シミアンウィルス40(SV40)で形質転換されたヒト間質に由来する(Thalmeier et al., 1994)。これは、SCFの両方のアイソフォーム(膜結合アイソフォームよりも高い割合での可溶性アイソフォーム)を発現し、クローニングのための膜結合SCF(mb-SCF)として用いた。規定どお

りに、熱で不活性化した10%の牛胎児血清(FCS;Gibco)を加えたDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 内で培養した。L88.5は、Dr. Karin Thalmeier (Germany)から頂いた。

【0183】

インキュベーター内で、過湿した5%CO₂ in airで、37℃で細胞ラインを増殖させた(New Brunswick Scientific, UK)。懸濁液中の増殖細胞は、2-5×10⁵細胞/mlで維持した。接着細胞を70-80%のコンフルエントで継代した：37℃、5%CO₂ in airで2分間、トリプシン-EDTAでの培養において、細胞を組織培養フラスコから引き離し、1200rpmで5分間遠心し、適切な増殖培地で再懸濁させた。

【0184】

2. ヒト細胞ラインL88.5からの全RNAの単離

細胞がサブコンフルエントであるときに、ヒト細胞ラインL88.5から全RNAを抽出した。RNA操作に用いる溶液は、RNase阻害剤ジエチルピロカルボネート(DEPC)で処理した。0.1%のDEPCを含む溶液を室温で12-16時間放置した。ガラス器具は、DEPC-ddH₂O中に2時間浸し、ddH₂Oで数回リンスし、オートクレーブした。DNaseおよびRnaseフリー（製造者に認定された）のチップおよびプラスチック器具を、全てのRNA調製のために使用し、リンスはしなかった。電気泳動槽は、洗剤で洗浄し、ddH₂Oでリンスし、エタノールで乾かし、3%H₂O₂中に浸し、DEPC処理ddH₂Oで徹底的にリンスした。手袋は、常時着用した。RNA抽出液は、専用のピペットを用いて取り扱う。全RNAは、RNaseフリーの条件で、約5×10⁶細胞から抽出した。簡単に述べると、10⁶細胞当たり0.2mlのRNAzol™ B(Biogenesis Limited, Bournemouth, U.K.)中で、細胞を直接溶菌した。10%v/vクロロホルムを添加することによって、RNAを抽出した。サンプルを15分間徹底的に攪拌し、氷上で5分間反応させ、13000rpm、4℃で15分間遠心した。RNAを含む無色の水溶性の上層を取り除き、等量のイソプロパノールの添加によってRNAを沈殿し、4℃で15分間反応させ、13000rpm、4℃で15分間遠心した。RNAペレットを75%エタノールで洗浄し、7500rpm、4℃で15分間遠心して再度ペレットを得た。ペレットを10-15分間風乾させ、滅菌したDEPC処理ddH₂Oで溶かした。全RNAの濃度および純度は、260nmおよび280nmの波長での光学濃度(OC)測定によって定量した。1unit(U)のODは、RNAの約40 μg/mlに相当する。OD_{260/280}比が1.8および2.0になる場合は、それぞれ、DNAおよびRNAの純度が高いことを示す。抽出したRNAの完全性を、分光光度計およびアガロースゲル電気泳動によって求めた。A_{260/280}比は、3回の異なる実験で一致して2.0であり、3種類のRNA(28S、18Sおよび5S)が、0.8%アガロースゲル電気泳動によって検出することができた。

【0185】

3. 膜結合SCFのmRNAのRT-PCR増幅

一本鎖cDNAを、その後、前記した全RNA調製物から調製した。1 μgの全RNAを鋳型として使用し、cDNAを産生した。1 μgのRNA、10mMのdNTPストック、100pmol/μlのランダムヘキサマー、5×RT (1st strand) バッファー、0.005MのDTT、2UのMLV逆転写酵素(Gibco, UK)からなる逆転写酵素反応液を、37℃で1時間反応させた。反応液を、その後、95℃で5分間加熱し、RT酵素を変性させた。反応性生物を使用するまで氷上に置いた、または、-20℃で長期間保存した。

【0186】

L88.5細胞ラインに由来するcDNAを鋳型DNAとして用いて、SCFプライマーMFおよびMRを使用するPCRによって膜結合SCFをクローニングした。図2は、使用したプライマーの位置を表した概念図である。プライマー配列を以下に示す。

【0187】

【表 C】

SCF MF	ACACCACTGTTTGTGCTGGATC
SCF MR	AACTGTTACCAGCCAATGTACG

【0188】

増幅反応液は、全反応液50 μ l中で、2 μ lのcDNA、1 μ lのSCFフォワードおよびリバースプライマー、200 μ MのdATP、dCTP、dGTP、dTTP(Sigma)、1 $\times$ 反応バッファー (1mMのTris-HCl(25 $^{\circ}$ CでpH 9.0)、5mMのKCl,0.01%のTriton(登録商標)X-100、1.5mMのMgCl₂(Sigma)および1.25UのTaqDNAポリメラーゼ(Sigma)を含む) となる。94 $^{\circ}$ Cでの10-15秒の最初の変性工程の後、Taqポリメラーゼ酵素を加えることによって、ホットスタートPCRを行った。アニーリング温度を最適にし、60 $^{\circ}$ Cで1分間とし、伸長温度を72 $^{\circ}$ Cで1分間とした。34サイクル行い、最後のサイクルについては、伸長時間を延ばして10分間とした。0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲル中で、PCR産物を電気泳動解析した。Eoto UV300シリーズのトランスイルミネーター(Fotodyne Incorporated)上で短波長のUV光(300 nm)を照射することによって、DNAを可視化し、Polaroid 667film(Polaroid U.K. Limited)で写真をとった。

10

【0189】

913bp (可溶性SCF)、829bp (膜結合SCF) のサイズを有するフラグメントおよび約700bpの未同定のフラグメントを含む3つの異なるバンドが、3回の異なる実験において、2%アガロースゲル上で観察された。RT-PCR用のポジティブコントロールとして、350bpという予想されるサイズフラグメントを付与するGAPDH5' および3' プライマーを使用した。GAPDHプライマー配列を以下に示す。

20

【0190】

【表 D】

GAPDH 5'	GTGAAGGTCGGAGTCAACG
GAPDH 3'	GAGATGATGACCCTTTTGGC

30

【0191】

鋳型DNAを水で置き換えて、RT反応における逆転写酵素を除いて、ネガティブコントロールとした。RT-PCR反応の結果を図3に示す。

【0192】

4. Mb-SCFのcDNAのクローニング

アガロースゲル電気泳動(前記に示した)によってPCR増幅SCFフラグメントを分離し、短波長のUV光(300nm)かで照射して可視化した。膜結合SCFに対応する829bpのフラグメントは、外科用メスを用いて切り取った。製品の取扱説明書に従い、AdvantageTM PCR-Pur e Kit(Clontech Laboratories-distributed by Cambridge Bioscience, Cambridge, U.K.)を用いて、mb-SCF DNAをゲル精製した。精製したmb-SCF cDNAを含む上清を新しいチューブに移し、分光光度計により収率および純度を求めた。精製したDNAフラグメントの溶液を-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

40

【0193】

直線化したpCR2.1ベクター(50ng):ゲル精製したmb-SCF cDNA (インサートDNA) を1:3のモル比により、ゲル精製したmb-SCFフラグメントDNAを直線化したpCR2.1クローニングベクターでライゲーションした。全容量10 μ l中、1 $\times$ リガーゼ反応バッファー (Clontech, UK: 30mMのTris-HCl pH7.8、10mMのMgCl₂、10mMのDTT、0.5mMのATP) および2UのT4 DNAリガーゼ (Pfomega) の存在下で、ベクターおよびインサートDNAを14 $^{\circ}$ Cで14-16時間反応させた。製品のコントロールプラスミドを含むポジティブおよびネガティブコントロールの

50

ライゲーション反応も同時に行った。

【0194】

pCR2.1クローニングプラスミドをInvitrogen(Netherland)から入手し、全てのPCRクローニングのためにTAクローニングキット (Invitrogen) を使用した。pCRII (ベクター) のTA Cloning Kit Dual Promoterにより、PCR (またはRT-PCR) 産物をプラスミドベクターへと直接挿入するという、迅速で1工程のクローニング方法が可能である。TAクローニングの原理は、Taqポリメラーゼが、PCR産物の3'末端に1つのデオキアデノシン (A) を加えるという鋳型に依存しない活性を有するという事実に基づく。当該キットで供給される直線化プラスミドベクター(pCR2.1)は、1つの3'デオキシチミジン (T) 残基を有する。このことにより、PCRインサートはベクターに効率的にライゲーションされる。

10

【0195】

前記ライゲーション反応物を、大腸菌のINV Fα株 (Invitrogen) へと形質転換した。凍結した大腸菌のコンピテントセルを氷上で溶解した。3μlのライゲーション反応液をコンピテントセルの1つのバイアルに加え、氷上で30分間反応させた。細胞を42℃で30秒間ヒートショックに供し、すぐに2分間氷上に置いた。その後、250μlのSOC培地を加え、225rpmで攪拌しながら、37℃で60分間、形質転換混合液を培養した。全量を、100μg/mlのアンピシリンを含む15% Luria Bertani (LB)寒天プレート上にプレーティングし、プレートを37℃で14-16時間培養した。閉環した環状プラスミドDNAおよび直線状DNAまたはddH₂Oを含むポジティブおよびネガティブコントロール形質転換反応を、同時に行った。閉環した環状プラスミドDNAでのテスト形質転換を行うことによって、形質転換効率を計算した。1、10および10ngのDNAを使用して得られたコロニーの数により、コロニー形成単位/μgを見積もった。

20

【0196】

インサートDNAが適切なLacZ-ペプチド-コードベクターへとクローニングされ、大腸菌のINV Fα株を形質転換した場合は、β-ガラクトシダーゼ活性に基づいて、リコンビナント形質転換体の細菌コロニーをスクリーニングすることができる。適切なベクターは、β-ガラクトシダーゼ酵素のアミノ末端フラグメントをコードする、大腸菌のlacオペロンフラグメントを有する。INV Fα株は、lacZ-ペプチドの存在下で、対立遺伝子内の相補によって相補されるlac I^{qZΔM15}を有する。相補性は、β-ガラクトシダーゼの基質である5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクト-ピラノシド(X-gal)の存在下で、青色のコロニーが形成されることによって示される。pCR2.1クローニングベクターのβ-ガラクトシダーゼ内のマルチプルクローニング部位へとクローニングされたDNAは、挿入により不活性になり、白色のコロニーが形成することによって示されるように、β-ガラクトシダーゼ活性が減少する。簡単に言うと、100μg/mlのアンピシリン(amp)を含むLB寒天プレートに、40μlの20mg/mlのX-gal(BoehingerMannheim)および4μlの200mg/ml (800μg) のIPTGをプレーティングし、2-3時間、37℃で乾燥させた。100μlの前記形質転換液をプレーティングし、12-16時間37℃で培養した。Mb-SCF cDNAを含む得られた白色のコロニーを、制限酵素切断解析、並びに、前記のSCFプライマーMFおよびMRによりスクリーニングし、829bpの増幅フラグメントを得た。

30

【0197】

pCR2.1中のフラグメントの向きも、最初に、M-13特異的フォワードプライマー (pCR2.1のフランキング部位) およびSCF特異的プライマー (MR) (データを示さず) を用いたPCRによって求め、配列決定によって確認した(Advanced Biotechnology Centre, ICSM Charing Cross Campus) (配列を示さず)。配列決定によって選択された最初のクローンにより、Taqによって生じた誤りが明らかになった (配列を示さず)。そのあと、更なる3つのクローンを選択し、配列を決定した。クローン2は、mb-SCFの正しい配列を有しており、サブクローニング実験用を選択した。

40

【0198】

5. 哺乳類の発現ベクターへのmb-SCF cDNAのクローニング

pCR2.1 mb-SCFクローンを、The Advanced Biotechnology Centre, Charring Cross Hos

50

pitalで配列決定した。正しいmb-SCF配列および向きを示す1つのクローン(クローン2)を、mb-SCFインサートをpREP8発現プラスミドへとサブクローニングするのに用いた。pREP8哺乳類発現プラスミドはInvitrogenから入手した。このプラスミドは、RSVプロモーターを利用してDNA産物を高レベルで構成的に発現するようにデザインされている。そして、望むクローン化遺伝子の発現のための選択マーカーとして、ヒスチジノール耐性遺伝子を有する。この発現プラスミドは、また、プラスミドをエピソームとして複製できるEpstein Barr Nuclear Antigen-1(EBNA-1)遺伝子およびEpstein Barr Virus(EBV)の複製開始点(oriP)を含む。

【0199】

液体培地で細菌を増殖させることによって、pCRII.1 mb-SCFクローン2およびpREP8細菌細胞ラインからプラスミドDNAを調製した。100 µg/mlのampを含む滅菌した培地を、新たに形成されたシングルコロニーから取った細菌で植菌し、220サイクル/分で攪拌しながら、12-16時間、37℃で培養した。その後の、細菌培養液からのプラスミドDNAの精製は、製品の取扱説明書に従い、Qiagen MinipREPs™ DNA Purification System(Qiagen)を用いて行った。プロトコールには、アルカリ溶菌によるプラスミドDNAの単離、および、その後のシリカベースのマトリクスに結合させることによる精製を含む。簡単に言うと、5mlの細菌培養液を前記のように増殖させ、製品の取扱説明書に従って、プラスミドDNAを抽出した。

【0200】

リコンビナントpCRII.1 mb-SCFクローン2およびpREP8を、両方とも、Not IおよびHind III制限酵素で切断した。1-2Uの制限酵素が存在する製品の1×切断バッファー中で、37℃で14時間反応することによって、プラスミドDNAを切断した。切断はアガロースゲル電気泳動で確認した。pCRII.1 mb-SCFクローン2中のMb-SCF cDNAインサートDNAを、制限酵素切断反応液の電気泳動によって、アガロースゲル上で単離し、前記アガロースゲルからインサートDNAを回収した。その後、前記と同じ方法を用いて、回収したmb-SCF cDNAを直線状pREP8ベクターへとライゲーションした。ライゲーション混合液を用いて、その後、前記の大腸菌INV-F株のコンピテントセルを形質転換した。得られたリコンビナントクローン(pREP8 mb-SCFクローンと命名)をmini pREPsおよびPCRによってスクリーニングし、正しい方向でpREP8ベクターへと挿入されたシングルコピーのmb-SCF cDNAを含むリコンビナントクローンを同定した。その後、これらのクローン1つ(pREP8 mb-SCFと命名)を選択し、更に使用した。

【0201】

(実施例2) レトロウィルスパッケージング細胞中でのmb-SCF cDNAの発現

ヒトmb-SCFポリペプチドをコードするcDNAクローンを単離し、前記の哺乳類の発現ベクターへとクローニングした。その後、我々は、ウィルス粒子の外被へとポリペプチドを挿入するための次の工程として、パッケージング細胞ラインの表面でmb-SCFを発現することを望んだ。

【0202】

1. pREP8 mb-SCFを用いたウィルスパッケージング細胞ラインの形質転換

クローンpREP8 mb-SCFをウィルスパッケージング細胞ラインへと形質転換した。このクローンは、哺乳類の発現ベクターへと挿入されたmb-SCFポリペプチドをコードするcDNAを有する。最初の工程として、大容量のプラスミド精製手法を用いて、クローンからプラスミドDNAを抽出した。新たに形成したコロニーから取った細菌を、5mlのLB brothに植菌するのに用いた。適切な抗生物質の存在下で、12-16時間37℃で、220サイクル/分で攪拌しながら、培地を培養し、300mlのLB brothに植菌するのに使用した(large-scale plasmid pREParation)。適切な抗生物質の存在下で、12-16時間37℃で、300サイクル/分で攪拌しながら、培地を培養した。製品の取扱説明書に従って、Qiagen MaxipREPTM DNA Purification systemを用いて大容量のプラスミドDNAを抽出した。

【0203】

その後、プラスミドDNAを、Phoenixエコトロピックレトロウィルスパッケージング細胞

10

20

30

40

50

ラインを形質転換するのに使用した。Phoenixエコトロピックおよびアンホトロピックパッケージング細胞ラインは、Dr Gray Nolan, Stanford University, California, USAにより頂いた(Grignani et al., 1998; Kinsella and Nolan, 1996)。これらの細胞ラインは、ヘルパー不要のエコトロピックおよびアンホトロピックレトロウィルスの産生のための第二世代のレトロウィルス産生ラインである。当該ラインは、293T細胞ライン、ヒトの胚性腎臓細胞ラインに基づく。この細胞は、共選択マーカーとしてハイグロマイシンでのgag-pol遺伝子、および第二の選択マーカーとしてジフテリア毒素での外被タンパク質（エコトロピックまたはアンホトロピックのいずれか）を産生する。これらの細胞ラインは、規定どおりに10%FCSを加えたDMEM中で維持した。再選択のために300 µg/mlのハイグロマイシンおよび1 µg/mlのジフテリア毒素中で、1週間で追加的に継代し、約10から12週間ごとに継代した。

10

【0204】

リン酸カルシウム沈殿によって、Phoenixエコトロピックパッケージング細胞ラインをリコンビナントプラスミドpREP8 mb-SCFで形質移入した。簡単に言うと、500 µlの250mM CaCl₂中の12 µgのプラスミドDNAを、バブリングエアーを送りながら、一滴ずつ、等量の2×HBSSに加えた。得られた溶液を室温で20-30分間反応させ、きれいな沈殿物を形成させ、その後、75mlの組織培養フラスコにおいて60%コンフルエントにまで増殖した細胞へ一滴ずつ加えた。リン酸カルシウム含む培地を取り除く前に、細胞を、37°Cで5%CO₂ in airで24時間維持した。細胞を10%の培養培地で二回洗浄し、新しい10%培養培地で再懸濁し、37°Cで5%CO₂ in airで24時間更に培養した。2.5mMのヒスチジノールの存在下で、安定な形質転換体の選択を行った。耐性細胞は、80%コンフルエントフラスコの中身を1:5に分けて増殖させた。少なくとも6-8週間、細胞を選択し続けた。安定な形質転換体を更なる実験のために冷凍保存した。

20

【0205】

6-8週間後に得られた前記安定な細胞は、更に希釈クローニングに供した。簡単に言うと、10%FCSおよび2.5mMヒスチジノールを加えた100 µlのDMEMを含む96穴平底プレートへと500の細胞を加えた。1週間内でコンフルエントに達した4つのウェルをトリプシン処理し、更なる週の間、10%FCSおよび2.5mMヒスチジノールを加えた300 µlのDMEMを含む48穴プレートへと移した。その後、これらのクローンを、10%FCSおよび2.5mMヒスチジノールを加えた10mlのDMEMを含むT25フラスコで増殖させた。その後、4つの独立したクローンを実験に供し、これらの細胞内でのmb-SCFの存在および発現を調べた。

30

【0206】

2. 形質転換したPhoenix細胞ライン内でのpREP8 mb-SCFプラスミドの検出

pREP8 mb-SCFプラスミドで安定に形質移入されたレトロウィルスパッケージング細胞について、PCRによりプラスミドを含むか確認した。簡単に言うと、10%FCSおよび2.5mMヒスチジノールを加えたDMEMを含むT25フラスコ内で増殖させたクローンをトリプシン処理した。トリプシン処理した細胞をPBSで二回洗浄し、500 µlのPBSで再懸濁した。2 µlの細胞懸濁液を、pREPFおよびEBVRプライマーを含む標準的なホットスタートPCR（前記参照）において鋳型として用いた。

【0207】

40

【表 E】

PREP F	GCTCGATACAATAAACGCC
EBVR	GTGGTTTGTCCAAACTCATC

【0208】

0.05%エチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲル上で、PCR産物を電気泳動した。プラスミドDNAの増幅用のポジティブコントロールは、鋳型としてpREP8 mb-SCF DNAそれ自身とした。ネガティブコントロールには、標準的なPCRにおいて、鋳型としての水または

50

形質移入していない細胞を使用した。pREPFおよびEBVRプライマーを使用してパッケージング細胞中のpREP8 mb-SCFの検出により、1164bpの増幅産物が得られた（図4）。

【0209】

3. 人工的に加工したレトロウィルスパッケージング細胞上のmb-SCFタンパク質の発現

人工的に加工したパッケージング細胞により、SCFの細胞表面での発現を検出するために、標準的な間接免疫蛍光アッセイを用いた。安定に形質移入したパッケージング細胞を、ガラスカバースリップ上で増殖させた。細胞が70%コンフルエントになった時、カバースリップをインキュベーターから取り除き、10分間室温でエタノールを用いて、細胞を固定化した。その後、37℃で30分間、1:5の希釈率のc-kitリガンド/幹細胞増殖因子抗体（ヤギ抗ヒトSCF）（R&D Systems）で、細胞を反応させた。カバースリップを10分間PBSで二回洗浄し、抗IgG FITCコンジュゲート二次抗体で反応させた。カバースリップを10分間PBSで二回洗浄し、10% PBS/90%グリセロールmountantでガラススライド上でマウントし、Olympus UV顕微鏡下で観察した。人工的に加工したパッケージング細胞は、濃い蛍光染色によってわかるようにSCFポリペプチドを高レベルで発現しているが、人工的に加工していない細胞は蛍光を発しなかった（図5）。抗体の特異性は、また、人工的に加工した細胞上で非免疫のヤギ血清の使用によっても確認され、シグナルを発しなかった。4つの別のクローンの間において、蛍光を発する細胞のシグナル強度や数に違いは見られなかった。

【0210】

ヒスチジノール選択によって得られた4つの改変したパッケージング細胞クローンをフローサイトメトリーによっても解析し、mb-SCFの存在を求めた。簡単に言うと、T25フラスコ内で増殖させた形質移入した細胞および形質移入していない細胞を、PBSベースで酵素が入っていない細胞解離バッファー（Gibco）を用いて解離した。細胞をPBSで二回洗浄した。その後、これらの細胞を、1:5で希釈した抗c-kitリガンド/幹細胞増殖因子抗体（ヤギ抗ヒトSCF）（R&D Systems）で、40分間4℃で反応させた。その後、細胞をPBSで二回洗浄し、抗IgG FITC1コンジュゲート二次抗体で、30分間4℃で反応させた。細胞を二回洗浄し、35 μlのLeucoperm Reagent A（Serotec）を用いて、20分間室温で固定した。細胞を、フローサイトメトリー解析のために、1mlのPBSで再懸濁した。フローサイトメトリー解析は、Beckman FACScan machineを用いて、Stem Cell Lab, Hammersmith Hospital内で行った。データ解析に必要なソフトウェアはCellquestであった。形質移入していない細胞の前方および側面の散乱特性を求め、一次抗体および二次抗体の両方で染色した形質移入していない細胞と、形質移入細胞の蛍光強度を比較した。この解析において、4つのクローンが、73-98%の範囲のmb-SCFを発現する細胞の頻度とわずかに異なることが明らかになった。蛍光軸上のピークによって求めたように、mb-SCFの発現レベルは4つ全てのクローンで同じであった。最も高くmb-SCFを発現するクローン、クローン3（98%発現のmb-SCFを有する）を、レトロウィルス産生用を選択した。結果を図6に示す。このクローンは、また、図6で示されるように、CD59の表面発現が高レベル（97%）であることが確認された。

【0211】

（実施例3）ウィルス外被の一部としてmb-SCFを含む人工的に加工したレトロウィルスパッケージング細胞からのレトロウィルス産生

前記のように、ヒトのmb-SCFポリペプチドをコードするcDNAクローンを単離し、哺乳類発現ベクターへとクローニングした。その後、我々は、パッケージ細胞ラインの表面で、mb-SCFを発現させた。次の工程として、我々は、ウィルス粒子が、ウィルス外被の一部としてmb-SCFを含むレトロウィルスパッケージング細胞に由来するかどうかを求めることを望んだ。

【0212】

1. 人工的に加工したPhoenix細胞からのレトロウィルスの産生

Phoenixエコトロピック細胞ライン、mb-SCF改変エコトロピッククローン3およびアンホトロピックパッケージング細胞ラインを、ウィルスのLTR、パッケージングシグナルおよびレポーター遺伝子（強化緑色蛍光タンパク質（eGFP））をコードするPINCOプラスミドベクターで、リン酸カルシウムを用いて形質移入した（Grignani et al., 1998）。PINCOベク

ターは、全長のMoloney murine leukaemia virus LTR、伸長したΨ配列およびCMVプロモーターから構成される転写カセット、および強化緑色蛍光タンパク質(eGFP)のcDNAを含む。レトロウィルスバックボーンに加えて、このベクターは、また、エピソームとしてベクターが複製できるEBV oriPおよびEBNA-1遺伝子を含む。このベクターは、また、Dr Gray Nolan(Stanford University, Leyland, USA)により頂いた。一過的なレトロウィルス上清をピューロマイシン($1\mu\text{l/ml}$)の選択前に得た。リン酸カルシウム-DNA混合液を取り除き、完全培地中にパッケージング細胞を一晩回収した後、培地を取り除き5mlの新しい培地に移し、細胞を 37°C で培養した。ウィルスを含む上清を24時間後に回収し、 $0.45\mu\text{m}$ フィルター滅菌し、分注して -70°C で保存した。PINCO形質移入細胞を、更に6週間、 $1\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシンの選抜条件下で増殖させた。レトロウィルスを、一過性の上清と同じ方法で回収した。

【0213】

2. Mb-SCF発現細胞に由来するウィルスのタイターの計算

レトロウィルスのタイターを求めるために、形質導入したNIH3T3のフローサイトメトリー解析によって、eGFP受容体遺伝子の発現を解析した。これらの細胞は、すでに研究所で入手でき、レトロウィルスタイターを求めるのに使用されている。この細胞を10%FDSを加えたDMEM中で維持した。3つのレトロウィルスパッケージング細胞ライン(Phoenixアンホトロピック; エコトロピックおよびmb-SCF改変エコトロピック)への一過的なおよび安定的なPINCOベクターの形質移入を、NIH3T3で求めた。NIH3T3(5×10^4)細胞を24穴プレートへ加えた。 $1\mu\text{l}$ から $100\mu\text{l}$ の範囲のレトロウィルス上清、10%の熱不活性化FCSを加えたDMEMおよび $8\mu\text{g/ml}$ のポリブレンを含む感染混合液のうち1mlをそれぞれのウェルに加えた。次の日、感染混合液を取り除き、1mlの新しい培地を加えた。 37°C で更に48時間培養した。その後、細胞をトリプシン処理し、PBSで二回洗浄し、Leucopermで固定化した。その後、細胞をフローサイトメトリーを用いて解析し、NIH3T3細胞中のeGFPの発現を求めた。形質移入していないNIH3T3細胞の散乱特性を求め、蛍光強度について、レトロウィルスで形質導入した細胞を比較した。全液量が1mlの感染混合液中(完全培地および $8\mu\text{g/ml}$ のポリブレンを含む)中の1、10、 $100\mu\text{l}$ のウィルス上清のタイトレーションによって(それぞれ二連ずつ)、タイターを計算した。蛍光細胞のパーセンテージとして求めたポジティブ細胞の頻度を用いた上清の容積に対してプロットした。グラフの角度がレトロウィルスのタイターを表す。レトロウィルスのタイターを感染粒子(IP)/mlとして表現する。

【0214】

mb-SCFで人工的に加工したパッケージング細胞のレトロウィルスタイターを、下の表1に示す。非改変のエコトロピック細胞とmb-SCF改変パッケージング細胞(安定)の間のレトロウィルスタイターは、顕著に異ならなかった(図7)。

【0215】

【表1】

パッケージング細胞ライン	NIH3T3 細胞におけるレトロウィルスタイター (IP/ml $\pm$ sd) (n=3 実験)
Phoenix エコトロピック	$3.88\pm 1.18\times 10^5$
Phoenix mb-SCF 改変 (一過性)	$2.98\pm 0.32\times 10^4$
Phoenix mb-SCF 改変 (安定)	$2.60\pm 0.53\times 10^5$
Phoenix アンホトロピック	$2.08\pm 1.29\times 10^5$

【0216】

3. Mb-SCF発現細胞に由来するレトロウィルス粒子のmb-SCFタンパク質の検出

レトロウィルスを、PINC0レトロウィルスベクタープラスミドを用いて、一過的におよび安定に、人工的に加工したエコトロピックパッケージング細胞、クローン3、人工的に加工していないエコトロピックパッケージング細胞およびアンホトロピックパッケージング細胞から産生させた。PINC0プラスミドでの形質移入後48時間で一過的に形質移入した細胞から、および、ピューロマイシン含有培地中で6週間選択された安定形質移入体から、レトロウィルス上清を回収した。4mlのこれらのウィルス上清を、SW55Tiローター(Beckman)を用いて、30,000rpm、1.5時間4℃で超遠心してペレットを得た。上清を捨て、ペレットのレトロウィルス粒子を50 μ lのPBSで再懸濁し、-70℃で保存した。

【0217】

市販のキット(Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad))を用いて、これまでもたくさん書かれているローリーアッセイに似たアッセイによって、ペレットのレトロウィルス粒子のタンパク質濃度を求めた。0.2mg/mlから2mg/mlの範囲のウシ血清アルブミンからなるタンパク質スタンダードを調製した。5mlのタンパク質スタンダードおよびサンプル(レトロウィルス粒子)を、その後、製品の取扱説明書に従い、Microplate Assayプロトコールを用いてアッセイした。750nmの吸光度から、レトロウィルス粒子およびタンパク質スタンダードのタンパク質濃度を求めた。

【0218】

ウェスタンブロット解析により、粒子のmb-SCFおよびCD59を検出するために、等量のタンパク質をゲルにロードした。10 μ gのレトロウィルス粒子を、2×ゲルローディングバッファー(50mMのTris-HCl pH6.8、2%のSDS、10%のグリセロールおよび/または1mgのプロモフェノールブルーを含む)、0.1Mのジチオトレイトール中で混合し、5分間、95℃でボイルした。その後、タンパク質抽出液を、還元条件下で、12%ポリアクリルアミドゲルで分離した。プロモフェノールマーカがゲルの底部から約1cmに至るまで、80Vで約3-4時間、タンパク質抽出液を、1×ランニングバッファー(25mMのTris pH8.3)、250mMのグリシンおよび0.1%のSDS中の染色マーカと並行して電気泳動した。セミドライ転写装置(Bio-Rad)を用いて、ニトロセルロース膜(Immobilon)にタンパク質を転写した。1×転写バッファーは、20%メタノールを含むことを除いて、1×ランニングバッファーと同じとした。製品の取扱説明書に従い、1時間、0.8mA/cm²の直流で、タンパク質の転写を行った。転写が成功しているかどうかは、膜上の染色タンパク質マーカの検出によって求め、これらのタンパク質スタンダードの位置を鉛筆で印をつけた。ゆるやかに攪拌しながら、1時間、室温で、1×TBST(Tris Buffered Saline and Tween20)中の10%のミルクタンパク質(Marvel)で、膜をブロックした。10%のMarvelを含む1×TBST中の1:500で希釈したヤギ抗ヒトSCF抗体(R&D Systems)と膜を、4℃で18時間反応させてレトロウィルス粒子上のSCFを求めた。10%のMarvelを含む1×TBST中の1:250で希釈したマウス抗ヒトCD59抗体(Serotec)と膜を、4℃で24時間反応させてレトロウィルス粒子上のヒトCD59を求めた。その後、抗体で処理した膜を、多量の1×TBSTで20分間、3回洗浄し、最後の洗浄を1×TBSで20分間行った。その後、10%のMarvelを含む1×TBST中の1:2500で希釈した二次抗体であるロバ抗ヤギIgG抗体-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)と；および1:500で希釈した二次抗体であるニワトリ抗マウスIgG抗体-HRPと、それぞれ、反応させることによって、SCFおよびCD59抗体を検出した。その後、膜を、多量の1×TBSTで20分間、3回洗浄し、最後の洗浄を1×TBSで20分間行った。SCFおよびCD59抗体を、製品の取扱説明書に従い、増幅化学発光キット(Amersham)を用いて可視化した。キットの適切な基質と反応させた膜を、その後、オートラジオグラフィーに供した。オートラジオグラフィーは、最上のシグナルを得るために、30秒から5分間の範囲の異なる照射時間で行った。自動フィルムデベロッパーを用いて、照射したオートラジオグラフィーフィルムを現像した。

【0219】

一過性の形質移入および安定な形質移入によって産生したレトロウィルスは、人工的に加工したmb-SCFを発現することが明らかになった。一過性の上清では、発現のレベルがわずかに高いことが明らかになった(図8)。予想されたとおり、人工的に加工されていない細胞は、mb-SCFを発現しなかった。CD59、パッケージング細胞に天然に存在する膜タン

10

20

30

40

50

パク質（人工的に加工されたおよび加工されていない）も、明らかにすることができた。

【0220】

（実施例4）mb-SCF含有ウィルス粒子の機能

我々は、ウィルスパッケージング細胞ライン内で発現する膜結合ポリペプチドを、その細胞ラインに由来するウィルス粒子の表面外被へと挿入できることを明らかにしてきた。我々は、組み込んだポリペプチドが生物学的活性を保持しているかどうかを求めることを望む。mb-SCFポリペプチドは、静止状態の細胞の細胞表面に見られるc-kit受容体タンパク質に結合することができる(Sehgal et al., 1999)。いったん結合すると、細胞を増殖させることができる(Sehgal et al., 1999)。それゆえ、我々は、改変したウィルス粒子がc-kit受容体を発現する細胞ラインの集団に結合して増殖を誘導することができるか求めた。

10

【0221】

1. c-kit受容体ポジティブ細胞に対するmb-SCFウィルス粒子の結合

mb-SCFを発現するレトロウィルス粒子が特異的にc-kit発現細胞に結合するかを調べるために、抗SCFモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより明らかにしたように、レトロウィルス結合実験を行った。高レベルのc-kit（SCFの受容体）を発現すると報告されていることから、ヒトの巨核芽球性白血病細胞ライン、Mo7eをレトロウィルス標的実験に用いた。Mo7e細胞を、20%のFCSおよび10ng/mlのGM-CSFを加えたRPMIで維持した。Mo7e細胞を、100 μ lのレトロウィルス上清と、32°Cで1時間培養した。細胞を冷PBSで二回洗浄した。その後、100 μ lのモノクローナル抗体、83A25を、4°Cで1時間、細胞と反応させた。これらの細胞を冷PBSで二回洗浄した。最後に、細胞を、FITC-コンジュゲート-ラット抗マウスIgG抗体と反応させた。その後、細胞を冷PBSで二回洗浄し、フローサイトメトリーで解析した。

20

【0222】

mb-SCFレトロウィルスは、Mo7e細胞に結合するが、非改変のエコトロピックウィルスは結合しなかった。GM-CSFの代わりにSCFで一晩Mo7e細胞を増殖することによるkit受容体の優先的なダウンレギュレーションにより（フローサイトメトリーで確認された）、mb-SCFレトロウィルスの結合は無くなった（図9）。これらの実験から、パッケージング細胞の改変により、標的レトロウィルス結合が達成されたことが示された。

【0223】

2. 改変したウィルス粒子に曝した後のMo7e細胞の増殖

mb-SCFタンパク質を含むレトロウィルス粒子の生物学的活性を、標準的な市販の増殖アッセイ、CellTiter 96（登録商標）AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay（Promega）を用いて求めた。Mo7e細胞をPBSで二回洗浄し、20%FCSを加えたRPMIで再懸濁した。再懸濁した培地の90 μ l当りまたは70 μ l当り5000の細胞を、96穴丸底マイクロタイタープレートへと分注した。Phoenixエコトロピックmb-SCF細胞ラインに由来するレトロウィルス上清（前記で調製した）の10 μ lまたは30 μ lを、96穴丸底プレートに加えて、細胞懸濁液の全体容量を100 μ lとした。増殖アッセイのためのポジティブアッセイは、100ng/mlの精製したリコンビナントヒトSCFの使用を含む。ネガティブコントロールは、サイトカインを含まず、または、Phoenixエコトロピック細胞に由来するウィルス上清を含む。8枚の同一のプレート（それぞれの濃度を3連で行った）を用意し、1枚のプレートは、準備して2時間後のバックグラウンド増殖活性のためのアッセイである。

30

40

【0224】

テトラゾリウム化合物；3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム、不活性な塩（MTS）および電子共役剤、フェナジンエトサルフェート(PES)を含む溶液を20 μ l、それぞれのウェルに加え、1.5時間、37°Cで加湿インキュベーター内で培養することによって、24時間ごとに、増殖を求めた。MTS化合物は、細胞により、組織培養培地に溶ける色のついたホルマゼン生成物へと、生物的に減少する。96穴プレートリーダーを用いて490nmの吸光度を測定することによって、着色反応を定量した。

50

【0225】

人工的に加工したmb-SCFパッケージング細胞に由来するウィルス粒子を、Mo7e細胞の増殖を刺激するのに用いた。非改変のエコトロピックパッケージング細胞に由来するコントロールレトロウィルス粒子およびサイトカインを添加せずに培養した細胞は、Mo7e細胞を刺激しなかった。Mb-SCF改変レトロウィルスの増殖が実験を開始してから3日後にしか始まらないことに注目することは興味深い。レトロウィルス上清の容積（30 μ lまで）が増すことにより、Mo7e細胞の増殖速度が増すことは見られなかった。一過的に得られたレトロウィルスも、Mo7e細胞の増殖を刺激することができた。実験のためのポジティブコントロールは、100ng/mlのリコンビナントヒトSCFとしたところ、予想したとおり、Mo7e細胞を刺激した。結果を図10にプロットした。

10

【0226】

（実施例5）本発明のウィルス粒子を用いた遺伝子運搬およびリポーター遺伝子としてのeGFP

前記実施例によって、本発明の方法を、ウィルス粒子へと生物活性パッセンジャーペプチド結合部分を組み込むのに使用することができることが示された。ここで、我々は、このようなウィルス粒子が、パッセンジャーペプチド結合部分によって結合している標的細胞を形質導入することができることを示す。

【0227】

方法

レトロウィルスベクタープラスミド、PINCO

20

Phoenixエコトロピック細胞ライン（アンホトロピックおよびエコトロピック）からレトロウィルスを得るのに使用されるレトロウィルスベクターは、PINCOと呼ばれている(Grignani et al., 1998; Kinsella and Nolan, 1996)。PINCOベクターは、全長のMoloney murine leukaemia virus LTR、伸長した Ψ 配列およびCMVプロモーターから構成される転写カセット、および強化緑色蛍光タンパク質(eGFP)のcDNAを含む。レトロウィルスバックボーンに加えて、このベクターは、また、エピソードとしてベクターが複製できるEBV oriPおよびEBNA-1遺伝子を含む。このベクターは、また、Dr Gray Nolan(Stanford University, Leyland, USA)により頂いた。

【0228】

方法

30

一次細胞

通常の末梢血幹細胞 (PBPC)

通常の個体由来のG-CSF誘導末梢血管は、Stem Cell Laboratory, Hammersmith Hospitalから得た。これらの細胞は、サインしたインフォームドコンセントおよび研究倫理委員会の承認が必要である。

【0229】

マウスのNIH3T3細胞ライン

これらの細胞は、すでに研究所にて入手でき、レトロウィルスタイターを求めるのに使用された。これらも、10%FCSを加えたDMEMで維持した。

【0230】

40

ヒトの赤白血病細胞ラインTF-1およびヒトの巨核芽球性白血病細胞ラインLAMA-84およびMo7e

TF-1細胞ライン、ヒトの赤白血病細胞ラインを、10%FCSおよび1ng/ml GM-CSFを加えたRPMIで維持した(Kitamura et al., 1989)。ヒトの巨核芽球白血病細胞ライン、Mo7eを、20%FCSおよび10ng/ml GM-CSFを加えたRPMIで維持した。ヒトの巨核芽球白血病、LAMA-84を、10%FCSを加えたRPMIで維持した。これらの細胞ラインは、高レベルのc-kit (SCFの受容体)を発現すると報告されているので、レトロウィルス標的試験に使用した。Mo7e細胞も、レトロウィルス粒子のmb-SCFの生物活性を明らかにするために、増殖活性に用いた。Mo7eおよびLAMA-84細胞ライン(Lee et al., 2001; Miyazawa et al., 1995; Seigneurin et al., 1987)は、Dr. Junia Meloから頂いた。TF-1細胞ラインは、研究所で入手できた。

50

【0231】

造血細胞ラインの上清の形質導入

感染効率 (MOI) を、NIH3T3細胞でのレトロウィルスタイターに基づいて計算し、少なくとも2のMOIで、レトロウィルス標的試験を行った。MOIが1であることは、標的細胞当たり1つの感染レトロウィルス粒子を表す。レトロウィルス、DMEM中の10%FCSおよび8 µg/mlポリブレンを含む感染混合液を、37℃、5%CO₂ in airで、25,000個の標的細胞と24時間培養した。培地を取り除き、新しい培地で置き換え、37℃、5%CO₂ in airで、48時間更に培養した。その後、標的細胞をPBSで二回洗浄し、固定化し、フローサイトメトリーで解析した。

【0232】

造血細胞ラインの共培養

2倍多い産生細胞を用いて、共培養による非接着性造血細胞ラインの形質導入を行った。レトロウィルス産生細胞を、コンフルエントに達するまで増殖させ、トリプシン処理し、2000radsで照射した。細胞を、コンフルエントを維持したまま、6穴マイクロタイタープレートへと再度入れ、37℃、5%CO₂ in airで、16-18時間培養した。細胞をPBSで注意深く洗浄し、ログ増殖期 (5×10^4) の標的細胞 (TF-1) を、全容量が2mlで加えた。残存する産生細胞活性を制御するために、標的細胞が存在しない擬形質導入を並行して行った。細胞を、37℃、5%CO₂ in airで、24時間培養した。非接着性の細胞を取り除き、新しい6穴マイクロタイタープレートに入れ、ベクターのレポーター遺伝子のアッセイの前に、コンタミした産生細胞の接着を容易にするために、37℃、5%CO₂ in airで、更に8時間培養した。その後、非接着性の細胞を新しい培地で再懸濁し、37℃、5%CO₂ in airで、48時間培養した。その後、標的細胞をPBSで二回洗浄し、固定化し、フローサイトメトリーによって解析した。

【0233】

一次細胞のレトロウィルス形質導入単核細胞の分離

防腐剤フリーのヘパリンを含む、骨髓細胞を、Hank's Buffered Salt Solution (Gibco) で1:4に希釈した。希釈したサンプルを、Lymphoprep (Nyegaard) 上で層状にし、1800rpmで30分間遠心した。単核細胞 (MNC) をインターフェースから取り除き、Hank's Buffered Salt Solution中で、1800rpmで10分間遠心して二回洗浄した。3%酢酸で希釈して任意のコンタミした赤血球を溶菌した後、血球計数器チャンバーを用いて、MNCをカウントした。

【0234】

CD34+細胞分離

製品の取扱説明書に従って、MiniMacsTM system (Miltenyi Biotec) を用いて、MHCからCD34細胞を分離した。簡単に言うと、MNCを、10⁸のMNC当たり500 µlで、0.5%ヒト血清アルブミン (Immuno AG) および5mM EDTAとともにカルシウムおよびマグネシウムフリーのPBSを含むバッファーで再懸濁した。100 µlの試薬A1 (IgGをブロック) およびA2 (QBEND/10-CD34を認識するマウスIgG) を細胞に加え、15分間4℃で培養した。細胞を5mlのバッファーで洗浄し、10⁸のMNC当たり400 µlのバッファーで再懸濁した。100 µlの試薬B (試薬A2を認識するコロイド状の超常磁性MACSマイクロビーズ) を細胞に加え、15分間4℃で培養し、前記の洗浄を行った。細胞を500 µlのバッファーで再懸濁し、その後、磁石を設置したプレパックのMiniMacsTM カラム (タイプMS) に加え、細胞をパスさせた。標識されたCD34+細胞は、磁石によりカラム内に保持される。500 µlのバッファーを加えて、パスさせることによって、これらの細胞を4回洗浄した。カラムを磁石から取り外し、ポジティブ細胞を1mlのバッファーで溶出させた。これらの細胞を、血球計測器を用いてカウントし、FITCをコンジュゲートした、CD34分子の異なるエピトープを認識するHPCA2抗体 (Beckton Dickinson) でサンプル細胞を染色することによって純度を求め、FACS解析した。サンプルの純度は、常に約90%であった。

【0235】

トランスウェル手法を用いたCD+34一次細胞のレトロウィルス形質導入

CD+34細胞の形質導入を開始する前の日に、アンホトロピックレトロウィルス外被およびレトロウィルスゲノム (pBabeNeo; Morgenstern and Land, 1990) を含む、安定なAM-12レトロウィルス産生細胞ラインを、 2×10^5 細胞/ウェルの濃度で、6穴プレートに加え、10%FDSを加えたDMEMで維持した。形質導入の日に、産生細胞ラインの培地を、10%FCSおよび $8 \mu\text{g/ml}$ の濃度のプロタミンスルフェート (トランスウェル添加後に、最終的に $4 \mu\text{g/ml}$ になるように釣り合わせた) を加えた、2.5mlの新しいDMEMで置き換えた。0.4 μm 膜 (Costar) を有する24mmトランスウェルを各ウェルに挿入した。CD34+ (10^5) 精製細胞を、Iscoves Modified Dulbecco's Eagles Medium (Gibco) 中の30%SCF (MycoplexTM PAA) およびサイトカインミックス (50ng/mlのIL-3、100ng/mlのSCF、10ng/mlのGM-CSF) 2.5mlで、再懸濁し、挿入したトランスウェルへと移した。以下に示すCFU-GMの増殖のために、細胞を集める前に、形質導入工程を48時間行い、G418選択が有りまたは無しの半固体培地 (メチルセルロース) 中で培養した。

10

【0236】

レトロウィルスで形質導入した前駆細胞のコロニー形成アッセイ CFU-GMアッセイ

CD34+形質導入細胞をトランスウェルから取り除き、Hank's Buffered Saline Solutionで洗浄した。これらの細胞を、300 μl のCFU-GMミックス (50ng/mlのSCF、1ng/mlのGM-CSF、10ng/mlのIL-3および100ng/mlのG-CSFを含む) および1.5mg/mlのG418を加えた3mlのメチルセルロース (MC, Methocult H4230, Stem Cell Technologies) 中で培養した。細胞をMC中でよく攪拌した後、35mm直径のペトリディッシュ (Nunc lon (登録商標)) (1ml/dish) に入れた。そのディッシュを、次々と、150mmの細菌用のペトリディッシュ中に、蒸発による培養培地のロスを少なくするために、滅菌水を含む35mmペトリディッシュ (蓋をしない) とともに置いた。培地を、37°C、加湿した5%CO₂ in airで培養した。顕微鏡を挿入したLeica DMILを用いて、培養7日めで、50より多い細胞のCFU-GMコロニーをスコア付けした。

20

【0237】

一次細胞への遺伝子移動の評価

形質導入効率

各CD+34形質導入実験の効率を、1.5mg/mlの濃度のG418を含む培地中で、14日間培養後に生存したCFU-GMコロニーの割合から計算した。以下に、より簡単に記載する。

30

【0238】

【数1】

$$\text{形質導入効率} = \frac{\text{G418} \times 100 \text{ で生存したコロニー数}}{\text{G418がない場合のコロニー数}}$$

【0239】

結果および考察

実験データを図11から17に示す。全てのデータは、対応するアンホトロピックパッケージング細胞ライン (すなわちPhoenixアンホトロピックパッケージング細胞) にパッケージングされた同じウィルスベクターから得られるものと比較して、形質導入効率として表した。

40

【0240】

図11から14は、3つの異なるSCF-受容体(kit)ポジティブ細胞ライン (Mo7e (図11)、TF-1 (図12)、LAMA (図13) およびkitネガティブ (U937, 図14) 細胞ラインのウィルス粒子形質導入により得られた結果を示す。Mb-SCF (図11-14においては「mb-SCF」と記載) を組み込んだウィルス粒子は、前記実施例で概要した方法を用いて調製した。エコトロピックウィルスのみマウス細胞に感染することができたが、アンホトロピックウィルスはマウス細胞とヒト細胞の両方に感染することができた。

【0241】

図11から14に示すように、非改変のエコトロピックウィルスのウィルス粒子形質導

50

入効率は、kitポジティブ細胞およびkitネガティブ細胞の両方で大変低い。対照的に、mb-SCFを組み込んだエコトロピックウィルスによる形質導入は、標的細胞が高レベルのkitを発現している場合（図11および12：kitの存在について、Mo7eおよびTF1細胞は>95%+veである）は、大変高い効率であり（アンホトロピックと同じような効率）、kit発現がより低い場合いくら効率も低くなり（図13：kit+veの存在について、LAMA細胞は～50%である）、非改変エコトロピックウィルスとkitネガティブ細胞（図14：U937：mb-SCF：「C13ウィルス」となっているmb-SCF結果）は差異が無い。

【0242】

SCF提示ウィルスがkitネガティブ細胞を形質誘導できないことは、これらの細胞に対するウィルス粒子の一般的な欠損でないことを明らかにするために、mb-SCFを組み込んだアンホトロピックウィルス粒子を使用した実験のデータを、コントロールとして示す。アンホトロピックmb-SCFウィルス粒子は、非改変のアンホトロピックウィルスと同様の形質導入効率を有しており、kitネガティブ細胞を形質誘導することができる（図14）。それゆえ、mb-SCFパッセンジャー結合部分を組み込んだ改変ウィルス粒子は、通常のウィルス粒子のように、敏感な細胞タイプを感染することができる。

【0243】

まとめると、当該データにより、mb-SCFパッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだエコトロピックウィルス粒子が、mb-SCFペプチドが結合できる受容体を有する細胞を形質導入することができることが示された。対照的に、パッセンジャーペプチドが存在しないエコトロピックウィルス粒子は、このような細胞を形質導入することができない。それゆえ、本発明の方法により、標的細胞のウィルスによる形質導入を媒介することができるパッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子を調製することができる。このようなウィルス粒子は、標的細胞へと遺伝子を運搬する手段として使用することができる。

【0244】

図15から17は、一次造血幹細胞に由来するヒトの骨髄のウィルス粒子による形質導入により得られたデータを示す。ウィルス粒子のタイプは、図11から14に示した実験に使用したものである。

【0245】

mb-SCFパッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子を使用した、一次造血幹細胞に由来するヒトの骨髄(CD34+細胞：図15)の形質導入効率は、同様に、アンホトロピックウィルスと同じくらい効率である（むしろ効率が良い）が、予想したとおり、非改変のエコトロピックウィルスは大変低い。当該実験においては、mb-SCFを組み込んだアンホトロピックウィルス粒子は、高い効率を有しており、細胞上へのmb-SCFを組み込むことは、一般的な非改変のアンホトロピックウィルスより増して、効率的に形質導入させることができることを示唆する。

【0246】

図16は、コントロールとしてマウスの骨髄の形質転換を示す。我々は、全ての標的細胞を形質導入するウィルス、そして実際には、エコトロピックウィルス（マウス細胞に特異的な）は、効率の点で、アンホトロピックウィルスよりも優れていることを予期する。しかしながら、エコトロピックmb-SCFおよびアンホトロピックmb-SCFウィルス粒子の両方は、形質導入のレベルを増しており、当該効率はkit ポジティブ細胞（mb-SCFパッセンジャーペプチド結合部分が結合する受容体を有する）において、より増していることが示唆される。一次造血幹細胞に由来するヒトの骨髄は、kit受容体を有する多くの細胞を含む。マウス細胞を用いた実験では、特異的な標的への形質導入が可能でないことは注目すべきである。

【0247】

強化緑色蛍光タンパク質(EGFP)を有するPINCOレトロウィルスベクターを用いた実験について前記に詳細に示し、細胞のウィルス粒子形質導入を、FAC（蛍光活性化細胞ソーター）を使用した細胞の蛍光の解析によって、スコア付けした。

【0248】

最後に、図17は、骨髓系コロニー形成細胞に由来するヒト骨髓のウィルス粒子形質導入から得られるデータを示す。これらの実験において、レトロウィルスコンストラクトは、ドラッグG418（哺乳類細胞も殺傷することができる、抗菌物質ネオマイシンの誘導体）に耐性を付与する遺伝子を有する。骨髓細胞を形質導入し、その後、G418を含む半固体培地にプレーティングし、耐性を有する造血系のコロニーを形成させた。コロニーを、倒立顕微鏡下で、14日後にスコア付けする。形質導入に成功した細胞のみが、G418培地中で生存して、コロニーを形成するはずである。それゆえ、データは、異なるレトロウィルスで形質導入した後に得られるコロニーの数から得られ、同じようなアンホトロピックウィルスでの実験と比較して表す。これらの実験のウィルスベクターはpBabeベクター(Morgenstern and Land, 1990)に基づく。

10

【0249】

前記に観察されたように、非改変のエコトロピックウィルスは、ほとんどヒト造血前駆細胞を形質導入せず、アンホトロピックウィルスによって媒介される形質導入の割合の10%より少ない。しかしながら、対照的に、2つの異なるエコトロピックmb-SCFコンストラクト（「CDK4遺伝子」および「KL35M CDK4遺伝子」と記載）により、CFU-GMの高い効率の形質導入（アンホトロピックウィルスを使用した場合に見られた場合に匹敵する形質導入効率）をもたらす。それゆえ、mb-SCFは、kit受容体を有する細胞のウィルスによる形質導入を促進する。

20

【0250】

これらの実験により、mb-SCFパッセンジャーペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子が標的細胞へのウィルス形質導入を媒介できることが確認された。このようなウィルス粒子は、標的細胞への遺伝子運搬手段として使用することができる。

【0251】

実施例6：ウィルス外被に人工的に加工したポリペプチドを1つより多く含むウィルス粒子の調製

実施例1および2において、ウィルス粒子へと組み込まれるペプチドをコードするcDNAをヒト細胞ラインからクローニングし、ウィルスパッケージング細胞ライン内で発現させた。当然、ウィルス粒子内へ1つより多いペプチドを組み込むことは可能である。

【0252】

使用するペプチド（例えば、細胞タイプ特異的受容体のリガンドであるペプチド）を選択すれば、実施例1で概要を示した方法を使用して、直接、リガンドを発現する細胞集団からペプチドをコードするcDNAを単離する。代替の方法としては、リガンドをコードするcDNAを同定するために、データベース探索を行う。

30

【0253】

いったん、リガンドをコードするcDNAをクローニングし、配列決定し、正確なクローンであることが証明されると、cDNAを安定して発現する哺乳類細胞発現ベクターへとクローニングする。実施例1においては、mb-SCFを、Invitrogenから入手したpREP8哺乳類発現プラスミドへとクローニングした。このプラスミドは、望むクローン遺伝子を発現するために、選択マーカーとしてヒスチジノール耐性遺伝子を有している。第二のペプチドは、同じ細胞ライン内で発現させるべきであり、両方のプラスミドが同じ細胞ライン内に存在することを確かなものとするため、選択マーカーとして異なる耐性遺伝子を有する発現ベクターを使用することが望ましい。他の適した発現ベクターは、Stratageneから入手できるpCMV-Script(G418耐性)、GTSから入手できるpCMV Xi-Clone(G418耐性)、Stratageneから入手できるpExchanger（ハイグロマイシン、ピューロマイシンまたはネオマイシン耐性）およびNovagenから入手できるpTriEx system（ハイグロマイシン耐性）を含む。

40

【0254】

当該cDNAを有する発現ベクターは、その後、ウィルスパッケージング細胞ラインへと形質転換し、形質転換体を選択する。パッケージング細胞ラインには、すでにペプチド発現ベクターを有しているはずであり、その後、両方の選択マーカー遺伝子により

50

形質転換体を選択する。実施例 2 により、どのようにパッケージング細胞ラインが形質転換され、形質転換体を選択するかが示されている。

【0255】

実施例 3 には、pREP8哺乳類発現ベクターへとクローニングしたMb-SCF cDNAを含むウィルスパッケージング細胞ラインから、どのようにレトロウィルス粒子が産生されて回収するかが概論されている。この方法においては、ウィルス外被へと組み込まれた1つまたは複数のペプチドを有するウィルス粒子を産生および回収することができる。

【0256】

実施例 7：ウィルス外被に抗体フラグメントを含むウィルス粒子の調製

例えば、以下の手法を使用して、ウィルス粒子へと抗体フラグメントを組み込むことができる。

【0257】

マウスモノクローナル抗体HMF1およびヒト化モノクローナル抗体Hu HMF1の一本鎖Fv

HMF1およびHu HMF1のV_H重鎖およびV_K軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、WO 94/10323の図 15に示され、Verhoeyen et al (1993) Immunology 78, 364-370で与えられている。両方ともリファレンスによって本出願に組み込まれる。

【0258】

マウスおよび新たに作ったHMF1可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列。(a) マウスおよび新たに作ったHMF1の重鎖可変領域配列(Mo V_H-HMF1およびHu V_H-HMF1)；(b) それぞれ、マウスおよび新たに作った軽鎖可変領域配列(Mo V_K-HMF1およびHu V_K-HMF1)。CDRおよびフレームワークのアミノ酸番号および定義は、Kabat et al (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Edn 4, US Dept of Health and Human Services Public Health Service, NIH, Bethesda, MD 20892, USAに由来する。

【0259】

Bird et al (1988) Science 242, 423またはHuston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879に記載されている方法を、図 12に記載されているヌクレオチド配列に適用し、HMF1のScFvおよびHu HMF1のScFvをコードする遺伝子を得る。前記したリコンビナントDNA技術を使用することによって、HMF1のScFvおよびHu HMF1のScFvをコードするDNA部分を、クローンpRep8mb-SCF中のmb-SCFの膜貫通領域へ融合することは容易である。実施例 1 は、pRep8mb-SCFのコンストラクトが記載されている。SCFの膜貫通領域は、ペプチドのC末端のエキソン6によってコードされているタンパク質分解切断部位に由来する(Hamel and Westphal, 1997)。

【0260】

H17E2のV_HおよびV_Lのアミノ酸配列は、「Monoclonal antibodies-applications in clinical oncology」,page 37-43, 1991, A.A.Epenetos, ed., Chapman&Hall, UKに開示されている。

【0261】

V_HおよびV_L鎖をコードするヌクレオチド配列は、遺伝子コードを使用して、アミノ酸配列から容易に得ることができ、ScFvは、前記したように、Bird et alまたはHuston et alの方法を使用して、その配列から調製することができる。

【0262】

いったんmb-SCF-ScFvクローンを構築することができれば、実施例 2 で概要を示したように、ウィルスパッケージング細胞ラインへと形質転換する。実施例 3 で概要を示したように、Mb-SCF-ScFvを組み込んだウィルス粒子を産生することができる。

【0263】

この業界の当業者に良く知られた、免疫学的手法を使用して、mb-SCF-ScFvペプチドを組み込むことができたウィルス粒子を、ウィルス粒子の全集団から濃縮することができる。例えば、ScFvを認識する抗体を、例えばカラムまたは類似の支持体マトリクスにコンジュゲートすることができる。全ウィルス粒子をそのカラムに通すと、mb-SCF-ScFvペプチドを組み込んだウィルス粒子のみが保持されるであろう。非結合のウィルス粒子を除去し

10

20

30

40

50

た後、結合したウィルス粒子をカラムから遊離させることができる。他の方法としては、カラム、または類似の支持体マトリクスが、mb-SCF-ScFvペプチドが結合することができる抗原を支持する方法を使用することができる。このような抗原は、muc-1によってコードされる多型性上皮ムチン(polymorphic epithelial mucin (PEM))コアペプチドである。HMFG1およびHu HMFG1を使用する方法および/またはコードされる多型性上皮ムチンコアペプチドを使用する方法は、WO 01/72336およびWO 94/10323で開示されている。これらの中身は、リファレンスによって本出願に組み込まれる。

【0264】

実施例8：遺伝子運搬のための本発明のウィルス粒子の使用

本発明のウィルス粒子による、静止状態の標的細胞の形質導入を容易にするという能力は、以下のようにテストされる。

【0265】

TF-1細胞ラインは、赤白血病の患者から発現し、巨核球の発達の初期段階で停止した細胞とほとんど同一視される(Bagnis et al. 1994)。当該細胞は、増殖因子（通常は、非常に感度良く細胞が反応するIL-3またはGM-CSFである）の存在下でのみ増殖することができる。当該細胞は、また、SCFに反応して分割することができるが、この反応は非常に弱い。当該細胞は、増殖因子の提供を中止することによって、容易に静止状態にすることができる。我々は、レトロウィルスの形質導入のための標的として当該細胞（静止状態を誘導した）を使用した。

【0266】

当該実施例においては、ウィルスパッケージング細胞ラインは、レポーター遺伝子 β -ガラクトシダーゼをコードする核酸を含むウィルス粒子を産生することができる。当該方法は、我々が構築した、mb-SCF cDNAを含むプラスミド(pRep8mb-SCF)と類似のプラスミドを、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(NLSlacZ)をコードするレトロウィルスベクターを形質導入したレトロウィルス産生細胞へと形質移入することによって行うことができる。この細菌酵素は、活性酵素が存在する時に青色染色反応を産生する合成基質とともに、使用することができる。従って、これらの実験においては、形質導入することができた細胞は、ウィルスによる遺伝子運搬を介した後で、青く染色するであろう。得られた産生ラインは、LacJPと同定される。実施例2で論じられているように、LacJP細胞ラインの抗-SCF抗体による免疫蛍光染色されることは、SCFが結合している表面が存在することを示す。

【0267】

指数増殖しているTF-1細胞を増殖因子から取り除き、一晩培養し、静止状態にする。前記したように、TF-1細胞を、mb-SCFを組み込んだレトロウィルス粒子と一晩共培養させる。共培養の後、TF-1細胞を取り除き、顕微鏡スライドの上に集め、 β -ガラクトシダーゼ産生のための染色を行った。元の産生ラインと共培養する細胞は、レトロウィルスによる形質導入の痕跡は無いであろう。対照的に、SCF産生細胞と共培養した細胞のいくつかは、ポジティブ染色するであろう。このことは、滴定したチミジン(3H)で細胞を二重標識することによって、サイクリングTF-1細胞（細胞分裂を繰り返す細胞）として確かめることができる。この放射線活性なヌクレオチドを、分裂細胞のDNAへと組み込むことができ、スライドを漬けた写真乳剤中で、銀目のオートラジオグラフィー沈着物によって検出できる。多くの形質導入されたTF-1細胞も銀目が存在を示すことが予想され、これは、細胞分裂が行われていることを意味する。

【0268】

それゆえ、これらの実験により、レトロウィルス産生細胞ラインによる表面結合増殖因子の発現により、静止状態の標的細胞集団のレトロウィルス形質導入を容易に行うことができ、それゆえ、通常この手法を用い難い細胞へと、レトロウィルスを介した遺伝子の運搬を行うことができることが示されるであろう。

【0269】

実施例9：in vivoでの遺伝子運搬のための本発明のウィルス粒子の使用

以下の実施例は、遺伝子運搬のための、本発明のウィルス粒子を使用する方法を記載す

る。ウィルス粒子は、パッセンジャーペプチド結合部分を発現するウィルスパッケージング細胞に由来する。以下に示す実験は、例えば、幹細胞ペプチド結合部分を組み込んだウィルス粒子が、in vivoで、遺伝子運搬ベクターとして機能するかを調べるために、行うことができる。明らかに、実験に用いる組織は、ウィルス粒子が標的とする細胞タイプに依存して変えることができる。

【0270】

実施例8に示すような、遺伝子運搬のためのリポーター遺伝子としてβ-ガラクトシダーゼを有するウィルス粒子を、ヌードマウスの皮下に注入する。注入後、1および7週間で、組織を集め、β-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を、以下に示す組織化学的なアッセイによって評価する。

【0271】

細胞内のβ-ガラクトシダーゼ活性の組織化学的染色

本発明のウィルス粒子の組合せで形質移入した細胞を、PBSで洗浄し、室温で10分間PBS中の0.1%グルタルアルデヒドで固定化し、その後、PBSで二回洗浄し、X-gal溶液(5mM $K_3Fe(CN)_6$, 5mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 2mM $MgCl_2$, 200 μg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド(N-N-ジメチルホルムアミド中))で、20-24時間室温で反応させる。細胞中のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子産物の発現は、顕微鏡で、インジゴブルー色として検出できる。

【0272】

全組織内のβ-ガラクトシダーゼ活性染色

解剖後直後の、マウスに由来する全組織をPBSで洗浄し、1%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド、2mM $MgCl_2$ 、5mM EDTA、0.02% NP-40からなる溶液で固定化する。1時間後に、PBSで洗浄することによって、余分な固定剤を取り除き、PBS中の染色剤(5mM $K_3Fe(CN)_6$, 5mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 2mM $MgCl_2$, 0.02% NP-40, 1mg/ml X-gal[5-ブロモ-4-クロロ-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド;Promega, Madison Wisc, USA])と、暗黒下で一晩サンプルを反応させる。全ての手順は、室温で行う。サンプルを低パワー光の顕微鏡で調べ、全組織内の青色に染色した領域をスコア付けし、その代わりに確認のために、切片(1-2mm)を染色組織領域から切り取り、高倍率で観察することができる。

【0273】

レポーター遺伝子発現によりアッセイすることができる組織は、例えば、脾臓、肝臓、腎臓、脳、皮膚、心臓、脊髄、筋肉および耳下腺を含む。

【0274】

データは、組織化学的に観察される青色コロニー形成の相対的なレベル、すなわち、遺伝子運搬の程度を示すであろう。

【0275】

長期間維持した発現は、遺伝子治療の望まれる構成要素であるから、β-ガラクトシダーゼ遺伝子発現をモニターすることによって、組成培養中のこの特性を評価する試みが可能である。

【0276】

実施例10：本発明のウィルス粒子を用いた、in vivoで中枢神経系の細胞へと誘導する遺伝子

以下の実施例により、中枢神経系の細胞へと遺伝子を運搬するために、本発明のウィルス粒子を使用する方法を記載する。ウィルス粒子は、中枢神経系の細胞に特異的に結合することができるパッセンジャーペプチド結合部分を発現するウィルスパッケージング細胞に由来する。用いることができるペプチドの例は、この業界の当業者に知られており、例えば、AMPAおよびNMDA受容体に対する抗体(Pickard et al., 2000)またはアルファ(2A)-アドレノレセプター(Hurt, et al., 2000)である。

【0277】

6歳のメスのヌードマウス(nu/nu)に、前記した本発明のウィルス粒子を、首の後ろに皮下注入する。注入後1または6週間で、頸部脱臼により動物を殺し、主要な組織を凍結し、

10

20

30

40

50

-70℃で保存する。各組織の4分の1を生理的リン酸バッファー(PBS)で洗浄し、固定化液(PBS中の1%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド、2mM MgCl₂、5mM EDTA、0.02% Nonidet P-40)中で反応させ、洗浄し、室温で一晩、X-gal溶液(PBS中、3mM K₃Fe(CN)₆、3mM K₄Fe(CN)₆、1mM MgCl₂、0.05% 5-ブromo-4-クロロ-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)中で反応させる。青色生成物の沈積で検出される、酵素活性は、目視または低パワー顕微鏡で求まる。

【0278】

リポーター遺伝子発現のためのアッセイを行うことができる組織は、脾臓、肝臓、腎臓、脳、皮膚、耳下腺を含む。特に、骨髄組織および他の神経系の組織をアッセイすることができる。

10

【0279】

データは、組織化学的に観察される青色コロニー形成の相対的なレベル、すなわち、遺伝子運搬の程度を示すであろう。

【0280】

このような方法を用いて、ペプチド結合部分により付与されたウィルス粒子への特異性の程度を評価することができる。

【0281】

実施例 11：本発明において使用できる他のウィルス粒子

PINCOおよびpBabe MLVレトロウィルスに基づくレトロウィルスベクターを使用する前述の実施例に対して、この方法は、ただ単に本発明の例示を目的とし、本発明を制限することを意味しない。以下は、パッセンジャーペプチド結合部分を有するウィルス粒子を産生するための、本発明の方法に使用できる他のウィルスベクターの例である。

20

【0282】

LentiVectorは、Oxford BioMedicaによって製造されているベクターシステムに基づく、レンチウィルスである。このベクターは、HIVおよびEquine Infectious Anaemia Virus(EIAV)に基づく。

【0283】

pVPackは、Stratageneによって製造されているベクターシステムに基づく、MLVである。

【0284】

BD Biosciencesによって製造されているPantropic Retroviral Expression Systemは、水胞性口炎ウィルスに由来する外被糖タンパク質を使用する。

30

【0285】

再び、BD Biosciencesによって製造されているRetro-X systemは、MLVウィルスに由来する。

【0286】

他の例は、当業者の知識の範囲内であろう。

【0287】

実施例 12：哺乳類への本発明のウィルス粒子の投与

本発明の前記したウィルス粒子は、経口投与および非経口投与（例えば、皮下投与または筋肉投与）を含む任意の一般的な方法によって投与することができる。投与の好ましい方法は、ウィルス粒子はエアロゾルとして産生される、鼻孔吸入スプレー方法による。このような方法は、遺伝治療薬を肺上皮細胞へと効果的に伝達する方法として、嚢胞性繊維症の遺伝子治療において使用されている。治療は、治療期間にわたる一回の投与または複数回の投与からなる。

40

【0288】

医薬調合物

本発明のウィルス粒子を単独で投与することができるが、1つまたは複数の許容できる担体とともに、医薬調合物として与えることが好ましい。担体は、本発明のウィルス粒子と相性が良く、受容者に有害でないという意味で、「許容できる」必要がある。一般的に

50

、担体は、滅菌して発熱性物質を含まない水または生理食塩水である。

【0289】

以下の実施例により、ウィルス粒子が「活性成分」を構成する、本発明による医薬調合物を例示する。

【0290】

【表2】

実施例A：タブレット

活性成分	100mg	10
ラクトース	200mg	
スターチ	50mg	
ポリビニルピロリドン	5mg	
ステアリン酸マグネシウム	4mg	
	359mg	

【0291】

タブレットは、湿式造粒の後の圧縮によって、前記成分から調製される

【0292】

【表3】

20

実施例B：点眼剤

活性成分	0.5g
塩化ナトリウム、分析グレード	0.9g
チオマーサル	0.001g
精製水	100ml まで
pH 調整	7.5

【0293】

実施例C：タブレット調合物

30

以下の調合AおよびBを、ポビドン溶液とともに、成分の湿式造粒によって調製し、その後、ステアリン酸マグネシウムを加えて圧縮する。

【0294】

【表4】

調合A

	mg/タブレット	mg/タブレット	40
a) 活性成分	250	250	
b) ラクトース B.P.	210	26	
c) ポビドン B.P.	15	9	
d) デンプングリコール酸ナトリウム	20	12	
e) ステアリン酸マグネシウム	5	3	
	500	300	

【0295】

【表 5】

調合 B

	mg/タブレット	mg/タブレット	
a) 活性成分	250	250	
b) ラクトース	150	-	
c) Avicel PH 101®	60	26	
d) ポビドン B.P.	15	9	
e) デンプングリコール酸ナトリウム	20	12	
f) ステアリン酸マグネシウム	5	3	10
	500	300	

【0 2 9 6】

【表 6】

調合 C

	mg/タブレット	
活性成分	100	
ラクトース	200	
デンプン	50	20
ポビドン	5	
ステアリン酸マグネシウム	4	
	359	

【0 2 9 7】

以下の調合 D および E は、混合した成分を直接圧縮して調製される。調合 E で使用するラクトースは直接圧縮タイプである。

【0 2 9 8】

【表 7】

調合 D

	mg/カプセル	
活性成分	250	
Pregelatinised Strach NF15	150	
	400	

【0 2 9 9】

【表 8】

調合 E

	mg/カプセル	
活性成分	250	
ラクトース	150	
Avicel®	100	
	500	

【0 3 0 0】

調合 F（放出を制御した調合物）

当該調合物は、ポビドン溶液とともに成分（以下）の湿式造粒によって調製され、その後、ステアリン酸マグネシウムを添加し、圧縮する。

【0301】

【表9】

	mg/タブレット
活性成分	500
ヒドロキシプロピルメチルセルロース (Methocel K4M Premium) *	112
ラクトース B.P.	53
ポビドン B.P.	28
ステアリン酸マグネシウム	7
	700

10

【0302】

約6-8時間の期間にわたり薬剤は放出され、12時間後に完結する。

【0303】

実施例 D：カプセル調合物

調合 A

カプセル調合物は、前記実施例 C の調合 D の成分を混合し、2つの部分を有するハードゼラチンのカプセルに満たすことによって調製する。調合 B（以下）を同様に調製する。

【0304】

20

【表10】

調合 B

	mg/カプセル
活性成分	250
ラクトース B.P.	143
デンプングリコール酸ナトリウム	25
ステアリン酸マグネシウム	2
	420

30

【0305】

【表11】

調合 C

	mg/カプセル
活性成分	250
Macrogol 4000 BP	350
	600

【0306】

40

カプセルは、Macrogol 4000 BPを溶かし、溶解物中で活性成分を分散させ、溶解物を2つの部分を有するハードゼラチンのカプセルに満たすことによって調製する。

【0307】

【表 1 2】

調合D

	mg/カプセル
活性成分	250
レシチン	100
ラッカセイ油	100
	450

【0 3 0 8】

10

カプセルは、レシチンおよびラッカセイ油中で活性成分を分散し、分散液をソフトで、可塑性のあるゼラチンカプセルに満たすことによって調製する。

【0 3 0 9】

調合E（放出を制御した調合物）

以下の放出を制御したカプセル調合物は、エクストルーダーを用いて成分a、b、cを押し出し、その後、球形にし乾燥させて調製する。乾燥したペレットを、その後、放出制御膜(d)でコートし、2つの部分を有するハードゼラチンのカプセルに満たす。

【0 3 1 0】

【表 1 3】

	mg/カプセル
活性成分	250
微結晶性セルロース	125
ラクトース BP	125
エチルセルロース	13
	513

20

【0 3 1 1】

【表 1 4】

実施例E：注入組成物

30

活性成分 0.200g
滅菌済み、発熱物質フリーのリン酸バッファー(pH7.0) 10ml まで

【0 3 1 2】

活性成分を大部分のリン酸バッファー中で溶解し(35-40℃)、定容して、滅菌した10ml アンバーガラスバイアル（タイプ1）へと滅菌したマイクロポアフィルターを通し、滅菌した蓋でシールする。

【0 3 1 3】

【表 1 5】

40

実施例F：筋肉注入

活性成分 0.20g
ベンジルアルコール 0.10g
Glucofurol 75* 1.45g
注入のための水 3.00ml まで

【0 3 1 4】

活性成分をグリコフロールへと溶かす。ベンジルアルコールを、その後、加えて溶かし、水を3mlまで加える。混合液を、その後、滅菌したマイクロポアフィルターに通して、

50

滅菌した3mlのガラスバイアル（タイプ1）をシールする。

【0315】

【表16】

実施例G：シロップ懸濁液

活性成分	0.2500g
ソルビトール溶液	1.5000g
グリセロール	2.0000g
分散性セルロース	0.0750g
安息香酸ナトリウム	0.0050g
香料、ピーチ 17.42.3169	0.0125ml
精製水	5.0000ml まで

10

【0316】

安息香酸ナトリウムを精製水の一部に溶かし、ソルビトール溶液を加える。活性成分を加えて、分散させる。グリセロール中で、増粘剤（分散性セルロース）を分散させる。2つの分散液を混ぜ、精製水で必要な容積まで定容する。更なる増粘は、懸濁液の過度のせん断によって得る。

【0317】

【表17】

20

実施例H：座薬

	mg/座薬
活性成分 (63 μ m) ※	250
Hard Fat, BP (Witepsol H15-Dynamit Nobel)	1770

2020

※活性成分は、少なくとも 90%の粒子が直径 63 μ m 未満である粉末として使用する。

30

【0318】

1/5のWitepsol H15を、最大でも45℃でジャケット付き蒸気鍋中で溶かす。活性成分を200 μ mのふるいでふるい分けし、滑らかな分散液が得られるまで、カッティングヘッドを有するシルバーソンミキサーを用いて混ぜながら前記溶解物を加える。最大でも45℃に保ったまま、残りのWitepsol H15を分散液に加えて、均一な混合液が得られるまで攪拌する。攪拌しながら、分散液を250 μ mのステンレス製の網を通して、40℃まで冷やす。38℃から40℃で、2.02gの混合物に適したプラスチックの鋳型へと満たす。座薬は室温にまで冷却する。

40

【0319】

【表 18】

実施例H：座薬

	mg/ペッサリー
活性成分	250
無水デキストロース	380
ポテトデンプン	363
ステアリン酸マグネシウム	7
	1000

10

【0320】

前記成分を直接混合し、得られた混合物を直接圧縮することによってペッサリーを調製した。

【0321】

実施例J：クリームおよび軟膏

(Remington: The Science and Practise of Pharmacy, 19th ed., The Philadelphia College of Pharmacy and Science, ISBN 0-912734-04-3を参照せよ)

【0322】

実施例K：ミクロスフィア調合物

20

Cleland (1997), Pharm. Biotechnol. 10:1-43, Lee (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 11:81-84, Cleland et al. (2001) J. Control. Release 72:13-24およびTakeuchi et al. (2001) Adv. Drug. Delic. Rev. 47:39-54に記載されたもののような、ミクロスフィア調合物用いても、本発明のウィルス粒子を伝達することができる。

【0323】

実施例L：乾燥パウダー吸入

本発明のウィルス粒子は、Ansel (1999) Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Lippincott Williams and Wilkinsに記載されているように、微粉化した粒子を伝達する乾燥粉末用定量吸入器により、吸入によって伝達することができる。

【0324】

30

実施例M：噴霧吸入

本発明のウィルス粒子は、Ansel (1999) Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Lippincott Williams and Wilkinsに記載されているように、非CFC高压ガスを使用した、微粉化した粒子を伝達する適した定量吸入器により、吸入によって伝達することができる。

【0325】

前記調合物は、便利なことに、投与量形態で存在することができ、製薬業界で良く知られた任意の方法により調製することができる。このような方法は、1つまたは複数の補助的な成分からなる担体と、活性成分（本発明のウィルス粒子）を組み合わせる工程を含む。一般的に、調合物は、液体の担体または分割できる固体の担体またはそれら両方と活性成分を一様に十分に組み合わせることによって調製され、その後、必要であれば、製品を成形する。

40

【0326】

経口投与に適した本発明による調合物は、カプセル、カセットまたはタブレットのような別々の単位として与えることができ、それぞれは、活性成分を圧倒的な量で含む；粉末または顆粒として与えることができ；水溶性の液体または非水溶性の液体中の懸濁液または溶液として与えることができ；または、水中油型液体エマルジョンまたは油中水型液体エマルジョンとして与えることができる。活性成分は、丸薬、舐剤またはペーストとしても与えることができる。

【0327】

50

任意に1つまたは複数の補助的な成分とともに、圧縮または型に入れて製造することによって、タブレットを調製することができる。圧縮して製造するタブレットは、適した機械において、任意にバインダー（例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性な希釈剤、防腐剤、錠剤分割物質（例えば、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋ポビドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、表面活性剤または分散剤と混合した、流れない形態の活性成分（例えば、粉末または顆粒）を圧縮することによって調製することができる。型に入れて製造するタブレットは、適した機械において、不活性液体希釈剤で湿らした粉末状化合物の混合物を型に入れることによって調製することができる。タブレットは、任意にコーティングまたは刻み目をつけることができ、望ましい放出特性を付与するために、例えば様々な割合でヒドロキシプロピルメチルセルロースを使用して、活性成分をゆっくりとまたは制御して放出するように調合することができる。

10

【0328】

口への局所的な適用に適した調合物は、風味のついたベース（通常スクロースおよびアカシアまたはトラガカント）で活性成分を含む薬用ドロップ；ゼラチンおよびグリシンまたはスクロースおよびアカシアのような不活性なベースで活性成分を含む錠剤；適した液体担体で活性成分を含むマウスウォッシュを含む。

【0329】

非経口投与に適した調合物は、抗酸化剤、バッファー、静菌剤および溶液（調合剤に対象とするレシピエントの血液との等張性をもたせる）を含む水溶性および非水溶性の滅菌注入溶液；並びに、懸濁剤および増粘剤を含むことができる水溶性および非水溶性の滅菌懸濁液を含む。調合物は、一回の投与量または複数の投与量の容器（例えば、シールしたアンプルおよびバイアル）で調製することができ、使用前に直接滅菌した液体担体（例えば注入のための水）を加えることのみが必要なフリーズドライ（凍結乾燥）した条件で保存することができる。

20

【0330】

即座に注入できる溶液および懸濁液は、前記の様々な滅菌した粉末、顆粒およびタブレットから調製できる。

【0331】

好ましい一回の投与量を有する調合物は、活性成分を一日の投与量または一回分、一日のサブ投与量または適切なその一部を含む調合物である。

30

【0332】

前記に特に示した成分に加えて、本発明の調合物は、対象とする調合物のタイプに関連してこの業界の一般的な他の剤（その例としては、経口投与に適した剤には風味付与剤を含む）を含むことができることは理解されるであろう。

[参考文献]

References.

Ager *et al.*, (1996) *Hum Gene Ther* 7, 2157 – 2164

Bagnis *et al.*, (1994) *Hum Gene Ther* 5, 1325 – 1333

Beradi *et al* (1995) *Science* 267:104-108

10

Bodem *et al* (1997) *Stem Cells* 15 Supp 1, 141 – 147

Cadd *et al.*, (1997) *Bioessays* 19, 993 – 1000

Cosman *et al.*, (1988) *Behring Inst Mitt* 149 – 157

20

Cosset and Russell (1996) *Gene Therapy* 3, 946 – 956

Cosset *et al.*, (1995) *J Virol* 69, 6314 – 6322

Cosset *et al* (1995) *J Virol* 69, 7430-7436.

Dimmock and Primrose, (1987) *Introduction to Modern Virology* Blackwell
Scientific Publications, ISBN 0 – 632 – 01597 – 7

30

Etienne – Juan *et al.*, (1992) *J Gen Virol* 73, 3251 – 3255

Garoff *et al.*, (1998) *Mirobiol Mol Biol Rev* 62, 1171 – 1190

Goud *et al.*, (1998) *Virology* 163, 251 – 254

40

Griffiths and Rottier, (1992) *Semin Cell Biol* 3, 367 – 381

Grignangi *et al* (1998) *Cancer Res* 58, 14 – 19

Hamel and Westphal, (1997) *J Neuro – Oncology* 35, 327 – 333

Han *et al.*, (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9747 – 9751

Hatzioannou *et al.*, (1998) *J Virol* 72, 5313 – 5317

10

Hatzioannou *et al.*, (1999) *Hum Gene Ther* 10, 1533 – 1544

Hurt *et al.*, (2000) *J Biol Chem* 275, 35424 – 35431

Kasahara *et al.*, (1994) *Science* 266, 1373 – 1376

20

Kinsella and Nolan (1996) *Hum Gene Ther* 7, 1405 – 1413

Kitamura *et al.*, (1989) *Cell Physiol* 140, 323 – 334

Lee *et al.*, (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 280, 675 – 683

30

Lee *et al.*, (2002) *Science*, 297(5587):1689-92.

Lyman *et al.*, (1995) *Oncogene*, 10, 149 – 157

Marin *et al.*, (1996) *J Virol* 70, 2957 – 2962

Matano *et al.*, (1995) *J Gen Virol* 76, 3165 – 3169

40

Miyazawa *et al.*, (1995) *Blood* 85, 641 – 649

- Morgenstern and Land, (1990) *Nucleic Acid Res* 18, 3587 – 3596
- Neda *et al.*, (1991) *J Biol Chem* 226, 14143 – 14149
- Pickard *et al.*, (2000) *J Neurosci* 20, 7922 – 7931
- Roux *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9079 – 9083 10
- Russell *et al.*, (1993) *Nucl Acid Res* 21, 1081 – 1085
- Russell *et al.*, (1993) *Nucleic Acid Res* 21, 1081 – 1085
- Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2001. 3rd edition Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 20
- Schnierle *et al.*, (1996) *Gene Therapy* 3, 334 – 342
- Sehgal *et al* (1999) *Gene Ther* 6, 1084 – 1091 30
- Seigneurin *et al.*, (1987) *Exp Hematol* 15, 822 – 832
- Sellar *et al.*, (2003) *Nat Genet.* 34(3):337-43
- Somia *et al.*, (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7570 – 7574
- Strauss *et al.*, (1995) *Trends Microbiol* 3, 346 – 350 40
- Thalmeier *et al.*, (1994) *Blood* 83, 1799 – 1807

Valsesia – Wittmann *et al.*, (1994) *J Virol* 68, 4609 – 4619

Valsesia – Wittmann *et al.*, (1996) *J Virol* 70 2059 – 2064

【図面の簡単な説明】

【0333】

【図1】図1は、レトロウィルス粒子の表面上で生物学的に活性な増殖因子を発現させるための手法を示した図である。使用するベクターおよび方法は、詳細な説明で更に記載する。

10

【図2】図2は、幹細胞増殖因子（SCF）のcDNAの概略図である。SCF cDNAを増幅するのに用いられるフォワードプライマー（SCF MF）およびリバースプライマー（SCF MR）の位置を示す。プライマー配列は発明の詳細な説明で記載する。

【図3】図3は、SCFプライマーで増殖させたL88.5 RNAから得られたRT-PCR産物のアガロースゲル電気泳動の図である。L88.5は、可溶性および膜結合型の幹細胞増殖因子（SCF）を発現するヒトの細胞ラインである。レーン1-100bp分子量マーカー；レーン2-SCF MFおよびMRプライマーを用いたL88.5細胞から抽出したRNAのRT-PCRサンプル。3つの異なるバンド、可溶性アイソフォームをコードする全長のSCFを表す913bpのフラグメント；膜結合SCF（mb-SCF）をコードする829bpフラグメントおよび700bpと800bpの間の同定できないフラグメント（PCR人工産物または可能性あるSCFの他のスプライシングバリエーション）が観察された。829bp(mb-SCF)フラグメントをPCRクローニングベクターへとクローニングした。レーン3-GAPDH特異的プライマーを用いて350bpのGAPDH遺伝子産物を増幅した、L88.5のcDNAに由来するコントロールPCR反応液；レーン4-鋳型として逆転写酵素がない逆転写させたcDNAに由来するRT-PCR産物。

20

【図4】図4は、人工的に加工したパッケージング細胞内のリコンビナントプラスミドのPCR検出の図である。リン酸カルシウム沈殿により、リコンビナントプラスミド、pRep8mb-SCFを、Phoenixエコトロピック細胞ラインへと形質移入した。得られた安定したクローンを増殖させ、細胞が90% コンフルエントになったとき、トリプシン処理した。2μlのこれらの細胞を含む細胞懸濁液（クローン3由来）を、プラスミドの存在を検出するために、PrepFおよびEBVRプライマーを用いてPCR分析に供した。レーン1-100bp分子量マーカー；レーン2-形質移入していないエコトロピック性のパッケージング細胞；レーン3-2μlのpRep8mbで形質移入した、Phoenixエコトロピック細胞懸濁液；レーン4-PCRの鋳型としてのpRep8mb-SCFコントロールDNA；レーン5-鋳型DNAとして水を含むネガティブコントロール。予想される増幅産物である1164bpが、レーン3および4で観察された。

30

【図5】図5は、pRep8mb-SCFで形質移入したPhoenixエコトロピック細胞ラインの免疫蛍光アッセイの図である。上パネル-形質移入細胞をガラスカバースリップ上で増殖させて、メタノールで固定化した。カバースリップを抗SCF抗体と反応させ、PBSで二回洗浄し、蛍光標識二次抗体で染色した。カバースリップをガラススライドにマウントし、UV顕微鏡（mag 400X）で観察した。当該図により、染色された表面が示された。下パネル-ネガティブコントロールの形質移入していない細胞。これらの細胞は、蛍光を発しなかった。ネガティブイメージ（細胞）を得るのに必要な照射時間は、顕著に増加させなければならなかった。

40

【図6】図6は、レトロウィルスパッケージング細胞のフローサイトメトリー解析の結果である。パネルA-非改変のエコトロピック性のレトロウィルスパッケージング細胞。パネルB-mb-SCFタンパク質を高レベルで発現するクローン3パッケージング細胞。パネルC-CD59を発現するレトロウィルスパッケージング細胞。

【図7】図7は、レトロウィルスのタイターを比較した図である。NIH3T3細胞で、3回の実験からレトロウィルスタイターを求めた。Mb-SCF改変パッケージング細胞は、わずかなが、統計的に有意にタイターが減少することが示された（paired t test, p=0.5）。

50

【図8】図8は、レトロウイルス粒子のウェスタンブロット分析の結果である。上パネルー外被タンパク質のSU部分を発現するレトロウイルス粒子。真中パネルーmb-SCFを発現するレトロウイルス粒子。下パネルーパッケージング細胞上で、天然に存在するタンパク質である、CD59を発現するレトロウイルス粒子。レーンは、レーン1ー安定mb-SCF産生エコトロピック細胞から得られるレトロウイルス粒子；レーン2ー非改変のエコトロピックレトロウイルス粒子；レーン3ーmb-SCFエコトロピックパッケージング細胞から一過的に得られるレトロウイルス粒子。

【図9】図9は、レトロウイルス結合アッセイの結果である。レトロウイルスを標的細胞と培養し、ウイルスが結合した細胞を抗-レトロウイルス外被モノクローナル抗体で染色した。パネルB-Dは、パネルAのコントロールスペクトル（グレー）上で重ね合わせたウィルス結合データ（緑）を示す。パネルGおよびHは、コントロール（グレー）上で重ね合わせたより濃い黒として、結合データを示す。A)Mo7e細胞単独；B)Mo7e+アンホトロピックウィルス；C)Mo7e+エコトロピックウィルス；D)Mo7e+SCF-エコトロピックウィルス；パネルEおよびF。100ng/mlのSCFで一晩反応させる前の、アイソタイプコントロール（グレー）と比較したc-kitに対する抗体を用いたMo7e細胞の染色（黒）。G) パネルF+エコトロピックウィルスに由来するMo7e細胞；H) パネルF+Mo7e+SCF-エコトロピックウィルスに由来するMo7e細胞。

10

【図10A】図10Aは、表面SCFを組み込んだレトロウイルス粒子を使用した増殖アッセイの結果である。

【図10B】図10Bは、表面SCFを組み込んだレトロウイルス粒子を使用した増殖アッセイの結果である。

20

【図11】図11は、ヒトkitポジティブMo7e細胞に対するSCF-改変エコトロピックレトロウイルスの形質転換効率の結果である。

【図12】図12は、ヒトkitポジティブTF-1細胞に対するSCF-改変エコトロピックレトロウイルスの形質転換効率の結果である。

【図13】図13は、ヒトkitポジティブLAMA細胞に対するSCF-改変エコトロピックレトロウイルスの形質転換効率の結果である。

【図14】図14は、ヒトkitポジティブU937細胞に対するSCF-改変エコトロピックレトロウイルスの形質転換効率の結果である。

【図15】図15は、ヒトの一次造血前駆細胞に対するSCF-改変エコトロピックウィルスの相対的な形質転換効率の結果である。

30

【図16】図16は、マウスの骨髄細胞に対するSCF-改変エコトロピックウィルスの相対的な形質転換効率の結果である。

【図17】図17は、ヒトの骨髄に由来するCFU-GMの相対的な形質転換効率の結果である。

【図18】図18は、様々なエンベロープウィルスの出芽する場所を示した概略図である。

【図 1】

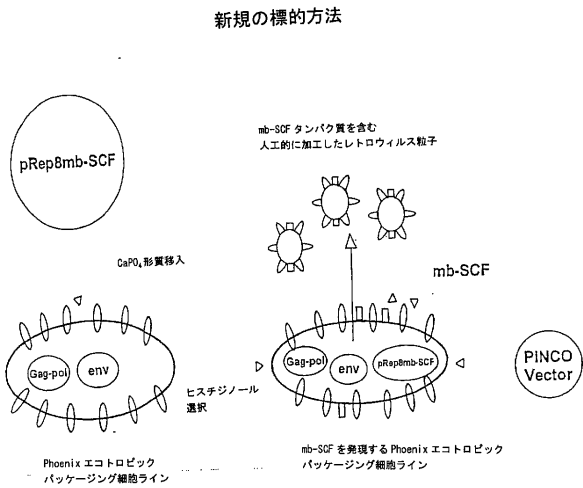


Fig. 1

【図 2】

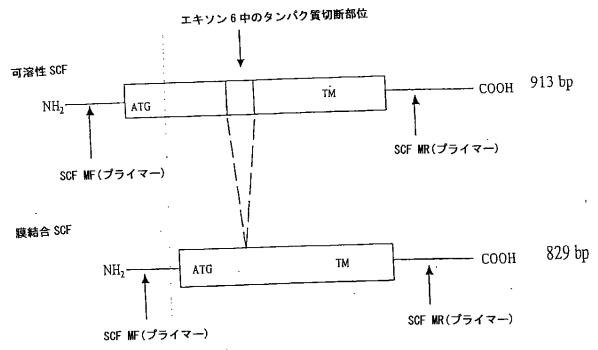


Fig. 2

【図 3】

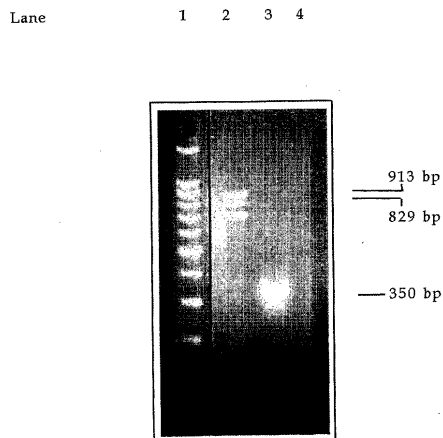


Fig. 3

【図 4】

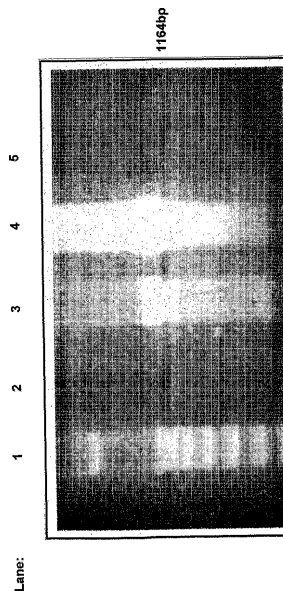
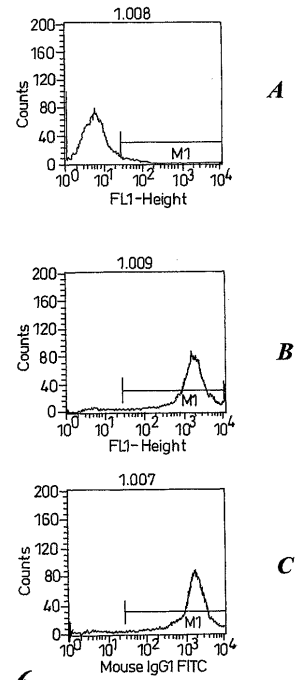


Fig. 4

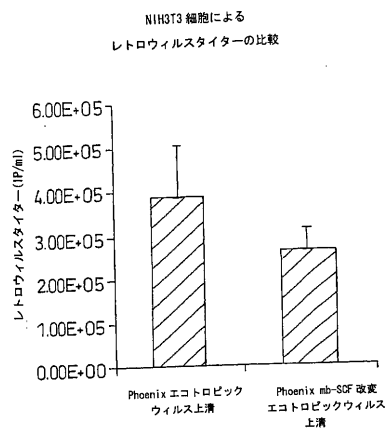
【図 5】

*Fig. 5*

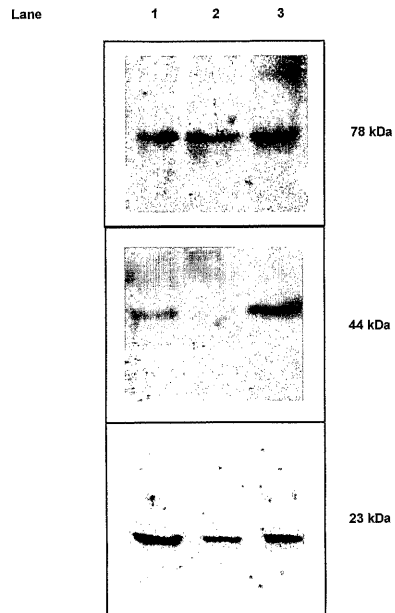
【図 6】

*Fig. 6*

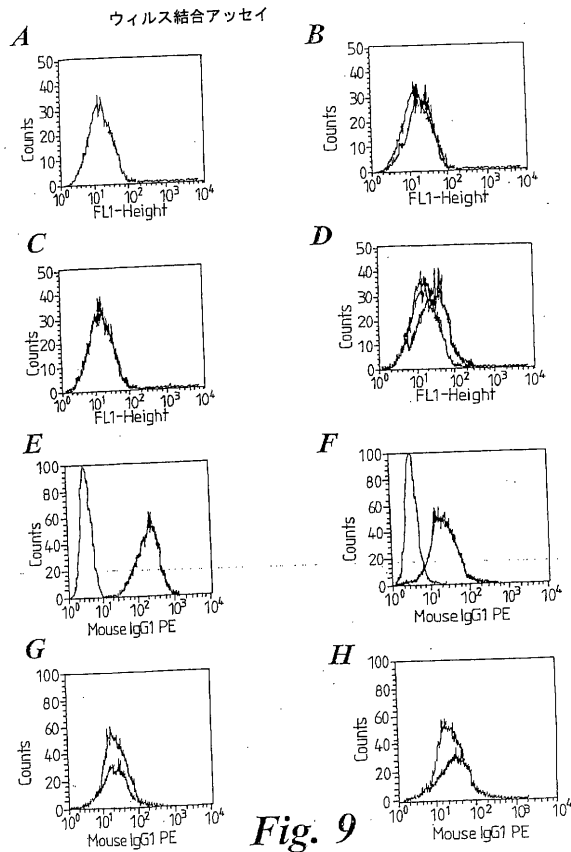
【図 7】

*Fig. 7*

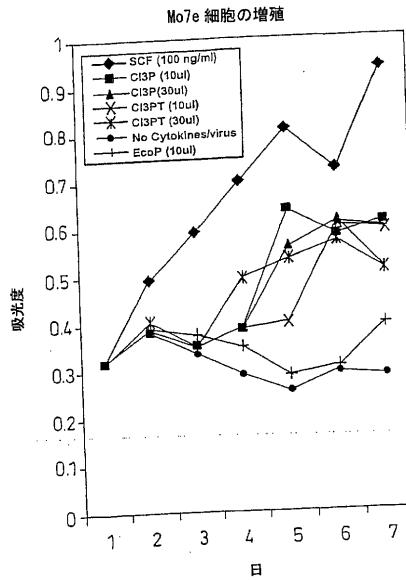
【図 8】

*Fig. 8*

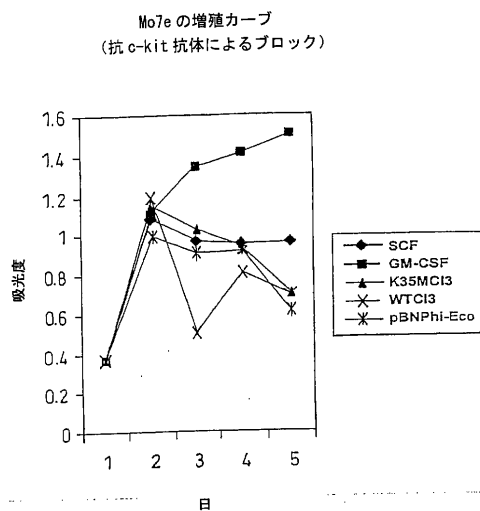
【図 9】



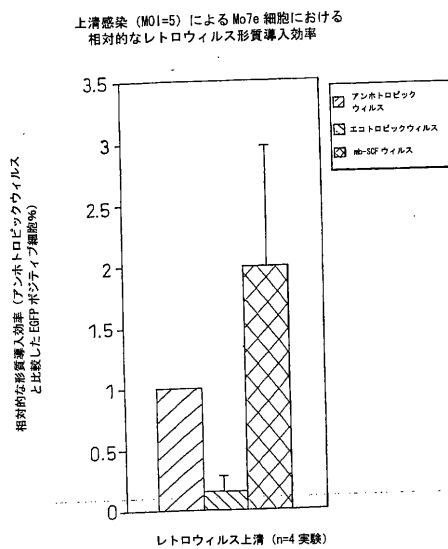
【図 10 A】



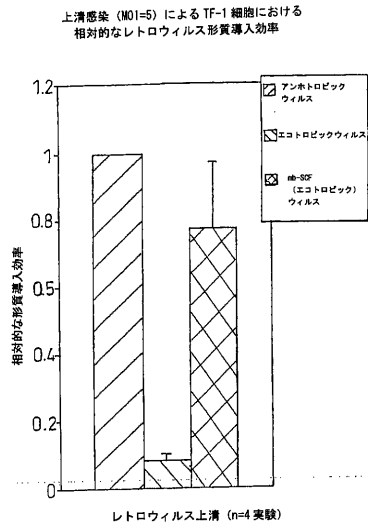
【図 10 B】



【図 11】



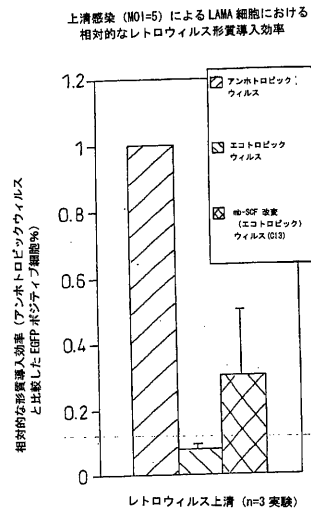
【図 12】



>95% kit+

Fig. 12

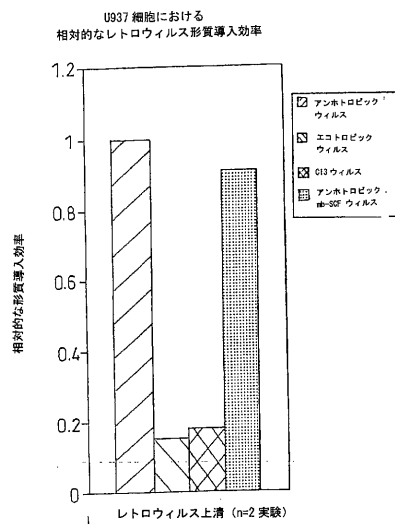
【図 13】



~50% kit+

Fig. 13

【図 14】



>99% kit -ve

Fig. 14

【図 15】

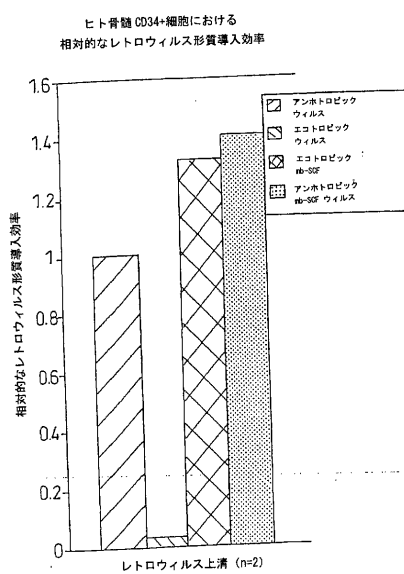


Fig. 15

【図 16】

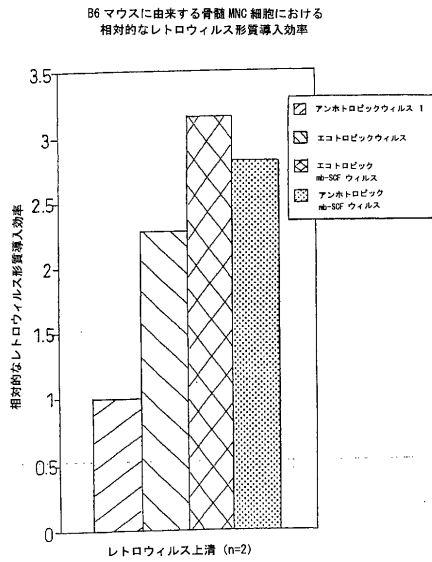


Fig. 16

【図 17】

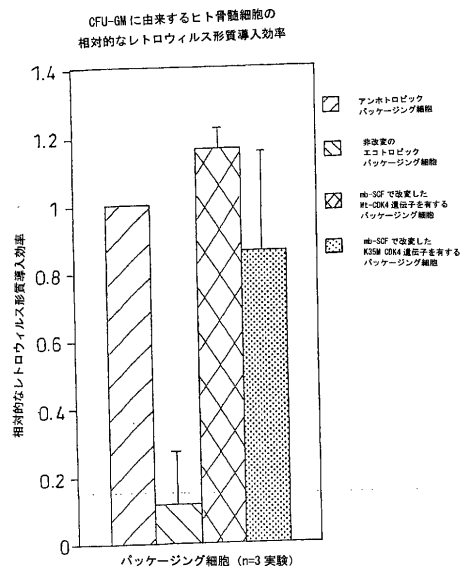


Fig. 17

【図 18】

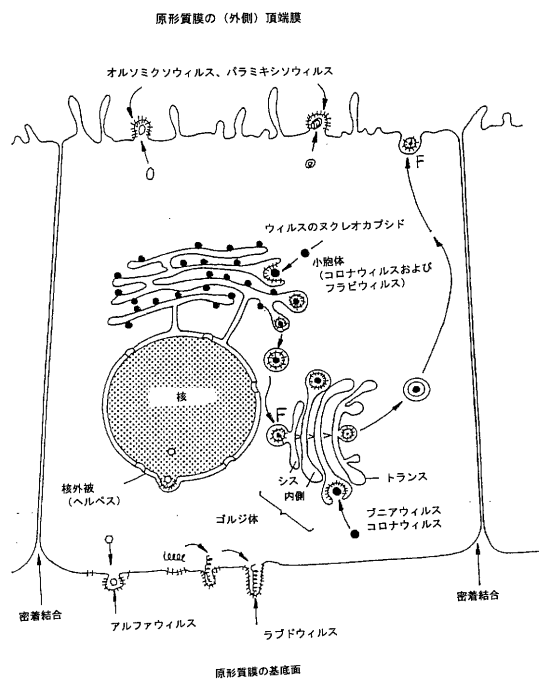


Fig. 18

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 コリン・マーライス・カシミア

イギリス・ロンドン・N 2 ・ 9 P T ・ イースト・フィンチレイ・パーク・ホール・ロード・ 3

審査官 中野 あい

(56)参考文献 国際公開第 9 7 / 0 1 2 0 4 9 (WO, A 1)

BITTNER ALEXANDRA, JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, 2 0 0 2 年 6 月, V104 N1, P83-92

JIANG AN, JOURNAL OF VIROLOGY, 1 9 9 8 年 1 2 月, V72 N12, P10148-10156

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 7/00-7/08

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed