

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4349660号
(P4349660)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月31日(2009.7.31)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N 9/10
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N 7/00
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00

請求項の数 37 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-552561
(86) (22) 出願日	平成11年4月16日(1999.4.16)
(65) 公表番号	特表2002-511769(P2002-511769A)
(43) 公表日	平成14年4月16日(2002.4.16)
(86) 国際出願番号	PCT/FR1999/000904
(87) 国際公開番号	W01999/054481
(87) 国際公開日	平成11年10月28日(1999.10.28)
審査請求日	平成17年12月22日(2005.12.22)
(31) 優先権主張番号	98/05054
(32) 優先日	平成10年4月17日(1998.4.17)
(33) 優先権主張国	フランス(FR)

(73) 特許権者	トランジェーヌ フランス・F-67000・ストラスブール・リュ・ドゥ・モルシム・11
(74) 代理人	弁理士 志賀 正武
(74) 代理人	弁理士 高橋 詔男
(74) 代理人	弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人	弁理士 青山 正和
(74) 代理人	弁理士 鈴木 三義

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ活性を有する変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

天然UPRTアーゼの第2ATGコドンの上流部のN末端領域を欠失することによって、上記天然UPRTアーゼから得られたことを特徴とするウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ(UPRTアーゼ)活性を有するポリペプチド。

【請求項2】

位置1においてMet残基で始まり、位置216においてVal残基で終わる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】

位置2においてセリン残基からアラニン残基への置換をさらに含むことを特徴とする請求項2記載のポリペプチド。

【請求項4】

上記天然UPRTアーゼによって示されるよりもより高いUPRTアーゼ活性を示すことを特徴とする請求項1から3のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項5】

上記ポリペプチドがフレーム内で、シトシンデアミナーゼ(CDアーゼ)活性を示し且つ天然シトシンデアミナーゼから得られる少なくとも第2のポリペプチドと融合される、融合ポリペプチドであることを特徴とする請求項1から4のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項6】

10

20

第2のポリペプチドとの融合が、上記ポリペプチドのN末端で実行されることを特徴とする請求項5記載のポリペプチド。

【請求項7】

上記天然CDアーゼが酵母CDアーゼであることを特徴とする請求項5または6記載のポリペプチド。

【請求項8】

上記酵母CDアーゼがサッカロミセス セレピシエFCY1遺伝子によってコードされたものであることを特徴とする請求項7記載のポリペプチド。

【請求項9】

位置1においてMet残基で始まり位置373においてVal残基で終わる配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項7記載のポリペプチド。

10

【請求項10】

上記天然CDアーゼのそれよりもより高いCDアーゼ活性を示すことを特徴とする請求項5から9のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項11】

請求項1から10のいずれか1項記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項12】

宿主細胞中のその発現に要求される要素の制御の下に配された請求項11記載のポリヌクレオチドを運ぶ組換えベクター。

【請求項13】

20

上記ベクターが、そのベクターのトランスフェクションの有効性及び/又は安定性を改善する1又はそれ以上の物質と適切に結合した、プラスミド及びウイルスベクターからなる群から選択されることを特徴とする請求項12記載の組換えベクター。

【請求項14】

上記ベクターが、ボックスウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アルファウイルス、フォーミーウイルス又はアデノウイルス関連ウイルスから得られるウイルスベクターであることを特徴とする請求項13記載の組換えベクター。

【請求項15】

上記ベクターが、複製のために必須であり且つE1, E2, E4及びL1-L5から選択される少なくとも1の領域の全部又は一部を欠くアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項13又は14記載のベクター。

30

【請求項16】

上記ベクターが、非必須E3領域の全部又は一部を更に欠くアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項15記載のベクター。

【請求項17】

発現に要求される要素がプロモーターを含むことを特徴とする請求項12から16のいずれか1項記載の組換えベクター。

【請求項18】

上記プロモーターがサイトメガロウイルス(CMV)早期プロモーターであることを特徴とする請求項17記載の組換えベクター。

40

【請求項19】

インターロイキンIL-2、IL-4、IL-7、IL-10とIL-12、インターフェロン、腫瘍壊死因子(TNF)、コロニー刺激因子(CSF)及び新脈管形成で作用する因子をコードしている遺伝子から選択される1又はそれ以上の興味ある遺伝子をさらに含むことを特徴とする請求項12から18のいずれか1項記載の組換えベクター。

【請求項20】

興味ある遺伝子が、IL-2とINFから選択されるポリペプチドをコードすることを特徴とする請求項19記載の組換えベクター。

【請求項21】

上記ベクターが、ワクシニアウイルスから由来するボックスウイルスベクターであること

50

を特徴とする請求項 1 4 記載の組換えベクター。

【請求項 2 2】

上記ベクターが、MVA ウイルスから由来するボックスウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 4 記載の組換えベクター。

【請求項 2 3】

(i) 請求項 1 2 から 2 2 のいずれか 1 項記載の組換えベクターが、トランスフェクションした細胞が得られるようにトランスで上記ベクターを補うことができる細胞内に導入され、

(i i) 上記トランスフェクションした細胞が、ウイルス粒子が生産できるのに適切とされる条件下で培養され、及び

(i i i) 上記ウイルス粒子が細胞培養物から回収される、
ウイルス粒子の製造方法。

10

【請求項 2 4】

請求項 1 2 から 2 2 のいずれか 1 項記載の組換えベクターを含む、又は請求項 2 3 記載の方法に従って得られたウイルス粒子。

【請求項 2 5】

請求項 1 1 記載のポリヌクレオチド又は請求項 1 2 から 2 2 のいずれか 1 項記載の組換えベクターを含む、又は請求項 2 4 記載のウイルス粒子で感染された、宿主細胞。

【請求項 2 6】

薬学的に許容される賦形剤と組合せて、請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 1 1 記載のポリヌクレオチド、請求項 1 2 から 2 2 のいずれか 1 項記載の組換えベクター、請求項 2 4 記載のウイルス粒子又は請求項 2 5 記載の宿主細胞を含む組成物。

20

【請求項 2 7】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと、CDアーゼ活性を示す興味ある第 2 のポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 2 6 記載の組成物。

【請求項 2 8】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをコードしている請求項 1 1 記載のポリヌクレオチドと、CDアーゼ活性を示すポリペプチドをコードする興味ある第 2 のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 2 6 記載の組成物。

30

【請求項 2 9】

請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと、IL - 2 と INF から選択される興味ある第 2 のポリペプチドとを含むことを特徴とする請求項 2 6 記載の組成物。

【請求項 3 0】

請求項 1 1 記載のポリヌクレオチドと、IL - 2 と INF から選択されるポリペプチドをコードする興味ある第 2 のポリヌクレオチドとを含むことを特徴とする請求項 2 6 記載の組成物。

【請求項 3 1】

遺伝子治療によって又は組換えルートによって生産されているタンパク質を投与することによってヒト又は動物体を治療するために意図された薬剤の製造のための請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 1 1 記載のポリヌクレオチド、請求項 1 2 から 2 2 のいずれか 1 項記載の組換えベクター、請求項 2 4 記載のウイルス粒子又は請求項 2 5 記載の宿主細胞の使用。

40

【請求項 3 2】

望ましくない細胞増殖から生じる癌、腫瘍及び疾患を治療することを意図した薬剤の製造のための請求項 3 1 記載の使用。

【請求項 3 3】

- 請求項 1 1 記載のポリヌクレオチドが形質転換細胞を生成するために細胞中に導入され、

- 上記形質転換細胞が、ポリペプチドを生産するために適切とされる条件下で培養され

50

、且つ

- 上記ポリペプチドが細胞培養物から収穫される、
請求項 1 から 10 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 3 4】

5 - フルオロシトシン (5 - F U) の細胞毒性作用を有力にする 1 又はそれ以上の物質を更に含むことを特徴とする請求項 2 6 から 3 0 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 3 5】

5 - フルオロシトシン (5 - F U) の細胞毒性作用を有力にする物質が、ピリミジンのデノボ合成のための経路の酵素を阻害する薬剤であることを特徴とする請求項 3 4 記載の組成物。

【請求項 3 6】

5 - フルオロシトシン (5 - F U) の細胞毒性作用を有力にする物質が、ロイコボリン及びメトトレキサートから選択されることを特徴とする請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

5 - フルオロシトシン (5 - F U) の細胞毒性作用を有力にする物質が、P A L A、レフルノミドの代謝活性物、及びブレキナル (Brequinar) から選択されることを特徴とする請求項 3 5 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

本発明は、ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ (U P R T アーゼ) 活性を有し且つ上記 U P R T アーゼの 1 又はそれ以上の残基が変異されることによって天然 U P R T アーゼから誘導されるポリペプチドに関する。本発明はまた、この変異体 U P T R T アーゼをコードするヌクレオチド配列、この後者の変異体を発現するためのベクター、ウイルス粒子と宿主細胞、及びそれを含む組成物にも関する。最後に、本発明はまた、その治療の使用、及びその手段を提供する治療方法をも導く。本発明は、特に増殖性の及び感染性の疾患に関しての適用のための自殺遺伝子治療 (suicide gene therapy) の状況において特に有用である。

遺伝子治療は、宿主細胞又は生体への遺伝的情報の転移であると定義される。ヒトに適用された最初のプロトコルは、アデニンデアミナーゼ (ADA) をコードしている遺伝子が冒された変異のために遺伝的な免疫不全となった患者について、1990年9月に米国で始められた。この最初の実験の相対的な成功は、遺伝的な病気 (不完全遺伝子の機能不全を治す目的を持つ) と、後天的疾患 (癌、A I D S などのような感染性疾患) の両方を含む、各種の疾患のためのこのアプローチの発展に希望を与えた。この技術は、発現産物が不活性物質 (プロドラッグ) の細胞毒性物質への形質転換、それによって細胞死を生起することができる遺伝子を用いる「自殺遺伝子 (suicide gene)」治療を含むことから、非常に多数の開発が試みられている。1992年に、幾つかのグループが、腫瘍を治療するための及び A I D S に応答可能である、H I V ウイルスの播種性を抑制するためのこの新規のアプローチの関連性を実証した。

この関係において、単純ヘルペス 1 型ウイルスチミジンキナーゼをコードしている遺伝子 (H S B - 1 T K) が自殺遺伝子の原型を構成する (Caruso等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90, 7024-7028; Culver等, 1992, Science 256, 1550-1552; Ram等, 1997, Nat. Med. 3, 1354-1361)。その T K ポリペプチドがそのような毒性でない一方、アシクロビル又はガンシクロビル (G C V) のようなヌクレオシド類似体の形質転換を触媒する。修飾されたヌクレオシドは、延長のプロセスにおいて、結果として細胞分裂を阻害するものとして D N A 鎖に取り込まれる。多数の自殺遺伝子 / プロドラッグのペアが現在利用可能である。特に言及され得るそれらは、ラットシトクロム p 4 5 0 とシクロホスファミド [sic] (Wei等, 1994, Human Gene Therapy 5, 969-978)、大腸菌 (E. Coli) プリンヌクレオシドホスホリラーゼと 6 - メチルプリンデオキシリボヌクレオシド (Sorscher等, 1994, Gene Therapy 1, 223-238)、大腸菌グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼと 6 - チオキサンチン (MzozとMoolten, 1993, Human Gene Therapy 4, 589-595) 及びシトシンデアミナーゼ (C D アーゼ) と 5 - フルオロシトシン (5 F C) である。

10

20

30

40

50

CDアーゼは、外来のシトシンが加水分解脱アミノ化によってウラシルに転換されること
 によってピリミジン代謝経路中に含まれる。CDアーゼ活性は原核生物と下等な真核生物
 で示されている(JundとLacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615; Beck等, 1972, J. Bacteriol. 110, 219-228; De Haan等, 1972, Antonie van Leeuwenhoek 38, 257-263; Hoepriech等, 1974, J. Inf. Dis. 130, 112-118; EsdersとLynn, 1985, J. Biol. Chem. 260, 3915-3922)一方で、
 それらは哺乳動物において存在していない(Koechlin等, 1966, Biochem Pharmacol. 15, 435-446; Polak等, 1976, Chemotherapy 22, 137-153)。サッカロミセス セレビスエ(S. cerevisiae) F C Y 1 と大腸菌 c o d A 遺伝子、これら2つの生体のCDアーゼをそれぞれコードする、が知られ、且つその配列は公表されている(EP 402 108; Erbs等, 1997, Curr. Genet. 31, 1-6; WO93/01281)。

10

CDアーゼはまた、シトシンの類似体、即ち5 - フルオロシトシン(5 - F C)を脱アミノ化し、それによって、それが5 - フルオロ - U M P (5 - F U M P に変換される場合に高い細胞毒性となる化合物である5 - フルオロウラシル(5 - F U)を形成する。その酵素をコードしている遺伝子を不活性化する変異のため又はそれが哺乳動物細胞のように、この酵素を自然に欠いているためのいずれか一方によって、CDアーゼ活性を欠く細胞は、5 - F C に耐性である(JundとLacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615; Kilstrup等, 1989, J. Bacteriol. 1989 171, 2124-2127)。反対に、転移されたCDアーゼ活性をコードしている配列を含む哺乳動物細胞は、5 - F C に感受性になる(Huber等, 1993, Cancer Res. 53, 4619-4626; Mullen等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 33-37; WO 93/01281)。加えて、隣接した未形質転換細胞もまた、5 - F C に感受性になる(Huber等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8302-8306)。パイスタンダー効果と称される、この現象は、5 - F U を分泌するCDアーゼ活性を発現し、そして原形質膜を横切って直進する拡散によって隣接する細胞を中毒させる細胞のためである。受動的拡散における5 - F U のこの性質は、そのパイスタンダー効果が t k を発現している細胞と接触させることを要する、t k / G C V 参照系と比較して有効性を表す(Mesnil等, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1831-1835)。遺伝子治療の、特に抗癌遺伝子治療の状況の中でCDアーゼが提供する効果の全ては、従って容易に理解できる。

20

しかしながら、5 - F C への感受性は、使用した細胞系に基づいて相当に変化する。例えば、低い度合の感受性が、大腸菌 c o d A 遺伝子を発現するレトロウイルスによって転移されているヒト腫瘍細胞系 P A N C - 1 (膵臓癌)及びS K - B R - 3 (胸腺癌)において観測される(Harris等, 1994, Gene Therapy 1, 170-175)。この望ましくない現象は、細胞毒性5 - F U M P に変換されないか、又は低いレベルでのみ変換されるいずれか一方のCDアーゼの酵素作用によって形成される5 - F U によって説明できる。オロチン酸ホスホリボシル[sic]トランスフェラーゼによって哺乳動物細胞において正常に生み出される(Peters等, 1991, Cancer 68, 1903-1909)この段階は、特別な腫瘍を不在として良く且つそれによってCDアーゼベースの遺伝子治療を無効にする。

30

原核生物及び下等な真核生物において、ウラシルは、ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ(U P R T アーゼ)によってU M P に転換される。この酵素はまた、5 - F U を5 - F U M P に変換する。かくして、酵母サッカロミセス セレビスエのf u r 1 変異体は、U P R T アーゼ活性がないことによって、CDアーゼによって5 - F C の脱アミノ化から生じる5 - F U が細胞毒性5 - F U M P に変換しないために、高濃度の5 - F U (10 m M)及び5 - F C (10 m M)に耐性である(JundとLacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615)。大腸菌とS . セレビスエU P R T アーゼをそれぞれコードするu p p とF U R 1 遺伝子は、クローン化され且つ配列決定されている(Andersen等, 1992, Eur. J. Biochem. 204, 51-56; Kern等, 1990, Gene 88, 149-157)。

40

これらの欠点を改善するために、従来技術の文献WO-A-96/16183は、CDアーゼとU P R T アーゼ活性を持っている2のドメイン酵素をコードする融合タンパク質を用いることを推奨し、且つ発現プラスミドによって運ばれた、ハイブリッドc o d A : : u p p 又はF C Y 1 : : F U R 1 遺伝子の転移が5 - F C にトランスフェクションされたB 1 6 細胞の感受性を増すことをインビトロで示す。

50

本発明は、そのN末端部分で欠失されたUPRTアーゼをコードする変異したFUR1遺伝子を用いる従来技術の改良である。本発明は、開始ATGコドンの後に、FUR1遺伝子が天然タンパク質の位置36でメチオニンをコードしている第2のATGコドンを含むという観測から生じる。

FUR1遺伝子は、そのコード化部分の5'末端で105ヌクレオチドを欠いて現に構成され、それによって最初の35N末端残基が欠失されており、且つ天然タンパク質中の位置36中でメチオニンで始まるUPRTアーゼを合成することを可能にする。FUR1105と定義した変異体遺伝子の発現生成物は、S.セレビシエfur1変異体を補うことができることが示されており、それによって機能的であることを示している。驚くべきことに、その切り詰めた変異体は、一致する遺伝子を発現するプラスミドによってトランスフェクションしたCOS7細胞で実行されている酵素アッセイにより試験される通り、天然酵素のそれよりもより大きいものであるUPRTアーゼ活性を呈する(野生型遺伝子と比較してのFUR1105遺伝子)。それらが5-FU耐性であるために選択された3つのヒト腫瘍細胞系は、アデノウイルスベクターによって運ばれた変異体遺伝子によって形質導入され、インビトロで5-FUに対する増加した感受性を呈する。5-FCに対する感受性もまた、もしその細胞がFCY1とFUR1105をそれぞれ発現するアデノウイルスと共感染されるなら、FCY1を唯一発現するアデノウイルスによる感染と比較して、増加する。さらに驚くべきことには、ハイブリッドFCY1::FUR1105遺伝子によって生産され、FCY1と切り詰めたFUR1遺伝子のフレーム内融合で生じた融合タンパク質は、そのUPRTアーゼ活性を保持するが、しかし天然FCY1生産物を用いて測定したそれと比較して10から30のファクターによって増加するCDアーゼ活性を示す。二官能タンパク質の高いCDアーゼ活性は、実質上バイスタンダー効果を生じる5-FUのプールを形成することを可能にする。WO-A-96/16183のCDアーゼ::UPRTアーゼ融合タンパク質のCDアーゼ活性が改善されることを示さない点が注目される。

本発明は、より有効な変異体を提供し、それによって5-FCに対する細胞の感受性を増加すること及び自殺遺伝子を用いる遺伝子治療の見通しを改善することを可能にする。この変異体は、非常に多くの適用、特に抗癌及び抗ウイルス適用、及び細胞死を要する全ての適用のために使用できる。

この理由のために、本発明は、少なくともUPRTアーゼの1又はそれ以上の残基の変異によって天然UPRTアーゼから得られたことを特徴とするウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ(UPRTアーゼ)を持つポリペプチドに関する。

本発明の意味する範囲内で、UPRTアーゼ活性を持つポリペプチドは、ウラシルを、又はその誘導体の一つを、モノホスファート類似体に、特に5-FUを5-FUMPに変換することができるポリペプチドに関する。「変異」は、上記ポリペプチド中の何れかのサイトで1又はそれ以上の残基の付加、欠失及び/又は置換をなすことと解される。

本発明に従うポリペプチドが得られる天然UPRTアーゼは、いずれの起源とすることもでき、特に原核生物、真菌又は酵母起源とすることができる。説明のために、大腸菌からの(Anderson等,1992,Eur.J.Biochem 204,51-56)、ラクトコッカス ラクチスからの(MartinussenとHammer,1994,J.Bacteriol.176,6457-6463)、マイコバクテリウム ボビスからの(Kim等,1997,Biochem Mol.Biol.Int 41,1117-1124)及びバチルス ズブチルスからの(Martinussen等,1995,J.Bacteriol.177,271-274)からのUPRTアーゼが本発明の状況の中で使用することができる。しかしながら、特に好適なものは、酵母UPRTアーゼ、特にKern等(1990,Gene 88,149-157)において配列が開示されるS.セレビシエFUR1遺伝子によってコードされたそれを用いることにより与えられる。情報のために、その遺伝子の情報、及び一致するUPRTアーゼのそれは、文献において及び特殊化されたデータベース(SWISSPROT,EMBL,Genbank,Medline,etc.)において見出すことができる。

一つの特有の有利な実施態様に従い、本発明に従うポリペプチドは、天然UPRTアーゼの欠失変異体である。その欠失は、元のUPRTアーゼのN末端領域中に好ましくは設けられる。その欠失は、全体的(上記N末端領域の全ての残基に影響する)又は部分的(最初

10

20

30

40

50

の構造に連なり得る又は得ない1又はそれ以上の残基に影響する)とすることができる。一般的な手法において、ポリペプチドは、N末端部、中央部及びC末端部からなり、それぞれの部分が分子のほぼ3分の1を表している。例えば、251アミノ酸を含むS・セレピシエUPRTアーゼのケースにおいて、そのN末端部分は最初の83残基からなり、天然型の最初の位置に設けられる、開始メチオニンと称したそれによって始まる。大腸菌UPRTアーゼのケースにおいて、N末端部分は位置1から69をカバーする。

この好適な実施態様は、該分子の何れかのサイトで1又はそれ以上の付加変異と勿論結合できる。好ましくは、その付加の修飾は、本発明に従うポリペプチドのUPRTアーゼ酵素特性に顕著な影響を及ぼさない。該変異体の生物学的活性が、特に以下の実施例中に記載される技術を用いて試験できる点が注目される。

10

非常に好ましくは、本発明に従うポリペプチドは、上記天然UPRTアーゼの第2ATGコドンのN末端領域上流の全部又は一部を少なくとも欠失することによって、天然UPRTアーゼから得られる。前述の領域の全体的欠失が好ましい。例えば、FUR1遺伝子によってコードされたUPRTアーゼは、位置+36中の第2に続き位置+1で最初のATGコドン(開始ATGコドン)を含む。かくして、それは本発明の状況の中で残基+1から35の欠失を考察することが可能であり、それによって天然型の位置+36において通常見出されるメチオニンで始まるポリペプチドを与える。

本発明に従う好適なポリペプチドは、位置1のMet残基で始まり、位置216のVal残基で終わる、配列番号:1で実質上表されるアミノ酸配列を含む。用語「実質上」は、70%より高い、有利には80%より高い、好ましくは90%より高い、特に好ましくは95%より高い配列番号:1との同一性の度合に関する。更により好ましくは、該ポリペプチドは配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含む。上述した通り、それは付加の変異体を含むことができる。アラニン残基による位置2(天然UPRTアーゼにおいて位置37)でのセリン残基の置換が特に言及され得る。

20

有利には、本発明に従うポリペプチドは、上記天然UPRTアーゼによって示されるそれよりも容易に判断可能なより高いUPRTアーゼ活性を示す。後述する実施例で提供される結果は、5-FUから5-FUMPへの変換がより急速に及び/より効率的であることが明瞭に示され、トランスフェクションした又は形質導入した細胞に関する細胞毒性のより高い度合でそれ自身を証明している。有利には、本発明に従うポリペプチドのUPRTアーゼ活性は、2から100までの、好ましくは5から75まで、及び非常に好ましくは10から50までのファクターによって天然UPRTアーゼによって示されたそれよりも大きい。

30

別の実施態様に従い、本発明に従うポリペプチドは、少なくとも第2のポリペプチドとフレーム内で融合される融合ポリペプチドである。該融合が第1のポリペプチド中の何れかのサイトで実行されるとしても、そのN又はC末端、特にN末端が好適とされる。有利には、該フレーム内融合は、本発明に従う融合タンパク質がCDアーゼとUPRTアーゼ活性を呈するように、シトシンデアミナーゼ(CDアーゼ)活性を示し且つ天然シトシンデアミナーゼから得られる第2のポリペプチドを用いる。FCY1::FUR1融合(以下、FCU1と定義した)が好適である。そのような二官能性ポリペプチドは、5-FCと5-FUに対する標的細胞の感受性を改善することを可能にする。「シトシンデアミナーゼ活性」は、シトシン又はその類似体の一つの脱アミノ化をカバーするとして解される。好ましくは、本発明に従う該第2のポリペプチドは、5-FCを5-FUに代謝することができる。

40

原核生物の又は下等な真核生物起源のCDアーゼが、本発明の状況の中で使用される。更により好ましくは、CDアーゼは、酵母CDアーゼ、特にサッカロミセス セレピシエFCY1遺伝子によってコードされたそれである。異なる起源のCDアーゼをコードする遺伝子のクローン化と配列は、文献中及び特殊化されたデータベースで利用可能である。情報のため、FCY1遺伝子の配列は、Erbs等(1997,Curr.Genet.31,1-6)中に開示される。天然酵素のそれに匹敵する又は優る変換能力を持つCDアーゼ変異体を使用することも勿論可能である。当業者であれば、公表されたデータの基礎の上にCDアーゼをクローン化

50

すること、何れかの変異を実行すること、当該分野の技術に従って無細胞又は細胞系において変異型の酵素活性を試験すること、又は後述で与えられるプロトコルに続いて、及びフレーム内CDアーゼとUPRTアーゼ活性を有するポリペプチドを融合することができる。

好ましい実施例は、位置1のMet残基で始まり、位置373のVal残基で終わる配列番号：2で実質上表されるアミノ酸配列を含む。用語「実質上」は、前記の通り定義される。配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドは、本発明を実行するために特に適切である。

有利な実施態様に従い、本発明の二官能ポリペプチドは、上記天然のCDアーゼのそれよりも容易に検知可能なより高いCDアーゼ活性を示す。かくして、二つの酵素を結合することを次に示す実施例は、5-FCに対する標的細胞の感受性を増加することができる。感受性が増加されることによってそのファクターは、有利には少なくとも2、好ましくは少なくとも5、及び、特に好ましくは10又はそれ以上である。

一般的な手法において、本発明に従うポリペプチドは、化学合成の通常の方法によって又は組換えDNA技術(例えばManiatis等,1989,Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NYを参照)のいずれか一方で生産することができる。

この理由のため、本発明はまた、形質転換細胞を生成するために細胞内に導入される上記ポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列の製造方法をも含み、上記形質転換細胞は、上記ポリペプチドを製造することができる適切な条件下で培養され、且つ上記ポリペプチドは細胞培養物から収穫される。その生産細胞は、制限されることなしに、考慮の下にそのヌクレオチド配列がそのゲノム内に統合され又は複製することができる適切な発現ベクター内に統合されるいずれか一方とされる程度に、細菌、酵母又は哺乳動物細胞の何れかの起源のものとするすることができる。自然には、該ヌクレオチド配列は、生産細胞中でそれが発現できるように転写及び翻訳シグナルの制御の下に設けられる。発現ベクターと制御シグナルは、当業者に周知である。該ポリペプチドは、培地又は細胞(それが溶解された後)から回収することができ、通常の精製工程(クロマトグラフィー、電気泳動、濾過、免疫精製などによって)にかけられる。

本発明はまた、本発明に従うポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にも関する。該ヌクレオチド配列は、cDNA又はゲノムの配列とすること又は混合したタイプとすることができる。適切な場合、それは宿主細胞における発現を増加するため、天然、異種(例えばウサギ-グロブリン遺伝子など)、又は合成起源とされるこれらと共に一又はそれ以上のイントロンを含むことができる。既に記載されている通り、上記配列は、天然酵素から誘導されるポリペプチド、或いは匹敵する又は優る活性を示す変異体をコードすることができる。本発明の状況の中で使用される配列は、分子生物学の通常の方法によって、例えば特異的なプローブによるライブラリーのスクリーニングによって、発現ライブラリーの免疫スクリーニングによって又は適当なプライマーを用いたPCRによって、又は化学合成によって得ることができる。該変異体は、部位特異的変異誘発、PCR、制限酵素と結紮酵素による消化の技術を用いて一又はそれ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加によって、又はその他の化学合成によって天然配列から生産することができる。該変異体の能力と機能に対する構成は、酵素活性を測定することによって又は5-FC及び/又は5-FUに対する標的細胞の感受性を測定することによって証明することができる。

本発明はまた、宿主細胞においてその発現のために要求される要素(elements)の制御下に設けられる本発明に従うヌクレオチド配列を運ぶ組換えベクターにも関する。該組換えベクターは、プラスミド又はウイルス起源とすることができ、適切な場合、該ベクターの転移有効性及び/又は安定性を改善する一又はそれ以上の物質と組み合わせることができる。これらの物質は、当業者に利用可能である文献中に広範に記載される(例えば,Felgner等,1987,Proc.West.Pharmacol.Soc.32,115-121;HodgsonとSolaiman,1996,Nature Biotechnology 14,339-342;Remy等,1994,Bioconjugate Chemistry,5,647-654)。非制限的な説明のため、その物質は、ポリマー、脂質、特にカチオン性脂質、リボソーム、核タンパク質

10

20

30

40

50

又は中性脂質とすることができる。これらの物質は、単独で又は組み合わせて使用することができる。考察され得る組合せは、カチオン性脂質(D O G S、D C - C H O L、スペリミン-コール、スペリミジン-コールなど)又は中性脂質(D O P E)と結合した組換えプラスミドベクターのそれである。

本発明の状況の中で使用することができるプラスミドの選択は、非常に多数である。それはクローン化ベクター及び/又は発現ベクターとすることができる。一般的な手法において、それらは当業者に知られており、その幾つかは商業的に利用可能であると同時に、それはまた遺伝子操作の技術を用いてそれを構築する又はそれを修飾することも可能である。言及され得る実例は、p B R 3 2 2 (Gibco BRL)、p U C (Gibco BRL)、pBluescript(Stratagene)、p R E P 4、p C E P 4 (Invitrogene)又はp Poly(Lathe等,1987, Gene 57,193-201)である。好ましくは、本発明の状況において使用されるプラスミドは、複製が生産細胞及び/又は宿主中で開始されることが保証される複製の起源を含む(例えば、そのC o 1 E 1起源は、大腸菌中で生産されることが意図されるプラスミド用に選択されるであろうし、且つo r i P / E B N A 1系は哺乳動物宿主細胞において該プラスミドが自己複製化されるであろうことが望まれるならば選択されるであろう、LuptonとLevine,1985, Mol.Cell.Biol.5,2533-2542; Yates等,Nature 313,812-815)。該プラスミドは、トランスフェクションした細胞を選択又は同定することができる選択遺伝子を更に含むことができる(栄養要求性変異の相補性、抗生物質に対する耐性をコードしている遺伝子など)。勿論、該プラスミドは、与えられた細胞においてその維持性及び/又はその安定性を改善する補足の要素を含むことができる(モノマー形態でプラスミドの維持を促進するc e r配列(SummersとSherrat,1984,Cell 36,1097-1103,細胞ゲノムへの統合のための配列)。

ウイルスベクターに関して、ボックスウイルスから(ワクシニアウイルス、特にM V A、カナリーボックスウイルスなど)、アデノウイルスから、レトロウイルスから、ヘルペスウイルスから、アルファウイルスから、フォーミー(foamy)ウイルスから、又はアデノウイルス関連ウイルスから得られるベクターを意図することができる。好ましくは、複製されない及び統合されないベクターを用いることで与えられるであろう。この関係において、アデノウイルスベクターが、本発明の実施のために特に好適である。

レトロウイルスは感染する特性を有し、多くのケースにおいて分割細胞に統合化を生じ、且つこれに関連して癌への関連における使用のために特に適切である。本発明に従う組換えレトロウイルスは一般に、後述したそれらのようなレトロウイルスL T Rの又は内部プロモーターの制御の下に設けられる、L T R配列、被包領域及び本発明に従うヌクレオチド配列を含む。該組換えレトロウイルスは、何れかの起源(ネズミ、霊長類、ネコ科動物、ヒトなど)のレトロウイルスから、特にM o M u L V (MoIoneyネズミ白血病ウイルス)、M V S (ネズミ肉腫ウイルス)又はFriendネズミレトロウイルス(F b 2 9)から得ることができる。それは、ウイルス粒子を構成するために要求されるウイルスポリペプチドg a g , p o l及び/又はe n vの途中で供給できる被包細胞系において増殖される。そのような細胞系は、文献中に記載される(PA317, Psi CRIP GP+Am-12など)。本発明に従うレトロウイルスベクターは、特にL T R s (真核生物プロモーターの持つプロモーター領域の置換)又は被包領域(異種被包領域、例えばV L 3 0タイプによる置換)における置換を含む(フランス出願94 08300と97 05203を参照)。

好ましくは、複製のために必須であり且つ宿主生物又は環境の中で増殖しているベクターを避けるためE 1 , E 2 , E 4 , 及びL 1 - L 5領域から選択される少なくとも1の領域の全て又は一部を欠くアデノウイルスベクターを用いることで与えられるであろう。E 1領域の欠失が好適である。しかしながら、それは、特に不完全な必須の機能が補足細胞系及び/又はヘルパーウイルスによって途中で補われる程度にE 2 , E 4及び/又はL 1 - L 5領域の全部又は一部に影響を及ぼす他の修飾/欠失と組み合わせることができる。これに関して、それは当該技術の状態の二次生成ベクターを使用することが可能である(例えば、国際出願WO-A-94/28152とWO-A-97/04119を参照)。説明のために、E 1領域とE 4転写ユニットの主要な部分の欠失は、特に有利である。クローン化能力の増加の目的のため、アデノウイルスベクターは、必須でないE 3領域の全部又は一部を更に欠くことがで

10

20

30

40

50

きる。別な改変に従い、5' と 3' I T R s (変換した末端繰り返し) と称す被包のために必須とされる、及び被包領域の配列を保持する最小アデノウイルスを使用することができる。該ウイルスのアデノウイルスベクター、及びその製造のための技術は知られる(例えば、GrahamとPreveet, 1991, in *Methods in Molecular Biology*, Vol 7, p 109-128; Ed: E. J. Murey, The Human Press Inc)。

さらに、本発明に従うアデノウイルスベクターの起源は、種の観点から及び血清型の観点からの両方で変更できる。該ベクターは、ヒト又は動物(イヌ、トリ、ウシ、ネズミ、ヒツジ、ブタ、類人猿など)起源のアデノウイルスのゲノムから又は少なくとも2の異なる起源のアデノウイルスゲノムフラグメントを含むハイブリッドから得ることができる。特に挙げられるものは、イヌ起源の C A V - 1 又は C A V - 2 アデノウイルス、トリ起源の D A V アデノウイルス又はウシ起源の B a d タイプ3 アデノウイルスである(Zakharchuk 等, *Arch. Virol.*, 1993, 128: 171-176; SpibeyとCavanagh, *J. Gen. Virol.* 1989, 70: 165-172; Jovenne等, *Gene*, 1987, 60: 21-28; Mittal等, *J. Gen. Virol.*, 1995, 76: 93-102)。しかしながら、好ましくは血清型Cアデノウイルス、特にタイプ2又は5血清型Cアデノウイルスから好適に得られるヒト起源のアデノウイルスベクターに対し与えられるであろう。

本発明に従うアデノウイルスベクターは、結紮又は同種組換え(例えば、国際出願WO-A-96/17070を参照)によって又は相補細胞系での組換えによって大腸菌(*E. coli*)においてインビトロで生産できる。

発現のため要求される要素は、ヌクレオチド配列からポリペプチドへの翻訳を可能にする全ての要素からなる。これらの要素は、特に、調節可能な又は構成され得るプロモーターを含む。勿論、該プロモーターは、選択したベクターと宿主細胞に好適である。言及され得る実例は、P G K (ホスホグリセレートキナーゼ)の真核性プロモーター、M T (メタロチオネイン; McIvor等, 1987, *Mol. Cell Biol.* 7, 838-848)、 γ -1 アンチトリプシン、C F T R、界面活性剤、免疫グロブリン、 α -アクチン(Tabin等, 1982, *Mol. Cell Biol.* 2, 426-436)及びS R (Takebe等, 1988, *Mol. Cell Biol.* 8, 466-472)遺伝子、S V 4 0 ウイルス(シミアンウイルス)の早期プロモーター、R S VのL T R(ラウス肉腫ウイルス)、H S V - 1 T Kプロモーター、C M V ウイルス(サイトメガロウイルス)の早期プロモーター、p 7 . 5 k p H 5 R、p K 1 L、ワクシニアウイルスのp 2 8 と p 1 1 プロモーター、及びE 1 A と M L P アデノウイルスプロモーターである。プロモーターはまた、腫瘍又は癌細胞中で発現を刺激するプロモーターとすることができる。特に挙げられるものは、乳癌と前立腺癌で過剰発現されるM U C - 1 遺伝子の(Chenら, 1995, *J. Clin. Invest.* 96, 2775-2782)、結腸癌で過剰発現される(Schrewe等, 1990, *Mol. Cell Biol.* 10, 2738-2748) C E A (癌胚芽抗原を表す)遺伝子の、黒色腫で過剰発現されるチロシナーゼ遺伝子の(Vile等, 1993, *Cancer Res.* 53, 3860-3864)、乳癌と膵臓癌で過剰発現するE R B B - 2 遺伝子の(Harris等, 1994, *Gene Therapy* 1, 170-175)及び肝臓癌で過剰発現される α -フェトプロテイン遺伝子(Kanai等, 1997, *Cancer Res.* 57, 461-465)のプロモーターから作られ得る。サイトメガロウイルス(C M V)早期プロモーターが特に好ましい。

必要な要素は、本発明に従うヌクレオチド配列の発現を又は宿主細胞中でのその維持を改善する付加の要素を更に含むことができる。イントロン配列、分泌シグナル配列、核局在化配列、I R E S タイプの翻訳の再開用内部サイト、転写終止ポリA配列、トリパーチットリーダー(tripertite leaders)及び複製の起点が特に挙げられ得る。これらの要素は当業者に周知である。

本発明に従う組換えベクターはまた、同じ調節要素(ポリシストロンのカセット)の又は独立要素の制御の下にこれら遺伝子を配置することができることによって、興味ある1又はそれ以上の付加の遺伝子をも含むことができる。特に挙げることができる遺伝子は、インターロイキンI L - 2、I L - 4、I L - 7、I L - 1 0 と I L - 1 2、インターフェロン、腫瘍壊死因子(T N F)、コロニー刺激因子(C S F)、特にG M - C S F、及び新脈管形成で作用する因子(例えばP A I - 1、プラスミノゲン活性化インヒビターを表す)をコードしている遺伝子である。一つの特有の実施態様において、本発明に従う組換えベクターは、I L - 2 をコードする又はインターフェロン (I N F) をコードする興味ある遺

10

20

30

40

50

伝子を含む。それはまた、HSV-1 TK遺伝子、リシン遺伝子、コレラ毒遺伝子などのような他の自殺遺伝子と、本発明に従うヌクレオチド配列との組み合わせを意図することも可能である。

本発明はまた、本発明に従う組換えベクターを含むウイルス粒子にも関する。そのようなウイルス粒子は、当該技術分野で普通であるいずれかの技術を用いてウイルスベクターから作製できる。該ウイルス粒子は、該ベクターの欠失に適した補体化細胞中で増殖される。アデノウイルスベクターに関して、使用は例えば、ヒト胎児腎臓細胞を用いて確立された及びA549-E1細胞系の(Imler等,1996, Gene Therapy 3,75-84)又は二重相補性を容認する細胞系の(Yeh等,1996, J.Virol.70,559-565;KrougliakとGraham,1995, Human Gene Therapy 6,1575-1586;Wang等,1995 Gene Therapy 2,775-783; 国際出願WO 97/04119)の、E1機能(Graham等,1977, J.Gen.Virol.36,59-72)を効果的に補う、293細胞系をもたらずであろう。それはまた、欠点のある機能を少なくとも部分的に補うためのヘルパーウイルスの利用を可能にする。補体化細胞は、組換えベクターを含むウイルス粒子を生成するためのウイルスカプシド中にウイルスゲノムを被包するために要求される早期の及び/又は後の因子を介して供給できる細胞であると解される。上記細胞は、それ自身のベクターの欠点のある機能の全てを補足することができないであろうし、このケースにおいて、付加の機能を供給するベクター/ヘルパーウイルスとトランスフェクション/形質導入できる。

本発明はまた、

(i) 本発明に従う組換えベクターが、トランスフェクションした補体細胞を得るために途中で上記ベクターを補うことができる補体細胞内に導入され、

(ii) 上記トランスフェクションした補体細胞が、ウイルス粒子が生産できるのに適切とされる条件下で培養され、及び

(iii) 上記ウイルス粒子が細胞培養物から回収される、ウイルス粒子の製造方法に関する。

該ウイルス粒子が細胞上清から勿論回収できると同時に、該細胞からもまた回収できる。普通に用いられる方法は、細胞溶解上清中のビリオンを採集するために、連続した凍結/解凍サイクルによる該細胞の溶解を含む。該ビリオンは、当該分野の技術を用いて増幅し且つ精製することができる(クロマトグラフィー法、超遠心分離法、特に塩化セシウム密度勾配を通して、など)。

本発明はまた、本発明に従うヌクレオチド配列又は組換えベクターを含む、又は本発明に従うウイルス粒子で感染した、宿主細胞にも関する。本発明の目的のために、宿主細胞は、上述したような、組換えベクターによりトランスフェクトすることができる、又はウイルス粒子によって感染することができる何れかの細胞からなる。哺乳動物細胞、特にヒト細胞が特に好適である。該細胞はゲノムに統合された又はされない(エピソーム)形態で上記ベクターを含むことができる。該細胞は、何れかの生物の最初の又は腫瘍細胞、特に造血細胞(全能幹細胞、白血球、リンパ球、単球又はマクロファージなど)、筋細胞(サテライト細胞、ミオサイト、筋芽細胞、平滑筋細胞、など)、心臓細胞、肺細胞、気管細胞、肝細胞、上皮細胞又は線維芽細胞とすることができる。

本発明はまた、薬学上許容される賦形剤と組合せて、本発明に従うポリペプチド、ヌクレオチド配列、組換えベクター、ウイルス粒子又は宿主細胞を含む組成物にも関する。

本発明はまた、UPRTアーゼ活性を示す本発明に従うポリペプチドと、興味ある別なポリペプチド、特にCDアーゼ活性を示す従来技術のポリペプチドを含む組成物にも関する。

本発明はさらに、本発明に従うポリペプチドと、興味のある先に記載した遺伝子の一つによりコードされる興味あるポリペプチドを含む組成物に関する。興味あるこれらポリペプチドで特に言及され得るものは、IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12、インターフェロン、腫瘍壊死因子(TNF)、コロニー刺激因子(CSF)、特にGM-CSF、及び新脈管形成について作用する因子(例えばPAI-1、プラスミノゲン活性化インヒビターを表している)である。IL-2又はINFが、特に挙げられる。

該組成物はまた、宿主細胞の中で上記ポリペプチドを発現することを可能にするヌクレオチド配列にも基づくことができる。該ヌクレオチド配列は、一つの又は同じ発現ベクターによって二つの独立のベクターによって運ばれ得る。上記組成物は、上記ヌクレオチド配列を発現しているウイルスベクターから作製されるウイルス粒子を勿論含むことができる。

この理由のために、本発明はまた、URPTアーゼ活性を示すポリペプチドをコードする本発明に従うヌクレオチド配列と、特にCDアーゼ活性を示すポリペプチドをコードする、興味ある第2のヌクレオチド配列を含む組成物にも関する。

本発明はさらに、本発明に従うヌクレオチド配列と、IL-2とINF から選択されるポリペプチドをコードする興味ある第2のヌクレオチド配列を含む組成物にも関する。

本発明に従う組成物は、遺伝子治療によって疾患の予防的な又は治療的な治療をとりわけ意図し、且つ増殖性疾患(癌、腫瘍、再狭窄など)を、及び感染の起源の、特にウイルス(B型又はC型肝炎ウイルス、HIV、ヘルペス、レトロウイルスなど)起源の疾患を、特にねらったものである。

本発明に従う組成物は、それを局所的に、非経口的に又は消化ルートによって投与することに鑑みて、通常は作製できる。特に、治療薬又は予防薬の治療的有効量が薬学的に許容される賦形剤と結合される。非常に多くの投与のルートを意図することが可能になる。实例は、胃内、皮下、心臓内、筋肉内、静脈内、腫瘍内、鼻内、肺内及び気管内ルートが挙げられる。これら3つの後の実施態様のケースにおいて、それはエアゾルによって又は吸入によって行う投与のために有効とされる。その投与は、単一投薬量として、又は特定の時間の間隔後に1又はそれ以上の機会を繰り返される投薬として実施できる。投与の適当なルートと投薬量は、各種のパラメーター、例えば個体、治療すべき疾患又は転移すべき興味ある遺伝子に基づき変更する。本発明に従うウイルス粒子に基づく調製物は、 10^4 と 10^{14} p f u (プラーク形成単位)、有利には 10^5 と 10^{13} p f u、好ましくは 10^6 と 10^{12} p f uの間の投薬量の形で調剤できる。本発明に従う組換えベクターが関係する限り、DNAの0.01から100 mgまで、好ましくは0.05から10 mgまで、特に好ましくは0.5から5 mgまでを含む投薬量を意図することが可能である。ポリペプチドに基づいた組成物は、上記ポリペプチドの0.05から10 gまで、特に好ましくは0.05から5 gまでを含む。勿論、その投薬量は臨床医によって調整され得る。

該製剤はまた、薬学的な見地から許容される、希釈剤、アジュバント又は賦形剤を、同じく可溶化、安定化及び保存剤をも含むことができる。注射可能なケースにおいて、好適には水性、非水性又は等張性溶液が与えられる。それは、液体又は、適当な希釈剤を用いる使用の時点で再構成することができる乾燥(粉末、凍結乾燥物など)の形態で、単一投薬又は複数投薬として提供することができる。該製剤はまた、プロドラッグの適切な量を含む。

本発明はまた、遺伝子治療によって又は組換えルートによって生産されているタンパク質を投与することによってヒト又は動物体を治療するために意図される医薬を製造するために、本発明に従うポリペプチドの、組換えベクターの、ウイルス粒子の、又は宿主細胞の治療的又は予防的な使用にも関する。最初の可能性に従い、その医薬はインビボで直接投与できる(例えば、接触可能な腫瘍に静脈内注射によって、エアゾルによって肺に、適当なカテーテルを用いて血管系内に、など)。それはまた、患者から細胞(骨髄幹細胞、末梢血液リンパ球、筋肉細胞など)を取り出すことを含むエクスピボアプローチ、従来技術に従いインビトロでそのトランスフェクション又は感染及び次いで患者にそれを再投与すること、に適合することも可能となる。好ましい使用は、望ましくない細胞増殖を生じる結果となる癌、腫瘍及び疾患を治療すること又は予防することを含む。言及され得る想像できる適用は、胸部の、子宮の(特にパピローマウイルスによって誘発されたそれら)、前立腺の、肺の、膀胱の、肝臓の、結腸の、膵臓の、胃の、食道の、咽頭の、中枢神経系の及び血液(リンパ腫、白血病など)の癌である。それはまた、心臓血管の病気の状況において、例えば血管壁の平滑筋細胞の増殖(再閉塞)を阻止する又は遅延するためにも使用できる。最後に、感染疾患のケースにおいて、AIDSに適用させる医薬を意図することも可

10

20

30

40

50

能である。

本発明はまた、本発明に従うヌクレオチド配列、組換えベクター、ウイルス粒子又は宿主細胞を、その治療を必要とする宿主生物又は細胞に投与することを特徴とする遺伝子治療によって病気を治療するための方法にも及ぶ。

該治療方法が、UPRTアーゼ活性を与える、本発明に従うポリペプチドの発現を可能にするヌクレオチド配列、組換えベクター又はウイルス粒子の使用を行う場合、上記組換えベクター又はウイルス粒子によって又は別個のベクター又はウイルス粒子によって運ばれる第2のヌクレオチド配列によって、CDアーゼ活性を示す第2のポリペプチドをコードする第2のポリペプチド配列を付加して投与することを有効にすることができる。後者のケースにおいて、UPRTアーゼとCDアーゼ配列は、重要ではない投与の順序によって、同時に又は連続的に投与できる。

10

有利な実施態様に従い、その治療的使用又は治療方法はまた、プロドラッグの薬学上許容される量を投与する工程をも含み、有利にはシトシンの類似体、特に5-FUが宿主生物又は細胞に投与される。説明のために、それは、50から500mg/kg/日の投薬量で、好ましくは200mg/kg/日の投薬量で使用することが可能である。本発明の状況の範囲内で、該プロドラッグは、本発明に従う治療薬の投与の前に、随伴して、さもなくば続けて実行する投与により、標準慣行に従って投与される。経口ルートが好ましい。それは、プロドラッグの単一投薬又は、宿主生物又は細胞内で毒性の代謝産物の生産を可能にするために十分に長い時間繰り返し投薬を投与することが可能である。

さらに、本発明に従う組成物又は方法は、5-FUの細胞毒性作用を有力にする1又はそれ以上の物質と結合できる。ピリミジンのデノボ合成のための経路の酵素を阻害する医薬の製造に特に言及され得る(例えば後述するそれら)、5-FU(5-FdUMP)の代謝の生産物の存在において、ロイコボリン(Waxman等,1982,Eur.J.Cancer Clin.Oncol.18,685-692)のような医薬は、PRPP(ホスホリボシルピロホスファート)のプールを増加することによって、複製のために要求されるdTMPのプールの減少に帰結する、チミジル酸シンターゼの阻害を増加し、且つメトトレキサート(Cadman等,1979,Science 250,1135-1137)のような最終的な薬剤は、ジヒドロ葉酸還元酵素を阻害する及び細胞のRNAへの5-FUの取込みの増加をもたらす。

20

本発明はまた、哺乳動物細胞中のポジティブ選択標識として、本発明に従う配列又は組換えベクターを用いることにも向けられる。有利には、該細胞はトランスフェクションされ、そして該細胞混合物は、PALA(N-(ホスホノアセチル)-L-アスパルタート)のようなピリミジンのデノボ合成のための経路のインヒビターの存在中において培養される; Moore等,1982,Biochem.Pharmacol.31,3317-3321),A77 1726(レフルノミドの活性代謝物; Davis等,1996,Biochem.35,1270-1273)及びBrequinar(Chen等,1992,Cancer Res.52,3251-3257)。そのようなインヒビターの存在は、RNAとDNAを合成するために要求されるUMPのデノボ合成をブロックし、それによって細胞死に帰結する。この細胞毒性作用は、ウラシルの存在においてUPRTアーゼ活性をコードしている本発明に従うヌクレオチド配列を発現することによって又はシトシンの存在においてCDアーゼ活性をコードしているこの後者の配列を共発現することによって(融合した形態が適する場合)、避けることができる。結果として、トランスフェクションした細胞のみが(UPRTアーゼ/CDアーゼ配列を組み込んだ細胞)、ピリミジン合成経路のインヒビターの存在中で増殖できるだろう。かくして、本発明に従う使用は、細胞混合物中でトランスフェクションした細胞を効果的に同定すること及び/又はそれから単離することを可能にする。

30

本発明はまた、基礎とされるトランスジェニック動物の作製方法が遮断されること(ノックアウトした)における、胚の幹細胞の遺伝子における実験中のネガティブ選択標識として本発明に従う配列又は組換えベクターの使用にも関する(例えば、Capecchi,1989,Science 244,1288-1292;Reid等,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,4299-4303を参照)。そのような使用、例えばネオマイシンに耐性な遺伝子との結合で、相同組換え事象を受けている及びゲネチン及び一致するフッ素化ピリミジン(もし本発明に従うヌクレオチド配列がUPRTアーゼ活性をコードすることに用いられるなら5-FU、CDアーゼ活性をコー

40

50

ドしているヌクレオチド配列も又用いられる場合、5 - F C)の存在においてのみ増殖できるであろう細胞を選択する可能性をつくることができる。非標的化組換え事象を受けていない細胞は、ゲネチシンの存在中で増殖するが、しかしフッ素化ピリミジンの存在中ではできない。ネガティブ選択標識として別の潜在的な使用は、ちょうど哺乳動物細胞のように、植物が何れかの内因性CDアーゼ活性を所有していないことから、植物において見出される。それは、外因的にCDアーゼの発現を可能にする本発明に従うヌクレオチド配列をトランスフェクションすることによって5 - F Cに感受性にできる(例えば、Perera等,1993,Plant.Mol.Biol.23,797-799)。

実施例

本発明は、全てが制限するものではなく、以下の実施例によって説明され、ここで：

- 図1はB16F0腫瘍細胞を移植しているB6D2マウスの生存率を表す。マウスの異なる群(群当たり10匹のマウス)は、次の組成物で処理した：

ビヒクル/生理食塩水；+ビヒクル/5 - F C； Ad null /生理食塩水； - Ad null / 5 - F C； x Ad F C U 1 /生理食塩水； Ad F C U 1 / 5 - F C

- 図2はB16F0腫瘍細胞を移植しているB6D2マウスの生存率を表す。マウスの異なる群(群当たり10匹のマウス)は、次の組成物で処理した：

ビヒクル/生理食塩水；+ビヒクル/G C V； Ad null /生理食塩水； - Ad null / G C V； x Ad T K /生理食塩水； Ad T K / G C V

図3はB16F0腫瘍細胞を移植しているB6D2マウスの生存率を示す。マウスの異なる群(群当たり13マウス)は、次の組成物で処理した：

ビヒクル/生理食塩水；+ビヒクル/5 - F C； Ad null /生理食塩水； - Ad null / 5 - F C； x Ad null + Ad F C U 1 /生理食塩水； Ad null + Ad F C U 1 / 5 - F C； Ad null + Ad mu I F N g /生理食塩水； Ad null + Ad mu I F N g / 5 - F C； o Ad mu I F N g + Ad F C U 1 /生理食塩水； O Ad mu I F N g + Ad F C U 1 / 5 - F C

- 図4はB16F0腫瘍細胞を移植しているB6D2マウスの生存率を示す。マウスの異なる群(群当たり13マウス)は、次の組成物で処理した：

ビヒクル/生理食塩水；+ビヒクル/5 - F C； Ad null /生理食塩水； - Ad null / 5 - F C； x Ad null + Ad F C U 1 /生理食塩水； Ad null + Ad F C U 1 / 5 - F C； Ad null + Ad hu I L - 2 /生理食塩水； Ad null + Ad hu I L - 2 / 5 - F C； o Ad hu I L - 2 + Ad F C U 1 /生理食塩水； O Ad hu I L - 2 + Ad F C U 1 / 5 - F C

後述した構築は、Maniatis等(1989,Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY)中に記載されたような遺伝的エンジニアリングと分子クローニングの一般的技法を用いて又は市販キットを用いた場合製造者の推奨に従い調製した。相同組換え工程は、好ましくは大腸菌BJ5183株(Hanahan,1983,J.Mol.Biol.166,557-580)において実施される。制限サイトの再生に関して、利用したその技術は、5'突出末端において満たすための大腸菌ポリメラーゼIのラージフラグメント(クレノーフラグメント)を用いることを含む。加えて、後述した異なる構築において利用したアデノウイルスゲノムフラグメントは、レファレンスM73260の下にGenebankデータベース中に開示された通りのAd5ゲノムのヌクレオチド配列中のその位置に従って正確に示される。

細胞生物学に関して、その細胞はトランスフェクションされ又は形質導入され、当業者に良く知られた標準の技術に従い培養される。酵母の株に関して、使用したものは、特に、GuthrieとFink(1991,Methods in Enzymology,Vol.194,Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology,Academic Press Inc)中に記載される通常の技術で作られる。

実施例1： 端切りFUR1 105遺伝子の構築

野生型FUR1遺伝子を運ぶEcoRI/HindIIIフラグメントは、プラスミドpHX(Kern等,1990,Gene 88,149-157)から単離し、プラスミドpRS306FUR1を形成するために、これらの同じ酵素で消化されている統合化酵母プラスミドpRS306(S

10

20

30

40

50

ikorskiとHieter, 1989, Genetics 122, 19-27)中に挿入した。この後者のプラスミドにより開始する、XhoI/EcoRIによって処理されている、酵母セントロメトリックプラスミドpRS314 (SikorskiとHieter, 1989, Genetics 122, 19-27)内に、XhoI/EcoRIフラグメントの形態で、FUR1遺伝子を再クローン化した。これは、大腸菌CJ236株(dut, ung, thi, relA, pCJ105(Cm^R))中で作製したウラシル含有一本鎖から、ファージミドpRS314FUR1を生じた；部位特異的変異誘発は、Kunkel法(Muta-Gene phagemid kit, In vitro Mutagenesis Version 2; Biorad)を用いてこの鎖上で実行した。その変異誘発のねらいは、FUR1遺伝子の、開始ATGの5'と停止コドンの3'それぞれにEcoRIとMluI制限サイトを導入することと、AspIに変わっている第2 Asnコドンを伴う、Kozak則に従って開始ATGの状況を変更することである。配列番号：3と配列番号：4中に記載したオリゴヌクレオチドが、これをなすために用いられた。それにより生じたプラスミド、即ちpRS314FUR1+1は、野生型UPRTアーゼ活性用のコントロールとして用いた。

同じく、FUR1コード化配列の最初の105ntは、配列番号：5と配列番号：4中に記載したオリゴヌクレオチドを用いてプラスミドpRS314FUR1を変異誘発することによって欠失した。得られたプラスミド、即ちpRS314FUR1+106は、Serコドンの次にAla、及び停止コドンのMluIサイト3'への変更と一緒に、この位置でKozakコンセンサス、いわゆるATGコドン(天然タンパク質のMet+36に相当する)のEcoRIサイト5'にその完全に同等な変更を含む。pRS314FUR1+106からのEcoRI/SacIフラグメントは、最初の35'N末端残基が欠失されているタンパク質を発現するFUR1遺伝子を運ぶプラスミドpRS314FUR1-105を形成するため、EcoRIとSacIで切断されている、プラスミドpRS314FUR1+1に再クローン化した。

実施例2： S.セレビスエのfur1変異体の相補性

上記構築物から得られたFUR1発現生産物の機能的能力を、pRS314型の異なるプラスミドによって形質転換されているS.セレビスエのfur1-8trp1-4変異体(JundとLacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615)の相補性によって評価した。その形質転換体は、通常的手法(最少YNB培地)中又は5mM 5-FUの存在中のいずれかで培養し、30℃及び37℃でのその増殖能力を評価した。その結果は表1中に表され、ここで、+は、5-FUに対する感受性を、且つそれ故にUPRTアーゼ活性を試験している、増殖の欠如を表す。

表1

形質転換体	YNB培地 (最少)	+5mM 5-FU
	30℃及び37℃	30℃及び37℃
PRS314 [sic]	+	+
pRS314FUR1	+	-
pRS314FUR1+1	+	-
pRS314FUR1+106	+	-
pRS314FUR1Δ105	+	-

形質転換体の全ては、通常の YNB 培地において勿論増殖できる。一方、FUR1 配列を含んでいない「空の」pRS314 プラスミドを含む形質転換体のみは、天然 FUR1 配列 (pRS314FUR1) を含むプラスミドが与えられているそれらに対して、5-FU の存在中で増殖でき、第 1 ATG コドンのレベルで変異されている FUR1 配列 (pRS314FUR1+1)、第 2 ATG コドンのレベルで変異されている FUR1 配列 (pRS314FUR1+106) 又は端切りした FUR1 配列 (pRS314FUR1 105) は、5-FU の存在に対して感受性である。これらの相補性試験は、異なる構築生産物、機能的 UPR T アーゼ酵素と 35 N 末端残基を欠失しているそれは、酵素の活性に関して何れかのネガティブな作用を有さないことを示す。

実施例 3： 哺乳動物細胞中の FUR1 と FUR1 105 の発現。

10

FUR1 と FUR1 105 遺伝子を運ぶ、pRS314FUR1+1 と pRS314FUR1 105 の EcoRI / MluI フラグメントは、プラスミド pCI-neoFUR1+1 と pCI-neoFUR1 105 のそれぞれを形成するために、真核生物発現プラスミド pCI-neo (Promega) に導入した。COS7 細胞 (ATCC CRL-1651) は、これらのプラスミドによって一時的にトランスフェクションされ、UPR T アーゼ酵素活性は細胞抽出物中で測定した。

より正確には、 5×10^5 COS7 細胞を、10% 胎児ウシ血清 (FCS) を補充した DMEM 培地の 5 ml を含む 60 mm 培養皿中、37 °C で植種した。次の日、その細胞を、プラスミドの 5 µg の存在又は不在中、リポフェクチン (Gibco BRL) の 20 µl で処理し、DMEM 培地の 2 ml 中で培養を継続した。37 °C で 16 時間のインキュベーション後、その細胞をほぼ 48 時間、DMEM-10% FCS の 5 ml 中に移し替えた。次いでその細胞を洗浄し、4 °C で 30 分間、溶解緩衝液 (50mM トリス塩酸, pH 7.5 / 150mM NaCl / 5mM EDTA / 1mM DTT / 1% triton X-100) の 30 µl 中に再懸濁した。その細胞溶解物を採集し、遠心分離し、その UPR T アーゼ酵素活性を得られた上清について測定した。これをなすために、溶解物の 4 µl を、UPR T アーゼ反応緩衝液 (100mM トリス塩酸 pH 7.5 / 10mM MgCl₂ / 10mM 5-P-PRPP (5-ホスホリボシルピロホスファート) / 0.02 µCi / µl (NEN) を有する 3mM [C¹⁴]ウラシル) の 2 µl の存在中で 10 分間、37 °C でインキュベーションした。その酵素反応は、1 分間 100 °C で加熱することによって停止した。1 µl アリコートをし、ポリエチレンイミン-セルロース TLC プレート (Merck) 上にロードした。そのウラシルは、移動溶媒として水を用いることによって UMP から分離した。移動の後、その TLC 板を、PhosphorImager (445 SI; Molecular Dynamics) によりスキャンした。そのタンパク質濃度は、ブラッドフォード法 (protein Assay; Biorad) で測定した。UPR T アーゼ活性は、3 つの個別の形質転換体を基礎として測定し、その結果を表 2 に示した。

20

30

表 2

形質転換プラスミド	UPR T アーゼ活性 (37 °C) 転換したウラシルの pmol / 分 / タンパク質の mg
—	検出不可能
PCI-neo	検出不可能
PCI-neoFUR1+1	91 +/- 15
PCI-neoFUR1 Δ 105	3150 +/- 420

40

UMP へのウラシルの形質転換は、完全な FUR1 遺伝子 (PCI-neoFUR1+1) 又は端切り F

50

U R 1 遺伝子 (PCI-noeFUR1 105) を発現するプラスミドがトランスフェクションされている細胞においてのみ観測された。それはまた、端切りした遺伝子によってコードされた U P R T アーゼ活性が、30 のファクターによって完全な遺伝子によってコードされたそれよりもより高かったことが注目される。

実施例 4 : 端切り F U R 1 105 遺伝子を翻訳するためのアデノウイルスの構築とヒト腫瘍細胞感染。

1 . F U R 1 105 発現用の p T G 6 2 8 9 の構築

端切りした遺伝子を包含する、p C I - n e o F U R 1 105 から E c o R I / M l u I フラグメントを分離し、翻訳ベクター p T G 6 2 8 8 を形成するために、同じ酵素で切断されている、ベクター p T G 6 6 0 0 の中に導入した。情報のために、p T G 6 6 0 0 は、p polyIIベクター (Lathé等,1987, Gene 57,193-201) であり、A d 5 1 から 4 5 8 配列、早期 C M V プロモーター、ハイブリッドスプライシング配列はプラスミド p C I (Pro 10
mega社、ヒト - グロブリン遺伝子のイントロン 1 のスプライシングドナーサイトとマウス免疫グロブリン遺伝子のスプライシングアクセプターサイトを含む) 中に見出され、S V 4 0 ウイルスポリアデニル化配列と A d 5 3328-5788配列が挿入されている。その構築物の達成化は、当業者の能力の範囲内である、特に文献FR-A-2 763 959に基づく。そのアデノウイルスベクター p T G 6 2 8 9 は、p T G 6 2 8 8 からの P a c I / B s t E I I フラグメントと、C l a I - 直線化したベクター p T G 6 6 2 4 の間で大腸菌 B J 5 1 8 3 株中、組換えによって再構築した。情報のために、p T G 6 6 2 4 は、E 1 (nt 459から3327) と E 3 (nt 28592から30470) 領域は、E 1 の代わりに挿入される発現カセットと一緒に欠失さ 20
れているものから、A d 5 ゲノムを搬送しているプラスミド p poly II に一致する。

最後の p T G 6 2 8 9 構築物は、E 1 (nt 459から3328) と E 3 (nt 28249から30758) 領域のバルクが欠失されているものからの A d 5 ゲノム、及び E 1 の代わりに、早期 C M V プロモーターの制御下に配される F U R 1 105 遺伝子を発現するカセット及びハイブリッド - グロブリン / I g スプライシング配列を含む。該アデノウイルス粒子は、E 1 機能を補う、例えば従来技術 (Graham and Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology Vol .7, Gene Transfer and Expression Protocols; Ed. E. J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ) に従う 2 9 3 細胞系 (ATCC CRL1573) のような細胞系をトランスフェクションすることによって作製される。

2 . F C Y 1 遺伝子を発現するためのベクターの構築。

ウラシル含有一本鎖は、部位特異的変異誘発によって (Muta-gene Phagemid kit, In vitro Mutagenesis version2; Biorad) 鎖が変更される発現ファージミド p R S 3 1 5 F C Y 1 (Erbs等, 1997, Curr. Genet. 31, 1-6) から単離した。配列番号 : 6 と番号 : 7 のオリゴヌクレオチドを用いるその変異誘発は、開始 A T G の H i n d I I I サイト 5 ' 及び F C Y 1 遺伝子の停止コドンの E c o R 1 サイト 3 ' を導入すること及び Kozak 則に従って翻訳状況を変更することを可能にする。この手法において変更されている HindIII/EcoR1 フラグメントは、p R S 3 0 6 F C Y 1 を形成するために、同じ酵素によって消化されているプラスミド p R S 3 0 6 (Sikorski と Hieter, 1989, Genetics 122, 19-27) に挿入した。p R S 3 0 6 F C Y 1 からの XhoI/XbaI フラグメントは、X h o I と X b a I で切断されているベクター p C I - n e o (Promega) にサブクローンした。これはその開始 A T G のレベルで K 40
ozak コンセンサス配列を有する F C Y 1 遺伝子を含む p c I - n e o F C Y 1 に帰結する。

酵素 C D アーゼをコードしている S . セレピシエ F C Y 1 遺伝子を発現するためのアデノウイルスベクターを作製した。F C Y 1 遺伝子を囲む、プラスミド p C I - n e o F C Y 1 からの XhoI/XbaI フラグメントは、p T G 6 2 8 6 を形成するために XhoI-XbaI-消化したベクター p T G 6 6 0 0 中に導入した。先の通り、F C Y 1 を搬送する且つ p T G 6 2 8 6 から分離した P a c I / B s t E I I フラグメントと、E 1 と E 3 領域を欠失し且つ E 1 に代えて F C Y 1 遺伝子を含む、アデノウイルスベクター p T G 6 2 8 7 を作製する ClaI-直線化したベクター p T G 6 6 2 4 との間の相同組換えは、C M V プロモーターとハイブリッド - グロブリン / I g スプライシング配列の制御下に設けた。該ウイルス粒子 (A d T G 50

6287)は、293細胞のトランスフェクションにより得られた。

3. 酵素活性の測定

アデノウイルスの構築物は3つのヒト腫瘍細胞系：PANC-1(膵臓肉腫/ATCC CRL-1469)、SK-BR-3(胸腺癌/ATCC HTB-30)及びSW480(結腸腺癌/ATCC CCL-228)について試験した。これらの細胞は、それが5-FUに対し抵抗性であり、それによってFUR1 105遺伝子の効力を測定することが可能であるために選択した。

より正確には、PBS-2%FCFの100 μ l中に懸濁した 5×10^6 細胞を、20のMOI(感染多重度)で試験するべきアデノウイルス(Ad.CMV-FCY1とAd.CMV-FUR1、又はその2つの混合物)の存在中、30分間37 $^{\circ}$ でインキュベーションした。ネガティブコントロールとして、模擬感染を実施した又は感染が興味ある遺伝子を欠く最初に作製したアデノウイルス(Ad.null)により実行された、のいずれか一方で行った。感染した細胞は、DMEM-10%FCFの500 μ lに入れ、皿当たり 1×10^6 細胞の率で35mm培養皿中に配した。37 $^{\circ}$ で48時間のインキュベーション後、基質として5-FC又は5-FUを用い、酵素活性の相違を、細胞溶解物について測定した。UPRTアーゼ活性は、先に記載されたプロトコルに従い、UPRTアーゼ反応緩衝液([C¹⁴]5-FU, Sigma)の2 μ lの存在中、37 $^{\circ}$ で20分間インキュベーションされる、細胞溶解物の4 μ lについて測定した。CDアーゼ活性の場合、CDアーゼ反応緩衝液(100mMトリス塩酸, pH7.5/0.25 μ Ci/ μ lを有する3mM[H³]5-FC)の2 μ lと一緒に20分間37 $^{\circ}$ でインキュベーションされる、細胞溶解物の4 μ lを使用し行った。5-FCの5-FUMP(CDアーゼ/UPRTアーゼ活性)への変換は、CDアーゼ/UPRTアーゼ反応緩衝液(100mMトリス塩酸, pH7.5/10mM MgCl₂/10mM 5-PRPP/0.25 μ Ci/ μ lを有する3mM[H³]5-FC)の2 μ lの存在中、20分間37 $^{\circ}$ でインキュベーションされる、細胞溶解物の4 μ lについて測定した。1 μ lアリコートにPEIセルロースTLC板上にロードした。その5-FUは溶媒として水を用いることによって5-FUMPから分離し、その5-FUMPは溶媒として水/1-ブタノール(14%/86%)混合液を用いることによって5-FUから分離した。

3つの細胞型において、CDアーゼ活性はFCY1遺伝子を発現するアデノウイルスで感染した細胞(Ad.CMV-FCY1)から、及び2つのウイルス、即ちAd.CMV-FCY1とAd.CMV-FUR1 105で共感染した細胞から得られた抽出物において観測された。その酵素アッセイは、PANC-1, SK-BR3とSW480細胞において約80から100転換した5-FCのpモル/分/タンパク質のmgまでの変化に富んだ活性を示した。5-FUの転換に関する限り(UPRTアーゼ活性)、ほぼ数百の転換した5-FCのpモル/分/タンパク質のmgの内因活性を観測した。その活性は、その感染をそれ自身についてAd.CMV-FUR1 105によって実行した場合又はその細胞を共感染した場合に7から8のファクターによって増幅される。最後に、5-FCの5-FUMPへの変換は、Ad.CMV-FCY1によって感染されている(内因性UPRTアーゼ活性のために)、及び該細胞が共感染される場合、抽出物で検出された。

加えて、5-FCと5-FUのLD₅₀(50%致死量)値(μ M)を、上記ウイルスで感染した(Mock感染、Ad.null感染、Ad.CMV-FCY1感染及びAd.CMV-FUR1 105感染)又はFCY1とFUR1 105遺伝子を発現するアデノウイルスで共感染した、3つのヒト腫瘍細胞系に関して測定した。その細胞は、20のMOIで感染し次いで各種濃度の薬剤(5-FC又は5-FU)の存在又は不在中で培養した。トリパンブルーを、D+6でのトリプシン化後に加えた。生存細胞はトリパンブルーを取り込まず、一方死滅細胞は染色される。死亡率%を顕微鏡下に評価した。以下に報告した値は、4回の計測後に得た平均値である。

5-FCに関しての感染細胞系のLD₅₀は、2つのFCY1とFUR1 105遺伝子が共発現された場合、5と10 μ Mの間であり(細胞系に基づいて)、一方FCY1遺伝子がそれ自身で発現される場合100から500 μ Mであり、且つネガティブコントロールのケースにおいて(Mock感染とAd.null感染)及びAd.CMV-FUR1 105の場合において、5000から10000 μ Mまでであった。同様に、5-FUに関するL

10

20

30

40

50

D₅₀は、そのその感染がFUR1 105遺伝子を発現するウイルスを用いた場合、ネガティブコントロール及びそれ自身についてAd.CMV-FCY1を用いた感染における、に対してかなり低かった。これらの結果は、5-FCプロドラッグの、細胞毒性5-FUMPへの転換を改善するための「自殺」遺伝子アプローチにおけるFCY1とFUR1 105遺伝子の相乗効果を用いることの重要性を示す。

実施例5： CDアーゼとUPRTアーゼを運ぶ融合タンパク質をコードするハイブリッド遺伝子の構築

1. 遺伝子融合の構築

pCI-neoFUR1 105からのEcoR1/NotIフラグメントは、プラスミドpCI-neoFCY1+FUR1 105を与えるために、EcoR1/NotI切断プラスミドpCI-neoFCY1中に挿入した。開始点としてこのウラシル含有一本差プラスミドを用い、FCY1とFUR1 105を、オリゴヌクレオチドOTG11615(配列番号：8)を用いた部位特異的変異誘発の手段によって融合した。その変更は、FCY1の停止コドンとFUR1の開始Metコドンを欠失すること、それによっていずれかのスペーサーなしに相中でFCY1とFUR1 105配列を融合することを可能にすることを含む(この融合体は以下にFCU1と定義した)。

2. 二官能性FCU1タンパク質の酵素的な特徴。

予め記載された技術は：

- トランスフェクションしない
- pCI-neo(空のプラスミド)の10 μ gをトランスフェクションした
- pCI-neoFCY1の5 μ g+pCI-neoFUR1 105の5 μ gをトランスフェクションした
- pCI-neoの5 μ g+pCI-neoFCU1の5 μ gをトランスフェクションした

COS7細胞からの細胞溶解物中、CDアーゼとUPRTアーゼ活性(37 $^{\circ}$ Cで10分間反応)を測定するために使用した。

得られた値を以下の表3中に3回の酵素測定の平均を記した。

表3

COS7	CDアーゼ 転換したシツ のpEh/分/タ ハク質 mg	UPRTアーゼ 転換したシツ のpEh/分/タ ハク質 mg	CDアーゼ/UPRTアーゼ 形成したUMPの pEh/分/タ ハク質 mg
未トランスフェクション	検出不可能	検出不可能	検出不可能
pCI-neo	検出不可能	検出不可能	検出不可能
pCI-neoFCY1+ PCI-neoFUR1 Δ 105	626 +/- 106	3005 +/- 298	535 +/- 54
pCI-neo+ PCI-neoFCU1	5373 +/- 268	2789 +/- 310	2121 +/- 107

同等のUPRTアーゼは、該遺伝子が融合した形(pCI-neoFCU1)においてか又は非融合形(pCI-neoFUR1 105)のどちらかで観測された。驚くべきことに

、そのCDアーゼ活性は、その遺伝子が融合した形態である場合、融合していないFCY1遺伝子に対して、10のファクターで増加した。かくてその融合形は、それが集合CDアーゼ-UPRTアーゼ活性の増加を生じ、従って5-FCから5-FUMPの形成を増加することから有益となる。

FCU1によりコードした融合タンパク質のUPRTアーゼ活性は、CDアーゼ活性に相関して制限される；3000ウラシルpモル/分/タンパク質のmgのオーダーのウラシルのプールの形成が、CDアーゼ-UPRTアーゼ反応の間にインビトロで検出された。このウラシルのプールは、該反応がFCY1とFUR1 105タンパク質の使用を行う場合、同じ条件下で持続しない。

3. B16(F0)細胞系におけるプラスミドpCI-neoにクローン化されているFCY1、FUR1 105及びFCU1遺伝子の発現。

FCU1遺伝子融合の効率は、B16(F0)マウスメラノーマ細胞系(ATCC CRL-6322)のトランスフェクションによって評価した。これをなすために、 2.5×10^5 B16(F0)細胞を、DMEM-10%FCS培地の5mlを含む6.0mmの皿中、37℃で植種した。インキュベーションの48時間後、その細胞を、プラスミドの5μgの存在中、リポフェクチン(Gibco BRL)の20μlで処理し、次いで培養をDMEM培地2ml中、37℃で16時間継続した。その48時間後、細胞をDMEM-10%FCSの5ml中に配し、次いで10cmペトリ皿中で、1mgのG418/mlを含むDMEM-10%FCS培地中で希釈した。G418に耐性のクローンは、20日後に生存可能である。それぞれの構築物で得られたクローンを採集し、T150フラスコ中に移し、選択培地中で培養した。CDアーゼ、UPRTアーゼ及びCDアーゼ-UPRTアーゼ活性は、基質として5-FC又は5-FUの存在中、37℃で測定した。示した値は、3回の酵素測定後に得られた平均値である(表4参照)。

表4

B16(F0)	CDアーゼ 転換した5-FC のpモル/分/タン パク質のmg	UPRTアーゼ 転換した5-FU のpモル/分/タン パク質のmg	CDアーゼ/UPRTアーゼ 5-FUMP形成pモル/ 分/タンパク質のmg
未トランスフェクション	検出不可能	310 +/- 77	検出不可能
pCI-neo	検出不可能	238 +/- 56	検出不可能
pCI-neoFCY1	3 +/- 0.4	292 +/- 93	2 +/- 0.4
pCI-neoFUR1 Δ 105	検出不可能	813 +/- 47	検出不可能
pCI-neoFCU1	158 +/- 9	834 +/- 67	41 +/- 5

その酵素結果は、トランスフェクションしたCOS7細胞を用いて測定したそれらを確認する、即ち、UPRTアーゼ活性を保持するが、しかしCDアーゼ活性が天然FCY1タンパク質を用いて測定したそれと比較して融合タンパク質のケースにおいて強力に増加している。pCI-neoFCU1でトランスフェクションしたB16クローンの場合、CDアーゼ活性の増加の結果である5-FUのプール(120pモル/分/タンパク質mg)もまたインビトロで現れた。

5-FCと5-FUに対する異なるクローンの感受性もまた、6日間薬剤の存在中でインキュベートした後に試験した。以下の値は、細胞死亡率の4回の計測(トリパンプルーを用いた)の平均である。5-FCのLD₅₀は、pCI-neoFCY1を用いた場合の1

00 μM及びネガティブコントロール(未トランスフェクション細胞とpCI-neoでトランスフェクションした細胞)を用いた場合及びpCI-neoFUR1 105を用いた場合の1000 μMと比較して、(pCI-neoFCU1)遺伝子融合を運ぶプラスミドでトランスフェクションした細胞のケースにおいて10 μMである。5-FUのLD₅₀は、他の全てのケースにおける0.05 μMに対して、pCI-neoFUR1 105又はpCI-neoFCU1を用いてトランスフェクションを実施した場合、0.03 μMである。

これらの結果は、FCU1遺伝子の発現が、FCY1遺伝子の発現でなされたよりもより強力に5-FCに対して細胞を感作する。5-FCに対する感作のこの相違は、より高いCDアーゼ活性を有する融合タンパク質のためであり且つUPRTアーゼ活性の存在のためではない；S.セレピシエ遺伝子によってコードされるこのUPRTアーゼ活性は、5-FUに対して生来非常に感受性であり且つかなりの内因性UPRTアーゼ活性を示すB16(F0)細胞の5-FUの毒性において少しの効果を有する。

4. FCU1遺伝子によってトランスフェクションされたB16(F0)細胞がバイスタンダー効果を示すことの実証。

FCU1トランスフェクションしたB16(F0)細胞のCDアーゼ-UPRTアーゼ活性のインビトロアッセイにおける5-FUのプールの出現は、バイスタンダー効果を高める有効性、priori、がある：この細胞内プールの非常に大きなサイズ、その大きさは、培地中の5-FUの受動的拡散であろうし且つその大きさは非トランスフェクション細胞の死亡率となるであろう。

このバイスタンダー効果を実証するために、非トランスフェクションB16(F0)クローンを、pCI-neoFCU1によってトランスフェクションされたB16(F0)クローンと、異なる割合で混合した。これらのクローン混合物は、次いで5-FCの異なる濃度の存在中で試験した。細胞死亡率(トリパンブルーを用いた)は、5-FCの存在中で4日間の培養後に評価した。その結果を以下の表5中に示した。

表5

B16/B16 pCI-neoFCU1 %での	LD ₅₀ (μM) + 5-FC
100%/0%	5000
95%/5%	500
90%/10%	300
75%/25%	200
50%/50%	100
0%/100%	50

5-FCのLD₅₀は、該細胞混合物がFCU1-トランスフェクションした細胞の5%を含むとすぐに、10のファクターによって低下し、それによってバイスタンダー効果の存在の証拠となること明らかになった。そのLD₅₀投薬量は勿論、トランスフェクションした細胞の比率が増加した場合、減少を続ける。

このバイスタンダー効果が、tk/ガンシクロビル系に対して、細胞間の何れかの接触が要求されないことを実証する目的に関し、培地への5-FUの拡散のために、(トランスフェクションしない)B16細胞を、5-FCの異なる濃度の存在中48時間インキュベーションされているB16(ネガティブコントロール)又はB16pCI-neoFCU1

クローンからの培養上清から得られた培地(新たな培地中で4対1に希釈した)中で4日間インキュベーションし、B16細胞の死亡率をトリパンブルーを用いて評価した。その結果は、LD₅₀についての強烈な効果を実証し且つ5-FUが、高いCDアーゼ活性を有するFCU1遺伝子によりコードされたタンパク質融合の結果としてその培地中に存在することを示した。

実施例6 FCU1遺伝子を転移するための及び腫瘍細胞に感染するためのアデノウイルスの構築。

1. FCU1を発現するためのpTG13060の構築。

FCU1遺伝子融合を包含する、pCI-neoFCU1からのXhoI/MluIフラグメントを単離し、転移ベクターpTG13059を形成するためにXhoI/MluI-線状化ベクターpTG6600に導入した。FCU1を運ぶ且つpTG13059から分離したPacI/BstEIIフラグメントと、E1とE3領域を欠失し且つE1に代えてFCU1遺伝子を含むアデノウイルスベクターpTG13060を生成するClaI-線状化ベクターpTG6624との間の相同組換えは、CMVプロモーターとハイブリッド-グロブリン/IgSプライシング配列の制御下で行った。そのウイルス粒子(Ad.CMV-FCU1)は、293細胞をトランスフェクションすることによって得た。

2. 腫瘍細胞においてアデノウイルスベクター中にクローン化されるFCU1遺伝子の発現。

新たなアデノウイルス構築物は、3つのヒト腫瘍細胞系:PANC-1, SK-BR-3及びSW480について試験した。上述した技術は、20のMOIで感染したヒト細胞から得られた細胞溶解物において、CDアーゼとUPRTアーゼ活性(基質として5-FC又は5-FUを用い)を測定するために使用した。UPRTアーゼ活性(700から800の変換5-FUpモル/分/タンパク質mg)が、FUR1105遺伝子によって発現したUPRTアーゼ活性に同等であるAd.CMV-FCU1によって感染した3つの細胞系で観測された。その3つの細胞形において、CDアーゼ活性は、Ad.CMV-FCY1によって感染した場合の細胞の活性との比較として、該遺伝子が融合形(FCU1)で発現される場合、100のファクターで(10000から12000転換5-FCpモル/分/タンパク質mg)増加した。

アデノウイルスベクターから発現した場合、その融合タンパク質は、実施例5と同様に、CDアーゼ活性に相関して制限される、及びCDアーゼ-UPRTアーゼ反応の間に10000転換5-FCpモル/分/タンパク質mgのオーダーの5-FUの相当なプールの形成に至る、UPRTアーゼ活性を示す。この5-FUの蓄積は、バスタンダー効果を高める。

5-FCと5-FUのLD₅₀値は、異なるウイルス(Ad.null, Ad.CMV-FCY1, Ad.CMV-FUR1105及びAd.CMV-FCU1)又はFCY1とFUR1105遺伝子を発現するアデノウイルスによって共感染した、3つのヒト腫瘍細胞系と比較して測定した。その細胞は、5のMOIで感染し、5-FCと5-FUの異なる濃度の存在中で培養した、培養6日後、細胞の生存能を、トリパンブルーを用いて測定した。以下の表6中に掲載したそのLD₅₀値は4回の計数の平均値である。

10

20

30

表 6

		LD ₅₀ (μM)	LD ₅₀ (μM)
		5-FU	5-FC
PANC-1	Mock	0.3	10,000
	Ad null	0.3	10,000
	Ad.CMV-FCY1	0.3	500
	Ad.CMV-FUR1Δ105	0.01	10,000
	Ad.CMV-FCY1 + Ad.CMV-FUR1Δ105	0.01	20
	Ad.CMV-FCU1	0.01	0.5
SK-BR-3	Mock	0.1	5000
	Ad null	0.1	5000
	Ad.CMV-FCY1	0.1	300
	Ad.CMV-FUR1Δ105	0.005	5000
	Ad.CMV-FCY1 + Ad.CMV-FUR1Δ105	0.005	10
	Ad.CMV-FCU1	0.005	0.03
SW480	Mock	0.5	5000
	Ad null	0.5	5000
	Ad.CMV-FCY1	0.5	300
	Ad.CMV-FUR1Δ105	0.03	5000
	Ad.CMV-FCY1 + Ad.CMV-FUR1Δ105	0.03	20
	Ad.CMV-FCU1	0.03	0.3

これらの結果は、アデノウイルスベクターからのFCU1遺伝子の発現が、FCY1とFUR1 105遺伝子の共発現をなしたものよりも、より強い5-FCへの感作を生じた。5-FCに対するこの大きな感作は、FCU1遺伝子融合によってコードしたCDアーゼ活性の増加をもたらす。

3. 異なるアデノウイルスによって感染したヒト腫瘍細胞がバイスタンダー効果を示すことの実証。

ヒト腫瘍細胞PANC-1, SK-BR-3及びSW480は、20のMOIで感染させた(Ad null, Ad.CMV-FCY1, Ad.CMV-FUR1 105及びAd.CMV-FCU1)。37 °Cでのインキュベーションの48時間後、その細胞をPBSで二度濯ぎ、トリプシン処理し、異なる比率で未感染細胞の存在中に植種した。1mM 5-

10

20

30

40

50

FCの存在中で六日間培養後、細胞死亡率をトリパンブルーを用いて評価した。その結果(4回の測定の平均)は、3つの腫瘍株のケースにおいて、Ad.CMV-FCY1によって感染した細胞10%と未感染細胞の90%の混合物は100%死亡率に至ることを示した。その細胞をAd.CMV-FCU1で感染した場合、感染細胞の1%は100%死亡率に至るに十分であった。この実験は、融合タンパク質を発現する細胞中の5-FUのブールの増加をもたらす、かなりのバイスタンダー効果の存在を実証する。

5-FCの存在中、FCY1とFCU1を発現する細胞によって培地への5-FUの分泌を実証する目的に関して、 10^6 PANC-1, SK-BR-3及びSW480細胞を、20のMOIで感染した(Ad.null, Ad.CMV-FCY1, Ad.CMV-FUR1 105及びAd.CMV-FCU1)。その細胞は、 $0.25 \mu\text{Ci} / \mu\text{l}$ を与える $1 \text{mM} [^3\text{H}]5\text{-FC}$ の存在中で培養した。培養48時間後、培地の $2 \mu\text{l}$ アリコート
10
をセルロースTLC板にロードした。その5-FUを、溶媒として水/1-ブタノール(14%/86%)混合液を用いることによって5-FCから分離した。3つの細胞形において、その細胞がAd.CMV-FCY1で感染した場合、5-FCのほぼ20%が5-FUに転換した。その細胞がAd.CMV-FCU1で感染した場合、5-FCの90%以上が5-FUに転換された。

4.FCU1/5-FCとTK/GCV系の効力の比較。

TK/GCV系との相関においてFCU1/5-FC系の有効性を比較する目的に関し、アデノウイルスベクターを、単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ遺伝子(HSV-1 TK)を発現するために作製した。HIV-1 TK cDNAを包含するpTG40
20
43からEcoRI/XbaIフラグメントを単離し、転移ベクターpTG6222を形成するために、EcoRI/XbaI-線状化したベクターpTG6600に導入した。HSV-1 TKを運び且つpTG6222から分離したPacI/BstEIIフラグメントと、E1とE3領域を欠失し且つE1に代えてHSV-1 TK遺伝子を含むアデノウイルスベクターpTG13019を生成するClaI-線状化ベクターpTG6624との間の相同組換えは、CMVプロモーターとハイブリッド-グロブリン/Igスプライシング配列の制御下で行った。そのウイルス粒子(Ad.CMV-TK)は、293細胞をトランスフェクションすることによって得た。

ヒト細胞PANC-1, SK-BR-3及びSW480、及びネズミ細胞系B16(F0)及びRENCA(腎臓癌、Murphy等J.Nat'l Cancer Inst.,1973,50(4):1013-25)は、Ad.null
30
1, Ad.CMV-FCU1又はAd.CMV-TKにより感染した。その細胞は、5-FC又はGCVの異なる濃度の存在中で培養した。培養10日後、細胞の生存能をトリパンブルーを用い測定した。治療指数(表7中)は、未感染細胞(又はAd.nullで感染した細胞のLD₅₀)のLD₅₀/Ad.CMV-FCU1又はAd.CMV-TKで感染した細胞のLD₅₀の比率と一致する。FCU1/5-FC系の治療指数は、FCU1/5-FC組合せに基づく自殺遺伝子計画がより治療的に有効であることを示すように、TK/GCV系のそれよりも一般的により高かった。

表7

	FCU1/5-FC 治療指数	TK/GCV 治療指数
B16(F0) MOI 50	30	10
RENCA MOI 5	100	100
SW480 MOI 1	300	100
PANC-1 MOI 1	1000	150
SK-BR-3 MOI 1	3000	1000

5. インビボ実験

インビボでの腫瘍の増殖を阻害するFCU1/5-FCとTK/GCV系の能力を評価するために、 3×10^5 B16(F0)細胞を、 $n = 10$ の免疫応答性B6D2マウスの6群に皮下的に注射した(=DO)。その腫瘍が触知可能(D+8)となったらすぐに、「ビヒクル」緩衝液(10mMトリス,pH8、1mM MgCl₂)又は、この同じ緩衝液中に懸濁したアデノウイルス(図1の凡例を参照)を、3つの場合について(D+8, D+9とD+10)、腫瘍ルートによって 5×10^8 IUの投薬量で注射した。D+8から先に、0.9%生理食塩水の1ml、又は5-FCの1%溶液の1ml又はGCVの0.1%溶液の1mlを、D+43まで日に2回、腹腔内に注射した。その結果(図1と図2)は、Ad.CMV-FCU1を注射し且つ5-FCで処理した群において、GCVで治療したAd.CMV-TK群及びコントロール群と比較して生存率増加を示した。これらの結果は、FCU1遺伝子と5-FCプロドラッグの結合の、特に抗腫瘍性治療を実行する場合の価値を確認する。実施例7 FCU1自殺遺伝子とサイトカインをコードする遺伝子の結合。

FCU1とサイトカイン(IFN とIL-2)の組合せを、B16(F0)細胞が免疫応答性B6D2マウスに移植されたネズミ腫瘍モデルにおいてインビボで試験した。サイトカインをコードするアデノウイルスは、ネズミIFN を発現するAd.CMV-muIFN (AdTG13048)、及びヒトIL-2を発現するAd.CMV-HuIL-2 (AdTG6624)とした。

ネズミIFN を発現するためのベクターpTG13048は、以下の手法で構築した：ネズミIFN (muIFN)のためのcDNAを包含するpTG8390からSalI/NotIフラグメントを単離し、転移ベクターpTG13047を形成するために、XhoI/NotI線状化したベクターpTG6600に導入した。muIFN を運ぶ且つpTG13047から分離したPacI/BstEIIフラグメントと、E1とE3領域を欠失し且つE1に代えてmuIFN 遺伝子を含むアデノウイルスベクターpTG13048を生成するClaI線状化ベクターpTG6624との間の相同組換えは、CMVプロモーターとハイブリッド-グロブリン/Igスプライシング配列の制御下で行った。そのウイルス粒子(Ad.CMV-muIFN)は、293細胞をトランスフェクションすることによって得た。ヒトIL-2を発現する、pTG6624ベクターは、文献FR-A-2763959中に記載される。

3×10^5 B16(F0)細胞を、13の免疫応答性B6D2マウスの10群に皮下的に注射した(=DO)。その腫瘍が触知可能(D=7)となったらすぐに、「ビヒクル」緩衝液(10mMトリス,pH8、1mM MgCl₂)又は、この同じ緩衝液中に懸濁したアデノウイルス(図3と4の凡例を参照)の組合せを、3つの場合について(D+7, D+8とD+9)、腫瘍ルートによってアデノウイルス当たり 2×10^8 IU(トータルで 4×10^8 IU)の投薬量で注射した。D+7から先に、0.9%生理食塩水の1ml、又は5-FCの1%溶液の1

10

20

30

40

50

m1を、日に2回、腹腔内に注射した。その生存率曲線(図3と図4)は、自殺遺伝子と、本発明の組成物に含まれたサイトカインとの間に相乗効果の存在を示した。この相乗効果は、自殺遺伝子をコードするアデノウイルスを用いることそれ自身又はサイトカインを用いることそれ自身を含むアプローチと比較して、FCU1/サイトカイン結合の場合におけるより高い生存率によって示される。

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人:

- (A) 名称: トランジェーヌ ソシエテ アノニム
- (B) ストリート: 11 リュ ドゥ モルシャイム
- (C) 市: ストラスブール
- (E) 国: フランス
- (F) 郵便番号: 67000

10

(G) 電話: (0)3 88 27 91 00

(H) テレファックス: (0)3 88 27 91 41

(ii) 発明の名称: ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ活性を有する変異体

(iii) 配列の数: 8

(iv) コンピュータ読取可能形態:

- (A) 媒体型: テープ
- (B) コンピュータ: IBM PC コンパチブル
- (C) 操作システム: PC - DOS / MS - DOS
- (D) ソフトウェア: Patent In Release #1.0, Version #1.25(EPO)

20

(2) 配列番号: 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 216 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子型: タンパク質

(iii) 仮定的(HYPOTHETICAL): なし

(vi) 起源:

(A) 生物: サッカロミセス セレピシエ

(vii) 直接の源:

(B) クローン: デルタ35変異体UPRTアーゼ

(xi) 配列の詳細: 配列番号: 1:

30

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
1 5 10 15

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
20 25 30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
35 40 45

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
50 55 60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
85 90 95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val
100 105 110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
115 120 125

Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe
130 135 140

Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ala Ser
145 150 155 160

Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu Pro Gln Thr Asn Gln Leu Leu
165 170 175

10

20

Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys Asn Thr Thr Arg Pro Asp Phe
180 185 190

Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg Leu Leu Val Glu Glu Gly Leu
195 200 205

Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile Val Glu Thr Asp Thr Asn Glu
210 215 220

Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly Lys Ile Cys Gly Val Ser Ile
225 230 235 240

Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln Gly Leu Arg Asp Cys Cys Arg
245 250 255

Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile Gln Arg Asp Glu Glu Thr Ala
260 265 270

Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu Pro Glu Asp Ile Ser Glu Arg
275 280 285

Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu Ala Thr Gly Gly Ser Ala Ile
290 295 300

Met Ala Thr Glu Val Leu Ile Lys Arg Gly Val Lys Pro Glu Arg Ile
305 310 315 320

Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys Glu Gly Ile Glu Lys Tyr His
325 330 335

Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr Gly Ala Leu Asp Arg Gly
340 345 350

Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro Gly Leu Gly Asp Phe Gly Asp
355 360 365

Arg Tyr Tyr Cys Val
370

10

20

30

(2) 配列番号 : 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 25 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子型 : DNA (ゲノム)

(iii) 仮定的 (HYPOTHETICAL) : なし

(iii) アンチセンス : あり

40

(vi) 起源 :

(A) 生物 : サッカロミセス セレピシエ

(vii) 直接の源 :

(B) クローン : 合成オリゴヌクレオチド

(xi) 配列の詳細 : 配列番号 : 3 :

CGGGTCCATG GTTGAATTCG AAATG

25

(2) 配列番号 : 4 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 19 塩基対

(B) 型 : 核酸

50

- (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：線状
 (ii)分子型：DNA(ゲノム)
 (iii)仮定的(HYPOTHETICAL)：なし
 (iii)アンチセンス：なし
 (vi)起源：
 (A)生物：サッカロミセス セレピシエ
 (vii)直接の源：
 (B)クローン：合成オリゴヌクレオチド
 (xi)配列の詳細：配列番号：4：
TGGTGTACGC GTGTGATT 10
19
- (2)配列番号：5の情報：
 (i)配列の特徴：
 (A)長さ：26塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：線状
 (ii)分子型：DNA(ゲノム)
 (iii)仮定的(HYPOTHETICAL)：なし
 (iii)アンチセンス：あり 20
 (vi)起源：
 (A)生物：サッカロミセス セレピシエ
 (vii)直接の源：
 (B)クローン：合成オリゴヌクレオチド
 (xi)配列の詳細：配列番号：5：
CGAAGCCATG GTTTGCAGAA TTCTAG 26
- (2)配列番号：6の情報：
 (i)配列の特徴：
 (A)長さ：25塩基対
 (B)型：核酸 30
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：線状
 (ii)分子型：DNA(ゲノム)
 (iii)仮定的(HYPOTHETICAL)：なし
 (iii)アンチセンス：あり
 (vi)起源：
 (A)生物：サッカロミセス セレピシエ
 (vii)直接の源：
 (B)クローン：合成オリゴヌクレオチド
 (xi)配列の詳細：配列番号：6：
GTTAAAAGCT TCATAGGCCA TGGTG 40
25
- (2)配列番号：7の情報：
 (i)配列の特徴：
 (A)長さ：21塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：線状
 (ii)分子型：DNA(ゲノム)
 (iii)仮定的(HYPOTHETICAL)：なし
 (iii)アンチセンス：なし 50

(vi) 起源 :

(A) 生物 : サッカロミセス セレビシエ

(vii) 直接の源 :

(B) クローン : 合成オリゴヌクレオチド

(xi) 配列の詳細 : 配列番号 : 7 :

AGTAGAGAAT TCAGCAGCT G

21

(2) 配列番号 : 8 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 26 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子型 : DNA (ゲノム)

(iii) 仮定的 (HYPOTHETICAL) : なし

(iii) アンチセンス : あり

(vi) 起源 :

(A) 生物 : サッカロミセス セレビシエ

(vii) 直接の源 :

(B) クローン : 合成オリゴヌクレオチド

(xi) 配列の詳細 : 配列番号 : 8 :

ATGGTTCGGA AGCCTCACCA ATATCT

26

10

20

【 図 1 】

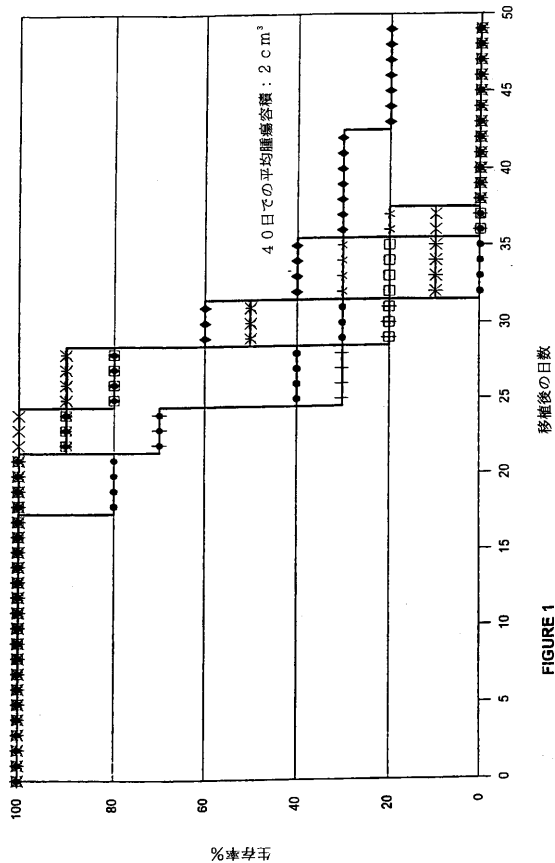


FIGURE 1

【 図 2 】

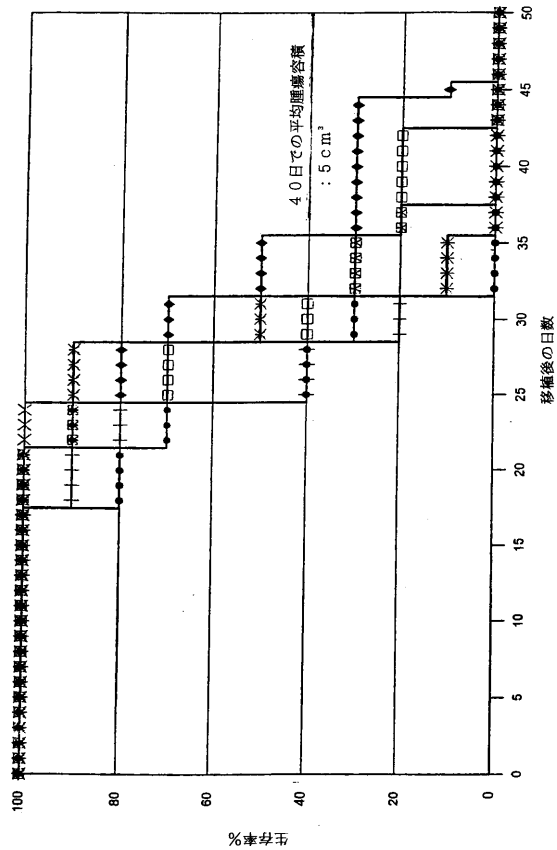
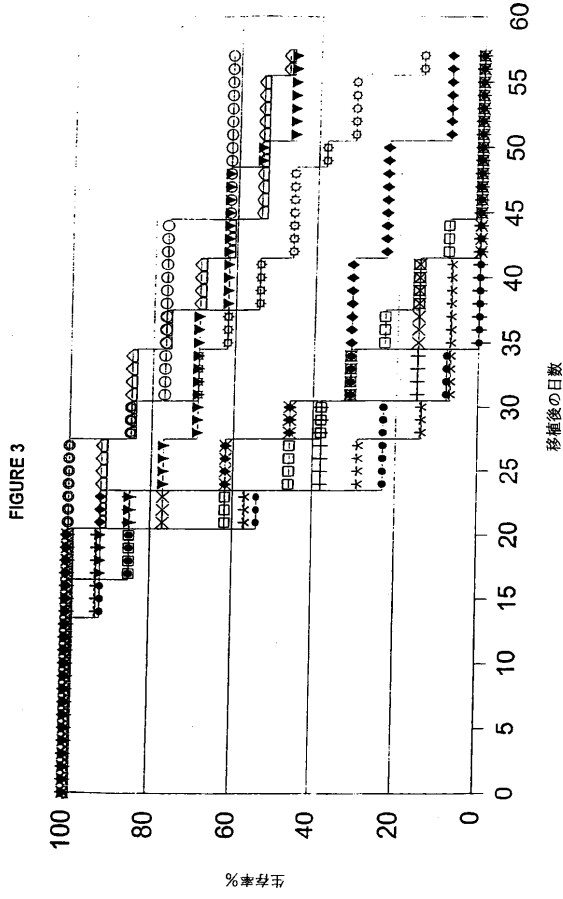
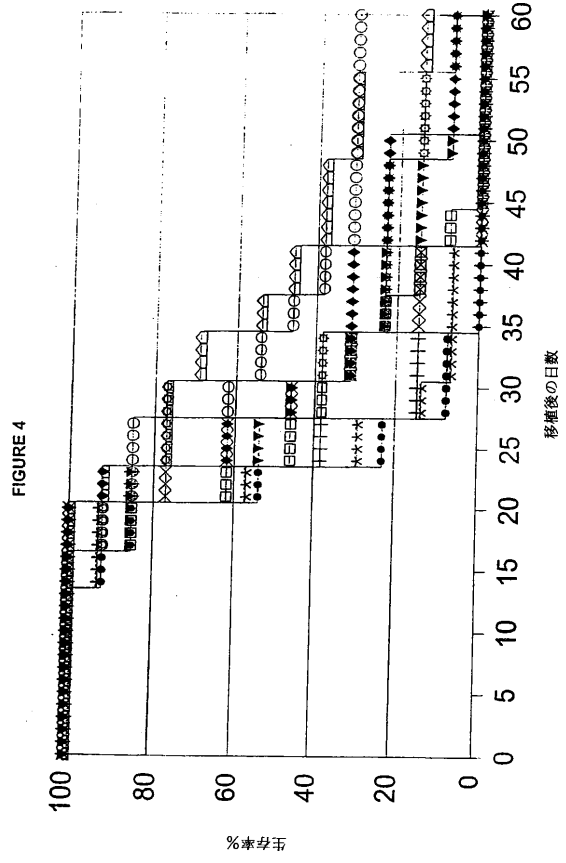


FIGURE 2

【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/45 (2006.01) A 6 1 K 37/52
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(74)代理人

弁理士 松富 豊

(74)代理人

弁理士 西 和哉

(74)代理人

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 フィリップ・イアブス

フランス・F 6 7 0 0 0・ストラスブール・リュ・キルシュレジェル・3

(72)発明者 リシェール・ジューン

フランス・F 6 7 1 0 0・ストラスブール・リュ・ドゥ・スール・4 2

審査官 中野 あい

(56)参考文献 国際公開第96/016183(WO,A1)

特表2003-500342(JP,A)

特表2003-501367(JP,A)

Gene, 1990年, vol. 88, p. 149-157

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed