

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500809  
(P2004-500809A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**C12N 15/09**  
**A61K 35/26**  
**A61K 35/36**  
**A61K 38/00**  
**A61K 38/22**

F 1

C 12 N 15/00  
A 61 K 35/26  
A 61 K 35/36  
A 61 K 39/00  
A 61 K 48/00

Z N A A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 3  
4 B 0 6 5  
4 C 0 8 4  
4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-544325 (P2001-544325)	(71) 出願人	500065406 アンチキャンサー, インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成12年12月11日 (2000.12.11)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921 11, サン デイエゴ, オストロー ストリート 7917
(85) 翻訳文提出日	平成14年4月17日 (2002.4.17)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(86) 國際出願番号	PCT/US2000/033645	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 國際公開番号	W02001/042449	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 國際公開日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		
(31) 優先権主張番号	60/170,166		
(32) 優先日	平成11年12月10日 (1999.12.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, JP, KR		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物被験体に遺伝子を導入するための方法

## (57) 【要約】

組織培養物において細胞の遺伝的改变物を入手するための方法が記載されている。改变は、組織培養物を望ましい遺伝子用の送達ビヒクルと接触させる前にその組織培養物をコラゲナーゼで処理することにより補助される。毛包及び他の組織をこの方法で改变し、その後で無傷のレシピエントに移植することができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

哺乳動物被験体に核酸分子を導入する方法であって、前記核酸分子を含むようにイクスピボで改変された少なくとも一個の毛包を前記被験者の皮膚に移植する工程を含む方法。

**【請求項 2】**

前記毛包が、組織培養物中でイクスピボで改変されている請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

前記組織培養物が、前記毛包を改変する前にコラゲナーゼを用いて処理されている請求項 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

前記毛包が成長中である請求項 1 記載の方法。

**【請求項 5】**

前記包が、前記核酸を用いて形質導入することによって、またはリポフェクションによって前記核酸分子を含むように改変された請求項 1 記載の方法。

**【請求項 6】**

前記包が、ウイルスベクターを用いて処理することによって前記核酸分子を含むように改変された請求項 1 記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ウイルスベクターがウイルスパッケージング細胞の上清を含み、及び／または前記ウイルスベクターがレトロウイルスベクターを含み、及び／または前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターを含む請求項 6 記載の方法。 20

**【請求項 8】**

前記哺乳動物がマウスまたはヒトである請求項 1 記載の方法。

**【請求項 9】**

前記核酸が免疫原をコードするか、または前記核酸がホルモンをコードするか、または前記核酸が毛髪の成長もしくは質に影響を与える産生物をコードする請求項 1 記載の方法。

**【請求項 10】**

異種の核酸分子を含むように改変された成長期にある組織培養中の毛包。

**【請求項 11】**

哺乳動物被験者に核酸分子を導入する方法であって、前記核酸分子を含むようにイクスピボで改変された組織培養された無傷の組織を前記哺乳動物の対応する組織に移植することを含む方法。 30

**【請求項 12】**

前記組織培養物が、その組織を前記核酸を用いて改変する前にコラゲナーゼで処理される請求項 11 記載の方法。

**【請求項 13】**

核酸を用いる前記改変がリポソーム組成物を用いて前記組織を処理することを含むか、または前記改変が前記核酸を用いて前記組織の細胞を形質導入することを含むか、または前記改変がウイルスベクターを用いて前記組織を処理することを含む請求項 11 記載の方法。 40

**【請求項 14】**

前記無傷の組織が皮膚であるか、または前記組織がリンパ組織である請求項 11 記載の方法。

**【請求項 15】**

毛包に核酸を供給する方法であって、組織培養物中に前記毛包を維持させ、前記組織培養物を核酸を用いて処理することを含む方法。

**【請求項 16】**

核酸を用いる前記処理の前に、コラゲナーゼで前記組織培養物を処理する工程が行われる請求項 15 記載の方法。

**【請求項 17】**

10

30

40

50

無傷の組織に核酸を送達する方法であって、前記核酸を用いて前記無傷の組織の組織培養物を処理することを含む方法。

【請求項 1 8】

核酸を用いる前記処理の前に、コラゲナーゼで前記組織培養物を処理する工程が行われる請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記核酸が皮膚またはリンパである請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

異種の核酸を含むように改変された組織培養物。

【請求項 2 1】

皮膚またはリンパ節の無傷の断片である請求項 2 0 記載の組織培養物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

関連出願との相互参照

この出願は、その内容が参照文献としてこの明細書に組み入れられる 1999 年 12 月 10 日に提出された仮出願第 60 / 170 , 166 号から 35U.S.C. § 199 (e) に基づく優先権を主張する。

【0 0 0 2】

技術分野

本発明は、異種遺伝子を含むように哺乳動物被験体を改変することに関する。更に特定すると本発明は、毛包を含む組織培養された組織をイクスピボ (ex vivo) で処理し、レシピエントに組織または毛包を再移植することを含む。

【0 0 0 3】

背景技術

ヒトを含む哺乳動物被験体を遺伝的に補足するという体細胞性改変は、さまざまな技術を用いて試みられてきた。例えば、所望の遺伝子を含むアデノウイルスベクターは、組織及び器官をインサイチューで直接的に感染させるために用いることができる。より一般的には、おそらく、細胞培養物または細胞の上清がイクスピボで改変され、その後で血流を介して無傷の被験体に戻される。例えば、マウスのチロシナーゼ遺伝子中のアルビノ点突然変異を修正するように設計された RNA - DNA オリゴヌクレオチド (RDO) は、培養されたアルビノメラニン細胞においてこの状態を修正することができた (Alexeed, D. ら、Nature Biotechnol (1998) 16: 1343 - 1346)。この研究は、同じグループによって報告されているように、リポソームに入れて RDO を供給することによって、または皮内注入することによって同じ欠陥のインビボでの修正に拡張された (Alexeed, D. らの Nature Biotechnol (1999) 16: 1343 - 1346)。早期の研究は、リポソーム - トラップ 1 acZ を用いた毛包の選択的遺伝子治療について記載していた (Li, L. ら、Nature Med (1995) 1: 705 - 706)。リポソーム組成物の好ましいレシピエントは、成長期にある内因性の毛包であった (Domashenko, A. ら、J. Invest Dermatol (1999) 112: 552)。

【0 0 0 4】

このように、培養物中で個別に毛包細胞を改変すること、およびインビボで無傷の毛包を改変することが可能となっている。また、ラメラ状魚鱗癬を持っている患者から得られた培養された突然変異性皮膚ケラチン細胞をインビトロで遺伝的に安全に改変し、続いて正常の表皮が得られるようにヌードマウスに移植するとよいこともわかっている (Chouate, K. A. ら、Nature Med (1996) 2: 1263 - 1267)。同様に、インビトロで個々に培養したケラチン細胞を遺伝的に改変し、その後でヌードマウスに移植することによって再 - 形成組織が得られるようにしてよい (Deng, H. ら、Nature Biotechnol (1997) 15: 1388 - 1391)。毛包が、別の個体の頭皮から採取される毛包皮膚鞘細胞から形成できることもわかつた

10

20

30

40

50

(Reynolds, J.ら、Nature (1999) 402: 33-34)。

【0005】

要約すると、個々の細胞を遺伝的に改変してから無傷の生物に移植できること、また移植が行われた場合に個々の細胞が適当な条件下で構造化組織を形成できることが判明した。

【0006】

ヒトの皮膚に遺伝子を、即ち一般的にはDNAを直接的に適用すると、コードされた抗原に関して免疫化された期間は少なくとも効果的であることがわかっている。このことは、Tang, D-CらのNature (1997) 388: 729-730、Yu, W-HらのJ. Invest Dermatol (1999) 112: 370-375、Falo, L. D. Jr. のProc Assoc Am Physicians (1989) 111: 211-219、Shi, Z. らのVaccine (1999) 17: 2136-2141、及びTutting. P. らのJ. Invest Dermatol (1998) 111: 183-188といった、多くのグループによって報告されている。Fan, H. らのNature Biotechnol (1999) 17: 870-872はさらに、B型肝炎表面抗原に対する応答を誘導するために、毛包を含む正常の皮膚に適用する場合にはこの抗原をコードする遺伝子が効果的であることを示した。しかしながら毛包がなくなっている皮膚は、ワクチン接種に対する適当な標的ではなかった。

【0007】

本発明の開示

20

本発明は、毛包を含む組織などの組織培養された組織がイクスピボで遺伝子的にうまく改変され、続いて無傷の哺乳動物被験体に首尾よく移植できるという発見に属している。その改変の首尾は、遺伝子的に改変する前にコラゲナーゼを用いて組織培養された組織を処理することによって良くなる。

【0008】

このように一態様における本発明は、組織に核酸を送達する方法であり、その方法は、前記組織の組織培養物を前記核酸で処理する工程を含んでおり、任意でその工程の前にはコラゲナーゼで前記の組織を処理する工程が行われる。好適な組織は毛包を含む組織である。

【0009】

30

別の態様での本発明は、哺乳動物被験体に核酸分子を導入するための方法であり、その核酸分子を含有するようにイクスピボで改変された少なくとも一個の毛包を前記被験体の皮膚に移植し、またはその核酸分子を含むようにイクスピボで改変された組織培養中の組織をその被験体の対応する組織に移植する工程が含まれる。どちらの場合でも、望ましい核酸を用いて改変する工程の前に組織培養物がコラゲナーゼを用いて処理される。

【0010】

さらに別の態様における本発明は、異種の核酸を含むように改変された組織培養された組織に向けられる。

【0011】

40

発明の実施の形態

遺伝的改変のための基質として組織培養された組織を用いると、直接的にインピボで適用した場合を越えるいくつかの利点、また、引き続いてインピボで移植するために個別に培養された細胞をイクスピボで改変した場合を越えるいくつかの利点がある。この組織は三次元の保全性を維持しており、したがってレシピエントに移植された場合にはより容易に再構成される。組織をイクスピボで操作することによって遺伝的改変のレベルを調節でき、被験体の侵襲性の処理を行う前に結果が評価できる。異種の核酸を受け入れる組織の能力を高めるためにコラゲナーゼを用いてその培養組織を処理することは有利であるが、その処理は三次元配列の保全性を完全に破壊するほど苛酷ではない。

【0012】

三次元の組織培養物は、皮膚、特に毛包を含む皮膚、リンパ組織、または腫瘍組織といっ

50

た任意の組織から集めることができる。組織の選択は、計画した処理の特徴に依存する。組織培養物は、無傷の断片として与えられる組織サンプルの構造を維持している。「無傷の」とは、その組織の三次元構造が、異種の核酸を含むように細胞を改変する前と後のどちらにおいてもその組織培養物に保存されていることを意味する。下記のように組織培養物は、適当な核酸 - 含有ベクターまたはその核酸を含む配合物を提供する前に、コラゲナーゼを用いて処理できる。しかしながらコラゲナーゼを用いた処理は、構造の必須の要素を保存できるように充分に緩和でなくてはならない。したがって「無傷の」組織、または「無傷の」断片とは、本発明の方法に従いコラゲナーゼを用いて処理を行う前と後の双方における、ドナーである被験体から入手した組織の断片を意味する。

#### 【0013】

10 例え毛包は、毛髪の成長または質に影響を与えることを意図する遺伝子の有用な受容体であり、それだけでなく免疫原や、採用した生物体に全体として有用でありうる他の産物を産生する能力もある。したがって毛包を形質転換することは、生物体全体に向けられる遺伝子治療の中間工程として容易に利用できる。例えば必要な抗原を産生するために毛包を改変する工程を経た免疫化では、毛包を含む皮膚のみが、抗原に対する免疫応答を誘導できるDNAを受け入れることができ、これに対して毛包が全くない皮膚ではそれが起こる可能性がないという上記で報告された観察結果と一致している。

#### 【0014】

こうして毛包または毛包を含む皮膚は、治療すべき被験体の重要でない領域から採取され、インビトロで培養される。好ましくは毛包を含む皮膚は、組織培養する。それからその組織培養された皮膚は、異種の核酸を取り込む毛包の能力を高めるのに充分な量と時間でコラゲナーゼを用いて処理されるが、ただしその処理は、結果的に組織培養物の壊変が生じないように調節される。続いて培養物中、または組織培養物中の無傷の毛包は、目的の核酸を送達できる適当なベクターを用いて処理される。このようなベクターには、アデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターのようなウイルスベクター、またはパッケージング細胞由来の上澄が含まれる。

#### 【0015】

概して言うと一態様において本発明は、遺伝子発現ベクターのため、またはむき出しのままのDNAのための送達システムとして毛包を利用することに関する。本発明を実施するためには、毛包を採取して処理を行う適当な方法を用いるべきである。即ちさまざまな手段が毛包を改変するために利用可能であり、その毛包はその後レシピエントに再移植できる。

#### 【0016】

毛包を採取するためには、好ましくはその包を含む皮膚が小さな片として適当なドナーから採取される。包が既に成長期にある場合には、それらは直接組織培養できる。しかし提供者が成長期ではない毛包を有しているのであれば、例えばワックス法を用いて皮膚を脱毛し、その後成長が確立されたら適当な時点で毛包を含有する皮膚片を採取することによって、再同調させることが可能である。一般にこれは、マウスの被験体では3-10日後、より好ましくは5-7日後、そして最も好ましくは6日後であり、他の哺乳動物被験体では成長性が再び確立されるための期間はさまざまである。最適の待機期間はたやすく決定できる。その後、成長期にある毛包を含む皮膚は、一般的にはコラーゲンをベースとする三次元マトリックスに埋め込まれる。その組織培養物がコラゲナーゼまたは感染もしくは形質導入を促す他の適当な溶菌酵素を用いて処理されると、続いて行われる所望の異種遺伝子を用いた改変が改良されることが本発明者らによって見出されている。

#### 【0017】

コラゲナーゼを用いた処理は、続いて行われる遺伝的改変を高めるのに十分であるが、組織培養物の保全性を破壊するほど過酷でないべきである。コラゲナーゼによる分解の程度は、コラゲナーゼの濃度、インキュベーションの温度、及びインキュベーションの時間を調節することによって調整できる。これらは相互依存するファクターであり、最適レベルは経験的により容易に決定できる。一般に適する条件は、約2mg/mlのコラゲナーゼ

10

20

30

40

50

溶液、37で1-2時間である。

【0018】

支持マトリックスを「開放」した後、その組織培養物は遺伝子の改変を受け入れるための適当な条件下に置かれる。この工程で考慮すべきファクターは、改変方法の特徴、即ち、用いるベクター系または方法論、及び挿入すべき遺伝子の性質である。

【0019】

遺伝的改変は、典型的には、市販されている系を含む、リポソームを基本的に用いる系、または一般にはリポフェクションを用いて処理することによって成し遂げられる。アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターのようなウイルスベクター、また一般的にウイルスベクターの場合では、このようなベクターにのパッケージング細胞から得られる上澄である。裸のままのDNAを用いて適した条件下で形質導入を行うこともできる。

【0020】

図1は、一般的な毛包の図である。ここに示すように、毛管は、脂を分泌する皮脂腺に結合している。一般に組成物の毛包への選択的送達は、リポソーム組成物を用いて行うことができる事が本発明者らによって見出された。例えば参考としてこの明細書に組み入れられる米国特許第5,914,126号を参照されたい。このように、場合によってコラゲナーゼで処理された組織培養サンプルにおいて、毛包への特異的な作用を意図した核酸の毛包への選択的な送達が成し遂げられる。

【0021】

本発明の別法では、特に局所送達を全身化する、即ち核酸分子を全身的に送達することができる場合、被験体の皮膚または他の組織を組織培養したサンプルを用いることができる。この例では選択的な送達は必要ではない。一般にサンプルを組織培養するための適切な技術は周知であり、例えば参考としてここに組み入れられる米国特許第5,849,579号及び米国特許第5,726,009号に開示されている技術が好ましい。

【0022】

挿入すべき遺伝子は、それ自体のコントロール配列に機能的に結合させて用いることができるし、また毛包細胞にある内因性のプロモーターを利用するむき出しのままのDNAを供給してもよい。このコントロール配列には通常、構成的または誘導的な、哺乳動物の細胞と適合できるプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターとしては、限定するわけではないが、CMVプロモーター、HSVプロモーター、アデノウイルス由来のLTR、及びメタロチオニンプロモーターが挙げられる。

【0023】

適切なヌクレオチドのオープンリーディングフレームは、免疫応答を誘起したり、毛髪の成長を調節したり、毛髪の色を変化させたりするタンパク質、またはホルモンや治療用化合物であるタンパク質をコードするものを含む。ヌクレオチド配列の選択は、状況や目的とする結果に応じて異なる。したがって例えば、レシピエントに色や密度についてある特徴を持つ髪を提供することが、望まれる最終的な結果であるならば、メラニンの生成に関与するチロシナーゼのようなタンパク質をコードするヌクレオチドオープンリーディングフレームが含まれているとよいし、また、毛髪の成長を刺激するタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれているとよい。この場合の好適な方法には、レシピエントの皮膚に本発明の方法によって改変した毛包を移植することが含まれるであろう。目的が原虫、細菌、またはウイルスのような病原体に対する個体の免疫感作に影響を与えることにあるならば、B型肝炎の表面抗原、ウイルスの皮膜タンパク質、細菌や原虫の表面抗原ペプチドサブユニット、または他のペプチドをベースとする免疫原のような適当な免疫原がヌクレオチド配列によってコードされているとよい。この例では、本発明の方法によって改変された毛包、あるいは組織培養した組織サンプルのいずれかの移植を用いることが可能である。上記したように組織培養されたサンプルには、皮膚以外にリンパ組織または腫瘍組織が含まれる。さらに、FSH、LH、ヒト成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、オキシトシン、カルシトニン、組織プラスミノーゲンアクチベーター、エリスロポエチン、インターロイキンのような種々のサイトカインなどのホルモンまたは治療薬を、それらをコ

10

20

30

40

50

ードするヌクレオチド配列を与えることによって投与し、実質的に被験体の代謝を改変することも本発明の範囲に含まれる。局所作用と全身作用のどちらもが得られるであろう。一般に、改変した毛包の移植、または組織培養された一部の移植のいずれかを用いることができる。

【0024】

上述したように、所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列をむき出しのままのDNAとして用いることもできるが、発現させるためのコントロール配列を有する構築物の形態でこれらのヌクレオチド配列を提供する方が好ましい。この構築物はさらに、標的細胞に形質導入するためのウイルスベクターまたは別の手段によって達成されるような感染法によって、毛包や組織サンプルに含まれる細胞の形質導入機構をもたらすことができる。例えはリボフェクション、リポソームの利用、エレクトロポレーション、及び他の同種の方法を用いることもできる。

【0025】

毛包または組織が上記の遺伝子構築物を含むように改変されると、それらは適当なレシピエントに移植される。レシピエントへの毛包の移植技術、また、毛包を含む組織などの組織の移植技術はこの技術分野では周知である。組織培養された毛包または組織は、無傷で構造の整った移植片として与えられる。

【0026】

移植片のレシピエントである被験体は、哺乳動物被験体である。移植された組織の拒絶反応を抑えるために、レシピエントは毛包または培養組織の提供者と同系であること、またレシピエントが免疫無防備状態にあることが好ましい。ヒトの同種移植の設定で毛包を移植することは周知である。同様にヒト被験体では、例えば被験体に再移植するのに先だって遺伝的改変するために、その同一の個体自身の皮膚組織を用いることが明らかに好ましい選択である。しかしながら何らかの理由で同一の個体の皮膚を用いることができない場合には、従来から行われているように、免疫抑制剤の投与を伴って、別の提供者から入手した組織の移植がなされる。

【0027】

同様の考え方は、免疫原、ホルモンまたは治療用化合物を産生する核酸構築物を投与する場合の獣医学での利用に関してもあてはまる。

【0028】

実験室の環境で用いる場合にはこの移植技術は、この遺伝子治療法によって導入されたタンパク質の効果が評価できるように、改変された被験体を形成する点で有用である。要するにこの技術は、そのモデル系に他の物質を投与したことによる効果を評価するための実験モデルとして用いることができる、トランスジェニック被験体を産生する。この状況では、改変された組織を同一又は同系の被験体から誘導してもよいし、あるいはS C I Dマウスやヌードマウスのような免疫無防備状態のレシピエントを、任意の起源から誘導された組織に対するレシピエントとして利用することもできる。これらの免疫無防備状態のマウス被験体以外に他の哺乳動物を、例えばHodgkin, E. C. らのM. J. Vet. Res. (1978) 39: 1161-1167、Perryman, L. E. らのThymus (1984) 6: 263-272によるウマ、Roth, A. らのM. J. Vet. Res. (1984) 45: 1151-1155によるイヌ、及びBaskin, G. B. のAm. J. Pathol. (1987) 129: 345-352によるサルで記載されているように放射線照射または免疫抑制剤によって免疫無防備状態にすることができる。

【0029】

このように任意の哺乳動物被験体は、改変されて構造の整った組織または毛包が移植されるレシピエントとして適当である。被験体には、ウサギ、マウス及びラットのような実験動物はもちろん、ヒト以外に、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、及びネコのような獣医学上の被験体も含まれる。

【0030】

10

20

30

40

50

レシピエントの一部に十分な免疫無防備状態を確実に起こさせるために所与の工程を行ったレシピエントに移植する際には、任意の起源から得られる組織を用いることが可能であるが、本発明の利点の一つは、遺伝子構築物を送達するためのビヒクルとして皮膚組織及び／または毛包を用いることによって、同種移植片の利用がかなり可能になることである。これによって、さもなければ免疫抑制状態において苦労が伴うであろう合併症が回避される。

## 【0031】

実施例

以下の実施例は本発明を例示することを意図しており、本発明を限定するものではない。

## 【0032】

GFPを形質導入した毛包及び毛幹を評価する方法

毛包とGFP陽性毛包の数を、自然光視野の顕微鏡及び蛍光視野の顕微鏡の下で測定した。0.581mm<sup>2</sup>の視野(200×倍率の1視野)をカバーする5カ所の無作為に選択した顕微鏡視野から得られる毛髪の平均数に基づいて計算を行った。1つの群あたり少なくとも500本の毛髪を、GFP陽性毛包のパーセントを得るためにカウントした。毛球または毛幹のどこかでGFPが明視化されている毛包をGFP陽性として数えた。

## 【0033】

50W水銀ランプのパワー電源を装着したニコン(Nikon)(Tokyo, Japan)の蛍光顕微鏡及びレイカ(Leica)の蛍光立体顕微鏡モデルLZ12(Leica Inc., Deerfield, IL)を用いた。放射された蛍光は、ハママツ(Hamamatsu)C5810-3-チップ冷却カラーCCDカメラ(Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater, NJ)に装着した長波-透過フィルターGG475(Chroma Technology, Brattleboro, VT)を通過させて集めた。

## 【0034】

ウイルスのGFPを形質導入した後、組織学的研究を行うべく数回の時点で皮膚片を採取し、GFP発現の局在化を検出した。組織培養された皮膚片または皮膚移植片は、培養培地に入れた2mg/mlのI型コラゲナーゼ溶液中で2時間、37にてインキュベートし、毛包を遊離するために培養培地ですすいだ。また組織学的研究では、組織培養された皮膚片または皮膚移植片は-80で保存した。凍結させた試験片はクリオスタット(Hacker Instruments, Inc., Fairfield, NJ)上で薄片に切断し、スライドガラス(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)の上に収集した。

## 【0035】

さらに、RT-PCRにかけた組織培養した皮膚または移植された皮膚からRNAを単離した。皮膚サンプル(100mg)は、1mlのTRI REAGENT(Sigma, St. Louis, MO)中で均質化することでRNA(13,14)を抽出した。RT-PCRでは約10μgのRNAが第1cDNA鎖に逆転写された。逆転写は20μlの第1鎖緩衝液、500μMの各dNTP、及び20ユニットのAMV逆転写酵素(Strategy, San Diego, CA)中で行った。第1鎖のプライマーはpGFPアンチセンスであった。インキュベーションは42で50分間行った。それから逆転写の生成物をPCRによって増幅した。マウス-アクチンのmRNAを標準物質として用いた。比較参照としてマウス-アクチン(514bp)を、GFP陽性およびGFP陰性である皮膚の両方から抽出したRNAでRT-PCRによって増幅した。GFP上流のプライマーの配列は、5'-ATG GCT AGC AAA GGA GAA GAA CT-3'であった。下流側のプライマーは、5'-TCA GTT GTA CAG TT C ATC ACT G-3'であった。GFPと-アクチンの両方のPCR条件は以下のとおりである。即ち、97で30秒間の変性；55で30秒間のアニール化；そして72で45秒間の伸張；続いて72で10分間の最終的な伸張である。

## 【0036】

10

20

30

40

50

実施例 1組織培養された皮膚の毛包の遺伝的改変

C 5 7 B L / 1 0 とアルビノのマウスをこの研究では用いた。修飾される場合の毛包は成長期にあった。この研究で使用した 6 日齢のマウスの毛包は、天然には成長期にあった。この研究で使用した 8 週齢のマウスは、ピンク色を示すことから休止期にあることが判断される。これらのマウスに麻酔をかけ、3 × 5 cm の背部領域をワックスを用いて脱毛することによって、毛包が同期した成長期となるように処理した。これはつまり、8 週齢のマウスの毛包は天然には休止期であったが、背部領域から脱毛を行った 6 日後に、成長期に切り替わったということである。

## 【0037】

各マウスについて、皮下組織を取り出して 1 mm × 2 mm の切片とした。その皮膚片を組織培養した。組織培養した試料のいくつかを、37 で 1 ~ 2 時間、2 mg / ml コラゲナーゼ溶液を含む培養培地 (RPMI 1640、10% の FBS) 中でインキュベートすることによって、コラゲナーゼ処理した。コラゲナーゼで処理された組織培養物を、続けて PBS ですすいだ。

## 【0038】

より詳細には、動物を脱毛後 6 日目に頸椎脱臼によって殺した。背部の皮膚を皮下組織の深さまで切開した。皮下組織を取り出し、その皮膚をカルシウム及びマグネシウム不含リン酸緩衝化生理食塩水 (CMF-PBS、pH 7.4) ですすいだ。その皮膚サンプルを小片 (1 mm × 1 mm ~ 2 cm × 2 cm) に切断した。試料の断片は、10% のウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI 1640 中で培養して非処理のコントロールとして直接用いた。その試料の残りは、2 mg / ml の I 型コラゲナーゼ (Sigma, St. Louis, MO) 溶液を含む培地中、37 で 45 分 ~ 3 時間 45 分、インキュベートし、CMF-PBS にてすすいだ。

## 【0039】

処理していない培養物も処理された培養物も、加湿された 5% の CO<sub>2</sub> / 95% 空気中、37 でインキュベートし、その後 pQBI-AdCMV5GFP (Quantum, Montreal, Quebec) を用いて、培養培地 1 mlあたり 2.4 × 10<sup>6</sup> 個から 5.0 × 10<sup>9</sup> 個のブラーク形成単位 (PFU) で 90 分間にわたり感染させ、続いて新しい RPMI 1640 (10% の FBS) 中、37 で 1 ~ 6 時間インキュベートした。グリーン蛍光タンパク質 (GFP) の発現をその後数日の間観察した。結果が表 1 に示されている。遺伝子修飾はコラゲナーゼを用いた場合でも用いなかった場合でも首尾よく達成されているが、この効果はコラゲナーゼを用いて処理すると改善されることがわかる。

## 【0040】

## 【表 1】

## 組織培養した皮膚の毛包におけるアデノウイルスにより送達されたGFPの発現

コラゲナーゼを用いた場合			コラゲナーゼを用いない場合		
毛包の数	GFPポジティブの毛包の数	GFPポジティブの毛包のパーセント	毛包の数	GFPポジティブの毛包の数	GFPポジティブの毛包のパーセント
1日目	98±3.46	57±13.08	58.09±12.9	51±2.83	11±2.83
2日目	94±15.1	61±12.49	64.73±5.07	58±12.08	13±1.14
3日目	82±3.46	55±6.93	67.03±7.28	58±7.87	16±1.41
					21.98±0.95
					22.84±2.1
					28.16±4.82

同様の実験では、コラゲナーゼ処理を行った皮膚と処理を行わなかった皮膚の組織培養物の両方を、2.4 × 10<sup>6</sup> から 5.0 × 10<sup>9</sup> PFU / ml の範囲のアデノウイルス GFP を用いて 37 で 2.5 時間処理した。GFP を形質導入した 3 日後には、コラゲナーゼ処置した組織培養物に含まれる GFP - ポジティブな毛包の数は、ウイルス力価が高くなるにつれて 80% まで増加した。非処理の組織培養物では GFP ポジティブな毛包の数

10

20

30

40

50

は非常に少なく、力価が高まるにつれてほんのわずかに増加するにすぎず、コラゲナーゼ処理した組織培養物の4分の1以下であった。これらの結果は図2Aに示されており、それはウイルス力価に依存することを示している。

#### 【0041】

さらに同様の実験では、コラゲナーゼ処理を行った組織培養物と処理を行わなかつた組織培養物の両方を、 $3.4 \times 10^8$  p.f.u./mlのアデノウイルスGFPとともに37℃で1時間～6時間インキュベートした。コラゲナーゼ処置した組織培養物に含まれるGFP-ポジティブな毛包の数が、ウイルスとのインキュベーションの時間が最大で4時間に達するまでに80%まで増加した。4時間を過ぎるとそれ以上の増加は観察されなかつた。非処理の組織培養物ではGFPポジティブな毛包の数は非常に少なく、時間が経過してもほんのわずかに増加したにすぎなかつた。これらの結果は図2Bに示されている。

#### 【0042】

GFP陽性毛包の数は、皮膚の組織培養物をコラゲナーゼ処理した時間が最大で1時間30分に達するまでは増加したが、それを過ぎると時間の経過につれてその数は減少した。

#### 【0043】

これらの実験では、アデノウイルス-GFP処理を行つた1日後には組織培養された皮膚の毛髪マトリックス細胞においてGFPが可視化された。アデノウイルス-GFP処理をした3日後に組織培養された皮膚から毛包を単離し、GFP蛍光の局在を調べた。GFPは、毛球及び真皮乳頭にある細胞の大部分で広範囲に可視化された。アデノウイルスGFP処理の7日後には、組織培養した皮膚の毛幹でGFPが可視化された。図3A参照。GFP陽性毛幹、GFP陰性毛幹、および部分的にGFP陽性である毛幹は、イクスピボでアデノウイルス-GFP遺伝子治療を行つた3日後には特異的なGFP蛍光によって明瞭に識別され、GFP蛍光はコラゲナーゼ処理を行つて組織培養された皮膚に存在する毛包の79%で可視化された。対照的に、処理を行わなかつた組織培養された皮膚においては、わずか12%の毛包しかGFP蛍光を有しなかつた。図3Aを参照のこと。組織培養物においては少なくとも35日間にわたり、高いGFP蛍光が毛包において維持されていた。

#### 【0044】

異なる時点での毛包におけるGFP遺伝子の発現を確認するために、RT-PCR分析を用いて、3日目、6日目、9日目、12日目、15日目、及び17日目においてアデノウイルス-GFP遺伝子を形質導入した組織培養皮膚に存在するGFP-特異的mRNAを検出した。RT-PCR産物は、GFPのcDNAが上記の時点で全RNAから特異的に増幅されたことを示していた。電気泳動分析は、アデノウイルス-GFP-形質導入された組織培養皮膚から増幅された産物の推定サイズが720bpであることを示した。非感染組織培養皮膚から抽出した全RNAを用いたRT-PCRでは、この配列は増幅されなかつた。

#### 【0045】

どの場合においても、組織培養された皮膚の毛包、毛球、及び真皮乳頭においてGFPの発現が示されることが可視的な観察によって示された。

#### 【0046】

#### 実施例2

#### レシピエントへの改変された組織培養物の移植

毛包が休止期にある8週齢のメスのC57BL/10マウスを、ドナーとして用いた。その背部領域をワックスにより脱毛することによって、脱毛後6日で起こる成長を誘導した。組織を背部領域から採取し、小片に切断してから、培養、コラゲナーゼを用いた処理、及びGFPを含むアデノウイルスを用いた感染を実施例1に記載されたように行った。それからその皮膚片を7週齢/3日齢のメスのヌードマウスの背部領域に移植した。移植後の移植皮膚を観察すると、毛包においてGFPが広範囲に発現すること、およびその発現はコラゲナーゼで前処理することにより増強されることが示された。

#### 【0047】

10

20

30

40

50

より詳細には、インビボでトランスジーンの発現を可視化するために、ウイルスGFPを形質導入した後、組織培養した皮膚をヌードマウスまたはC57BL/10マウスに移植した。組織培養された試料は、採集した24時間以内に移植した。移植外科術は、滅菌法を用いて層流フード内で行った。マウスはケタミンを用いて麻酔した。1×1cmの皮膚片を、筋膜の下にあるレシピエントマウスの皮膚をとり除いて準備した同じ大きさの埋め込み部に移植した。皮膚移植片は、6~0の非吸収性の単纖維縫合糸を用いて適切に固定した。

#### 【0048】

移植後のコラゲナーゼ処理した組織培養皮膚においては、毛包のより広範囲のGFP蛍光が可視化され、この蛍光は非処理の皮膚におけるよりも広範囲であった。移植の8日後には、皮膚移植片における最大蛍光の領域において毛包の75%でGFPが可視化されていた。移植後、コラゲナーゼ-処理された皮膚においてGFP蛍光を有する毛包のパーセントは、非処理の皮膚の毛包における該パーセントの5.7倍大きかった。図3Bを参照するとよい。上記に記載した免疫応答性を有するC57BL10マウスに移植したGFP-アデノウイルス処理を行った皮膚においては、免疫不全のヌードマウスに移植した皮膚と同様の期間、同様の効率で、GFPが可視化された。

#### 【0049】

GFP-形質導入した移植皮膚について、6日目、8日目、そして10日目にRT-PCRを行った。GFP-特異的mRNAがそれぞれの時点で同様に増幅された。これらのデータからは、組織培養を行う少なくとも17日間にわたって、およびマウスへの皮膚の移植後少なくとも10日間にわたって、GFP遺伝子が発現することが確認された。

#### 【0050】

##### 実施例3

ストレプトマイセス (Streptomyces) チロシナーゼ遺伝子、上流ORF - 438、および内部リボソームエントリー部位 (IRES) のクローニング

ストレプトマイセス・アンチビオティカス (Streptomyces antibioticus) のチロシナーゼ遺伝子およびORF - 438をエンコードする配列を、アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) より入手したプラスミドpIJ702 (ATCC #35287) からPCRによって増幅した。Katz, E. らのJ. Gen. Microbiol. (1983) 129: 2703-2714。

#### 【0051】

PCR増幅するためのオリゴマーは、S.アンチビオティカス (S. antibioticus) チロシナーゼ遺伝子とORF - 438のcDNAの配列に従って設計した。Bernan, V. らのGene, (1985) 37: 101-110。哺乳動物細胞において上記細菌遺伝子の発現を増強するために、ORF - 438およびチロシナーゼ遺伝子のTGA終止コドンをTAAに変更した。翻訳効率を向上させるために、それぞれの場合にATG開始コドンのすぐ前に、コザック共通配列であるGCCGCCACCCを上流側に付加した。

#### 【0052】

コザック共通配列を含むORF - 438上流側プライマーの配列は、5' - CGGAAATTCGCCGCCACCATGCCGGAACTCACCCGTC - 3' であった。下流側プライマーの配列は、5' - GGCTGATCATTAGTTGGAGGGGAAGGGAGG - 3' であった。コザック共通配列を含むチロシナーゼの上流側プライマーの配列は、5' - CT CGAGGCCGCCATGACCGTCCGCAAGAACCA - 3' であった。

#### 【0053】

下流側プライマー配列は、5' - GGATCCCTTAGACGTCGAAAGGTGTA GTGC - 3' であった。ORF - 438とチロシナーゼの両方について、PCR反応条件は以下のとおりであった。即ち、97℃で10分間の変性；次に97℃で30秒間の変性

10

20

30

40

50

、 66 で 30 秒間のアニーリング、および 72 で 45 秒間の伸長を 10 サイクル；それから 72 で 10 分間の最後の伸長。

【 0054 】

P C R オリゴマーは、 C l o n e t e c h ( P a l o A l t o , C A ) から入手したレトロウイルスベクター p L I S N に含まれる内部リボソームエントリー部位 ( I R E S ) の配列に従って設計した。上流側プライマーの配列は、 5' - G G C T G A T C A T T C G C C C C T C T C C C T C C C C - 3' であった。下流側プライマーの配列は、 5' - A G C G G C C A T T A T C A T C G T G T T T C A A A G G - 3' であった。

【 0055 】

I R E S 遺伝子は、鑄型としての p L X I N から P C R によって増幅した。 P C R の反応条件は以下のとおりであった。即ち、まず 96 で 10 分間の変性；次に 94 で 30 秒間の変性、 50 で 30 秒間のアニーリング、および 72 で 45 秒間の伸長を 30 サイクル；それから 72 で 10 分間の最後の伸長。

【 0056 】

電気泳動分析は、増幅された産物の推定サイズが、 O R F - 438 、チロシナーゼ及び I R E S に対してそれぞれ 438 b p 、 800 b p 及び 580 b p であることを示した。

【 0057 】

実施例 4

レトロウイルスベクター p L m e l S N の構築およびパッケージング

p L m e l S N の構築を記述する。レトロウイルスベクター p L X S N ( C l o n e t e c h , P a l o A l t o , C A ) は、二つのプロモーター、即ち、挿入遺伝子を調節する 5' - 長末端反復配列 ( 5' - L T R ) と、ネオマイシンリン酸転移酵素 ( n e o R ) を調節する S V 40 プロモーター、とを含むマウス白血病ウイルス系ベクターである。 800 - b p のチロシナーゼ P C R 産物を X h o I によって切断し、 p L X S N の H a p I / X h o I クローニング部位に挿入することによって p L t y r S N が得られた。 O R F - 438 と I R E S P C R 産物を B c l I 部位で連結し、その後 p L t y r S N の E c o R I / X h o I クローニング部位に挿入することによって、 p L m e l S N が得られた。 O R F - 438 とチロシナーゼ遺伝子はどちらも、 p L m e l S N 中のモロニーマウス白血病ウイルスの 5' - L T R によって駆動される。 5' - L T R プロモーターの制御下にある O R F - 438 、 I R E S 及びチロシナーゼ遺伝子を含むニシストロン配列がそのベクター中に存在している。

【 0058 】

p L m e l S N を、 l i p o T A X I ( C l o n e t e c h , P a l o A l t o , C A 、 S t r a t a g e n e , S a n D i e g o , C A ) を用いて P T 67 パッケージング細胞系にトランスフェクトした。そのトランスフェクトされた P T 67 細胞系は、 0.4 m g / m l の G 418 ( G i b c o B R L ) を含む D M E M 培地にて選択した。 G 418 - 耐性細胞をクローニ化し増殖させた。 G 418 を用いて 2 週間の選択的培養を行った後、陽性であるトランスフェクトされた細胞である P T 67 - m e l が得られた。

【 0059 】

実施例 5

P T 67 - m e l 細胞における発現

O R F - 438 遺伝子とチロシナーゼ遺伝子の両方の発現を確認するために、 R T - P C R 分析を用いてトランスフェクトされたパッケージング細胞において各 m R N A を検出した。 R T - P C R 産物は、 S . a n t i b i o t i c u s 由来のチロシナーゼ遺伝子と O R F - 438 遺伝子が p L m e l S N 形質導入した P T 67 - 細胞の全 R N A から特異的に増幅された産物であることを示していた。比較対照として、 P T 67 - m e l と P T 67 細胞の両方から得られるマウスの - アクチンを R T - P C R によって増幅した。電気泳動分析は、 R T 67 - m e l 細胞から得られる増幅産物の予測サイズが、チロシナーゼと O R F - 438 に対してそれぞれ 800 b p と 438 b p であることを示した。感染を行わなかった P T 67 細胞から得られる全 R N A を用いた R T - P C R 反応では、これら

10

20

30

40

50

の断片は増幅しなかった。

【0060】

より詳細に述べると、PT67-mel細胞をトリプシンを用いて消化し、そして遠心分離によってペレット化した。全RNAはゲアニジンチオシアナート法 (MicroRNA Reagent Kit, Stratagene, San Diego, CA) によって抽出した。RNAは、260 nmにおける吸光度を測定することによって定量した。約10 µgの全RNAを第1cDNA鎖へと逆転写した。逆転写は20 µlの第1鎖緩衝液、500 µMの各dNTP、及び20ユニットのAMV逆転写酵素 (Stratagene, San Diego, CA) で行った。第1鎖に対するPCRプライマーは、pORF-438アンチセンスとpTyrアンチセンスであった。サンプルを42で50分間インキュベートした、逆転写の産物をPCR反応によって増幅した。マウス-アクチノンを標準として用いてRNAの品質を調節した (Stratagene, San Diego, CA)。

【0061】

実施例6

チロシナーゼ活性アッセイ

トランスフェクトしたパッケージング細胞を、G418-耐性パッケージング細胞のクローンの溶解物に含まれるチロシナーゼ活性を測定することによって、活性を有するチロシナーゼタンパク質の発現についてスクリーニングした。チロシナーゼ活性は、NakajimaらのPigment Cell Res (1998) 11: 12-17によって記載された方法で評価した。pLme1SN感染したPT67パッケージング細胞を、96ウェルプレートに2,000細胞/ウェルの密度で植え付けた。培養を24時間行った後、そのパッケージング細胞をPBSを用いて洗浄し、1%のトリトン-100 (45 µ/ウェル) を用いて溶解した。振とうしてその溶解物を混合した後、5 µlの10 mM L-DOPAをそれぞれのウェルに添加した。その培養物を37で30分間インキュベートしてから、490 nmでの吸光度を分光光度測定法で測定した。

【0062】

またDOPA-オキシダーゼ反応も、無傷のトランスフェクトしたPT67細胞におけるメラニンの産生を検出するために利用した。その細胞を、1 mg/mlのDOPAと2 mg/mlのチロシンとを含むPBS (pH 7.4) とともに37で12時間、先に記載したようにインキュベートした。Kugelman, T.らのJ. Invest Dermatol (1961) 37: 66-73参照。

【0063】

同じ条件を用いて細胞上清のメラニン含有量について490 nmで測定した。図3は、PT67クローン1-4が比較対照のPT67よりも多いメラニンを生成することを示している。チロシナーゼ陽性細胞は、自然光視野の顕微鏡を用いて観察される茶色のメラニン顆粒を産生することによって同定した。茶色に着色した顆粒は、pLme1SN-トランスフェクトした細胞でのみ観察された。

【0064】

実施例7

アルビノマウスの成長期の毛包の培養

メスのアルビノマウスC57BL/6J-チロシナーゼ (c-2J) (8週齢) は、Jackson Laboratoryから購入した。全ての毛包が毛髪サイクルの休止期 (テロゲン期) に入っている背部の皮膚に、毛髪サイクルの成長期 (組織再生期) を誘導した。全身麻酔を行った後、温かいワックス/ロジン混合液を適用してから皮膚を剥離し、全ての休止期の毛幹を脱毛し、それによって成長期に入るよう毛包を誘導した。Schillaci J. Invest Dermatol (1998) 111: 598-604参照。

【0065】

脱毛後6日目に全ての毛包が成長期に入った時点でのマウスを殺し、その背部の皮膚を

採取した。マウスの皮膚の小片（ $2 \times 5 \times 2 \text{ mm}$ ）をハサミで切斷し、H B S S で3度洗浄した。採取した皮膚を抗生物質（1 mlあたり $100 \mu\text{g}$ のゲンタマイシン、1 mlあたり $10 \mu\text{g}$ のシプロフロキサシン、1 mlあたり $2.5 \mu\text{g}$ のアンホテリシン-B、1 mlあたり $100 \text{ I.U.}$ - $100 \mu\text{g}$ のペニシリン-ストレプトマイシン）を含むM E M 中で30分間、37℃でインキュベートした（Sigma）。その皮膚をH B S S 培地を用いて3回洗浄することによって残っている抗生物質を除去し、10%のウシ胎児血清とゲンタマイシンを補充したイーグルの最小必須培地（M E M）において組織培養するため、コラーゲンを含むゲルに入れた。培養は5%の $\text{CO}_2$ を含むガス封入インキュベーター中で、37℃に維持した。

【0066】

10

実施例8培養したアルビノマウスの毛包の感染

実施例7の組織培養したアルビノマウスの皮膚を、P T 6 7 - m e 1 細胞とともに以下とのおりに共培養した。

【0067】

最も多く産生したクローンから得られるP T 6 7 - m e 1 細胞を計数し、24-ウェルのプレートに植え付けてから80%のコンフルエントに達するまで37℃で増殖させ、24-ウェルのプレートにおいて組織培養されたアルビノ皮膚とともに、12時間、24時間及び72時間共培養した。その後組織培養された皮膚を、新しいM E M 培地を用いて24ウェルのプレートで単独培養し、更に4~6日間インキュベートした。ウイルス感染させた皮膚の小片を無作為にサンプリングした。新しい凍結切片を標準法によって調製した。

【0068】

メラニンは、レトロウイルス感染の4日後の組織培養物の毛球の深部にある毛マトリックスにおいて観察された。またメラニンは毛包の上部にも見られ、感染の6日後には毛マトリックスと毛幹の両方で観察することができた。

【0069】

共培養した組織培養アルビノマウスの皮膚をP T 6 7 - m e 1 細胞とともに24時間共培養する工程が含まれる最初の実験では、皮膚組織培養物のほぼ2.5-15%がメラニン産生性の毛包を含んでいた。P T 6 7 - m e 1 と共に培養しなかった組織培養したアルビノマウスの皮膚ではメラニンは観察されなかった。

【0070】

30

次に、アルビノ皮膚とP T 6 7 - m e 1 の共培養物のインキュベーション時間が長くなるほどチロシナーゼ感染の効率が良くなるかどうかを調べるために、経時的実験を行った。組織培養皮膚の感染効率は、共培養した時間につれて有意に向上した。12時間の共培養を行った後では、皮膚の7%（30片のうちの2片）がメラニンを産生し、また毛包の15%（60片のうち40片）がメラニンを産生した。共培養を24時間行った後では皮膚片の25%（20片のうち5片）がメラニンを産生し、毛包の35%（80片のうち28片）がメラニンを産生した。共培養を72時間行った後では、皮膚片の60%（20片のうち12片）がメラニンを産生し、毛包の53%（80片のうち42片）がメラニンを産生した。

【0071】

40

これらの結果は、ウイルス力価とウイルスに曝露された時間が形質導入の頻度に影響をあたえ得ることを示唆している。

【図面の簡単な説明】

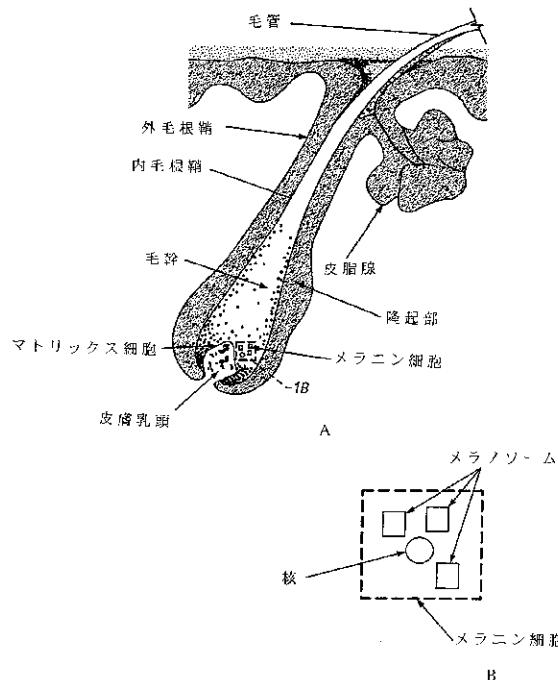
【図1】図1は、一般的な毛包の図である。

【図2】図2A及び2Bは、コラゲナーゼを用いた処理を行った場合と行わなかった場合の組織培養された皮膚におけるアデノウイルス-供給G F Pについて、ウイルス力価及びウイルスインキュベート時間のそれぞれに対する関数として示したグラフ表示である。

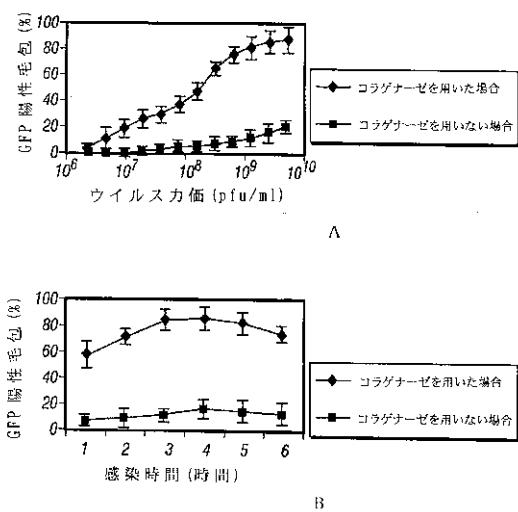
【図3】図3A及び3Bはそれぞれ、組織培養物及び移植された皮膚におけるG F Pの持続性を示す。

50

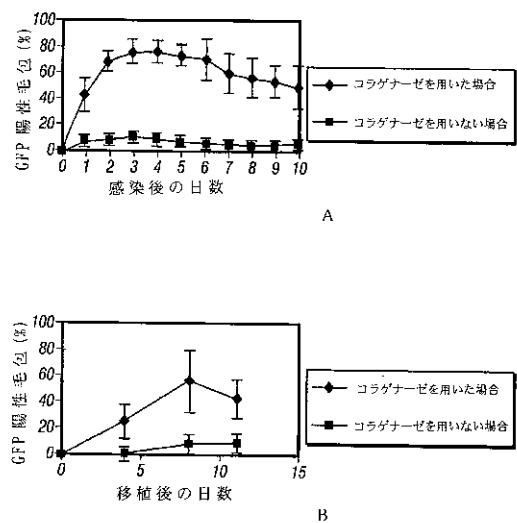
【図1】



【図2】



【図3】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 June 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/42449 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/00 Apartment 3211, 3833 Nobel Drive, San Diego, CA 92132 (US)

(21) International Application Number: PCT/US00/32645 (74) Agents: MURASHIGE, Kate, II, et al.: Morrison &amp; Foerster LLP, Suite 500, 3811 Valley Centre Drive, San Diego, CA 92130-2332 (US)

(22) International Filing Date: 11 December 2000 (11.12.2000) (81) Designated States (national): AU, CA, JP, KR.

(25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR.

(26) Publication Language: English (30) Priority Data: 60/170,166 10 December 1999 (10.12.1999) US  
Published: — *Without international search report and to be republished upon receipt of that report.*(71) Applicant: ANTICANCER, INC. (US/US), 7917 Kearny Street, San Diego, CA 92111 (US).  
(72) Inventors: ZHAO, Ming: Apartment 42, 4178 Decoro Street, San Diego, CA 92122 (US); SAITO, Norimitsu;

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 01/42449 A2

(54) Title: METHODS FOR INTRODUCING GENES INTO MAMMALIAN SUBJECTS

(57) Abstract: Methods to obtain genetic modifications of cells in histoculture are described. Modification is assisted by treating the histoculture with collagenase prior to connecting the histoculture with the delivery vehicle for the desired gene. Hair follicles and other organized tissues can be modified in this way and then transplanted into intact recipients.

WO 01/42449

PCT/US00/33645

**METHODS FOR INTRODUCING GENES INTO  
MAMMALIAN SUBJECTS**

**Cross-Reference to Related Application**

5 This application claims priority under 35 U.S.C. § 119(e) from provisional application serial no. 60/170,166, filed 10 December 1999, the contents of which are incorporated herein by reference.

**Technical Field**

10 The invention relates to modifying mammalian subjects to contain heterologous genes. More particularly, the invention concerns treating histocultured tissue, including hair follicles, *ex vivo* and re-implanting tissue or hair follicles into a recipient.

**Background Art**

15 Somatic modification of the genetic complement of mammalian subjects, including humans, has been attempted using a variety of techniques. For example, adenoviral vectors containing a desired gene can be used directly to infect tissues and organs *in situ*. More typically, perhaps, cell cultures or suspensions of cells are modified *ex vivo* and then returned to the intact subject via the bloodstream. For example, an RNA-DNA oligonucleotide (RDO) 20 designed to correct the albino point mutation in the mouse tyrosinase gene was able to correct this condition in cultured albino melanocytes (Alexeed, D., *et al.*, *Nature Biotechnol* (1998) 16:1343-1346). This work was extended to *in vivo* correction of the same defect by delivering the RDO in liposomes or by 25 intradermal injection as reported by the same group (Alexeed, D., *et al.*, *Nature Biotechnol* (1999) 16:1343-1346. Earlier work had described selective gene therapy of hair follicles using a liposome-entrapped *lac Z* (Li, L., *et al.*, *Nature Med* (1995) 1:705-706). Preferred recipients of the liposomal compositions were endogenous hair follicles in the anagen phase (Domashenko, A., *et al.*, *J. Invest Dermatol* (1999) 112:552).

{

WO 01/42449

PCT/US00/33645

Thus, it has been possible to modify hair follicle cells individually in culture and to modify intact hair follicles *in vivo*. It has also been shown that cultured mutant skin keratinocytes from patients with lamellar ichthyosis can be safely modified genetically *in vitro* and then transplanted into nude mice to obtain a normal epidermis (Choate, K.A., *et al.*, *Nature Med* (1996) 2:1263-1267.) Similarly, keratinocytes cultured individually *in vitro* can be modified genetically and then transplanted into nude mice to obtain re-formed tissue (Deng, H., *et al.*, *Nature Biotechnol* (1997) 15:1388-1391). It has also been shown that hair follicles will form from hair follicle dermal sheath cells taken from the scalp of a different individual (Reynolds, J., *et al.*, *Nature* (1999) 402:33-34).

In short, it has been shown that individual cells can be modified genetically and then transplanted to an intact organism and that individual cells, when transplanted can, under appropriate conditions, form an organized tissue.

Direct application of genes or DNA in general to human skin has also been shown to be effective, at least in terms of immunization with respect to an encoded antigen. This has been reported by a number of groups including Tang, D-C, *et al.*, *Nature* (1997) 388:729-730; Yu, W-H, *et al.*, *J. Invest Dermatol* (1999) 112:370-375; Falo, L.D. Jr., *Proc Assoc Am Physicians* (1989) 111:211-219; Shi, Z., *et al.*, *Vaccine* (1999) 17:2136-2141; and Tuting, P., *et al.*, *J. Invest Dermatol* (1998) 111:183-188. Fan, H., *et al.*, *Nature Biotechnol* (1999) 17:870-872 further showed that to elicit a response to a hepatitis B surface antigen, the gene encoding this antigen was effective when applied to normal skin containing hair follicles. However, skin lacking hair follicles was not a suitable target for vaccination.

25

#### Disclosure of the Invention

The invention resides in the discovery that histocultured tissues, including tissues containing hair follicles, can be successfully modified genetically *ex vivo* and then transplanted successfully into an intact mammalian subject. The success of the modification is enhanced by treating the histocultured tissues with collagenase prior to genetic modification.

Thus, in one aspect, the invention is directed to a method to deliver a nucleic acid to a tissue which method comprises treating a histoculture of said tissue with said nucleic acid, optionally preceded by the step of treating said tissue with collagenase. A preferred tissue is tissue containing hair follicles.

5 In additional aspects, the invention is directed to methods to introduce a nucleic acid molecule into a mammalian subject which comprises transplanting into the dermis of said subject at least one hair follicle that has been modified *ex vivo* to contain the nucleic acid molecule, or transplanting into the corresponding tissue of the subject a histocultured tissue that has been modified *ex vivo* to contain the nucleic acid molecule. In both cases, the histoculture is treated with collagenase prior to the step of modifying with the desired nucleic acid.

10 In still another aspect, the invention is directed to histocultured tissue modified to contain heterologous nucleic acids.

15 Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a diagram of a typical hair follicle.

Figures 2A and 2B are a graphic representation of adenoviral-delivered GFP in histocultured skin with and without treatment with collagenase, as a function of virus titer and of virus incubation time, respectively.

20 Figures 3A and 3B show the persistence of GFP in histoculture and grafted skin, respectively.

Modes of Carrying Out the invention

The use of histocultured tissue as the substrate for genetic modification has several advantages over direct *in vivo* application and over *ex vivo* modification of individually cultured cells for subsequent transplant *in vivo*. The tissue retains its three-dimensional integrity and is thus more readily reconstituted when transplanted into the recipient. By manipulating the tissue *ex vivo*, the level of genetic modification can be controlled and success measured prior to invasive treatment of the subject. Although it is advantageous to treat the cultured tissue with collagenase in order to enhance the ability of the tissue to accept

WO 01/42449

PCT/US00/33645

heterologous nucleic acids, the treatment is not so severe as to destroy completely the integrity of the three-dimensional array.

The three-dimensional histoculture can be assembled from any tissue, including skin, especially skin containing hair follicles, lymphoid tissue, or tumor tissue. The choice of tissue will depend on the nature of the treatment contemplated. The histoculture maintains the organization of the tissue sample which is provided as an intact fragment. By "intact" is meant that the three-dimensional organization of the tissue is preserved in the histoculture both before and after modifying the cells to contain a heterologous nucleic acid. As described below, the histoculture may be treated with collagenase prior to supplying the appropriate nucleic acid-containing vector or formulation containing the nucleic acid. However, the treatment with collagenase must be sufficiently mild to preserve the essential elements of organization. Thus by "intact" tissue, or "intact" fragment is meant the fragment of tissue as obtained from a donor subject both before and after treatment with collagenase according to the method of the invention.

For example, hair follicles are useful recipients of genes intended to affect the growth or quality of hair, but also are able to produce immunogens and other products that may be useful to the organism taken as a whole. Thus, a transformation of hair follicles can readily be used as an intermediate step in genetic therapy directed to the whole organism. Immunization, for example, through modifying the hair follicles to produce the required antigen is consistent with the observation, reported above, that only skin containing hair follicles is able to accept DNA for eliciting an immune response against an antigen, whereas skin devoid of hair follicles is incapable of doing so.

Thus, hair follicles or skin containing hair follicles would be removed from a non-critical area of a subject to be treated and cultured *in vitro*. Preferably, the skin containing hair follicles would be histocultured. The histocultured skin is then treated with collagenase in an amount and for a time sufficient to enhance the ability of the hair follicles to take up heterologous nucleic acid, but the treatment is regulated so as not to result in disintegration of the histoculture. The intact hair follicles in culture or in histoculture are then treated with a suitable vector to

WO 01/42449

PCT/US00/33645

deliver desired nucleic acids. Such vectors include viral vectors such as adenoviral vectors or retroviral vectors or the supernatants from packaging cells.

In general, in one aspect the invention relates to the use of hair follicles as a delivery system for gene expression vectors or for naked DNA. In order to practice the invention, proper methods to harvest and treat the hair follicles should be employed; various means are available to modify the hair follicles; the follicles can then be re-implanted into the recipient.

For harvesting the hair follicles, preferably skin containing the follicles is removed in small pieces from a suitable donor. If the follicles are already in anagen phase, they can directly be histocultured. However, if the donor contains hair follicles that are not in anagen phase, they can be resynchronized by depilating the skin using, for example, a wax procedure, and then removing the hair follicle-containing skin pieces at an appropriate later time when anagen has been established. Typically, this is after 3-10 days, more preferably 5-7 days, and most preferably 6 days in murine subjects; other mammalian subjects will exhibit varying time periods to reestablish anagen. An optimum waiting period can readily be determined. The skin containing hair follicles in anagen phase is then embedded in a three-dimensional matrix, typically collagen based. It has been found by the present inventors that subsequent modification with the desired heterologous gene is improved if the histoculture is then treated with collagenase or other appropriate lytic enzyme to facilitate infection or transduction.

The treatment with collagenase should be sufficient to enhance the subsequent genetic modification, but not so severe as to destroy the integrity of the histoculture. The extent of collagenase digestion can be regulated by controlling the concentration of collagenase, the temperature of incubation, and the time of incubation. These are interdependent factors and optimum levels can readily be determined empirically. Typical suitable conditions are about 2 mg/ml collagenase solution for 1-2 hours at 37°C.

After "loosening" the supporting matrix, the histoculture is in an appropriate condition to accept genetic alteration. The factors to be considered in

WO 01/42449

PCT/US00/33645

this step are the nature of the method of modification - *i.e.* the vector system or methodology used and the nature of the genes to be inserted.

5 Genetic alteration is typically accomplished by treating with liposomal based systems or lipofection in general, including commercial systems. Viral vectors such as adenoviral vectors and retroviral vectors, and, in the case of viral vectors in general, supernatants from packaging cells for such vectors. Transduction under suitable conditions with naked DNA can also be accomplished.

10 Figure 1 shows a diagram of a typical hair follicle. As seen, the hair canal is coupled to a sebaceous gland which secretes lipids. It has been found by applicants herein that selective delivery of compositions in general to the hair follicle can be accomplished using liposomal compositions. See, for example, U.S. Patent 5,914,126, incorporated herein by reference. Thus, in the histocultured sample, treated optionally with collagenase, selective delivery to the 15 hair follicle of nucleic acids intended for hair follicle-specific effects can be accomplished.

15 In the alternative method of the invention, especially where generalized local, or systemic delivery of the nucleic acid molecule is desired, a histocultured sample of the dermis or other tissue of the subject can be used. In this instance, 20 selective delivery is not required. Suitable techniques for histoculturing samples generally are well known; those disclosed, for example, in U.S. Patent 5,849,579, and U.S. Patent 5,726,009, incorporated herein by reference are preferred.

25 The genes to be inserted can be provided operably linked to their own control sequences or naked DNA may be supplied which will co-opt promoters endogenous to the hair follicle cells. The control sequences typically include promoters which may be a constitutive or inducible that are compatible with mammalian cells. Such promoters include, but are not limited to, the CMV promoter, the HSV promoter, the LTR from adenovirus, and the metallothioneine promoter.

30 Suitable nucleotide open reading frames include those encoding proteins which elicit immune responses, regulate hair growth, modify hair color, or which are hormones or therapeutic compounds. The choice of nucleotide sequence will

depend on the circumstances and the desired result. Thus, for example, if the end result desired is to supply the recipient with hair having certain characteristics of color and density, nucleotide open reading frames encoding proteins such as tyrosinase which participate in the generation of melanin might be included; also 5 included might be nucleotide sequences encoding proteins that stimulate hair growth. The suitable method in this case would include implantation of hair follicles which had been modified according to the method of the invention into the dermis of the recipient. If the purpose is to effect immunization of an individual with regard to a pathogen such as a protozoan, a bacterium, or a virus, 10 an appropriate immunogen, such as hepatitis B surface antigen, a viral coat protein, a peptide subunit of bacterial or protozoal surface antigen, or other peptide based immunogen would be encoded by the nucleotide sequence. In this instance, either implantation of hair follicles that had been modified according to the method of the invention, or a histocultured tissue sample generally could be 15 employed. As noted above, the histocultured sample could include, in addition to skin, lymphoid tissue or tumor tissue. In addition, it is included within the scope of the invention to modify the metabolism of the subject by, in effect, administering hormones or therapeutic agents such as FSH, LH, human growth hormone, thyroid stimulating hormone, oxytocin, calcitonin, tissue plasminogen 20 activator, erythropoietin, various cytokines such as the interleukins and the like by providing nucleotide sequences that encode them. Both a local and systemic effect will result. Either implantation of modified hair follicles or histocultured sections in general may be used.

As described above, the nucleotide sequences encoding the desired 25 proteins may be provided as naked DNA; however, it is preferable to provide these nucleotide sequences in the form of constructs which provide control sequences for expression. The constructs may further provide the mechanism for transduction of the cells in the hair follicle or tissue sample by infection such as realized with viral vectors or alternative means to transduce the target cells, such 30 as lipofection, use of liposomes, electroporation and the like may also be employed.

- When the hair follicles or tissue have been modified to contain the genetic constructs described above, these are then implanted into a suitable recipient. Techniques for implantation of hair follicles and implantation of tissue, including tissue containing hair follicles, into recipient subjects are well known in the art.
- 5 The hair follicle or tissue which has been histocultured are provided as intact, organized implants.
- The subjects that are the recipients of the implants are mammalian subjects. In order to prevent rejection of the implanted tissue, it is preferable that the recipient be syngenic with the donor of the hair follicle or cultured tissue, or 10 that the recipient be immunocompromised. Implantation of hair follicles in allograft settings in humans is well known. Similarly, in human subjects, the individual's own dermal tissue, for example, is the clearly preferred selection for genetic modification prior to reimplantation into the same subject. If, however, for some reason, the dermis of the same individual cannot be employed, the 15 implantation of tissue from another donor would be, as is conventional, accompanied by administration of immunosuppressants.
- Similar considerations apply with regard to veterinary use for administration of nucleic acid constructs which will produce immunogens, hormones or therapeutic compounds.
- 20 For use in laboratory context, the implantation techniques are useful in generating modified subjects such that the effect of the proteins introduced by this gene therapy method can be evaluated. In effect, the technique produces a transgenic subject which can then be used as an experimental model to evaluate the effects of administering other substances to the model system. In this context, 25 the tissue modified may be derived from the same or syngenic subject, or an immunocompromised recipient such as a SCID mouse or nude mouse can be used as a recipient for tissue derived from an arbitrary source. In addition to these murine immunocompromised subjects, other mammals can be immunocompromised by radiation or immunosuppressants as has been described, 30 for example, in horses by Hodgin, E.C., et al., *M.J. Vet. Res.* (1978) 39:1161-1167; Perryman, L.E., et al., *Thymus* (1984) 6:263-272; in dogs, by Roth, J.A. et

WO 01/42449

PCT/US00/33645

al., *M.J. Vet. Res.* (1984) 45:1151-1155; and in monkeys by Baskin, G.B., *Am. J. Pathol.* (1987) 129:345-352.

Thus, any mammalian subject is appropriate as a recipient of the transplanted modified organized tissue or hair follicle. Subjects can include, in 5 addition to humans, veterinary subjects such as horses, cows, pigs, sheep, dogs and cats, as well as laboratory animals such as rabbits, mice and rats.

Although it is possible to utilize tissue from arbitrary sources for transplantation into the recipient provided steps are taken to assure a sufficiently immunocompromised state on the part of the recipient, one of the advantages of 10 the present invention is that by using dermal tissue and/or hair follicles as vehicles for delivery of genetic constructs, it is frequently possible to utilize an allograft. This bypasses the complications that might otherwise accompany efforts at immunocompromise.

15 Examples

The following examples are intended to illustrate, but not to limit, the invention.

20

Methods to Assess GFP-transduced hair follicles and shafts

The number of hair follicles and GFP-positive hair follicles was determined under bright-field microscopy and fluorescent-field microscopy. The 25 calculations were based on average number of hairs from 5 randomly chosen microscopic fields covering an area of 0.581 mm<sup>2</sup> (1 field of 200 $\times$  magnification). At least 500 hairs per group were counted to generate the percentage of GFP-positive hair follicles. Hair follicles in which GFP was visualized anywhere in the hair bulb or shaft were scored as GFP positive.

A Nikon (Tokyo, Japan) fluorescent microscope and a Leica fluorescence 30 stereo microscope model LZ12 (Leica Inc., Deerfield, IL) equipped with a mercury 50W lamp power supply were used. Emitted fluorescence was collected

WO 01/42449

PCT/US00/33645

through a long-pass filter GG475 (Chroma Technology, Brattleboro, VT) on a Hamamatsu C5810 3-chip cooled color CCD camera (Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater, NJ).

After viral GFP transduction, skin pieces were taken at several time points for histological study to determine the location of GFP expression. Pieces of histocultured skin or skin grafts were incubated in a 2 mg/ml type I collagenase solution in culture medium for 2 hr at 37° C, and rinsed in culture medium in order to release hair follicles. Alternatively, for histological studies, pieces of histocultured skin or skin grafts were stored -80° C. Frozen specimens were sectioned on a cryostat (Hacker Instruments, Inc., Fairfield, NJ) and collected onto glass slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

In addition, RNA was isolated from histocultured or grafted skin subjected to RT-PCR. Skin samples (100mg) were homogenized in 1 ml of TRI REAGENT (Sigma, St. Louis, MO) to extract RNA (13,14). For RT-PCR, approximately 10 µg of RNA was reversely transcribed to first cDNA chains. Reverse transcription was carried out in 20 µl of first-strand buffer, 500 µM of each dNTP, and 20 units of AMV reverse transcriptase (Stratagene, San Diego, CA). The primer for the first strand was pGFP antisense. Incubation was at 42° C for 50 min. The products of the reverse transcription were then amplified by the PCR. Mouse β-actin mRNA was used as the standard. As a control, mouse β-actin (514 bp) was amplified by the RT-PCR in extracted RNA from both the GFP-positive and -negative skin. The sequence of the GFP upstream primer was 5'-ATG GCT AGC AAA GGA GAA GAA CT-3'. The downstream primer was 5'-TCA GTT GTA CAG TTC ATC ACT G-3'. The PCR conditions for both GFP and β-actin were as follows: first denaturation at 97° C for 30 seconds; annealing at 55° C for 30 seconds; and extension at 72° C for 45 seconds; then a final extension at 72° C for 10 minutes.

Example 1Genetic modification of hair follicles of histocultured skin

C57BL/10 and albino mice were used in this study. The hair follicles when modified were in anagen phase. The hair follicles of six-day-old mice used in the study were naturally in anagen phase. Eight-week-old mice used in the study, judged to be in telogen by their pink color, were anesthetized and treated to place the hair follicles in synchronized anagen by depilation with wax in a 3 x 5 cm dorsal area; i.e., the hair follicles in eight-week-old mice were natively in telogen phase, but converted to anagen phase six days after depilation from the dorsal area.

10 In each case, subcutaneous tissue was removed and cut into pieces of 1 mm x 2 mm. The skin pieces were histocultured. Some of the histocultured specimens were treated with collagenase by incubating in 2 mg/ml collagenase solution in culture medium (RPMI 1640, 10% FBS) for 1-2 hours at 37°C. The histocultures treated with collagenase were then rinsed in PBS.

15 In more detail, animals were sacrificed by cervical dislocation on the 6<sup>th</sup> day after depilation. The back skin was dissected at the level of the subcutis. Subcutaneous tissue was removed and the skin was rinsed in calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline (CMF-PBS, pH 7.4). The skin samples were cut into small pieces (1 mm x 1 mm ~ 2 cm x 2 cm). A fraction of the 20 specimens were directly used as untreated controls cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum (FBS). The remainder of the specimens were incubated in a 2 mg/ml type I collagenase (Sigma, St. Louis, MO) solution in medium from 45 min to 3 hr 45 min at 37° C and rinsed in CMF-PBS.

25 Both untreated and treated cultures were incubated at 37° in humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air and then infected with pQBI-AdCMV5GFP (Quantum, Montreal, Quebec) at  $2.4 \times 10^6$  to  $5.0 \times 10^7$  plaque forming units (PFU) per ml in the culture medium for 90 minutes then incubated in fresh RPMI 1640 (10% FBS) at 37° for 1-6 hours. The expression of green fluorescent protein (GFP) was then 30 observed over several days. The results are shown in Table 1. It is seen that

successful genetic modification is achieved both with and without collagenase but that this is improved by treatment with collagenase.

Table 1**Expression of Adenovirus-delivered GFP in Hair Follicles of Histoctured Skin**

Number of hair follicles	With collagenase		Without collagenase		
	Number of GFP-positive hair follicles	Percent of GFP-positive hair follicles	Number of hair follicles	Number of GFP-positive hair follicles	Percent of GFP-positive hair follicles
Day1	98 ± 3.46	57 ± 13.08	58.09 ± 12.9	51 ± 2.83	11 ± 2.83 21.98 ± 0.95
Day2	94 ± 15.1	61 ± 12.49	64.73 ± 5.07	58 ± 12.08	13 ± 1.41 22.84 ± 2.1
Day3	82 ± 3.46	55 ± 6.93	67.03 ± 7.28	58 ± 7.87	16 ± 1.41 28.16 ± 4.82

- 5        In similar experiments, both collagenase-treated and untreated skin histocultures were treated with adenoviral GFP at a range of  $2.4 \times 10^5$  to  $5.0 \times 10^9$  pfu/ml for 2.5 hr at 37° C. On day-3 after GFP transduction, the number of GFP positive hair follicles in collagenase-treated histocultures increased up to 80% with higher virus titer. In untreated histocultures, the number of GFP positive hair  
10      follicles was very small and increased only slightly with higher titer and was 4 times less than collagenase-treated histocultures. These results are shown in Figure 2A, indicating the dependence on virus titer.
- 15      In additional similar experiments, both collagenase-treated and untreated histocultures were incubated with adenoviral GFP at  $3.4 \times 10^8$  pfu/ml for 1 hr to 6 hr at 37° C. The number of GFP-positive hair follicles in collagenase-treated histocultures increased up to 80% with time of virus incubation for up to 4 hr. After 4 hr, no further increase was observed. In untreated histocultures, the number of GFP-positive hair follicles was very small and increased only slightly with time. These results are shown in Figure 2B.
- 20      The number of GFP-positive hair follicles increased with the time of collagenase treatment of skin histocultures for up to 1 hr 30 min, after which the number decreased with time.

In these experiments, GFP was visualized in hair matrix cells of histocultured skin on day-1 after adenoviral-GFP treatment. On day-3 after adenoviral-GFP treatment, hair follicles were isolated from histocultured skin to determine the location of GFP fluorescence. GFP was extensively visualized in 5 the majority of the cells in the hair bulbs and dermal papillae. On day-7 after adenoviral GFP treatment, GFP was visualized in hair shafts of histocultured skin. See Figure 3A. GFP-positive and negative hair shafts and partially GFP-positive hair shafts were clearly distinguished by the specific GFP fluorescence, on day-3 after *ex-vivo* adenoviral-GFP gene treatment, GFP fluorescence was visualized in 10 79% of the hair follicles in collagenase-treated histocultured skin. In contrast, only 12% of hair follicles had GFP fluorescence in the untreated histocultured skin. See Figure 3A. High GFP fluorescence was maintained in hair follicles for at least 35 days in histoculture.

In order to confirm the expression of the GFP gene in the hair follicles at 15 different time points, RT-PCR analysis was used to detect GFP-specific mRNA in the adenoviral-GFP gene transduced histocultured skin at day-3, -6, -9, -12, -15, and -17. The RT-PCR products demonstrated that the GFP cDNA was specifically amplified from the total RNA at the above time points.

Electrophoretic analysis demonstrated that amplified products from the 20 adenoviral-GFP-transduced histocultured skin had the predicted size of 720 bp. RT-PCR with total RNA extracted from uninfected histocultured skin did not amplify this sequence.

In all cases, visual observation showed that the hair follicles, hair bulbs, and dermal papilla of the histocultured skin showed expression of GFP.

25

Example 2

Transfer of modified histoculture to a recipient

Eight-week-old female C57BL/10 mice whose hair follicles were in 30 telogen phase were used as donors. The dorsal area was depilated with wax to induce anagen which occurred six days after depilation. Tissue was removed from the dorsal area and cut into small pieces, cultured, treated with collagenase, and infected with adenovirus containing GFP as described in Example 1. The

WO 01/42449

PCT/US00/33645

skin pieces were then transplanted to the dorsal area of seven-week/three-day-old female nude mice. Observation of the grafted skin after transplant showed extensive expression of GFP in the hair follicles which expression was enhanced by the pretreatment with collagenase.

5 In more detail, to visualize the expression of the transgene *in vivo*, histocultured skin was grafted to nude mice or C57BL/10 mice after viral GFP transduction. Histoctured specimens were grafted within 24 hrs of harvest. Grafting surgery was performed in a laminar-flow hood using sterile procedures. Mice were anesthetized with Ketamine. 1 x 1 cm pieces of skin were grafted to a  
10 bed of similar size that was prepared by removing recipient mouse skin down to the fascia. Skin grafts were fixed in place with 6-0 nonabsorbable monofilament sutures.

15 More extensive GFP fluorescence of hair follicles was visualized in the collagenase-treated histocultured skin after grafting than in untreated skin. On day-8 after grafting, GFP was visualized in 75% of hair follicles in the area of maximum fluorescence in the skin graft. After grafting, the percentage of hair follicles with GFP fluorescence in collagenase-treated skin was 5.7 times greater than in hair follicles of untreated skin. See Figure 3B. GFP was visualized for similar time periods at similar efficiencies in GFP-adeno-viral treated skin grafted  
20 to immune-competent C57BL10 mice as described above for skin grafted to immuno-deficient nude mice.

25 RT-PCR was performed at day-6, -8, and -10 on GFP-transduced grafted skin. GFP-specific mRNA was amplified at each point as well. These data confirm GFP gene expression for at least 17 days in histoculture and for at least 10 days after grafting of skin to mice.

#### Example 3

##### Cloning of the *Streptomyces* tyrosinase gene, the upstream ORF-438 and the Internal Ribosome Entry Site (IRES)

30 The sequences encoding the *Streptomyces antibioticus* tyrosinase gene and ORF-438 were amplified by PCR from plasmid pIJ702 obtained from the

WO 01/42449

PCT/US00/33645

American Type Culture Collection (ATCC #35287). Katz, E., et al., *J. Gen. Microbiol.* (1983) 129:2703-2714.

- Oligomers for PCR amplification were designed according to the sequence of *S. antibioticus* tyrosinase gene and ORF-438 cDNA. Bernan, V., et al., *Gene*, 1985) 37:101-110. In order to enhance expression of the bacterial gene in mammalian cells, the ORF-438 and tyrosinase-gene TGA termination codons were altered to TAA. The Kozak consensus sequence, GCCGCCACC, was added upstream, immediately preceding the ATG initiator codon in each case to facilitate translation efficiency.
- 10 The sequence of the ORF-438 upstream primer, which included the Kozak consensus sequence was  
5'-CGGAATTGCCGCCACCATGCCGGAACTCACCCGTC-3'.  
The downstream primer sequence was  
5'-GGCTGATCATTAGTGGAGGGAAAGGGAGGAGC-3'.  
15 The sequence of the tyrosinase upstream primer, which includes the Kozak consensus sequence was  
5'-CTCGAGCCGCCCATGACCGTCCGCAAGAACCA-3'.  
The downstream primer sequence was  
5'-GGATCCTTAGACGTCGAAGGTGTAGTGC-3'.  
20 The PCR reaction conditions for both ORF-438 and tyrosinase were as follows: first denaturation at 97 °C for 10 min.; then 10 cycles of denaturation at 97 °C for 30 s; annealing at 66 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 45 s; then a final extension at 72 °C for 10 min.  
25 PCR oligomers were designed according to the sequence of the internal ribosome entry site (IRES) contained in the retroviral vector pLISN, obtained from Clonetech (Palo Alto, CA). The sequence of the upstream primer was  
5'-GGCTGATCATTGCCGCCCTCTCCCTCCCC-3'.  
The downstream primer sequence was  
5'-AGCGGCCATTATCATCGTGTCTTCAAAGG-3'.  
30 The IRES gene was amplified by PCR from pLXIN as the template. The PCR reaction conditions were as follows: first denaturation at 96°C for 10 min;

then 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s; annealing at 50 °C for 30 s; and extension at 72 °C for 45 s; then a final extension at 72 °C for 10 min.

Electrophoretic analysis demonstrated that the amplified products had the predicted sizes of 438 bp, 800 bp and 580 bp for ORF-438, tyrosinase and IRES, respectively.

Example 4

Retroviral Vector pLme/SN Construction and Packaging

The construction of pLme/SN is described. Retroviral vector pLXSN (Clonetech, Palo Alto, CA) is a murine leukemia virus-based vector containing two promoters: the 5'-long terminal repeat (5'-LTR) to control the inserted genes and the SV40 promoter to control neomycin phosphotransferase (neoR). The 800-bp tyrosinase PCR product was digested by XbaI and inserted into the HpaI/XbaI cloning site of pLXSN to obtain pLty/SN. The ORF-438 and IRES PCR products were ligated at the Bcl I site and then inserted into the EcoRI/XbaI cloning site of pLty/SN to obtain pLme/SN. Both the ORF-438 and tyrosinase genes are driven by the Moloney murine leukemia virus 5'-LTR in pLme/SN. The bicistronic sequence containing the ORF-438, IRES and tyrosinase genes under control of the 5'-LTR promoter is present in the vector.

pLme/SN was transfected into the PT67 packaging cell line using lipoTAXI (Clonetech, Palo Alto, CA; Stratagene, San Diego, CA). The transfected PT67 cell line was selected in DMEM medium containing 0.4 mg/ml G418 (Gibco BRL). The G418-resistant cells were cloned and expanded. After two weeks of selective culturing with G418, positive transfected cells, PT67-mel, were obtained.

Example 5

Expression in PT67-mel Cells

In order to confirm the expression of both the ORF-438 and the tyrosinase gene, RT-PCR analysis was used to detect their mRNA in the transfected packaging cells. The RT-PCR products demonstrated that the tyrosinase and ORF-438 genes from *S. antibioticus* were specifically amplified products from the

total RNA of pLmel/SN-transduced PT7-cells. As a control, mouse  $\beta$ -actin from both PT67-mel and PT67 cells was amplified by the RT-PCR. Electrophoretic analysis demonstrated that the amplified products from PT67-mel cells had the predicted sizes of 800 bp and 438 bp for tyrosinase and ORF-438, respectively.

5 The RT-PCR reaction with total RNA from uninfected PT67 cells did not amplify these fragments.

In more detail, PT67-mel cells were digested with trypsin and pelleted by centrifugation. Total RNA was extracted by the guanidium thiocyanate method (MicroRNA Reagent Kit, Stratagene, San Diego, CA). RNA was quantified by

10 measuring the absorbance at 260 nm. Approximately 10  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed to first cDNA chains. Reverse transcription was carried out in 20  $\mu$ l of first-strand buffer, 500  $\mu$ M of each dNTP, and 20 units of AMV reverse transcriptase (Stratagene, San Diego, CA). The PCR primer for the first strand was pORF-438 antisense and pTyr antisense. Samples were incubated at 42 °C  
15 for 50 min. The products of the reverse transcription were amplified by the PCR reaction. Mouse  $\beta$ -actin was used as a standard to control the quality of the RNA (Stratagene, San Diego, CA).

**Example 6**

20 **Tyrosinase Activity Assay**

The transfected packaging cells were screened for the expression of active tyrosinase protein by measuring tyrosinase activity in the lysates of clones of G418-resistant packaging cells. Tyrosinase activity was assessed by the method described by Nakajima *et al.* *Pigment Cell Res* (1998) 11:12-17. The pLmel/SN-infected PT67 packaging cells were plated at a density of 2,000 cells/well in 96 well plates. After 24 hours of culture, the packaging cells were washed with PBS and lysed with 1% Triton-100 (45  $\mu$ l/well). After mixing the lysates by shaking, 5  $\mu$ l of 10 mM L-DOPA were added to each well. Following incubation of the culture at 37 °C for 30 min., the absorbance was spectrophotometrically measured  
25 at 490 nm.  
30

WO 01/42449

PCT/US00/33645

The DOPA-oxidase reaction was also used to detect melanin production in intact transfected PT67 cells. The cells were incubated with 1 mg/ml of DOPA and 2 mg/ml of tyrosine in PBS (pH 7.4) for 12 hr at 37 °C as previously described. See Kugelman, T. *et al. J. Invest Dermatol* (1961) 37:66-73.

5 Using the same conditions, cell supernatants were measured for melanin content at 490 nm. Figure 3 shows PT67 clones 1-4 generate more melanin than control PT67. The tyrosinase-positive cells were identified by production of brown-colored melanin granules observed with brightfield microscopy. The brown pigment granules were observed only in pLmelSN-transfected cells.

10

#### Example 7

##### Culture of Albino-Mouse Anagen Hair Follicles

Female albino mice C57BL/6J-Tyrosinase (c-2J), 8 week old, were purchased from the Jackson Laboratory. The growth phase of the hair cycle (anagen) was induced in the back skin, which had all follicles in the resting phase of the hair cycle (telogen). After general anesthesia, a warm wax/rosin mixture was applied and then peeled off the skin, depilating all telogen hair shafts and thereby inducing the follicles to enter anagen. See Schilli *J Invest Dermatol* (1998) 111:598-604.

20 On day-6 post-depilation, when all hair follicles were in anagen, back skins of the mice were collected after sacrifice. Small pieces of the mouse skin (2 x 5 x 2 mm) were cut with a scissors, and washed three times in HBSS. The harvested skin was incubated at 37 °C in MEM with antibiotics (100 µg gentamycin per ml, 10 µg ciprofloxacin per ml, 2.5 µg amphotericin-B per ml, 25 100 IU-100 µg penicillin-streptomycin per ml) for 30 min. (Sigma). The skins were washed three times with HBSS medium to remove residual antibiotics and put into collagen-containing gels for histoculture in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and gentamycin. Cultures were maintained at 37 °C in a gassed incubator with 5% CO<sub>2</sub>.

30

Example 8Infection of Cultured Albino-Mouse Hair Follicles

The histocultured albino-mouse skin of Example 7 was co-cultured with PT67-*mel* cells as follows:

5 The PT67-*mel* cells from the highest producing clone were counted, seeded in 24-well plates, and grown at 37 °C until 80% confluence, and co-cultured with the histocultured albino skin in 24-well plates for 12, 24 and 72 hours. The histocultured skins were then mono-cultured in 24-well plates with fresh MEM medium and incubated for an additional 4-6 days. Small pieces of  
10 virus-infected skin were sampled at random. Fresh and frozen sections were prepared by standard techniques.

Melanin was observed in the hair matrix deep in the hair bulbs of the histocultures four days after retroviral infection. Melanin was also found in the upper part of the hair follicles and could be observed in both the hair matrix and hair shaft six days after infection.

15 In the initial experiments which involved co-culturing histocultured albino mouse skin with PT67-*mel* cells for 24 hours, approximately 2.5-15% of the skin histocultures contained melanin-producing hair follicles. No melanin was observed in histocultured albino-mouse skin not co-cultured with PT67-*mel*.

20 A time-course experiment was then carried out to determine if longer incubation times of the co-cultures of the albino skin and PT67-*mel* increased the efficiency of tyrosinase infection. The efficiency of infection of the histocultured skin was significantly increased with time of co-culture. After 12 hours co-culture, 7% (2 of 30 pieces) of skin produced melanin, and 15% of hair follicles (6 of 40) produced melanin. After 24 hours co-culture, 25% of skin pieces (5 of 20) produced melanin, as did 35% (28 of 80) of hair follicles. After 72 hours co-culture, 60% of skin pieces (12 of 20) produced melanin as did 53% (42 of 80) of hair follicles.

25 These results suggest that the virus titer and time exposure to virus can affect the transduction frequency.

## CLAIMS

1. A method to introduce a nucleic acid molecule into a mammalian subject which method comprises  
5 transplanting into the dermis of said subject at least one hair follicle that has been modified *ex vivo* to contain said nucleic acid molecule.
2. The method of claim 1 wherein said hair follicle has been modified *ex vivo* in a histoculture.
3. The method of claim 2 wherein said histoculture has been treated with  
10 collagenase prior to modifying said hair follicle.
4. The method of claim 1 wherein said hair follicle is in anagen.
5. The method of claim 1 wherein said follicle has been modified to contain said nucleic acid molecule by transducing with said nucleic acid or by lipofection.
- 15 6. The method of claim 1 wherein said follicle has been modified to contain said nucleic acid molecule by treating with a viral vector.
7. The method of claim 6 wherein said viral vector comprises the supernatant of a viral packaging cell, and/or wherein said viral vector comprises a retroviral vector, and/or wherein said viral vector comprises an adenoviral vector.
- 20 8. The method of claim 1 wherein said mammal is a mouse or a human.
9. The method of claim 1 wherein said nucleic acid encodes an immunogen, or wherein said nucleic acid encodes a hormone, or wherein said nucleic acid encodes a product that affects hair growth or quality.

WO 01/42449

PCT/US00/33645

10. A histocultured hair follicle, in anagen phase, modified to contain a heterologous nucleic acid molecule.
11. A method to introduce a nucleic acid molecule into a mammalian subject which method comprises transplanting into the corresponding tissue of said mammal a histocultured intact tissue that has been modified *ex vivo* to contain said nucleic acid molecule.
12. The method of claim 11 wherein said histoculture has been treated with collagenase prior to modifying said tissue with the nucleic acid.
13. The method of claim 11 wherein said modifying with nucleic acid comprises treating said tissue with a liposomal composition, or wherein said modifying comprises transducing the cells of said tissue with said nucleic acid, or wherein said modifying comprises treating said tissue with a viral vector.
14. The method of claim 11 wherein said intact tissue is dermis, or wherein said tissue is lymph tissue.
15. A method of delivering a nucleic acid to a hair follicle which method comprises maintaining said hair follicle in histoculture and treating said histoculture with a nucleic acid.
16. The method of claim 15 wherein said treating with a nucleic acid is preceded by the step of treating said histoculture with collagenase.
17. A method of delivering a nucleic acid to a intact tissue which method comprises treating a histoculture of said intact tissue with said nucleic acid.
18. The method of claim 17 wherein said treating with a nucleic acid is preceded by the step of treating said histoculture with collagenase.

WO 01/42449

PCT/US00/33645

19. The method of claim 18 wherein said tissue is skin or lymphoid.

20. A histoculture modified to contain a heterologous nucleic acid.

21. The histoculture of claim 20 which is an intact fragment of skin or lymph node.

5

WO 01/42449

PCT/US00/33645

1/3

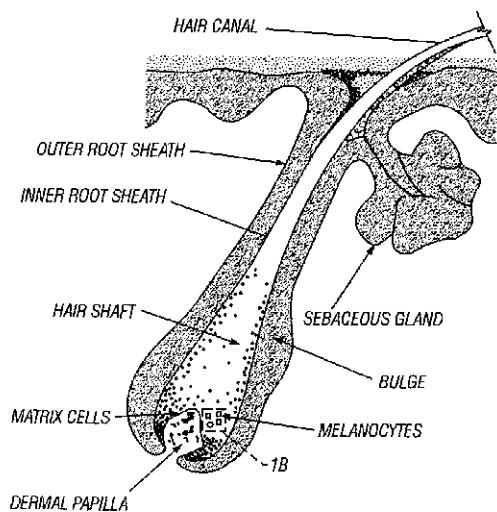


FIG. 1A

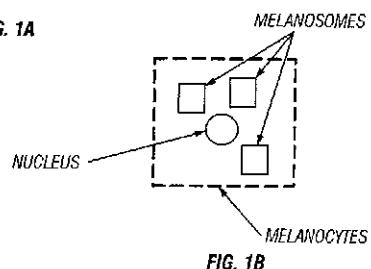


FIG. 1B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2/3

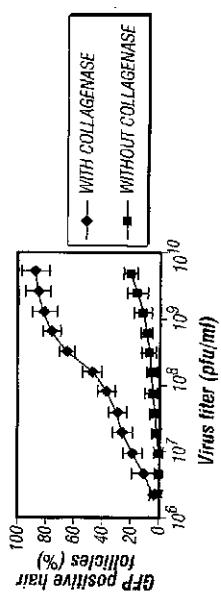


FIG. 2A

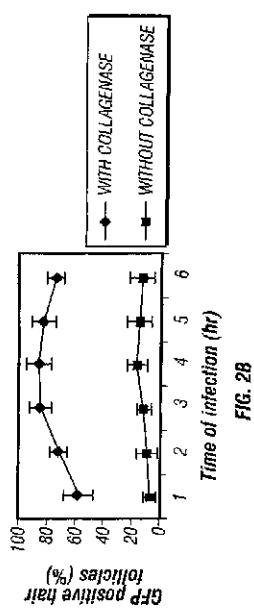


FIG. 2B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

3/3

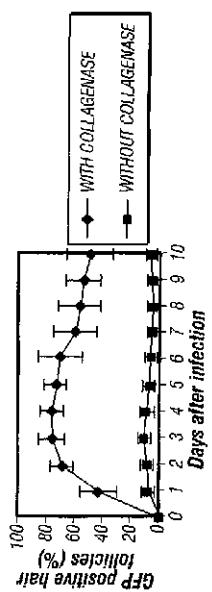


FIG. 3A

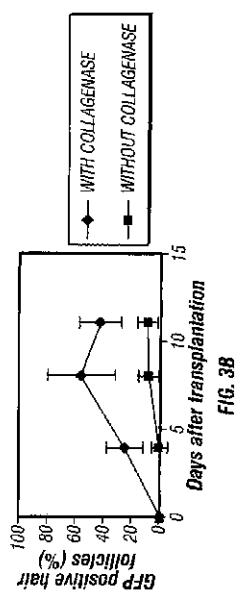


FIG. 3B

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 June 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/42449 A3(51) International Patent Classification? A61K 48/00, Apartment 3211, 3833 Nobel Drive, San Diego, CA 92122  
C12N 15/00 (US)

(21) International Application Number: PCT/US00/33645 (74) Agents: MURASHIGE, Keiji, H. et al.; Morrison &amp; Foerster LLP, Suite 500, 3811 Valley Centre Drive, San Diego, CA 92130-2332 (US)

(22) International Filing Date: 11 December 2000 (11.12.2000)

(81) Designated States (national): AU, CA, JP, KR.

(25) Filing Language: English

(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) Publication Language: English

Published:  
— with international search report

(30) Priority Data: 60/170,166 10 December 1999 (10.12.1999) US

(88) Date of publication of the international search report:  
7 February 2002

(71) Applicant: ANTICANCER, INC. [USA/US]; 7917 O Street, San Diego, CA 92111 (US)

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventors: ZHAO, Ming; Apartment 42, 4178 Decorum Street, San Diego, CA 92122 (US); SAITO, Norimitsu,



WO 01/42449 A3

(54) Title: METHODS FOR INTRODUCING GENES INTO MAMMALIAN SUBJECTS

(57) Abstract: Methods to obtain genetic modifications of cells in histoculture are described. Modification is assisted by treating the histoculture with collagenase prior to contacting the histoculture with the delivery vehicle for the desired gene. Hair follicles and other organized tissues can be modified in this way and then transplanted into intact recipients.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT																							
<p>Inte. onal Application No. PCT/US 00/33645</p>																							
<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K48/00 C12N15/00</p>																							
<p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:</p>																							
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searching (classification system based on classification symbols) IPC 7 A61K C12N</p>																							
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are identified in the fields searched</p>																							
<p>Information on data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used): EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data</p>																							
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X, P</td> <td>WO 00 05366 A (KORNELUK ROBERT G, HOLCIK MARTIN (CA); UNIV OTTAWA (CA); LISTON PE) 3 February 2000 (2000-02-03) the whole document</td> <td>1,5-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>DE 197 40 092 A (HENGGE ULRICH DR MED) 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document</td> <td>1-3,5, 8-21</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5 672 508 A (BEACH DAVID ET AL) 30 September 1997 (1997-09-30) the whole document</td> <td>1,2,5-21</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>EP 0 633 315 A (INVEST ENERGET MEDIOAMBIENT) 11 January 1995 (1995-01-11) abstract claims</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td></td> <td>---</td> <td>---</td> </tr> <tr> <td></td> <td>---</td> <td>---</td> </tr> </tbody> </table>			Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X, P	WO 00 05366 A (KORNELUK ROBERT G, HOLCIK MARTIN (CA); UNIV OTTAWA (CA); LISTON PE) 3 February 2000 (2000-02-03) the whole document	1,5-8	X	DE 197 40 092 A (HENGGE ULRICH DR MED) 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document	1-3,5, 8-21	X	US 5 672 508 A (BEACH DAVID ET AL) 30 September 1997 (1997-09-30) the whole document	1,2,5-21	X	EP 0 633 315 A (INVEST ENERGET MEDIOAMBIENT) 11 January 1995 (1995-01-11) abstract claims	10		---	---		---	---
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X, P	WO 00 05366 A (KORNELUK ROBERT G, HOLCIK MARTIN (CA); UNIV OTTAWA (CA); LISTON PE) 3 February 2000 (2000-02-03) the whole document	1,5-8																					
X	DE 197 40 092 A (HENGGE ULRICH DR MED) 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document	1-3,5, 8-21																					
X	US 5 672 508 A (BEACH DAVID ET AL) 30 September 1997 (1997-09-30) the whole document	1,2,5-21																					
X	EP 0 633 315 A (INVEST ENERGET MEDIOAMBIENT) 11 January 1995 (1995-01-11) abstract claims	10																					
	---	---																					
	---	---																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further statements are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family numbers are listed in annex.</p>																							
<p>* Special responses of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*B* earlier document but published not or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubt on novelty, claimed or which is cited to establish the publication date of another document for special reasons (as specified)</p> <p>*C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to demonstrate the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when this document is taken alone</p> <p>*Y* document in patent application form; this document cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents in such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>																							
<p>Date of the actual completion of the international search 22 June 2001</p>		<p>Date of mailing of the international search report 29/06/2001</p>																					
<p>Name and mailing address of the USA European Patent Office, P.B. Seite Patentean 2, NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 esp@nl Fax. (+31-70) 340-3010</p>		<p>Authorized officer Penzica, G</p>																					

Form PCT/ISA/20 (Rev. 01/00) (Annex 1) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Inte inal Application No PCT/US 00/33645
Category	Citation or description, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	WO 98 22589 A (UNIV YALE ;ALTIERI DARIO C (US)) 28 May 1998 (1998-05-28) the whole document ----	1-21
X	WO 96 25422 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;BILLY PATRICK J (US); GRUBER JOACHIM R) 22 August 1996 (1996-08-22) abstract page 22 page 3 example 3 ----	1,2,5-20
X	WO 94 22468 A (ANTICANCER INC ;LI LINGNA (US); LISJKO VALERYI K (US)) 13 October 1994 (1994-10-13) the whole document ----	1-3,5-20
X	WO 98 46208 A (UNIV MICHIGAN) 22 October 1998 (1998-10-22) the whole document ----	1-3,5-8
X	PARK CHAEHWA ET AL: "Production of IL-12 from gene modified human dermal fibroblasts: A preclinical study for IL-12 cancer gene therapy." EXPERIMENTAL & MOLECULAR MEDICINE, vol. 29, no. 1, 1997, pages 65-69, XP000994592 the whole document ----	11-13, 17-21
A		3
1		

Form PCT/ISA2102 (continuation of second sheet) May 1992

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Appl. No.  
PCT/US 00/33645

Patent document cited in search result	Publication date	Patent family members	Publication date
WO 0005366 A	03-02-2000	US 6159709 A US 6171821 B EP 1100900 A	12-12-2000 09-01-2001 23-05-2001
DE 19740092 A	18-03-1999	NONE	
US 5672508 A	30-09-1997	AU 700847 B AU 1747397 A CA 2242960 A EP 0877804 A JP 11509739 T WO 9727297 A	14-01-1999 20-08-1997 31-07-1997 18-11-1998 31-08-1999 31-07-1997
EP 0633315 A	11-01-1995	ES 2152753 A JP 8019352 A US 6087654 A	01-02-2001 23-01-1996 11-07-2000
WO 9822589 A	28-05-1998	US 6245523 B AU 7301898 A EP 0950103 A	12-06-2001 10-06-1998 20-10-1999
WO 9625422 A	22-08-1996	AU 708868 B AU 1917195 A EP 0815115 A JP 10509328 T NZ 282146 A US 6077692 A	12-08-1999 04-09-1996 07-01-1998 14-09-1998 28-10-1999 20-06-2000
WO 9422468 A	13-10-1994	US 5641508 A AU 6554594 A CA 2159626 A EP 0692972 A JP 2950520 B JP 8511510 T US 5753263 A US 5914126 A US 6224901 B US 5965157 A	24-06-1997 24-10-1994 13-10-1994 24-01-1996 20-09-1999 03-12-1996 19-05-1998 22-06-1999 01-05-2001 12-10-1999
WO 9846208 A	22-10-1998	NONE	

Form PCT/ISA/210 (International Search Report) (1992)

## フロントページの続き

(51) Int.CI. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 5/06	
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 5/10	
A 6 1 P 5/06	A 6 1 P 5/22	
A 6 1 P 5/10	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 5/22	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 17/14	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 33/02	1 7 1
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 33/02	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 37/04	C 1 2 Q 1/37	
A 6 1 P 43/00	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 37/24	
C 1 2 Q 1/37	A 6 1 K 37/02	

## (72)発明者 ザオ,ミング

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州,サンディエゴ,デコロ ストリート 4 1 7 8  
,アパートメント 4 2

## (72)発明者 サイトウ,ノリミツ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州,サンディエゴ,ノーベル ドライブ 3 8 3 3  
,アパートメント 3 2 1 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA08 BA31 CA04 DA02 EA02 FA02 GA11 GA13 HA17  
4B063 QA01 QQ08 QR16 QS02  
4B065 AA90X AA99Y AB01 BA02 CA24 CA28 CA44  
4C084 AA02 AA13 BA44 DA01 DB01 DC01 MA63 MA65 NA10 NA14  
ZA54 ZA55 ZA75 ZA92 ZB09 ZB32 ZB33 ZB35 ZB38 ZC03  
ZC04 ZC06 ZC19  
4C085 AA03 BA02 BA07 BA51 BB11 CC07 CC08 CC21 CC31 DD62  
EE01  
4C087 AA01 AA02 BB33 BB43 BB48 BB65 MA63 MA65 NA10 NA14  
ZA54 ZA55 ZA75 ZA92 ZB09 ZB32 ZB33 ZB35 ZB38 ZC03  
ZC04 ZC06 ZC19