

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5553989号
(P5553989)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月6日(2014.6.6)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 7/00 (2006.01)C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 7/00

請求項の数 15 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2008-514924 (P2008-514924)
 (86) (22) 出願日 平成18年6月1日 (2006.6.1)
 (65) 公表番号 特表2008-541768 (P2008-541768A)
 (43) 公表日 平成20年11月27日 (2008.11.27)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2006/021558
 (87) 國際公開番号 WO2006/130855
 (87) 國際公開日 平成18年12月7日 (2006.12.7)
 審査請求日 平成21年6月1日 (2009.6.1)
 (31) 優先権主張番号 60/686,215
 (32) 優先日 平成17年6月1日 (2005.6.1)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/738,078
 (32) 優先日 平成17年11月19日 (2005.11.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 501272937
 カリフォルニア インスティテュート オ
 ブ テクノロジー
 アメリカ合衆国 91125 カリフォル
 ニア州 パサデナ メール コード 21
 0-85 イースト カリフォルニア ブ
 ールヴァード 1200
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100106622
 弁理士 和久田 純一
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウィルスベクターを使用した標的化遺伝子送達方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レンチウィルスの 5' 長末端反復領域 (LTR) 由来の R 配列及び U5 配列を有する核酸と、自己不活性化したレンチウィルスの 3' LTR と、免疫応答が所望される抗原をコードする目的の遺伝子を含むウイルスベクター、ならびに、

シンドビスウイルス E 1 糖タンパク質である融合分子および (a) 樹状細胞を標的化し、(b) 前記融合分子から分離されており、(c) 組み換えレンチウィルスのエンベロープに組み込まれている、膜結合親和性分子である細胞特異的な結合決定基を含むウイルスエンベロープ

を含む、患者における樹状細胞に前記抗原を送達するための組み換えレンチウィルス。

10

【請求項 2】

前記抗原が腫瘍抗原である、請求項 1 に記載の組み換えレンチウィルス。

【請求項 3】

前記細胞特異的な結合決定基が抗 DEC-205 抗体である、請求項 1 または 2 に記載の組み換えレンチウィルス。

【請求項 4】

前記抗体がヒト IgG1 であり、前記細胞特異的な結合決定基が免疫グロブリン G と免疫グロブリン M とをさらに含むか、または、前記抗体が单鎖抗体である、請求項 3 に記載の組み換えレンチウィルス。

【請求項 5】

20

前記エンベロープがシンドビスウイルス E 1 および E 2 糖タンパク質を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組み換えレンチウィルス。

【請求項 6】

前記ウイルスベクターが成熟刺激分子をコードする遺伝子をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組み換えレンチウィルス。

【請求項 7】

前記自己不活性化 3'LTR が、そのエンハンサー配列が欠失した U3 要素を含み、前記自己不活性化 3'LTR が、改変された HIV の 3'LTR である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組み換えレンチウィルス。

【請求項 8】

ポリヌクレオチドをインビトロで標的細胞に送達する方法であって、前記方法は、

前記標的細胞を組み換えレンチウィルスに感染させる工程を含み、

前記組み換えレンチウィルスは、レンチウィルスの 5'長末端反復領域 (LTR) 由来の R 配列及び U5 配列を有する核酸と、自己不活性化したレンチウィルスの 3'LTR と、免疫応答が所望される抗原をコードする目的の遺伝子を含むウイルスベクター、ならびに、

シンドビスウイルス E 1 糖タンパク質である融合分子および (a) 樹状細胞を標的化し、(b) 前記融合分子から分離されており、(c) 前記組み換えレンチウィルスのエンベロープに組み込まれている、膜結合親和性分子である細胞特異的な結合決定基を含むウイルスエンベロープを含む、方法。

【請求項 9】

前記抗原が腫瘍抗原である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記自己不活性化 3'LTR が、そのエンハンサー配列が欠失した U3 要素を含み、前記自己不活性化 3'LTR が、改変された HIV の 3'LTR である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞特異的な結合決定基が抗 DEC-205 抗体である、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗体がヒト IgG1 であり、前記細胞特異的な結合決定基が免疫グロブリン G と免疫グロブリン M とをさらに含むか、または、前記抗体が单鎖抗体である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

レンチウィルスの 5'長末端反復領域 (LTR) 由来の R 配列及び U5 配列を有する核酸と、自己不活性化したレンチウィルスの 3'LTR と、免疫応答が所望される抗原をコードする目的の遺伝子を含むウイルスベクター、

樹状細胞を標的化し、シンドビスウイルス E 1 糖タンパク質である融合分子から分離された状態で組み換えレンチウィルスのエンベロープに組み込まれる、膜結合親和性分子である細胞特異的な結合決定基をコードする遺伝子を含むベクター、および

シンドビスウイルス E 1 糖タンパク質である融合分子をコードするベクターでパッケージング細胞株をトランスフェクトする工程、並びに

組み換えレンチウィルスを前記パッケージング細胞株から回収する工程を含む、方法。

【請求項 14】

前記抗原が腫瘍抗原である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記パッケージング細胞株が 293 細胞株である、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、広くは、標的遺伝子の送達に関し、そしてより詳細には融合分子及び異なる親和性分子とを含む組み換えウィルスの使用に関する。

【0002】

[関連出願の相互参照]

本出願は、米国特許法第119条(e)項に基づいて、2005年6月1日に出願された米国仮特許出願第60/686,215号、及び2005年11月19日に出願された米国仮特許出願第60/738,078号(これらは共に、参照により本明細書に明確に援用される)に対して優先権を主張する。

【背景技術】

10

【0003】

特定の標的細胞への機能的遺伝子及び他のポリヌクレオチドの送達は、様々な状況で使用することができる。例えば、疾患を予防又は治療するのに遺伝子治療を使用することができる。特に望ましい遺伝子の送達プロトコルは、*in vivo*で特定の細胞又は組織に目的の遺伝子を正確に送達することができることであろう。或る特定のウィルスは天然のままで、遺伝子送達に適しており、遺伝子導入媒体としてのウィルスベクターを設計することに、多大な努力が費やされている。これらのウィルスの中でも、癌レトロウィルスベクター及びレンチウィルスベクターは、安定な形質導入を引き起こす能力を有し、長期間、導入遺伝子の発現を維持し、そしてレンチウィルスにおいては、非分裂細胞の形質導入を可能にするので、有望な特性を示している。このようなウィルスを特定の細胞型に対して標的化することが課題であることが分かっている。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

レトロウィルスベクター及びレンチウィルスベクターを使用して、標的化可能な形質導入系を開発するために、多くの試みが為されてきた(例えば、D. Lavillette, S. J. Russell, F. L. Cosset, *Curr. Opin. Biotech.* 12, 461 (2001), V. Sandrin, S. J. Russell, F. L. Cosset, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 281, 137 (2003)を参照のこと)。

30

ウィルスを細胞表面の受容体との結合と、侵入の媒介を担うタンパク質であるエンベロープ糖タンパク質(envelope protein)を改変するのに、多大な努力が為されてきた。envelopeの表面ドメインの柔軟性が、リガンド、ペプチド及び单鎖抗体の挿入を可能にし、これは、ベクターを特定の細胞型に向けることができる(N. V. Somia, M. Zoppe, I. M. Verma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7570 (1995))。しかし、この操作は、envelopeの融合ドメインに悪影響を与え、ウィルス価を低くする。結合及び融合の未知で纖細な共役機構が、同一分子の表面ドメインが変わる際に融合機能を再構築することを非常に困難にしている。

【0005】

別の試みは、ウィルスを特定の細胞に付着させるための架橋を形成するリガンドタンパク質又は抗体を有する複合体envelopeに関する(例えば、K. Morizono, G. Bristol, Y. M. Xie, S. K. P. Kung, I. S. Y. Chen, *J. Virol.* 75, 8016 (2001))。この試みに対する課題は、架橋分子の一方の末端で複合体化された場合、envelopeの融合が非効率的であることがある。いずれの実践的な戦略も、標的化された*in vivo*での遺伝子送達に利用することができないので、現在、遺伝子治療の臨床試験は一般的に、精製された細胞の*in vitro*での形質導入、その後の改変細胞の患者への導入に基づいている。この*in vitro*の試みは、重大な安全性に対する課題を有する費用のかかる手法である。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の一態様によれば、ポリヌクレオチドを所望の細胞に送達する方法が提供され、これは標的細胞を組み換えレトロウィルスに感染させることを含む。他の態様では、組み換えレトロウィルスと、様々なベクターと、組み換えレトロウィルスを産生する構築物とが提供される。

50

【0007】

組み換えレトロウィルスのエンベロープは、融合分子と、細胞特異的な結合決定基とを含むことが好ましい。幾つかの実施の形態では、組み換えレトロウィルスは、レンチウィルスの5'長末端反復領域(LTR)由来のR配列及びU5配列と、自己不活性化されるレンチウィルスの3'LTRと、融合分子と、細胞特異的な結合決定基とを含むことが好ましい。幾つかの実施の形態では、組み換えレトロウィルスは、FUGW構築物から產生される。

【0008】

融合分子は好ましくはウィルス糖タンパク質であり、例えば、クラスI融合因子又はクラスII融合因子であり得る。本発明の幾つかの実施の形態では、融合分子はpH感受性である。好ましくは、pH感受性は、融合因子が標的細胞の細胞内区画の膜を通じてウィルスコアの送達を媒介することができるようなものである。幾つかの実施の形態では、融合分子は、受容体又は抗原等の対応する分子に対して低い親和性を有する。

10

【0009】

幾つかの実施の形態において、融合分子はヘマグルチニン、好ましくは突然変異型のヘマグルチニンである。他の実施の形態では、融合分子はSINである。さらに他の実施の形態では、融合分子は、以下のウィルス：ラッサ熱ウィルス、ダニ媒介性脳炎ウィルス、デングウィルス、B型肝炎ウィルス、狂犬病ウィルス、セムリキ森林ウィルス、ロスリバーウィルス、アウラウィルス、ボルナ病ウィルス、ハンターンウィルス、及びSARS-CoVウィルスの1つに由来するウィルス糖タンパク質を含む。

20

【0010】

本発明の幾つかの実施の形態において、細胞特異的な結合決定基は、標的細胞に存在する細胞表面分子と特異的に結合することができるタンパク質を含む。好ましくは、結合は高親和性結合であり、幾つかの実施の形態では、解離定数は、 $10^{-6} \sim 10^{-12} M$ の範囲であり得る。しかし、他の実施の形態では、より低いか、又はより高い親和性結合が可能である。

【0011】

細胞特異的な結合決定基は好ましくはタンパク質であり、幾つかの実施の形態では抗体である。細胞特異的な結合決定基は、2つ以上の分子を含み得る。例えば、細胞特異的な結合決定基が抗体を含む場合、これは、免疫グロブリン及び免疫グロブリンも含み得る。抗体が、例えば単鎖抗体である場合、別のタンパク質由来の膜貫通ドメインと融合することができる。本発明の幾つかの特定の実施の形態では、抗体はCD20抗体、CD34抗体、又はDEC-205に対する抗体である。

30

【0012】

本発明の幾つかの実施の形態において、5'LTR配列はHIV由来である。自己不活性化3'LTRは、そのエンハンサー配列が欠失されたU3要素を含み得る。自己不活性化3'LTRは、改変されたHIVの3'LTRであり得る。組み換えレトロウィルスは、ウッドチャック肝炎ウィルスエンハンサー要素配列及び/又はtRNAのアンバーサブレッサー配列等の他の要素を含み得る。

40

【0013】

組み換えレトロウィルスは、例えば、水疱性口内炎ウィルスエンベロープの糖タンパク質又は同種指向性のエンベローピタンパク質4.17を有する偽型であり得る。

【0014】

好ましい実施の形態において、組み換えレトロウィルスは、標的細胞に送達される1つ又は複数の目的の遺伝子をさらに含む。目的の遺伝子は全く限定されず、例えば細胞で発現するタンパク質をコードし得る。他の実施の形態では、目的の遺伝子は、siRNA又は細胞内で発現される他の分子をコードする。幾つかの実施の形態では、目的の遺伝子のうちの少なくとも1つが、蛍光タンパク質等のレポーター遺伝子である。幾つかの実施の形態では、蛍光タンパク質は緑色蛍光タンパク質である。

【0015】

50

目的の遺伝子は、好ましくは、RNAのポリメラーゼⅡプロモーター又はポリメラーゼⅢプロモーター等のプロモーターと結び付く。幾つかの実施の形態では、プロモーターはユビキタスプロモーターである。例えば、ユビキタスプロモーターは、ユビキチンプロモーター、CMV - アクチンプロモーター及びpgkプロモーターから成る群より選択され得る。他の実施の形態では、プロモーターは組織特異的なプロモーターであり得る。組織特異的なプロモーターは、存在する場合、例えば、lckプロモーター、ミオゲニンプロモーター、及びthy1プロモーターから成る群より選択され得る。

【0016】

組み換えレトロウィルスは、プロモーターと機能可能に連結したエンハンサーをさらに含み得る。幾つかの実施の形態では、エンハンサー及びプロモーターが共にCMV配列である。

10

【0017】

本発明の幾つかの実施の形態では、パッケージング細胞株は、レトロウィルス要素と、目的の遺伝子と、融合分子と、細胞特異的な結合決定基とをコードする1つ又は複数のベクターでトランスフェクトされる。組み換えレトロウィルスは、パッケージング細胞株から回収され、標的細胞を感染させるのに使用されて、これにより、目的の遺伝子が標的細胞に送達される。本発明の幾つか実施の形態では、パッケージング細胞株は293細胞株である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

20

特異性がある所望の細胞型に対して効果的な遺伝子送達媒体を標的化することにより、ウィルス媒介性の遺伝子治療の治療可能性が著しく高まり、in vivoでのオフターゲット効果の不安が軽減する。さらに、このことは、疾患耐性又は特定の組織におけるタンパク質産生等の特定の形質を有するトランスジェニック動物の創出のような他の状況において多くの利点がある。

【0019】

本明細書中に記載される方法及び構築物の好ましい実施形態は、ウィルス結合機能及び融合機能をウィルスエンベロープに挿入される2つの異なる成分（融合タンパク質及び親和性分子）に分けることができるという発見に一部基づいている。これにより、所望の標的細胞に対するウィルスの正確な標的化、並びに所望のポリヌクレオチド又は他の分子の効果的な形質導入及び送達が可能になる。例えばウィルスの融合タンパク質が異種の結合成分で改変される場合、本方法の他に優る利点は、標的の特異性を増大させるのにウィルス価を犠牲にしないように、融合タンパク質はその生物活性を維持することができる

30

【0020】

以下に詳細に述べられるように、本方法は、レンチウィルス等の組み換えレトロウィルスの使用に基づいていることが好ましく、これはこれらのウィルスが、ウィルス産生細胞の表面上に見出されるタンパク質をどれでもこれらのエンベロープに容易に組み込むためである。しかし、他の種類のウィルスを使用してもよく、それに応じて方法を変更してもよい。一般的に、パッケージング細胞株には、レトロウィルス成分をコードする1つ又は複数のベクター、目的の遺伝子、融合分子及び親和性分子がトランスフェクトされる。ウィルスの出芽の間に、パッケージング細胞膜で発現している融合分子及び親和性分子をウィルスのエンベロープに組み込む（図1）。結果として、レトロウィルス粒子は、目的の遺伝子を包含するコア、並びにその表面に融合分子及び親和性分子を含むエンベロープを含む。それから、親和性分子は標的細胞膜の構成要素を認識し、細胞表面にレンチウィルスを付着させる（図2）。結合により、標的のエンドサイトーシスが誘導され、レンチウィルスをエンドソームに運ぶ。そこで、融合分子（FM）は膜融合を誘発し、これによりウィルスコアがサイトゾルに侵入することが可能になる。逆転写及び産物の核への移動の後に、ウィルスのゲノムが標的の細胞ゲノムに統合され、導入遺伝子を組み込む。

40

【0021】

50

本明細書中で開示される方法は、様々な親和性分子及び融合分子に容易に適用することができる。好ましい実施形態では、融合分子（F M）は、好ましくはエンドソームの低pH環境に応じて融合を媒介するウィルス糖タンパク質であることが好ましく、親和性分子は、好ましくは結合後に効率的に取り込まれる膜結合タンパク質である。融合分子は、ウイルスの含有物がウイルス粒子の分解前にサイトゾルに流入することができる十分に迅速な動態を示すことが好ましい。さらに、融合分子の結合能を低減させるように、したがって任意の非特異的な結合を低減させるか、又は取り除くように融合分子を改変することができる。つまり、融合分子の結合能を低減させることによって、主に又は完全に親和性分子によって、標的細胞へのウイルスの結合が決定され、これにより、高い標的特異性及び不要な効果の低減が可能になる。

10

【 0 0 2 2 】

親和性分子としては、例えば、標的細胞表面上の特定の抗原に対する抗体、及び細胞表面のリガンドに対する受容体又は細胞表面の受容体に対するリガンドが挙げられ得る。親和性分子は膜結合されることが好ましい。したがって、抗体を使用すべきである場合、この抗体は膜結合形態に改変され得る。例えば、所望の特異性を有する抗体由来の可変領域は Ig G₁にクローニングすることができる。代替的に、膜貫通ドメインは、単鎖抗体等の抗体に付着し得る。

【 0 0 2 3 】

幾つかの実施形態において、この方法を用い、親和性分子としてDEC-205受容体に対する膜結合モノクローナル抗体を使用して、樹状細胞を標的化する。他の実施形態では、親和性分子として膜結合形態の幹細胞因子の組み込みを使用して、cキット陽性細胞を標的化することができる。

20

【 0 0 2 4 】

したがって、開示される方法のモジュールの柔軟性（親和性分子と融合分子との組合せ）及び幅（例えば、モノクローナル抗体又は多くの取り込まれた細胞特異的な表面分子に対するリガンドの利用可能性及びこのような抗体を生成する能力）は、治療、産業及び研究のために標的化された遺伝子送達の適用を容易にするのに特に有利である。例えば、本発明の方法を標的腫瘍細胞に使用し、毒性遺伝子を送達することができる。別の実施形態では、病原体に感染した（又はこのような感染の影響を受けやすい）細胞が標的化され、siRNAを送達して、病原体のライフサイクルの段階を抑制することができる。さらに別の実施形態では、特定の成分（例えば酵素）を欠失した細胞が標的化され、この特定の成分をコードする遺伝子を送達することができる。

30

【 0 0 2 5 】

[定義]

別途定義されない限り、本明細書中で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されるものと同じ意味である。例えば、Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)を参照のこと。本明細書中に記載されるものと同様な又は同等な任意の方法、装置、及び材料を本発明の実施に使用することができる。

40

【 0 0 2 6 】

本明細書中で使用される場合、「核酸」、「ポリヌクレオチド」、及び「ヌクレオチド」という用語は交換可能であり、これはリン酸ジエステル結合又はリン酸トリエステル、ホスホロアミダート、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエステル、架橋ホスホロアミダート、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホロアミダート、架橋ホスホロアミダート、架橋メチレンホスホネート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオエート、架橋ホスホロチオエート、又はスルトン結合等の改変結合のいずれか、及びこのような結合の組合せから成っているかにかかわらず、任意の核酸を指す。

50

【0027】

また、「核酸」、「ポリヌクレオチド」、及び「ヌクレオチド」という用語は、5つの生物学的に生成される塩基（アデニン、グアニン、チミン、シトシン及びウラシル）以外の塩基から成る核酸を特に含む。

【0028】

本明細書中で示される場合、核酸分子は、他のポリペプチドをコードする混入核酸分子から実質的に分離される場合に、「単離」されるという。

【0029】

「免疫付与」は、宿主に対して抗原の提供を指す。幾つかの実施形態では、樹状細胞等の抗原提示細胞に対して抗原が与えられる。例えば、以下で記載されるように、抗原をコードする遺伝子を含む組み換えウィルスは、樹状細胞上のタンパク質に特異的な親和性分子により樹状細胞に対して標的化することができる。したがって、免疫応答が望まれる抗原を樹状細胞に送達することができる。他の免疫付与方法は当該技術分野で既知である。

10

【0030】

「抗体」（Ab）及び「免疫グロブリン」（Ig）は、同じ構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体が特定の抗原に対する結合特異性を示す一方で、免疫グロブリンは抗体及び抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系では低いレベルで、及び骨髄腫では増大されたレベルで産生される。

【0031】

「自然抗体」及び「自然免疫グロブリン」は、通常2つの同一の軽（L）鎖と2つの同一の重（H）鎖とから成るヘテロ四量体の糖タンパク質である。それぞれの軽鎖はジスルフィド結合によって重鎖と結合する。ジスルフィド結合の数は、様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変化する。それぞれの重鎖は、可変ドメイン（V_H）を含み、その後に多くの定常ドメインが続く。それぞれの軽鎖は一方の末端に可変ドメイン（V_L）及びそのもう一方の末端に定常ドメインを含む。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと並び、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並ぶ。

20

【0032】

「抗体」という用語は幅広い意味で使用され、所望の生物活性を示す限り、ヒト、非ヒト（例えばマウス）及びヒト化モノクローナル抗体（全長のモノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、複数の特異性がある抗体（例えば二重特異性抗体）、単鎖抗体、及び抗体フラグメントを特に含む。

30

【0033】

「標的細胞」は、目的の遺伝子の発現が望まれる任意の細胞である。好ましくは、以下に記載されるように、標的細胞は、細胞が親和性分子の標的とされることを可能にするタンパク質又は他の分子を細胞表面上に示す。

【0034】

「哺乳動物」という用語は、哺乳類に属する個体として定義され、ヒト、家畜、並びに動物園の動物、スポーツ用の動物及びペット用の動物（ヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ及びウシ等）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0035】

「被検体」又は「患者」は、治療が必要な任意の動物、好ましくは哺乳動物である。

【0036】

本明細書中で使用される場合、「治療」は患者によって明示されるか、又は患者において予防されるべきである疾患、障害又は生理的状態に応じて行われる臨床的介入である。治療目的は、症状の緩和及び/又は予防、並びに疾患、障害、又は状態の進行を抑えること、止めること、若しくは逆転させることを含む。「治療」は治療上の処置及び予防又は再発防止措置の両方を指す。治療が必要な患者としては、疾患又は障害又は望ましくない生理的状態を既に患っている患者、及び疾患又は障害又は望ましくない生理的状態を予防するべきである患者が挙げられる。「治療」は疾患を完全に取り除く必要はなく、また患者が疾患又は障害に罹るのを完全に予防する必要もない。

50

【0037】

本明細書中で使用される場合、「腫瘍」は、陽性又は悪性にかかわらず、全ての腫瘍細胞の成長及び増殖、並びに全ての前癌及び癌性の細胞及び組織を指す。

【0038】

「癌」という用語は、調節できない細胞成長が特徴である疾患又は障害を指す。癌の例としては、上皮性悪性腫瘍、リンパ腫、芽細胞腫及び肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。特定の癌の例としては、肺癌、結腸癌、乳癌、精巣癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、結腸直腸癌、及び前立腺癌が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる癌は、当業者に既知である。

【0039】

「ベクター」は別の核酸を輸送することができる核酸である。例えば、ベクターはプラスミド、コスミド、又はファージであり得る。「発現ベクター」は、適切な環境内に存在する場合、ベクターによって運ばれる1つ又は複数の遺伝子でコードされるタンパク質の発現をすることができるベクターである。

【0040】

「調節要素」及び「発現制御要素」という用語は交換可能に使用することができ、特定の環境で機能可能に連結したコード配列の転写及び/又は翻訳に影響を与えることができる核酸分子を指す。これらの用語は広く使用され、プロモーター、RNAポリメラーゼと転写因子との基本的な相互作用に必要なコア要素、上流要素、エンハンサー、及び応答要素を含む転写を促進するか、又は調節する全ての要素を含む（例えば、Lewin著「Genes V」(Oxford University Press, Oxford) pages 847-873を参照のこと）。原核生物における例示的な調節要素としては、プロモーター、オペレーター配列及びリボソーム結合部位が挙げられる。真核細胞に使用される調節要素としては、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、及びポリアデニル化シグナルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

「トランスフェクション」という用語は、核酸の宿主細胞への導入を指す。

【0042】

「レトロウィルス」はRNAゲノムを有するウィルスである。

【0043】

「レンチウィルス」は、分裂細胞及び非分裂細胞に感染することができるレトロウィルスの属を指す。レンチウィルスの幾つかの例としては、HIV（ヒト免疫不全ウィルス：1型HIV及び2型HIVを含む）、ヒトの後天性免疫不全症候群（AIDS）の病原因子；ビスナ-マエディ（ヒツジにおいて脳炎（ビスナ）又は肺炎（マエディ）を引き起こす）、ヤギ関節炎脳炎ウィルス（ヤギにおいて免疫不全、関節炎、及び脳障害を引き起こす）；ウマ伝染性貧血ウィルス（ウマにおいて自己免疫性溶血性貧血及び脳障害を引き起こす）；ネコ免疫不全ウィルス（FIV）（ネコにおいて免疫不全を引き起こす）；ウシ免疫不全ウィルス（BIV）（ウシにおいてリンパ節症、リンパ球増加症、及び場合によっては中枢神経系感染を引き起こす）；並びにサル免疫不全ウィルス（SIV）（霊長類において免疫不全及び脳障害を引き起こす）が挙げられる。

【0044】

本明細書中で使用される「ハイブリッドウィルス」は、非レトロウィルスベクター由來の要素を含む1つ又は複数の他のウィルスベクター由來の成分を有するウィルス、例えばアデノウィルスレトロウィルスハイブリッドを指す。本明細書中で使用される場合、レトロウィルス成分を有するハイブリッドベクターは、レトロウィルスの範囲内であるとみなす。

【0045】

レンチウィルスゲノムは一般的に、5'長末端反復領域（LTR）、gag遺伝子、pol遺伝子、env遺伝子、付属遺伝子（nef、vif、vpr、vpu）及び3'LTRに系統付けられる。ウィルスのLTRは、U3、R及びU5と呼ばれる3つの領域に

10

20

30

40

50

分けられる。U 3 領域には、エンハンサー要素とプロモーター要素とが含まれる。U 5 領域にはポリアデニル化シグナルが含まれる。R(反復)領域は、U 3 領域とU 5 領域とを分け、R領域の転写配列はウィルスRNAの5'側及び3'側の両方に現れる。例えば、「RNA Viruses: A Practical Approach」(Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)), O Narayan and Clements J. Gen. Virology 70:1617-1639 (1989), Fields et al. Fundamental Virology Raven Press. (1990), Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. J Virol. 72(10):8150-7 (1998), 及び米国特許第6,013,516号を参照のこと。

【0046】

レンチウィルスベクターは当該技術分野で既知であり、これには造血幹細胞をトランسفェクトするのに使用されるものの幾つかが含まれる。このようなベクターは、例えば以下の出版物で見出すことができ、これらは参考により本明細書中に援用される: Evans JT et al. Hum Gene Ther 1999;10:1479-1489, Case SS, Price MA, Jordan CT et al. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:2988-2993, Uchida N, Sutton RE, Friera AM et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:11939-11944, Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE et al. Science 1999;283:682-686, Sutton RE, Wu HT, Rigg R et al.著「Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells」J Virol 1998;72:5781-5788。

【0047】

「ビリオン(virion)」、「ウィルス粒子」及び「レトロウィルス粒子」は本明細書中では、RNAゲノム、pol遺伝子誘導性タンパク質、gag遺伝子誘導性タンパク質、及びエンベロープ(糖)タンパク質を示す脂質二重層を含む単独ウィルスを示すのに使用される。RNAゲノムは通常、組み換えRNAゲノムであり、したがって、天然のウィルスゲノムに対して外因性であるRNA配列を含み得る。また、RNAゲノムは欠損した外因性のウィルス配列を含み得る。

【0048】

「偽型(pseudotype)」レトロウィルスは、RNAゲノムの由来となるウィルス以外のウィルス由来であるエンベロープタンパク質を有するレトロウィルス粒子である。エンベロープタンパク質は、異なるレトロウィルスに由来するか、又は非レトロウィルス性のウィルスに由来し得る。好ましいエンベロープタンパク質は、水疱性口内炎ウィルスG(VSV-G)タンパク質である。しかし、ヒトへの感染の可能性を取り除くために、代替的に、ウィルスは、マウス又はトリ等の特定の種への感染を制限するエコトロピックエンベロープタンパク質で偽型にすることができる。例えば、一実施形態では、エコトロピックエンベロープタンパク質4.17等の突然変異型のエコトロピックエンベロープタンパク質が使用される(Powell et al. Nature Biotechnology 18(12): 1279-1282 (2000))。

【0049】

「自己不活性化3'LTR」は、LTR配列が下流の遺伝子の発現を促進するのを防止する突然変異、置換、又は欠失を含む3'長末端反復領域(LTR)である。3'LTR由来のU 3 領域のコピーが、統合プロウィルスにおける両方のLTRの形成に対する鑄型として作用する。したがって、不活性化される欠失又は突然変異を有する3'LTRがプロウィルスの5'LTRと統合される場合、5'LTRからの転写は不可能である。このことは、ウィルスのエンハンサー/プロモーターと任意の内部エンハンサー/プロモーターとの間の競合を取り除く。自己不活性化3'LTRは、例えば、Zufferey et al. J. Virol. 72:9873-9880 (1998)、Miyoshi et al. J. Virol. 72:8150-8157及びIwakuma et al. Virology 261:120-132 (1999)に記載されている。

【0050】

本明細書中に定義されるように、「形質転換」は、外来DNAが標的細胞に侵入するプロセスを示す。形質転換は、異種核酸配列を原核宿主細胞又は真核宿主細胞に挿入するための任意の既知の方法によるが、これには、ウィルス感染、エレクトロポレーション、熱

10

20

30

40

50

ショック、リポフェクション及び粒子衝突が挙げられ得るがこれらに限定されない。「形質転換」細胞としては、挿入DNAが自己複製プラスミドとして、又は宿主染色体の一部としてのいずれかとして複製することができる安定な形質転換細胞が挙げられる。また、目的の遺伝子を一過性に発現する細胞も含まれる。

【0051】

本明細書中で記載される「融合分子」は、膜融合を誘発し、ウィルスコアが膜を通過するのを可能にさせるウィルス表面上の任意の分子であり、典型的には標的細胞のサイトゾルに侵入する。ウィルスの糖タンパク質は、融合分子の一例である。

【0052】

本明細書中に記載される「親和性分子」又は「細胞特異的な結合決定基」は、標的細胞膜上の分子構成要素を認識し、それにより細胞表面に対してウィルスを標的化するよう機能するウィルス表面上の任意の分子である。親和性分子は、融合分子とは別々のものであることが最も好ましい。

10

【0053】

「導入遺伝子」とは、本発明の方法等によって、ヒトの介入によって宿主細胞の1つ又は複数の染色体に統合される任意のヌクレオチド配列、特にDNA配列を意味する。好ましくは、導入遺伝子は「目的の遺伝子」を含む。他の実施形態では、導入遺伝子は、統合される場合、染色体をマークするのに使用されるヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列であり得る。導入遺伝子は、発現することができるタンパク質をコードする遺伝子を含んでいる必要はない。

20

【0054】

「目的の遺伝子」は何ら限定するものではなく、統合、転写、翻訳、及び/又は標的細胞で発現することができる任意の核酸（これらに限定されない）であり得る。目的の遺伝子は、タンパク質又はRNA分子等の機能的産物をコードすることができる。好ましくは、目的の遺伝子は、宿主細胞で発現が望まれるタンパク質又は他の分子をコードする。目的の遺伝子は、一般的に転写調節配列等の目的の遺伝子の所望の発現を得るために有用な他の配列と機能可能に結び付く。

【0055】

「機能的な関係」及び「機能可能に連結した」は、限定されないが、プロモーター及び/又はエンハンサーに対して遺伝子が正しい位置、及び向きにあること、プロモーター及び/又はエンハンサーが適切な分子と接触する場合、遺伝子の発現に影響を与えることを意味する。

30

【0056】

「RNAコード領域」は、siRNA等のRNA分子の合成のための鋳型として作用することができる核酸である。好ましくは、RNAコード領域はDNA配列である。

【0057】

「低分子干渉RNA」又は「siRNA」は、相同性を共有する遺伝子の発現を抑制することができる二本鎖のRNA分子である。一実施形態では、siRNAは、センス領域、ループ領域、及びセンス領域と相補的であるアンチセンス領域を含む、「ヘアピン」又はステム-ループRNA分子であり得る。他の実施形態では、siRNAは、非共有結合的に結び付き二本鎖を形成する2つの異なるRNA分子を含む。

40

【0058】

「2A配列」又は要素は、2つのタンパク質間のリンカーとして導入される小ペプチドであり、これによりポリタンパク質の自律したリボソーム内の自己処理が可能になる（de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004); deFelipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)）。短ペプチドは、同じベクターからの融合分子と親和性分子との同時発現等の単独ベクターからの複数のタンパク質の同時発現を可能にする。したがって、幾つかの実施形態では、2A要素をコードするポリヌクレオチドは、ベクターの中で発現されるタンパク質をコードするポリヌクレオチドの間に組み込まれる。

【0059】

50

[融合分子]

融合分子（F M）は、組み換えウィルスのエンベロープに組み込むことができる分子であり、適した条件下で、目的の遺伝子の標的細胞への侵入を可能にする膜融合を誘導する。融合分子はウィルス、好ましくは組み換えレンチウィルスを偽型にすることができることが好ましく、このようにしてウィルスエンベロープに組み込むことができる。好ましくは、F Mは標的細胞のウィルス感染を直接媒介しないが、一度ウィルスがエンドサイトーシス経路に侵入しても、融合を誘導するその能力は依然として維持される。したがって、F Mは細胞表面分子と結合する能力を自然に有し得るが、結合能が低いか、又は低減されたF Mが非特異的な形質導入を低減するのに好ましい。好ましくは、F Mはウィルス糖タンパク質である。さらに、F Mは濃縮を可能にする超遠心分離に耐性があることが好ましく、このことは *in vivo* での遺伝子送達にとって重要である。

10

【0060】

F Mは、親和性分子の結合とは関係なく、低pHで膜融合を誘導することができる。したがって、開示される方法において、F Mを含むウィルスが標的細胞のエンドソームの内側にあり、また目的の遺伝子を含むウィルスのコア成分がサイトゾルに送達されるときに、F M誘導性の膜融合が起こることが好ましい。

【0061】

幾つかの実施形態において、タグ配列が融合分子に組み込まれて、ウィルス粒子におけるF M発現及びF Mの存在の検出が可能になる。

20

【0062】

ウィルス融合因子の2つの認識された群が存在し、両方ともF Mとして使用することができる（D. S. Dimitrov, *Nature Rev. Microbiol.* 2, 109 (2004)）。クラスI融合因子は、らせん状の二重コイル構造を使用して膜融合を誘発するが、クラスII融合因子はバレルで融合を誘発する。これらの2つの構造は様々な力学及び動態を有する（D. S. Dimitrov, *Nature Rev. Microbiol.* 2, 109 (2004)）。

20

【0063】

融合分子に使用することができる表面の糖タンパク質の幾つかの非限定的な例としては、E 1、E 2及びE 3等の表面の糖タンパク質を含む、セムリキ森林ウィルス（SFV）、ロスリバーウィルス（RRV）、及びアウラウィルス（AV）等の ウィルス由来の糖タンパク質等が挙げられる。シンドビスウィルス由来のE 2糖タンパク質（SIN）、及びインフルエンザウィルスのヘマグルチニン（HA）は、細胞表面上の特定の分子を認識する非レトロウィルス糖タンパク質であり（E 2に関してはヘパリン硫酸グリコサミノグリカン、HAに関してはシアル酸）、幾つかの実施形態ではF Mとして使用される。これらの融合は受容体分子の結合とは比較的関係なく、融合の活性化がエンドソームにおける酸性化によって達成される（Skehel及びWiley, *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531-569 (2000); Smit, J. et al. *J. Virol.* 73, 8476-8484 (1999)）。その上、それらは或る特定の遺伝的修飾に耐容性があり、レトロウィルス表面上に効果的にアセンブリすることを維持することができる（Morizono et al. *J. Virol.* 75, 8016-8020）。幾つかのF Mで認識される表面分子の遍在的存在的ために、HAの結合欠損型等のように結合能が欠損しているが、融合能を有する融合タンパク質が使用されることが好ましい。

30

【0064】

本発明の他の実施形態において、ラッサ熱ウィルス、B型肝炎ウィルス、狂犬病ウィルス、ボルナ病ウィルス、ハンターンウィルス、又はS A R S - C o V ウィルスの表面の糖タンパク質は、融合分子として利用することもできる。他の実施形態では、D Vの糖タンパク質を融合分子として利用することができる。

40

【0065】

本発明の他の実施形態において、フラビウィルスベースの表面の糖タンパク質は融合分子として利用することができる。 ウィルスのように、フラビウィルスはクラスII融合分子を使用して感染を媒介する（Mukhopadhyay et al. (2005) *Rev. Microbiol.* 3, 13-22）。p r M（約165個のアミノ酸）及びE（約495個のアミノ酸）は、フラビウィ

50

ルスの糖タンパク質である。また、D Vに対するリガンド結合ポケットはよく特徴付けられている。興味深いことに、マンノース特異的なレクチンであるD C - S I G N (樹状細胞特異的なICAMグラッピング非インテグリン (ICAM-grabbing non-integrin))は、D V E タンパク質上の炭水化物残基と特異的に相互作用し、ウィルスの侵入を高めることが示唆されている (Mukhopadhyay et al. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 13-22)。このD V E タンパク質のみによってエンベロープを形成したレンチウィルスは潜在的にD C を標的化することができる。T B E 及びD V E タンパク質並びに記載される他の融合分子のリガンド結合ポケットは、以下の様式で結合能を欠損させ、融合能を有するよう改変され得る。

【0066】

10

幾つかの実施形態において、クラスI融合因子である、インフルエンザA / 家禽ペストウィルス / ロストク / 34 (FPV) 由来のヘマグルチニン (HA) を使用する (T. Hatzioannou, S. Valsesia-Wittmann, S. J. Russell, F. L. Cosset, *J. Virol.* 72, 5313 (1998))。好ましくは、H Amu 等の結合欠損バージョンのFPV HA (図3A) を使用する (A. H. Lin et al., *Hum. Gene. Ther.* 12, 323 (2001))。H Amu 媒介性の融合は一般的に受容体結合と独立していると考えられている (D. Lavillette, S. J. Russell, F. L. Cosset, *Curr. Opin. Biotech.* 12, 461 (2001))。

【0067】

他の実施形態において、クラスIIのFM、好ましくは ウィルスファミリー由来のシンドビスウィルスの糖タンパク質 (本明細書中ではS INとも呼ばれる) を使用する (K. S. Wang, R. J. Kuhn, E. G. Strauss, S. Ou, J. H. Strauss, *J. Virol.* 66, 4992 (1992))。S INには、融合に関する第1のタンパク質 (E 1) 及び細胞結合に関する第2のタンパク質 (E 2) の2つの膜貫通タンパク質が含まれる (S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, *Nature Rev. Microbiol.* 3, 13 (2005))。S INは、腫瘍レトロウィルス及びレンチウィルスの両方を偽型にするものとして知られている。

20

【0068】

幾つかの実施形態において、結合能欠損で融合能を有するS INを融合分子として使用する。例えば、プロテインAの免疫グロブリンG結合ドメイン (ZZドメイン) がE 2タンパク質に組み込まれ、1つ又は複数のさらなる突然変異が起こり、受容体結合部位を不活性化する、S IN融合分子を使用することができる (K. Morizono et al., *Nature Med.* 11, 346 (2005))。

30

【0069】

FMをコードする遺伝子は、p c D N A 3 (Invitrogen)等の発現ベクターにクローニングすることが好ましい。それから、293T細胞等のパッケージング細胞を、目的の遺伝子、パッケージングベクター (必要であれば)、親和性分子をコードする1つ又は複数のベクター及び任意の関連の成分、並びに融合分子の発現のためのベクターを含むウィルスベクターで同時にトランスフェクトする。FMは、パッケージング細胞膜上で発現し、組み換えウィルスに組み込まれる。パッケージング細胞の表面上のエンベロープ糖タンパク質の発現は、F A C Sで分析することができる。

【0070】

40

例えば、構造研究及び分子のモデル化により得られた情報に基づいて、突然変異誘発を用いて、これらの融合能を維持するが、所望のレベルの結合能を有する突然変異型の糖タンパク質を創出することができる。幾つかの突然変異体がそれぞれの糖タンパク質で作られ、以下に記載の方法又は当該技術分野で既知の他の方法を使用して分析し、最も望ましい特徴を有するFMを同定することができる。

【0071】

好適なFM (野生型又は突然変異型のいずれか)を選択するために、FM及び親和性分子の両方を有するウィルスを調製し、それらの選択性及び/又は標的細胞膜の通過を促進する能力に関して試験する。選択性を測定するための対照として、親和性分子を示さないウィルスを使用することができる一方で、親和性分子と野生型の糖タンパク質とを示すウ

50

イルスを突然変異体における力価効果を試験するための対照として使用することができる。親和性分子の結合パートナーを発現する細胞が、標準的な感染試験を使用してウィルスにより形質導入される。規定時間後、例えば形質導入の48時間後、細胞を回収することができ、例えばFACSによって、突然変異型のFMを含むウィルスに感染した細胞の割合を求めることができる。ウィルスに感染した細胞の割合を算出することによって、選択性に値を付けることができる。同様に、突然変異型のFMを含むウィルスに感染した細胞の割合を対応する野生型のFMを含むウィルスに感染した細胞の割合で割ることによって、ウィルス価に対する突然変異の効果を定量化することができる。好ましい突然変異体により、選択性と感染価との最良の組合せが与えられる。FMが選択されれば、FMによって包まれたウィルスが濃縮されることを確認することで、ウィルス濃度分析を行い得る。ウィルス上清を回収し、超遠心分離で濃縮する。ウィルスのストック溶液の限界希釈及び親和性分子の結合パートナーを発現する細胞の形質導入によって、ウィルス価を求めることができる。

【0072】

幾つかの実施形態において、ウィルスの侵入と、それによる融合分子（野生型又は突然変異型）の有効性を評価するために、BlaM-Vpr融合タンパク質を利用することができる。抗体等の親和性分子は、BlaM-Vprを組み込んだウィルス粒子を包むことができる。例えば、ウィルス要素と、BlaM-Vprと、目的のFMと、親和性分子とを含む1つ又は複数のベクターによるパッケージング細胞の一過性なトランスフェクトによって、このようなウィルスを調製することができる。得られたウィルスを使用して、親和性分子結合の遊離した阻害剤（抗体等）の非存在下又は存在下における親和性分子によって認識される分子を発現する細胞を感染させることができる。それから、細胞を、CO₂非依存培地で洗浄し、CCF2染料(Aurora Bioscience)で染色することができる。開裂反応を完了させるための室温でのインキュベート後、細胞を、パラホルムアルデヒドによって固定化し、FACS及び顕微鏡検査によって分析することができる。青色細胞の存在により、細胞質へのウィルスの侵入が示され、阻害抗体が加えられると、青色細胞が減少すると予測される。

【0073】

侵入が低pHに依存しているか否かを調査し、所望のpH依存性を有するFMを選択するために、pHを変えるNH₄Cl又は他の化合物を感染工程で加えることができる（NH₄Clにより、エンドソームの酸性区画が中和される）。NH₄Clの場合、青色細胞の消失により、ウィルスの侵入が低pH依存性であることが示される。

【0074】

さらに、融合分子活性がpH依存性であることを確認するために、塩化アンモニウム、クロロキン、コンカナマイシン、バフィロマイシンA1、モネンシン、ニゲリシン等のリソソーム指向性因子（lysosomotropic agents）をインキュベート緩衝液に加えることができる。これらの因子はエンドソーム区画内のpHを上昇することができる（例えば、Drrose and Altendorf, J. Exp. Biol. 200, 1-8, 1997）。これらの因子の阻害効果により、ウィルスの融合及び侵入に対するpHの役割が示される。異なる融合分子を示すウィルス間の異なる侵入動態を比較し、特定の用途のために、最も好適なものを選択することができる。

【0075】

PCR侵入分析（PCR entry analysis）を利用して、逆転写をモニタリング、これによりウィルス侵入の動態の徴候としてウィルスのDNA合成の動態を測定することができる。例えば、特定のFMと親和性分子とを含むウィルス粒子は、293T細胞等の、親和性分子に対する適切な対応因子を発現するパッケージング細胞でインキュベートすることができる。（感染させるための）インキュベートの後又は直後のいずれかで、未結合のウィルスを取り除き、一定分量の細胞を分析する。それから、これらの一定分量の細胞からDNAを抽出し、LTR特異的なプライマーを使用して半定量を行う。LTR特異的なDNA産物の出現により、ウィルスの侵入及び脱殻の成功が示される。

10

20

30

40

50

【0076】

[細胞特異的結合決定基（膜結合親和性分子）]

本発明の好ましい実施形態において、ウィルス表面には、膜結合した親和性分子を含む細胞特異的な結合決定基が含まれる。標的細胞上の表面分子、例えば受容体タンパク質と選択的に結合する親和性分子を選択する。好ましくは、結合は高親和性結合であり、幾つかの実施形態では、解離定数は $10^{-6} \sim 10^{-12} M$ の範囲であり得る。しかし、他の実施形態では、より低い親和性結合、又はより高い親和性結合が可能である。

【0077】

一般的に、標的細胞のタンパク質は、標的細胞上に選択的に発現されるものである。すなわち、標的細胞のタンパク質は、標的細胞上で唯一発現されるか、又は他の細胞よりも高い濃度で標的細胞上で発現されることが好ましい。しかし、広集団の標的細胞が標的化される幾つかの実施形態では、標的細胞のタンパク質は、種々の細胞型で発現されるか、又は遍在的にさえ発現され得る。

【0078】

親和性分子は、膜結合したリガンド、膜結合した受容体、又はキメラ抗体、抗体フラグメント、若しくは単鎖抗体（これらに限定されない）等の膜結合した抗体であることが好ましい。一般的には単一分子であるものを示すが、親和性分子は IgG₁、Ig₂ 分子、及び Ig₃ 分子等の 2 つ以上の分子を含み得る。

【0079】

膜結合した親和性分子は、融合分子とは分離した分子であることが最も好ましい。

10

【0080】

標的細胞表面上の分子との親和性分子の結合の際、ウィルス粒子はエンドサイトーシスによって取り込まれる。幾つかの実施形態では、続いて pH 变化により、融合分子の融合が誘導され、ウィルスコアが膜を通過し、サイトゾルへ送達される。

【0081】

親和性分子は、目的の遺伝子と融合分子とを含むウィルスによって、パッケージング細胞において同時発現される。また幾つかの実施形態では、パッケージング細胞において親和性分子を発現するための構築物としては、タンパク質を細胞表面上に向かわせるのに必要なシグナルペプチドをコードする配列をも含む。

【0082】

30

293T 細胞等のパッケージング細胞は、目的の遺伝子を含むウィルスベクター、パッケージングベクター（必要であれば）、親和性分子と任意の関連成分（Ig₁ 及び Ig₂ 等）とをコードする 1 つ又は複数のベクター、及び融合分子の発現のためのベクターと同時にトランスフェクトすることが好ましい。幾つかの実施形態では、これらの成分の 2 つ以上が多シストロン性ベクターの中で結合される。例えば、幾つかの実施形態では、融合分子及び親和性分子は、同じベクター中に含まれる。

【0083】

親和性分子は、パッケージング細胞膜上で発現し、組み換えウィルスのエンベロープに組み込まれる。親和性分子に対する抗体等による既知の方法によって、親和性分子の発現を分析することができる。

40

【0084】

様々な種類の親和性分子（標的タンパク質の異なるエピトープに対する抗体等）の組み換えレトロウィルスの標的化及び遺伝子送達を促進する能力を比較することができ、最も望ましい特徴を有する分子を選択することができる。望ましい特徴としては、例えば、ウィルスの効果的なエンドサイトーシスを刺激する能力、標的分子と特異的に結合する能力、及び同様に標的細胞との組み換えウィルスの結合を促進する能力が挙げられる。例えば、異なる親和性分子と結合した同じ標的細胞は別々にエンドサイトーシスされることができる。したがって、幾つかの実施形態では、エンドサイトーシスを誘発する能力を有する一方で、特定の標的細胞型に対する結合特異性を維持する親和性分子が選択される。同様に、同じ抗体 - 抗原対が異なる細胞において異なるエンドサイトーシス経路を刺激するこ

50

とができ、これにより異なる細胞において目的の遺伝子の送達を促進するための異なる能力が得られる。上述した融合分子に対する分析を改変して、様々な抗体、又は他の親和性分子が特定の標的細胞への目的の遺伝子の送達を媒介するための能力を比較することができる。

【0085】

異なる親和性分子、例えば異なる細胞における異なる抗CD20抗体で媒介された形質導入の効率は容易に試験することができる。標的細胞に最も密接に類似している細胞（又は利用可能であれば標的細胞）で形質導入を行い、ウィルス侵入の効率を定量し、比較することができる。上記のBamM-Vprに基づく分析及びPCRに基づく分析を用いて、異なる細胞株における異なる親和性分子に対するウィルス侵入の効率を測定することができる。さらに、共焦点顕微鏡検査により、異なる親和性分子によって導入される、異なる細胞型におけるエンドサイトーシスを調べることができる。これらの詳細な研究は、形質導入の効率とエンドサイトーシス挙動との間の関係を決定するのに役立ち、これを用いて標的化スキームを最適化することができる。

10

【0086】

[親和性分子としての抗体]

幾つかの実施形態において、細胞特異的な結合決定基は抗体である。抗体は、既知の方法を使用して、標的細胞上の任意の所望の細胞表面分子に対して作製され得る。抗体は、免疫応答を最小限にするのに適切な種で產生することができる。他の実施形態では、ヒト化抗体又はキメラ抗体を調製して使用する。例えば、抗体はマウス、ウサギ又は他の動物で作製し、可変領域をヒトの抗体の定常領域と組合せることができる。さらに、多くの抗体が市販され、標的細胞上の標的分子に基づいて選択することができる。

20

【0087】

細胞特異的な結合決定基は膜結合されるか、又はそうでなければパッケージング細胞の膜及び最終的には組み換えウィルスのエンベロープに関連していることが好ましい。したがって、親和性分子が可溶性抗体である場合、抗体を修飾して膜と関連付けさせる必要があり得る。

【0088】

幾つかの好ましい実施形態において、親和性分子として使用される抗体は、標的に対する抗体由来の可変領域と、ヒトのIgG₁由来の定常領域とを含むことが好ましい。すなわち、所望の特異性を有する膜結合したキメラ免疫グロブリンを形成するために、標的に対する可溶性抗体等の抗体の可変領域がIgG₁の定常領域と組み合わされる。組み換えレトロウィルスがヒトに使用される場合、IgG₁はヒト由来であることが好ましい。キメラ抗体を調製する方法は当該技術分野で既知である。

30

【0089】

このような実施形態において、パッケージング細胞（ウィルスをアセンブリ（assemble）するのに使用される）は、免疫グロブリン（Ig）及び免疫グロブリン（Ig）の発現に対するベクターに加えて、IgG₁の重鎖及び軽鎖の両方をコードするベクターで同時にトランスフェクトすることが好ましい。免疫グロブリン（Ig）及び免疫グロブリン（Ig）は、抗体をウィルスの表面膜に結合させるのに有用である。幾つかの実施形態では、抗体は、マウス又はウサギ等のヒト以外の種で產生され、可変領域は、ヒトのIgG₁にクローン化される。

40

【0090】

幾つかの実施形態において、抗体及びIg₁及びIg₂の発現を誘導するのに多シストロン性ベクターが使用される。アセンブリPCR（Assembly PCR）を用いて、抗体の重鎖、軽鎖、及びIg₁及びIg₂を結び付けることができる。一実施形態では、3つの成分をコードする遺伝子は、3つの2Aペプチドで分けられ、単一のプロモーターからの発現を促進する。それから、全力セットをpCDNA3（Invitrogen）等の発現ベクターにクローン化することができる。パッケージング細胞の表面上の抗体発現の効率は、FACS染色によって分析することができる。

50

【0091】

他の実施形態において、親和性分子は自然抗体又はキメラ抗体のいずれかの単鎖抗体であり、別のタンパク質由来の膜貫通ドメインに融合されることが好ましい(Chou et. al., Biotechnol. Bioeng., 65, 160 (1999)、Liao et al, Biotechnol. Bioeng., 73, 313 (2001)、de Ines et al, J. Immunol., 163, 3948 (1999)、Lee et al, J. Immunol., 173, 4618 (2004))。細胞表面上への天然型の抗体の配置には、抗体の重鎖、抗体の軽鎖、IgG、及びIgMの4つの遺伝子の同時発現が必要であるため、単鎖の膜結合型の抗体(sCAM)は、ウィルスによる産生を単純化するのに有益である。

【0092】

sCAMは、典型的には柔軟性ペプチドリンカーで連結された重鎖の可変ドメインと軽鎖の可変ドメインとを有するように設計される。sCAMは、細胞表面に固定するために、そのN末端にシグナルペプチド及びそのC末端に膜貫通ドメインも保有している。幾つかの実施形態では、わずかに異なるバージョンのsCAMが使用され、これには、(GGGGSGGGSG)2ペプチド等のペプチドで連結された(標的細胞表面上の抗原に特異的な)所望の抗体の重鎖の可変ドメイン及び軽鎖の可変ドメインと、ヒトのIgG1のヒンジCH2-CH3ドメインを含む二量体化ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞表面上にこのキメラタンパク質を示すためのヒトのHLA-A2の細胞質尾部とが含まれる。

【0093】

したがって、幾つかの実施形態において、所望の標的細胞又は細胞集団で好ましくは唯一に又は主要に発現される標的分子を同定する。標準的な方法を使用して、標的分子に対する抗体を作製し、可変領域をヒトのIgG1の定常領域と組合せて、組み換えレトロウイルスを標的細胞に特異的に向ける親和性分子を形成する。

【0094】

[非抗体の親和性分子]

他の実施形態において、親和性分子は、標的細胞上の細胞表面の受容体と結合するリガンド、好ましくはペプチド又はタンパク質リガンド、あるいは標的細胞上の細胞表面リガンドと結合する受容体であり得る。親和性分子が可溶性リガンド又は受容体である場合、親和性分子は、膜貫通ドメイン又は膜に固定させる他の成分を有する融合分子として構築することが好ましい。好適なリガンドは、例えばホルモン、成長因子等を含む。非抗体の親和性分子の1つの具体例は幹細胞因子である。

【0095】

親和性分子が自然発生的な分子でりうる一方、それは、非天然タンパク質、例えば標的細胞上で特定のタンパク質と結合するように特異的に形成されるものもあり得る。さらに、親和性分子はタンパク質に限定されず、標的細胞にウィルス粒子をエンドサイトーシスさせるように、標的細胞上の分子と特異的に相互作用することができる任意の化合物を含み得る。例えば、幾つかの実施形態では、親和性分子は炭水化物を含み得る。

【0096】

[送達ベクター]

好ましい実施形態において、1つ又は複数のベクターを使用して、標的細胞に所望のポリヌクレオチドを導入する。このベクターは、自身の組み換えレトロウイルスの様々な成分と、目的の遺伝子と、融合分子と、親和性分子と、パッケージング細胞では供給されないウィルスの産生に必要な任意の成分をコードするポリヌクレオチド配列とを含む。典型的に、これらのポリヌクレオチドは、必要に応じて、パッケージング細胞及び標的細胞におけるコード配列の発現に関する1つ又は複数の調節要素の制御下にある。真核細胞の発現ベクターは当該技術分野で既知であり、多くの商業的供給源から入手できる。

【0097】

幾つかの実施形態において、パッケージング細胞を2つ以上のさらなるベクターと共に(以下に記載のように)ウィルスベクターでトランスフェクトする。例えば、ウィルスベクターに加えて、第2のベクターは、本出願で別記のように、HAMu又はSINmu等

10

20

30

40

50

の融合分子をコードする遺伝子を有することが好ましい。第3のベクターは、本出願で別記のように、抗体等の親和性分子をコードする遺伝子を有することが好ましい。さらに、幾つかの実施形態では、1つ又は複数のさらなるベクターは、例えばp o l、e n v、及びg a g等のパッケージング細胞に必要なウィルスエンベロープタンパク質をコードする遺伝子を含むことが好ましい。また、幾つかの実施形態では、親和性分子がI g G₁免疫グロブリンであるような場合、I g₁及びI g₂をコードする遺伝子等の付属タンパク質をコードする1つ又は複数のさらなるベクターを使用する。

【0098】

他の実施形態において、パッケージング細胞において、所望の組み換えレトロウィルスの產生に必要な2つ以上の要素（例えばウィルス遺伝子、目的の遺伝子、F M、親和性分子、I g₁、I g₂）を含む1つ又は複数の多シストロン性発現ベクターを用いる。多シストロン性ベクターの使用により、要求されるベクターの総数が減少し、これにより複数のベクターからの発現の調節に伴い起こりうる困難性が避けられる。多シストロン性ベクターにおいて、発現される様々な要素は、1つ又は複数のプロモーター（及び必要であれば他の発現制御要素）と機能可能に結び付く。例えば、一実施形態では、多シストロン性発現ベクターを使用して、抗体の親和性分子と関連の成分とを発現する。ベクターは、抗体の重鎖と、軽鎖と、I g₁と、I g₂とをコードするポリヌクレオチドを含むことが好ましい。他の実施形態では、目的の遺伝子と、レポーター遺伝子と、ウィルス要素とを含む多シストロン性ベクターが使用される。このようなベクターは、例えばF M及び親和性分子の両方をコードする多シストロン性ベクターと共に、同時にトランスフェクトすることができる。

【0099】

多シストロン性発現ベクターで発現される各成分は、I R E S要素又はウィルスの2 A要素によって分けることができ、同じプロモーターからの様々なタンパク質の別々の発現を可能にする。I R E S要素及び2 A要素は当該技術分野で既知である（米国特許第4,937,190号；de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)）。一実施形態では、口蹄疫ウィルス（F M D V）、ウマのA型鼻炎ウィルス（E R A V）、及びt h o s e a a s i g n a ウィルス（T a V）（Szymczak et al. (2004) Nat. Biotechnol. 22, 589-594）由来の2 A様配列と連結されたフリン開裂部位配列（R A K R）をコードするオリゴヌクレオチド（Fang et al. Nat. Biotech 23, 584-590 (2005)）を使用して、多シストロン性ベクターの遺伝子要素を分ける。所望の組み換えレトロウィルスを合成するのに使用される特定の多シストロン性ベクターの有効性は、標準的なプロトコルを使用して、それぞれの遺伝子の発現を検出することによって容易に試験することができる。

【0100】

当該技術分野で既知の任意の好適な遺伝子操作技術を使用して、ベクターの創出を達成することができ、この技法には、これらに限定されないが、例えばSambrook et al.「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1989)、Coffin et al.「Retroviruses」Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1997)、及び「RNA Viruses: A Practical Approach」(Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000))に記載されるような、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製及びD N A シークエンシングの標準的な技法が含まれる。

【0101】

ベクターは、任意の既知の生物のゲノム由来の配列を組み込むことができる。それらの配列を、それらの天然の状態、又は任意の方法による改変状態で組み込むことができる。例えば、それらの配列は挿入、欠失又は置換を含み得る。

【0102】

成分の発現を調節するのに使用することができる発現制御要素は当該技術分野で既知であり、これらに限定されないが、誘導プロモーター、構築プロモーター、分泌シグナル、エンハンサー及び他の調節要素を含む。

10

20

30

40

50

【0103】

一実施形態において、ベクターは原核生物のレブリコン、すなわち、これらで形質転換された細菌宿主細胞のような原核宿主細胞において、染色体外で組み換えDNA分子の自己複製及び維持に関する能力を有するDNA配列を含む。このようなレブリコンは当該技術分野で既知である。さらに、原核生物のレブリコンを含むベクターには、発現が薬剤耐性等の検出可能なマーカーを付与する遺伝子も含み得る。典型的な細菌の薬剤耐性遺伝子は、アンピシリン又はテトラサイクリンに対する耐性を付与するものである。

【0104】

ベクターは、薬剤耐性選択マーカーに関する遺伝子等の、真核細胞において効果的である選択可能なマーカーに関する1つ又は複数の遺伝子を含み得る。この遺伝子は、選択培地で成長する形質転換した宿主細胞の生存又は成長に必要な要素をコードする。選択遺伝子を含むベクターで形質転換しなかった宿主細胞は、当該培地では生存しない。一般的な選択遺伝子は、抗生物質又は他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、又はテトラサイクリンに対する耐性を付与するか、又は栄養要求性欠損を補完するか、又は培地から必須栄養分吸収するためのタンパク質をコードする。適宜、選択可能なマーカーは、別々のプラスミドに存在し、同時ドランクスフェクトによって導入することができる。

10

【0105】

ベクターは通常、パッケージング細胞により認識され、F M、親和性分子、及びウィルス成分等をコードするポリヌクレオチドと機能可能に結び付られるプロモーターを含む。プロモーターは、RNAポリメラーゼの結合及び転写を可能にするDNA配列によって形成される発現制御要素である。プロモーターは、構造遺伝子の開始コドンに対して上流(5'側)に位置し(一般的に約100~1000bp以内の)、それらが機能可能に結び付く抗原特異的なポリヌクレオチド配列の転写及び翻訳を制御する非翻訳配列である。プロモーターは、誘導性又は構造的であり得る。誘導性プロモーターは、温度変化等の培養条件における幾つかの変化に応じて、これらの制御下でDNAからの転写レベルを増加させる。

20

【0106】

当業者は、特定の状況に基づいて、適切なプロモーターを選択することができる。プロモーターを、発現されるべき遺伝子と機能可能に結び付ける方法として、多くの様々なプロモーターが当該技術分野で既知である。天然のプロモーター配列及び多くの異種プロモーターの両方を使用して、パッケージング細胞及び標的細胞で発現を誘導することができる。しかし、異種プロモーターは一般的に、天然プロモーターに比べて、転写を増強させ、また所望のタンパク質の収率を高めるので好ましい。

30

【0107】

プロモーターは、例えば、ポリオーマウィルス、鶏痘ウィルス、アデノウィルス、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス、及びサルウィルス40(SV40)等のウィルスゲノムから得ることができる。プロモーターはまた、例えば、異種の哺乳動物のプロモーター(例えば、アクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター)熱ショックプロモーター、又は通常の天然配列に関連するプロモーターであってもよいが、このようなプロモーターは標的細胞に適合したものである。一実施形態では、プロモーターはウィルス発現系における自然発生的なウィルスプロモーターである。

40

【0108】

エンハンサー配列をベクターに挿入することによって、転写を増大させることができる。エンハンサーは一般的に、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用要素であり、プロモーターに作用し、転写を増大させる。哺乳動物の遺伝子から多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターーゼ、アルブミン、-フェトプロテイン、及びインスリン)。好ましくは、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが使用される。例としては、複製起点の後半部分(late side)(100~270bp)のSV40エン

50

ハンサー、サイトメガロウィルスの早期プロモーターエンハンサー、複製起点の後半部分におけるポリオーマのエンハンサー、及びアデノウィルスのエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは、抗原特異的なポリヌクレオチド配列に対して5'位又は3'位でベクターにスプライシングすることができるが、プロモーターから5'位に位置することが好ましい。

【0109】

発現ベクターは、転写を終わらせ、mRNAを安定化するのに必要な配列も含む。これらの配列は、真核細胞又はウィルスのDNA又はcDNAの5'側の非翻訳領域でよく見い出され、そして3'側で見出されることもあり、当該技術分野で既知である。

【0110】

上記の1つ又は複数の成分を含むプラスミドベクターは、当該技術分野でよく知られた標準的な技法を使用して容易に構築される。

【0111】

構築されたプラスミドの配列が正しいことを確認する分析のために、プラスミドを大腸菌で複製し、精製して、制限エンドヌクレアーゼ消化によって分析し、及び/又は既存の方法でシーケンシングすることができる。

【0112】

哺乳動物の細胞における一過性発現を与えるベクターも使用することができる。一過性発現は、宿主細胞において効率的に複製することができる発現ベクターの使用を伴い、これにより、宿主細胞が発現ベクターの多くのコピーを集積し、次に発現ベクターにおいて抗原特異的なポリヌクレオチドでコードされるポリペプチドが高いレベルで合成される(Sambrook et al, *supra*, pp. 16.17 - 16.22.)。

【0113】

他のベクター及びウィルスのポリペプチドの発現に対する適合に好適な方法は当該技術分野で既知であり、特定の状況に容易に適合される。

【0114】

本明細書中の教示により、当業者は、レポーパータンパク質をコードする遺伝子を含むベクターでパッケージング細胞を形質転換し、及び好適な技法、例えば緑色蛍光タンパク質複合体からの蛍光を測定することによって、特定の発現系の効率を試験することができるということを認識する。好適なレポーター遺伝子は当該技術分野で既知である。

【0115】

本発明のベクターによるパッケージング細胞の形質転換が既知の方法で達成され、使用される方法は全く限定されない。多くの非ウィルス性の送達系が当該技術分野で既知であり、Schatzlein AG (2001)著「Non- Viral Vectors in Cancer Gene Therapy: Principles and Progresses」(Anticancer Drugs)で記載されたもののように、例えば、エレクトロポレーション、リポソームを含む脂質に基づく送達系、「裸の」DNAの送達、及びポリシクロデキストリン化合物を使用した送達が含まれる。カチオン性脂質又は塩による処理方法が典型的に用いられる。例えば、Graham et al. Virol. 52:456, (1973)、Wigler et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-76, (1979)を参照のこと。リン酸カルシウム侵入法が好ましい。しかし、ベクターを細胞に導入する他の方法を使用することもでき、これには核マイクロインジェクション及び細菌の原形質融合が含まれる。

【0116】

[ウィルスベクター及びパッケージング細胞]

ベクターのうちの1つがコアウィルスをコードする(「ウィルスベクター」)。本発明に使用するのに好適である利用可能なウィルスベクターが非常に多く存在し、これにはPfeifer A, Verma IM (2001)著「Gene Therapy: promises and problems」(Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177-211)に記載されるようなヒトの遺伝子治療への適用のために同定したものが含まれる。好適なウィルスベクターとしては、レトロウィルス由来のベクター、例えばモロニーマウス白血病ウィルス(MLV)由来ベクター等のRNAウィルスに基づくベクターが挙げられ、またより複雑なレトロウィルス由来ベクター、例えばレ

10

20

30

40

50

ンチウィルス誘導性ベクターが挙げられる。ヒトの免疫不全ウィルス（HIV-1）誘導性ベクターは、このカテゴリーに属している。他の例としては、HIV-2に由来するレンチウィルスベクター、ネコ免疫不全ウィルス（FIV）、ウマ伝染性貧血ウィルス、サル免疫不全ウィルス（SIV）及びマエディナビスナウィルスが挙げられる。

【0117】

ウィルスベクターは、組み換えウィルスの成分をコードする1つ又は複数の遺伝子並びに1つ又は複数の目的の遺伝子を含むことが好ましい。ウィルスベクターは標的細胞における目的の遺伝子の発現を促進する遺伝要素（例えば、プロモーター配列及びエンハンサー配列）も含み得る。標的細胞における複製を抑制するために、複製に必要な外因性のウイルス遺伝子を取り除き、パッケージング細胞株に別個に与えることができる。

10

【0118】

好ましい実施形態において、ウィルスベクターは無傷レトロウィルスの5'LTRと自己不活性化3'LTRとを含む。

【0119】

当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、ゲノムがウィルスベクターのRNAコピーを含む感染性のレトロウィルス粒子を產生することができる。この目的のために、ウィルスベクター（FM、親和性分子等をコードする他のベクターと共に）が、ウィルス粒子の中に、ウィルスベクターに基づくウィルスゲノムRNAを封入するパッケージング細胞株に導入されることが好ましい。

【0120】

20

パッケージング細胞株は、transでのウィルス粒子へのウィルスのゲノムRNAの封入に必要であるウィルスタンパク質を提供する。パッケージング細胞株は、レトロウィルスタンパク質を発現することができる任意の細胞株であり得る。好ましいパッケージング細胞株としては、293（ATCC CCL X）、HeLa（ATCC CCL 2）、D17（ATCC CCL 183）、MDCK（ATCC CCL 34）、BHK（ATCC CCL-10）及びCf2Th（ATCC CRL 1430）が挙げられる。パッケージング細胞株は、必要なウィルスタンパク質を安定して発現することができる。このようなパッケージング細胞株は、例えば米国特許第6,218,181号に記載されている。代替的に、パッケージング細胞株は、（ウィルスベクター及びFMと親和性分子とをコードするベクターと共に）1つ又は複数の必要なウィルスタンパク質をコードする核酸を含むプラスミドで一過性にトランスフェクトすることができる。

30

【0121】

目的の遺伝子のポリヌクレオチド、及びFMと親和性分子とが含まれるエンベロープを含むウィルス粒子が回収されて、標的細胞を感染させることができる。標的細胞の特異性は、ウィルスを偽型にすることによって、さらに改善することができる。偽型にする方法は、当該技術分野で既知である。

【0122】

一実施形態において、目的の遺伝子を送達するのに使用される組み換えレトロウィルスは改変レンチウィルスであり、ウィルスベクターはレンチウィルスに基づいている。レンチウィルスが、分裂細胞及び非分裂細胞の両方を感染することができるので、本実施形態では標的細胞が分裂している（又は標的細胞が分裂するのを刺激する）必要はない。

40

【0123】

別の実施形態において、ベクターはマウスの幹細胞ウィルス（MSCV）に基づいている。MSCVベクターにより、標的細胞、特に造血前駆細胞における長期的な安定した発現と分化した細胞とが提供される。

【0124】

別の実施形態において、ベクターは改変モロニーウィルス、例えば、モロニーマウスの白血病ウィルスに基づいている。さらなる実施形態では、ベクターはマウスの幹細胞ウィルスに基づいている（Hawley, R. G., et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10297-10302, Keller, G., et al. (1998) Blood 92:877-887, Hawley, R. G., et al. (1

50

994) Gene Ther. 1 : 136-138)。ウィルスベクターは、Choi, JK、Hoanga, N、Vilardi, AM、Conrad, P、Emerson, SG、Gewirtz, AM(2001) (Stem Cells 19, No. 3, 236-246)に記載されるようなハイブリッドウィルスに基づくこともできる。

【0125】

D N A ウィルスベクターを使用することができ、これには例えばアデノウィルス系ベクターとアデノ関連ウィルス(A A V)系ベクターとが含まれ得る。同様に、レトロウィルスアデノウィルスベクターも、本発明の方法に使用することができる。

【0126】

他のベクターもポリヌクレオチド送達に使用することができ、これには、アンプリコンベクターを含む単純ヘルペスウィルス(H S V)、複製欠損H S V、及び弱毒化H S Vに由来するベクターが含まれる(Krisky DM, Marconi PC, Oligino TJ, Rouse RJ, Fink DJ, et al. (1998)著「Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy applications」Gene Ther. 5: 1517-30)。

【0127】

遺伝子治療への使用のために近年開発された他のベクターを本発明の方法に使用することができる。このようなベクターには、バキュロウィルス及び ウィルスに由来するものが含まれる(Jolly DJ. (1999)著「Emerging viral vectors」, pp 209-40 in Friedman T編 (1999)「The development of human gene therapy」 New York: Cold Spring Harbor Lab)。

【0128】

好ましい実施形態において、ウィルス構築物は、H I Vゲノム又はS I Vゲノム等のレンチウィルスゲノム由来の配列を含む。ウィルス構築物は、レンチウィルスの5'LTR及び3'LTRに由来する配列を含むことが好ましい。より好ましくは、ウィルス構築物は、レンチウィルスの5'LTR由来のR配列及びU5配列と、レンチウィルス由来の不活性化又は自己不活性化3'LTRとを含む。LTR配列は、任意種の任意のレンチウィルス由来のLTR配列であり得る。例えばこれらは、H I V、S I V、F I V又はB I V由来のLTR配列であり得る。好ましくは、LTR配列はH I VのLTR配列である。

【0129】

ウィルス構築物は、不活性化又は自己不活性化3'LTRを含むことが好ましい。3'LTRは、当該技術分野で既知の任意の方法によって自己不活性化させることができる。好ましい実施形態では、3'LTRのU3要素は、エンハンサー配列、好ましくはT A T Aボックス、S p 1部位、及びN F - B部位の欠失を含む。自己不活性化3'LTRの結果として、宿主細胞ゲノムに統合されるプロウィルスには不活性化5'LTRが含まれる。

【0130】

適宜、レンチウィルスの5'LTR由来のU3配列をウィルス構築物のプロモーター配列に置き換えることができる。これにより、パッケージング細胞株から回収されるウィルスの力価が増大し得る。エンハンサー配列も含まれ得る。パッケージング細胞株におけるウィルスRNAゲノムの発現を増大する任意のエンハンサー/プロモーターの組合せを使用することができる。好ましい実施形態では、C M Vのエンハンサー/プロモーター配列が使用される。

【0131】

一般的にウィルス構築物は、1つ又は複数の標的細胞で望ましく発現されるタンパク質(又はs i R N A等の他の分子)をコードする遺伝子を含む。好ましくは、目的の遺伝子は、5'LTR配列と3'LTR配列との間に位置している。さらに、目的の遺伝子は、他の遺伝要素、例えばプロモーター及び/又はエンハンサー等の転写調節配列と機能的な関係であることが好ましく、このことにより、遺伝子が標的細胞に組み込まれる場合、特定の様式で目的の遺伝子の発現が調節される。或る特定の実施形態では、有用な転写調節配列は、時間的及び空間的の両方で、活性に関して高度に調節されるものである。

10

20

30

40

50

【0132】

好ましくは、目的の遺伝子は、内部のプロモーター / エンハンサー調節配列と機能的な関係にある。「内部」のプロモーター / エンハンサーは、ウィルス構築物において 5'LTR 配列と 3'LTR 配列との間に位置しており、望ましく発現する遺伝子と機能可能に結び付いている。

【0133】

内部のプロモーター / エンハンサーは、機能的な関係にある遺伝子の発現を増大することが知られている任意のプロモーター、エンハンサー、又はプロモーター / エンハンサーの組合せであり得る。「機能的な関係」及び「機能可能に連結した」は、プロモーター及び / 又はエンハンサーが適切な分子と接触する場合、遺伝子の発現が影響を受けるプロモーター及び / 又はエンハンサーに対して正しい位置及び向きに遺伝子があることを意味するが、これに限定はされない。

10

【0134】

内部のプロモーター / エンハンサーは、目的の遺伝子の所望の発現パターン及び既知のプロモーター / エンハンサー特定の性質に基づいて選択されることが好ましい。したがって、内部プロモーターは構成プロモーターであり得る。使用することができる構成プロモーターの非限定的な例としては、ユビキチン、CMV (Karasuyama et al. J. Exp. Med. 169:13 (1989))、アクチン (Gunning et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4831-4835 (1987))、及び pgk (例えば、Adra et al. Gene 60:65-74 (1987), Singer-Sam et al. Gene 32:409-417 (1984) 及び Dobson et al. Nucleic Acids Res. 10:2635-2637 (1982) を参照のこと) のプロモーターが挙げられる。

20

【0135】

代替的には、プロモーターは組織特異的なプロモーターであり得る。使用することができる組織特異的なプロモーターの幾つかの非限定的な例としては、lck (例えば Garvin et al. Mol. Cell Biol. 8:3058-3064 (1988) 及び Takadera et al. Mol. Cell Biol. 9:2173-2180 (1989) を参照のこと)、ミオゲニン (Yee et al. 著「Genes and Development」7:1277-1289 (1993))、thy1 (Gundersen et al. Gene 113:207-214 (1992)) が挙げられる。さらに、プロモーターは、遺伝子を誘導発現させるように選択することができる。誘導発現に対する多くの系が当該技術分野で既知であり、これにはテトラサイクリン応答系及び lac オペレーター - リプレッサー系が含まれる。プロモーターの組合せを使用して、目的の遺伝子の所望の発現を得ることも考えられる。当業者は、生物体、及び / 又は目的の標的細胞における遺伝子の所望の発現パターンに基づいて、プロモーターを選択することができる。

30

【0136】

幾つかの実施形態において、ウィルス構築物は、少なくとも 1 つの RNA ポリメラーゼ II 又は RNA ポリメラーゼ I II のプロモーターを含むことが好ましい。RNA ポリメラーゼ II 又は RNA ポリメラーゼ I II のプロモーターは、目的の遺伝子と機能可能に結び付き、終止配列とも結び付くことができる。さらに、2 つ以上の RNA ポリメラーゼ II 又は RNA ポリメラーゼ I II のプロモーターを組み込むことができる。

40

【0137】

RNA ポリメラーゼ II 及び RNA ポリメラーゼ I II のプロモーターは、当該技術分野で既知である。RNA ポリメラーゼ I II プロモーターの好適な範囲は、例えば Paule 及び White 著「Nucleic Acids Research」(Vol 28, pp 1283-1298 (2000)) (参照により本明細書中にその全体が援用される) で見出すことができる。RNA ポリメラーゼ II 又は RNA ポリメラーゼ I II のプロモーターそれぞれの定義には、それぞれ RNA ポリメラーゼ II 又は RNA ポリメラーゼ I II に、下流の RNA コード配列を転写させることができる任意の合成 DNA フラグメント又は変更 DNA フラグメントをも含む。さらに、ウィルスベクターの一部として使用される RNA ポリメラーゼ II 又は RNA ポリメラーゼ I III (Pol II 又は III) のプロモーターは誘導性であり得る。任意の好適な誘導性 Pol II 又は III のプロモーターを本発明の方法に使用することができる。

50

特に好適な P o l I I 又は I I I のプロモーターには、Ohkawa及びTaira著「Human Gene Therapy」(Vol. 11, pp 577-585 (2000))並びにMeissner et al著「Nucleic Acids Research」(Vol. 29, pp 1672- 1682 (2001)) (参照により本明細書中に援用される)において提示されるテトラサイクリン応答性プロモーターが含まれる。

【0138】

内部エンハンサーはウィルス構築物にも存在し、目的の遺伝子の発現を増大することができる。例えば、CMVエンハンサー(Karasuyama et al J. Exp. Med. 169:13 (1989))は、ニワトリの アクチンプロモーターと組合せて使用することができる。また、当業者は所望の発現パターンに基づいて、適切なエンハンサーを選択することができる。

【0139】

目的の遺伝子は全く限定されず、当業者が標的細胞で統合、転写、翻訳、及び／又は発現することを所望する任意の核酸が含まれる。例えば、目的の遺伝子は、ホルモン、毒素、又は抗体等のポリペプチドをコードするか、又は siRNA 等のスクレオチドをコードし得る。

【0140】

幾つかの実施形態において、目的の遺伝子が安全対策として組み込まれ、異種集団内、例えばヒトの患者等の動物内で感染した標的細胞を選択的に死滅させる。1つのこのような実施形態では、目的の遺伝子はチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) であり、その発現により、標的細胞がガンシクロビル薬の作用を受けやすくしている。

【0141】

さらに、2つ以上の目的の遺伝子が、内部プロモーターと機能的な関係で配置し得る。例えば、マーカータンパク質をコードする遺伝子は、所望のタンパク質を発現する細胞を同定することができるようにするために、第一の目的の遺伝子の後に配置され得る。一実施形態では、蛍光マーカータンパク質、好ましくは緑色蛍光タンパク質 (GFP) が、目的の遺伝子と共に構築物に組み込まれる。1つ又は複数のさらなるレポーター遺伝子が含まれる場合、内部リボソーム侵入部位 (IRE) 配列、又は2A要素も含まれることが好ましく、最初の目的の遺伝子をレポーター遺伝子及び／又は任意の他の目的の遺伝子から分離する。IRE 又は 2A 配列は、レポーター遺伝子又は他の遺伝子の発現を促進し得る。

【0142】

ウィルス構築物は、さらなる遺伝要素も含み得る。構築物に含まれ得る要素の種類は全く限定されず、特定の結果を達成するために当業者によって選択される。例えば、標的細胞のウィルスゲノムの核侵入を促進するシグナルが含まれ得る。このようなシグナルの例は、HTV-1 フラップシグナルである。

【0143】

さらに、標的細胞においてプロウィルスの統合部位の特性化を促進する要素が含まれ得る。例えば、tRNAアンバーサプレッサー配列が構築物に含まれ得る。

【0144】

さらに、構築物は、目的の遺伝子の発現を高めるように設計された1つ又は複数の遺伝要素を含み得る。例えば、ウッドチャック肝炎ウィルス応答要素 (WRE) が構築物に配置され得る (Zufferey et al. J. Virol. 74:3668-3681 (1999)、Deglon et al. Hum. Gene Ther. 11:179-190 (2000))。

【0145】

ニワトリの グロビンインシュレーターもウィルス構築物に含まれ得る。この要素が、メチル化及びヘテロクロマチン化の効果により標的細胞中の統合プロウィルスをサイレンシングする機会を低減させることを示している。さらに、インシュレーターは内部エンハンサー、プロモーター、及び染色体上の統合部位における周囲のDNAの正の位置効果又は負の位置効果からの外因性遺伝子を遮断することができる。

【0146】

任意のさらなる遺伝要素は、目的の遺伝子の3'側に挿入されることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0147】

特定の実施形態において、ウィルスベクターは、サイトメガロウィルス(CMV)のエンハンサー/プロモーター配列、HIVの5'LTR由来のR配列及びU5配列、HIV-1フラップシグナル、内部エンハンサー、内部プロモーター、目的の遺伝子、ウッドチヤック肝炎ウィルス応答要素、tRNAアンバーサブレッサー配列、エンハンサー配列が欠失したU3要素、ニワトリのグロビンインシュレーター、及び3'HIVのLTRのR配列及びU5配列を含む。

【0148】

ウィルス構築物は、パッケージング細胞株にトランスフェクトされ得るプラスミドにクローン化することが好ましい。好ましいプラスミドは、細菌におけるプラスミドの複製に有用な配列を含むことが好ましい。

10

【0149】

[ウィルスの送達]

ウィルスは、ウィルスを目的の遺伝子の送達が望まれる標的細胞に接触させる任意の方法で、細胞に送達することができる。好ましい実施形態では、好適な量のウィルスが、例えば、体内への注射によって、動物に直接(in vivoで)導入される。1つのこのような実施形態では、ウィルス粒子が動物の末梢血流に注入される。標的細胞を含む器官へ直接注入する等の他の注入位置も好適である。例えば、頭蓋内注入又は肝内注入を使用して、ウィルスをそれぞれ脳及び肝臓に送達することができる。特定の状況及び標的細胞の性質に応じて、例えば吸入、又は上皮組織との直接接触(例えば、眼、口又は肌との接触)を含む他の手段によって、導入を行うことができる。

20

【0150】

他の実施形態において、標的細胞は、培養プレート等においてin vitroでウィルスと接触することが好ましい。ウィルスは培地で懸濁し、培養プレート、チューブ又は他の容器のウェルに加えることができる。細胞のプレート播種(plating)の前、又は細胞をプレート播種した後に、ウィルスを含む培地を加えてよい。好ましくは、細胞を適切な量の培地でインキュベートし、生存能力を与えると共に、宿主細胞の感染が起こるよう、培地におけるウィルスを好適な濃度にすることができる。

【0151】

細胞は、十分な時間、ウィルスとインキュベートし、細胞をウィルスに感染させることが好ましい。好ましくは、少なくとも1時間、より好ましくは少なくとも5時間、及びさらにより好ましくは少なくとも10時間、細胞をウィルスとインキュベートする。

30

【0152】

当業者によって容易に決定することができるよう、in vivo及びin vitroの両方の送達実施形態において、所望の標的細胞を感染させるのに十分な任意の濃度のウィルスを使用することができる。標的細胞が培養される必要がある場合、ウィルス粒子の濃度は、少なくとも1pfu/μl、より好ましくは少なくとも10pfu/μl、さらにより好ましくは少なくとも400pfu/μl、及びさらにより好ましくは少なくとも 1×10^4 pfu/μlである。

40

【0153】

幾つかの実施形態において、in vitroでのウィルスによる感染後、標的細胞は動物に導入することができる。培養細胞の導入位置は、使用される細胞型及び所望の効果に依存する。例えば、細胞が造血細胞である場合、細胞は末梢血液流に導入することができる。動物に導入される細胞は、その動物由来の細胞であることが好ましく、これにより拒絶反応が避けられる。同様の免疫構造を有するドナー動物に由来する細胞も使用することができる。また、免疫原性応答を避けるように設計されるものを含む他の細胞を使用することもできる。

【0154】

当該細胞及び標的細胞が組み込まれた動物は、例えば目的の遺伝子の統合、転写及び/又は発現、統合された遺伝子のコピー数、並びに統合位置に関して分析することができる

50

。任意の時間でこのような分析を行うことができ、当該技術分野で既知の方法で行ってもよい。

【0155】

上記で開示された細胞を感染する方法は、細胞の種特異的な特徴に依存していない。結果として、これらは全ての哺乳動物種に容易に拡大適用される。幾つかの実施形態では、組み換えウィルスが、ヒト又はヒトの細胞に送達される。別の実施形態では、ヒト又はヒトの細胞以外の動物に送達される。

【0156】

上記のように、改変レトロウィルスを偽型にし、このウィルスに広い宿主範囲を付与することができる。また当業者は、特定の動物種において、目的の遺伝子の所望の発現を達成するのに適切な内部プロモーターを知っている。したがって、当業者は、任意の種由來の細胞を感染させる方法を修正することができる。10

【0157】

[標的細胞]

本明細書中に開示される組み換えレトロウィルスを使用して、目的の遺伝子を送達するために、多種多様な細胞を標的化することができる。標的細胞は、一般的に目的の遺伝子及び所望の効果に基づいて選択される。

【0158】

幾つかの実施形態において、目的の遺伝子を送達して、標的細胞が生物体における欠損（例えば、酵素欠損又はX連鎖重症複合型免疫不全等の免疫不全）を補うタンパク質を產生することができる。したがって、幾つかの実施形態では、通常動物においてタンパク質を産出する細胞が標的化される。他の実施形態では、タンパク質が最も有益である領域における細胞を標的化する。20

【0159】

他の実施形態において、s i R N A をコードする遺伝子等の目的の遺伝子が、標的細胞において特定の遺伝子の発現を抑制し得る。目的の遺伝子は、例えば病原体のライフサイクルに関与する遺伝子の発現を抑制し得る。したがって、病原体から感染しやすいか、又は病原体に感染した細胞が標的化され得る。他の実施形態では、目的の遺伝子が標的細胞における毒素の産出に関与する遺伝子の発現を抑制し得る。

【0160】

他の実施形態において、目的の遺伝子は、その遺伝子を発現する細胞を死滅させる毒性タンパク質をコードし得る。この場合、腫瘍細胞又は他の不要な細胞が標的化され得る。

【0161】

さらに別の実施形態において、治療用タンパク質等の回収されるタンパク質をコードする遺伝子を使用することができ、タンパク質を產生及び分泌することができる細胞が標的化される。

【0162】

目的の遺伝子の発現が望まれる標的細胞の特定の集団が同定されると、この標的細胞集団で特異的に発現する標的分子が選択される。標的分子は、この細胞集団で唯一発現するか、又は他の細胞集団よりこの細胞集団で有意に多く発現し得る。発現が特異的であれば、より特異的に遺伝子の送達を標的細胞に向けることができる。状況によって、マーカーの特異性（及びそれによる遺伝子送達の）所望の量は変化し得る。例えば、毒性遺伝子の導入には、高い特異性が、非標的化細胞を死滅させるのを避けるためには最も好ましい。集菌のためのタンパク質の発現には、又は広範な効果が望まれる分泌産物の発現には、マーカーの特異性を低くすることが必要である。40

【0163】

上記のように、標的分子は、特異的な結合パートナーを同定又は形成することができる任意の分子であり得る。好ましくは、標的分子は、受容体等のペプチド又はポリペプチドである。しかし他の実施形態では、標的分子は、炭水化物又は結合パートナーにより認識することができる他の分子であり得る。標的分子に対する結合パートナーが既知である場50

合、親和性分子として使用することができる。しかし、結合分子が知られていない場合、標準的な手法を使用して、標的分子に対する抗体を產生することができる。したがって抗体は、親和性分子として、又は親和性分子を形成するために使用することができる。

【0164】

このように、標的細胞は、例えば、(1)特定の用途(例えば治療、回収されるタンパク質の発現、及び疾患耐性の付与)及び(2)所望の量の特異性を有するマーカーの発現を含む様々な要素に基づいて選択することができる。

【0165】

標的細胞は全く限定されず、これには生殖系細胞及び細胞株と、体細胞及び細胞株との両方が含まれる。標的細胞は、いずれの起源由来の幹細胞であってもよい。標的細胞が生殖系列細胞である場合、標的細胞は単一細胞胚及び胚性幹細胞(ES)から成る群より選択されることが好ましい。

10

【0166】

一実施形態において、標的細胞はCD20+細胞である(実施例1~実施例5を参照)。標的細胞の幾つかの他の非限定的な例は、CD34+細胞、CD4+細胞、樹状細胞、腫瘍細胞、及び他の機能異常細胞、並びに病原体に感染しやすい細胞である。様々な親和性分子は、多くの細胞型、例えばCD34+細胞、及び樹状細胞を標的化するのに利用可能であり、以下により詳細に記載される。

【0167】

使用されるベクターに応じて、標的細胞の分裂が形質転換に必要である。当該技術分野で既知の任意の方法によって標的細胞を刺激して、in vitroで分裂させることができる。例えば、IL-3、IL-6及び/又は幹細胞因子(SCF)等の1つ又は複数の成長因子の存在下で造血幹細胞を培養することができる。

20

【0168】

標的化されたCD34+幹細胞及び樹状細胞に対する例が以下に記載されているが、当業者は他の状況にこの開示を適合させることができる。

【0169】

[ヒトのCD34+の造血幹細胞に対するレンチウィルスベクターの標的化]

CD34は、ヒトの造血幹細胞(HSC)マーカーである。HSCは、ウィルス媒介性遺伝子導入によって抗原特異的な免疫細胞に分化させるようにプログラムすることができる。CD34+HSCへの標的化された遺伝子送達によりin vivoでの遺伝子導入ができるが、in vitroで使用することもできる。したがって、様々な貧血症、白血病、リンパ腫、及び血小板障害等の広範囲の血液疾患は、開示の方法と適切なポリヌクレオチドをHSCに送達するベクターとを使用して治療することができる。HSCにおける発現が様々な血液疾患の治療に有益であるタンパク質をコードするポリヌクレオチドが当業者には明らかである。

30

【0170】

本発明の幾つかの実施形態において、CD34が標的化される。様々な例の抗CD34抗体が利用可能であり、これらが膜関連である場合、親和性分子の基礎として、又は親和性分子として使用することができる。例えば、ATCC番号HB-12346は、ATCCから容易に利用可能であり、親和性分子を調製するのに使用することができる。組み換えレトロウィルスにおける親和性分子としての抗CD34抗体の機能的発現の評価は、ウィルス細胞結合分析を使用して達成し得る。ヒトのCD34+細胞株であるTF-1aは、ATCCから得ることができ(AATCC番号: CRL-2451)、このような結合実験に標的細胞として使用される。それから、TF-1a系及びヒトの一次骨髄又は臍帯血細胞において形質導入実験を行うことができる。形質導入効率は、天然形態及び単鎖形態を含む様々な抗体間で比較され得る。有効な親和性分子が同定されると、SINmu又はHAMu等のFMと共に使用され、in vivo又はin vitroのいずれかで、目的の遺伝子をCD34+細胞に送達させることができる。

40

【0171】

50

[in vivoでの樹状細胞に対する組み換えウィルスの標的化]

動物腫瘍モデル及び癌患者における腫瘍特異的なキラー(CD8)及びヘルパー(CD4)T細胞応答を誘導するのに樹状細胞(DC)が広く使用されている(Schuler et al. Curr. Top. Microbiol. 281, 137-178 (2003))。抗原の標的化及びこれらの成熟の誘導は、in situのDCワクチン化のアプローチの一部である。したがって、本明細書に記載されるようなウィルスを使用して、in vivoでDCに対するレンチウィルスベクターを標的化することは治療的に利用され、例えば、メラノーマ及びHIVを治療するのに利用することができる。DEC-205がリンパ組織で豊富に発現されるので、DEC-205エンドサイトーシス受容体は、DCにおける好ましい標的表面抗原であり、抗原提示の効率を有意に改善し得る(Bonifaz, L.C. et al. J Exp. Med. 199, 815-824 (2004))。好ましくは、IgG1の定常領域と共に抗DEC205抗体由来の可変領域を含む抗DEC-205抗体が、親和性分子としてウィルス粒子の表面上に示され、抗原タンパク質及びTNF又はCD40L等の成熟刺激性分子の両方をコードする遺伝子をDCへ同時に送達させることができる。成熟シグナルは、親和性分子として抗CD40抗体を使用することによって、抗原遺伝子と共に送達することもできる。

【0172】

以下の実施例6に記載されるように、in vitroで骨髄由来のDCを標的化するために、mDEC-205とSINmuとを同時に示す組み換えレンチウィルスが作られている。ヒトのDCを標的化するために、ヒトの抗DEC-205抗体由来の可変領域を含むヒトのDCに対する膜結合した抗体(IgG1等)を組み換えウィルスで創出させた。このようにして、組み換えウィルスを使用したDCに対する適切な抗原遺伝子の送達によって、HIV及びメラノーマ等の疾患を予防及び/又は治療することができる。一実施形態では、マウスの抗DEC-205抗体由来の可変領域とヒトのIgG1由来の定常領域とを含む抗DEC-205抗体を親和性分子として使用し、SINmuを融合分子として使用して(実施例6を参照)、DCに対して組み換えレンチウィルスを標的化すると共に、抗原をコードする遺伝子を送達する。

【0173】

[トランスジェニック動物]

本発明の方法を使用してトランスジェニック動物を作ることができる。幾つかの実施形態では、成体動物における特定の細胞を標的化し、これらの細胞で発現させるべき遺伝子をコードするポリヌクレオチドを送達する。他の実施形態において、卵母細胞或いは1つ又は複数の胚細胞が、上記のように産出された組み換えウィルスに感染される。ウィルスが、発生過程の動物のゲノムに組み込まれる目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを送達し、何代にもわたって伝達することができる。当業者は、感染方法及び感染後の細胞の処理方法が細胞が得られる動物の種類によって変わること、並びに特定の細胞型への遺伝子の送達を標的化する能力により、in vivo又はin vitroで遺伝子が送達されることを認識している。

【0174】

[治療]

本発明の方法を使用して、多種多様の疾患又は障害を予防又は治療することができる。本発明の方法による治療又は予防の効果のある疾患又は障害としては、癌、自己免疫疾患、ウィルス、細菌、真菌、寄生虫等による感染が挙げられるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態では、目的の遺伝子を標的細胞へ送達する組み換えレトロウィルスを使用することによって疾患が治療されるが、この遺伝子の発現により、細胞又は動物における機能不全に全体として対処するタンパク質又は他の分子が産出される。

【0175】

他の実施形態では、疾患又は障害に関与するタンパク質の発現を調節する遺伝子が標的細胞株に送達される。例えば、sirNA分子をコードする遺伝子は、病原体のライフサイクルに関する遺伝子を阻害するか、又は過剰に産出されるタンパク質の発現を低減するか、又は疾患若しくは障害の進行に関与する過程を妨げるために供給される。他の実施例

10

20

30

40

50

では、天然分子と競合させることによって特定の細胞活性を阻害するか、又は天然分子の活性を相乗的に作用させ、若しくは促進させる細胞活性を高める遺伝子が送達される。

【0176】

さらに別の実施形態において、腫瘍細胞等の不要な標的細胞の死滅を引き起こす遺伝子が送達される。代替的には、腫瘍細胞を増殖させる能力を抑制又は低減させる遺伝子が送達され得る。

【0177】

以下で幾つかの特定の状況を示すが、当業者は特定の環境を考慮して、本明細書中で開示される方法及び構築物を適合させることができる。

【0178】

10

[s i R N A]

本明細書中に記載の方法は、R N A 分子のベクター媒介性の送達を可能にし、また標的細胞における小さいR N A 分子の送達及び発現に特に適している。本発明の幾つかの実施形態によれば、R N A 分子が標的細胞に送達され、それから標的遺伝子の発現を下方調節するために標的細胞内で発現される。標的遺伝子を下方調節する能力には、特定の遺伝子の生物学的機能を同定することを含む、多くの治療用途及び研究用途がある。R N A 分子を標的細胞に送達し、その後、標的細胞内のR N A 分子が発現することによって、培養細胞及び哺乳動物生物体の両方において、任意の多くの遺伝子の発現をノックダウン（又は下方調節）することが可能になる。幾つかの実施形態では、病原体ウィルス等の病原体のライフサイクルに必要であるか、又は疾患若しくは障害に直接又は間接的に寄与する遺伝子が、s i R N A を有する標的細胞において下方調節される。

20

【0179】

したがって、幾つかの実施形態において、ウィルスベクターはs i R N A 分子をコードするR N A 発現力セットを含む。標的細胞に送達されるR N A 発現力セットは、P o 1 I I I プロモーターとR N A コード領域とを含むことが好ましい。R N A コード領域は、特定の遺伝子の発現を下方調節することができるR N A 分子をコードすることが好ましい。コードされるR N A 分子は、例えば下方調節される遺伝子をコードするR N A 分子配列に相補的であり得る。このような実施形態では、R N A 分子は、アンチセンス機構を通じて作用するように設計される。

【0180】

30

好ましい実施形態は、標的細胞への送達、及びその後の二本鎖R N A 複合体又はシステム・ループ若しくはいわゆる「ヘアピン」構造を有するR N A 分子の発現を伴う。本明細書中で使用されるように、「R N A 二本鎖」という用語は、R N A 複合体又はヘアピン若しくはシステム・ループ構造の二本鎖領域を示す。R N A コード領域は、一本鎖R N A 又は2つ以上の相補的な一本鎖R N A 若しくはヘアピン形成R N A をコードすることができる。

【0181】

二本鎖R N A は、R N A 干渉又はR N A 抑制と呼ばれるプロセスを介して、相補的な配列を有する遺伝子の遺伝子発現を阻害することが示されている（例えば、Hammond et al. Nat. Rev. Genet. 2: 110-119 (2001)を参照のこと）。

【0182】

40

本発明の幾つかの実施形態によれば、下方調節される遺伝子領域に対応するR N A 二本鎖又はs i R N A が、記載のベクターを使用して標的細胞に送達され、それから標的細胞で発現する。R N A 二本鎖は、下方調節される標的化された遺伝子の配列と実質的に同一である（一般的に少なくとも約80%同一、及びより一般的には少なくとも約90%同一）。s i R N A 二本鎖は、例えばBummelkamp et al. Science 296:550-553 (2202)、Caplen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747 (2001)、及びPaddison et al. Genes & Devel. 16:948-958 (2002)に記載されている。

【0183】

標的細胞に送達されるR N A 二本鎖は、一般的に少なくとも約15ヌクレオチド長であり、約15～約30ヌクレオチド長であることが好ましい。幾つかの生物体では、R N A

50

二本鎖は、有意により長くなり得る。より好ましい実施形態では、R N A二本鎖は、約19～22ヌクレオチド長である。R N A二本鎖は、二本鎖領域にわたって標的ヌクレオチド配列と同一であることが最も好ましい。

【0184】

下方調節される標的細胞遺伝子が高度に保存された遺伝子ファミリーに存在する場合、二本鎖領域の配列は、所望の遺伝子のみを標的化するために配列比較を用いて選択することができる。生物体内の相同遺伝子ファミリー間で十分な同一性がある場合、同時に複数の遺伝子を下方調節する二本鎖領域を設計することができる。

【0185】

R N Aコード領域の配列、及びしたがって標的細胞に送達される二本鎖R N Aの配列は、発現が標的細胞において下方調節されるべき遺伝子の配列に相補的であるように選択することが好ましい。所与の標的遺伝子に対する所与のR N A分子によって達成される下方調節の程度は、配列によって変化する。当業者は有効な配列を容易に同定することが可能である。例えば、抑制の量を最大限にするために、標的細胞を処理する前に培養細胞において、多くの配列を試験することができる。

10

【0186】

幾つかの実施形態において、二本鎖R N Aの（標的細胞内の）標的は、例えばウィルスの遺伝子発現、及びウィルス複製に必要な細胞の受容体又は補助受容体（co-receptor：コレセプター）の発現を含む、ウィルスのライフサイクル又は複製に必要な配列である。本発明の一実施形態では、阻害されるウィルスは、ヒト免疫不全ウィルス（H I V）である。

20

【0187】

幾つかの実施形態において、標的細胞に送達される目的の遺伝子は、少なくとも90%の相同性であり、及び好ましくは通常のウィルス複製に重要であるヌクレオチドにおいて少なくとも約15～25ヌクレオチド領域と同一である、少なくとも1つの二本鎖R N Aをコードする。例えば、二本鎖R N Aは、ウィルスゲノム、すなわちウィルスゲノム転写物、又はウィルスのライフサイクルに必要である患者の標的細胞受容体に対する遺伝子における核酸と相同性を有し得る。

【0188】

幾つかの実施形態において、s i R N Aは、H I V、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎等の感染又は広範囲の他のウィルス感染を治療するために送達される。当業者は、細胞成分、すなわちR N A又はウィルスのライフサイクル等の病原体のライフサイクルに必要な細胞のタンパク質をコードするR N Aのいずれかを標的化することができる。好ましい実施形態では、選択される細胞標的は、通常の細胞の成長及び生存に必要であるタンパク質又はR N Aではない。ウィルスのライフサイクルを破壊するのに好適なタンパク質には、例えば一次受容体及び二次受容体の両方を含む、ウィルス侵入に関与する細胞表面の受容体と、ウィルスゲノムの転写に関与する転写因子と、宿主の染色体への統合に関与するタンパク質と、ウィルス遺伝子発現の転写調節又は他の調節に関与するタンパク質とが含まれる。

30

【0189】

多種多様な分子が病原体に特異的に関与しており、本明細書中で開示される方法により標的化することができる。これらには、細胞へのウィルス侵入のための受容体であることが知られている多くの細胞タンパク質が含まれる（Baranowski, et al. Science 292: 1102-1105）。ウィルスによる認識に関与する幾つかの細胞受容体を以下に列挙する：アデノウィルス：C A R、インテグリン、M H C I、ヘパラン硫酸グルコアミノグリカン、シアル酸；サイトメガロウィルス：ヘパラン硫酸グルコアミノグリカン；コクサッキーウィルス：インテグリン、I C A M - I、C A R、M H C I；A型肝炎：マウス様クラスI内在性膜糖タンパク質；C型肝炎：C D 8 1、低濃度リボタンパク質受容体；H I V（レトロウィルス科）：C D 4、C X C R 4、ヘパラン硫酸グルコアミノグリカン；H S V：ヘパラン硫酸グルコアミノグリカン、P V R、H v e B、H v e C；インフルエンザウ

40

50

イルス：シアル酸；麻疹：CD46、CD55；ポリオウイルス：PV R、HveB、HveC；ヒトパピローマウィルス：インテグリン。当業者は、本発明が現在知られている受容体（又は他の分子）による使用に限定されないことを認識するであろう。新規の細胞受容体及び補助受容体が見出されれば、本発明の方法はこのような配列に適用することができる。

【0190】

本発明の幾つかの実施形態において、HIVが特に標的化され、レトロウイルス構築物は、HIVウィルスのRNAゲノム、すなわちHIVウィルスのRNAゲノムの発現領域（例えば、統合HIVウィルスの9kbの転写産物の約19～25ヌクレオチド長の任意の領域）又は様々にスプライシングしたHIVのmRNA転写産物の任意のものと少なくとも90%相同性を有する二本鎖分子をコードするRNAコード領域を含む（Schwartz et al. J. Virol. 1990; 64(6): 2519-29）。HIV転写産物内の標的領域は、任意のウイルスゲノムと対応するように選択することができ、これには、例えばHIV-1 LTR、vif、nef、及びrevが含まれる。他の実施形態では、RNAコード領域は、HIVウィルスの受容体又は補助受容体と少なくとも90%相同性を有する二本鎖領域をコードする。例えば、T細胞へのHIVの侵入に対する一次受容体はCD4である。好ましい実施形態では、補助受容体であるCXCKモカイン受容体4（CXC R4）及びCCケモカイン受容体5（CCR5）が、本発明の方法に従って下方調節される。CXC R4（Fedderspiel et al. Genomics 16:707-712 (1993)）がHIVのT細胞栄養株に対する主要な補助受容体である一方、CCR5（Mummidi et al. J. Biol. Chem. 272:30662-30671 (1997)）は、HIVのマクロファージ栄養株に対する主要な補助受容体である。HIVに対する他の細胞標的は、HIVライフサイクルに関与するタンパク質に対するRNA転写産物を含み、これにはシクロフィリン、CRM-1、インポルチン-、HP68（Zimmerman C, et al.著「Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids」Nature 415 (6867): 88-92 (2002)）、及び未だに知らない細胞因子としての他の転写産物が含まれる。

【0191】

1つの特定の実施形態において、組み換えレトロウイルスを使用して、HIV-1の補助受容体CCR5に対するsiRNAをヒトの末梢血のT細胞に導入する。siRNAによるCCR5発現の低減により、CCR5指向性のHIV-1ウイルスの感染から保護される（Qin et al. (2003). Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 183-188）。したがって、このようなsiRNAのヒトCD34⁺細胞への標的化された送達により、HIV-1感染に耐性があるCD4⁺細胞が再構築され得る。HIVを治療するために、抗CD34抗体等のCD34を標的化する親和性分子と、SIN又はHA等の融合分子と、コードされるCCR5-siRNAと、適宜にGFPとを含む組み換えレンチウイルスを静脈注射することができる。

【0192】

ワクチン接種

上記で示されるように、表面の樹状細胞マーカーに対する様々な細胞特異的な結合決定基が、抗原をコードする遺伝子をDCへ送達する組み換えレトロウイルスの產生に使用するためには考案されている。例えば、ヒト抗DEC-205抗体（hDEC-205）に対するハイブリドーマ細胞株は、ATCCから入手可能である（ATCC番号：CRL-2460）。癌（例えば、Mارت-1）又は別の疾患/障害（例えばウイルス感染）等に対する免疫応答が望まれる抗原をコードする遺伝子が、上述された方法を使用して、DCに送達され得る。この抗原に対する遺伝子は、複数のベクター又は好ましくは多シストロンベクター系を使用して、TNF / CD40L等の刺激分子及び/又はGFP等のレポーター分子をコードする遺伝子を伴い得る。

【0193】

本発明の幾つかの実施形態において、ヒトのDCは、in vitroの培養方法を使用して、CD34⁺ヒトの造血前駆細胞から產生される（例えばBanchereau et al. Ce

10

20

30

40

50

II 106, 271-274 (2001)。免疫応答が望まれる抗原をコードする遺伝子を含む h D E C - 2 0 5 及び S I N m u 保有ウィルスが産生され、ヒトの D C に形質導入するのに使用される。形質導入の特異性及び有効性は、F A C S により定量化することができる。D C の成熟は、M H C I I 等の表面マーカーの上方調節の F A C S 分析により特徴付けることができる。

【0194】

他の実施形態において、ウィルスは *in vivo* で注入され、天然 D C と接触し、抗原をコードする遺伝子を送達し得る。選択された間隔で、リンパ器官由来の D C を使用し、例えば、G F P 等のマーカーの発現を観察することによって発現を測定することができる。ウィルス処理した受容者のリンパ節及び脾臓由来の T 細胞は抗原刺激に対する応答の大きさ及び持続性から測定することができる。上皮細胞及びリンパ細胞等の D C 以外の組織細胞を *in vivo* の遺伝子送達の特異性のために分析することができる。

10

【0195】

A I D S 流行（及び他のウィルス疾患）を終焉させるのに最も有効な潜在的方法はワクチンであることが広く認められている。不運にも今日まで、H I V に対するワクチン接種方法が首尾よく I I I 相試験を通過したことはない。したがて、新規で且つ有効なワクチン接種戦略に対する緊急の要求が存在する。本発明の幾つかの実施形態では、D C ワクチン接種が使用される。上記に記載されるようなウィルスタンパク質をコードする遺伝子をウィルスベクターにクローニングする。注射によって、h D E C - 2 0 5 等の D C を標的化する親和性分子を含むウィルスに患者を感染させる。動物モデルでは、分子的にクローニングした H I V レポーターウィルス（N F N S Z - r - H S A S, N L - r - H S A S）及び臨床分離株を使用して、尾静脈注射でその動物を処理し得る。感染の証拠は、脾細胞、リンパ節、及び末梢血において経時的にモニタリングすることができる。レポーターウィルスにおける H I V - g a g タンパク質に対する P C R 及び H A S に対する F A C S を使用して、ウィルスの統合及び複製を試験することができる。生産的な *in situ* の D C ワクチン接種により、H I V 攻撃に対する耐性が増大し得る。

20

【0196】

腫瘍細胞及び他の異常細胞の処理

他の実施形態において、開示された方法を使用して、腫瘍又は他の異常細胞の成長を処理することができる。例えば前立腺癌及び乳癌を含む様々な癌に対する腫瘍関連抗原が知られている。幾つかの乳癌では、例えば、H e r - 2 受容体が、癌細胞の表面上で過剰発現される。多くの腫瘍関連抗原が検討されている（例えば、Boon T, Cerottini JC, Vandeneijnde B, Vanderbruggen P, Vanpel A, Annual Review Of Immunology 12: 337-365, 1994, Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. Cancer Immunology Immunotherapy 50: (1) 3-15 MAR 2001）。したがって、幾つかの実施形態では、既知の腫瘍関連抗原に対する抗体を使用して、親和性分子を調製する。

30

【0197】

他の実施形態において、疾患又は障害に関連する抗原は、治療される患者から同定される。例えば、腫瘍に関連する抗原は、当該技術分野で既知の任意の方法によって、腫瘍自体から同定することができる。

40

【0198】

腫瘍細胞への目的の遺伝子の標的化送達のために、腫瘍関連抗原に対する抗体がウィルス表面上に示され得る。目的の遺伝子は、その発現が標的の腫瘍細胞を死滅させる毒素をコードし得る。幾つかの実施形態では、毒素の発現は誘導性である。他の実施形態では、目的の遺伝子は、細胞サイクルに干渉し、細胞の分裂能を低減又は取り除き得る。

【0199】

これらの方は、対象の病的細胞に対する特定の標的分子を選択すること及びこの特定の標的分子に対する親和性分子を合成することによって、幅広い疾患を治療するのに適合され得る。次に、目的の遺伝子を標的細胞に送達するために、膜結合した親和性分子及び融合分子を有する組み換えレトロウィルスをアセンブリする。

50

【0200】

幾つかの実施形態において、組み換えレトロウィルスを使用して、非ホジキンリンパ腫細胞を標的化することができる。HSVチミジンキナーゼ(HSV-tk)自殺遺伝子及びGFPレポーター遺伝子が腫瘍細胞に送達され得る。これらの2つの遺伝子が内部リボソーム侵入部位(IREs)によって結び付き、同時発現が達成され得る。

【0201】

幾つかの実施形態において、本明細書中に記載されているようなレトロウィルスを使用して、特異的な細胞表面抗原を有する腫瘍細胞(例えば乳癌腫瘍細胞)を標的化することができる。抗ヒトHer2抗体についてのハイブリドーマ細胞株がATCCから利用可能である(ATCC番号: CRL: 1043)。このような抗体を保有するウィルスを使用して、癌細胞を標的化し、そして死滅させることができる。

10

【0202】

[X連鎖重症複合型不全の治療]

ヒトにおいて、共通の鎖(。)における遺伝子異常により、X連鎖重症複合型免疫不全(X-SCID)が引き起こされる。治療を行わなければ、X-SCID患者は重度の感染症に苦しめられ、発育障害が起こり、通常生後1年以内で死に至る。この疾患に対する根本的な治療処置は遺伝子治療であることが一般的に認められている。開示されるようなレトロウィルスを使用して、in vitroで共通の。遺伝子を精製したCD34+造血幹細胞(HSC)に送達し、免疫系を再構築するために、。形質導入したHSCを患者に移植することができる。他の実施形態では、組み換えウィルスがin vivoで与えられ、X-SCIDを治療するために、CD34+幹細胞が標的化される。。遺伝子が送達される場合、標的細胞に対して組み換えレトロウィルスを特異的に標的化するためにSCFを使用することができる。

20

【0203】

他の実施形態において、X-SCIDを患う患者が治療される。全長の。のcDNAが増幅され、上記のように、レンチウィルスベクターにクローン化される。293細胞等のパッケージング細胞が、レンチウィルスベクター、並びに親和性分子及び融合分子をコードする1つ又は複数のベクターでトランスフェクトされる。SCFを保有するウィルス又はHSCを標的化する別の親和性分子及び融合分子(SINmu等)を回収及び濃縮する。注射によって、。欠損患者にこのウィルスが投与される。動員(mobilization)のあり、又はなしで試験を行い、HSCを循環血に移すことができる。それから末梢リンパ細胞を6~8週間分析し、成熟T細胞及び成熟B細胞の存在を検出することができる。

30

【0204】

[抗原特異的な免疫細胞治療]

他の実施形態において、組み換えレトロウィルスを使用して、T細胞受容体又はB細胞受容体等の免疫細胞受容体をコードするポリヌクレオチドをヒトの幹細胞に送達する。それから、幹細胞がT細胞又はB細胞等の成熟免疫細胞に発展し、これらの特異性は、幹細胞が形質導入された受容体により決定される。一実施形態では、疾患又は障害を患う患者が、このアプローチを使用して所望の特異性を有する免疫細胞を発生することによって治療される。抗原は、疾患又は障害に関連することがこれまでに知られている場合があるか、又は当該技術分野で既知の任意の方法で同定され得る。例えば、腫瘍関連抗原等の患者が患っている種類の癌に対する抗原が既知であり得る。腫瘍関連抗原は全く限定されず、これには、例えば治療される患者由来の癌細胞で同定される抗原が含まれる。

40

【0205】

ひとたび抗原が同定及び/又は選択されると、その後この抗原に対して特異的である1つ又は複数のT細胞受容体が同定される。同定される疾患関連抗原に対して特異的なT細胞受容体が未だに知られていない場合、当該技術分野で既知の任意の方法によってこの受容体を同定することができる。T細胞受容体は、患者において形成される免疫細胞の種類に応じて、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、又はその両方から同定することができる。例えば、細胞傷害性T細胞が患者において形成される場合、T細胞受容体はCTLから

50

同定される。一方で、ヘルパーT細胞が形成される場合、T細胞受容体はヘルパーT細胞から同定される。以下に示されるように、幾つかの実施形態では、CTL由来のT細胞受容体及びヘルパーT細胞由来のT細胞受容体の両方が用いられる。

【0206】

所望のT細胞受容体をコードするポリヌクレオチドが同定される。好ましくは、ポリヌクレオチドには、T細胞受容体のサブユニットをコードするcDNAと、T細胞受容体のサブユニットをコードするcDNAとが含まれる。T細胞受容体をコードするポリヌクレオチドは、上記のように、融合分子と細胞特異的な結合決定基とを含む修飾レトロウイルス、より好ましくは修飾レンチウィルスを使用して、標的細胞（好ましくは、造血幹細胞）に導入されることが好ましい。最初に、ウィルスは、膜結合した親和性分子により標的細胞膜と結合し、T細胞受容体サブユニットをコードするポリヌクレオチドが、融合分子の作用によってサイトゾルに侵入する。そして、目的の遺伝子（例えば、T細胞受容体をコードするもの）が細胞のゲノムに統合され、発現されることが好ましい。標的細胞がex vivoで接触した場合、それからこの標的細胞を、例えば注射によって患者に移し戻すと、標的細胞は、同定された抗原と接触すると免疫応答を発生することができる免疫細胞に発展する。しかし、好ましい実施形態では、ウィルスが患者に注入され、このウィルスが標的化細胞を特異的に形質導入する。患者で得られた免疫細胞が特定のTCRを発現し、そして患者は疾患又は障害に対する有効な免疫応答を増大させることができる。

【0207】

幾つかの実施形態において、T細胞受容体が細胞傷害性T細胞からクローン化される。これにより、患者において細胞傷害性T細胞が形成される。他の実施形態では、T細胞受容体がヘルパーT細胞からクローン化され、これにより患者においてヘルパーT細胞が形成される。

【0208】

さらに別の実施形態において、B細胞受容体をコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達することによって、患者においてB細胞が形成される。標的細胞集団が分裂し、幾つかの幹細胞が、細胞傷害性T細胞から得られたT細胞受容体をコードするベクターでトランسفェクトされ、幾つかの幹細胞がヘルパーT細胞から得られたT細胞受容体をコードするベクターでトランسفェクトされる。標的幹細胞が患者にトランسفェクトされ、これにより、患者において、疾患又は障害に特異的なヘルパーT細胞集団と、疾患又は障害に特異的な細胞傷害性T細胞集団とが同時に形成される。

【0209】

以下の実施例は例示目的のみのために与えられ、本発明の範囲を限定することは全く意図されない。実際、本明細書中で図示及び記載されるものに加えて、上記の記載から本発明の様々な変形態が当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲内に含まれる。

【0210】

本明細書中で言及される全ての特許及び参考文献は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

[実施例]

【0211】

実験方法

以下の実験方法が、以下の実施例1～実施例5で使用される。

【0212】

[構築物調製]

膜結合したヒトのIgG₁の軽鎖及び重鎖の定常領域のcDNAが増幅され、pBudCE4.1ベクター(Invitrogen)のヒトのCMVプロモーター及びEF1プロモーターそれぞれの下流に挿入された。それからマウスの抗CD20抗体(クローン2H7)の軽鎖及び重鎖の可変領域が、PCR増幅を使用してクローン化され、対応する定常領域の上流に直接挿入された。得られる構築物をpCD20として表した。ヒトのIg及

10

20

30

40

50

び I g の c D N A も p B u d C E 4 . 1 ベクター (Invitrogen) にクローン化され、 p I g が得られた。

【 0 2 1 3 】

H A m u をコードする構築物が、南カルフォルニア大学のDr. Cannonの研究室により提供された (A.H. Lin et al. , Hum. Gene. Ther. 12, 323 (2001)) 。野生型の S I N に対する c D N A が、CaltechのDr. Straussの研究室から得られた。P C R 突然変異誘発及びアセンブリを使用して、10個のアミノ酸残基のタグ配列をプロテインAのZ Z ドメインに置き換える (これは S I N の E 2 糖タンパク質の 7 1 ~ 7 4 番目のアミノ酸に位置している) ことを除いて、Morizono et al. , (Nature Med. 11, 346 (2005)) で記載されるように、突然変異型 S I N を創出した。このバージョンの S I N は S I N m u として表される。 10

【 0 2 1 4 】

[ウィルス産物]

標準的なリン酸カルシウム沈殿法を使用して、293 T 細胞をトランスフェクトすることによって、レンチウィルスを創出した。それぞれ 2 . 5 μ g の p C D 2 0 、 p I g 、及びパッケージベクタープラスミド (p M D L g / p R R E 及び p R S V - R e v) と共に、適切なレンチウィルスベクタープラスミド (5 μ g) で 6 c m の培養皿中の 293 T 細胞 (約 8 0 % の密集生) をトランスフェクトした (Sandrin et al. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 281:137 (2003)) 。トランスフェクトの 4 8 時間及び 7 2 時間後に、 20 ウィルス上清を集菌し、 0 . 4 5 μ m 孔径のフィルターで濾過した。

【 0 2 1 5 】

高い力価のレンチウィルスを調製するために、 5 0 , 0 0 0 \times g で 9 0 分間、超遠心分離 (Optima L - 8 0 K 分取用超遠心器, Beckman Coulter) を使用して、ウィルス上清を濃縮した。それから、粒子を適切な量の冷 P B S で再懸濁した。

【 0 2 1 6 】

[細胞株再構築]

V S V G 偽型化レンチウィルスを介した安定な形質導入によって、 293 T / C D 2 0 細胞株が形成された。ヒトの C D 2 0 の c D N A が、プラスミド F U W (G F P without F U G W ; Lois et al. Science 295:868-872 (2002)) におけるヒトユビキチン C プロモーターの下流でクローン化され、 F U W - C D 2 0 を構築した。それから、レンチウィルスベクター F U W - C D 2 0 を V s V g で偽型にし、 293 T を形質導入するのに使用した。得られた細胞を細胞選別にかけ、 293 T / C D 2 0 として表される均一な集団の C D 2 0 + 細胞を得た。 30

【 0 2 1 7 】

[ウィルス - 細胞結合分析]

細胞 (293 T / C D 2 0 又は 293 T (0 . 1 \times 1 0 ⁶)) を 4 で 3 0 分、 5 0 0 μ L のウィルス上清とインキュベートし、 4 m l の冷 P B S で洗浄した。それから、細胞を以下の 3 つの抗体で染色した： C D 2 0 を染色する抗ヒト I g G 抗体 (BD Pharmingen) 、 C D 2 0 を染色する抗ヒト C D 2 0 抗体 (BD Pharmingen) 、及び H A m u を染色する抗 F P V H A ポリクローナル抗体 (H.-D. Klenck (Institute of Virology; Philipps- University, Marburg, Germany) から得られる) 又は S I N m u を染色する抗タグ抗体 (Roche) 。染色後、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) によって細胞を分析した。 40

【 0 2 1 8 】

[i n v i t r o での 293 T / C D 2 0 細胞の標的化された形質導入]

293 T / C D 2 0 細胞 (0 . 2 \times 1 0 ⁶ / ウェル) 又は 293 T 細胞 (0 . 2 \times 1 0 ⁶ / ウェル) を 2 4 ウェル培養皿でプレート培養し、 Beckman Allegra 6 R 遠心器を使用して、 3 0 で 9 0 分間、 2 , 5 0 0 r p m でウィルス上清 (0 . 5 m l / ウェル) でスピン感染させた。それから、培地を取り除き、新鮮培地に置き換え、 3 7 でさらに 3 日間、 5 % の C O ₂ の存在下でインキュベートした。 G F P + 細胞の割合を F A C S により求めた。形質導入価を、線形応答を示す希釈範囲で測定した。 50

【0219】

[ウィルス形質導入における可溶性抗体及びN H₄C 1の効果]

293T / CD20細胞 (0.2 × 10⁶) 及び0.5mLのウィルス上清を用量勾配の抗ヒトCD20抗体(BD Pharmingen)又はN H₄C 1の非存在下又は存在下で8時間、インキュベートした。培地を新鮮培地に置き換え、37℃でさらに2日間、5%のCO₂の存在下でインキュベートした。FACS分析を使用して、形質導入の効率を定量化した。

【0220】

細胞 - 細胞融合試験

293T細胞 (0.1 × 10⁶) を一過性にトランスフェクトして、GFPと、表面のCD20と、融合タンパク質(HA mu又はSIN muのいずれか)とを発現させ、293T / CD20細胞 (0.1 × 10⁶) を共に混合し、標準PBS (pH = 7.4) で2回洗浄して、37℃で30分間、5%のCO₂で150μlの低pHのPBS (pH = 5.0) 又は標準pHのPBS (pH = 7.4) (対照として) 中でインキュベートした。それから、細胞を広く洗浄し、1日間標準培地で培養した。GFPフィルターセットを備える落射蛍光顕微鏡によって、細胞を視覚化させた。in vitroでヒトの初代B細胞の形質導入が標的化された。

【0221】

新鮮で非分画のヒトの末梢血単核細胞(PBMC) (2 × 10⁶) (AllCells, LLC)を、全体の形質導入単位(TU)が10 × 10⁶ (293T / CD20細胞における力価に基づいて) である濃縮ウィルスでインキュベートした。それから、B細胞が生存及び成長するようにLPS (50 μg / mL) を加えた。2日後、細胞を集菌し、PBSで洗浄した。抗ヒトCD20抗体及び抗ヒトCD19抗体を使用してFACS染色によって、B細胞集団を確認した。異なる細胞集団をゲートに通し、これらのGFP発現を測定することによって、標的化した形質導入を定量化した。

【0222】

[in vivoの初代ヒトB細胞の標的化された形質導入]

6~8週齢のRAG^{-/-}の雌マウス(Taconic)を360度全身照射した。翌日、100 × 10⁶個の新鮮なヒトのPBMC(AllCells, LLC)が、それぞれのマウスへの尾静脈注射によって伝播された。6時間後、濃縮ウィルス (100 × 10⁶ (TU / マウス)) 又はPBS (対照として) が尾静脈を介してこれらのマウスに投与された。2日後、心臓穿刺によってこれらのマウスから全血を採取し、ヒトのCD3及びCD20に対して、細胞を染色して、それから、CD3、CD20及びGFPの発現をFACSにより分析した。マウスは、大学の規則に従って、カルフォルニア工科大学(the California Institute of Technology)の動物施設における無菌環境下で、混合抗生物質スルファメタキサゾールと経口懸濁剤トリメトブリム(Hi-Tech Pharmacal)とで維持された。

【実施例1】

【0223】

[レトロウィルスベクターFUGW / CD20 + HA mu及びFUGW / CD20 + SIN muを利用した標的化された細胞の形質導入]

本発明の幾つかの実施形態によれば、親和性分子の基礎として機能するために選択された抗体の1つは、現在B細胞リンパ腫の治療に使用されているバージョンである抗CD20抗体(CD20)である。生理学的に、CD20が、発生における前駆B細胞の段階、及びB細胞の成熟過程を通して発現され、造血幹細胞はCD20を発現しない。B細胞がプラズマ細胞に成熟する場合、CD20発現が低減される。したがって、CD20は、例えばB細胞リンパ腫及び白血病の治療に理想的な標的である。ヒトの膜結合したIgG定常領域を有するマウス / ヒトのキメラ抗CD20抗体をコードする構築物(pCD20)が、上記のように形成された。抗体の表面での発現に必要な2つの関連するタンパク質であるヒトのIgG及びIgMをコードする遺伝子がpIgGとして表す構築物にクローン化された(図1)。

【0224】

10

20

30

40

50

抗 C D 2 0 抗体及び候補の融合分子 (F M) の両方で覆われたレンチウィルスの產生が、標準的なリン酸カルシウム沈殿法を使用して、レンチウィルスベクター F U G W (Lois et al. Science 295:868-872 (2002))、ウィルスの g a g 、 p o l 、及び r e v 遺伝子をコードするプラスミド、 p C D 2 0 、 p I g 、及び p F M (H A m u 又は S I N m u のいずれかである F M をコードするプラスミド) による 2 9 3 細胞の同時トランスフェクトによって達成された。 F U G W は、 G F P レポーター遺伝子を働くヒトのユビキチン - C プロモーターを保有する自己不活性化した、複製能力がないレンチウィルスベクターである (C. Lois, E. J. Hong, S. Pease, E. J. Brown, D. Baltimore, Science 295, 868 (2002)) 。対照として、水疱性口内炎ウィルス (V S V G) に由来するエンベロープ糖タンパク質を認識及び融合タンパク質として使用した。

10

【 0 2 2 5 】

トランスフェクトされた細胞の F A C S 分析は、事実上の全ての細胞がウィルスベクターの存在の指標としての G F P をあるレベルで発現したことを示していた (図 3 B 及び図 3 D 、上のパネル) 。 G F P 陽性細胞の約 3 0 % が、細胞表面上で H A m u と C D 2 0 とを同時に発現した (図 3 B 、下のパネル) 。それより僅かに小さい割合 (約 2 0 %) の 2 9 3 T 細胞が G F P 、 S I N m u 、及び C D 2 0 の同時発現を示した (図 3 D) 。これらのトランスフェクトされた產生細胞から得られたウィルスを F U G W / C D 2 0 + H A m u 及び F U G W / C D 2 0 + S I N m u として表した。

【 0 2 2 6 】

C D 2 0 及び F M が同じビリオンに組み込まれたか否かを調べるために、ウィルス細胞結合分析を行った。標的として、上記のように、 C D 2 0 タンパク質抗原を安定して発現させた 2 9 3 T 細胞が作製された (2 9 3 T / C D 2 0 、図 4 A) 。親細胞株 2 9 3 T が陰性対照として有用であった。 4 で 3 0 分間、ウィルス上清を標的細胞とインキュベートした。得られた結合を三染色スキームで分析した (図 4 B) 。 F A C S 分析は、 C D 2 0 を保有する組み換えレンチウィルスが、実際 C D 2 0 を発現する 2 9 3 T 細胞と結合することが可能であることを示していた (図 4 C 、上のパネル) 。 C D 2 0 が発現していない対照の 2 9 3 T 細胞は検出可能な C D 2 0 を示さず、これは、細胞とウィルスの結合が、細胞表面の C D 2 0 抗原とウィルス表面の C D 2 0 分子との間の特異的な相互作用によるものであることを示していた。別の対照では、 F M のみを保有するウィルスが両方の細胞と結合する能力を示さず、これは H A m u 及び S I N m u が細胞結合能を失っていたことを示していた。 F A C S 分析は 2 9 3 T / C D 2 0 細胞表面と結合するウィルスが F M を示したことも示しており (図 4 C 、下のパネル) 、これにより C D 2 0 及び F M の両方が同じビリオンに組み込まれていたことが示唆され、これは C D 2 0 対 F M の F A C S プロットによってさらに確認された (図 4 D) 。同時提示に加えて、これらの結果により、 F M の存在は C D 2 0 の C D 2 0 との結合には影響を与えないことが示される。

20

【 実施例 2 】

【 0 2 2 7 】

[レトロウィルスベクター F U G W / C D 2 0 + H A m u 及び F U G W / C D 2 0 + S I N m u を利用した C D 2 0 発現標的細胞及び 2 9 3 T 細胞の形質導入]

40

次に、細胞特異的な様式での、 C D 2 0 保有ウィルスによる、 C D 2 0 を発現する細胞内への遺伝子送達の有効性を試験した。 G F P 発現を使用して、形質導入効率を測定した。様々な表面タンパク質を保有するウィルスを含む上清を、 C D 2 0 を発現する標的細胞及び対照としての 2 9 3 T 細胞とインキュベートした。形質導入の 4 日後、標的化の効率を F A C S により分析した。図 5 A (右端のパネル) は、 F U G W / C D 2 0 + H A m u ウィルス粒子が 2 9 3 T / C D 2 0 細胞の 1 6 % を特異的に形質導入し得ることを示している。左側のパネルは、形質導入にはビリオン上に H A m u の存在が必要であるが、おそらくは H A m u のそのリガンド (シアル酸) との弱い残りの結合のために、 C D 2 0 を欠失しているビリオンによるバックグラウンド形質導入が幾らか存在していたことを示す。 F U G W / C D 2 0 + H A m u (新鮮ウィルス上清、非濃縮) に対する力価は、

50

約 1×10^5 形質導入単位 (T U) / mL であると推測された。線形応答を示した希釈範囲における G F P⁺細胞の割合によりこの力値を求めた。293T 細胞は、僅かなバックグラウンド感染レベルを示したが、F U G W / C D 2 0 + H a m u による特異的な形質導入は示さなかった (図 5 A、下のパネル)。

【 0 2 2 8 】

S I N m u が融合タンパク質として使用された場合、特異的な形質導入の実質的な増大が観察された (52%、図 5 B)。F U G W / C D 2 0 + S I N m u に対する力値は、約 1×10^6 T U / mL であると推測された。また、それより非常に低い形質転換が、結合タンパク質の非存在下 (約 1%) で検出された。したがって、図 5 B のデータにより、S I N m u が、ウィルスを標的化するための C D 2 0 とのパートナーとして好ましい融合タンパク質であることが示される。F A C S を使用して、形質導入を様々な時点でモニタリングした場合、S I N m u 含有ビリオンが H A m u によるものよりも迅速な形質導入動態を示したことが見出された。F U G W / C D 2 0 + H A m u 及び F U G W / C D 2 0 + S I N m u の両方を 90% を超える回収率を有する超遠心分離によって濃縮することができ、これが in vivo 適用に重要である。

【 0 2 2 9 】

C D 2 0 及び融合タンパク質 (H A m u 又は S I N m u) が同じウィルス粒子に組み込まれる必要があるか否か、したがって、c i s で形質導入を媒介するように機能するか否かを評価するために、F U G W / C D 2 0 から產生したウィルスを、F U G W / H A m u 又は F U G W / S I N m u から產生したウィルスと混合し (それぞれが一つのタンパク質のみを示す)、それらの 293T / C D 2 0 細胞の形質導入を試験した。この手法によつては特異的な形質導入が得られず、これは、改変された組み換えウィルスで与えられた特異的な形質導入には、2つのタンパク質が同じウィルス粒子上に示されることが必要であることを示した。

【 0 2 3 0 】

したがって、2つの異なるタンパク質は、標的化形質転換のために改変したレンチウィルスの結合事象及び融合事象に貢献し得る。観察される特異性が、C D 2 0 と C D 2 0 との間の相互作用の結果であったことをさらに確認するために、293T / C D 2 0 細胞を抗 C D 2 0 遮断抗体の存在下で形質転換させた。予想どおりに、感染性の劇的な低減が、F U G W / C D 2 0 + H A m u 及び F U G W / C D 2 0 + S I N m u ウィルスの両方で検出され (図 5 D)、これは抗体 - 抗原結合が標的化された形質転換を促進することを示した。

【 0 2 3 1 】

組み換えレンチウィルスを細胞に侵入させるための低 pH 区画の必要性を調べるために、F U G W / C D 2 0 + H A m u 及び F U G W / C D 2 0 + S I N m u ウィルスの両方を、酸性のエンドソーム成分を中性にする塩化アンモニウム (N H₄ C l) の非存在下又は存在下で 293T / C D 2 0 細胞とインキュベートした。細胞への N H₄ C l 添加は、F U G W / C D 2 0 + H A m u ウィルス (図示せず) 又は F U G W / C D 2 0 + S I N m u のいずれかによる形質導入を完全に取り除く (図 5 E)。これらの結果は、膜融合を誘発させるためのヘマグルチニン及びシンドビスウィルス糖タンパク質の低 pH 要求性と一致している。

【 0 2 3 2 】

pH 依存性の融合に対するより直接的な証拠が、細胞 - 細胞融合分析によって得られた。G F P と、表面 C D 2 0 と、F M とを発現する 293T 細胞を 30 分間、低 pH 緩衝液中で 293T / C D 2 0 細胞でインキュベートした後、標準培地で培養した。H A m u 及び S I N m u の両方が、多核化多細胞核 (multi-nucleated polykaryons) を形成することによって、細胞 - 細胞融合を誘導した (図 5 C)。C D 2 0 と C D 2 0 とを欠失した細胞を用いた同様の実験では非常に低いレベルの融合が得られたことから、C D 2 0 と C D 2 0 との間の相互作用は融合の可能性を劇的に増大させる。C D 2 0 / C D 2 0 の相互作用が細胞膜を極めて近づけて、これにより融合タンパク質の作用を促進させる。

10

20

30

40

50

【実施例3】

【0233】

[レトロウィルスベクターFUGW/CD20+SINmuを使用した初代ヒトBリンパ細胞の形質導入]

人工的に生成された細胞株のCD20に特異的な形質導入を媒介する系の能力を確立し、CD20抗原を天然で保有している細胞である初代ヒトBリンパ細胞の特異的な形質導入を調査した。新鮮で非分画のヒト末梢血単核細胞(PBMC)をFUGW/CD20+SINmuで形質導入し、それからリポ多糖(LPS)で刺激して、B細胞集団を増大させた。4日後、細胞をCD19(B細胞マーカー)、CD20及びGFPの発現を調べるために染色した(図6A)。35%を超える細胞が、記載の培養条件下においてCD20⁺B細胞であった。これらの大部分はGFP⁺であった。反対に、CD20⁻の非B細胞の中でGFP⁺の細胞は実質的に検出されず、このことにより形質転換がCD20発現に厳密に依存していることが確認された。別の対照実験では、新鮮なPBMCをFUGW/CD20+SINmuで形質転換した後、ホリボール-12-ミリスチン酸-13-酢酸塩(PMA)とイオノマイシンとで刺激して、T細胞を増殖させた。これらのT細胞のFACS分析はGFPの発現を示さず(図7)、このことにより形質導入の特異性が確認された。

【実施例4】

【0234】

[レンチウィルスベクターCCMV/CD20+SINmu及びCPGK/CD20+SINmuを用いた形質導入の実証]

標的化方法はレンチウィルスベクターFUGWに限定されないことを実証するために、異なるプロモーター構造を有する2つのさらなるレンチウィルスベクターを評価した。Kohn et al.は、関連のマトリクス付着領域を有する免疫グロブリン重鎖エンハンサー(Eμ)をヒトのサイトメガロウィルス(CMV)プロモーター(CCMV)又はマウスのホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター(CPGK)を保有するレンチベクターに組み込んでいる(C. Lutzko et al. J. Virol. 77, 7341-51 (2003))。それから、2つのレンチウィルスベクターをこの系に適合させ、組み換えレンチウィルスCCMV/CD20+SINmu及びCPGK/CD20+SINmuを調製した。これらのウィルス上清を有するPBMC誘導性B細胞の形質導入は、これまでにFUGWで観察されたものと同様の結果を示した(図6A)。ゲノムPCR増幅によって、GFP導入遺伝子の安定な統合を検出した(図6B)。

【実施例5】

【0235】

[特異的な形質導入の媒介におけるレンチウィルスベクターのin vivoでの有効性試験]

次に、in vivoで特異的な形質導入の媒介における、この系の有効性を試験した。この目的のために、ヒトのPBMCを異種移植したマウスマルクを使用した。新鮮なヒトのPBMC(100×10⁶/マウス)を尾静脈注射によって放射性免疫不全RAG2^{-/-}マウスに移した。ヒトの細胞を移して6時間後、CD20とSINmuとを保有する変異レンチウィルスを尾静脈を介して投与した。2日後、これらのマウスの全血を採取し、表面抗原とGFP発現とに関して細胞を分析した。

【0236】

マウスから回収した細胞の約30~40%がヒトのT細胞(CD3⁺)であり、0.1~0.3%がCD20⁺のヒトB細胞であった。3つの集団をGFP発現に関して分析した: CD20⁺、CD3⁺、及びCD20⁻CD3⁻。対照の抗体とSINmuとを保有するウィルス(FUGW/b12+SINmu)を注射したマウスから集菌した細胞は、任意の3つの集団でGFP発現の徴候を示さなかった(図6C)。これに対して、FUGW/CD20+SINmuを注射したマウスから単離したCD20⁺細胞の少なくとも40%でGFP発現が観察された一方で、他の2つの集団では形質導入が検出されなかった。

【0237】

*in vivo*での所望の細胞型に対する厳密な、そして有効な遺伝子送達媒体の標的化のこのような実証により、レンチウィルス媒介性遺伝子治療が可能になり、非特異的な効果への懸念が抑えられる。おそらく、この研究の最も重要な意味は、これから遺伝子治療は安価な手法として行うことができ、したがって発展途上国においてさえも実行を考慮することができるところである。

【実施例6】

【0238】

[組み換えレンチウィルスベクターFUGW / mDEC-205 + SINmuによるDEC-205受容体を発現する樹状細胞の感染]

レンチウィルスベクターを標的化する表面の抗体等の親和性分子の使用を評価するために、抗CD20抗体に関して上記されたように、マウスのDEC-205受容体に対する膜結合した抗体（mDEC-205として表される）を調製した。mDEC-205は、樹状細胞（DC）で豊富に発現したエンドサイトシス受容体である。

【0239】

骨髄培養物で成長させた前駆体由来のマウスのDCを生成するように、或るプロトコルを適合させた（Yang L and Baltimore D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:4518 (2005)）。骨髄細胞をマウスから収集し、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の存在下で*in vitro*で培養した。10日目に、細胞を回収し、70%の細胞がDEC-205を発現したことを確認した。ウィルス細胞結合分析は、組み換えFUGW / mDEC-205 + SINmuがDEC-205陽性細胞と結合することができるところを示した。ウィルスと複合体を形成したDCを分析した場合、DEC-205の有意な下方調節が観察された。ウィルス上清によるこれらの細胞の感染は、CD-20でこれまでに示されたものと非常に類似したパターンに従っていた。DCが（高いmCD11c）ゲートに通された場合、FUGW / mDEC-205 + SINmuが高い感染効率（42%）を示した一方で、FUGW / mDEC-205及びFUGW / SINmuは、実質的に感染を示さなかった。DEC-205の下方調節が、mDEC-205を保有するウィルスに感染したDCにおいて観察された。これらの結果は、上記のような組み換えレトロウィルスが初代細胞を効率的に感染させることも示していた。

【実施例7】

【0240】

[CD20発現細胞を標的化するための組み換えレンチウィルスによる単鎖膜結合抗体（抗CD20）の使用]

単鎖の膜結合形態の抗体（scAbm）が、標的化組み換えレンチウィルスの親和性分子として開発された。scAbmは一般的に、柔軟性のあるペプチドリンカーで連結された重鎖及び軽鎖の可変ドメインを有するように設計される。またこれらは、細胞表面に固定するために、N末端にシグナルペプチド、及びC末端に膜貫通ドメインを保有している。考案されたわずかに異なるバージョンのscAbmがsc-CD20として表される。このscAbmは、 $(GGGGSGGS)_2$ ペプチドと連結された抗CD20抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメインと、ヒトのIgG1のヒンジCH2-CH3ドメインを含む二量化領域と、膜貫通ドメインと、細胞表面上でこのキメラタンパク質を示すヒトのHLA-A2の細胞質尾部とから成る。

【0241】

細胞表面上で発現するsc-CD20の能力をFACS分析によって調べた。psc-CD20の発現ベクターによる293T細胞のトランスフェクトにより、文献（例えばde Ines, C. et al. J. Immunol. 163, 3948-3956(1999)）における二量化ドメインのないこれらのバージョンのscAbmと比較した場合、より高いレベルの表面抗体の発現が得られた。このことは、ジスルフィドと連結された二量化ドメインの包含に部分的に起因している可能性があり、これが表面上のscAbmの安定性を改善させ得る。

【0242】

10

20

30

40

50

ウィルス細胞結合分析を用いて、p s c C D 2 0 がその結合活性を維持するか否かを調べた。s c C D 2 0 保有レンチウィルス (F U G W / s c C D 2 0 + S I N m u として表される) の上清を 2 9 3 T / C D 2 0 細胞でインキュベートし、得られたウィルス細胞複合体を F A C S により分析した。F U G W / s c C D 2 0 + S I N m u ウィルスは C D 2 0 発現 2 9 3 T 細胞と結合することができたことが見出され、これは、ウィルス表面上の s c C D 2 0 が活性をもつことを示した。

【 0 2 4 3 】

次に、C D 2 0⁺細胞を特異的に形質導入する F U G W / s c C D 2 0 + S I N m u の能力を調査した。s c C D 2 0 を保有するレンチウィルスが、C D 2 0 を発現する 2 9 3 T / C D 2 0 細胞を形質導入することができる。この力価は約 5×10^5 I U / m L であると見積もられた。単鎖抗体を組み込んだレンチウィルスは、おそらくエンドサイトーシスを誘導する自然形態の抗体の能力のために、自然形態の抗体を組み込んだものよりも幾らか力価が低かった。それにもかかわらず、これらの結果により、s c A b m を使用して、対応する受容体を発現する細胞を形質導入することができるレンチウィルスを創出し得ることが実証された。

【実施例 8】

【 0 2 4 4 】

[C D 2 0 と、融合タンパク質とを保有する改変組み換えレンチウィルスを使用した表面結合抗 C D 2 0 抗体を発現する細胞の特異的な感染]

(1) 抗体以外の表面タンパク質を使用して、レンチウィルスベクターを標的化することができるか否か、及び(2) 細胞特異的な形質導入のために、C D 2 0 以外の表面受容体を標的とすることができるか否かに取り組む実験を行った。

【 0 2 4 5 】

C D 2 0 を発現する細胞を標的とする C D 2 0 の利用を調査した。4 - 膜貫通タンパク質である C D 2 0 とは異なり、膜結合した I g G₁ は、原形質膜で分子を固定する C 末端膜貫通部分と細胞質部分を有する。生理学的に、細胞質ドメインは抗原 - 免疫グロブリン複合体の内在化を媒介することができる (Nussenzweig, M.C. Curr. Biol. 7, R355-357 (1997))。本明細書中に 2 9 3 T / C D 2 0 として表される膜結合した C D 2 0 を発現する 2 9 3 T 細胞を安定して生成した。出芽機構の性質を利用して、C D 2 0 及び H A m u / S I N m u (それぞれ、F U G W / C D 2 0 + H A m u 及び F U G W / C D 2 0 + S I N m u として表される) を保有する組み換えレンチウィルスが調製された。2 9 3 T / C D 2 0 を形質導入し、G F P 発現を定量化することによって、C D 2 0 を有するレンチウィルスの感染性を測定した。F U G W / C D 2 0 + H A m u ウィルスが C D 2 0 を発現する 2 9 3 T 細胞を特異的に形質導入することができる。この力価は、約 1.2×10^6 I U / m L であると推測された。このデータは、膜結合した抗体がウィルス受容体として作用し、対応する抗原を保有するレンチウィルスの侵入を媒介することができることを示している。

【 0 2 4 6 】

したがって、レンチウィルスベクターを標的化するために、C D 2 0 等の膜貫通タンパク質をウィルス表面に組み込むことができ、標的化戦略に利用することができるタンパク質プールを拡大させることができることが実証された。これらの結果は、当業者に、多くの異なる種類の細胞表面の受容体を標的化侵入を媒介する親和性分子として利用することができることも示している。

【実施例 9】

【 0 2 4 7 】

[膜結合形態の幹細胞因子 (S C F) と、融合タンパク質とを同時に示す改変組み換えレンチウィルスを使用した c キット発現細胞の特異的な感染]

他の表面受容体 - リガンド相互作用を標的化を達成するのに利用することができるか否かを研究した。幹細胞因子 (S C F) は、細胞表面上のタンパク質チロシンキナーゼ受容体である c キットと相互作用し、造血を調節する (Shimizu, Y.J. et al. J Immunol. 156

10

20

30

40

50

, 3443-34491996))。SCFのcキットとの結合により、エンドソーム過程を介したcキットの迅速な内在化が引き起こされることが見出された (Jahn, T. et al. *Oncogene* 21, 4508- 4520(2002))。Casimir et al.は、膜結合ヒトSCFを同種指向性レトロウィルスに組み込むことができる事を示し、得られたウィルスがcキット発現ヒト細胞を特異的に形質導入することができることを見出した (Chandrashekran, A., et al. *Blood* 104, 2697- 2703(2004))。エンベロープタンパク質Ecoがヒトの細胞表面上で発現したmCATを認識することができないので、元の同種指向性ウィルスはヒト細胞に感染しない (「the mCAT derived from rodent cells is the viral receptor for Eco」; Coffin, J.M. et al. (1997). *Retroviruses* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press))。組み換えレンチウィルス及びレトロウィルスを標的化するためにSCFと協調するHAMu及びSINmuの能力を評価した。 10

【0248】

膜結合形態のヒトのSCF (hSCFとして表される)をs1/s14のhSCF220間質細胞株 (ATCCから得られた)からクローニングした。膜結合形態のマウスSCF (mSCFとして表される)を構築するために、分泌されたマウスのSCFに対するcDNAをhSCFの膜貫通部分と結び付けた。hSCF及びmSCFの両方をレンチウィルス表面上に安定して示し得ることが見い出された。HAMu及びhSCFを組み換えレンチウィルス (FUGW/hSCF+HAMu)に組み込んだ場合、このウィルスはヒトのcキットを発現するTF-1a細胞を感染することができなかった。同様に、FUGW/mSCF+HAMuがマウスのSCF受容体を発現するD9細胞を感染することはできなかった。一方で、SINmuを使用した場合、FUGW/mSCF+SINmu及びFUGW/mSCF+SINmuは、それぞれcキット陽性細胞TF-1a及びD9を特異的に感染することができた。これらの力価はそれぞれ、約 1.5×10^6 IU/mL及び 4×10^6 IU/mLであると見積もられた。これらの結果は、融合タンパク質と認識タンパク質との間の適切な調節が、感染性である組み換えウィルスに重要な要素であることを示している。 20

【0249】

mSCF及びSINmuを示しているレトロウィルスが、D9細胞を感染させる場合、極めて高い感染性 (93%) が得られた。mSCF又はSINmuのみを保有するレトロウィルスは、実質的にD9細胞の感染を示さなかった。この感染性は、Eco偽型ウィルスが達成できるものと同程度に高かった。このことは、受容体リガンド対を使用して、特定の標的細胞に対してレトロウィルスを標的化することができることを示している。 30

【図面の簡単な説明】

【0250】

【図1】本発明の幾つかの実施形態による細胞特異的な結合決定基と融合分子とを有する組み換えウィルスの創出の概略図である。

【図2】融合分子と親和性分子とを含むウィルス粒子の標的化された形質導入の分子機構を示す図である。

【図3A】インフルエンザA (FPV) ヘマグルチニン (HA) に由来する融合タンパク質HAMuを示す図である。HAは、成熟後に細胞表面受容体と結合するHA1 (シアル酸)、及び膜融合を誘発するHA2の2つの糖タンパク質を含む。受容体結合部位内の3点の突然変異 (a1:Y106F, a2:E199Q, a3:G237K) が導入され、結合能を欠損しているが、融合能を有する融合分子 (HAMu) を創出した。 40

【図3B】ウィルス産生細胞のFACS分析を示す図である。293T細胞は、レンチウィルスベクターFUGW、膜結合抗体 CD20、付属タンパク質Ig 及びIg 、融合タンパク質HAMu、並びにウィルスのgag、pol及びrev遺伝子をコードする別々のプラスミドで一過性にトランスフェクトした。抗ヒトIgG抗体及び抗FPV HA抗体を使用して、CD20及びHAMuの発現を検出した。

【図3C】シンドビスウィルスの糖タンパク質 (SIN) に由来する融合タンパク質SINmuを示す図である。SINは2つの膜糖タンパク質 (E1及びE2) 及びシグナルペ 50

プチド (E3) (融合を媒介するE1、受容体結合のためのE2、E2の糖タンパク質を処理するシグナル配列としてのE3)を含む。E2の糖タンパク質の71番目のアミノ酸と74番目のアミノ酸との間に、10残基の検出タグ配列を挿入した。一連の変異 (a4 : E3の61～64番目のアミノ酸の欠失、a5 : 68 S L K Q 71の68 A A A A 71への突然変異、a6 : 157 K E 158の157 A A 158への突然変異)が導入され、結合能を欠損しているが、融合能を有するSINmu結合分子を得た。

【図3D】SINmuが融合タンパク質に使用され、抗タグ抗体で検出されたことを除いて、図3Bに示されるFACS分析と同様の図である。

【図4A】標的細胞株293T/CD20のFACS分析を示す図である。抗CD20抗体を使用して、CD20の発現を検出した。実線は、293T/CD20のCD20の発現を示し、影線は293T細胞のCD20発現を示す(対照として)。

【図4B】ウィルス-細胞の結合を分析するのに使用した三染色スキームの概略図である。3つの染色を利用して、CD20、CD20及び融合分子(HAmu又はSINmu)の存在をそれぞれ検出した。

【図4C】図4Cの左側のパネルは、FUGW/CD20+HAMuでインキュベートした293T/CD20細胞のFACSプロットを示す図である。293T/CD20細胞へのウィルスの結合は、CD20(抗IgG)及びHAMuに対する抗体によって調べられる。実線は293T/CD20に対する分析を示し、影線は293Tに対する分析を示す(対照として)。図4Cの右側のパネルは、FUGW/aCD20+SINmuでインキュベートした293T/CD20細胞のFACSプロットを示す図である。CD20及びSINmuに対する抗体によって、293T/CD20細胞とのウィルスの結合を検出した。実線は293T/CD20に対する分析を示し、影線は293Tに対する分析を示す(対照として)。

【図4D】密度プロットによる抗体と融合タンパク質との2つのタンパク質の存在を関連付ける同時表示を示す図である。

【図5A】in vitroでの293T/CD20細胞に対する、抗体及び融合タンパク質の両方を有する組み換えレンチウィルスの標的化を示す密度プロットを示す図である。293T/CD20細胞(2×10^5)を500μLの新鮮な(fresh)未濃縮FUGW/CD20(HAmuなし)、FUGW/HAMu(CD20なし)、又はFUGW/CD20+HAMuで形質導入した。CD20を発現しなかった293T細胞を対照として含んだ。得られたGFP発現をFACSで分析した。FUGW/CD20+HAMuに対する特定の形質導入価は、約 1×10^5 TU/mLであると見積もられた。

【図5B】図5Aで示されるが、未濃縮FUGW/SINmu(CD20なし)又はFUGW/CD20+SINmuを使用して行った同様の形質導入実験の結果を示す図である。標的化された特異性の比較のために、細胞をFUGW/HAMuでも形質導入した。FUGW/CD20+SINmuに対する特異的な形質導入価は、~ 1×10^6 TU/mLであると推測された。

【図5C】細胞間の融合分析による、HAMuとSINmuとのpH依存性融合の証拠を示す図である。293T細胞(0.1×10^6)を、GFPと、表面のCD20と、融合タンパク質(HAMu又はSINmuのいずれか)とを発現させるように、一過性にトランスフェクトした。293T/CD20細胞を共に混合し、標準PBS(pH=7.4)で1回洗浄して、低pHのPBS(pH=5.0)又は標準pHのPBS(対照として)で37度30分間インキュベートした。それから、細胞を洗浄し、1日標準培地で培養した。GFPフィルターセットを備えた落射蛍光顕微鏡で細胞を視覚化した。

【図5D】CD20及び融合タンパク質を示すウィルス粒子による形質導入に対する可溶性CD20の添加の効果を示す図である。8時間の形質導入の間に、CD20をウィルス上清に加えた。それから、上清を新鮮培地に置き換えた。2日後、GFP発現に関して、細胞を分析した。アイソタイプ適合した抗体を対照として使用した。

【図5E】NH₄Cl(可溶性CD20の代わり)の添加の効果に基づく形質導入のpH依存性を示す図である。

10

20

30

40

50

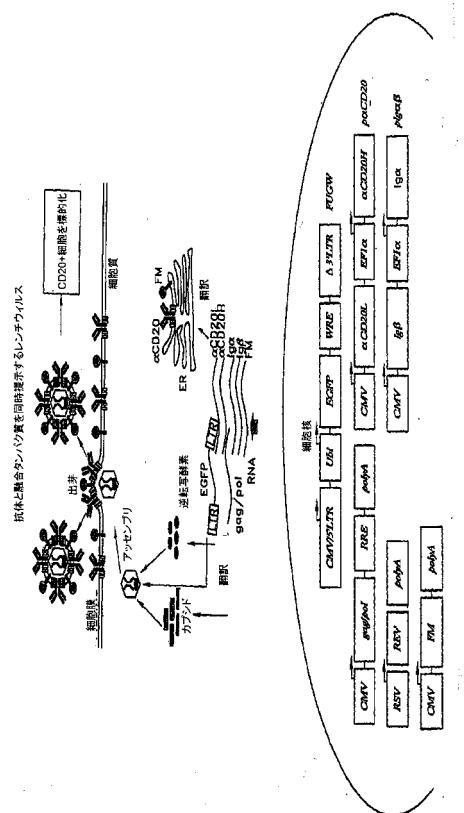
【図6A】図6は、改変したレンチウイルスを使用した、*in vitro*及び*in vivo*でのCD20⁺のヒト初代B細胞の標的化を示す図である。図6Aは、濃縮されたFUGW/CD20+ SINmu、CCMV/CD20+ SINmu又はCPGK/CD20+ SINmuウイルス(10×10^6 TU)で共培養することによって形質導入した新鮮で非分画のヒトのPBMC(2×10^6)における目的の遺伝子(GFP)の発現を示す。B細胞の生存及び成長のために、LPS(50 μg/mL)を培養培地に加えた。2日後、CD19とCD20の同時染色によって、B細胞集合を同定した。実線は形質導入細胞における発現を示し、影線は非形質導入細胞における発現を示す。

【図6B】一対のGFP特異的なプライマーを使用して、ゲノムPCR增幅で検出されるような、導入遺伝子の安定な組み込みを示す。

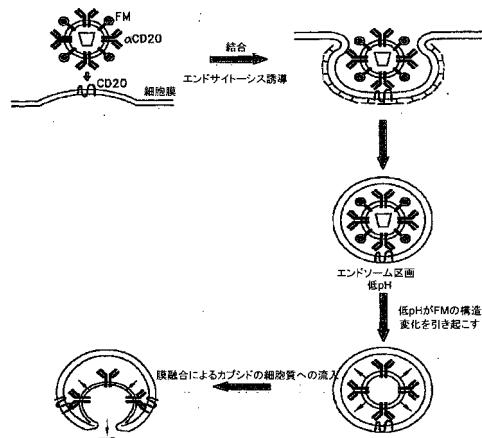
【図6C】ウィルスの*in vivo*送達の後の標的細胞における目的の遺伝子の発現を示す。尾静脈を介して、照射されたRAG2^{-/-}マウス(100×10^6 /マウス)に新鮮なヒトのPBMCを移した。6時間後、濃縮ウイルス(100×10^6 TU /マウス)を尾静脈に注射した。2日後、心臓穿刺によって、これらのマウスから全血を採取し、ヒトのCD3及びCD20に対して細胞を染色し、それからGFP発現に関して、FACSで分析した。下方のパネルでは、影線はウィルス処理をしないことを示し、破線はFUGW/b12+ SINmuウイルスによる処理を示す。実線は、FUGW/CD20+ SINmuウイルスによる治療を示す。

【図7】3つの異なるウィルス構築物から調製したウイルスを使用した、目的の遺伝子の発現を示す図である。濃縮FUGW/CD20+ SINmu、CCMV/CD20+ SINmu又はCPGK/CD20+ SINmu(10×10^6 TU)で共培養することによって、新鮮で非分画化のヒトのPBMC(2×10^6)を形質導入した。PMA(50 ng/mL)及びイオノマイシン(500 ng/mL)を培養培地に加え、T細胞の生存及び成長を高めた。2日後、ヒトのCD3の同時染色によって、T細胞集合を同定した。実線は形質導入細胞における分析を示し、影線は形質導入なしの細胞における分析を示す(対照として)。

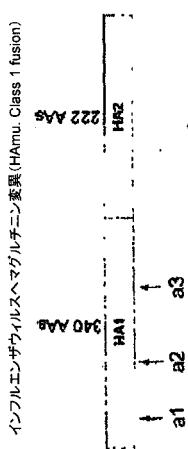
【 図 1 】



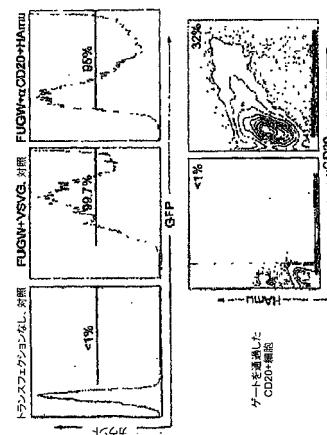
【 四 2 】



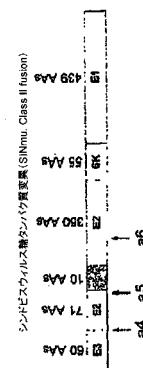
【図3A】



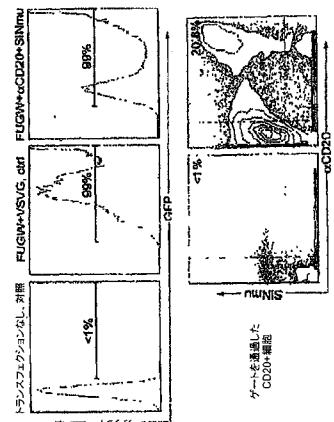
【図3B】



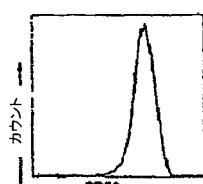
【図3C】



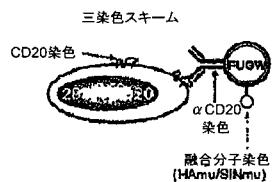
【図3D】



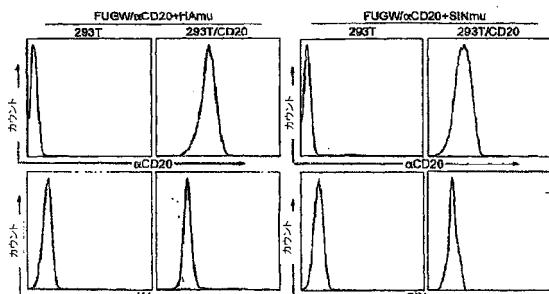
【図4A】



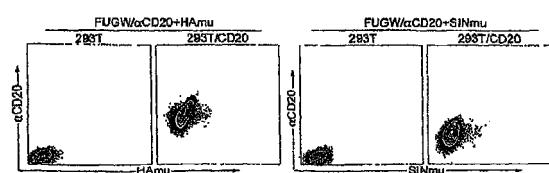
【図4B】



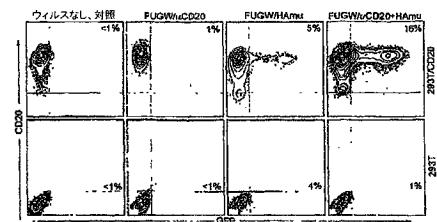
【図4C】



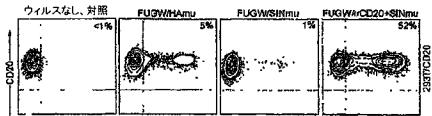
【図4D】



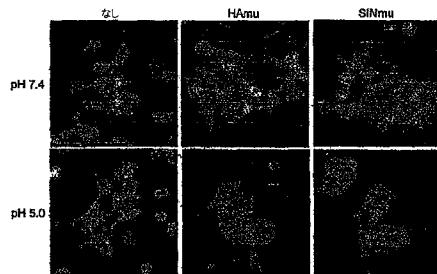
【図5A】



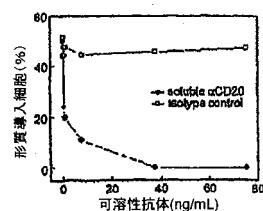
【図5B】



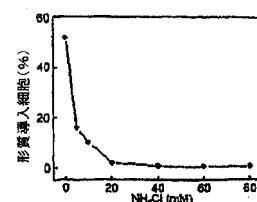
【図5C】



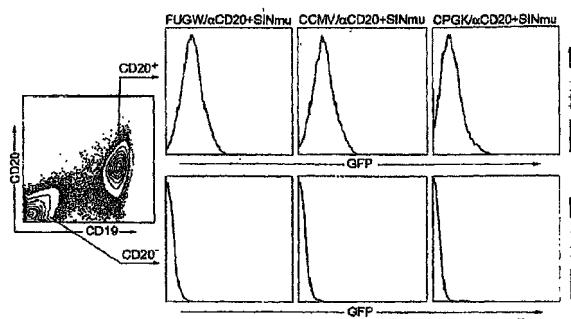
【図5D】



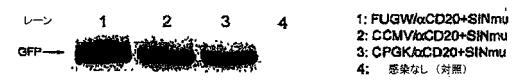
【図5E】



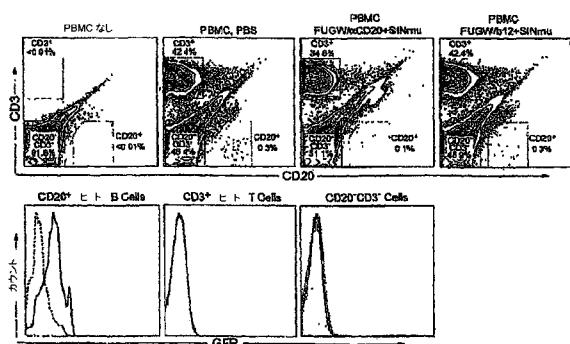
【図6A】



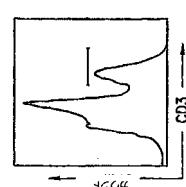
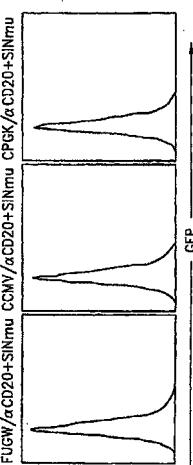
【図 6 B】



【図 6 C】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 ワン , ピン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91106 パサデナ アパートメント ナンバー226 サン パスカル ストリート 975

(72)発明者 ヤン , リリ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91106 パサデナ アパートメント ナンバー226 サン パスカル ストリート 975

(72)発明者 ボルティモア , デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91106 パサデナ サウス ヒル アベニュー 415

審査官 北田 祐介

(56)参考文献 國際公開第2004 / 067710 (WO , A1)

特表2004 - 532645 (JP , A)

特表2005 - 514326 (JP , A)

J Virol. , 2001年, 第75巻, 8016-8020ページ

J Virol. , 1998年, 第72巻, 9873-9880ページ

Hum Gen Ther. , 2005年2月, 第16巻, 223-234ページ

J Cell Biol. , 2005年4月11日, 第169巻, 167-177ページ

GARRY CE et al. , Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrines) , Theor Biol Med Model. [online] , <<http://www.tbiomed.com/content/pdf/1742-4682-1-10.pdf>> , 1 5-NOV-2004 uploaded, [retrieved on 28-OCT-2011]

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

C 12 N 7 / 00

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d

S c i e n c e D i r e c t