

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-519008

(P2012-519008A)

(43) 公表日 平成24年8月23日(2012.8.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/015 (2006.01)	C O 7 K 14/015	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 5
C O 7 K 16/08 (2006.01)	C O 7 K 16/08	4 C O 8 4
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 107 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-552364 (P2011-552364)
 (86) (22) 出願日 平成22年3月4日 (2010.3.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年10月19日 (2011.10.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/001343
 (87) 国際公開番号 W02010/099960
 (87) 国際公開日 平成22年9月10日 (2010.9.10)
 (31) 優先権主張番号 61/157, 436
 (32) 優先日 平成21年3月4日 (2009.3.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/306, 205
 (32) 優先日 平成22年2月19日 (2010.2.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505033721
 ドイツェス クレブスフォルシュングスツ
 エントルム
 Deutsches Krebsfors
 chungszentrum
 ドイツ国、69120 ハイデルベルク、
 イム ノイエンハイメル フェルト 28
 O
 Im Neuenheimer Feld
 280, 69120 Heidelbe
 rg, Germany

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 集合活性化タンパク質 (AAP) およびVP3から本質的になるパルボウイルス粒子を製造するためのAAPの使用

(57) 【要約】

本発明は、新規のパルボウイルスタンパク質「集合活性化タンパク質」(AAP)をコードする核酸、コードされるポリペプチド、前記ポリペプチドを産生する方法、AAP特異的抗体、前記ポリペプチドを調製するための前記核酸の使用、パルボウイルス粒子を調製するための前記核酸または前記ポリペプチドの使用、およびパルボウイルス構造タンパク質VP3のコード配列に加えて、配列断片Z/AAPをコードする核酸を細胞内に提供し、rep非依存性プロモーターの制御下でVP3および断片Zを発現させることによって、VP3から本質的になるパルボウイルス粒子を産生する方法に関する。さらに、本発明は、VP3から本質的になり、かつ/または前記方法によって入手可能なパルボウイルス粒子、ならびに(i)異種プロモーターならびに(ii)VP3コード配列および/または断片Zを含む発現カセットに関する。さらに、本発明は、前記パルボウイルス粒子または発現カセットを含む医用薬剤、特に、ワクチン、およびその使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:22からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするか、またはこれらのアミノ酸配列のいずれかの機能活性変種を含むポリペプチドをコードし、

いずれの機能タンパク質も発現することができず、特に、Rep40、Rep52、Rep68、Rep78、VP1、VP2、およびVP3を発現することができない、核酸であって、

機能活性変種が、

(i)SEQ ID NO:1～22のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも60%同一のアミノ酸配列を有する、および/または

(ii)6xSSC、5xデンハルト液、0.5%SDSの中で、40℃で2～12時間、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、およびSEQ ID NO:44からなる群より選択される核酸配列、もしくはSEQ ID NO:23～44の核酸配列のいずれかに相補的な核酸配列にハイブリダイズするcDNAによってコードされる、および/または

(iii)VP1、VP2、およびVP3をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)とインフレームにないORFを含み、VP3 ORFの378ヌクレオチドより多くを含む、パルボウイルスゲノムの一部によってコードされる、核酸。

【請求項 2】

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:5のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードすることを特徴とする、請求項1記載の核酸。

【請求項 3】

機能活性変種が、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:22のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%、および特に100%同一のアミノ酸配列を有する、請求項1または2記載の核酸。

【請求項 4】

機能活性変種が、6xSSC、5xデンハルト液、0.5%SDSの中で、45℃、より好ましくは50℃、より好ましくは55℃、より好ましくは60℃、特に65℃、および有利には68℃で、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、およびSEQ ID NO:44の核酸配列のいずれかに相補的な核酸配列にハイブリダイズするcDNAによってコードされる、請求項1～3のいずれか一項記載の核酸。

【請求項 5】

機能活性変種が、6xSSC、5xデンハルト液、0.5%SDSの中で、SEQ ID NO:23の核酸配列またはSEQ ID NO:23の核酸配列に相補的な核酸配列にハイブリダイズするcDNAによってコードされる、請求項1～4のいずれか一項記載の核酸。

【請求項 6】

VP3 ORFの378より多いヌクレオチド、好ましくは少なくとも400ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも425、および特に少なくとも445ヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項記載の核酸。

【請求項7】

VP3開始コドン5'側のすぐ上流に位置する、隣接VP2コードヌクレオチドの少なくとも44ヌクレオチド、好ましくは少なくとも20ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも5ヌクレオチドを含むことを特徴とするか、またはその開始コドンが、VP3開始コドンの下流4ヌクレオチドにある、好ましくは24ヌクレオチドにある、およびより好ましくは44ヌクレオチドにあるATGであることを特徴とする、請求項1～6のいずれか一項記載の核酸。

【請求項8】

VP3のキャプシド集合を促進するタンパク質を発現することができることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項記載の核酸。

【請求項9】

AAV2に由来し、かつその翻訳開始コドンが、C₂₇₂₉TG、A₂₇₃₅CG、A₂₇₁₇TT、またはT₂₇₂₀TGであることを特徴とするか、または別のパルボウイルスに由来し、かつその翻訳開始コドンが、AAV2の翻訳開始コドンと相同な部位にあることを特徴とする、請求項1～8のいずれか一項記載の核酸。

【請求項10】

オープンリーディングフレームの翻訳の改善を可能にするATG開始コドンを生じさせる変異を含む、好ましくは、AAV2の翻訳開始コドンの1つまたは他のパルボウイルスの相同な部位がATG開始コドンに変異している、請求項1～9のいずれか一項記載の核酸。

【請求項11】

核酸のポリペプチドコード配列の後にポリ(A)シグナルが続くことを特徴とする、請求項1～10のいずれか一項記載の核酸。

【請求項12】

ポリペプチドコード配列の転写を駆動するプロモーター、好ましくは、異種プロモーター、特に、誘導性異種プロモーターを含むことを特徴とする、請求項1～11のいずれか一項記載の核酸。

【請求項13】

アデノ随伴ウイルス(AAV)、ガチョウパルボウイルス、アヒルパルボウイルス、およびヘビパルボウイルスに由来することを特徴とする、請求項1～12のいずれか一項記載の核酸。

【請求項14】

AAVが、ウシAAV(b-AAV)、イヌAAV(CAAV)、マウスAAV1、ヤギAAV、ラットAAV、トリAAV(AAAV)、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびAAV13、特に、AAV2からなる群より選択されることを特徴とする、請求項13記載の核酸。

【請求項15】

発現カセット、構築物、ベクター、または細胞株の中に含まれる、請求項1～14のいずれか一項記載の核酸。

【請求項16】

請求項1～14のいずれか一項記載の核酸によってコードされるポリペプチド。

【請求項17】

集合活性化タンパク質(AAP)である、請求項16記載のポリペプチド。

【請求項18】

宿主細胞において、請求項1～14のいずれか一項記載の核酸を発現させる工程を含む、請求項16または17記載のポリペプチドを産生する方法。

【請求項19】

宿主細胞が、哺乳動物細胞株、特に、ヒト細胞株、バキュロウイルス感染に用いられる細胞株、細菌株、および酵母株からなるリストより選択されることを特徴とする、請求項

10

20

30

40

50

18記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項17記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 2 1】

AAV2のAAP(SEQ ID NO.1)に特異的に結合することを特徴とする、請求項20記載の抗体。

【請求項 2 2】

請求項16または17に記載のポリペプチドを調製するための、請求項1～14のいずれか一項記載の核酸の使用。

【請求項 2 3】

パルボウイルス粒子を調製するための、請求項1～14のいずれか一項記載の核酸または請求項16または17に記載のポリペプチドの使用。

10

【請求項 2 4】

機能タンパク質VP1、VP2、およびRep、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78をいずれも含まないパルボウイルス粒子を調製するための、請求項23記載の核酸またはポリペプチドの使用。

【請求項 2 5】

VP3から本質的になるパルボウイルス粒子を産生する方法であって、

i.rep非依存性プロモーターの制御下にある、パルボウイルスに由来するVP3コード配列(cds)からVP3を発現することができ、かつ請求項1～14のいずれか一項記載の核酸によってコードされるタンパク質を発現することができる細胞を提供する工程、

20

ii.VP3および請求項1～14のいずれか一項記載の核酸に由来するタンパク質の発現を促す条件で細胞をインキュベートし、それによって、パルボウイルス粒子を産生する工程、ならびに

iii. 任意で、細胞からパルボウイルス粒子を精製する工程

を含み、

細胞1個あたり少なくとも 10^5 個のウイルス粒子が形成され、かつ

VP1、VP2、およびRep、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78の機能タンパク質は発現されない、方法。

【請求項 2 6】

細胞1個あたり少なくとも 10^6 個、および好ましくは少なくとも 10^7 個のウイルス粒子が形成される、請求項25記載の方法。

30

【請求項 2 7】

機能タンパク質VP1、VP2、およびRep、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78のタンパク質発現が細胞において遮断されている、請求項25または26のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項1～14のいずれか一項記載の核酸がVP3 cdsに対してシスで提供される、請求項25～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 9】

請求項1～14のいずれか一項記載の核酸がVP3 cdsに対してトランスで提供される、請求項25～28のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 3 0】

パルボウイルス粒子が、Rep機能タンパク質、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78をいずれも含有しない、請求項25～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 1】

発現された構造タンパク質の最大で1/50、好ましくは最大で1/100、より好ましくは最大で1/250、最も好ましくは最大で1/500が請求項16記載のポリペプチドであり、特に、どの構造タンパク質も請求項16記載のポリペプチドでない、請求項25～30のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 2】

50

粒子の最大で1/100、好ましくは粒子の最大で1/1,000、より好ましくは粒子の最大で1/10,000がDNAを含有し、特に、どの粒子もDNAを含有しない、請求項25～31のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

VP3 cdsが1つまたは複数の変異を含む、請求項25～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

VP3 cdsの変異が、1つまたは複数の欠失、1つまたは複数の挿入、1つまたは複数の置換、およびその組み合わせからなる群より選択される変異である、請求項33記載の方法。

【請求項35】

VP3 cdsが1つまたは複数のサイレント変異を含む、請求項33または34のいずれかに記載の方法。

10

【請求項36】

VP3 cdsの1つまたは複数の変異が、VP3 VLPの表面上に位置する1つまたは複数の変異につながる、請求項33～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

VP3 cdsの1つまたは複数の変異が、VP3のN末端に位置する1つまたは複数の変異につながる、請求項33～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

VP3 cdsの1つまたは複数の変異が、I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-453、I-459、I-471、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713、およびI-716、好ましくはI-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587、特に、I-587からなる群より選択される1つまたは複数の位置への1つまたは複数の挿入につながる、請求項33～37のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項39】

I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587からなる群より選択される2つの位置に、好ましくはI-261とI-587との組み合わせ、I-261とI-453との組み合わせ、またはI-453とI-587との組み合わせに、2つの挿入がなされる、請求項38記載の方法。

【請求項40】

VP3の3つの位置で変異される、好ましくは、位置453における挿入と位置587における挿入との組み合わせおよびさらなる変異と組み合わせされる、請求項38記載の方法。

30

【請求項41】

VP3が、ウイルスに対して異種の少なくとも1つのエピトープを含む、請求項33～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

VP3タンパク質のエピトープがB細胞エピトープである、請求項41記載の方法。

【請求項43】

B細胞エピトープが、I-453および/またはI-587、特に、AAV1、AAV2、またはAAV4のI-453および/またはI-587に挿入される、請求項41または42のいずれかに記載の方法。

【請求項44】

VP3が融合タンパク質の中に含まれる、請求項25～43のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項45】

VP3が、リガンドとの結合に有用な少なくとも1つのタグを含む、請求項25～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項46】

VP3が少なくとも1つのさらなる変異を含む、請求項33～45のいずれか一項記載の方法。

【請求項47】

請求項25～46記載の方法から入手可能なパルボウイルス粒子。

【請求項48】

VP3から本質的になるパルボウイルス粒子であって、

i.VP3は、任意で1つまたは複数の変異を含み、かつ、

50

ii.VP3は、異種核局在化シグナルを含有せず、かつ

iii.粒子は、Rep機能タンパク質、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78をいずれも含有しない、

VP3から本質的になるパルボウイルス粒子。

【請求項 4 9】

キャプシドがVP3のみからなる、請求項47または48のいずれかに記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 5 0】

VP3の変異が請求項33～46のいずれか一項記載の変異である、請求項47～49のいずれか一項記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 5 1】

異種プロモーターおよび請求項25～46のいずれか一項記載のVP3 cdsを含む、VP3発現カセットAであって、VP3の転写は異種プロモーターによって駆動され、かつ該発現カセットは本質的にVP3のみを発現することができる、VP3発現カセットA。

【請求項 5 2】

異種プロモーター、請求項25～46のいずれか一項記載のVP3 cds、ならびに請求項1～14のいずれか一項記載の核酸を含む、組み合わせ発現カセットであって、VP3および請求項16～17のいずれかに記載のポリペプチドの発現は、この1つの異種プロモーターによって駆動される、組み合わせ発現カセット。

【請求項 5 3】

請求項51記載の少なくとも1つのVP3発現カセット、および請求項15記載の発現カセットに含まれる少なくとも1つの核酸を含む、キット。

【請求項 5 4】

請求項52記載の少なくとも1つの組み合わせ発現カセットおよびマニュアルを含む、キット。

【請求項 5 5】

医用薬剤として使用するための、請求項47～50のいずれか一項記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 5 6】

医用薬剤が1種類または複数の種類の賦形剤をさらに含む、請求項55記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 5 7】

医用薬剤がワクチンである、請求項55または56のいずれかに記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 5 8】

ワクチンが1種類または複数のアジュバントをさらに含む、請求項57記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 5 9】

自己免疫疾患、感染症、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、代謝病、(慢性)炎症性疾患、神経学的疾患、依存症の予防もしくは治療において使用するための、または眼科学において用いられる、請求項55～58のいずれか一項記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 6 0】

自己免疫疾患および/または慢性炎症性疾患が、慢性関節リウマチ、乾癬、およびクローン病からなる群より選択される、請求項59記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 6 1】

腫瘍疾患が、モノクローナル抗体を用いた治療に適している、請求項59記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 6 2】

アレルギー性疾患が、喘息、アレルギー、およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項59記載のパルボウイルス粒子。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

神経学的疾患がアルツハイマー病である、請求項59記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 6 4】

代謝病がアテローム性動脈硬化症である、請求項59記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 6 5】

眼科学的疾患が加齢黄斑変性である、請求項59記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 6 6】

B細胞寛容を破壊する方法において使用するための、請求項55～65のいずれか一項記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 6 7】

パルボウイルス変異構造タンパク質が遺伝子療法におけるベクターとして用いられない、請求項55～66のいずれか一項記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 6 8】

遺伝子療法のための、請求項55～56および59～66のいずれか一項記載のパルボウイルス粒子の使用。

【請求項 6 9】

VP3から本質的になるパルボウイルス粒子を産生する方法であって、

i. 細胞において、rep非依存性プロモーターの制御下にある、パルボウイルスに由来するVP3コード配列(cds)からVP3を発現させる工程、

ii. 細胞において、rep非依存性プロモーターの制御下にあるDNA配列断片(断片Z)を発現させる工程であって、断片Zは、

(1)VP3開始コドン上流にある少なくとも44ヌクレオチド、ならびに

(2)

a)パルボウイルス、または

b)AAV2に由来する断片Zのヌクレオチド配列と少なくとも60%、好ましくは80%、より好ましくは90%、特に99%、および有利には100%同一のヌクレオチド配列(図2)、または

c)4xSSC、0.1%SDSにおいて65℃で、AAV2の断片Z DNA分子の相補鎖にハイブリダイズする核酸配列、または

d)トランス相補アッセイにおいて使用して、VP3 VLPの集合を引き起こすことができる核酸配列

に由来する、開始コドンから開始して、VP3 cdsの242ヌクレオチドより多くを含む、工程、

iii.VP3発現に適した条件で細胞をインキュベートする工程、ならびに

iv. 細胞からパルボウイルス粒子を精製する工程

を含み、

細胞1個あたり約 10^5 個、好ましくは約 10^6 個、およびより好ましくは約 10^7 個のウイルス粒子が形成され、かつ

VP1、VP2、およびRep、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78タンパク質は本質的に発現されない、方法。

【請求項 7 0】

断片Zの配列がVP3 cdsと重複しないことから、VP3のみからなるパルボウイルス粒子が得られる、請求項69記載の方法。

【請求項 7 1】

VP1、VP2、およびRep、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78のタンパク質発現が遮断されている、請求項69または70のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 2】

断片ZのDNA配列の後にポリ(A)シグナルが続く、請求項69～71のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7 3】

断片Zが、VP3開始コドンの上流にある少なくとも44ヌクレオチド、好ましくは113ヌクレオチド、およびより好ましくは198ヌクレオチドを含む、請求項69～72のいずれか一項記載の方法。

【請求項74】

断片Zが、開始コドンから開始して、VP3 cdsの242ヌクレオチドより多く、好ましくは約275ヌクレオチドより多く、約300ヌクレオチドより多く、約325ヌクレオチドより多く、約350ヌクレオチドより多く、約375ヌクレオチドより多く、約400ヌクレオチドより多く、約425ヌクレオチドより多く、および最も好ましくは約445ヌクレオチドより多くを含む、請求項69～73のいずれか一項記載の方法。

【請求項75】

10

断片Zが少なくとも1つの変異を含む、請求項69～74のいずれか一項記載の方法。

【請求項76】

断片Zの変異が、タンパク質翻訳のための少なくとも1つの停止コドンを含む、請求項75記載の方法。

【請求項77】

断片ZがVP3 cdsに対してシスで提供される、請求項69～76のいずれか一項記載の方法。

【請求項78】

断片ZがVP3 cdsに対してトランスで提供される、請求項69～77のいずれか一項記載の方法。

【請求項79】

20

パルボウイルス粒子がRepタンパク質を含有しない、請求項69～78のいずれか一項記載の方法。

【請求項80】

発現された構造タンパク質の1/50のみ、好ましくは構造タンパク質の1/100、より好ましくは構造タンパク質の1/250、最も好ましくは構造タンパク質の1/500がVP3のN末端伸長バージョンであり、および特には、いずれの構造タンパク質もVP3のN末端伸長バージョンでない、請求項69～79のいずれか一項記載の方法。

【請求項81】

粒子の1/100のみ、好ましくは粒子の1/1000、より好ましくは粒子の1/10000のみがウイルスDNAを含有し、および特には、いずれの粒子も全くウイルスDNAを含有しない、請求項69～80のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項82】

パルボウイルスが、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ウシAAV(b-AAV)、イヌAAV(CAAV)、およびトリAAV(AAAV)からなる群より選択される、請求項69～81のいずれか一項記載の方法。

【請求項83】

AAVが、AAV-1、AAV-2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、およびAAV-12、特に、AAV-2からなる群より選択される、請求項82記載の方法。

【請求項84】

40

VP3 cdsが1つまたは複数の変異をさらに含む、請求項69～83のいずれか一項記載の方法。

【請求項85】

VP3 cdsの変異が、1つまたは複数の欠失、1つまたは複数の挿入、1つまたは複数の置換、およびこれらの変異の組み合わせからなる群より選択される変異である、請求項84記載の方法。

【請求項86】

VP3 cdsが1つまたは複数のサイレント変異を含む、請求項84または85のいずれかに記載の方法。

【請求項87】

VP3 cdsの1つまたは複数の変異が、VP3 VLPの表面上に位置する1つまたは複数の変異に

50

つながる、請求項84～86のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 8】

VP3 cdsの1つまたは複数の変異が、VP3のN末端に位置する1つまたは複数の変異につながる、請求項84～87のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 9】

VP3 cdsの1つまたは複数の変異が、I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-453、I-459、I-471、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713、およびI-716、好ましくは、I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587、特に、I-587からなる群より選択される1つまたは複数の位置への1つまたは複数の挿入につながる、請求項84～88のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 9 0】

I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587からなる群より選択される2つの位置に、好ましくは、I-261とI-587との組み合わせ、I-261とI-453との組み合わせ、またはI-453とI-587との組み合わせに、2つの挿入がなされる、請求項89記載の方法。

【請求項 9 1】

VP3が、ウイルスに対して異種の少なくとも1つのエピトープを含む、請求項84～90のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 2】

VP3タンパク質のエピトープがB細胞エピトープである、請求項91記載の方法。

【請求項 9 3】

B細胞エピトープが、I-453および/またはI-587、特に、AAV-1、AAV-2、またはAAV-4のI-453および/またはI-587に挿入される、請求項91または92のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 9 4】

VP3が第2のタンパク質またはペプチドと融合している、請求項85～93のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 5】

VP3が、リガンドとの結合に有用な少なくとも1つのタグを含む、請求項85～94のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 6】

VP3が少なくとも1つのさらなる変異を含む、請求項85～95のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 9 7】

請求項69～96記載の方法から入手可能なパルボウイルス粒子。

【請求項 9 8】

VP3から本質的になるパルボウイルス粒子であって、

i.VP3は、1つまたは複数の変異を含み、かつ

ii.VP3は、異種核局在化シグナル(NLS)を含有せず、かつ

iii.粒子は、Repタンパク質を含有しない、

VP3から本質的になるパルボウイルス粒子。

【請求項 9 9】

キャプシドがVP3のみからなる、請求項97または98記載のパルボウイルス粒子。

40

【請求項 1 0 0】

VP3の変異が、請求項85～96のいずれか一項記載の変異である、請求項97～99のいずれか一項記載のパルボウイルス粒子。

【請求項 1 0 1】

異種プロモーターならびに請求項69および84～96のいずれか一項記載のVP3 cdsを含む、発現カセットAであって、VP3の転写は異種プロモーターによって駆動され、かつ該発現カセットは本質的にVP3のみを発現し、特に好ましくはVP3しか発現しない、発現カセットA。

【請求項 1 0 2】

異種プロモーターならびに請求項69および73～76のいずれか一項記載の断片Zを含む、

50

発現カセットBであって、断片Zの転写は異種プロモーターによって駆動される、発現カセットB。

【請求項 1 0 3】

異種プロモーター、請求項69および84～96のいずれか一項記載のVP3 cds、ならびに請求項69および73～76のいずれか一項記載の断片Zを含む、発現カセットCであって、VP3および断片Zの発現は、この1つの異種プロモーターによって駆動される、発現カセットC。

【請求項 1 0 4】

請求項101記載の少なくとも1つの発現カセットAおよび請求項102記載の少なくとも1つの発現カセットBを含む、キット。

【請求項 1 0 5】

請求項103記載の少なくとも1つの発現カセットCを含む、キット。

【請求項 1 0 6】

請求項97～100のいずれか一項記載のバルボウイルス粒子を含む、医用薬剤。

【請求項 1 0 7】

1種類または複数の種類の賦形剤をさらに含む、請求項106記載の医用薬剤。

【請求項 1 0 8】

ワクチンである、請求項106または107のいずれかに記載の医用薬剤。

【請求項 1 0 9】

1種類または複数の種類のアジュバントをさらに含む、請求項108記載のワクチン。

【請求項 1 1 0】

自己免疫疾患、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、代謝病、炎症性疾患、神経学的疾患の予防もしくは治療のための、または眼科学において用いられる、請求項106～109のいずれか一項記載の医用薬剤。

【請求項 1 1 1】

免疫寛容を破壊するための、請求項106～110のいずれか一項記載の医用薬剤。

【請求項 1 1 2】

疾患が感染症でない、請求項106～111のいずれか一項記載の医用薬剤。

【請求項 1 1 3】

バルボウイルス変異構造タンパク質が遺伝子療法におけるベクターとして用いられない、請求項106～112のいずれか一項記載の医用薬剤。

【請求項 1 1 4】

好ましくは、自己免疫疾患および/もしくは慢性炎症性疾患、好ましくは、慢性関節リウマチおよび/もしくはクローン病、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、喘息、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、代謝病、炎症性疾患、神経学的疾患を予防もしくは治療するための、または眼科学において用いられる、ワクチンを製造するための、バルボウイルスにとって異種の少なくとも1つのB細胞エピトープを含む請求項97～100のいずれか一項記載のバルボウイルス粒子の使用であって、特に、医用薬剤が請求項106～113のいずれか一項に記載されている通りである、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規のバルボウイルスタンパク質「集合活性化タンパク質」(AAP)をコードする核酸、コードされるポリペプチド、前記ポリペプチドを産生する方法、AAP特異的抗体、前記ポリペプチドを調製するための核酸の使用、バルボウイルス粒子を調製するための前記核酸または前記ポリペプチドの使用、およびバルボウイルス構造タンパク質VP3のコード配列に加えて、配列断片Z/AAPをコードする核酸を細胞内に提供し、rep非依存性プロモーターの制御下でVP3および断片Zを発現させることによって、VP3から本質的になるバルボウイルス粒子を産生する方法に関する。さらに、本発明は、VP3から本質的になる、および/または前記方法によって入手可能なバルボウイルス粒子、ならびに(i)異種プロモーターならびに(ii)VP3コード配列および/または断片Zを含む発現カセットに関する。

10

20

30

40

50

さらに、本発明は、前記パルボウイルス粒子または発現カセットを含む医用薬剤、特に、ワクチン、およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

変異パルボウイルス構造タンパク質をベースとするウイルス様粒子(VLP)は適切なワクチン候補であることが示されている(参照により本明細書に組み入れられる、WO2008/145401(特許文献1))。このような変異パルボウイルス構造タンパク質に基づいて、寛容原、または低分子抗原、さらには個々のエピトープを提示するためのVLPを作製した。これらのVLPは、患者に対して治療効果があるようにB細胞寛容を壊さなければならない場合に、特に有益であると分かった。

10

【0003】

VLPに基づくワクチンの臨床開発のためには、理想的には1種類の活性化化合物/タンパク質をベースとし、かつ可能な限り純粋な製品を作製することが一般的に必要である。VLPに関して、一般的に、ウイルスは複数の種類のタンパク質からなることが多く、かつウイルスDNAを特異的にパッケージングすることができるか、または宿主細胞由来DNAを非特異的にパッケージングすることができるので、このことは難題である。従って、可能な限り種類の少ないタンパク質を含有する、好ましくは核酸を含有しない「純粋な」VLPを得ることが望ましい。この文献では、このような粒子を効率的に産生するために、いくつかの試みがなされている。

【0004】

20

Rabinowitzら(例えば、Rabinowitz et al., 1999(非特許文献1))は、ビリオンの集合および感染性の重要な成分を明らかにするためにリンカー挿入変異誘発によってAAV2の構造遺伝子を変化させた。Rabinowitzらは、repおよびcap ORFならびに位置2634にあるHaeIII制限部位に挿入を含有する変異体H2634を作製した。重要なことには、rep ORFが存在するために、この挿入変異体はそれぞれのRepタンパク質を発現した。この変異体は無傷のビリオンを組み立て、キャプシドはVP3のみからなるように見えた。著者らによれば、細胞溶解産物または精製ビリオンにおけるVP1およびVP2の検出不可能な発現は検出限界の問題であった可能性がある。

【0005】

Warrington et al.(2004)(非特許文献2)およびWO2004/027019(特許文献2)もまた、重要な構造ドメインを破壊することなく、完全長ペプチドをAAVキャプシドORFのどの場所に挿入できるかを明らかにするために、キャプシド形成において個々のキャプシドタンパク質が具体的にどのような役割を果たすかという問題に取り組んだ。repおよびcap ORFと、VP1、VP2、および/またはVP3の開始コドンに変異を含有する構築物を作製し、従って、Repの存在下で1種類または2種類のためのキャプシドタンパク質を発現させることによって、Warrington et al.は、VP3タンパク質が存在する場合に限ってゲノム含有粒子が形成されたことを示した。従って、VP1および/またはVP2を単一のキャプシドタンパク質として、または一緒に発現する変異体は粒子を形成しなかった。もっと正確に言うと、彼らは、これらの結果から、VP1はウイルス感染に必要であるが、キャプシド集合および粒子形成には必須でないのに対して、VP2はウイルス感染性に必須でないように見えると結論付けた。さらに、彼らは、VLPを形成するには、VP1およびVP2の変異開始コドンを有する構築物からVP3だけを発現させることで十分であると述べた。

30

40

【0006】

同様に、Grieger et al.(2007)(非特許文献3)は、AAV2ヘルパープラスミドpXR2(repおよびcap遺伝子を含有する。Li et al.(2008)(非特許文献4))を用いて、VP1開始コドンおよびVP2開始コドンの変異誘発を介してVP3のみの粒子を作製した。Repの存在下でVP3のみの構築物ならびにVP2/VP3のみの構築物を発現させると、構築物にVP1サブユニットが無い場合に限り非感染性のウイルス粒子が得られた。

【0007】

Repの存在下でVP3を唯一のキャプシドタンパク質として発現する変異体からのゲノム含

50

有AAV様粒子の形成に関する結果から、これらの粒子は容易に得ることができるように見えた。

【0008】

前記の発現構築物は全て、好ましくは1種類のタンパク質からなり、DNAからならないVLPを組み立てるために取り除かなければならないRepタンパク質を発現した。Repは、VLPに取り付けられる余分なタンパク質であるだけでなく、前もって形成されたキャプシドへのウイルスゲノムおよび非特異的DNAのパッケージングを担っている(King et al., 2001(非特許文献5))。VLPが患者の細胞に進入し、それによって、このような汚染DNAを移入することで、あらゆる種類の望ましくない作用が引き起こされる可能性があるので、DNAのパッケージングは避けなければならない。

10

【0009】

確実にVP3だけが発現するように、Hoque et al.(1999a(非特許文献6), 1999b(非特許文献7))およびHanda et al.(JP2001169777)(特許文献3)は、Rep cdsの非存在下で、異種プロモーターの制御下においてVP3のコード配列(cds)のみを含む発現構築物を作製した。驚いたことに、彼らは、これらの発現構築物からウイルス粒子を産生することができなかった。VP3開始コドンの5'側にある様々な部位において発現を開始する一連のVP2欠失変異体を分析することによって、彼らはVP3の核移行に必要な領域を特定し、キャプシドタンパク質の核局在の効率およびVLP形成の効率が良好な相関関係にあることを発見した。彼らは、VP2 cdsにあるアミノ酸29~34の領域、言い換えるとVP3の5'伸長が存在する場合に限ってウイルス粒子が形成されると述べた。この領域のアミノ酸モチーフPARKRLから、彼らは、これが、VP3が核に移行するのに重要な核局在化シグナル(NLS)として機能すると結論付けた。

20

【0010】

または、キャプシドはまた、シミアンウイルス40(SV40)ラージT抗原のNLSがVP3タンパク質のN末端と融合した場合(NLS_{SV40}-VP3)にも得ることができた。この融合タンパク質はVLPを形成することができた。このことから、このタンパク質のN末端側に位置するVP2特異的領域は構造的に必要とされないことが分かった。この知見のため、著者らは、VP3にはVLP形成のための十分な情報があり、VP2はキャプシドタンパク質の核移行にのみ必要であり、これもまたVLP形成に必要な条件であると考えた。

【0011】

30

彼らが使用した変異体構築の方法のために、全ての構築物は、コード配列のすぐ5'末端側にあるATG開始コドンから開始した。一般的に、「位置効果」(Kozak, 2002(非特許文献8))により、転写物の最初の(最も上流にある)ATG開始コドンが翻訳を開始するので、発現し、粒子を生じる主なタンパク質はN末端伸長VP3であろう。VP3のさらに下流にあるATG開始コドンからは翻訳のごく一部しか開始しないであろう。

【0012】

Hoque et al.(前記)およびHanda et al.(前記)に従い、彼らが述べた構築物を用いても、本発明者らは、構成的プロモーターの制御下においてVP3 cdsのみを含む発現構築物からVP3のみからなるVLPを、AAV2力価測定ELISAを用いて(製造業者Progen, Heidelberg, Germanyの説明書に従って定量した。図15B)、哺乳動物細胞においても昆虫細胞においても定量可能な量で($<10^{10}$ 、特に、 $<10^8$ キャプシド/mlが存在することを意味する)検出することができなかった。本発明者らは、構成的プロモーターの制御下にあるATGコドンから開始して、VP1 cdsのみを含む発現構築物からVP1のみを発現するAAV様粒子を検出することができず、VP2 cdsのみを含む発現構築物からVP2のみを発現するAAV様粒子を検出することができなかった。全ての構築物のみのキャプシド産生の効率、またはRep発現の存在下もしくは非存在下と、アデノウイルスヘルパー遺伝子の同時送達の下もしくは非存在下での様々な比を様々な組み合わせたキャプシド産生の効率は、AAV2力価測定ELISAの検出下限値($<10^8$ キャプシド/ml、前記を参照されたい)であった。

40

【0013】

本発明者らは、VP3開始コドンの5'側にある、ある配列とVP3をコードする配列を含む発

50

現構築物からVLPを作製できると確かめることができたが、Hoque et al.の結果とは対照的に、本発明者らは、NLS_{SV40}-VP3融合構築物を用いて、検出可能な量で(\geq 約 10^8 キャプシド/ml。実施例8を参照されたい)、キャプシド集合を定量することができなかった。従って、Hoque et al.の方法は、市販用のワクチン接種に適した多量の純粋なVLPを作製するに適していない。

【0014】

まとめると、先行技術の技法では、必然的にRepおよびDNAのパッケージングにつながるRepの存在下で発現系を用いるか、またはRepの非存在下では、VP3 VLPの収量は、商業的に実現可能なプロセスまたは製品を作るには低すぎる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】WO2008/145401

【特許文献2】WO2004/027019

【特許文献3】Handa et al.(JP2001169777)

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Rabinowitz et al., 1999

【非特許文献2】Warrington et al.(2004)

【非特許文献3】Grieger et al.(2007)

【非特許文献4】Li et al.(2008)

【非特許文献5】King et al., 2001

【非特許文献6】Hoque et al.(1999a)

【非特許文献7】Hoque et al.(1999b)

【非特許文献8】Kozak, 2002

【発明の概要】

【0017】

従って、本発明の目的は、前記の欠点の1つまたは複数を避けながら、VLPをベースとするワクチンとして有用な粒子、およびこの粒子を産生する方法を提供することにあった。特に、VLPは、本質的に1種類のためのウイルスタンパク質からなり、DNAを全く含有しないか、もしくはごく微量のDNAしか含有せず、および/または経済的に、例えば、高収量で産生できることが望ましい。

【0018】

この問題は、VP3から本質的になり、本質的に、VP1、VP2、およびRepタンパク質を含まないパルボウイルス粒子を提供することによって解決される。このような粒子は、細胞において、rep非依存性プロモーターの制御下で、パルボウイルス構造タンパク質VP3のVP3コード配列(cds)(VP3 cds)からVP3を発現させることによって産生することができる。さらに、この方法においては、「集合活性化タンパク質」(AAP)と命名された新たに特定されたポリペプチドを(部分的に)コードするDNA配列断片(断片Z)が発現される。断片Zは高収量を可能にし、例えば、細胞1個あたり、約 10^5 個、好ましくは約 10^6 個、より好ましくは約 10^7 個のウイルス粒子が形成される。VP2タンパク質の中の配列モチーフ、例えば、仮定された「PARKRL」モチーフまたはVP3の異種核局在化配列が、仮定されたように必要とされないで(Hoque et al., 1999a, 1999b)、この新規タンパク質の特定は、一般的に、パルボウイルスキャプシドの集合、特に、VP3キャプシドの集合に関して全く新しい概念である。

【0019】

最先端技術とは対照的に、これらのVLPは異種NLSもVP2タンパク質も含有しない。VP3にある好ましい部位の1つまたはいくつかにエピトープを挿入すると、ワクチン開発用のエピトープを提示する粒子を首尾よく組み立てることができた。この方法を用いると、粗溶解産物1ml当たり、 10^{11} 個、好ましくは約 10^{12} 個、より好ましくは約 10^{13} 個のウイルス粒

10

20

30

40

50

子が形成される。従って、この収量は、商業的に実現可能な製品に十分である。

【0020】

驚いたことに、かつポリペプチドをコードする機能と合致して、本質的にVP3からなるキャプシドを組み立てるために、配列断片Zをシスまたはトランスで提供することができる。さらに、断片ZおよびVP3は、パルボウイルス科の同じ種または異なる種に由来してもよく、VP3粒子集合に関して互いを相互にトランス相補する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】 AAVキャプシド遺伝子の構成図を示す。最初のラインにcap遺伝子のコードDNAを示し、次のラインにCapタンパク質VP1、VP2、およびVP3を示した。ヌクレオチド番号は、NCBI(エントリー番号:NC_001401)から入手可能な、Ruffing et al.(1994)に示されたAAV-2のゲノム配列に対応する。アミノ酸(AA)配列の番号はAAV2のVP1(Girod et al. 1999)に従う。EcoNIおよびBsiWI制限部位に印を付けた。正確な縮尺ではない。

10

【図2】 様々なAAVの断片Zのヌクレオチド配列を示す。パルボウイルスAAV1(NC_002077)、AAV2(AF043303)、AAV3b(AF028705)、AAV4(U89790)、AAV5(NC_006152)、AAV6(AF028704)、AAV7(AF513851)、AAV8(AF513852)、AAV10(AY631965)、AAV11(AY631966)、およびb-AAV(NC_005889)の断片Zのヌクレオチド配列を示した(NCBIによるヌクレオチドエントリーの番号を括弧内に示した)。+1は、VP3のATG開始コドンにコードする最初のヌクレオチドの位置を示す。+1位置の上流にある44ヌクレオチドおよび下流にある242ヌクレオチドを示した。VP3のATG開始コドンに下線を引いた。

20

【図3】 VP3粒子の集合に適した様々な発現構築物の模式図を示す。示したように、断片Z配列およびVP3 cdsの構成の点で異なる6つの可能性のある発現構築物を異なる囲みで示した。丸で示したように、シス状況では、発現構築物は同じ1つのプロモーター下で発現するのに対して、トランスでは、2種類の別々のプロモーターが発現を動かす。+1は、VP3のATG開始コドンにコードする最初のヌクレオチドの位置を示す。+1位置の上流にある少なくとも44ヌクレオチドおよび下流にある242ヌクレオチドより多くを含む断片ZのDNAを囲みで示した(図2と比較のこと)。+1602は、VP3 cdsの3'末端にあるTAA停止コドンの最後のヌクレオチドの番号を示す(図1に略図を書いた)。任意の数のヌクレオチドによってVP3 cdsおよび断片Zを分けることができ、任意の数のヌクレオチドには//の印を付けた。正確な縮尺ではない。

30

【図4】 rep遺伝子およびcap遺伝子の構成図、ならびに発現構築物のクローニングに使用した様々な制限部位の位置を示す。パルボウイルスゲノムにおけるrep遺伝子およびcap遺伝子の模式図を示す。様々な発現構築物のクローニングに使用した制限部位R1~R5の位置、ならびに3種類のキャプシドタンパク質の翻訳開始コドンの位置に印を付けた。正確な縮尺ではない。

【図5】 様々なVPタンパク質発現構築物を用いたキャプシド集合の比較を示す。A) VPタンパク質発現の分析およびキャプシド集合の研究に使用したcap遺伝子発現構築物の模式図を示す。プラスミドpCMV-VP3/1882~pCMV-VP3/2809はプラスミドpVP3から得た。番号は、Ruffing et al., 1994(前記)によるAAV2ゲノムにおけるヌクレオチド位置を示す。矢印はVPタンパク質の翻訳開始部位を示し、変異翻訳開始部位には×印を付けた。これらの発現構築物から発現したタンパク質がキャプシドを集合させる能力を右の縦列に示した(Cの定量に対応する。++は、キャプシドのピーク力価に対応する。-は、キャプシドが検出できなかったことを意味する。+は、キャプシド集合が検出可能であることを意味する)。B) 3種類全てのキャプシドタンパク質を検出する抗体B1、またはVP1およびVP2のみを検出する抗体A69を用いて、発現したVPタンパク質のウェスタンブロット分析を行った。各レーンでは、異なる発現構築物が分離され、名前はAと一致する。3種類のキャプシドタンパク質の位置に印を付けた。C) モノクローナル抗体A20に基づくELISAによって、キャプシド形成を定量した。少なくとも3回の独立した実験の平均+/-標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった構築物を示す。

40

【図6】 VP2N-gfpによるVP3キャプシド集合の相補を示す。A) 示されたような、融合構築

50

物pVP2N-gfpならびにその転写物VP2N-gfp、VP3N-gfp、およびGFPの模式図。B)示されたような、pVP3/2809(1)および漸減量のpVP2N-gfp(1、1/5、1/50、1/500、delは0を意味する)のコトランスフェクション後のHeLa細胞における、VP3(B1抗体)、VP3N-gfp融合タンパク質(抗gfp抗体)、およびVP2N-gfp(A69抗体)発現のウエスタンブロット検出。C)印を付け、Bに示したように、様々な比のpVP3/2809およびpVP2N-gfpによってコトランスフェクトされたHeLa細胞における、抗体A20を用いた間接免疫蛍光によるキャプシド形成の検出。D)A20をベースとするキャプシドELISAを用いた、様々な比のpVP3/2809およびpVP2N-gfpによってコトランスフェクトされたHeLa細胞におけるキャプシド形成の定量。これも、様々なプラスミド比の印を付け、この比はBおよびCに示した比に対応する。各実験について、少なくとも2回の独立した実験のキャプシド平均濃度 \pm 標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

10

【図7】シス状況におけるVP3粒子内への切断型VP2の準化学量論的組み込みを示す。精製されたwt AAV、およびpVP3/2696またはpVP2N-gfpとトランス相補されたpVP3/2809に由来するキャプシドのウエスタンブロット分析。抗体A69を用いて、VP1およびVP2が検出された。様々なシグナルの比の定性評価のために、示されたように様々な量のキャプシドをゲルにロードした(VP2tru=切断型VP2)。

【図8】別のコドン使用頻度を有するヘルパープラスミドpVP2Ncm-gfpの特徴付けを示す。A)構築物pVP2N-gfp(図6Aに詳述)のwt(VP2N、SEQ ID NO:145)DNA配列と、pVP2Ncm-gfpのコドンが改変されたVP2N(VP2Ncm、SEQ ID NO:146)DNA配列のアラインメントを示す。B)示されたプラスミドのトランスフェクション後の、モノクローナル抗体A69を用いた293-T細胞抽出物のウエスタンブロットを示す。C)pVP2N-gfpによってトランスフェクトされたHeLa細胞の蛍光画像:左上パネルおよび左下パネルは総GFP蛍光を示す。右上パネルおよび右下パネルは、A69抗体およびそれぞれの二次Cy3標識ヤギ抗マウス抗体によって視覚化された、VP2N-gfpの中のVP2部分の間接免疫蛍光を示す。D)A20をベースとするキャプシドELISAを用いた、pCMV-VP3/2809および示されたプラスミドによってコトランスフェクトされた293-T細胞におけるキャプシド形成の定量を示す。少なくとも3回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

20

【図9】トランス相補構築物内での停止コドン変異誘発を示す。A)VP2N読み枠の中の4種類の位置に翻訳停止コドンを有するpVP2N-gfp構築物の模式図。置換ヌクレオチドの番号は、AAV2ゲノムのヌクレオチド位置を指している。pVP2N/stopAにおいては、ヌクレオチド2770から始まり、グルタミンをコードするcagコドンをtagに変異させ、pVP2N/stopBにおいては、ヌクレオチド2797から始まり、グリシンをコードするggaコドンをtgaに変異させ、pVP2N/stopCにおいては、ヌクレオチド2821から始まり、セリンをコードするagtコドンをtgaに変異させ、pVP2N/stopDにおいては、ヌクレオチド2878から始まり、グリシンをコードするggaコドンをtgaに変異させた。B)pCMV-VP3/2809および示されたプラスミドのコトランスフェクション後の、モノクローナル抗体B1およびA69を用いた293-T細胞抽出物のウエスタンブロット。C)pCMV-VP3/2809および示されたプラスミドによってコトランスフェクトされた293-T細胞における、A20をベースとするキャプシドELISAを用いたキャプシド形成の定量。少なくとも3回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

30

40

【図10】異なるcap遺伝子変異体の発現によって得られたキャプシドタンパク質およびキャプシドの細胞局在を示す。総キャプシドタンパク質(VP)を検出するポリクローナルウサギ抗血清および集合したキャプシドを検出するモノクローナル抗体A20を用いた二重免疫蛍光によって、HeLa細胞において異なる構築物から発現したキャプシドタンパク質の局在を視覚化した。トランスフェクトされたプラスミドを左余白に示した。トランスフェクトされたHeLa細胞をA20抗体によって免疫蛍光染色すると、変異体pCMV-VP3/2696RKR168-170AAAのVPタンパク質のキャプシド集合の効率はwt AAVと同程度であることが分かった。構築物pCMV-VP3/2696RKR168-170AAAについては、RKRペプチド(AA168-170)を変換することによって、想定されたNLSを変異させた。

【図11】NLSまたはヒト血清アルブミンのN末端伸長によって改変されたVP3のキャプシ

50

ド集合を示す。A) キャプシド集合の分析に使用したNLS-VP3およびHSA-VP3の模式図。B) 前記で示されたプラスミドによってトランスフェクトされたHeLa細胞の間接二重免疫蛍光。ポリクローナルVP抗血清(VP)を用いて、発現した総キャプシドタンパク質の場所を突き止めた画像(上横列)、および抗体A20を用いて、集合したキャプシドを検出した画像(下横列)。VP2N-egfpはpVP2N-gfpの同義語である。C) スクロース勾配によって分離したCOS-1細胞抽出物から得られた画分のイムノドットプロット分析。左余白に示したプラスミドのトランスフェクションの48時間後に、細胞を収集した。集合したキャプシドを検出するために、A20抗体との反応は非変性条件下で行ったのに対して、単一のキャプシドタンパク質を検出するために、B1抗体との反応はキャプシド変性後に行ったことに留意されたい。ウイルスキャプシドの沈降定数を示した(60S)。

10

【図12】 昆虫細胞におけるVP3粒子産生を示す。A) 昆虫細胞におけるAAV産生に使用した構築物の模式図を示す。B) 発現したVPタンパク質のウエスタンブロット分析は、3種類全てのキャプシドタンパク質を検出するポリクローナルウサギ血清である抗体SA7885(1:10000希釈)およびその後の二次抗体抗ウサギIgG-HRP 1:2500(Dianova, Hamburg, Germany)を用いて行った。C) キャプシド形成は、モノクローナル抗体A20をベースとするELISAによって定量した。2回(VP2構築物)または4回(VP3およびVP1_Mod4)の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を示した。

【図13】 様々なAAV1構築物のウエスタンブロット分析を示す。様々なAAV1構築物:pCI_VP2/2539_AAV1、pCI_VP3/2539_AAV1mutACG、pCI_VP3/2634_AAV1mutACG、およびpUCAV1によってトランスフェクトされた293細胞の粗溶解産物中にある発現したVPタンパク質のウエスタンブロット分析を示す。VPタンパク質の検出は、B1抗体(希釈:1:250)(Progen Heidelberg, Germany)およびその後の二次抗体抗マウスIgG-HRP1:2500(Dianova, Hamburg, Germany)を用いて行った。AAV1キャプシドELISA(Progen Heidelberg, Germany)によるAAV1力価測定に従って、構築物1つあたり 2×10^{10} 個の粒子をロードした。ウエスタンブロットは、構築物pUCAV1が、3種類のキャプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3を発現するのに対して(レーン5)、pCI_VP2/2539_AAV1はVP2およびVP3を発現し(レーン2)、pCI_VP3/2539_AAV1mutACGおよびpCI_VP3/2634_AAV1mutACGによってトランスフェクトされた細胞の溶解産物の中には、VP3しか検出できなかったことを示している(レーン3および4)。

20

【図14】 AAV2のpVP2N-gfpによるAAV1 VP2構築物のトランス相補を示す。pVP2N-gfpのコトランスフェクションと共に、またはpVP2N-gfpのコトランスフェクション無しで、AAV2 pCMV-VP3/2809またはAAV1 pCMV-AAV1VP3/2828のVP3発現構築物によってトランスフェクトされた細胞抽出物(図の中には、それぞれ、AAV2またはAAV1と示した)のウエスタンブロット分析を示す。AAV1およびAAV2のVP3は、AAV1とAAV2との間で完全に保存されているエピトープを認識する抗体B1(Progen, Heidelberg, Germany)によって検出した。VP2N-gfpタンパク質は、抗体A69(Progen, Heidelberg, Germany)によって検出した。

30

【図15】 様々なpCMV-VP発現ベクターを用いた粒子産生効率の比較を示す。A) 構築物の模式図を示す。pCI-VP、pCI-VP2、およびpCI-VP3は、XhoI(5'-)およびNotI(3'-)オーバーハングのあるプライマーを用いて、それぞれのVPコード領域をPCR増幅し、XhoI/NotIで消化されたPCR産物をXhoI/NotIで消化されたベクターpCI(PROMEGA)にサブクローニングすることによってクローニングした。pCI-VP2の場合、同時にVP2の開始コドンをACGからATGに変えた。構築物pCI-VP2mutACG、pCMV-NLS-VP3、およびpCMV-VP3/2696のクローニングについては、他を参照されたい。B) トランスフェクションのために、 5.0×10^5 個の293-T細胞を、総体積3mlの培地(10% FCSおよびABAMを含有するDMEM)が入っている6ウェル細胞培養プレートの各ウェルに播種した。細胞を37℃および5% CO₂、加湿雰囲気中で24時間、培養した。その後、US2004/0053410に開示されたように、リン酸カルシウムトランスフェクションプロトコルを用いて、細胞をトランスフェクトした。簡単に述べると、293-T細胞を含むウェル1個のトランスフェクションの場合、示されたプラスミド(それぞれ、pCI-VP、pCI-VP2、pCI-VP3、1:10モル比のpCI-VP2およびpCI-VP3、pCMV-NLS-VP3、pCI-VP2mutACG、ならびにpCMV-VP3/2696)6 μ gを、270mM CaCl₂ 150 μ lに溶解して混合した。2xPBS(50mM BES(pH6.95)、280mM NaCl、および1.5mM Na₂HPO₄)150 μ lを混合物に添加し、結果とし

40

50

て生じた溶液をピペッティングによって注意深く混合した。溶液を室温で20分間インキュベートし、次いで、細胞に滴下した。細胞を、35℃、3%CO₂、加湿雰囲気中で18時間インキュベートした。35℃および3%CO₂で、18時間後に、細胞を、37℃、5%CO₂、加湿雰囲気中で、さらに3日間培養した。その後、293-T細胞を培地に入れて、3回の凍結(-80℃)および融解(37℃)サイクルによって溶解した。溶解産物(3ml総体積)を遠心分離によって清澄化し、VLPキャプシド力価を、市販のELISA(AAV力価測定ELISA, Progen)を用いて求めた。構築物1つあたり4~6回の独立したトランスフェクションの平均値を、それぞれのエラーバーと共に示した。注目すべきことに、構築物pCMC-NLS-VP3を用いた粒子産生効力は、検出限界(約1E+09/ml)より低く、従って、本発明に記載の最も良いVP3粒子産生ベクター(pCI-VP2mutACGおよびpCMV-VP3/2696)と比較して少なくとも3~4 log少なかった。C)トランスフェクションのために、5.0E+05個の293-T細胞を、総体積3mlの培地(10%FCSおよびABAMを含有するDMEM)が入っている6ウェル細胞培養プレートの各ウェルに播種した。細胞を、37℃および5%CO₂、加湿雰囲気中で24時間培養した。その後US2004/0053410に開示されたようにリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコルを用いて、細胞をトランスフェクトした。簡単に述べると、293-T細胞を含む1ウェルのトランスフェクションの場合、示されたプラスミド(それぞれpCI-VP、pCI-VP2、pCI-VP3、1:10モル比のpCI-VP2およびpCI-VP3、pCMV-NLS-VP3、pCI-VP2mutACG、ならびにpCMV-VP3/2696)6μgを、270mM CaCl₂ 150μlに入れて混合した。2xBBS(50mM BES(pH6.95)、280mM NaCl、および1.5mM Na₂HPO₄)150μlを混合物に添加し、結果として生じた溶液をピペッティングによって注意深く混合した。溶液を室温で20分間インキュベートし、次いで、細胞に滴下した。細胞を35℃、3%CO₂、加湿雰囲気中で18時間インキュベートした。35℃および3%CO₂で、18時間後に、細胞を37℃、5%CO₂、加湿雰囲気中でさらに3日間培養した。その後、293-T細胞の上清を除去し、細胞をPBSでリンスし、最後に、RIPA緩衝液(25mM Tris.Cl pH7.4、150mM NaCl、1% IGEPAL、1% Na.DOC、0.1% SDS)300μlによって溶解した。100μlの3xGeba試料緩衝液(Gene Bio-Application Ltd)および25mM DTTを添加し、試料を95℃で10分間加熱した。試料を遠心分離し、清澄化した上清30μlをSDS page(10% GeBa gels, Gene Bio-Application Ltd)に供した。タンパク質をニトロセルロース膜(1h、230mA)に転写し、その後、ニトロセルロース膜をRTで1時間ブロックした。抗体B1(Progen)を使用し、ブロッキング緩衝液(1:500希釈)中で4℃で一晩インキュベーションし、その後洗浄し、二次抗体(抗マウスIgG-HRP;ブロッキング緩衝液で1:2500)とインキュベーションすることによって、VPタンパク質を検出した。最後に、膜を再度リンスし、スーパーシグナルピコウエスト基質(super signal pico west substrate)(Pierce)とRTで5分間インキュベートした。予想どおりに、様々なVP発現ベクターからAAVキャプシドタンパク質が発現した。

【図16】 AAVキャプシド遺伝子の構成図を示す。ORF2およびコードされるタンパク質AAPの位置を、Capタンパク質VP1、VP2、およびVP3の翻訳開始コドンならびにEcoNIおよびBsiWI制限部位(図1にさらに詳細に示し、説明した)の位置を基準にして示した。矢印は翻訳開始部位を示し、VP1、VP2、およびVP3がcap遺伝子の同じ1つの読み枠(本明細書において第1のORF、ORF1と呼ぶ)から翻訳されるのに対して、AAPが異なる読み枠(ORF2)から翻訳されることを示している。VP1、VP2、およびVP3について、翻訳開始部位の詳細に明らかにされた番号を示した。

【図17】 AAV2のORF2ヌクレオチド配列およびAAPタンパク質配列を示す。位置2717~3343(tga停止コドンを含む)のAAV2 ORF2ヌクレオチド配列(NCBIエントリー番号NC_001401)、ならびにORF2の最初のヌクレオチドからORF2が翻訳された時に得られる、それぞれのAAPタンパク質配列を示した。2809はVP3のATG開始コドンのヌクレオチド位置を示し、これに下線を引き、太字で示した。L(ロイシン)をコードする予測されたAAP翻訳開始コドンであるCTGにも下線を引き、太字で印を付けた。

【図18】 ORF1cmおよびORF2cmの配列を示す。A)コドンが改変されたEcoNI-BsiWI制限断片ORF1cmのDNA配列を示す。B)コドンが改変されたEcoNI-BsiWI制限断片ORF2cmのDNA配列を示す。VP2およびVP3の翻訳開始コドンに下線を引いた。ORF2の開始に印()を付け、ORF2cmにおいて損なわれていない予測された非標準AAP翻訳開始コドンCTGの位置を枠で強調

した。ORF1cmにおいては、AAP翻訳開始コドンにCCGに変異させた。

【図 19】pVP2N-gfpによる、VP3発現プラスミドのトランス相補を示す。A) AAV2ゲノムから得られたEcoNI-BsiWI断片およびgfpカセットを含有する、構築物pVP2N-gfpの模式図を示す。B) プラスミドpCMV-VP3/2809のVP3発現を補うために、pVP2N-gfpと等モル比から開始して漸減量のpCMV-VP3/2809を、293-T細胞にコトランスフェクトした。比較のために、空のベクターpBS(市販のBluescriptベクター)またはプラスミドpCMV-VP3/2696をトランスフェクトした。試料は、VP3の検出にはモノクローナル抗体B1およびVP2N-gfpおよびVP2tru(切断型VP2)の検出にはA69を用いたウエスタンブロットによって分析した。C) キャプシド形成は、モノクローナル抗体A20をベースとするELISAによって定量した。少なくとも3回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

10

【図 20】pVP2N/ORF1cmおよびpVP2N/ORF2cmによる、VP3発現プラスミドのトランス相補を示す。トランス相補のために構築物pVP2N/ORF1cmおよびpVP2N/ORF2cmを使用した以外は、図19に記載した同じ実験構成。コドンが改変されたDNA配列(詳細な配列を図18に示した)を、A)に陰付きの囲みとして示した。

【図 21】pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1、およびpORF2/TTG-AU1による、VP3発現プラスミドのトランス相補を示す。トランス相補のために構築物pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1、およびpORF2/TTG-Aを使用した以外は、図19に記載した同じ実験構成。これらは、AU1タグをコードする配列と融合したcap遺伝子のORF2全体(図17に示した)を含む。予測されたAAP翻訳開始コドン(CTG)をATGおよびTTGにさらに変異させた。AAP-AU1の検出にはモノクローナル抗体抗AU1、またはAAP-AU1もしくはC末端切断型AAP(AAPtru)の検出にはポリクローナル抗AAP血清。

20

【図 22】pVP2N/ORF2stopA、pVP2N/ORF2stopB、およびpVP2N/ORF2stopCによる、VP3発現プラスミドのトランス相補を示す。cap遺伝子断片のORF2に停止コドンを有するpVP2N-gfpの誘導体とVP3発現プラスミドpCMV-VP3/2809を、293-T細胞にコトランスフェクトした。A) 構築物pVP2N/ORF2stopA、pVP2N/ORF2stopB、およびpVP2N/ORF2stopCの模式図を示す。それぞれ、cap遺伝子断片のORF2の示された位置に停止コドンを含有する。pVP2N/ORF2stopAにおいては、ヌクレオチド2810から開始するtggコドンをtagに変異させ、pVP2N/ORF2stopBにおいては、ヌクレオチド2831から開始するcaaコドンをtaaに変異させ、pVP2N/ORF2stopCにおいては、ヌクレオチド2879から開始するgaaコドンをtgaに変異させた。変異は全てORF1を破壊しない。B) 試料は、VP3検出にはモノクローナル抗体B1およびVP2N-gfp検出にはA69を用いたウエスタンブロットによって分析した。C) キャプシド形成を、モノクローナル抗体A20をベースとするELISAによって定量した。少なくとも3回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

30

【図 23】様々な構築物を用いた、AAP発現が欠損している完全長AAV2ゲノムのトランス相補を示す。A) 野生型AAV2ゲノムを有するプラスミドpTAV2.0、およびcap遺伝子のORF1コドン改変EcoNI/BsiWI断片(陰付きの囲み)を含有するプラスミドpTAV/ORF1cmの模式図を示す。B) プラスミドと示された構築物を293-T細胞にコトランスフェクトした。VPタンパク質発現のウエスタンブロット分析は、モノクローナル抗体B1を用いて行った。AAPおよび切断型AAP(AAPtru)は、ポリクローナル抗AAP血清を用いて検出した。C) およびD) 293-T細胞において、示されたプラスミドをコトランスフェクションした時のキャプシド形成を、モノクローナル抗体A20をベースとするELISAによって定量した。少なくとも3回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

40

【図 24】wtゲノムによる、cap遺伝子のORF2に停止コドンを含有する完全長AAV2ゲノムのトランス相補を示す。A) wt AAV2ゲノムを有するプラスミドpTAV2.0およびcap遺伝子のORF2に停止コドンを含有するプラスミドpTAV/ORF2stopB(プラスミドpVP2N/ORF2stopBと同等の位置、図22)の模式図を示す。B) プラスミドと(示されたように)空のベクターpBSまたはpVP2N-gfpを、293-T細胞にコトランスフェクトした。VPタンパク質発現のウエスタンブロット分析は、モノクローナル抗体B1を用いて行った。AAPおよびAAPtruは、ポリクロー

50

ナル抗AAP血清を用いて検出した。C)293-T細胞において、示されたプラスミドをコトランスフェクションした時のキャプシド形成を、モノクローナル抗体A20をベースとするELISAによって定量した。3回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

【図25】VP3およびNoLS-VP3ならびに集合したキャプシドの細胞内局在の免疫蛍光画像を示す。A)VP3とSV40ラージT抗原の核局在化シグナルとの融合によりNLS-VP3を発現する構築物(図11において使用した)と比較した、HIV Revの核小体局在化シグナルと融合したVP3(NoLS-VP3)の発現に使用した構築物の模式図を示す。B)左に示したプラスミドによってトランスフェクトされたHeLa細胞の間接二重免疫蛍光を示す。発現した総キャプシドタンパク質の場所を突き止めるためにポリクローナルVP抗血清(VP)を使用し(左画像)、集合したキャプシドを検出するために抗体A20を使用した(右画像)。C)左に示したプラスミドによってトランスフェクトされたHeLa細胞の間接二重免疫蛍光を示す。発現したAAPの場所を突き止めるために、AU1-タグに対するモノクローナル抗体(抗AU1)を使用し(左画像)、核小体局在マーカーとしてポリクローナルフィブリリン抗体(抗フィブリリン)を使用した(真ん中の画像)。右側には、同じ領域の位相差画像を示した。

10

【図26】VP3、NLS-VP3、およびNoLS-VP3の発現およびキャプシド集合活性を示す。A)示されたように、VP3またはVP3融合タンパク質を発現する293-T細胞の抽出物のウェスタンブロット分析を、モノクローナル抗体B1を用いて行った。B)モノクローナル抗体A20に基づくELISAによって、293-T細胞におけるキャプシド形成を定量した。少なくとも3回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を示した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

20

【図27】パルボウイルスAAP配列の比較を示す。様々なパルボウイルスのcap遺伝子のORF2に由来する予測されたAAPタンパク質配列のアラインメントを示す。アラインメントされた配列の少なくとも60%において100%同一である保存アミノ酸を、下横列にあるラインとして示した。予測されたAAV2 AAP翻訳開始の位置は枠で強調した。潜在的な翻訳開始コドンの上流にある非翻訳配列も含めた。対応するDNA配列のNCBIエントリー番号を表8に列挙した。

【図28】AAV2空の粒子の調製物のEM分析を示す。示されたように、VP1、VP2、およびVP3から組み立てられたウイルス様粒子(VLP)、またはVP3のみから組み立てられたウイルス様粒子(VLP)を示す。

30

【図29】トランス相補した時のキャプシド集合を示す。示されたように、AAV2に由来するpVP2N-gfp、AAV1に由来するpVP2N-gfp、およびAAV5に由来するpVP2N-gfpとコトランスフェクトされた、AAV2の構築物pCMV_VP3/2809(AAV2-VP3)、AAV1に由来するpCMV_AAV1VP3/2829(AAV1-VP3)、および対応するAAV5 VP3構築物(AAV5-VP3)からの293-T細胞におけるキャプシド形成を、モノクローナル抗体A20をベースとするELISAによって定量した。Bluescriptベクター(pBS)を負の対照として使用した。星印は、キャプシドを検出できなかった試料を示す。

【0022】

アミノ酸配列

SEQ ID NO: 1

ILVRLETQTQ YLTPSLSDSH QQPPLVWELI RWLQAVAHQW QTITRAPTEW VIPREIGIAI
 PHGWATESSP PAPEPGPCPP TTTTSTNKFP ANQEPRTTIT TLATAPLGGI LTSTDSTATF
 HHVTGKDSST TTGDSDPRDS TSSSLTFKSK RSRRTVRRR LPITLPAFR CLLTRSTSSR
 TSSARRIKDA SRRSQQTSSW CHSMDTSP

SEQ ID NO: 2

SSRHKSQTPP RASARQASSP LKRDSILVRL ATQSQSPIHN LSENLOQPPL LWDLLQWLQA
 VAHQWQTITK APTWVMPQE IGIAIPHGWA TESSPPAPAP GPCPPTITS TSKSPVLQRG
 PATTTTTSAT APPGGILIST DSTATFHHVT GSDSSTTIGD SGPRDSTSNS STSKSRRSRR
 MMASQPSLIT LPARFKSSRT RSTSFRITSSA LRTRAASLRS RRTCS

10

SEQ ID NO: 3

ISVRLATQSQ SQTNLNSENH QQPQVWDLI QWLQAVAHQW QTITRVPMEW VIPQEIGIAI
 PNGWATESSP PAPEPGPCPL TTTISTSKSP ANQELQTTTT TLATAPLGGI LTLTDSTATS
 HHVTGSDSLT TTGDGPRNS ASSSSTSKLK RSRRTMARRL LPITLPAFRK CLRTRSISSR
 TCSGRRTKAV SRRFQRTSSW SLSMDTSP

SEQ ID NO: 4

LNPPSSPTPP RVSARKASSR LKRSSFSTK LEQATDPLRD QLPEPCLMTV RCVQQLAELQ
 SRADKVPMEW VMPRVIGIAI PPGLRATSRP PAPEPGSCPP TTTTSTSDSE RACSPTPTTD
 SPPPGDTLTS TASTATSHHV TGSDSSTTTG ACDPKPCGSK SSTSRRSRRS RRTARQRWLI
 TLPAFRSLR TRRTNCR

SEQ ID NO: 5

TTTFQKERRL GPKRTPSLPP RQTPKLDPAD PSSCKSQPNQ PQVWELIQCL REVAAHWATI
 TKVPMEWAMP REIGIAIPRG WGTSSSPSP EPGCCPATTT TSTERSKAAP STEATPTPTL
 DTAPPGGTLT LTASTATGAP ETGKDSSTTT GASDPGPSES KSSTFKSKRS RCRTPPPPSP
 TTSPPPSKCL RTTTTSCPTS SATGPRDACR PSLRRSLRCR STVTRR

20

SEQ ID NO: 6

SSRHKSQTPP RALARQASSP LKRDSILVRL ATQSQSPTHN LSENLOQPPL LWDLLQWLQA
 VAHQWQTITK APTWVMPQE IGIAIPHGWA TESSPPAPEH GPCPPTITS TSKSPVLQRG
 PATTTTTSAT APPGGILIST DSTAISHHV GSDSSTTIGD SGPRDSTSSS STSKSRRSRR
 MMASRPSLIT LPARFKSSRT RSTSCRTSSA LRTRAASLRS RRTCS

SEQ ID NO: 7

SRHLSVPPTP PRASARKASS PPERDSISVR LATQSQSPTL NLSNLOQRP LVWDLVQWLQ
 AVAHQWQTIT KVPTEWVMPQ EIGIAIPHGWA ATESLPPAPE PGPCPPTTTT STSKSPVKLQ
 VVPTTTPTSA TAPPGGILTL TDSTATSHHV TGSDSSTTTG DSGPRSCGSS SSTSRRSRRS
 RMTALRPSLI TLPAFRYSR TRNTSCRTSS ALRTRAACLR SRRTSS

30

SEQ ID NO: 8

SHHPSVLQTP LRASARKANS PPEKDSILVR LATQSQFQTL NLSNLOQRP LVWDLIQWLQ
 AVAHQWQTIT KAPTEWVVR EIGIAIPHGWA ATESSPPAPE PGPCPPTTTT STSKSPTGHR

EEPPTTTPTS ATAPPGGILT LTDSTATFHH VTGSDSSTTT GDSGPRDSAS SSSTSRSRRS
 RRMKAPRPS ITSPAPSRCL RTRSTSCRTF SALPTRAACL RSRRTCS

SEQ ID NO: 9

SSLLRNRTTP RVLANRVHSP LKRDSISVRL ATQSQSQTLN QSENLPQPPQ VWDLLQWLQV
 VAHQWQTITK VPMWVVPRE IGIAIPNGWG TESSPPAPEP GPCPPTTITS TSKSPTAHLE
 DLQMTTPTSA TAPPGGILTS TDSTATSHHV TGSDSSTTTG DSGLSDESTSS SSTFRSKRLR
 TMESRPSPI TLPARSRSSR TQTISSRTCS GRLTRAASRR SQRTFS

SEQ ID NO: 10

TLGRLASQSQ SPTLNQSENH QQAPLVWDLV QWLQAVALLQW QTITKAPTEW VVPQEIGIAI
 PHGWATESSP PAPEPGPCPP TTTTSTSKSP TGHREEAPTT TPTSATAPPG GILTSTDSTA
 TSHHVTGSDS STTTGDSGQK DSASSSSTSR SRRSRMRKAP RPSITLTPAR FRYLRTRNTS
 CRTSSAPRTR AACLRSRMS S

10

SEQ ID NO: 11

SHHKSPTPPR ASAKKANNQP ERGSTLKRTL EPETDPLKDQ IPAPCLQTLK CVQHRAEMLS
 MRDKVPMWV MPRVIGIAIP PGLRARSQOP RPEPGSCPPT TTTCTCVSEQ HQAATPTTDS
 PPPGDILTST DSTVTSHHVT GKDSSTTTGD YDQKPCALKS SISKLRSSQR RTARLRSLIT
 LPARFRYLRT RRMSSRT

SEQ ID NO: 12

KRLQIGRPTR TLGRPRPRKS KKTANQPTLL EGHSTLKTLE QETDPLRDHL PEKCLMMLRC
 VRRQAEMLSR RDKVPMWVM PPVIGIAIPP GQRAESPPPA PEPGSYPRTT TTCTCESEQR
 PTATPTTDSP PPGDTLTLTA STATFPHATG SDSSTTTGDS GRNRCVLKSS TYRSRRSRRO
 TARLRSLITL PARFRSLRIR RMNSHT

20

SEQ ID NO: 13

SRVLKSQTPR AELARKANSL PERDSTLTNN LEPETGLPQK DHLPELCLLR LKCVQQLAEM
 VAMRDKVPRE WMPVPVIGIA IPLGQRATSP PPQPAPGSCR PTTTTCTCGS ARATPATPST
 DSPPPGDTLT LTASTATSRQ ETGKGSSTTT GDCAPKACKS ASSTSKLRSS RRLTGRRPYP
 TTSPARSRL RTARTSSRT

SEQ ID NO: 14

VKPSSRPKRG FSNPLVWWKT QRRLRPETSG KAKTNLVCPT LLHRLPRKTR SLARKDLPAG
 QKIRAKAPLP TLEQQHPPLV WDHLWLKEV AAQWAMQARV PMEWAIPEI GIAIPNGWKT
 ESSLEPPEPG SCPATTTTCT NESKDPAEAT TTTNSLDSAP PGDTLTTIDS TATFPRETGN
 DSSTTTGASV PKRCALDSLTL SRLKRSRST STPPSATTSP VRSRSLRTRT TNCRTSSDRL
 PKAPSRSSQR ISTRSRSTGT AR

30

SEQ ID NO: 15

ILVRLATQSQ SQTLNHSDNL PQPPLVWDLL QWLQAVAHQW QTITRVPMWV VIPQEIGIAI
 PNGWATESSP PAPAPGPCPP TTITSTSKSP ANQEPPTTTT TLATAPPGGI LTSTDSTATF
 HHVTGKDSST TTGDSDPDS TSSSLTFKSK RSRMTVRRR LPITLTPARFR CLLTPSTSSR
 TSSARRIRDA SRRSQQTSSW SHSMDTSP

SEQ ID NO: 16

TRRTVSSLPL QRRPKLEALP PPAIWDLVWR LEAVARQSTT ARMVPMWAM PREIGIAIPH
 GWTTVSSPEP LGPGICQPTT TTSTNDSTER PPETKATSDS APPGDTLTST ASTVISPLET
 GKDSSTITGD SDQRAYGSKS LTFKLKKSRR KTQRRSSPIT LPARFRYLRT RSTSSRT

40

SEQ ID NO: 17

LNNPTTRPGP GRSVPNASTT FSRKRRRPRP SKAKPLLKRA KTPEKEPLPT LDQAPPLVWD
 HSLWLKEVAV QWAMQAKVPT EWAIPREIGI AIPNGWTTES LPEPLEPGSC PATTTTCTSG
 SKDREEPTPT INSLDSAPPG GTLTTTDSTA TSPPETGND STTTGASDPK RCALDSLTSR
 LKKSLSKTPT PPSPTTSPAR SKSLRTRTTS CRTSSDRLQR APSRRSQRIS TRSRSMVTAR

SEQ ID NO: 18

TTTFQKERRL GPKRTPSLPP RQTPKLDPAD PSSCKSQHNQ PQVWELIQCL REVAAHWATI
 TKVPMWAMP REIGIAIPRG WGTESSPSPP APGCCPATTT TSTERSKAAP STEATPTPTL
 DTAPPGGTLT LTASTATGAP ETGKDSSTTI GASDPGLSES KSSTSKSKRS RCRTPPPPSP
 TTSPPPSKCL RTTTTNSRTS SATGPRDACR PSPRRSLRCR STATRR

SEQ ID NO: 19

ASRSRSWLLQ SSVHTRPRKP QRTRRVSRDR IPGRRPRRGS SSPISLDLQQ TYLHPHNSPS
 LPQGFPVWFL VRCLQEEALQ WTMNLKVPTE WAMPREIGIA IPNGWATEFS PDPPGPGCCP
 ATTTTCTSRs QTPPACTASP GADTLATAPP GGTSTSIASAT ATSRPETGSA SSITTGASDP
 RDCESNSSTS RSRRSRLIR RPRSPTTSRA RSRSSQTTST SCRTSAATPP RDACRRSPRT
 SSRCSRSTATR R

SEQ ID NO: 20

KTEEPRRRAP NLWQHLKWQR EEAEWLATLQ GVPMEWVMPR EIGIAIPNGW ETQSSQRPPE
 PGSCQATTTT STKQLPVEPL KMQMSSMQDT VPPGGTLIST ASTATSPLET GRDLSTTIGE
 SDPNLLNSRS SMSKSKKSQR RIKQRPLQTI SPQRFKSLRM MSINSRMSWA RLRKAPCRRS
 RRMSMPCRST GTAQCTPTRM EHGSMTVVHS TA

10

SEQ ID NO: 21

KSLNYLKKTL LHPVIVEEKQ VQLPPKAPNL WQHLTWQREE AELWATLQGV PMEWVMPQEI
 GIAIPNGWET QSLPRLQEPG SCQATTTTST KPSQAEQTQT QIPNMLDTAP PGGTLISTDS
 TAISLQETGR DSSTTIGGLD RKHSNSRYSM CKLKKSRRKT RQRLLLTTLP LQSRYSRIMN
 TSCPMFWARP RRGCHRSPQ MCMPCPSTAT AQCTPTRVEL DSMTEVPSIA

SEQ ID NO: 22

TNTILKLKRP NKACRYQLHL KAEKKKLHRH NLEGAQQVPI LAAHLSWLQE EAVRWQTITR
 APREWVIPQV IGIAIPSGWE TTSLQSQPEL GCSPLTGIIS TGLSTLTAPQ VRVLMQPMQD
 TRLPGGTTLTS IDSIATSPPE TGKDSSTTTQ ASGRKDSKSK SLTSKSKKLQ HKIQRKQLPT
 ISPAPYRSLR TRTTTTYHMY

20

SEQ ID NO: 143

LNNPTTRPGP GRSVFNASTT FSRKRRRPRP SKAKPLLKRA KTPEKEPLPT LDQAPPLVWD
 HLSWLKEVAV QWAMQAKVPT EWAIPREIGI AIPNGWTTES LPEPLEPGSC PATTTTCTSG
 SKDREETPT INSLDSAPPG GTLTITDSTA TSPPETGNDS STTTGASDPK RCALDSLTSR
 LKKSLSKTPT PPSPTTSPAR SKSLRTRTTS CRTSSDRLQR APSRRSQRIS TRSRSMVTAR

【 0 0 2 3 】

核酸配列

SEQ ID NO: 23

ATTTTGGTCA GACTGGAGAC GCAGACTCAG TACCTGACCC CCAGCCTCTC GGACAGCCAC
 CAGCAGCCCC CTCTGGTCTG GGAACATAA CGATGGCTAC AGGCAGTGGC GCACCAATGG
 CAGACAATAA CGAGGGCGCC GACGGAGTGG GTAATTCCTC GGGAAATTGG CATTGCGATT
 CCACATGGAT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCCG AACCTGGGCC CTGCCCACCT
 ACAACAACCA CCTCTACAAA CAAATTTCCA GCCAATCAGG AGCCTCGAAC GACAATCACT
 ACTTTGGCTA CAGCACCCCT TGGGGGTATT TTGACTTCAA CAGATTCCAC TGCCACTTTT
 CACCACGTGA CTGGCAAAGA CTCATCAACA ACAACTGGGG ATTCCGACCC AAGAGACTCA
 ACTTCAAGCT CTTTAACATT CAAGTCAAAG AGGTCACGCA GAATGACGGT ACGACGACGA
 TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTTACAG TGTTTACTGA CTCGGAGTAC CAGCTCCCGT
 ACGTCCTCGG CTCGGCGCAT CAAGGATGCC TCCCGCCGTT CCCAGCAGAC GTCTTCATGG
 TGCCACAGTA TGGATACCTC ACCCTGA

30

SEQ ID NO: 24

AGCAGTCGCC ACAAGAGCCA GACTCCTCCT CGGGCATCGG CAAGACAGGC CAGCAGCCCG
 CTAAGAAAGAG ACTCAATTTT GGTACAGACTG GCGACTCAGA GTCAGTCCCC GATCCACAAC
 CTCTCGGAGA ACCTCCAGCA ACCCCGCTG CTGTGGGACC TACTACAATG GCTTCAGGCG
 GTGGCGCACC AATGGCAGAC AATAACGAAG GCGCCGACGG AGTGGGTAAT GCCTCAGGAA
 ATTGGCATTG CGATTCCACA TGGCTGGGCG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGCACCT
 GGGCCTTGCC CACCTACAAT AACCACTCT ACAAGCAAAT CTCCAGTGCT TCAACGGGGG
 CCAGCAACGA CAACCACTAC TTCGGCTACA GCACCCCTG GGGGTATTTT GATTTCAACA
 GATTCCACTG CCACTTTTCA CCACGTGACT GGCAGCGACT CATCAACAAC AATTGGGGAT
 TCCGGCCCAA GAGACTCAAC TTCAAATCT TCAACATCCA AGTCAAGGAG GTCACGACGA
 ATGATGGCGT CACAACCATC GCTAATAACC TTACCAGCAC GGTTCAGGTC TTCTCGGACT
 CGGAGTACCA GCTTCCGTAC GTCCTCGGCT CTGCGCACCA GGGCTGCCTC CCTCCGTTCC
 CGGCGGACGT GTTCATGA

40

50

SEQ ID NO: 25

ATTTTCGGTCA GACTGGCGAC TCAGAGTCAG TCCCAGACCC TCAACCTCTC GGAGAACCAC
 CAGCAGCCCC CACAAGTTTG GGATCTAATA CAATGGCTTC AGGCGGTGGC GCACCAATGG
 CAGACAATAA CGAGGGTGCC GATGGAGTGG GTAATTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
 CCCAATGGCT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCAG AACCTGGGCC CTGCCCCACTT
 ACAACAACCA TCTCTACAAG CAAATCTCCA GCCAATCAGG AGCTTCAAAC GACAACCACT
 ACTTTGGCTA CAGCACCCTT TGGGGGTATT TTGACTTTAA CAGATTCCAC TGCCACTTCT
 CACCACGTGA CTGGCAGCGA CTCATTAACA ACAACTGGGG ATTCCGGGCC AAGAACTCA
 GCTTCAAGCT CTTCAACATC CAAGTTAAAG AGGTCACGCA GAACGATGGC ACGACGACTA
 TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTTCAAG TGTTTACGGA CTCGGAGTAT CAGCTCCCGT
 ACGTGCTCGG GTCGGCGCAC CAAGGCTGTC TCCCGCCGTT TCCAGCGGAC GTCTTCATGG
 TCCCTCAGTA TGGATACCTC ACCCTGA

10

SEQ ID NO: 26

TTGAATCCCC CCAGCAGCCC GACTCCTCCA CGGGTATCGG CAAAAAAGGC AAGCAGCCGG
 CTAAAAAGAA GCTCGTTTTT GAAGACGAAA CTGGAGCAGG CGACGGACCC CCTGAGGGAT
 CAACTTCCGG AGCCATGTCT GATGACAGTG AGATGCGTGC AGCAGCTGGC GGAGCTGCAG
 TCGAGGGCGG ACAAGGTGCC GATGGAGTGG GTAATGCCTC GGGTGATTGG CATTGCGATT
 CCACCTGGTC TGAGGGCCAC GTCACGACCA CCAGCACCAG AACCTGGGTC TTGCCCCACTT
 ACAACAACCA CCTCTACAAG CGACTCGGAG AGAGCCTGCA GTCCAACACC TACAACGGAT
 TCTCCACCCC CTGGGGATAC TTTGACTTCA ACCGCTTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG
 ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACAACCTGGG GCATGCGACC CAAAGCCATG CGGGTCAAAA
 TCTTCAACAT CCAGGTCAAG GAGGTCACGA CGTCGAACGG CGAGACAACG GTGGCTAATA
 ACCTTACCAG CACGGTTCAG ATCTTTGCGG ACTCGTCGTA CGAACTGCCG TACGTGA

20

SEQ ID NO: 27

ACGACCACTT TCCAAAAAGA AAGAAGGCTC GGACCGAAGA GGACTCCAAG CCTTCCACCT
 CGTCAGACGC CGAAGCTGGA CCCAGCGGAT CCCAGCAGCT GCAAATCCCA GCCCAACCAG
 CCTCAAGTTT GGGAGCTGAT ACAATGTCTG CGGGAGGTGG CGGCCATTG GCGACAATA
 ACCAAGGTGC CGATGGAGTG GGCAATGCCT CGGGAGATTG GCATTGCGAT TCCACGTGGA
 TGGGGGACAG AGTCGTCACC AAGTCCACCC GAACCTGGGT GCTGCCCAGC TACAACAACC
 ACCAGTACCG AGAGATCAA AGCGGCTCCG TCGACGGAAG CAACGCCAAC GCCTACTTTG
 GATACAGCAC CCCCTGGGGG TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACAGCCAC TGGAGCCCCC
 GAGACTGGCA AAGACTCATC AACAACCTACT GGGGCTTCAG ACCCGGTCC CTCAGAGTCA
 AAATCTTCAA CATTCAAGTC AAAGAGGTCA CGGTGCAGGA CTCCACCACC ACCATCGCCA
 ACAACCTCAC CTCCACCGTC CAAGTGTTTA CGGACGACGA CTACCAGCTG CCCTACGTG
 TCGGCAACGG GACCGAGGGA TGCCTGCCGG CCTTCCCTCC GCAGGTCTTT ACGTGCCCG
 AGTACGGTTA CGCGACGCTG A

30

SEQ ID NO: 28

AGCAGTCGCC ACAAGAGCCA GACTCCTCCT CGGGCATTGG CAAGACAGGC CAGCAGCCCC
 CTAAAAAGAG ACTCAATTTT GGTCAGACTG GCGACTCAGA GTCAGTCCCC GACCCACAAC
 CTCTCGGAGA ACCTCCAGCA ACCCCGCTG CTGTGGGACC TACTACAATG GCTTCAGGCG
 GTGGCGCACC AATGGCAGAC AATAACGAAG GCGCCGACGG AGTGGGTAAT GCCTCAGGAA
 ATTGGCATTG CGATTCCACA TGGCTGGGCG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGAACAT
 GGGCCTTGCC CACCTATAAC AACCACCTCT ACAAGCAAAT CTCCAGTGCT TCAACGGGGG
 CCAGCAACGA CAACCACTAC TTCGGCTACA GCACCCCTG GGGGTATTTT GATTTCACAA
 GATTCCACTG CCATTTCTCA CCACGTGACT GGCAGCGACT CATCAACAAC AATTGGGGAT
 TCCGGCCCAA GAGACTCAAC TTCAAGCTCT TCAACATCCA AGTCAAGGAG GTCACGACGA
 ATGATGGCGT CACGACCATC GCTAATAACC TTACCAGCAC GGTTCAGTC TTCTCGGACT
 CGGAGTACCA GTTGCCGTAC GTCCTCGGCT CTGCGCACCA GGGCTGCCTC CCTCCGTTCC
 CGGCGGACGT GTTCATGA

40

SEQ ID NO: 29

AGCCGTCACC TCAGCGTTCC CCCGACTCCT CCACGGGCAT CGGCAAGAAA GGCCAGCAGC
 CCGCCAGAAA GAGACTCAAT TTCGGTCAGA CTGGCGACTC AGAGTCAGTC CCCGACCCTC
 AACCTCTCGG AGAACCTCCA GCAGCGCCCT CTAGTGTGGG ATCTGGTACA GTGGCTGCAG
 GCGGTGGCGC ACCAATGGCA GACAATAACG AAGGTGCCGA CGGAGTGGGT AATGCCTCAG
 GAAATTGGCA TTGCGATTCC ACATGGCTGG GCGACAGAGT CATTACCACC AGCACCCGAA

CCTGGGGCCCT GCCACCTAC AACAAACCACC TCTACAAGCA AATCTCCAGT GAAACTGCAG
 GTAGTACCAA CGACAACACC TACTTCGGCT ACAGCACCCC CTGGGGGTAT TTTGACTTTA
 ACAGATTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACAACTGGG
 GATTCCGGCC CAAGAAGCTG CGGTTCAAGC TCTTCAACAT CCAGGTCAAG GAGGTACGCA
 CGAATGACGG CGTTACGACC ATCGCTAATA ACCTTACCAG CACGATTCAG GTATTCTCGG
 ACTCGGAATA CCAGCTGCCG TACGTCTCG GCTCTGCGCA CCAGGGCTGC CTGCCTCCGT
 TCCCGGCGGA CGTCTTCATG A

SEQ ID NO: 30

AGCCATCACC CCAGCGTTCT CCAGACTCCT CTACGGGCAT CGGCAAGAAA GGCCAACAGC
 CCGCCAGAAA AAGACTCAAT TTTGGTCAGA CTGGCGACTC AGAGTCAGTT CCAGACCCTC
 AACCTCTCGG AGAACCTCCA GCAGCGCCCT CTGGTGTGGG ACCTAATACA ATGGCTGCAG
 GCGGTGGCGC ACCAATGGCA GACAATAACG AAGGCGCCGA CGGAGTGGGT AGTTCCTCGG
 GAAATTGGCA TTGCGATTCC ACATGGCTGG GCGACAGAGT CATCACCACC AGCACC CGAA
 CCTGGGGCCCT GCCACCTAC AACAAACCACC TCTACAAGCA AATCTCCAAC GGGACATCGG
 GAGGAGCCAC CAACGACAAC ACCTACTTCG GCTACAGCAC CCCCTGGGGG TATTTTGACT
 TTAACAGATT CCACTGCCAC TTTTCACCAC GTGACTGGCA GCGACTCATC AACAACT
 GGGGATTCCG GCCCAAGAGA CTCAGCTTCA AGCTCTTCAA CATCCAGGTC AAGGAGGTCA
 CGCAGAAATGA AGGCACCAAG ACCATCGCCA ATAACCTCAC CAGCACCATC CAGGTGTTTA
 CGGACTCGGA GTACCAGCTG CCGTACGTTT TCGGCTCTGC CCACCAGGGC TGCCTGCCTC
 CGTTCCCGGC GGACGTGTTC ATGA

10

SEQ ID NO: 31

AGCAGTCTCC TCAGGAACCG GACTCCTCCG CGGGTATTGG CAAATCGGGT GCACAGCCCG
 CTA AAAAGAG ACTCAATTTT GGT CAGACTG GCGACACAGA GTCAGTCCCA GACCCCTAAC
 CAATCGGAGA ACCTCCCGCA GCGCCCTCAG GTGTGGGATC TCTTACAATG GCTTCAGGTG
 GTGGCGCACC AGTGGCAGAC AATAACGAAG GTGCCGATGG AGTGGGTAGT TCCTCGGGAA
 ATTTGGCATTG CGATTCCCAA TGGCTGGGGG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGAACCT
 GGGCCCTGCC CACCTACAAC AATCACCTCT ACAAGCAAAT CTCCAACAGC ACATCTGGAG
 GATCTTCAA TGACAACGCC TACTTCGGCT ACAGCACCCC CTGGGGGTAT TTTGACTTCA
 ACAGATTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACAACTGGG
 GATTCCGGCC TAAGCGACTC AACTTCAAGC TCTTCAACAT TCAGGTCAAA GAGGTTACGG
 ACAACAATGG AGTCAAGACC ATCGCCAATA ACCTTACCAG CACGGTCCAG GTCTTCACGG
 ACTCAGACTA TCAGTCTCCG TACGTGCTCG GGTGCGCTCA CGAGGGCTGC CTCCCGCCGT
 TCCAGCGGA CGTTTTCATG A

20

SEQ ID NO: 32

ACTTTGGGCA GACTGGCGAG TCAGAGTCAG TCCCCGACCC TCAACCAATC GGAGAACCAC
 CAGCAGGCC CTCTGGTCTG GGATCTGGTA CAATGGCTGC AGGCGGTGGC GCTCCAATGG
 CAGACAATA CGAAGGCGCC GACGGAGTGG GTAGTTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
 CCACATGGCT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCCG AACCTGGGCC CTGCCCACCT
 ACAACAACCA CCTCTACAAG CAAATCTCCA ACGGGACATC GGGAGGAAGC ACCAACGACA
 ACACCTACTT CGGCTACAGC ACCCCCTGGG GGTATTTTGA CTTCACAGA TTCCACTGCC
 ACTTCTCACC ACGTGACTGG CAGCGACTCA TCAACAACAA CTGGGGATTG CGGCCAAAAA
 GACTCAGCTT CAAGCTCTTC AACATCCAGG TCAAGGAGGT CACGCAGAA GAAGGCACCA
 AGACCATCGC CAATAACCTT ACCAGCACGA TTCAGGTATT TACGGACTCG GAATACCAGC
 TGCCGTACGT CCTCGGCTCC GCGCACCAGG GCTGCCTGCC TCCGTTCCCC GCGGATGTCT
 TCATGA

30

40

SEQ ID NO: 33

AGTCACCACA AGAGCCCGAC TCCTCCTCGG GCATCGGCAA AAAAGGCAAA CAACCAGCCA
 GAAAGAGGCT CAACTTTGAA GAGGACACTG GAGCCGGAGA CGGACCCCT GAAGGATCAG
 ATACCAGCGC CATGTCTTCA GACATTGAAA TGCGTGCAGC ACCGGGCGGA AATGCTGTCTG
 ATGCGGGACA AGGTTCCGAT GGAGTGGGTA ATGCCTCGGG TGATTGGCAT TGCGATTCCA
 CCTGGTCTGA GGGCAAGGTC ACAACAACCT CGACCAGAAC CTGGGTCTTG CCCACCTACA
 ACAACCACTT GTACCTGCGT CTCGGAACAA CATCAAGCAG CAACACCTAC AACGGATTCT
 CCACCCCTG GGGATATTTT GACTTCAACA GATTCCACTG TCACTTCTCA CCACGTGACT
 GGCAAAGACT CATCAACAAC AACTGGGGAC TACGACCAA AGCCATGCGC GTTAAATCT

TCAATATCCA AGTTAAGGAG GTCACAACGT CGAACGGCGA GACTACGGTC GCTAATAACC
TTACCAGCAC GGTTTCAGATA TTTGCGGACT CGTCGTATGA GCTCCCGTAC GTGA

SEQ ID NO: 34

AAAAGACTCC AAATCGGCCG ACCAACCCGG ACTCTGGGAA GGCCCCGGCC AAGAAAAAGC
AAAAAGACGG CGAACCAGCC GACTCTGCTA GAAGGACACT CGACTTTGAA GACTCTGGAG
CAGGAGACGG ACCCCCTGAG GGATCATCTT CCGGAGAAAT GTCTCATGAT GCTGAGATGC
GTGCGGCGCC AGGCGGAAAT GCTGTCGAGG CGGGACAAGG TGCCGATGGA GTGGGTAATG
CCTCCGGTGA TTGGCATTGC GATTCCACCT GGTCAGAGGG CCGAGTCACC ACCACCAGCA
CCCGAACCTG GGTCTTACCC ACGTACAACA ACCACCTGTA CCTGCGAATC GGAACAACGG
CCAACAGCAA CACCTACAAC GGATTCTCCA CCCCCTGGGG ATACTTTGAC TTTAACCGCT
TCCACTGCCA CTTTTCCCCA CGCGACTGGC AGCGACTCAT CAACAACAAC TGGGGACTCA
GGCCGAAATC GATGCGTGTT AAAATCTTCA ACATACAGGT CAAGGAGGTC ACGACGTCAA
ACGGCGAGAC TACGGTCGCT AATAACCTTA CCAGCACGGT TCAGATCTTT GCGGATTCTGA
CGTATGAACT CCCATACGTG A

10

SEQ ID NO: 35

AGCAGAGTCC TCAAGAGCCA GACTCCTCGA GCGGAGTTGG CAAGAAAGGC AAACAGCCTG
CCAGAAAGAG ACTCAACTTT GACGACGAAC CTGGAGCCGG AGACGGGCCCT CCCCAGAAAG
GACCATCTTC CGGAGCTATG TCTACTGAGA CTGAAATGCG TGCAGCAGCT GGCGGAAATG
GTGGCGATGC GGGACAAGGT GCCGAGGGAG TGGGTAATGC CTCCGGTGAT TGGCATTGCG
ATTCCACTTG GTCAGAGAGC CACGTCACCA CCACCTCAAC CCGCACCTGG GTCCTGCCGA
CCTACAACAA CCACCTGTAC CTGCGGCTCG GCTCGAGCAA CGCCAGCGAC ACCTTCAACG
GATTCTCCAC CCCCTGGGGA TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACTGCCAC TTCTCGCCAA
GAGACTGGCA AAGGCTCATC AACAACCACT GGGGACTGCG CCCCAAAAGC ATGCAAGTCC
GCATCTTCAA CATCCAAGTT AAGGAGGTCA CGACGTCTAA CGGGGAGACG ACCGTATCCA
ACAACCTCAC CAGCACGGTC CAGATCTTTG CGGACAGCAC GTACGAGCTC CCGTACGTGA

20

SEQ ID NO: 36

GTAAAGCCAT CTTCCAGGCC AAAAAGAGGG TTCTCGAACC CTTTGGTCTG GTGGAAGACT
CAAAGACGGC TCCGACCGGA GACAAGCGGA AAGGCGAAGA CGAACCTCGT TTGCCCGACA
CTTCTTCACA GACTCCCAAG AAAAACAAGA AGCCTCGCAA GGAAAGACCT TCCGGCGGGG
CAGAAGATCC GGGCGAAGGC ACCTCTTCCA ACGCTGGAGC AGCAGCACCC GCCTCTAGTG
TGGGATCATC TATCATGGCT GAAGGAGGTG GCGGCCAGT GGGCGATGCA GGCCAGGGTG
CCGATGGAGT GGGCAATTCC TCCGGAATTT GGCATTGCGA TTCCCAATGG CTGGAAAACG
GAGTCGTAC TCGAACCACC CGAACCTGGG TCTTGCCAG CTACAACAAC CACCTGTACA
AACGAATCCA AGGACCCAGC GGAGGCGACA ACAACAACAA ATTCTTTGGA TTCAGCACCC
CCTGGGGATA CTTTGACTAC AATCGATTCC ACTGCCACTT TTCCCGCGA GACTGGCAAC
GACTCATCAA CAACAACCTGG GGCATCCGTC CCAAAGCGAT GCGCTTTAGA CTCTTTAACA
TCCAGGTAA AGAGGTCACG GTCCAAGACT TCAACACCAC CATCGGCAAC AACCTCACCA
GTACGGTCCA GGTCTTTGCG GACAAGGACT ACCAACTGCC GTACGTCCTC GGATCGGCTA
CCGAAGGCAC CTTCCCGCCG TTCCAGCGG ATATCTACAC GATCCCGCAG TACGGGTACT
GCACGCTAA

30

SEQ ID NO: 37

ATTTTGGTCA GACTGGCGAC ACAGAGTCAG TCCCAGACCC TCAACCACTC GGACAACCTC
CCGAGCCCC CTCTGGTGTG GGATCTACTA CAATGGCTTC AGGCGGTGGC GCACCAATGG
CAGACAATAA CGAGGGTGCC GATGGAGTGG GTAATTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
CCCAATGGCT GGGCGACAGA GTCATACCA CCAGCACCCG CACCTGGGCC CTGCCACCT
ACAACAATCA CCTCTACAAG CAAATCTCCA GCCAATCAGG AGCCACCAAC GACAACCACT
ACTTTGGCTA CAGCACCCCC TGGGGGTATT TTGACTTCAA CAGATTCCAC TGCCACTTTT
CACCACGTGA CTGGCAAAGA CTCATCAACA ACAACTGGG ATTCCGACCC AAGAGACTCA
ACTTCAAGCT CTTTAACATT CAAGTCAAAG AGGTCACGCA GAATGACGGT ACGACGACGA
TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTTCAAG TGTTTACTGA CTCCGAGTAC CAGTCCCGT
ACGTCCTCGG CTCGGCGCAT CAGGGATGCC TCCCGCCGTT CCCAGCAGAC GTCTTCATGG
TCCCACAGTA TGGATACCTC ACCCTGA

40

SEQ ID NO: 38

ACGAGGAGGA CCGTGAGTTC GCTGCCGCTG CAGCGGAGAC CGAAACTGGA AGCGCTCCCC
 CCACCGGCAA TTTGGGACCT GGTACGATGG CTGGAGGCGG TAGCGCGCCA ATCGACGACG
 GCTCGTATGG TGCCGATGGA GTGGGCAATG CCTCGGGAGA TTGGCATTGC GATTCCACAT
 GGCTGGACAA CTGTGTCATC ACCCGAACCA CTCGGACCTG GAATCTGCCA ACCTACAACA
 ACCACATCTA CAAACGACTC AACGGAACGA CCTCCGGAGA CCAAAGCTAC TTCGGATTCA
 GCACCCCTG GGGATACTTT GACTTCAACC GCTTCCACTG TCATTTCTCC CCTCGAGACT
 GGCAAAGACT CATCAACAAT AACTGGGGAC TCCGACCAA GAGCCTACGG TTCAAATCT
 TTAACATTCA AGTTAAAGAA GTCACGACGC AAGACTCAAC GAAGATCATC TCCAATAACC
 TTACCAGCAC GGTTTCAGGTA TTTGCGGACA CGGAGTACCA GCTCCCGTAC GTGA

SEQ ID NO: 39

TTGAACAACC CGACAACACG GCCGGGACCG GGGAGAAGCG TCCCGAACGC GTCGACGACT
 TTTTCCCGAA AAAGAAGAAG GCCAAGACCG AGCAAGGCAA AGCCCCTGCT CAAACGGGCG
 AAGACCCCGG AGAAGGAACC TCTTCCAACG CTGGATCAAG CGCCCCCTCT AGTGTGGGAT
 CATCTGTCAT GGCTGAAGGA GGTGGCGGTC CAATGGGCGA TGCAGGCCAA GGTGCCGACG
 GAGTGGGCAA TTCTTCGGGA AATTGGCATT GCGATTCCCA ATGGCTGGAC AACGGAGTCG
 TTACCCGAAC CACTCGAACC TGGGTCCTGC CCAGCTACAA CAACCACTTG TACAAGCGGA
 TCCAAGGACC GGGAGGAACC GACCCCAACA ATAAATTCTT TGGATTTCAGC ACCCCCTGGG
 GGTACTTTGA CTACAACCGA TTCCACTGCC ACTTCTCCCC CCGAGACTGG CAACGACTCA
 TCAACAACAA CTGGGGCATC CGACCCAAAG CGATGCGCTT TAGACTCTTT AACATCCAGG
 TTAAAGAAGT CACTGTCCAA GACTCCAACA CCACCATCGC CAACAACCTC ACCAGCACGG
 TCCAAGTCTT TGCGGACAAG GACTACCAGC TGCCGTACGT CCTCGGATCG GCTACAGAGG
 GCACCTTCCC GCCGTTCCCA GCGGATATCT ACACGATCCC GCAGTATGGT TACTGCACGC
 TAA

10

20

SEQ ID NO: 40

ACGACCACTT TCCAAAAAGA AAGAAGGCTC GGACCGAAGA GGACTCCAAG CCTTCCACCT
 CGTCAGACGC CGAAGCTGGA CCCAGCGGAT CCCAGCAGCT GCAAATCCCA GCACAACCAG
 CCTCAAGTTT GGGAGCTGAT ACAATGTCTG CGGGAGGTGG CGGCCATTG GGCAGACAATA
 ACCAAGGTGC CGATGGAGTG GGCAATGCCT CGGGAGATTG GCATTGCGAT TCCACGTGGA
 TGGGGGACAG AGTCGTCACC AAGTCCACCC GCACCTGGGT GCTGCCCAGC TACAACAACC
 ACCAGTACCG AGAGATCAA AGCGGCTCCG TCGACGGAAG CAACGCCAAC GCCTACTTTG
 GATACAGCAC CCCCTGGGGG TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACAGCCAC TGGAGCCCCC
 GAGACTGGCA AAGACTCATC AACAACATATT GGGGCTTCAG ACCCCGGTCT CTCAGAGTCA
 AAATCTTCAA CATCCAAGTC AAAGAGGTCA CGGTGCAGGA CTCCACCACC ACCATCGCCA
 ACAACCTCAC CTCCACCGTC CAAGTGTTTA CGGACGACGA C

30

SEQ ID NO: 41

GCGTCGAGGA GCCGGAGCTG GCTCCTCCAG TCAAGCGTCC ACACTCGCCC GAGAAAACCC
 CAGAGAACCA GAAGGGTCAG CCGCGACCGG ATCCCCGGAC GCCGGCCAAG AAGAGGCTCG
 AGTTCTCCGA TCAGCCTGGA TCTTCAGCAG ACTTACCTGC ATCCTCACAA CAGTCCCAGC
 CTCCCGCAGG GGTTCCCGGT GTGGTTCTTG GTACGATGTC TGCAGGAGGA GCGCTCCAG
 TGGACGATGC TCAACAAGGT GCCGACGGAG TGGGCAATGC CTCGGGAGAT TGGCATTGCG
 ATTCCAAATG GCTGGGCAAC CGAGTTCTCA CCCGATCCAC CCGGACCTGG GTGCTGCCCA
 GCTACAACAA CCACCTGTAC AAGCAGATCT CAGACGCCTC CGGCGTGCAC AGCCTCCCCG
 GGAGCCGATA CTTTGGCTAC AGCACCCCTT GGGGGTACTT CGACTTCAAT CGCTTCCACT
 GCCACTTCTC GCCCAGAGAC TGGCAGCGCC TCGTCAATAA CCACTGGGGC TTCCGACCCA
 AGAGACTGCG AGTCAAATC TTCAACATCC AGGTCAAGGA GGTCACGACT ACTGATTCTGA
 CGACCACGGT CTCCAACAAC CTCACGAGCA CGGTCCAGGT CTTACAGAC GACGAGTACC
 AGCTGCCGTA CGTCTGCGGC AACGCCACCG AGGGATGCCT GCCGCCGTTT CCCCCGACG
 TCTTCACGCT GCCGCAGTAC GGCTACGCGA CGCTGA

40

SEQ ID NO: 42

AAGACGGAGG AGCCACCGCG GAGGGCACCG AACCTGTGGC AGCATCTGAA ATGGCAGAGG
 GAGGAGGCGG AGCTATGGGC GACTCTTCAG GGGGTGCCGA TGGAGTGGGT AATGCCTCGG
 GAAATTGGCA TTGCGATTCC CAATGGATGG GAAACACAGT CATCACAAAG ACCACCAGAA
 CCTGGGTCCT GCCAAGCTAC AACAACCACA TCTACAAAGC AATTACCAGT GGAACCTCTC
 AAGATGCAAA TGTCCAGTAT GCAGGATACA GTACCCCTG GGGGTACTTT GATTTCACCC
 GCTTCCACTG CCACTTCTCC CCTAGAGACT GGCAGAGACT TATCAACAAC CATTGGGGAA

TCCGACCCAA ATCTCTTAAA TTCAAGATCT TCAATGTCCA AGTCAAAGAA GTCACAACGC
 AGGATCAAAC AAAGACCATT GCAAACAATC TCACCTCAAC GATTCAAGTC TTTACGGATG
 ATGAGCATCA ACTCCCGTAT GTCCTGGGCT CGGCTACGGA AGGCACCATG CCGCCGTTC
 CGTCGGATGT CTATGCCCTG CCGCAGTACG GGTACTGCAC AATGCACACC AACCAGAATG
 GAGCACGGTT CAATGACCGT AGTGCATTCT ACTGCTTAG

SEQ ID NO: 43

AAAAGCCTAA ATTATCTGAA GAAAACTCTC CTTACCCAG TAATAGTGGA GGAGAAGCAA
 GTGCAGCTGC CACCGAAGGC TCCGAACCTG TGGCAGCACC TAACATGGCA GAGGGAGGAA
 GCGGAGCTAT GGGCGACTCT GCAGGGGGTG CCGATGGAGT GGGTAATGCC TCAGGAAATT
 GGCATTGCGA TTCCAATGG CTGGGAGACA CAGTCATTAC CAAGACTACA AGAACCTGGG
 TCCTGCCAAG CTACAACAAC CACATCTACA AAGCCATCAC AAGCGGAACA AACCCAGACA
 CAAATACCCA ATATGCTGGA TACAGCACCC CCTGGGGGTA CTTTGATTTC AACAGATTCC
 ACTGCCATTT CTCTCCAAGA GACTGGCAGA GACTCATCAA CAACCATTGG GGGATTAGAC
 CGAAAGCACT CAAATTCAAG ATATTCAATG TGCAAGTTAA AGAAGTCACG ACGCAAGACC
 AGACAAAGAC TATTGCTAAC AACCTTACCT CTACAATCCA GATATTACG GATAATGAAC
 ACCAGCTGCC CTATGTTCTG GGCTCGGCCA CGGAGGGGAC GATGCCACCG TTCCCCTCAG
 ATGTGTATGC CTTGCCCCAG TACGGCTACT GCACAATGCA CACCAACCAG AGTGGAGCTA
 GATTCAATGA CAGAAGTGCC TTCTATTGCT TAG

10

SEQ ID NO: 44

ACGAATACTA TCCTAAAGCT AAAAAGGCCA AACAAGGCTT GCAGATACCA GCTCCACCTA
 AAGGCGGAGA AGAAGAAGCT ACATCGTCAC AATCTGGAGG GAGCCCAGCA GGTTCGATA
 CTAGCGGCAC ATCTGTCATG GCTACAGGAG GAGGCGGTCC GATGGCAGAC GATAACCAGG
 GCGCCGAGGG AGTGGGTAAT TCCTCAGGTG ATTGGCATTG CGATACCAAG TGGATGGGAG
 ACCACGTCAT TACAAAGTCA ACCAGAACTT GGGTGCTCCC CACTTACGGG AATCATCTCT
 ACGGGCCTAT CAACTTTGAC GGCACCACAG GTTCGGGTGC TAATGCAGCC TATGCAGGAT
 ACAAGACTCC CTGGGGGTAC TTTGACTTCA ATCGATTCCA TTGCCACTTC TCCCCCGAG
 ACTGGCAAAG ACTCATCAAC AACCACACAG GCATCAGGCC GAAAGGACTC AAAATCAAAG
 TCTTTAACGT CCAAGTCAAA GAAGTTACAA CACAAGATTC AACGAAAACA ATTGCCAACA
 ATCTCACCAG CACCGTACAG ATCTTTGCGG ACGAGAACTA CGACTTACCA TATGTATTAG

20

SEQ ID NO: 142

TTGAACAACC CGACAACACG GCCGGGACCG GGGAGAAGCG TCCCGAACGC GTCGACGACT
 TTTTCCCGAA AAAGAAGAAG GCCAAGACCG AGCAAGGCAA AGCCCCTGCT CAAACGGGCG
 AAGACCCCGG AGAAGGAACC TCTTCCAACG CTGGATCAAG CGCCCCCTCT AGTGTGGGAT
 CATCTGTCAT GGCTGAAGGA GGTGGCGGTC CAATGGGCGA TGCAGGCCAA GGTGCCGACG
 GAGTGGGCAA TTCTCGGGA AATTGGCATT GCGATTCCCA ATGGCTGGAC AACGGAGTCG
 TTACCCGAAC CACTCGAACC TGGGTCTGTC CCAGCTACAA CAACCACTTG TACAAGCGGA
 TCCAAGGACC GGGAGGAACC GACCCCAACA ATAAATTCTT TGGATTGAGC ACCCCCTGGG
 GGTACTTTGA CTACAACCGA TTCCACTGCC ACTTCTCCCC CCGAGACTGG CAACGACTCA
 TCAACAACAA CTGGGGCATC CGACCCAAAG CGATGCGCTT TAGACTCTTT AACATCCAGG
 TTAAAGAAGT CACTGTCCAA GACTCCAACA CCACCATCGC CAACAACCTC ACCAGCACGG
 TCCAAGTCTT TGCGGACAAG GACTACCAGC TGCCGTACGT CCTCGGATCG GCTACAGAGG
 GCACCTTCCC GCCGTTCCCA GCGGATATCT ACACGATCCC GCAGTATGGT TACTGCACGC
 TAA

30

【発明を実施するための形態】

40

【0024】

以下の定義は、本発明の産物、方法、および使用に関連して、定義された用語がどのように解釈されるかを説明する。

【0025】

「AA」はアミノ酸の略語として用いられ、「nt」はヌクレオチドの略語として用いられる。

【0026】

本発明によれば、「パルボウイルス」または「パルボウイルスの」は、パルボウイルス科(Parvoviridae)のメンバーに関する。パルボウイルス科においては、野生型は、キャプシドタンパク質としてVP1、VP2、およびVP3を発現する。パルボウイルス科にはいくつか

50

の属があり、2つの亜科であるパルボウイルス亜科(Parvovirinae)(パルボウイルス属、エリスロウイルス属(Erythrovirus)、デペンドウイルス属(Dependovirus)、アムドウイルス属(Amdovirus)、およびボカウイルス属(Bocavirus))とデンソウイルス亜科(Densovirinae)(デンソウイルス属(Densovirus)、イテラウイルス属(Iteravirus)、ブレビデンソウイルス属(Brevidensovirus)、ペフデンソウイルス属(Pefudensovirus)、およびコントラウイルス属(Contravirus))に分けられる(Fields: Virology, 第4版 2001, 第2巻, 第69章および第70章, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia; <http://virus.stanford.edu/parvo/parvovirus.html> http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_parvo.htm#SubFamily1)。野生型キャプシドは、3種類の構造タンパク質VP1、VP2、およびVP3から組み立てられ、これらは1:1:8の比で60サブユニットのAAVキャプシドを形成する(Kronenberg et al., 2001)。従って、「VP3」という用語はウイルスタンパク質3を表している。天然パルボウイルス粒子は、一本鎖DNAゲノムを閉じ込めている正二十面体キャプシドからなる。好ましいパルボウイルスは、AAVを含むデペンドウイルス属である。

【0027】

本発明に関連して、「血清型」という用語は、特徴的な抗原セットによって区別される、近縁関係にあるウイルスからなるグループのウイルスの種類を表す。従って、血清型は、血清学的分類(ウイルス表面上にある認識可能な抗原についての試験)によって特徴付けられる。従って、AAVはまた、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11～AAV12、およびAAV13、特に、AAV2から進化した血清型より選択することもできる。

【0028】

「本質的にVP3」からなる、または「本質的にVP3のみ」からなるパルボウイルス粒子とは、キャプシドが、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.6%、本質的に少なくとも99.8%までVP3から組み立てられることを意味する。これは、キャプシドを組み立てるタンパク質の1/50しかVP3のN末端伸長バージョンまたは完全に異なるタンパク質でない、好ましくは、1/100がVP3のN末端伸長バージョンまたは完全に異なるタンパク質である、より好ましくは、1/250がVP3のN末端伸長バージョンまたは完全に異なるタンパク質である、本質的には1/500またはそれ未満しかVP3のN末端伸長バージョンまたは完全に異なるタンパク質でないことを意味する。好ましい態様において、キャプシドは、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.6%、本質的に少なくとも99.8%までVP3から組み立てられる。これは、キャプシドを組み立てるタンパク質の1/50しかVP3のN末端伸長バージョンまたは異なるパルボウイルスタンパク質でない、好ましくは、1/100がVP3のN末端伸長バージョンまたは異なるパルボウイルスタンパク質である、より好ましくは、1/250がVP3のN末端伸長バージョンまたは異なるパルボウイルスタンパク質である、本質的に、1/500またはそれ未満しかVP3のN末端伸長バージョンまたは異なるパルボウイルスタンパク質でないことを意味する。パルボウイルスキャプシドは、野生型配列またはその変異型のVP3である1種類のタンパク質のみからなることが特に好ましい。

【0029】

「コード配列」または「cds」は、遺伝子産物のみアミノ酸(AA)配列を直接指定する遺伝子部分を意味する。従って、「VP3コード配列」または「VP3 cds」は、遺伝暗号がVP3のアミノ酸(AA)配列に翻訳されるcap遺伝子部分を規定し、本発明においてさらに定義されるように野生型でもよく変異型でもよい。VP3 cdsはcap ORFの3'末端に位置し、メチオニンをコードするATGヌクレオチドトリプレットから開始する。選択された個々のパルボウイルスに応じて、VP3 cdsは約533個のAaに翻訳される。例えば、AAV2の場合、主要なコートタンパク質VP3のcdsは、Ruffing et al.(1994)に従ってNCBIエントリー(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)NC_001401(ヌクレオチド2809-4410)から入手することができ、AA配列は、対応するNCBIエントリーYP_680428から入手することができる。本発明のVP3 cdsは、本発明の方法に従って粒子形成が可能なVP3タンパク質をコードする。N末端伸長VP3タンパク質は、VP2のそれぞれのAasの1つまたは複数を含む。従って、以下でさらに定義さ

れる、VP3に対して異種の配列、例えば、タグまたはエピトープのN末端挿入を有するVP3とは対照的に、VP2はN末端伸長VP3とみなすことができる。

【0030】

遺伝暗号は、「コドン」とよばれるトリヌクレオチド配列間の地図およびAaを規定する。核酸配列内にあるトリプレットコドンは、通常、1種類のAAを指定する。

【0031】

「読み枠」は、DNAまたはRNAにおける連続し、かつ重複しないトリヌクレオチドコドンセットである。mRNA鎖には3種類の可能性のある読み枠、二本鎖DNA分子には、転写が起こり得る鎖が2本あるために6つの可能性のある読み枠がある。「オープンリーディングフレーム」(ORF)は、開始コドン、通常、3ヌクレオチドの倍数である長さを有し、停止コドンで終わる後の領域を含有する読み枠である。ORFはタンパク質を潜在的にコードしている可能性がある。1個または2個のヌクレオチドが挿入されると、異なる読み枠に明確にシフトする(フレームシフト変異)。通常、ATGが開始コドンとして用いられる。しかしながら、AAVのVP2から既に知られているように、時として非標準の開始コドンが用いられる。

【0032】

「変異」とは、生物の遺伝物質のヌクレオチド配列に対する変化である。このような変異は、コードされるタンパク質の変化につながる場合があり、従って、変異が起こる場所、ならびに変異によって、コードされるタンパク質の構造および/または機能が変わるかどうかによって様々な効果を及ぼす場合がある。構造上、変異は、点変異、DNAに1つもしくは複数の余分なntを付加する/タンパク質に1つもしくは複数の余分なAAを付加する挿入、または1つもしくは複数のnt/AAを削除する欠失として分類することができる。nt/AAの「挿入」は、一般的に言って、少なくとも1つの異種nt/AAの挿入であり、本発明の場合、パルボウイルスタンパク質の配列への少なくとも1つの異種nt/AAの挿入である。これに関連して「異種」とは、パルボウイルスタンパク質が得られたウイルスと比較して異種であることを意味する。パルボウイルス構造タンパク質について例示されたように、挿入Aaは、単に、パルボウイルス構造タンパク質の所定の2個のAa間に挿入されてもよい。Aaの挿入は、挿入部位におけるパルボウイルス構造タンパク質の所定のAaの欠失と共に行われてもよく、これが、パルボウイルス構造タンパク質のAaの完全置換(例えば、所定の10個のAaが10個以上の挿入Aaによって置換される)、または部分置換(例えば、所定の10個のAaが8個の挿入Aaによって置換される)につながってもよい。

【0033】

オープンリーディングフレームが5'末端の近くにある開始コドンから開始することに加えて、タンパク質合成を開始するには、開始コドンの局所環境における、いくつかのさらなる配列要件を満たさなければならない。これらの1つが「コザック配列」である。所定のmRNAから合成されるタンパク質の量はコザック配列の強さに左右される。「強力な」コンセンサスの場合、番号1と呼ばれる翻訳開始コドンを基準にして、位置+4にあるヌクレオチド(すなわち、コンセンサスの中にあるG)および-3にあるヌクレオチド(すなわち、コンセンサスの中にあるAまたはG)は両方ともコンセンサスと一致しなければならない(番号0の位置はない)。「十分な」コンセンサスには、これらの部位のうち1つしかないのに対して、「弱い」コンセンサスはどちらもない。-1および-2にあるccは保存されていないが、全体の強さの一因となる。-6位置にあるGが翻訳開始において重要であるという証拠もある。

【0034】

2つの配列、特定のアミノ酸配列に関して「パーセント同一性」という用語は、2つの配列のアラインメントにおける同一のアミノ酸または塩基の数を示す。正規化(normalization)のために、長い方の配列の長さ、短い方の配列の長さ、または両配列に占めるアラインメントの列の長さを使用することができる。通常、配列のパーセント同一性を求めるために、配列アラインメントソフトウェアが用いられる。大まかな配列アラインメントタスクに用いられる一般的なソフトウェアツールには、例えば、アラインメント用にClustalWおよびT-coffee、ならびにデータベース検索用にBLASTおよびFASTA3xが含まれる。当業者

であれば、パーセント同一性を評価する時に、適切な方法またはソフトウェアおよび適切な設定を選択できるであろう。

【0035】

「核酸分子」は、RNA、例えば、mRNAまたはcRNAの形をとってもよく、例えば、cDNAおよびゲノムDNAを含むDNAの形をとってもよく、例えば、クローニングによって得られてもよく、化学合成法によって作製されてもよく、またはその組み合わせによって作製されてもよい。DNAは、三本鎖、二本鎖、または一本鎖でもよい。一本鎖DNAは、センス鎖としても知られるコード鎖でもよく、アンチセンス鎖とも呼ばれる非コード鎖でもよい。

【0036】

「Rep非依存性プロモーター」は、Repタンパク質の非存在下で活性化することができるプロモーターであるのに対して、本発明に関連するRepは、パルボウイルスによってコードされる非構造タンパク質、特に、Muzyczka and Berns(2001)に記載のRep40、Rep52、Rep68、およびRep78を表す。これらのプロモーターには、例えば、異種の構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターが含まれる。

【0037】

「遺伝子発現」は、遺伝子、例えば、DNA配列からの遺伝情報が機能的な遺伝子産物、例えば、タンパク質または核酸になるプロセスである。従って、遺伝子発現は常に転写を含むが、必ずしもタンパク質への翻訳を含むとは限らない。rRNA遺伝子およびtRNA遺伝子は、それぞれ、発現してrRNAおよびtRNAになり、タンパク質に翻訳されない非タンパク質コード遺伝子の一例である。遺伝子発現が起こるためには、プロモーターは、好ましくは、結合部位を提供し、酵素を集めて転写を開始するように遺伝子の近くに存在しなければならない。

【0038】

遺伝子発現の「遮断」とは遺伝子発現がブロックされることを意味する。これは、遺伝子組換え(開始コドン、cdsの少なくとも一部、または、例えば、プロモーターのようなcds発現に必要な配列エレメントの少なくとも一部の変異または欠失を含む、DNA配列の変化)によるものでもよく、試薬、例えば、mRNA転写物または遺伝子に相補的な配列を有する短いDNAオリゴヌクレオチドまたはRNAオリゴヌクレオチドを用いた処理によるものでもよい。後者は、好ましくは、一過的な遮断に使用することができる。

【0039】

転写物の3'末端にある「ポリ(A)」部位は、細胞質に移動する前のRNAプロセッシング段階中に一続きのアデニンを付加するシグナルを送る。これらのいわゆるポリ(A)テールはRNA安定性を高める。

【0040】

「配列断片Z」または「断片Z」は、

(i)VP3開始コドン上流にある少なくとも44ヌクレオチド、かつ

(ii)以下:

(a)パルボウイルス、または

(b)AAV2に由来する断片Zのヌクレオチド配列と少なくとも60%、好ましくは80%、より好ましくは90%、特に99%、有利には100%同一のヌクレオチド配列(配列1、図2)、または

(c)4xSSC、0.1%SDSにおいて65℃で、AAV2の断片Z DNA分子の相補鎖にハイブリダイズする核酸配列、または

(d)トランス相補アッセイにおいて使用して、VP3 VLPの集合を引き起こすことができる核酸配列

に由来する、開始コドンから開始して242ヌクレオチドより多くのVP3 cdsを含む、DNA断片である。

【0041】

このことは、AAVキャプシド遺伝子が、mRNAオルタナティブスプライシングおよび別の翻訳開始コドンを用いて、同じORFの重複配列によってコードされているので、断片Zの配列が同時にVP2の一部およびVP3 cdsでもあることを意味する。従って、VP2遺伝子は、VP3

遺伝子の全配列と特定の5'領域を含有する(図1にある模式図)。

【0042】

本発明のポリペプチドまたは核酸の「機能活性変種」とは、本明細書において詳述された1つまたは複数の変異によって得られ、生物学的機能、例えば、VP3の集合を促進する能力を維持している点で機能活性のある変種として本発明の文脈において言及されたポリペプチドまたは核酸である。生物学的活性はトランス相補アッセイにおいて確かめることができる。トランス相補アッセイにおいては、このような核酸からこのようなポリペプチドが発現されると、VP3コード構築物からのVP3 VLPの集合を促進することができる。この場合、VP3コード構築物が適切な条件下で発現されてもVP3キャプシド集合には不十分である。適切で不十分なAAV2 VP3コード構築物は、pCMV-VP3/2809またはpCI-VP3である。適切な試験が実施例、例えば、実施例3に記載されている。好ましくは、生物学的機能の維持は、天然AAPの活性の少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、80%、または90%、さらにより好ましくは95%を有すると定義される。

10

20

30

40

50

【0043】

相補アッセイは実施例3に記載のように行うことができ、ELISA(実施例1.5)または免疫蛍光(1.6)によって分析することができる。両アッセイとも、集合状態にあるウイルスキャプシドに対するモノクローナル抗体の結合によるウイルス粒子の検出をベースとしている。例えば、モノクローナル抗体A20(Progen, Heidelberg, Germany)は、AAV2および他のいくつかのAAV血清型のウイルスキャプシドに結合し、さらに遠い関係にある血清型に特異的な抗体が市販されている。特異的抗体が利用できないのであれば、電子顕微鏡(例えば、Hoque et al.(1999b)を参照されたい)またはスクロース密度勾配分析(実施例1.3.2.)によって、ウイルスキャプシドを検出することができる。

【0044】

「VP3伸長バージョン」は、一般的に、数個のAaによるN末端伸長を含む。AAVキャプシド遺伝子が、異なる開始コドンを用いて同じORFの重複配列によってコードされているので、これらのN末端伸長は、VP2をコードする配列の3'部分を表すが、VP3をコードする配列の3'部分を表さない(図1)。従って、N末端伸長VP3はN末端切断型VP2と同一であり、これは、VP2の一部がVP3のN末端伸長の中に存在することができるが、完全なかつ無傷の野生型VP2タンパク質は、例えば、Ruffing et al.(1994)により示されるように発現されず、NCBI(エントリー番号:NC_001401)から入手可能であることを意味する。本発明によれば、粒子は(定義されたように)本質的にVP3からなり、従って、VP3伸長バージョンは非常にまれであるが、天然粒子はVP1:VP2:VP3を1:1:8の比で含む(Kronenberg et al., 2001)。

【0045】

所定の試料において発現したキャプシドタンパク質の組成を確かめるために、ウエスタンブロット分析を使用することができる。細胞溶解産物または精製されたVLPをスクロース勾配によって分画し、画分を、ゲル電気泳動およびニトロセルロース膜への転写によって分析することができる。ニトロセルロース膜において、標的タンパク質に特異的な結合剤を用いて、画分をプローブすることができる。モノクローナル抗体B1は、3種類全てのキャプシドタンパク質と反応し、VP3を検出するのに使用することができるが、モノクローナル抗体A69はVP1およびVP2としか反応せず、切断型VP2を検出するのに使用することができる。

【0046】

本発明に関連する「効率的な粒子形成」とは、粗溶解産物中、約 10^{11} 、好ましくは約 10^{12} 、より好ましくは約 10^{13} 粒子/ml(約 10^5 、好ましくは約 10^6 、より好ましくは約 10^7 粒子/トランスフェクト細胞に相当する)の高力価粒子が形成されることを意味する。

【0047】

「約」という用語は、本発明によれば、 $\pm 20\%$ 、特に、 $\pm 10\%$ 、特に、 $\pm 5\%$ の大まかな誤差範囲を意味する。

【0048】

ウイルス粒子力価は、未希釈の形をした、または希釈されたトランスフェクト細胞(前

記を参照されたい)の溶解産物から、モノクローナル抗体A20と、集合状態にあるウイルスキャプシドとの結合に基づいてウイルス濃度を測定する市販の力価測定ELISAキットを用いて定量することができる。既に述べたように、抗体A20が、例えば、異なるウイルス血清型のキャプシドに結合しなければ、粒子力価を電子顕微鏡によって視覚化し、計数によって定量することができる(Grimm et al., 1999、Grimm and Kleinschmidt, 1999、Mittereder et al., 1996)。

【0049】

タンパク質発現を分析し、その量を概算するために、トランスフェクトされた細胞の同一部分の細胞溶解産物をSDS-PAGE用に処理することができる。ゲル電気泳動およびニトロセルロース膜への転写を行うと、標的タンパク質(例えば、モノクローナル抗体B1、A69、抗GFP)に特異的な結合剤を用いて、タンパク質をプローブすることができる。タンパク質翻訳量は、そのタンパク質に特異的に結合する結合剤の量から概算することができる。これらの複合体は、例えば、免疫組織化学染色、免疫蛍光染色、または放射標識によって視覚化および定量することができる。

【0050】

「結合剤」という用語は、分子のそれぞれの結合パートナーに特異的に結合する分子をいう。一般的に用いられる結合剤は、抗体、特に、モノクローナル抗体、抗体誘導体、例えば、単鎖抗体または抗体断片である。原則的に、全てのクラスの抗体を使用することができ、IgG抗体が好ましい。抗体の断片または多量体も等しく使用することができる。一般的に用いられる断片は、単鎖抗体、Fab断片、または(Fab)₂断片である。他の適切な結合剤の例は、タンパク質スキファールド、例えば、アンチカリン(anticalin)もしくはリボカリン(Nygren and Skerra, 2004)、受容体もしくはその一部(例えば、可溶性T細胞受容体)、アンキリン、ミクロボディ、またはアプタマーである。

【0051】

「特異的に結合する」という用語は、2つの分子AおよびB、好ましくはタンパク質が互いに結合し、それによって、少なくとも $K_D=1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ 、好ましくは少なくとも $1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ 、より好ましくは少なくとも $1 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ 、特に少なくとも $1 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ の親和性($K_D=k_{off}/k_{on}$)で複合体ABが生じることを意味する。

【0052】

「エピトープ」は、免疫系によって認識される、具体的には、抗体、B細胞、またはT細胞によって認識される高分子の一部である。

【0053】

「ミモトープ」は、キャプシドの三次構造全体のために極めて近傍に位置する、構造タンパク質直鎖配列の異なる領域に由来するいくつかのAaからなる、または炭水化物残基、核酸、もしくは脂質などの非ペプチド構造に由来する非直鎖の構造エピトープであり、このような非直鎖構造エピトープは抗体に特異的に結合する。従って、ミモトープは、エピトープの構造を模倣することによって、エピトープによって誘発される抗体応答と同一の抗体応答を引き起こす。本発明に関連するミモトープは、挿入されたペプチド配列(の一部)のみからなってもよく、挿入されたペプチドおよびパルボウイルスコア粒子AA残基からなってもよい。

【0054】

本明細書で使用する「B細胞エピトープ」という用語はミモトープも含むことが意図される。従って、エピトープは直鎖のかつ構造的なエピトープでもよい。

【0055】

本発明の産物、方法、および使用に関連する「抗原」という用語は、免疫反応が誘導されるべき全ての標的抗原を指す。このような標的抗原は、通常、体液性免疫応答に感受性の高い抗原である。このような標的抗原は、通常、翻訳後修飾され得るタンパク質、例えば、グリコシル化されるタンパク質である。

【0056】

「免疫グロブリン」(Igと省略する)という用語は、免疫原性抗原による浸潤に应答して

10

20

30

40

50

誘導され、病原体を根絶することによって宿主を保護する、血清中に天然にある全ての糖タンパク質を指す。IgM、IgG、IgA、IgD、およびIgEとして知られる全部で5つのヒト抗体クラスがあり、これらはこのタンパク質グループに属する。

【0057】

第1の局面において、本発明は、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:22からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸、またはこれらのアミノ酸配列のいずれかの機能活性変種を含むポリペプチドをコードし、いずれのRep機能タンパク質も発現することができず、特に、Rep40、Rep52、Rep68、Rep78、VP1、VP2、およびVP3を発現することができない核酸に関し、機能活性変種は、(i)SEQ ID NO:1~22のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも60%同一のアミノ酸配列を有する、ならびに/または

(ii)6xSSC、5xデンハルト液、0.5%SDSの中で、40℃で2~12時間、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、およびSEQ ID NO:44からなる群より選択される核酸配列、もしくはSEQ ID NO:23~44の核酸配列のいずれかに相補的な核酸配列にハイブリダイズするcDNAによってコードされる、ならびに/または

(iii)VP1、VP2、およびVP3をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)とインフレームにないORFを含み、VP3 ORFの378ヌクレオチドより多くを含む、パルボウイルスゲノムの一部によってコードされる。

【0058】

今までに特定されていなかったAAV2 cap遺伝子産物が同時発現すると、正二十面体キャプシドへのVP3の集合が効率的に促進されることが証明された。このタンパク質は集合活性化タンパク質すなわちAAPと命名され、cap遺伝子のORF2によってコードされ(第1のORFはVP1、VP2、およびVP3をコードする)、約23kDaの分子量を有する。ウエスタンブロットから見積もられたAAPの分子量はこれより大きく(約30kDa)、おそらく翻訳後修飾が原因である。その細胞局在は核小体にあり、VPタンパク質を、キャプシド集合が起こる核小体に標的化する。しかしながら、VP3のみの核小体局在ではキャプシド形成に十分でない。このことから、AAPは、完全長AAVゲノム内でも、さらなるシャペロン型機能、スキャフォールド機能、および/または核形成機能を提供することが分かる。

【0059】

異なるパルボウイルスについて相同ポリペプチドを特定することができる。異なるパルボウイルスのcap遺伝子のORF2に由来する予測AAPタンパク質配列のこのようなアラインメントを図28に示した。従って、本発明の核酸は、好ましくはSEQ ID NO:1(AAV2)、SEQ ID NO:2(AAV1)のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:5(AAV5)のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードすることを特徴とする。

【0060】

天然のAAPは改変することができるが、機能活性が残っていると本発明によって想定される。このような機能活性変種は、例えば、構築物の発現、安定性、および/もしくは活性を高めるために、または構築物の簡単なクローニングを容易にするために作製することができる。従って、本発明はまた、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:22のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましく

は少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%、特に、100%同一のアミノ酸配列を有する、ならびに/または6xSSC、5xデンハルト液、0.5% SDSの中で、45、より好ましくは50、より好ましくは55、より好ましくは60、特に、65、有利には68で、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、およびSEQ ID NO:44の核酸配列のいずれかに相補的な核酸配列にハイブリダイズするcDNAによってコードされる、機能活性変種にも言及する。好ましくは機能活性変種は、前記の条件で、6xSSC、5xデンハルト液、0.5% SDSの中で、SEQ ID NO:23の核酸配列またはSEQ ID NO:23の核酸配列に相補的な核酸配列にハイブリダイズするcDNAによってコードされる。

10

【0061】

本発明の好ましい態様において、核酸は、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、およびSEQ ID NO:22からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする、またはこれらのアミノ酸配列のいずれかの機能活性変種からなるポリペプチドをコードする。ここで、機能活性変種は前記で定義されている。より好ましくは、核酸は、SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:22からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする。

20

【0062】

AAPを用いたN末切断実験およびC末切断実験により、AAV2のAAPの3'末端に関して、ATG₂₈₀₉から開始するVP3 ORFと重複する378ntはVP3キャプシド集合を支援できないが、VP3 ORFの445ヌクレオチドは、キャプシド収量においてwtAAVとほぼ同等の効率であることが見出されている。従って、本発明の核酸は、VP3 ORFの378ヌクレオチドより多く(例えば、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399ヌクレオチドより多く)、好ましくは少なくとも400ヌクレオチド(例えば、少なくとも400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424ヌクレオチド)、より好ましくは少なくとも425ヌクレオチド(例えば、少なくとも425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、または445ヌクレオチド)、特に少なくとも445ヌクレオチド(例えば、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487または488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500以上のヌクレオチド)を含むことを特徴とする。

30

【0063】

AAV2のAAPの5'末端に関して、VP3開始コドンの上流に44ヌクレオチド伸長のある核酸によってコードされるN末切断型AAPは、翻訳がORF2とインフレームに挿入されたATGによって開始されれば、キャプシド収量においてwtAAVとほぼ同等の効率があり、ATG開始コドンが挿入されなければ効率はさらに低い(データ示さず)。位置2858にあるACGの代わりにATGから開始する核酸によってコードされるN末切断型AAPは、検出可能なキャプシド形成につながらなかった。AAV4およびAAV9について、検出可能なキャプシド集合には、それぞれのVP3開始コドンから始まるVP3 cds発現構築物で十分であり、従って、機能的AAP(変種)を依然としてコードすることが示された(データ示さず)。

40

【0064】

従って、本発明の核酸は、VP3開始コドンの5'側に直接連続して位置する、隣接するVP2コードヌクレオチドの少なくとも44ヌクレオチド(例えば、44、45、46、47、48、49、ま

50

たは50ヌクレオチド)、好ましくは少なくとも20ヌクレオチド(例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、または43ヌクレオチド)、より好ましくは少なくとも5ヌクレオチド(例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19ヌクレオチド)を含むことを特徴とする。

【0065】

AAPをコードする核酸またはその変種は、AAV4およびAAV9から分かるように(前記)、VP3開始コドンの3'側からでも開始することができる。従って、別の好ましい態様において、本発明の核酸は、その開始コドンがVP3開始コドンの4ヌクレオチド下流にある、好ましくは24ヌクレオチド下流にある、より好ましくは44ヌクレオチド下流にあるATGであることを特徴とする。

10

【0066】

従って、好ましい態様において、本発明の核酸は、VP3開始コドンの少なくとも44ヌクレオチド上流から445ヌクレオチド下流までのヌクレオチド(計算はATGを含む)、好ましくは、VP3開始コドンの少なくとも20ヌクレオチド(例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、または44ヌクレオチド)上流から425ヌクレオチド(例えば、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、または445ヌクレオチド)下流までのヌクレオチド、特に、VP3開始コドンの少なくとも5ヌクレオチド(例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19ヌクレオチド)上流から400ヌクレオチド(例えば、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、または424ヌクレオチド)下流までのヌクレオチドを含む。従って、本発明の核酸の全長は、少なくとも489nt(例えば、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500以上のnt)、好ましくは少なくとも445nt(例えば、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、または488nt)、特に少なくとも405nt(例えば、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、または444nt)である。

20

30

【0067】

本発明の核酸は、VP3のキャプシド集合を促進するタンパク質を発現することができる。本発明の核酸は、AAV2に由来し、(野生型AAV2配列に見出される)その翻訳開始コドンは、C₂₇₂₉TG、A₂₇₃₅CG、A₂₇₁₇TT、もしくはT₂₇₂₀TGであることを特徴としてもよく、本発明の核酸は、別のパルボウイルスに由来し、その翻訳開始コドンは、AAV2の翻訳開始コドンの相同部位であることを特徴としてもよい。他のパルボウイルスの相同開始コドンは、所定のアラインメントによって(図27を参照されたい)、および潜在的な非標準開始コドンによってコードされるアミノ酸を探すことによって容易に特定することができる。このような潜在的な非標準開始コドンは、実施例14においてAAV2 C₂₇₂₉TGに対して行われたように変異分析によって容易に確認することができる。図27に示されていないパルボウイルスについては、このような配列を所定のアラインメントに容易に加えることができる。

40

【0068】

好ましい態様において、AAPをコードするORFは、ATG開始コドンを作製して、オープンリーディングフレームの翻訳の改善するやり方で変異されるが、「改善」とは、AAPまたはその変種の発現が、それぞれの野生型配列と比較して高いことを意味する。好ましくは、AAV2の翻訳開始コドンまたは他のパルボウイルスの相同部位はATG開始コドンに変異される。一般的に、標準開始コドンATGから翻訳が開始されると、AAPまたはその変種の発現が最適化され、従って、AAPまたはその変種が最適以下である時に、キャプシド集合の収量が増加する。このことは、それぞれのウイルスが適合されていない細胞に発現系を切り

50

替えるのであれば特に有益になる。非宿主細胞におけるAAPまたはその変種の発現は最適以下であると想定することができる。例えば、昆虫細胞またはバキュロウイルス感染に適した他の細胞において、酵母または細菌においてキャプシドを製造することが本発明の中で予想される。これらの細胞においてキャプシド形成を増やすためには、AAPまたはその変種の発現を最適化することがかなり有益または重要な場合がある。

【0069】

このようにAAPの開始コドン(ATG)に変異させると、シス状況ではキャプシド形成が低下する場合があるが(この場合、AAPは、VP3をコードするORF1と共に重複核酸によってコードされる)、AAPが、VP3をコードするORF1とは独立してコードされるトランス構成において、このような変異は特に有益である(実施例14)。

10

【0070】

核酸は、核酸のポリペプチドコード配列の後にポリ(A)シグナルが続くことを特徴とすることが当技術分野において周知であり、本発明の一部である。

【0071】

本発明の1つの局面において、本発明の核酸は、ポリペプチドコード配列を転写するプロモーターを含む。好ましい態様において、異種プロモーター、すなわち、AAPをコードする核酸を得たウイルスに存在しないプロモーター、または好ましくは、パルボウイルス野生型ゲノムに存在しないプロモーターが用いられる。本明細書に記載の方法において使用することができるプロモーターは、本明細書に記載の例に限定されない。プロモーターは、任意の公知のプロモーターでもよく、後で発見されるプロモーターでもよい。例えば、初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(US4,168,062)のような連続的に転写される構成的プロモーターが本発明において有用であり、同様に、抗生物質特異的プロモーターまたは細胞特異的プロモーターなどの誘導性プロモーターも本発明において有用である。哺乳動物細胞系における発現のために、CMVプロモーターの使用が特に好ましく、例えば、トランスフェクション法を用いた製造プロセスにおける使用のために特に好ましいが、昆虫細胞においては、ポリヘドリンプロモーター(PoIH)の使用が好ましい。誘導性異種プロモーターは、VP3の安定した産生細胞を樹立するのに使用することができるので特に好ましい。

20

【0072】

パルボウイルスの中ではゲノム組成が高度に保存されているので、本発明を他のパルボウイルスメンバーに簡単に移しかえることができる。パルボウイルスの中で、本発明の核酸が得られる好ましいウイルスは、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ガチョウパルボウイルス、アヒルパルボウイルス、およびヘビパルボウイルスである。好ましいAAVは、ウシAAV(b-AAV)、イヌAAV(CAAV)、マウスAAV1、ヤギAAV、ラットAAV、トリAAV(AAAV)、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびAAV13、特に、AAV2からなる群より選択される。

30

【0073】

さらなる局面において、本発明の核酸は、発現カセット、構築物、ベクター、または細胞株の中に含まれる。構築物、典型的にはプラスミドは、一般的に、本発明の核酸、およびさらなる配列、例えば、ポリクロニングサイト、複製起点、選択マーカー遺伝子などを含む核酸である。発現カセットは、一般的に、細胞内に入ったら、本発明の核酸によってコードされるタンパク質を、細胞転写機構および翻訳機構によって産生することができる構築物である。発現構築物は、エンハンサーまたはプロモーター領域として働き、本発明の核酸の効率的な転写につながる調節配列を含有するように操作される。発現構築物は、通常、後でポリアデニル化されるポリ(A)部位をさらに含む。ポリ(A)部位は、mRNAの核外輸送、翻訳、および安定化に重要である。ベクターは、本発明の核酸を細胞に導入するのに用いられる構築物である。トランスフェクトしようとする細胞に応じて、ベクターは当業者によって構築される。これらは、リン酸カルシウムトランスフェクションもしくはリポソームトランスフェクション用のプラスミド、またはウイルスベクター、例えば、バキュロウイルスでもよい。細胞株は、AAPもしくはその変種の発現またはAAP(変種)をコー

40

50

ドするプラスミドの複製に適した実験用細胞株である。

【0074】

本発明のさらなる局面は、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドである。基礎をなす天然ポリペプチドは集合活性化タンパク質(AAP)と呼ばれる。従って、本発明の核酸によってコードされるこのポリペプチドの変種は、AAP変種と呼ばれる。例えば、AAPタンパク質および1つまたは複数のさらなるペプチドを含む変種は、AAP含有ポリペプチドと呼ばれる。タンパク質AAPは、(ORF1を規定するVP3の開始コドンを含む)ORF2から発現され、約23kDaの計算分子量を有し、核小体においてVP3キャプシド集合をもたらしことができる。これは、全AAVゲノムの中でのキャプシド形成にも必須である。これは、VPタンパク質を核小体に標的化し、核小体の中の集合反応促進においてさらなる機能を発揮する。

10

【0075】

本発明のさらなる局面は、本発明の核酸を宿主細胞において発現させることによって、本発明のポリペプチド、すなわち、AAPまたはAAP変種を産生する方法である。このような産生は、パルボウイルスのキャプシド形成、一般的にかつ具体的には、VP3を含むがVP1およびVP2ならびにRepタンパク質を含まないキャプシドを促進するのに適している。適切な宿主細胞は、当業者によって当業者のニーズおよび好みに応じて選択することができる。好ましい宿主細胞は、哺乳動物細胞株、特に、ヒト細胞株、バキュロウイルス感染に用いられる細胞株、細菌株、および酵母株からなるリストより選択される。

【0076】

本発明のさらなる局面は、AAPに特異的に結合する抗体、または、AAPに特異的に結合する結合剤全般である。特に、抗体は、SEQ ID NO:1~22のどの配列にも特異的に結合する。このような抗体は、AAPの機能をさらに調べるのに用いられてもよく、異種発現系におけるトランス作用因子として用いられる場合、パルボウイルスDNAまたはウイルス様粒子の商業生産のためにAAP発現レベルを確認および最適化するのに用いられてもよい。好ましい抗体は、AAV2のAAP(SEQ ID NO:1)に特異的に結合することを特徴とする。本発明の抗体はポリクローナルでもよく、モノクローナルでもよい。さらに、単鎖抗体、scF_vs、F_{ab}断片、ナノ抗体などの対応する抗体断片、または抗体多量体が発明に含まれる。

20

【0077】

本発明のさらなる局面は、AAPおよびAAP変種を含む本発明のポリペプチドを調製するための本発明の核酸の使用である。

30

【0078】

本発明のさらなる局面は、パルボウイルスおよびパルボウイルス粒子を調製するための本発明の核酸またはポリペプチドの使用である。AAPが特定されると、収量を増加させるように、または安定にトランスフェクトされた産生細胞株を用いる誘導性産生系を作製するように発現構築物を個々に最適化できるので、このようなウイルスを製造する、以前は分からなかった可能性が生まれる。異種プロモーターの使用によって、発現を増大させることができる。具体的には、機能的RepならびにVP1およびVP2をコードする配列の非存在下で、粒子を調製することができるので、機能タンパク質VP1、VP2、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78をどれも含まないパルボウイルス粒子の製造が可能になる。これらの因子は全て、このようなウイルスおよび粒子の強く、速く、かつ安価な産生系の作製に関して重要である。

40

【0079】

本発明の1つの局面は、VP3から本質的になるパルボウイルス粒子を産生する方法である。前記方法は、(i)rep非依存性プロモーターの制御下にある、パルボウイルスに由来するVP3コード配列(cds)からVP3を発現することができ、かつ本発明の核酸によってコードされるタンパク質を発現することができる細胞を提供する工程、(ii)VP3および本発明の核酸に由来するタンパク質の発現を促す条件で細胞をインキュベートし、それによって、パルボウイルス粒子を産生する工程、ならびに(iii)任意で、細胞からパルボウイルス粒子を精製する工程であって、細胞1個あたり少なくとも10⁵個のウイルス粒子が形成され、機能的VP1、VP2、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78タンパク質は発現されない、工程を含

50

む。この方法は、本発明の核酸の代わりに断片Zを用いて等しく適用することができる。

【0080】

別の局面において、本発明は、VP3から本質的になるパルボウイルス粒子を産生する方法を提供する。前記方法は、以下の工程：

i. 細胞において、rep非依存性プロモーターの制御下にある、パルボウイルスに由来するVP3コード配列(cds)からVP3を発現させる工程、

ii. 細胞において、rep非依存性プロモーターの制御下にあるDNA配列断片(断片Z)を発現させる工程であって、断片Zは、

(1)VP3開始コドン上流にある少なくとも44ヌクレオチド、かつ

(2)以下：

a)パルボウイルス、または

b)AAV2に由来する断片Zのヌクレオチド配列と少なくとも60%、好ましくは80%、より好ましくは90%、特に99%、有利には100%同一のヌクレオチド配列(配列1、図2)、またはc)4xSSC、0.1%SDSにおいて65℃で、AAV2の断片Z DNA分子の相補鎖にハイブリダイズする核酸配列(配列2)、または

d)トランス相補アッセイにおいて使用して、VP3 VLPの集合を引き起こすことができる核酸配列

に由来する、開始コドンから開始して242ヌクレオチドより多くのVP3 cds

を含む、工程、

iii.VP3発現に適した条件下で細胞をインキュベートする工程、ならびに

iv.細胞からパルボウイルス粒子を精製する工程を含み、細胞1個あたり約 10^5 個、好ましくは約 10^6 個、より好ましくは約 10^7 個のウイルス粒子が形成され、VP1、VP2、およびRepタンパク質(特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78)は本質的に発現されない。

【0081】

これらの方法の発明は、パルボウイルス科のウイルスに由来する粒子の作製に基づいている。パルボウイルス科においては、野生型は、キャプシドタンパク質としてVP1、VP2、およびVP3を発現する。VP3から本質的になるパルボウイルス粒子は、本質的に、VP1、VP2、およびRepの機能タンパク質、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78の発現の非存在下で、パルボウイルスVP3 cdsを発現させることによって作製することができる。結果として、精製されたパルボウイルス粒子は、1種類のキャプシドタンパク質のみから本質的になる。Repにより媒介されるDNAパッケージングは、粒子にRepが存在しないために完全に避けられる。本発明は、ワクチン開発に特に適した、VP3から本質的になる高力価のパルボウイルス粒子を提供する。

【0082】

VP3は単独ではキャプシドに集合できないことが当技術分野において周知である。本発明に関連して、細胞内で発現されればVP3粒子の集合を媒介する、AAPと命名された新規のポリペプチドをコードする核酸、配列エレメントZ(断片Z)が特定された。VP3は、キャプシド集合のためにさらなるウイルスタンパク質を必要としない。

【0083】

いくつかの証拠から、VP3は、キャプシド集合のためにcap遺伝子に由来するRNAを必要とするという結論が出た。VP3キャプシド集合に必要とされるこの因子は、gfpと融合したcap遺伝子断片(VP2N-gfp)の状態でトランスで提供することができた。このcap遺伝子断片の第1のORF(VP1、VP2、およびVP3をコードするORF)からのタンパク質発現は、cap遺伝子の関連領域にある停止コドンを含むいくつかの構築物がヘルパー機能も提供するので必要なかった。読み過ごし転写物からのVP2N-gfpの発現は、ウエスタンブロット分析によって検出できなかった。従来にはない翻訳開始部位で開始し、停止コドンが続く、このようなタンパク質発現は非常に起こりにくく、その量は非常に少ないだろう。VP2N-gfpのこのようなタンパク質発現でもVP3のキャプシド集合の刺激に十分でない。このことは、別のコドンを用いた、このタンパク質の発現によってはっきりと示されている。このタンパク質の発現から、高いVP2N-gfpタンパク質レベルが得られたが、VP3キャプシド集合は起

10

20

30

40

50

こらなかつた。このようなコドン変化はヌクレオチド配列の変化を意味するので、正しいヌクレオチドが集合ヘルパー効果に必要であり、第1のORFの発現タンパク質は必要でないことは明らかである。最後に、プラスミドによって、転写することができない正しいヌクレオチド配列を第1のORFの中に設けてもキャプシド集合は起こらなかつた。このことは、正しいヌクレオチド配列の転写が必要であることを証明している。

【 0 0 8 4 】

図2に示したように、断片Zは、VP3開始コドンの上流にある少なくとも44ヌクレオチドおよびVP3開始コドンの下流にある242ヌクレオチドより多くを含む。好ましくは、断片Zは完全長VP3 cdsを含まない。断片Zの配列は、図2に列挙した多くの異なるパルボウイルスの1つから得ることができる。図2には、パルボウイルスAAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV10、AAV11、およびb-AAVの断片Zのそれぞれの領域のヌクレオチド配列のいくつかの例を示した。このリストは、ここに示したパルボウイルスに限定されない。さらなる配列を、VP3開始コドンの位置に合わせて簡単にアラインメントし、断片Zとして選択することができる。ヌクレオチド配列はまた、AAV2に由来する断片Zのヌクレオチド配列(SEQ ID NO:45、以下を参照されたい)との同一性によって断片Zとして選択することもできる。同一性は、少なくとも60%、好ましくは80%、より好ましくは90%、特に99%、有利には100%である。さらに、4xSSC、0.1% SDSにおいて65℃で、AAV2の断片Z DNA分子の相補鎖(SEQ ID NO:46、以下を参照されたい)にハイブリダイズするヌクレオチド配列もまた、断片Zとしてトランス相補アッセイにおいて用いて、VP3 VLPの集合を引き起こすことができる。断片ZがAAV2に由来し、SEQ ID NO:45を含むことが特に好ましい。

【 0 0 8 5 】

AAV2に由来するDNA配列断片Zのヌクレオチド配列(SEQ ID NO:45、図2にも示した):

```

1  tcggacagcc accagcagcc ccctctggtc tgggaactaa tacgatggct
51  acagggcagtg gcgcaccaat ggcagacaat aacgagggcg ccgacggagt
101 gggtaattcc tcgggaaatt ggcattgcga ttccacatgg atgggcgaca
151 gagtcatcac caccagcacc cgaacctggg ccctgcccac ctacaacaac
201 cacctctaca aacaaatttc cagccaatca ggagcctcga acgacaatca
251 ctactttggc tacagcaccc cttgggggta ttttgac

```

【 0 0 8 6 】

未知のDNA断片を断片Zとして特定するためにハイブリダイゼーション実験において使用することができる、SEQ ID NO:45の逆方向の相補的な配列(SEQ ID NO:46):

```

1  gtcaaaatac cccaagggg tgctgtagcc aaagtagtga ttgtcggtcg
51  aggctcctga ttggctggaa atttgtttgt agaggtggtt gttgtaggtg
101 ggcagggccc aggttcgggt gctggtggtg atgactctgt cgcccatcca
151 tgtggaatcg caatgccaat ttcccaggga attaccact cgtcggcgc
201 cctcgttatt gtctgccatt ggtgcgccac tgccgttagc catcgatta
251 gttcccagac cagagggggc tgctggtggc tgtccga

```

【 0 0 8 7 】

VP3 cdsおよび断片Zまたは本発明の核酸の配列の転写を開始するために、1つまたは2つの「Rep非依存性プロモーター」が選択される。rep非依存性プロモーターは、パルボウイルス因子Repの非存在下でVP3および断片Zを発現させるために用いられる。Repは、パルボウイルス粒子へのウイルスゲノムおよび非特異的DNAのパッケージングを担っているため避けなければならない。本発明のために、意図せずにパルボウイルス粒子が遺伝子療法ベクターとして働くことがあるので、ウイルスDNAまたは非特異的DNAのパッケージングを避

けなければならない。VP3発現および断片Zまたは本発明の核酸の転写のために「Rep非依存性プロモーター」を用いることによって、RNAポリメラーゼは、Repタンパク質発現の非存在下での転写を開始することができるので、Repタンパク質、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78の非存在下でのキャプシドの製造が可能になる。Rep非依存性プロモーターは、例えば、異種構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターである。

【0088】

従って、本発明の1つの局面において、本発明の核酸は、ポリペプチドコード配列の転写を動かすプロモーターを含む。好ましい態様において、パルボウイルス野生型ゲノムに存在しない異種プロモーターが用いられる。本明細書に記載の方法において使用することができるプロモーターは、本明細書に記載の例に限定されない。プロモーターは任意の公知のプロモーターでもよく、後で発見されるプロモーターでもよい。例えば、初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(US4,168,062)のような連続的に転写される構成的プロモーターが本発明において有用であり、同様に、抗生物質特異的プロモーターまたは細胞特異的プロモーターなどの誘導性プロモーターも本発明において有用である。哺乳動物細胞系における発現のためには、例えば、トランスフェクション法を用いた製造プロセスにおける使用のためには、CMVプロモーターの使用が特に好ましいが、昆虫細胞においては、ポリヘドリンプロモーター(PoIH)の使用が好ましい。誘導性異種プロモーターは、VP3の安定した産生細胞を樹立するのに使用することができるので特に好ましい。

【0089】

VP発現に適した条件は当技術分野において周知であり、原則として、VP3のみの発現に移しかえることができる。パルボウイルスまたは特にパルボウイルス粒子を産生するためには、それぞれのDNA配列を細胞に移入しなければならない。プロトコールの1つを実施例に記載した。しかしながら、代わりに、異なるトランスフェクション方法、異なる細胞、または安定にトランスフェクトされた細胞を使用してもよい。異なる産生方法は、例えば、Grimm et al.(2002)およびGrieger and Samulski(2005)に記載されている。

【0090】

本発明の方法は高収量のパルボウイルス粒子につながる。ここで、トランスフェクト細胞1個あたり、約 10^5 個、好ましくは約 10^6 個、より好ましくは約 10^7 個のウイルス粒子が形成される。これらの数は、粗溶解産物1mlあたり、約 10^{11} 個、好ましくは約 10^{12} 個、より好ましくは約 10^{13} 個の粒子に相当する。VP3粒子の商業的使用には、高収量の粒子をもたらす効率的な産生方法が必要である。

【0091】

粒子は、本明細書および先行技術においてに開示された方法によって精製することができる。

【0092】

断片Zまたは本発明の核酸の配列およびVP3 cdsは、VP3のみからなるパルボウイルス粒子が産生されるように配置および発現されることが特に好ましい。これに関連して、「のみからなる」とは、ウェスタンブロッティングなどの一般的な方法によって、他のタンパク質分子が粒子の一部として検出できないことを意味する。このような粒子は、他の分子または塩、例えば、水および緩衝液の他の構成要素を含んでもよい。さらに、粒子は、細胞内での粒子集合中に偶然に中に入った分子を含んでもよい。

【0093】

本発明の1つの態様によれば、断片Zまたは本発明の核酸の配列はVP3 cdsと重複しないので、VP3のみからなるパルボウイルス粒子が得られる。このために、粒子に存在する準化学量論数のN末端伸長VP3タンパク質の発現が避けられる(実施例4を参照されたい)。このような少数のN末端伸長VP3タンパク質は、十中八九、粒子の活性または収量に影響を及ぼさないだろう。しかしながら、医用薬剤の規制面では、1種類のタンパク質生成物を有することが有利である。

【0094】

従って、本発明のパルボウイルス粒子はVP3のみから組み立てられることが特に好まし

い。この目的のために、VP1、VP2、およびRep、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78の発現は、当業者に周知の方法によって、例えば、それぞれの開始コドンの欠失もしくは変異、タンパク質に特異的なcdsの欠失(全体もしくは一部)、またはタンパク質に特異的なcdsの変異によって細胞において遮断されるので、機能的な遺伝子産物の発現が回避される(例は、例えば、Warrington et al.(2004)に記載されている)。

【0095】

ほとんどの真核生物mRNAにおける翻訳開始部位は、開始コドンの特定において5'末端の近傍にあることが中心的な役割を果たしていると予測するスキャニング機構を介して選択されるようである。この「位置効果」は、転写物の最初の(最も上流にある)ATG開始コドンが翻訳を開始するという原因となる(Kozak, 2002)。

10

【0096】

パルボウイルス/AAVキャプシドタンパク質の発現に注目すると、このことは、最初のATGからのVP1の合成を主に占めるのはマイナーなスプライシング転写物であり、VP3の翻訳が主に、メジャーなスプライシング転写物の最も上流にあるATGであるそのATG開始コドンから開始することを意味している。このメジャーなスプライシングRNAはまた、VP3開始部位の上流にある珍しいVP2 ACG開始コドンもコードする。従って、メジャーなスプライシング転写物から効果的に合成されるVP3に加えて、ある程度、VP2が発現する(Becerra et al., 1988、Becerra et al., 1985)。

【0097】

一般的に、位置効果は、変異によって正常開始部位が不活化または除去され、翻訳が下流開始部位にシフトする場合においても明らかである。従って、一部の疾患状態において周知の問題であるサイレントな内部ATGコドンを活性化することができ、翻訳効率を高めることができる(Kozak, 2002)。

20

【0098】

この知識を考慮に入れると、VP1およびVP2の発現を不活化するようにVP1開始コドンおよびVP2開始コドンを変異誘発することによって、野生型ではサイレントな、下流部位で開始する切断型タンパク質の翻訳を活性化することができる(Warrington et al.(2004)に記載、および実施例2.2.において観察)。

【0099】

従って、確実にVP3が、発現される唯一のキャプシドタンパク質となるように、キャプシドタンパク質について知られている主な開始コドンに加えて、好ましくは、このような別の開始コドンが欠失または変異される。VP3のみの発現および他のキャプシドタンパク質の遮断は、説明したようにウェスタンブロッティングを介して制御することができる。

30

【0100】

さらに好ましい態様において、VP3をコードする発現カセットから、VP3配列をコードしないVP1コード配列およびVP2コード配列は完全に欠失される。このような場合、VP3キャプシドを産生するために、断片Zまたは本発明の核酸はトランスで提供される。

【0101】

本発明の好ましい態様において、断片Zまたは本発明の核酸のDNA配列の後にポリ(A)シグナルが続く。遺伝子の転写が終わったら、ポリ(A)シグナルは、ポリアデニル化機構を集めて、RNA分子上にひと続きのアデニン(ポリ(A)テール)を加えることができる。このプロセスは、細胞内での、断片Zから転写された因子の安定性を高める。ポリ(A)シグナル、例えば、SV40ラージT抗原に由来するポリ(A)は当技術分野において周知であり、全種類の発現カセットおよび構築物においていつも用いられる。

40

【0102】

VP3開始コドンの5'側にある異なる部位で発現を開始する一連の欠失変異体の本発明者らの分析から、変異体pCMV-VP3/2765は依然としてキャプシド集合を引き起こすことができることが分かった(実施例2.)。従って、前記で既に述べたように、断片Zは、VP3開始コドンの上流に少なくとも44ヌクレオチドを含まなければならない。5'側にヌクレオチドがいくつか伸長した断片Zを用いることで、粒子形成の効率が高まったので、断片Zは、VP

50

3開始コドンの上流に少なくとも113ヌクレオチド、または特に少なくとも198ヌクレオチドを含むことが好ましい。本発明者らの実験において、本発明者らは、ヌクレオチド2696 (VP3開始コドンの113ヌクレオチド上流に対応する)で開始するAAV2の断片Zを提供する構築物を選択した。図2には、下線を引いたVP3開始コドンを基準として、異なる血清型の配列を列挙した。この配列は、それぞれのNCBIエントリーに示されたヌクレオチド配列に応じて5'方向または3'方向に簡単に伸長することができる(図2の説明文を比較のこと)。

【0103】

断片Zの5'伸長配列が、VP1および/もしくはVP2の翻訳開始コドンまたはORF1、ORF2、またはORF3にある他の任意のATG開始コドンを含むのであれば、VP3を唯一のキャプシドタンパク質として発現させるために変異または欠失によって、これらを不活化しなければならない。

10

【0104】

さらに、断片Zは、VP3開始コドンの下流に242ヌクレオチドより多くを含まなければならない。断片Zは、開始コドンから開始して、VP3 cdsの約275ヌクレオチドより多く、約300ヌクレオチドより多く、約325ヌクレオチドより多く、約350ヌクレオチドより多く、約375ヌクレオチドより多く、約400ヌクレオチドより多く、約425ヌクレオチドより多く、最も好ましくは約445ヌクレオチドより多くを含むことが好ましい。特に好ましい断片Zはヌクレオチド3254 (VP3開始コドンの約445ヌクレオチド下流に対応する)のあたりで停止する。

【0105】

20

断片Zによってコードされる活性分子は、拡散性分子、すなわち、AAPと命名されたタンパク質である可能性が最も高い。縮重された遺伝暗号に基づいて、本発明者らは、キャプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3もコードするZの第1の読み枠(ORF1)にあるZの中にコードされている可能性のある推定拡散性タンパク質の潜在的に高い発現を得るように断片Zの配列を最適化した。それによって、ORF1の中にコードされるタンパク質のAA配列は変わらなかったが、他のORFによってコードされるタンパク質配列は、DNA配列を改変することによって妨害された。しかしながら、ウイルス粒子をもはや検出することができなかった(実施例5、図6)、このコドン最適化断片は粒子形成を媒介することができなかった。他方で、停止コドンをORF1の断片Zの中に挿入すると、ORF1からのタンパク質合成は遮断されるが、ORF1のDNA配列はわずかにしか変化せず、ORF2からのタンパク質合成は妨害

30

【0106】

断片Zの変異は、第1の読み枠または第3の読み枠においてタンパク質翻訳のために少なくとも1つの停止コドンを含むことが特に好ましい。結果として、断片Zのこれらの読み枠から、18AA以上の長さを有するタンパク質を翻訳することはできず、特に、VP2タンパク質またはその一部を産生することができない。従って、VP2またはその一部が粒子に含まれないことが主な利点である。

【0107】

本発明の好ましい態様として、断片Zまたは本発明の核酸の中にあるVP3の主な翻訳開始コドンATG(AA203、AAV2のVP1に従って番号付けした、(Girod et al., 1999))を変異させる。VP3の別のマイナーな開始コドン(AA211およびAA235(Warrington et al., 2004))の一方または両方も変異させることがさらに好ましい。さらに好ましい態様では、断片Zを提供する発現構築物からVP3の翻訳を完全に回避するために、VP3の翻訳開始に使用することができる全てのATGコドンを変異させる(多くの可能性のあるATGコドンがWarrington et al., 2004に列挙されている)。

40

【0108】

断片Zの産物および本発明の核酸のコードされている機能は、断片Zおよび本発明の核酸が拡散性分子をコードすることを意味するトランス作用エレメントであることが特徴であったので、断片Zまたは本発明の核酸の配列は、cap遺伝子またはその一部として、例えば、VP3 cdsとして、同じ核酸分子または異なる核酸分子に載せられて細胞に提供されても

50

よい。

【0109】

好ましい態様において、断片Zまたは本発明の核酸は、VP3 cdsに対して「シスで」提供される。断片Z/本発明の核酸が、VP3をコードする発現カセットに対して「シスで」提供されるのであれば、これは、断片Z/本発明の核酸およびVP3の発現が同じ1つのプロモーターによって駆動されることを意味する。断片Z/本発明の核酸の配列はVP3 cdsの上流または下流に位置してもよい。断片ZおよびVP3をコードする配列は直接連結されてもよく、様々な数のヌクレオチドによって分離されてもよい(図3.1.)。

【0110】

本発明のさらに具体的な態様では、断片Z/本発明の核酸はVP3 cdsのすぐ上流に位置する。断片Z/本発明の核酸は、VP3開始コドンの下流に242より多いヌクレオチドを含み、この配列は全く同じものが存在する必要はなく、直後のVP3 cdsはVP3 ORFの残りのDNA配列を提供するだけでよい(図を図3.1.aに示した))。この場合、準化学量論量のN末端伸長VP3が発現し、キャプシドの中に提示される(実施例4)。N末端伸長VP3のこの部分を増やさないために、新たな開始コドンを断片Z/本発明の核酸の5'末端もしくは上流に付加しないこと、または断片Z/本発明の核酸の5'末端もしくは上流にある既存の開始コドンを欠失させることが本発明の重要な態様の1つである。

【0111】

さらに、断片Z/本発明の核酸と重複しないVP3特異的cdsだけを簡単に変異させることができる。また、断片Z/本発明の核酸と重複するVP3の変異は、断片Z/本発明の核酸によってコードされる拡散性分子の配列を変える可能性がある。結果として、拡散性分子にはもはや活性がない場合もあるだろう。これに関連する変異は、サイレント変異、例えば、エピトープの挿入を含む。VP3 cdsを変異させる可能性を小さくするために、重複を最小限にする、すなわち、断片Z/本発明の核酸とVP3 cdsを分離することが有益である。これは、あるプロモーターが、断片Zに必須のVP3開始コドンの上流にある44ヌクレオチドを含有しないVP3 cdsの発現を動かし、分離している断片ZがこのようなVP3 cdsの前または後に配置されるシス状況で行うことができる。

【0112】

断片Z/本発明の核酸は、VP3 cdsに対して「トランスで」で提供されることが特に好ましい。断片Z/本発明の核酸が、VP3をコードする発現カセットに対して「トランスで」提供されるのであれば、これは、断片Z/本発明の核酸およびVP3の発現は別々のプロモーターによって駆動されることを意味する(「シス」とは反対である。前記を参照されたい)。断片Z/本発明の核酸の配列は、同じ構築物上でVP3 cdsの上流または下流に位置してもよく、VP3 cdsとは異なる発現構築物上にあってもよい(例を図3.2.に図示した)。

【0113】

この場合、断片ZはVP3 cdsの5'末端のみを含み、従って、主な利点は、N末端伸長VP3(以下を参照されたい)は発現できず、キャプシドに組み込まれることができないということである。従って、VP3および断片Zをコードする配列がトランスで提供されるのであれば、さらに純粋な粒子組成物、好ましくは、構造タンパク質VP3のみからなる粒子組成物を得ることができると考えられる。

【0114】

トランス配置の利点の1つは、例えば、断片Z/本発明の核酸の配列を変えることなく収量をさらに上げるために、発現細胞株に合わせてコドン使用頻度を最適化するように、VP3 cdsを簡単に改変できることである。断片Z/本発明の核酸に影響を及ぼすことなく、他の改変、例えば、変異、挿入、タグなども行うことができる。断片ZおよびVP3 cdsの重複配列にあるVP3の中の挿入部位を特定する以前の試みの中で、挿入によっても断片Zの発現またはAAPの機能が妨げられたので、潜在的に有用な挿入部位は特定されなかった。従って、重複のないシス構成または好ましくはトランス構成で、これらの配列を機能的に分離すると、VP3コード配列を独立して変異誘発することが可能になる。このような変異誘発は商業的にいくつも応用がきく。新規の遺伝子療法ベクターの作製に関連して、キメラバ

10

20

30

40

50

ルボウイルスCap配列作製の限界を乗り越えることができる。いくつかのグループが、STEPおよびシャッフリング法を用いて、既知のAAV血清型キャプシド配列を用いて複数のランダム組換えキャプシド種を作ることによって(Ward and Walsh, 2009、Li et al., 2008)、1つの血清型に対してランダム変異ウイルスライブラリーの作製を伴うAAVの直接進化を試みてきた(Koerber et al., 2008)。同様に、独立したAAP発現を用いて、(他の細胞への標的化に用いられる)リガンド、B細胞エピトープ(エピトープ特異的ワクチンの作製に用いられる)、または欠失/置換(ウイルスの脱標的化もしくはウイルス抗原性の低下に用いられる)を許容するさらなる挿入部位を特定することができる。

【0115】

断片Z/本発明の核酸およびVP3 cdsのトランス配置のさらなる利点は、ある構築物を産生細胞株に安定に移入できる一方、他の構築物を一過的に移入/形質導入できることである。例えば、断片Z/本発明の核酸を含む発現カセットを、効率的なVP3発現に適した細胞株に安定に移入して、単一産生細胞株を得ることができる。次いで、このような産生細胞株に特定のVP3 cdsを一過的に移入/形質導入して(例えば、ウイルス感染させて)、このようなVP3を発現させ、それぞれの粒子を形成することができる。従って、ある産生細胞株を異なる粒子の産生に使用することができる。医用薬剤の製造に用いられる産生細胞株の質に必要な時間および費用を考えると、これは規制上の大きな利点となる。このために、断片Z/本発明の核酸およびVP3 cdsは別々の発現構築物に載せて提供されることが特に好ましい。

【0116】

さらに、この構成は、例えば、ある血清型の断片Z/本発明の核酸によって安定にトランスフェクトされている細胞に、特定の血清型のVP3をコードする発現カセットをトランスで提供することによって、別個の血清型のAAV/パルボウイルス粒子を作製するのに使用することができる。一般的に、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびAAV13からなる群より選択されるAAV血清型に特異的なVP3 cdsを、1種類のための血清型、例えば、AAV2の断片Z/本発明の核酸によって安定にトランスフェクトされている細胞のトランスフェクションに使用することができる。それによって、選択された血清型、例えば、AAV1粒子のVP3からなるAAV粒子を簡単に作製することができる。AAV1およびAAV2については、本発明者らは、断片Z/本発明の核酸の発現が、同じ血清型からクローニングされた構築物から発現されたVP3のキャプシド集合だけでなく、他の血清型、すなわち、AAV2およびAAV1それぞれからクローニングされた構築物から発現されたVP3のキャプシド集合も媒介すると確かめることができた(実施例21)。それにもかかわらず、一般的に、全ての血清型が互いに補う合うとは予想できないが、当業者であれば、本明細書に記載のトランス相補アッセイにおいてVP3 VLPを集合させるために、あるパルボウイルス/血清型に由来するAAPと、異なるパルボウイルス/血清型に由来するVP3のそれぞれのペアを簡単に特定することができる。異なるパルボウイルスまたはAAV血清型に由来するVP3 VLPの産生に使用することができる、特定のAAPを発現する安定細胞株が得られていれば、相互相補を使用することができる。VLPを時間対効果および費用対効果が大きく高力価で産生するために、それぞれの組み合わせを選択することができる。

【0117】

同様に逆も可能であり、断片Zをコードする多くの異なる配列から選択された断片Z/本発明の核酸、例えば、異なるAAV血清型/パルボウイルスに由来する断片Z/本発明の核酸を提供する発現カセットと共に、ある特定のVP3 cdsをトランスでトランスフェクトすることができる。

【0118】

本発明の別の好ましい態様において、パルボウイルス粒子は、Repタンパク質を含有せず、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78機能タンパク質を含有しない。この態様に関する詳細は、本明細書において本明細書の全体にわたって示される。

【0119】

本発明の別の好ましい態様において、発現構造タンパク質の1/50しかVP3のN末端伸長バ

10

20

30

40

50

ージョンでなく/最大で1/50がVP3のN末端伸長バージョンであり、好ましくは、構造タンパク質の最大で1/100がVP3のN末端伸長バージョンであり、より好ましくは、構造タンパク質の最大で1/250がVP3のN末端伸長バージョンであり、本質的には、構造タンパク質の1/500しかVP3のN末端伸長バージョンでなく/最大で1/500がVP3のN末端伸長バージョンである。VP3のN末端伸長バージョンを有する構造タンパク質を含有しないバルボウイルス粒子が特に好ましく、逆に、どの構造タンパク質もVP3のN末端伸長バージョンでない。断片ZおよびVP3 cdsの配列が重複し、同じプロモーターの制御下において発現されるのであれば(シス状況)、VP3 cdsのATG開始コドンは主にタンパク質翻訳の開始部位として用いられるのに対して、タンパク質翻訳のごく一部しか上流から開始しない。結果として生じる、タンパク質のごく一部が、VP3 cdsに加えて、VP2をコードするが、VP3をコードしない配列の3'部分に対応する数個のAaによるN末端伸長を含有する。まとめると、VP3のこれらの5'伸長バージョンの発現はウエスタンブロットにおいて目に見えるが(実施例4)、バルボウイルス粒子の構造タンパク質の1/50しか占めず、好ましくは1/100しか占めず、より好ましくは1/250しか占めず、本質的には1/500しか占めない。

10

20

30

40

50

【0120】

本発明の別の好ましい態様において、発現構造タンパク質の1/50しか本発明のポリペプチド、すなわちAAPまたはその変種でなく/最大で1/50が本発明のポリペプチド、すなわちAAPまたはその変種であり、好ましくは、構造タンパク質の最大で1/100が本発明のポリペプチド、すなわちAAPまたはその変種であり、より好ましくは、構造タンパク質の最大で1/250が本発明のポリペプチド、すなわちAAPまたはその変種であり、本質的に、構造タンパク質の1/500しか本発明のポリペプチド、すなわちAAPまたはその変種でなく/最大で1/500が本発明のポリペプチド、すなわちAAPまたはその変種である。バルボウイルスベクターまたは粒子の医療用途に影響を及ぼし得る宿主細胞に対して、AAPが特定の影響を及ぼすことは示されていないが、原則的に、可能な限り不純物が少ないことが有益である。

【0121】

ウイルスRepタンパク質はゲノムDNAおよびウイルスDNAに結合し、DNAパッケージングにおいて役割を果たすと議論されている。AAVをワクチンとして使用し、パッケージングされたDNAに対する非特異的反応または望ましくない遺伝子導入を避けるために、可能な限りDNAを含まないバルボウイルス粒子が特に好ましい。従って、バルボウイルス粒子は、細胞においてRepタンパク質発現の非存在下で産生される。従って、本発明のさらに別の好ましい態様において、粒子の1/100しかDNAを含有せず、好ましくは、粒子の1/1,000しかDNAを含有せず、より好ましくは、粒子の1/10,000しかDNAを含有しない。どのバルボウイルス粒子もDNAを含有しないことが特に好ましい。好ましくは、粒子の最大で1/100が任意のDNAを含有し、より好ましくは、粒子の1/1,000しか任意のDNAを含有せず/粒子の最大で1/1,000が任意のDNAを含有し、さらにより好ましくは、粒子の1/10,000しか任意のDNAを含有せず/粒子の最大で1/10,000が任意のDNAを含有する。結果として、ワクチン接種目的の前に、パッケージングされたDNAを破壊する不活化段階(例えば、線照射または紫外線照射)は必要ない。

【0122】

本発明によるバルボウイルスは、好ましくは、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ウシAAV(b-AAV)、イヌAAV(CAAV)、およびトリAAV(AAAV)からなる群より選択される。

【0123】

AAV-1、AAV-2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、およびAAV13からなる群より選択されるAAV、特に、AAV-2が特に好ましい。AAV1~AAV12は、アデノ随伴ウイルス(AAV)の規定された血清型を示す。

【0124】

本明細書にさらに詳述されるように、VP3 cdsは少なくとも1つの変異をさらに含むことが特に好ましい。変異は、それぞれの野生型バルボウイルス配列と比較して、好ましくは、1つまたは複数の欠失、1つまたは複数の挿入、1つまたは複数の置換、およびこれらの変異の組み合わせからなる群より選択される。

【 0 1 2 5 】

VP3 cdsは、1つまたは複数のサイレント変異を含むことが本発明の1つの態様である。VP3タンパク質のAA配列を変えないDNA変異を導入することによって、VP3 cdsのコドン使用頻度を最適化して、例えば、VP3 cdsの発現を高めることができる。遺伝暗号の縮重により、1つのAAは、複数のコドンにより特定されることがあり、例えば、AAグルタミン酸はGAAおよびGAGコドンによって特定される。従って、構造タンパク質VP3のそれぞれのAAについて、それぞれ、高効率で翻訳されるコドンが選択され、cdsが変異される。既に述べたように、これらの変異はタンパク質のAA配列を変えず、そのためサイレントと呼ばれるが、もちろん、断片Z/本発明の核酸によってコードされる拡散性分子を含むヌクレオチド配列を変える。このために、例えば、断片Zの配列と重複しない選択された構成で、すなわち、前記のトランス構成でVP3高発現を得るために、VP3 cdsの中の任意の場所での挿入またはコドン使用頻度の最適化によってVP3 cdsの一部のみが改変されることが本発明の特に好ましい態様である。

10

【 0 1 2 6 】

好ましい態様において、VP3 cdsの1つまたは複数の変異は、VP3 VLPの表面上に位置する1つまたは複数の変異につながる。構造タンパク質の表面に位置する領域は、AAV2で知られている結晶構造(Xie et al., 2002)を分析することによって決定することができる。選択された血清型の結晶構造が未だに利用できなければ、選択されたVP3配列を、既知の結晶構造を有する少なくとも1種類の血清型のVP3配列とアラインメントして、関心対象の相同領域を特定することができる。アラインメントは、例えば、Multialign(Corpet, 1988)のような市販のソフトウェアおよびこれに記載の標準的なパラメータを用いて行うことができる。

20

【 0 1 2 7 】

さらに好ましい態様において、VP3 cdsの1つまたは複数の変異は、VP3のN末端に位置する1つまたは複数の変異につながる。好ましくは、N末端は、それぞれのVP3のN末端10アミノ酸、好ましくは、N末端5アミノ酸、特に、N末端2アミノ酸と定義される。AA203(1-203)のすぐN末端側もしくはC末端側、好ましくは、AA203(1-203)のすぐC末端側での挿入、またはAA203(1-203)のすぐN末端側もしくはC末端側、好ましくは、AA203(1-203)のすぐC末端側での挿入に対応する挿入が特に好ましい。

【 0 1 2 8 】

本発明によれば、挿入は、1-261、1-266、1-381、1-447、1-448、1-453、1-459、1-471、1-534、1-570、1-573、1-584、1-587、1-588、1-591、1-657、1-664、1-713、および1-716、好ましくは、1-261、1-453、1-534、1-570、1-573、および1-587、特に、1-587からなる群より選択される1つまたは複数の位置に挿入されることが好ましい。

30

【 0 1 2 9 】

使用された命名法1-###は挿入部位を指しており、###は、AAV-2のVP1タンパク質を基準としたAA番号を示しているが、挿入が、あるAAのすぐN末端側もしくはC末端側、好ましくは、あるAAのすぐC末端側、所定のAAのN末端側もしくはC末端側にある5 Aaの配列内、所定のAAのN末端側もしくはC末端側にある好ましくは3 AA、より好ましくは2 AA、特に、1 AAの配列内にあってもよいことを意味する。AAV-2以外のパルボウイルスの場合、対応する挿入部位は、AAアラインメントを行うことによって、または利用可能であればキャプシド構造を比較することによって特定することができる。このようなアラインメントは、パルボウイルスAAV-1、AAV-2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-10、AAV-11、b-AAV、GPV、B19、MVM、FPV、およびCPVについて行われている(WO2008/145400の図3)。

40

【 0 1 3 0 】

後ろに挿入が導入され、その部位を示したAA位置に下線を引いた。同様に、下線を引いたAAの隣に位置する直接隣接する5個のAaの中に挿入を導入することもできる。なぜなら、これらの5個のAaはAAV2キャプシドの中のループ内に同様に位置するからである。

【 0 1 3 1 】

50

例えば、挿入部位 I-587 は、強調で示した以下の Aa の 1 つの前および/または後での挿入に対応する。

AAV1 の FQSSSTDPAT、
 AAV2 の LQRGN587RQAAT、
 AAV-3b の LQSSNTAPTT、
 AAV-6 の LQSSSTDPAT、
 AAV-7 の LQAANTAAQT、
 AAV-8 の LQQQNTAPQI、
 AAV10 の LQQANTGPIV、
 AAV11 の NQNATTAPIT および
 AAV-5 の NQSSTTAPAT。

10

【 0 1 3 2 】

さらに、挿入部位 I-453 は、以下の 10 個の Aa それぞれのすぐ N 末端側または C 末端側での、好ましくは、強調で示した AA のすぐ C 末端側での挿入に対応する。

AAV-1 の QNQSGSAQNK、
 AAV-2 の NTPSG453TTTQS、
 AAV-3b の GTTSGTTNQS、
 AAV-6 の QNQSGSAQNK、
 AAV-7 の SNPGGTAGNR、
 AAV-8 の QTTGGTANTQ、
 AAV-10 の QSTGGTQGTQ、
 AAV-11 の SGETLNQGNA および
 AAV-5 の FVSTNNNTGGV。

20

【 0 1 3 3 】

AAV2 配列に関して、本発明に含まれる AAV 用および他のパルボウイルス用の挿入部位を表 1 に列挙した。

【 0 1 3 4 】

(表 1) パルボウイルスの挿入部位

挿入部位	対応するAA/AAV2の配列		参考文献
I-261	S ₂₆₁	YKQIS ₂₆₁ SQSGA	(Girod et al., 1999)
I-266	A ₂₆₆	SQSGA ₂₆₆ SNDNH	(Wu et al., 2000)
I-381	N ₃₈₁	YLTLN ₃₈₁ NGSQA	(Girod et al., 1999)
I-447	R ₄₄₇	YYLSR ₄₄₇ TNTPS	(Girod et al., 1999, Wu et al., 2000)
I-448	T ₄₄₈	YLSRT ₄₄₈ NTPSG	(Grifman et al., 2001)
I-453	G ₄₅₃	NTPSG ₄₅₃ TTTQS	WO 2008/145400
I-459	R ₄₅₉	TTQSR ₄₅₉ LQFSQ	(Shi et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-471	R ₄₇₁	ASDIR ₄₇₁ DQSRN	(Asokan and Samulski, 2006, Moskalenko et al., 2000)
I-534	F ₅₃₄	EEKFF ₅₃₄ PQSGV	(Girod et al., 1999)
I-570	P ₅₇₀	RTTNP ₅₇₀ VATEQ	
I-573	T ₅₇₃	NPVAT ₅₇₃ EQYGS	(Girod et al., 1999)
I-584	Q ₅₈₄	STNLQ ₅₈₄ RGNRQ	(Shi et al., 2001, Shi and Bartlett, 2003)
I-587	N ₅₈₇	LQRGN ₅₈₇ RQAAT	(Girod et al., 1999, Shi et al., 2001, Maheshri et al., 2006, Ried et al., 2002, Grifman et al., 2001, Nicklin et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-588	R ₅₈₈	QRGNR ₅₈₈ QAATA	(Shi and Bartlett, 2003)
I-591	A ₅₉₁	NRQAA ₅₉₁ TADV N	(Wu et al., 2000)
I-657	P ₆₅₇	VPANP ₆₅₇ STTFS	
I-664	A ₆₆₄	TFSA A ₆₆₄ KFA SF	(Wu et al., 2000)
I-713	T ₇₁₃	NVDFT ₇₁₃ VDTNG	
I-716	T ₇₁₆	FTVDT ₇₁₆ NGVYS	(Maheshri et al., 2006)

10

20

30

40

【 0 1 3 5 】

I-570は、パルボウイルス構造タンパク質の所定のAaを挿入部位で欠失させて、完全置換させる挿入部位として特に適している。この場合、Aa RTTNPVATEQをエピトープまたはミモトープによって置換することができる。

【 0 1 3 6 】

AAV2以外のAAV血清型への挿入は成功している。

【 0 1 3 7 】

(表2) AAV2以外のAAV血清型への挿入

AAV血清型	配列	挿入部位/AAV2に関するAA		参考文献
AAV1	FQSSS ₅₈₈ TDPAT	I-587	N ₅₈₇	own data
AAV1	SSSTD ₅₉₀ PATGD	I-589	Q ₅₈₉	(Arnold et al., 2006, Stachler and Bartlett, 2006)
AAV-3	NNLQS ₅₈₆ -SNTAP	I-585	R ₅₈₅	(Arnold et al., 2006)
AAV-4	GGDQS ₅₈₄ -NSNLP	I-585		(Arnold et al., 2006)
AAV-5	TNNQS ₅₇₅ -STTAP	I-585		(Arnold et al., 2006)

10

【 0 1 3 8 】

最も好ましい挿入部位は、以下であった：

i) AAV2のN₅₈₇の周囲にあるAA領域(LQRGN₅₈₇RQAAT)において様々な挿入が行われた時I-587。この領域内で、AAV2のAa Q₅₈₄、N₅₈₇、R₅₈₈、およびA₅₉₁のC末端側、ならびにAAV2のR₅₈₅およびQ₅₈₉に対応する他のAAV血清型のAaのC末端側に、様々なペプチドの挿入が行われた。

ii) AAV2のG₄₅₃のC末端側にエピトープが首尾よく挿入された時I-453。

iii) AAV1のFQSSS₅₈₈TDPATまたはSSSTD₅₉₀PATGD。

iv) 本発明に従って、AAV2のS₂₆₁のC末端側にエピトープが首尾よく挿入された時I-261。

v) 本発明に従って、AAV2のF₅₃₄のC末端側にエピトープが首尾よく挿入された時I-534。

vi) 本発明に従って、AAV2のP₅₇₀のC末端側にエピトープが首尾よく挿入された時I-570。

vii) 本発明に従って、AAV2のT₅₇₃のC末端側にエピトープが首尾よく挿入された時I-573。

【 0 1 3 9 】

本明細書において開示されたパルボウイルスについて、本明細書において特定された全ての挿入部位の対応するAaは、WO2008/145400の図3にあるアラインメントから取得することができる。ここに列挙されていないパルボウイルスについては、このようなパルボウイルスの提供されたAA配列と、ここで用いられた標準的なパラメータの下でアラインメントを行うことができ、このようなアラインメントから対応するAAを取得することができる。

【 0 1 4 0 】

本発明によれば、2つの挿入が好ましい場合があり、I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、およびI-587からなる群より選択される2つの位置に、好ましくはI-261とI-587との組み合わせ、I-261とI-453との組み合わせ、またはI-453とI-587との組み合わせに、2つの挿入がなされる。三重挿入に関して、好ましい組み合わせは、VP3の3つの位置に、好ましくは、位置453における挿入と位置587における挿入との組み合わせ、およびさらなる変異との組み合わせ、より好ましくは、位置I-453、I-587における挿入と、I-534、I-570、およびI-573の1つとの組み合わせがなされる。

【 0 1 4 1 】

特に、ワクチン接種用途のために、選択されたエピトープを提示するAAV粒子を作製しなければならない。従って、VP3 cdsは、ウイルスに対して異種の少なくとも1つのエピトープを含むことが好ましい。

【 0 1 4 2 】

VP3タンパク質のエピトープはB細胞エピトープであることがさらに好ましい。好ましくは、B細胞エピトープは抗原の一部である。好ましい抗原は、血清タンパク質、少なくともある特定の条件下で(例えば、疾患状態において)血中に見られるタンパク質、膜タンパク質、特に、受容体タンパク質(例えば、CD20、アセチルコリン受容体、IL13R、EGFR)、および感染作用物質の表面抗原、好ましくは、このような表面抗原の免疫優性でないエピトープである。特に好ましい抗原は、IgE、腫瘍抗原(例えば、MelanA、高分子量黒色腫関連抗原(HMW MAA)、CA125、IL13R、Her2/NEU、L1細胞接着分子)、VEGF、EGFR、CD20、IL1

40

50

、IL4、IL5、IL6、IL9、IL13、IL17、IL18、IL33、TSLP(胸腺間質性リンパ球新生因子)、CETP(コレステロールエステル転送タンパク質)、TNFファミリーメンバー(例えば、TNF-)、または アミロイドである。

【0143】

さらなる態様において、VP3は、パルボウイルスに対して異種の少なくとも1つのB細胞エピトープを含む。このB細胞エピトープは、好ましくは、病原体と同一でなく、特に、病原体のB細胞エピトープと同一でない。ここで、B細胞エピトープはウイルスの表面上に位置する。好ましい態様において、VP3は、B細胞エピトープが得られた抗原と結合することができる免疫グロブリンを誘導することができる。

【0144】

好ましい態様において、B細胞エピトープは、AAV1、AAV2、またはAAV4のI-453および/またはI-587、特に、I-453および/またはI-587に挿入される。

【0145】

多数の同一のペプチドがキャプシドの表面上に最適に提示されることが重要なのであれば、特に、直接的なB細胞受容体架橋が、B細胞のT細胞非依存性の初回抗原刺激および自己抗原に対するB細胞寛容の破壊に必要とされる場合は、同一のB細胞エピトープが2種類以上の挿入部位に挿入されることが特に好ましい。B細胞エピトープが高密度になると、B細胞受容体間の規定された距離を必要とする最適なペプチド特異的B細胞受容体架橋の可能性が大きくなり、従って、それぞれのB細胞エピトープがパルボウイルスキャプシド上に提示される。

【0146】

さらに、挿入B細胞エピトープの数が多くなると、i)天然のパルボウイルスB細胞エピトープ/ミモトープが遮蔽されるために、および/またはii)これらの天然B細胞エピトープ/ミモトープを低免疫原性にする、キャプシドのわずかな構造変化のために、パルボウイルスバックボーンに対する望ましくない免疫反応の可能性が小さくなる。従って、少なくとも3つの挿入を含むパルボウイルス構造タンパク質が特に好ましい。

【0147】

まとめると、エピトープの表面提示のための好ましい挿入部位は、AAV2アミノ酸番号I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-453、I-459、I-471、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713、およびI-716、特に、I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、I-587、およびI-588、最も好ましくは、I-453およびI-587に対応するアミノ酸に続く位置である。

【0148】

さらなる態様において、挿入は末端でも内部でも、1つまたは複数のアミノ酸の欠失と組み合わせられ、アミノ酸が異なるアミノ酸によって部分置換または1:1置換される。ここで、部分置換とは、例えば、8個のアミノ酸が6個の異なるアミノ酸によって置換されることを意味し、1:1置換とは、例えば、8個のアミノ酸が8個の異なるアミノ酸によって置換されることを意味する。

【0149】

本発明の1つの態様において、VP3は融合タンパク質の中に含まれ、例えば、第2のタンパク質またはペプチドと融合される。特に好ましい態様において、B細胞エピトープ、特に、20アミノ酸より大きなエピトープがVP3のN末端と融合される。

【0150】

1つの特定の態様において、VP3は、リガンドとの結合に有用な少なくとも1つのタグを含む。特に好ましい態様において、タグは、さらなる変異によってパルボウイルス変異構造タンパク質の中に導入される。このようなタグは当技術分野において周知である。表3。

【0151】

(表3) タグおよび対応するリガンド

10

20

30

40

タグ	リガンド
AU1	抗AU1モノクローナル抗体
HIS	ニッケル
GST	グルタチオン
プロテインA	IgG
ビオチンまたはStrep	ストレプトアビジン
カルモジュリン結合ペプチド	カルモジュリン
IgGのFcペプチド	プロテインA
Flag	GLAG-または3xFLAG ペプチド
HA (ヘマグルチニン)	HAペプチド

10

【 0 1 5 2 】

本発明の別の態様において、VP3は少なくとも1つのさらなる変異を含む。変異は、任意の適切な変異、例えば、前記で定義された任意の変異でよい。

【 0 1 5 3 】

例えば、VP3の1つまたはいくつかのさらなる変異は、例えば、i) 同じ標的抗原のさらなるB細胞エпитープもしくは同一のB細胞エпитープ、および/あるいはii) 1つもしくは複数のさらなる標的タンパク質のB細胞エピトープ(多標的ワクチン)、望ましいT細胞免疫応答をさらに促進するためのT細胞エピトープ、抗原提示細胞を標的化および/もしくは活性化するためのペプチド配列、またはコア粒子の免疫原性が低下したキャプシド変異体を得るためのペプチド配列を導入するのに十分であり得る。後者は、効率的な初回刺激/追加免疫レジメンを設けるための可能性の1つであり得る。

20

【 0 1 5 4 】

加えて、パルボウイルス変異構造タンパク質の異なる位置におけるさらなる変異が、より複雑なミモトープを構成するために用いられてもよく、ビリオンのある特性の性質を改変するために用いられてもよく、例えば、その天然抗原性を改変するために用いられてもよく(例えば、Huttner et al., 2003、およびWO01/05990)、クロマトグラフィー特性を改変するために用いられてもよく(例えば、WO01/05991)、第2のB細胞エピトープを挿入するために用いられてもよく、Tヘルパーエピトープを挿入するために用いられてもよく、CTLエピトープを挿入するために用いられてもよい。このようなさらなる変異は、点変異、内部欠失または末端欠失、挿入、および置換より選択される。好ましくは、さらなる(第2の)挿入は内部にあり、例えば、N末端融合またはC末端融合によって内部にある。

30

【 0 1 5 5 】

本発明の別の局面は、前記で開示された任意の方法から入手可能なパルボウイルス粒子である。前記の方法に基づいて、本発明者らは、本質的にVP3のみからなり、異種核局在化シグナル(NLS)を含まないパルボウイルス粒子を産生することができた。このような粒子は、Repタンパク質、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78を含有しない。説明された方法を用いると、商業規模での医用薬剤の製造に十分な量/収量を得ることができる。

40

【 0 1 5 6 】

本発明の別の局面は、VP3から本質的になるパルボウイルス粒子に関する。ここで、VP3は、任意で、対応する野生型VP3と比較して1つまたは複数の変異を含み、異種核局在化シグナル(NLS)を含有せず、粒子は、Repタンパク質、特に、Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78機能タンパク質を含有しない。

【 0 1 5 7 】

キャプシドがVP3のみからなるパルボウイルス粒子が特に好ましい。

50

【0158】

1つまたは複数の変異に関して、これは前記の変異について言及されている。

【0159】

本発明の1つのさらなる局面は、前記で定義されたVP3 cdsおよびこれに対して異種のプロモーターを含む発現カセットAであり、VP3の転写は異種プロモーターによって動かされ、発現カセットは、本質的にVP3のみを発現することができる。VP3のみを発現する発現カセットが特に好ましい。この構築物は、本発明の変異VP3を発現させるのに用いられる。VP3の配列は、説明したように変異させることができる。当業者により理解されるように、発現カセットはポリ(A)配列をさらに含む。

【0160】

10

本発明の別の局面は、前記で定義された断片Zおよびこれに対して異種のプロモーターを含む発現カセットBであり、断片Zの転写は異種プロモーターによって駆動される。構築物は、本発明の断片Zを発現させるのに用いられる。断片Zの配列は、説明したように変異させることができる。任意で、この発現カセットはポリ(A)配列をさらに含む。

【0161】

本発明のさらなる局面は、(i)前記で定義されたVP3 cdsおよび前記で定義された断片Z、ならびに(ii)これに対して異種のプロモーターを含む発現カセットCであり、VP3および断片Zの発現は、この1つの異種プロモーターによって駆動される。

【0162】

20

本発明のさらなる局面において、異種プロモーター、前記のVP3 cds、および本発明の核酸を含む発現カセットが組み合わせられ、VP3および核酸によってコードされるポリペプチド(AAPまたはAAP変種)の発現は、この1つの異種プロモーターによって駆動される。任意で、この発現カセットはポリ(A)配列をさらに含む。

【0163】

さらなる1つの局面は、少なくとも1つの発現カセットA/VP3発現カセット、および少なくとも1つの発現カセットB/本発明の核酸を含む発現カセットがキットの中で組み合わせられることである。VP3 cdsに由来するパルボウイルスVP3の発現と、断片Z/本発明の核酸の発現を組み合わせることによって、本質的に本発明のVP3のみからなる粒子を作製することが可能である。

【0164】

30

別の局面は、少なくとも1つのVP3発現カセットAおよび少なくとも1つの本発明の核酸を含むキット、または細胞内でのVP3および断片Zの組み合わせた同時の発現ならびにVP3 VLPの作製のための少なくとも1つの発現カセットCを含むキットに関する。このようなキットは好ましくはマニュアルをさらに含む。

【0165】

本発明のさらに別の局面は、本発明のパルボウイルス粒子を含む医用薬剤に関する。本発明の医用薬剤には先行技術より優れた非常に多くの利点がある。一方で哺乳動物とその免疫系、他方でウイルスが共進化してきたために、哺乳動物の免疫系は、ウイルスキャプシドタンパク質に対して強力な抗体応答を生じるように特殊化している。強力な抗体応答とは、標準的なELISAにおいて測定される1,000~>100,000の力価を意味する。ウイルス様粒子は、ウイルスと類似点があり、反復したかつ高度に構造的な抗原パターンがあり、抗原提示細胞により、このような粒子が効率的に取り込まれるために免疫原性が高い。それぞれのB細胞受容体の直接的な架橋結合によって媒介され、自己抗原または寛容原に対するB細胞寛容さえ壊す非常に強力なT細胞非依存性B細胞応答に関して、ビリオンのサイズ、B細胞エピトープの密度および対称的な順序、ならびに任意の2つのB細胞エピトープ間の約50~100 の最適な距離が大きな役割を果たしている(Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 1998, Szomolanyi-Tsuda et al., 1998, Szomolanyi-Tsuda et al., 2000, Szomolanyi-Tsuda et al., 2001, Zinkernagel, 2002, Bachmann et al., 1993)。

40

【0166】

まとめると、このような医用薬剤は、高くかつ持続性の抗体価をもたらす能動的免疫応

50

答につながる、ある特定のB細胞エピトープに対するポリクローナル免疫応答を誘導することができる。ピリオンの多量体構造は、B細胞上にあるそれぞれの受容体を直接的に架橋結合し、それによって、T細胞非依存性B細胞応答を誘導する、密に詰め込まれた多数の同一エピトープを含有する。さらに、医用薬剤の粒子構造は、抗原提示細胞による効率的な取り込みを介した免疫応答を支援する。これによって、T細胞は活性化され、最終的にはIgGクラススイッチおよび活性化B細胞の超変異(hypermutation)が誘発され、高親和性IgG抗体の持続的な放出および記憶細胞へのB細胞の分化につながる。

【0167】

本発明の方法を用いると、このような医用薬剤を簡単に生産することができる。

【0168】

本発明の医用薬剤は、1種類または複数の種類の賦形剤をさらに含んでもよい。賦形剤は、薬学的に許容される担体および/または賦形剤である。賦形剤は従来の賦形剤であり、緩衝液、安定剤、希釈剤、防腐剤、および可溶化剤を含んでもよい。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition(1975)は、本明細書において開示された(パルボ)ウイルス粒子の薬学的送達に適した組成物および製剤について述べている。一般的に、担体または賦形剤がどういったものであるかは、使用されている特定の投与方法によって決まるだろう。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして、薬学的および生理学的に許容可能な液体、例えば、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、デキストロス水溶液、グリセロールなどを含む注射液を含む。固体組成物(例えば、散剤、丸剤、錠剤、またはカプセル形態)の場合、従来の無毒の固体担体は、例えば、薬学的グレードのエピトープ、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムを含んでもよい。生物学的に中性の担体に加えて、投与される薬学的組成物は、微量の無毒の補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含有してもよい。

【0169】

さらなる態様において、医用薬剤はワクチンである。一般的に、ワクチンは、疾患原因作用物質の抗原からなり、身体に導入されると、特異的抗体の産生または細胞変化を刺激する調製物である。これは、一般的に、活動原理(active principle)として免疫応答を生じる。特に、VP3から組み立てられたパルボウイルス粒子は、パルボウイルスに対して異種の、好ましくは、自己免疫疾患(例えば、1型糖尿病)、腫瘍疾患(例えば、黒色腫:例えば、HMW MAA、多形神経膠芽腫:例えば、CA125、抗IL13R、結腸癌:例えば、CA125もしくは抗EGF、および/または乳癌:例えば、Her2/NEU、卵巣癌:例えば、L1接着分子、B細胞リンパ腫:例えば、CD20)、アレルギー性疾患(喘息、アレルギー、例えば、アレルギー性鼻炎、標的の例は、IgE、IL4、IL5、IL9、IL13、IL18、IL33、TSLPである)、代謝病(例えば、高コレステロール、コレステロール代謝への介入(標的例:CETP)、肥満、高血圧(標的例アンジオテンシンII)、炎症性疾患(例えば、慢性関節リウマチ、クローン病、標的例IL6、IL17、およびTNF- α)、神経学的疾患(例えば、アルツハイマー病;標的例: β -アミロイド)を予防もしくは治療するための、あるいは眼科学において用いられる(例えば、AMD、標的例VEGF)少なくとも1つのB細胞エピトープを含む。

【0170】

有効量の本発明のパルボウイルス粒子および/または本発明のVP3 VLPをコードする発現構築物を患者に投与することによって、ワクチン接種するための方法および/または本明細書において特定された疾患を治療もしくは予防するための方法も本発明に含まれる。

【0171】

好ましい態様において、ワクチンは、1種類または複数の種類のアジュバントを、特に、免疫賦活性物質をさらに含む。アジュバントは投与方法に基づいて選択することができる、鉱油ベースのアジュバント、例えば、Freund完全アジュバントおよび不完全アジュバント、Montanide不完全Seppicアジュバント、例えば、ISA、水中油型エマルジョンアジュバント、例えば、Ribiアジュバントシステム、ムラミルジペプチドを含有するsyntaxアジュバント製剤、またはアルミニウム塩アジュバントを含んでもよい。

【0172】

本発明の1つの態様は、自己免疫疾患、感染症、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、代謝病、(慢性)炎症性疾患、神経学的疾患、依存症を予防もしくは治療するための、または眼科学において用いられる医用薬剤である。好ましい自己免疫疾患および/または慢性炎症性疾患は、慢性関節リウマチ、乾癬、およびクローン病である。好ましい腫瘍疾患は、モノクローナル抗体、例えば、トラスツズマブによる治療の対象である疾患である。好ましいアレルギー性疾患は、喘息およびアレルギー、例えば、アレルギー性鼻炎である。好ましいアレルゲンの例は、カバノキ花粉、ハウスダスト、ダニ、および牧草花粉である。好ましい神経学的疾患はアルツハイマー病である。好ましい代謝病はアテローム性動脈硬化症である。好ましい眼科学的疾患は加齢黄斑変性である。さらに好ましい態様において、自己抗原に対する抗体の誘導を意味するB細胞寛容を壊す方法において、パルボウイルス粒子またはその医用薬剤が用いられる。

10

【0173】

さらに特殊な態様において、医用薬剤によって治療される疾患は感染症でない。

【0174】

さらに、医用薬剤のパルボウイルス変異構造タンパク質は、遺伝子療法におけるベクターとして用いられない。

【0175】

別の態様において、本発明のパルボウイルス粒子は遺伝子療法に用いられる。

20

【0176】

本発明によれば、1つの態様は、ワクチンを製造するための、好ましくは、自己免疫疾患および/もしくは慢性炎症性疾患、好ましくは、慢性関節リウマチならびに/またはクローン病、腫瘍疾患、アレルギー性疾患、喘息、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、代謝病、炎症性疾患、神経学的疾患を予防もしくは治療するための、あるいは眼科学において用いられるワクチンを製造するための、パルボウイルスに対して異種の少なくとも1つのB細胞エпитープを含む、前記で定義されたパルボウイルス粒子、好ましくは、前記で定義された医用薬剤の使用である。

【0177】

本文書において、引用された全ての文書の内容は参照により組み入れられる。

【0178】

以下の実施例および図面は、本発明を限定することなく本発明を詳細に説明することを目的とする。

30

【実施例】

【0179】

以下の実施例は、AAV、特に、AAV2について本発明を例示する。アデノ随伴ウイルスと他のパルボウイルスの構造の中には大まかな類似性があるために、本発明は、3種類のウイルスキャプシドタンパク質をコードする他のパルボウイルスに簡単に移しかえることができる。

【0180】

1. 一般的方法

40

1.1. 昆虫細胞におけるAAV(様粒子)の作製

Sf9細胞(Graces(JHR Bioscience, USA)/10%FCS中で培養した)においてAAV粒子を作製するために、細胞を、改変AAV VP1オープンリーディングフレームを有するpVL1393 Polyhedrin Promoter-Based Baculovirus Transfer Vector(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)の誘導体であるベクタープラスミドpVL_VP1_MOD4、pVL_VP2、またはpVL_VP3によってトランスフェクトした。(pVL_VP1_MOD4、pVL_VP2、およびpVL_VP3のクローニングは実施例9において説明する)。

【0181】

トランスフェクションは、BaculoGold(商標)トランスフェクションキット(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を用いて製造業者のマニュアルに従って行った。トランスフェク

50

ション後に、細胞を27℃でインキュベートした。トランスフェクションをして5日後に、エンドポイント希釈アッセイ(EPDA)を介したシングルクローン分離のために、上清を使用した。このために、Sf9細胞を96ウェルプレート(2x10⁴細胞/ウェル)において培養し、トランスフェクション上清の段階希釈液に感染させた。27℃でインキュベーションをして7日後に、上清を新しい96ウェルプレート(マスタープレート)に移し、2~8℃で保管した。EPDAの細胞を水酸化ナトリウムによって溶解し、酢酸ナトリウムおよびによって中和し、プロテイナーゼKによって処理した。DIG-DNA洗浄液およびBlock Buffer Kit(Roche, Mannheim, Germany)を用いて免疫検出した後に、シングルクローンを検出することができた。

【0182】

シングルクローンを増幅するために、マスタープレートからの一致ウェル(according well)を用いてSf9細胞に感染させた。数継代かけて組換えバキュロウイルスの増幅を行った。各継代を27℃で3日間インキュベートした後に、上清を用いて、次の継代用の細胞に感染させた。最初の継代では、1.2x10⁵個のSf9細胞(12ウェルプレート)に、マスタープレートからの一致ウェルからの上清50μlを感染させた。上清を用いて、2x10⁶個のSf9(T25フラスコ)(第1B継代)を感染させた。継代のために、2.2x10⁷個のSf9(T175フラスコ)に、第1B継代からの上清1mlを感染させた。

【0183】

エンドポイント希釈アッセイを介して、第2継代(P2)の上清のウイルス力価を分析した。AAVを産生させるために、1x10⁶/ウェルSf9(6ウェルプレート)に、感染多重度(MOI)1でP2の上清を感染させた。培養を27℃で2~3日間インキュベートした。細胞を収集し、凍結融解プロセスによって破壊し、AAV産生について分析した。市販のAAV2力価測定ELISAキット(Progen, Heidelberg, Germany)を用いて、製造業者のマニュアルに従って、AAV2力価を分析した。

【0184】

1.2. 哺乳動物細胞におけるAAV(様粒子)の産生

1.2.1. プラスミド

・Adヘルパープラスミド

アデノウイルスタンパク質E2、E4、およびVAI~VAIIをコードするAdヘルパープラスミドを、293細胞または293-T細胞におけるAAV製造のために使用した。ヘルパープラスミドpUCAdE2/E4-VAI-VAIIは、pAdEasy-1(Stratagene, La Jolla, USA)に由来するアデノウイルス(Ad)E2およびE4-ORF6をコードするBamHI制限断片を、pUC19(Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)のBamHI部位にサブクロニングすることによって構築した。結果として生じたプラスミドをpUCAdE2/E4と呼ぶ。以下のプライマー

XbaI-VAI-780-3': 5'-TCT AGA GGG CAC TCT TCC GTG GTC TGG TGG-3' (SEQ ID NO: 59), および

XbaI-VAII-1200-5': 5'-TCT AGA GCA AAA AAG GGG CTC GTC CCT GTT TCC-3' (SEQ ID NO: 60)

を用いて、pAdVantage(商標)(Promega, Mannheim, Germany)からVAI-VAII断片を増幅し、pTOPO(Invitrogen, Carlsbad, USA)にクローニングし、次いで、pUCAdE2/E4のXbaI部位にサブクロニングした。このプラスミドをpUCAdVと名付けた。

【0185】

・AAVをコードするプラスミド

pUCAV2の構築はUS6,846,665において詳述されている。プラスミドpTAV2.0は(Heilbronn et al., 1990)に記載されており、pVP3は(Warrington et al., 2004)に説明されている。さらなるAAVウイルスタンパク質をコードするプラスミドは各実施例の中で説明されている。

【0186】

1.2.2. 大規模なウイルス産生のためのトランスフェクション

10

20

30

40

50

トランスフェクションの24時間前に、293-T細胞(ATCC, Manassas, USA) (7.5×10^6 /ディッシュ)を15cmディッシュ(すなわち、直径15cmのディッシュ)に播種した(DMEM/10%FCS中で培養した)。US2004/0053410に記載のように、細胞をリン酸カルシウム沈殿によってトランスフェクトした。

【0187】

AAVプロモーターp40依存性転写の場合、アデノウイルスのヘルパープラスミドとのコトランスフェクションを行った。AAVをコードするプラスミドおよびpUCAdVのコトランスフェクションの場合、1:1のプラスミドモル比を選択した。293-T細胞を含む1枚の培養プレートのトランスフェクションの場合、リン酸カルシウムトランスフェクションプロトコルを前記のように使用した。AAV Capをコードするプラスミド(それぞれ、pUCAV2、pTAV2.0、およびpVP3)12 μ gおよびpUCAdV 24 μ gを使用した。p40非依存性転写の場合、細胞を、それぞれのAAV VP1をコードするプラスミド、VP2をコードするプラスミド、および/またはVP3をコードするプラスミドによってトランスフェクトした。1枚の293-T細胞培養プレートのトランスフェクションの場合、US2004/0053410に開示されたように、リン酸カルシウムトランスフェクションプロトコルを使用した。総DNA 36 μ gを、270mM CaCl_2 875 μ lに入れて混合した。手短に述べると、2xBBS(50mM BES(N,N-Bis-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸)(pH6.95)、280mM NaCl、および1.5mM Na_2HPO_4)875 μ lを混合物に添加し、結果として生じた溶液をピペティングによって注意深く混合した。溶液を室温(RT)で20分間インキュベートし、次いで、細胞培養プレートに滴下した。細胞を加湿雰囲気中、35 °Cおよび3% CO_2 で18時間インキュベートした後に、培地を無血清DMEM(Invitrogen Carlsbad, USA)と交換し、細胞を、加湿雰囲気中、37 °C、5% CO_2 でさらに3日間培養した。

10

20

【0188】

293-T細胞を、セルリフターを用いて収集し、50mlプラスチックチューブ(Falcon)に移し、3000g、4 °Cで10分間遠心分離した。細胞ペレットを、15cmディッシュ1つにつき溶解緩衝液(150mM NaCl、50mM Tris、pH8.5)0.5mlに再懸濁し、3回の凍結融解サイクル(液体窒素/37 °C)に供した。細胞溶解産物を、2回の遠心分離工程(3700g、4 °C、20分)によって清澄化し、さらなる精製にAAV含有上清を使用した。または、ディッシュ全体を凍結融解サイクル(-50 °C/RT)に供した。残りの上清を集め、1.3に記載のようにさらに精製した。

30

【0189】

1.2.3. 小規模トランスフェクションおよびウイルス上清の調製

トランスフェクションの24時間前に、細胞(5×10^5 /ディッシュ)を6cmディッシュに播種した。US2004/0053410に記載のように、293-T細胞をリン酸カルシウム沈殿によってトランスフェクトした。HeLaおよびCOS-1細胞の場合、トランスフェクションは、リポフェクタミン2000(Invitrogen, Carlsbad, USA)を用いて製造業者のマニュアルに従って行った。cap遺伝子のプロモーターp40依存性転写の場合(pTAV2.0、その誘導体、およびpVP3)、細胞にアデノウイルス5型(Ad5)(MOI=10)を感染させた。24~48時間、さらにインキュベートした後に、細胞を培地に入れて収集し、3回の凍結融解サイクル(-80 °Cおよび37 °C)によって溶解した。Ad5を不活化するために、溶解産物を56 °Cで30分間インキュベートした。10000gで5分間の遠心分離によって細胞破片を除去した。

40

【0190】

1.2.4. 細胞培養

HeLaおよび293-T細胞を、10%熱失活ウシ胎仔血清、100U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン、および2mM L-グルタミンを添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)に入れて37 °Cおよび5% CO_2 で維持した。

【0191】

1.3. 精製

1.3.1 接線クロスフロー濾過(Tangential Cross Flow Filtration)(TFF)およびベンゾナーゼ処理

清澄化した細胞培地を収集した後に、100kDaカットオフ膜(SARTOCON Slice 200)を用い

50

た接線クロスフロー濾過ユニット(Sartoflow Slice 200 Benchtop Crossflow System, Sartorius Biotech GmbH, Gottingen, Germany)を用いてさらに濃縮した。結果として生じたTFF濃縮物を上清(1.2に記載のように得た)と共にプールし、すぐに、100U/mlベンゾナーゼ(Merck, Darmstadt, Germany)によって37℃で2時間、処理した。ベンゾナーゼ処理後に、3700g、4℃で20分間の遠心分離によって、細胞溶解産物を清澄化した。サイズ排除クロマトグラフィー(AKTA explorer system, GE Healthcare, Munich, Germany)を用いて、清澄化した上清を精製した。

【0192】

1.3.2 サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)

清澄化した上清を、Superdex200(プレップグレード)がバックされたXK50クロマトグラフィーカラム(高さ250mmおよび直径50mm; GE Healthcare, Munich, Germany)に通して分離した。SEC画分(それぞれ5ml)を集め、AAV2キャプシド特異的A20 ELISA(Progen, Heidelberg, Germany, カタログ番号:PRATV)を用いて、キャプシド力価を求めた。AAV2粒子を含有するSEC画分をプールし、イオジキサノール密度超遠心またはスクロース密度超遠心を用いて、さらに精製した。

10

【0193】

(i) イオジキサノールを用いた密度勾配遠心分離法によるAAV粒子の精製

ウイルス含有SECプールをQuickseal超遠心管(26x77 mm, Beckman Coulter, Marseille, France)に移した。濃度の異なるイオジキサノール溶液(Sigma, Deisenhofen, Germanyから購入)をウイルス含有溶解産物の真下に層状に積み重ねた。これによって、底部から6ml 60%、5ml 40%、6ml 25%、および9ml 15%のイオジキサノールからなるイオジキサノール勾配を作り出し、上部にウイルス溶液をのせた。勾配を超遠心機に入れて416000gで1時間、18℃で回転させた。次いで、カニュレを用いて、管に穴をあけて40%相の下に入れ、25%相に達するまで収集用の管に溶液を滴下することによって、AAV粒子を含有する40%相を抽出した。

20

【0194】

(ii) スクロース密度勾配分析

トランスフェクションの24時間前に、 1.5×10^6 個の細胞を10cmディッシュに播種した。トランスフェクションの48時間後に細胞を収集し、300 μ lのPBS-MK(1mM $MgCl_2$ 、2.5mM KCl)を添加した、リン酸緩衝食塩水:18.4mM Na_2HPO_4 、10.9mM KH_2PO_4 、125mM NaCl)に入れて5回の凍結融解サイクル(-80℃および37℃)によって溶解した。50U/mlベンゾナーゼ(Sigma, Deisenhofen, Germany)によって37℃で30分間処理し、3700gで20分間、遠心分離した後に、上清を、11mlの5~30%スクロース勾配または10~30%スクロース勾配(スクロースをPBS-MK、10mM EDTAに溶解した。コンプリートミニEDTAフリープロテアーゼインヒビター(Roche, Mannheim, Germany)の錠剤1個を含有する)が入っているポリアロマー遠心管(14x89mm; Beckman Coulter, Marseille, France)にロードした。160000g、4℃で2時間、遠心分離した後に(SW41ローター; Beckman)、500 μ lの画分を遠心管の底から集めた。参照として、空のAAV2キャプシド(60S)を別の勾配において分析した。イムノドットプロットアッセイのために、画分の熱変性(99℃、10分間)アリコートまたは非変性アリコート50 μ lを、バキュームプロッターを用いてProtranニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)に転写した。膜を、10%スキムミルク粉末を含むPBSに入れて1時間ブロックし、次いで、変性キャプシドタンパク質を検出するためにモノクローナル抗体B1(Progen, Heidelberg, Germany, カタログ番号: 65158)と、または非変性キャプシドを検出するためにA20と1時間インキュベートした。抗体B1およびA20は1:10に希釈して適用した。膜をPBSで数回洗浄し、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体(1:5000希釈)(Dianova, Hamburg, Germany)と1時間インキュベートした。次いで、膜を再洗浄し、高感度化学ルミネセンス検出キット(Amersham, Braunschweig, Germany)を用いて抗体反応を視覚化した。ウエスタンブロット分析のために、画分1つにつき15 μ lをSDS-PAGE用に処理し、次いで、モノクローナル抗体A69(Progen, Heidelberg, Germany, カタログ番号: 65157)またはB1によってプローブした。

30

40

50

【 0 1 9 5 】

(iii)クロマトグラフィーによるAAV粒子の精製

空のwtVP3[#]および改変AAVL^{*}P^{*}の精製

印[#]および^{*}は、wtAAV[#]と改変AAVL^{*}P^{*}との間で精製プロトコルがわずかに異なることを指している。これに応じて、緩衝液成分に印を付けた。

【 0 1 9 6 】

陽イオン交換クロマトグラフィー (AKTAエクスプローラーシステム)

3回の凍結融解サイクル(-54℃/37℃)を行うことによって、空のwtVP3[#]および改変AAVL^{*}P^{*}を含有する総溶解産物を得た。4100rpm、4℃で20分間の遠心分離によって(MULTIFUGE L-R; Heraeus, Hanau, Germany)、総溶解産物を清澄化した。結果として生じた清澄化上清のpHを調整して6にした。さらに、滅菌水を添加することによって、塩の伝導率を約10mS/cmに下げた。

10

【 0 1 9 7 】

Fractogel EMD SO₃⁻ (M)クロマトグラフィーカラム(高さ100mm;直径15mm、XK16, GE Healthcare, Munchen, Germany)をパックし、80mM NaCl、2%スクロース、50mM HEPES(pH6.0)、2.5mM MgCl₂からなる5 CVランニングバッファーを用いて平衡化した。

【 0 1 9 8 】

平衡化後、清澄化した上清を、Fractogel EMD SO₃⁻ (M)がパックされたクロマトグラフィーカラム(流速10ml/分)に通して分離した。分離後、カラムを、前記で述べた5 CVランニングバッファーを用いて洗浄した。結合した粒子(wtVP3または改変AAVL^{*}P^{*})は、350mMの塩化ナトリウム濃度で効果的に溶出した(ピーク1約45ml)。

20

【 0 1 9 9 】

緩衝液交換 (AKTAエクスプローラーシステム)

連続陰イオン交換クロマトグラフィー用に溶出タンパク質(ピーク1)のpHおよび塩濃度を調整するために、Sephadex G25がパックされたクロマトグラフィーカラム(高さ500mm;直径15mm、XK26, GE Healthcare, Munchen, Germany)(流速10ml/分)を用いて、緩衝液交換を行った。25mM Tris(pH8.2)、150mM NaCl[#]/100mM NaCl^{*}、2.5mM MgCl₂からなる3 CV SOURCE 15Qランニングバッファーを用いたカラム平衡化後に、ピーク1をカラムに通して分離した。タンパク質画分(約120ml)を集めた。

30

【 0 2 0 0 】

陰イオン交換クロマトグラフィー (AKTAエクスプローラーシステム)

SOURCE 15Qクロマトグラフィーカラム(高さ80mm;直径15mm、XK16, GE Healthcare, Munchen, Germany)を、25mM Tris(pH8.2)、150mM NaCl[#]/100mM NaCl^{*}、2.5mM MgCl₂からなる5 CV SOURCE 15Qランニングバッファーを用いて平衡化した。平衡化後に、緩衝液交換後に得られたタンパク質画分(約120ml)をロードし、クロマトグラフィーカラム(流速10ml/分)に通して濾過した。90%の粒子を含有するフローズルー(約120ml)を集めた。

【 0 2 0 1 】

遠心式フィルター装置を用いた粒子濃縮

Centricon Plus-70(カットオフ100kDa)遠心式フィルター装置(Millipore)を用いて、wtVP3[#]または改変AAVL^{*}P^{*}を含有するフローズルーを濃縮した。濃縮は、スイングングバケット(swinging-bucket)ローター(MULTIFUGE L-R; Heraeus, Hanau, Germany)を用いて、3500g、20℃で15分間行った。結果として生じた濃縮物(約45ml)をサイズ排除クロマトグラフィーに通してすぐに分離した。

40

【 0 2 0 2 】

サイズ排除クロマトグラフィー (AKTAエクスプローラーシステム)

Superdex 200(プレップグレード)クロマトグラフィーカラム(高さ500mm;直径50mm、XK50, GE Healthcare, Munchen, Germany)をパックし、200mM NaCl、2%スクロース、50mM HEPES(pH6.0)、2.5mM MgCl₂からなる2 CVランニングバッファーを用いて平衡化した。前記で述べた濃縮物(約45ml)をカラム(流速10ml/分)に通して分離した。粒子は最初に溶出した(SEC画分番号1~13;各5ml)。粒子純度が95%を超えるSEC画分をプールし、濾過滅菌し(

50

0.2 μ m)(Minisart; Sartoriusstedim)、-84 で保管した。

【0203】

1.4. ウエスタンブロットによるタンパク質発現の分析

同一部分の収集した細胞または等量の精製された粒子をSDS-PAGE用に処理した。タンパク質発現は、以前に説明されたように(Wistuba et al., 1995)モノクローナル抗体A69、B1(Progen, Heidelberg, Germany)、抗AU1(Covance, Emeryville, USA)、抗GFP(クローンB-2; Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA)、またはポリクローナル抗体抗AAP(1.7.を参照されたい)を用いたウエスタンブロットアッセイによって分析した。プロトコールのバリエーションを各実施例の説明の中に示した。

【0204】

1.5. 力価分析

キャプシド力価は、市販のAAV2力価測定ELISAキット(Progen, Heidelberg, Germany カタログ番号:PRATV)またはそれぞれのAAV1力価測定ELISAキット(Progen, Heidelberg, Germanyカタログ番号:PRAAV1)を用いて、製造業者のマニュアルに従って求めた。

【0205】

1.6. 免疫蛍光分析

免疫蛍光分析のために、HeLa細胞をカバーガラスに載せて24時間、培養し、トランスフェクトし、cap遺伝子のプロモーターp40依存性転写の場合は(pTAV2.0およびpVP3)、Ad5(MOI=4)に感染させた。20~48時間後に、細胞を100%メタノール(10分、-20)で固定し、PBS(リン酸緩衝食塩水:18.4mM Na₂HPO₄、10.9mM KH₂PO₄、125mM NaCl)で洗浄した。一次抗体とのインキュベーションは、RTで1時間、または4 で一晩行った。一次抗体として、ハイブリドーマ上清A20またはA69を使用して、それぞれ、集合したキャプシドまたはVP2を検出した。A20およびA69は希釈せずに使用した(Progen, Heidelberg, Germany)。集合しなかったキャプシドを検出するために、3種類全ての遊離VPタンパク質を標識するウサギポリクローナル血清を1:500に希釈して使用した。カバーガラスをPBSで3回洗浄し、その後、適切な二次抗体(Dianova, Hamburg, GermanyまたはMolecular Probes, Leiden, The Netherlandsから購入した、1:400に希釈したCy3標識ヤギ抗マウスまたはFITC標識ヤギ抗ウサギ1:150)とRTで1時間インキュベートした。カバーガラスを再洗浄し、100%エタノールに浸漬し、Permafluor封入剤(Beckman Coulter, Marseille, France)に包埋した。共焦点画像(0.3 μ m切片)を、Leica TCS SP2レーザー走査型顕微鏡を用いて取得し、Adobe Photoshop CSソフトウェアを用いてさらに加工した。プロトコールのバリエーションを各実施例の説明の中に示した。

【0206】

GFP発現を視覚化するために、細胞を2%パラホルムアルデヒドで15分間固定し、50mM N H₄Clによって5分間、2回クエンチし、0.2%Triton X-100によって10分間、透過処理した。

【0207】

1.7. ポリクローナル抗体の調製

ポリクローナルAAP抗血清(抗AAP)は、標準的な手順に従って、KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)と結合体化した配列GKDSSTTTGDS DPRDSTS(SEQ ID NO:61)を含むペプチドを用いてモルモットを免疫化することによって作製した。

【0208】

1.8. 電子顕微鏡のためのウイルス粒子の逆染色法

(Grimm et al., 1999, Grimm and Kleinschmidt, 1999, Mittereder et al., 1996)に従う電子顕微鏡のために、以下に記載のようにウイルス粒子の逆染色法を行った。

【0209】

5 μ lの試料(約5x10¹⁰ウイルス粒子)を、新鮮空気-グロー放電炭素がコーティングされたグリッド面に適用し、2分間インキュベートした。過剰な溶液は、グリッドの縁をWhatman濾紙にのせて吸い取ることによって除去した。塩沈殿物を避けるために、グリッドに水を3滴、その後に、2%(w/v)酢酸ウラニル溶液を4滴たらして洗浄した。最後の染色溶液の

液滴をグリッド上に5分間のせたままにした後に、吸い取りおよび風乾を行った。Morgagni 268D FEI顕微鏡を100kVで用いて、電子顕微鏡写真を撮影した。

【0210】

2.VP2のN末端欠失分析によるVLP形成の分析

本発明者らの研究ならびに以前の研究(前記と比較のこと)は、VP3 cdsのみを含む構築物からVP3を発現させた時にキャプシド集合が無いことを報告した。VP3の発現ではVLP形成に十分でないので、本発明者らは、この欠陥を克服することができる、さらなる配列を特定しようと試みた。この実験において、本発明者らは、VP3 cdsの上流にある配列がVLP形成に必要であるかどうか調べた。もしそうであれば、その配列を特徴付けなければならない。

10

【0211】

2.1. 欠失変異体のクローニング

プラスミドpTAV2.0(Heilbronn et al., 1990)、pVP3(Warrington et al., 2004)、pCMV-VP(Wistuba et al., 1997)、およびpKEX-VP3(Ruffing et al., 1992)は以前に説明されている。欠失変異体pCMV-VP3/1882、pCMV-VP3/2193、pCMV-VP3/2596、pCMV-VP3/2611、pCMV-VP3/2696、pCMV-VP3/2765、およびpCMV-VP3/2809をプラスミドpVP3からクローニングした。pCMV-VP3プラスミドの名前の後ろにある番号は、Ruffing et al.(1994)によるAAV2ゲノム内のヌクレオチド位置を示している。構築物を図5Aに図示した。

【0212】

欠失変異体のクローニングのために、(変異VP1翻訳開始コドンおよび変異VP2翻訳開始コドンを有する)pVP3のHindIII/BsiWI断片を、pCMV-VPのHindIII/BsiWIバックボーンにサブクローニングして、構築物pCMV-VP3/1882を得た(図5)。構築物pCMV-VP3/2193およびpCMV-VP3/2596は、pVP3からのDraI/BsiWIまたはEcoNI(平滑末端)/BsiWI断片を、pCMV-VPのHindIII(平滑末端)/BsiWIバックボーンにサブクローニングすることによって作製した(EcoNIおよびHindIII部位は、一本鎖オーバーハングを消化することによって平滑末端化した)(ゲノム配列を基準にした、クローニングに使用した様々な制限部位の位置を図4に示した)。さらなる欠失のために、pVP3を部位特異的変異誘発反応のテンプレートとして使用した。変異誘発は、QuickChange部位特異的変異誘発キット(Stratagene, Amsterdam, the Netherlands)を使用し、製造業者のマニュアルに従って行った。それぞれの変異について、指定された領域に新たなHindIII制限部位を生じるように、2つの相補的PCRプライマーを設計した。プライマー配列:

20

5'-CCTCTGGTCTGGGAAGCTTATGGCTACAGGCAGTGGCG-3' (SEQ ID NO: 62)

5'-CGCCACTGCCTGTAGCCATAAGCTTAGTTCCCAGACCAGAGG-3' (SEQ ID NO: 63)

【0213】

次いで、変異プラスミドからのHindIII/BsiWI断片を、pCMV-VPのHindIII/BsiWIバックボーンにサブクローニングして、構築物pCMV-VP3/2611、pCMV-VP3/2696、pCMV-VP3/2765、およびpCMV-VP3/2809を得た(図5A)。

【0214】

2.2. ウェスタンブロットおよびELISAによる構築物の分析

40

タンパク質発現を分析するために、同一部分の収集した細胞をSDS-PAGE用に処理した。

【0215】

図5Bに示したように、pTAV2.0(wtAAV)およびpCMV-VPを除く図5Aに列挙した全ての構築物を用いて293-T細胞をトランスフェクションすると、3種類全てのキャプシドタンパク質と反応する抗体B1を用いたウェスタンブロッティングによって分析した時に、VP3のみの発現が得られた。対応する翻訳開始部位が変異されていないプラスミドであるpTAV2.0(wtAAV)またはpCMV-VPによってトランスフェクトされた対照細胞においては、VP3に加えてVP1およびVP2が良好に検出された。

【0216】

例えば、変異プラスミドpKEX-VP3、pCMV-VP3/2765、およびpCMV-VP3/2809については、

50

抗体B1は、VP3よりもゆっくりと移動する2つのポリペプチドバンドと反応した。少なくとも、プラスミドpKEX-VP3およびpCMV-VP3/2809については、VP1またはVP2をコードするヌクレオチド配列が完全に欠失しているので、対応するポリペプチドはVP1またはVP2アミノ酸配列を含有することができない。さらに、3種類全ての変異体プラスミドが発現した時には、抗体A69を用いて、VP1およびVP2を検出することができなかった。従って、これらの試料中にVP1およびVP2が存在することははっきりと除外することができた。本発明者らは、VP3よりもゆっくりと移動する2つのポリペプチドバンドが、高レベルのVP3が完全に変性しなかった結果であると結論付けた。

【0217】

しかしながら、pVP3によってトランスフェクトした細胞の抽出物を、VP1およびVP2のみを検出する、従って、豊富なVP3との反応を除外する抗体A69によってプローブした時に、VP1およびVP2の領域において弱いバンドを検出することができた。このバンドは、pKEX-VP3によってトランスフェクトされた細胞の抽出物には無かった。この結果は、pVP3構築物のトランスフェクションによって、少量のVP1およびVP2またはVP1様タンパク質およびVP2様タンパク質が発現されることを示唆している。これらは、別の翻訳開始コドンから翻訳されたか、変異されたVP1翻訳開始部位およびVP2翻訳開始部位における予定外の開始によって翻訳されたのかもしれない。

【0218】

pCMV-VP3/2696までのpVP3の全ての欠失変異体において、抗体A69は1つまたはいくつかのポリペプチドバンドを明らかにし、pCMV-VP3/2765およびpCMV-VP3/2809によってトランスフェクトされた細胞の抽出物を用いたウェスタンブロットだけがA69との反応を示さなかった。なぜなら、これらのタンパク質において抗体エピトープが既に欠失していたからである。

【0219】

キャプシド集合は、抗体A20をベースとするキャプシドELISAによって確かめられた(図5C)。対照的に、pKEX-VP3によるVP3の発現によって検出可能な量のキャプシドは得られなかったが(図5C)、発現したVP3タンパク質の量はpVP3と比較してかなり多かった(図5B)。

【0220】

本発明者らの以前の結果と一致して、pKEX-VP3と同等のpCMV-VP3/2809をトランスフェクトすることによってVP3だけを発現させても、キャプシドは検出可能に形成されなかった(図5C)。A20 ELISAと反応しない可能性のあるキャプシドの形成は、細胞抽出物をスクロース勾配上で分析し、その後、B1抗体を用いてウェスタンブロットティングを行うことによって排除した(データ示さず)。興味深いことに、様々な欠失変異体のキャプシド集合効率を分析すると、キャプシド集合効率は、ある欠失変異体から次の欠失変異体に移るごとに増加し、その後、欠失がある大きさになると減少することが検出された。キャプシド集合のピーク効率は、変異体pCMV-VP3/2596およびpCMV-VP3/2611について見られた(図5AおよびC)。

【0221】

2.3 結論

この結果から、N末端伸長VP3配列の存在(VP3開始コドンの上流にDNA配列が存在することによる)とキャプシド集合との間には明らかな相関関係があることが分かる。本発明者らは、VP3 VLPが形成するためにはVP3 cdsの他に存在しなければならない、VP3 cds上流にある約44ヌクレオチドのDNA配列を特定した。この44ntは、キャプシド集合を依然として引き起こすことができる構築物pCMV-VP3/2765に寄与する。

【0222】

2765'部位の上流にもう少しDNA配列が存在するとキャプシド集合の効率が高まる。このDNA配列は、ヌクレオチド位置2717から開始するORF2、およびヌクレオチド2717と2765との間におそらく位置する完全長AAPの推定開始と一直線に並んでいる。

【0223】

3. cap遺伝子の配列断片はトランスでキャプシド集合を誘導することができる

10

20

30

40

50

実施例2において、本発明者らは、粒子が形成するためにはVP3 cdsの他に存在しなければならない、VP3開始コドンの上流にある(断片Zを含む)配列を特定した。断片Zの産物が一過的にかつトランスで機能するという仮説を証明するために、本発明者らは、GFP cdsと融合したEcoNI/BsiWI制限断片を含むキャプシド配列断片がVP3のキャプシド集合欠損を救出できるかどうか試験した。

【0224】

3.1. トランス相補のためのpVP2N-gfpのクローニング

構築物pVP2N-gfpを作製するために、EcoNIおよびBsiWI制限部位を、ベクターpEGFP-N1(BD Biosciences, Erembodegem, Belgium)のマルチクローニングサイトに導入した。その後、pTAV2.0からのEcoNI/BsiWI断片(制限部位の位置を図4に示した)を、CMVプロモーターの下流、GFP cdsおよびそのポリ(A)シグナルの上流に挿入した。この融合構築物pVP2N-gfpが発現すると、図6Aに図示したようにVP2、VP3、またはGFPの3つの既存の開始コドンの1つでの転写開始に応じて、3種類の転写物VP2N-gfp、VP3N-gfp、およびGFPが生じる。

【0225】

例えば、コドン改変または停止コドンを含む多くの誘導体が、それぞれの図に図示したようにpVP2N-gfpから得られた。これらは常にGFP cdsを含み、それに応じて名前が付けられた(付加事項-gfpを有する)。物事を単純にするために、この付属物(-gfp)は、一部の図(例えば、図20、22、23)では、それぞれの構築物の名前に無い。

【0226】

3.2. トランスでの機能置換の分析

以下の実験をHeLa細胞において行った。プラスミドpCMV-VP3/2809およびpVP2N-gfpを様々なモル比でコトランスフェクトし、遺伝子発現およびキャプシド集合について分析した(図6)。ウエスタンブロット分析によって、VP3の量は、それぞれのモル比の2つのプラスミドによってトランスフェクトされた細胞抽出物において同じであることが確かめられたが(抗体B1を用いた検出、図6B上部)、1:1比または1:1/5比それぞれでトランスフェクションした後にしか、VP2N-gfpは検出できなかったことが確かめられた(抗体A69を用いた検出、図6B下部)。1:1比または1:1/5比において、さらに、抗体抗gfp(図6B、真ん中)は、図6Aに図示したように、融合構築物pVP2N-gfpの発現に起因する3種類全ての転写物、すなわち、VP2N-gfp、VP3N-gfp、およびGFPを検出する。VP3の強力な開始コドンがあるためと、インビボ状況に対応して、VP3N-gfpの転写物が優位を占める。驚いたことに、キャプシド集合は、pCMV-VP3/2809:GFP融合プラスミドの比が1:1/50になるまで免疫蛍光によって観察することができた(図6C)。抗体A20をベースとするキャプシドELISAを用いたキャプシド形成の定量によって、pVP2N-gfpを添加した変異体pCMV-VP3/2809のキャプシド形成は、N末端伸長VP3が同時発現する変異体pCMV-VP3/2696と同様の効率があることが分かった(図6D)。

【0227】

3.3. 結論

この結果から、cap遺伝子のEcoNI-BsiWI制限断片がトランスで存在すると、唯一のキャプシドタンパク質としてVP3を発現する構築物のキャプシド集合が救出されることが分かる。集合は、コトランスフェクトされたpVP2N-gfpプラスミドが1/50の量でも検出することができたので、このヘルパー因子にはVP3キャプシド集合のための準化学量論的な作用があると推定することができる。

【0228】

4.C末端切断型VP2タンパク質は準化学量論量で発現し、キャプシドに組み込まれる

ここでは、作製されたAAV様粒子がVP3のみからなるかどうかを調べた。プラスミドpCMV-VP3/2696から、またはpCMV-VP/2809およびpVP2N-GFPのコトランスフェクションのトランス相補アッセイにおいて、空の粒子を産生した。Kronenberg et al.(2001)に記載の変更を加え、かつアデノウイルス感染無く293細胞をトランスフェクトし、48時間後に細胞を収集したという変更を加えたSteinbach et al.(1997)によるスクロースクッションを介して、粒子を精製した。切断型VP2タンパク質の組み込みをウエスタンブロットによって分

析した(図7)。

【0229】

pVP2N-GFPは、 5×10^{11} 粒子の最大ローディングの中で検出することができなかった。だが、pCMV-VP3/2696をトランスフェクトすることによって、A69シグナルが検出された。このことは、切断型VP2が準化学量論的にキャプシドに組み込まれることを示している。

【0230】

4.1. 結果

結論として、トランス状況でVP3のみの粒子が作製される。対照的に、シス状況では、切断型VP2は準化学量論で組み込まれる。ウエスタンブロットから、 2×10^9 wt AAV粒子からのVP1のシグナル強度は、pCMV-VP3/2696から生じた 1×10^{11} 粒子からのシグナルとほぼ同じである。このことは、切断型VP2の量がVP1の量の約1/50であることを意味している。wtキャプシドの中のVP1:VP2:VP3の化学量論比が1:1:10と仮定すると、切断型VP2はVP3の約1/500である。1個のキャプシドは60個のVPサブユニットからなるので、VP3のみからなるキャプシドも存在するはずである。

【0231】

4.2. 結論

この結果は、切断型VP2タンパク質それ自体はキャプシドそのものに必要とされないという結論を強める。

【0232】

5. トランス相補に使用した構築物のコドン改変はトランス相補プロセスを阻害することができる

断片Zのトランス相補作用物質がこういったものであるかを調べるために、pVP2N-gfpの中にあるVP2N部分(制限部位EcoNIとBsiWIとの間にある部分)のコドンを改変した。これは、第1のORFのアミノ酸配列が変わることなく、DNA配列が変化したことを意味している。G ENEART(Regensburg, Germany)によってコドン改変を行った。コドンを、哺乳動物細胞において優先的に用いられるコドンに改変した。配列を図8Aに示した。pVP2N-gfpのDNA配列と、コドンが改変されたpVP2N-gfp(cm、pVP2Ncm-gfp)のDNA配列との同一性は71%であるのに対して、タンパク質同一性は100%である。

【0233】

pVP2Ncm-gfpのタンパク質発現を、ウエスタンブロット分析(図8B)において、およびトランスフェクトされた293細胞内の免疫蛍光(図8C)によって比較した。pCMV-VP3/2809のキャプシド形成を救出する能力を、実施例3に記載したトランス相補アッセイにおいて試験した(図8D)。プラスミドを1:1のモル比でコトランスフェクトした。

【0234】

結果および結論

ウエスタンブロットから、コドンが改変された構築物(pVP2Ncm-gfp)からのタンパク質発現は、非改変構築物(pVP2N-gfp)からのタンパク質発現よりかなり多いことが分かった。これは、コドン改変を哺乳動物細胞に合わせて最適化したので予想していなかったことではなかった(図8B)。また、コドンが改変されたタンパク質の細胞内局在は非改変タンパク質と差がなかった(図8C)。驚いたことに、pVP2Ncm-gfpは、pCMV-VP3/2809のキャプシド形成を救出する能力を失った(図8D)。

【0235】

多量のpVP2Ncm-gfpタンパク質がキャプシド集合に及ぼす悪影響を排除するために、本発明者らは、コドンが改変されたpVP2Ncm-gfpとpCMV-VP3/2696をコトランスフェクトした。この組み合わせでは、キャプシド集合は正常であった。このことから、集合活性は多量のpVP2Ncm-gfpによって抑制されなかったことが分かる(データ示さず)。また、少量のプラスミドpVP2Ncm-gfpをpCMV-VP3/2809とトランスフェクションすることによって少量のpVP2Ncm-gfpを発現させても、キャプシド集合は救出されなかった(データ示さず)。

【0236】

この結果は、第1のORFから翻訳されるタンパク質はトランス相補活性を担っていないと

いう結論を強める。

【 0 2 3 7 】

6. トランス相補に使用した構築物に停止コドン挿入してもトランス相補プロセスは阻害されない

トランス相補作用物質がどういったものであるかさらに分析するために、停止コドンEcoNI-BsiWI制限断片の中に挿入した。停止コドン挿入のために、点変異を行った。

【 0 2 3 8 】

6.1. pVP2N-gfpへの停止コドン挿入

pVP2N/stopA-gfp(pVP2N/ORF1stopA-gfpとも名付けた)、pVP2N/stopB-gfp(pVP2N/ORF1stopB-gfpと同一)、pVP2N/stopC-gfp(pVP2N/ORF1stopC-gfpとも名付けた)、およびpVP2N/stopD-gfp(pVP2N/ORF1stopD-gfpと同一)を構築するために、テンプレートpVP2N-gfpおよび望ましい置換を含む2つの相補的PCRプライマーを用いて、部位特異的変異誘発反応(Quick Change部位特異的変異誘発キット, Stratagene)を行った。次いで、いずれの場合でも、EcoNI/BsiWI断片をpVP2N-gfpのEcoNI/BsiWIバックボーンにクローニングした。

【 0 2 3 9 】

StopAを作製するために、ヌクレオチド位置2770にあるシトシンをチミンに置換して、tag停止コドンを得た。StopBを作製するために、ヌクレオチド位置2797にあるアデニンをチミンに置換して、tga停止コドンを得た。StopCは、ヌクレオチド位置2821にあるアデニンをチミンに置換し、位置2823にあるチミンをアデニンに置換して、tga停止コドンを得ることによって作製した。StopDは、ヌクレオチド位置2878にあるグアニンをチミンに置換して、tga停止コドンを得ることによって作り出した。位置はRuffing et al.(1994)に従う。

【 0 2 4 0 】

pVP2N-gfpの中の4種類の部位における停止コドン挿入に使用したプライマーペア

StopA 5'-CCA GCC TCT CGG ATA GCC ACC AGC AGC C-3' (SEQ ID NO: 64)

i-StopA 5'-GGC TGC TGG TGG CTA TCC GAG AGG CTG G-3' (SEQ ID NO: 65)

StopB 5'-GCC CCC TCT GGT CTG TGA ACT AAT ACG ATG GC-3' (SEQ ID NO: 66)

i-StopB 5'-GCC ATC GTA TTA GTT CAC AGA CCA GAG GGG GC-3' (SEQ ID NO: 67) 30

StopC 5'-CGA TGG CTA CAG GCT GAG GCG CAC CAA TGG C-3' (SEQ ID NO: 68)

i-StopC 5'-GCC ATT GGT GCG CCT CAG CCT GTA GCC ATC G-3' (SEQ ID NO: 69)

StopD 5'-GGA GTG GGT AAT TCC TCG TGA AAT TGG CAT TGC G-3' (SEQ ID NO: 70)

i-StopD 5'-CGC AAT GCC AAT TTC ACG AGG AAT TAC CCA CTC C-3' (SEQ ID NO: 71)

【 0 2 4 1 】

挿入された停止コドンの模式図を図9Aに示した。pVP2N/stopA-gfpにおいて、ヌクレオチド c_{2770} はtに変異されており、従って、グルタミンをコードするcagコドンはtagに変わっており(ORF2の中のサイレント変異)、pVP2N/stopB-gfpにおいては、ヌクレオチド g_{2797} はtに変異されており、従って、グリシンをコードするggaコドンはtgaに変わっており(ORF2の中のTrp Cys変異)、pVP2N/stopC-gfpにおいては、ヌクレオチド a_{2821} はtに変異されており(ORF2においてサイレント)、ヌクレオチド t_{2823} はaに変異されており、従って、セリンをコードするagtコドンはtgaに変わっており(ORF2の中のVal Glu変異)、pVP2N/stopD-gfpにおいては、ヌクレオチド g_{2878} はtに変異されており、従って、グリシンをコードするggaコドンはtgaに変わっている(ORF2においてサイレント)。位置はRuffing et al.(1994)に従う。置換は全てORF2を破壊しない。結果として生じたpVP2N-gfp stop構築物を、

実施例3に記載した構築物pCMV-VP3/2809のトランス相補に使用した。プラスミドpCMV-VP3/2809およびそれぞれのpVP2N/stop-gfp構築物を1:1のモル比でコトランスフェクトした。

【0242】

さらに、Stop構築物のタンパク質発現を、A69抗体を用いたウエスタンブロット分析によって試験した。

【0243】

6.2. 結果および結論

ウエスタンブロット分析から、VP3は全ての試料において発現したことが確かめられた(図9Bにおいてモノクローナル抗体B1によって検出した)。予想どおりに、Bluescriptベクター(pBS)は、トランス相補アッセイにおいてキャプシド集合を引き起こさず、従って、負の対照として役立った(図9C)。興味深いことに、pVP2N-gfp構築物とは対照的に、pVP2N/stop-gfp構築物のタンパク質発現は検出されなかったが(図9B)、停止コドン挿入しても、cap遺伝子のEcoNI-BsiWI制限断片のトランス相補活性は影響を受けなかった。VP3粒子は簡単に集合することができた(図9C)。変異体pVP2N/stopB-gfpおよびpVP2N/stopC-gfpを用いて得られたキャプシド力価の低下は、それぞれの変異を加えることによって導入されたヌクレオチド変化による可能性がある(ORF1のstopBはORF2のTrp Cys変異につながり、ORF1のstopCはORF2のVal Glu変異につながった)。これらの実験は共に、EcoNI-BsiWI断片の核酸配列がキャプシド集合ヘルパー活性の基礎であるが、第1のORFからの発現タンパク質はキャプシド集合ヘルパー活性の基礎でないことを示している。なぜなら、全ての変異体は第1のORFにおいて停止コドンを含むからである。ORF1に停止コドンをもたらず置換は、ORF2からのAAPのアミノ酸合成を停止しなかったが、キャプシド力価の差から、AAPの機能に影響を及ぼしたことが分かった。

【0244】

7. 想定されたNLSはVLP形成に必要でない

変異体pCMV-VP3/2696は高濃度のキャプシドを形成したが、わずかに短い変異体pCMV-VP3/2765は、明らかに少量のキャプシドになって集合した(図5C)。この短い変異体は、AAV VP2タンパク質のNLSとして機能することが示唆されていた一群のAA(Hoque et al., 1999a)を欠いており、VPタンパク質の核輸送の低下を示した(図10)。想定されたNLSがこの違いの原因であるかどうか試験するために、本発明者らは、望ましい置換を含む2つの相補的PCRプライマーを用いた標準的な手順による部位特異的変異誘発によって、提唱されたNLS活性を破壊するために、構築物pCMV-VP3/2696においてはRKRペプチド(AA168~170)をAAAに置換することによって、それぞれの配列エレメントを置換した。RKRからAAAへの置換に使用したプライマー:

BC3_{ala}フォワード: 5'-GGC GGG CCA GCA GCC TGC AGC AGC AGC ATT GAA TTT TGG
TCA GAC TGG-3' (SEQ ID NO: 72)

BC3_{ala}リバース : 5'-CCA GTC TGA CCA AAA TTC AAT GCT GCT GCT GCA GGC TGC
TGG CCC GCC-3' (SEQ ID NO: 73)

【0245】

A20抗体を用いたトランスフェクトHeLa細胞の免疫蛍光(図10)およびキャプシドELISA(データ示さず)から、変異体pCMV-VP3/2696RKR168~170AAAのVPタンパク質のキャプシド集合の効率はwt AAVと同程度であることが分かった。

【0246】

このことは、これに関連して、RKR168~170を含む配列エレメントがNLSとして作用せず、キャプシド集合において異なる役割を果たしている可能性があるという解釈を裏付けている。

【0247】

8. VPタンパク質の核局在(およびN末端伸長)ではキャプシド集合に十分でない

SV40ラージT抗原に由来するNLSとVP3が融合すると、VP3は核に移動し、キャプシド集合

10

20

30

40

50

につながる事が報告されている(Hoque et al., 1999a)。本発明者らはこの実験を繰り返し、VP3タンパク質の効率的な核蓄積を観察した。しかしながら、抗体A20によって検出可能なキャプシド集合は無かった(図11A、11B、および15B)。

【0248】

さらに、VP3の上流にある異種N末端伸長(HSA)がVP3に集合能力を取り戻させるかどうか試験した。

【0249】

タンパク質発現および集合効率を比較するために、さらにいくつかの構築物を293細胞においてトランスフェクトした。

【0250】

8.1. 構築物のクローニング

pCI-VP、pCI-VP2、およびpCI-VP3は、それぞれのVPコード領域を、XhoI(5'-)およびNotI(3'-)オーバーハングのあるプライマーを用いてPCR増幅し、XhoI/NotIによって消化されたPCR産物をXhoI/NotIによって消化されたベクターpCI(PROMEGA)にサブクローニングすることによってクローニングされた。pCI-VP2の場合、同時にVP2の開始コドンをACGからATGに変えた。

【0251】

構築物pCMV-NLS-VP3のクローニングは、テンプレートとして構築物pCMV-VP3/2809および相補的PCRプライマー

5'-GGAAT TCGAT ATCAA GCTTG CCATG GCACC ACCAA AGAAG AAGCG AAAGG TTATG
GCTAC AGGCA GTGG-3' (SEQ ID NO: 74) および 5'-CCACT GCCTG TAGCC ATAAC CTTTC
GCTTC TTCTT TGGTG GTGCC ATGGC AAGCT TGATA TCGAA TTCC-3' (SEQ ID NO: 75)

を用いた部位特異的変異誘発反応によって行った。

【0252】

次いで、HindIII/BsiWI断片をアンブリコンからpCMV-VP3/2809のHindIII/BsiWIバックボーンにサブクローニングした。cap遺伝子産物NLS-VP3は、VP3のN末端にSV40 NLS MAPPK KKRKVのアミノ酸配列を含有する。

【0253】

構築物pCMV-HSA-VP3もpCMV-VP3/2809をベースとしており、VP3 cdsのすぐ上流にヒト血清アルブミン(HSA)のアミノ酸25~58をコードする核酸配列を含有する。断片

5'-GGTAC CAAGC TTACG GACGC CCACA AGAGC GAGGT GGCCC ACCGG TTCAA GGACC
TGGGC GAGGA AAAC TCAAG GCCCT GGTGC TGATC GCCTT CGCCC AGTAC CTGCA
GCAGT GCAAG CTTGA GCTC-3' (SEQ ID NO: 76)

(両端にHindIII制限部位を含む)を、遺伝子合成(Geneart, Regensburg, Germany)を介して得た。対応するベクターのHindIII消化の後に、結果として生じた111bp断片を、HindIIIによって直線化したpCMV-VP3/2809バックボーンにサブクローニングした。VP3の翻訳は、標準的なATG開始コドンにおいて開始するのに対して、HSA-VP3(VP3 N末端に37 Aa伸長を有する)の翻訳はACG開始コドンにおいて開始する。

【0254】

8.2. 免疫蛍光およびスクロース勾配による構築物の分析

本発明者らは、HeLa細胞を異なる構築物:pCMV-NLS-VP3もしくはpCMV-VP3/2809のみで、またはpVP2N-GFPとコトランスフェクションしてトランスフェクトした。さらに、pCMV-HSA-VP3をトランスフェクトした。キャプシドタンパク質の発現およびキャプシドの形成は、前記のように、ポリクローナルVP抗血清またはモノクローナルA20抗体を用いた免疫蛍光によって分析した。さらなるキャプシド形成は、以下のスクロース勾配の中で分析した。

。

10

20

30

40

50

【0255】

結果

Hoque et al.(1999a)と全く同じように、かつ野生型(wt)およびN末端切断型構築物pCMV/2696から発現したタンパク質と同等に、本発明者らは、構築物pCMV-NLS-VP3からVP3を発現することができ、VP3タンパク質の効率的な核蓄積を観察した。しかしながら、wtおよびN末端切断型構築物pCMV/2696とは対照的に、本発明者らは、抗体A20を用いてキャプシド集合を検出することができなかった(図11B)。

【0256】

予想どおりに、変異体pCMV-VP3/2696のVP3 N末端伸長と長さが同等の、ヒト血清アルブミンの36個のAAからなる伸長N末端を有するVP3タンパク質(HSA-VP3)の発現を抗体染色によって検出することができた(図11B)。pCMV-NLS-VP3の発現産物と比較して、変異体pCMV-HSA-VP3の発現産物は、かなり多い細胞質染色部分を示した。これもまた、本発明者らは、抗体A20を用いてキャプシド集合を検出することができなかった(図11B)。

10

【0257】

pVP2N-gfpのコトランスフェクションによってキャプシド集合が誘導され、抗体A20によって容易に検出することができた(図11B)。

【0258】

スクロース密度勾配沈降によって、A20抗体と反応しない、可能性のある集合産物を分析することによって、抗体B1と反応する非常に少量のVPタンパク質含有材料(勾配の全範囲にわたって沈降する)が示された(図11C)。このことから、誤って集合および凝集したVPタンパク質が、かなり少なく、ほとんど検出できない量で形成したことが分かる。

20

【0259】

8.3. ウェスタンブロットおよびELISAによる構築物の分析

一組の異なる構築物を、遺伝子発現についてはウェスタンブロットにおいて、キャプシド集合についてはELISAにおいて分析した(図15A)。

- ・ pCI-VP2: AAV2のVP2配列を、pCI(Promega, Mannheim, Germany)のマルチクローニングサイトにクローニングした。VP2開始コドンACGをATGに変えた。
- ・ pCI-VP3: 野生型VP3配列をpCIにクローニングした。
- ・ pCI-VP: 完全cap ORFをpCIにクローニングした。VP2およびVP3の開始コドンは変異させなかった。
- ・ pCMV-NLS-VP3: (実施例8およびHoque et al.(1999a)に記載)
- ・ pCI-VP2mutACG: これはpCI VP2を改変したものである。VP2開始コドンを破壊し、GAGコドンに置換した。
- ・ pCMV-VP3/2696(実施例2に記載)

30

【0260】

結果

ウェスタンブロット分析によって、VPタンパク質の予想されたサイズで、様々な構築物の類似したキャプシドタンパク質発現が示された(図15C)。しかしながら、キャプシド集合の効率は全く異なっていた(図15B)。Hoque et alと同様にクローニングされた構築物(pCMV-NLS-VP3)を用いて得られた粒子力価は検出限界より低かった。これはまた、好ましい構築物pCI-VP2mutACGまたはpCMV-VP3/2696のVP3粒子形成効率が、Hoque構築物pCMV-NLS-VP3と比較して3 log超、高かったことも意味している。構築物pCI-VP2は、pCI-VP2においてマイナーなACG開始コドンがATGに変異している以外はpCMV-VP3/2611と一致するのに対して、pCMV-VP3/2611においてはACGコドンは完全に欠失している。pCI-VP2構築物のキャプシド形成効率は著しく低下している(図15B)。本発明者らは、pCI-VP2から得られた粒子が主にVP2、VP3、または両タンパク質の混合物からなるかどうかを分析しなかった。図15Cは、この構築物からVP3が依然として発現しているが、VP2と比較してかなり低い(約1/10の)効率で発現していることを示している。本発明者らは、得られた粒子は主にVP3からなるという仮説を立てている。低い力価は、i)pCI-VP2からのVP3の量がpCMV-VP3/2611と比較して1/10であることで説明される。さらに、本発明者らは、おそらく、pCI-VP2にあるA

40

50

TG開始コドンがAAPの非標準開始コドンより優位に立つので、ATGがAAP発現を妨害すると推測している。予想どおりに、pCI-VP3は極めて低いキャプシド形成効率を示した。粒子集合効率は、10:1の比でpCI-VP3をpCI-VP2とコトランスフェクションすることによって部分的に救出することができた(図15B)。しかしながら、粒子形成全体は依然として、pCI-VP2mutACGまたはpCMV-VP3/2696と比較して1~2 log低い。このことは、pCI-VP2のVP2コード領域にあるATG開始コドンがAAP発現を妨害するという本発明者らの仮説を裏付けている。pCI-VPからの粒子形成はpCMV-VPと比較して非常に少ない(図5)。これは以下のように説明される。すなわち、pCI-VPは、スプライスドナー部位が無い点でpCMV-VPと異なる。従って、主にVP1を発現するpCI-VPから1種類のメッセンジャーRNAしか転写されないのに対して、pCMV-VPからは2種類のメッセンジャーRNAが転写される。マイナー転写物は主にVP1を発現するのに対して、メジャー転写物は1:8の比でVP2およびVP3をコードする。従って、pCMV-VPは、VP1:VP2:VP3を1:1:8の予想された比で発現するのに対して、構築物pCI-VPを用いた場合、VP2およびVP3は仮にあったとしてもわずかにしか検出できない。

10

【0261】

結論

結果から、VP3のみの核蓄積ではキャプシド集合に十分でなく、VP3の上流にある異種N末端伸長はVP3に集合能力をもたらすことができないと分かる。

【0262】

さらに、本発明者らの好ましい構築物pCI-VP2mutACGまたはpCMV-VP3/2696は、Hoque et al.(1999a)に記載のNLS-VP3融合構築物と比較して、3 log以上高いVP3粒子力価につながる。これらの実験は、VP3 N末端融合構築物がVLPに集合できることも証明している。従って、I-203は外来ペプチド配列に適した挿入部位である。

20

【0263】

9. 昆虫細胞においてVP3キャプシド集合を実現することができる

9.1.VP1変異体「Modification 4」のクローニング

Rep発現の非存在下でキャプシドタンパク質VP3から本質的になるウイルス粒子を産生するために、構築物pVL_VP1_MOD4を作製した。

【0264】

詳細に述べると、pUC19AV2(US6,846,665において詳述されている)をテンプレートとして使用して、以下のプライマーの存在下で標準的なPCR条件に従ってVP1を増幅した。

30

Insect_mod_4_s: 5'-CAC CCG CGG GGA TCC **GCC** GCT GCC GAC GGT TAT CTA CCC
GAT TGG CTC-3' (SEQ ID NO: 77), および

E_VP2_rev: 5'-CGC GAA TTC CTA **TTA** CAG ATT ACG AGT CAG G-3' (SEQ ID
NO: 78)

【0265】

それによって、VP1の野生型翻訳開始コドンATG(メチオニンをコードする)をGCC(アラニン)に変え、不活化した。結果として生じたEcoRI/BamHI断片を、pBSIIKS(Stratagene, La Jolla, CA, USA)にクローニングした。このベクターを用いて、以下のプライマー:

40

Insect-muta_4_s: 5'-ACC TGT TAA **GAC** AGC TCC GGG AAA AAA G-3' (SEQ ID NO:
79)

Insect-muta_4_as: 5'-CTT TTT TCC CGG AGC **TGT** CTT AAC AGG T-3' (SEQ ID NO:
80)

を用いて、QuickChange II部位特異的変異誘発キット(Stratagene)の説明書に従う部位特異的変異誘発によって、VP2の翻訳開始コドンを不活化した。

【0266】

それによって、VP2の野生型翻訳開始コドンACGをACAに変えた(両方ともスレオニンをコ

50

ードする)。結果として生じた構築物を制限酵素BamHIおよびEcoRIによって消化し、パキ
 ュロトランスファーベクターベクターpVL1393にクローニングした。結果として、構築物
 は、VP1開始コドンおよびVP2開始コドンに変異のある完全AAV cap遺伝子を含有するが、r
 ep cdsを含有しない(図12)。

【0267】

9.2. pVL_VP2のクローニング

以下に列挙したプライマーE_VP2_forおよびE_VP2_revを用いて、AAV2 VP2を増幅した。
 それによって、野生型VP2翻訳開始コドンACG(スレオニンをコードする)をATG(メチオニン
)に変えた。プライマー:

E_VP2_for: 5'-CAC CCG CGG GGA TCC ACT **ATGGCT** CCG GGA AAA AAG AGG-3' 10

(SEQ ID NO: 81)

E_VP2_rev: 5'-CGC GAA TTC CTA **TTA** CAG ATT ACG AGT CAG G-3' (SEQ ID NO: 82)

【0268】

結果として生じた構築物をパキュロトランスファーベクターベクターpVL1393にクロー
 ニングした。

【0269】

9.3. pVL_VP3のクローニング

以下に列挙したプライマーE_VP3_forおよびE_VP3_revを用いて、AAV2 VP3を増幅した。
 プライマー:

E_VP3_for: 5'-CAC CCG CGG GGA TCC ACT **ATG** GCT ACA GGC AGT GGC GCA C-3' 20

(SEQ ID NO: 83)E_VP2_rev:5'-CGC GAA TTC CTA **TTA** CAG ATT ACG AGT

CAG G-3' (SEQ ID NO: 84)

【0270】

結果として生じた構築物をパキュロトランスファーベクターpVL1393にクローニングし
 た。

【0271】 30

9.4. 粒子産生の分析

1.1に記載のようにAAV粒子を産生した。タンパク質発現については、ウエスタンブロッ
 ト分析によって細胞溶解産物を調べた。pVL_VP1_MOD4はVP3のみを発現し、pVL_VP2はVP2
 を発現したのに対して、pVL_VP3は、VP3に加えて、さらに小さな分解シグナルを示した(
 図12B)。A20 ELISAによって力価を得た。modification 4構築物については、 1×10^{12} 粒子/
 mlの力価が観察されたのに対して、VP2 pVL_VP2は 9×10^8 粒子/mlの力価を示し、pVL_VP3は
 1×10^8 粒子/mlの力価しか示さなかった(図12C)。

【0272】

結論

この結果から、哺乳動物細胞と同じくらい効率的に、昆虫細胞においてAAV VLPを産生
 できることが分かる。データから、昆虫細胞においても、VP3のN末端配列は、効率的なVP
 3キャプシド集合のために必要かつ十分であるように見えることが分かる。さらに、ACGか
 らATGへのVP2開始コドンの変化はキャプシド集合における効率の消失を伴う(図12C)。本
 発明者らは、構築物において欠陥のないVP3 ATGから開始するマイナーなVP3発現と同時に
 、pVL_VP2からの粒子集合が起こると推測している。

【0273】 40

10. 本質的にVP3からなるキャプシドはポリペプチドの挿入を許容する

10.1. 位置I-587にエピトープを含有するウイルス様粒子(VLP)の作製

位置I-587に特定のエピトープ配列を含有するVP3キャプシドタンパク質からなるVLPを
 コードする発現ベクターをクローニングするために、まず最初に、エピトープ配列を、pU 50

CAV2のVPコード配列の1-587(AAV-2のVP1タンパク質を基準としたアミノ酸番号)に対応する部位にクローニングし、その後に、ベクターpC1VP2mutACGにサブクローニングした。

【0274】

ベクターpUCAV2の作製はUS6,846,665において詳述されている。基本的には、このベクターは、pUC19のBamHI制限部位にクローニングされた、pAV2(Laughlin et al., 1983)に由来する完全なAAV2ゲノム(BglII断片)を含有する。AAV2キャプシドの位置1-587へのエピトープ配列の挿入を可能にするNotIおよびAscI制限部位を導入することによって、pUCAV2をさらに改変した(PCT/EP2008/004366)。さらに、位置453(AAV-2のVP1タンパク質を基準としたアミノ酸番号)と1-587の間に位置するFseI制限部位を、部位特異的変異誘発によってインフレームでベクターのVPコード配列に導入した。

10

【0275】

エピトープ配列を改変pUCAV2にクローニングするために、それぞれのエピトープとアラニンまたはグリシンアダプター配列をコードし、5'部位伸長を含有するセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計した。センスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドがアニーリングすると、改変pUCAV2のNotIおよびAscI制限によって作製されたオーバーハングと適合する5'部位オーバーハングおよび3'部位オーバーハングを有するdsDNAが生じるように、オリゴヌクレオチドの5'部位伸長を設計した。オリゴヌクレオチドおよびそれぞれのエピトープ配列の配列を表4にまとめた。挿入エピトープにはそれぞれ、以下の式：

Type Iアダプター：(Ala)₂-(Gly)₃-X_n-(Gly)₄-Ala

20

Type IIアダプター：(Ala)₂-(Gly)₄-X_n-(Gly)₄-Ala

Type IIIアダプター：(Ala)₃-(Gly)₅-X_n-(Gly)₅-(Ala)₂

Type IVアダプター：(Ala)₅-X_n-(Ala)₅

に従うアダプターが隣接する(X_nはエピトープ配列を表す)。

【0276】

オリゴヌクレオチドをアニーリングするために、センスオリゴヌクレオチド50.0 μgおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド50.0 μgを総体積200 μlで1xPCR-緩衝液(Qiagen)に入れて混合し、サーモミキサーに入れて95 °で3分間インキュベートした。95 °で3分後に、サーモミキサーの電源を切り、インキュベーターを冷却している間にオリゴヌクレオチドをアニーリングするために、チューブをさらに2時間インキュベーターに入れたままにした。アニーリングしたオリゴヌクレオチドをpUCAV2の1-587にクローニングするために、ベクターを、NotIおよびAscIによる制限によって直線化し、Rapid DNA Ligation Kit (Roche)を用いてクローニング反応を行った。簡単に述べると、アニーリングしたオリゴヌクレオチドを1xDNA希釈緩衝液によって10倍に希釈し、50 °で5分間インキュベートした。アニーリングしたオリゴヌクレオチド100ngおよびNotI//AscIによって直線化したベクターpUCAV2 50ngを連結反応において使用した。連結反応は、Rapid DNA Ligation Kit(Roche)の製造業者の説明書に従って行った。連結反応のアリコートを用いて、大腸菌XL1 blueまたはDH5 αを形質転換し、LB-Amp寒天プレート上に置いた。標準的な手順に従ってプラスミドを調製し、配列決定によって分析した。

30

【0277】

40

1-587にエピトープ配列を含有するVP3タンパク質からなる空のVLPを作製するために、標準的な手順に従って、1-587にエピトープを含有するpUCAV2のBsiWI/XcmI制限断片をベクターpC1VP2mutACGにサブクローニングした。ベクターpC1VP2mutACGは、pC1(Promega)のXhoI/NotI部位にクローニングされた重複するAAV2 VP2コード配列およびVP3コード配列を含有する。pC1VP2mutACGにおいて、VP2のACG開始コドンは破壊され、GAGコドンによって置換されている。置換は、VP2特異的プライマーおよびテンプレートとしてプラスミドpC1VP2を使用して、AAV2 VP2コード配列およびVP3コード配列をPCR増幅することによって行った(ベクターpC1VP2は、pC1のポリリンカーにクローニングされた野生型VP2コード配列およびVP3コード配列を含有する)。PCRに使用したフォワードプライマーは、VP2コード配列の5'部位にアニーリングし、GAGコドンによるVP2 ACG開始コドンの置換を含有する。

50

さらに、フォワードプライマーは、5' 部位にXhoI 認識配列を含有する。リバープライマーは、VP2/VP3コード配列の3' 末端にアニーリングし、その5' 部位にNotI 認識配列を含有した。結果として生じたPCR産物をpCIのXhoI/NotI 部位にクローニングした。

【0278】

結果として生じたベクターを、293-T細胞のトランスフェクションによるVLP産生に使用した。トランスフェクションの24時間前に、細胞(5×10^5 /ディッシュ)を6cmディッシュに播種した。293-T細胞を、US2004/0053410に記載したリン酸カルシウム沈殿によってトランスフェクトした。その後、293-T細胞を培地に入れて、3回の凍結(-80)および融解(37)サイクルによって溶解した。溶解産物(3ml総体積)を遠心分離によって清澄化し、市販のELISA(AAV力価測定ELISA; Progen, Heidelberg, Germany)を用いて、VLPキャプシド力価を求めた。VLP力価は、 2.1×10^{12} ~ 9.8×10^{12} キャプシド/mlであった(表5)。VLP TP18クローンを大規模パッケージングに直接使用した(実施例1に記載)。これは、粗溶解産物の中に 1.2×10^{13} キャプシド/mlを含有した(表5)。

10

【0279】

10.2. キャプシドの位置I-587およびI-453にエピトープを含有するウイルス様粒子(VLP)の作製

位置I-453およびI-587(AAV-2のVP1タンパク質を基準としたアミノ酸番号)にエピトープ配列を含有するVP3キャプシドタンパク質からなるVLPをコードする発現ベクターをクローニングするために、第1のエピトープ配列を、前記のようにpCIVP2mutACGのI-587に対応する部位にクローニングした。

20

【0280】

第2のエピトープ配列を、最初に、ベクターpCIVP2-I453-NotI-AscI(WO2008/145400に記載)のNotI/AscI制限部位にクローニングした。簡単に述べると、AAV2 VP2遺伝子をPCR増幅し、それぞれのPCR産物をベクターpCI(Promega)のXhoI/NotI 部位にクローニングすることによって、ベクターpCI-VP2-I453-Not-AscIを作り出した。結果として生じたベクターpCIVP2を、部位特異的変異誘発によってクローニング部位のNotI制限部位を破壊することによって改変した。このベクターを、AAV2キャプシドの位置I-453へのエピトープ配列の挿入を可能にする新規の唯一のNotIおよびAscI制限部位を導入することによってさらに改変した。さらに、I-453とI-587との間に位置するFseI部位を、部位特異的変異誘発によってインフレームでpCIVP2-I453-NotI-AscIのVPコード配列に導入した。ベクターのNotI/AscI 部位にエピトープ配列をクローニングするために、それぞれのエピトープとアラニン/グリシンアダプター配列をコードし、5' 部位伸長を含有するセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計した。センスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドがアニーリングすると、pCIVP2-I453-Not-AscIのNotIおよびAscI制限によって作製されたオーバーハングと適合する5' 部位オーバーハングおよび3' 部位オーバーハングを有するdsDNAが生じるように、オリゴヌクレオチドの5' 部位伸長を設計した。アニーリングしたオリゴヌクレオチドのクローニングは前記のように行った。

30

【0281】

オリゴヌクレオチドの配列およびそれぞれのエピトープ配列を表6にまとめた。挿入エピトープにはそれぞれ、以下の式:

40

$(\text{Ala})_2 - (\text{Gly})_3 - \text{X}_n - (\text{Gly})_4 - \text{Ala}$ に従うアダプターが隣接する(X_n はエピトープ配列を表す)。

【0282】

I-453およびI-587にエピトープ(マウスTNF またはIL-17エピトープ)を示す二価VLPを作製するために、I-453に挿入された所定のエピトープを含有するpCIVP2-I453-NotI-AscIのBsiWI/FseI断片を、(前記のように)I-587に挿入された特定のエピトープを含有するベクターpCIVP2mutACGにサブクローニングした。結果として生じたベクターを、前記(実施例1.2)(6ウェルプレートスケール)のように293-T細胞のトランスフェクションによる二価VLPの産生に使用した。粒子産生はELISA(AAV2力価測定ELISA; Progen)によって分析した。結果を表7に示した。これらのデータから、I-453およびI-587にエピトープが挿入されたV

50

P3タンパク質からなるVLPを高いキャプシド力価で産生できることが証明される。

【 0 2 8 3 】

(表 4) I-587へのエピトープ配列のクローニングに使用したオリゴヌクレオチド

名前/ ペプチド配列	タイプ	センス オリゴヌクレオチド	アンチセンス オリゴヌクレオチド	アダプター
CETP TP18 DISVTGAPVIT ATYL	ウサギ CETP エピトープ	5' GGCCGGCGGAGGTGACAT CAGCGTGACCGGTGCACCCG TGATCACCGCCACCTACCTG GGGGGTGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 85)	5' CGCGCACCGCCACCCCC CAGGTAGGTGGCGGTGATC ACGGGTGCACCGGTTCACGC TGATGTCACCTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 86)	タイプ I
3Dapi-3 DSNPRGV SAY LSR	ヒト IgE エピトープ	5' GGCCGGCGGAGGTGGTGA CAGCAACCTAGAGGCGTGA GCGCCTACCTGAGCAGAGGG GGTGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 87)	5' CGCGCACCGCCACCCCC TCTGCTCAGGTAGGCGCTC ACGCCTCTAGGGTTGCTGT CACCACCTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 88)	タイプ II
Kricek VNLTWSRASG	ヒト IgE エピトープ	5' GGCCGCAGCGCGGTGAA CCTGACCTGGAGCAGAGCCT CCGGCGCGGCGGCGGCGG 3' (SEQ ID NO: 89)	5' CGCGCCGCGCGCGCGCGC GCCGAGGCTCTGCTCCAG GTCAGGTTACCGCCGCTG C3' (SEQ ID NO: 90)	タイプ IV
TNFα-V1 SSQNSSDKPV AHVVANHQVE	マウス TNF α エピトープ	5' GGCCGGCGGAGGTAGCAG CCAGAACAGCAGCGACAAGC CCGTGGCCACGTGGTGGCT AACCACCAGGTGGAGGGGG TGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 91)	5' CGCGCACCGCCACCCCC CTCCACCTGGTGGTTAGCC ACCACGTGGGCCACGGGCT TGTCGCTGCTGTTCTGGCT GCTACCTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 92)	タイプ I
IL-17-V1 NAEGKLDHH MNSVL	マウス IL-17 エピトープ	5' GGCCGGCGGAGGTAACGC CGAGGGCAAGCTTGACCACC ACATGAACAGCGTGCTGGGG GGTGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 93)	5' CGCGCACCGCCACCCCC CAGCACGCTGTTTCATGTGG TGGTCAAGCTTGCCCTCGG CGTTACCTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 94)	タイプ I
IL-6-V2 LEEFLKVTLRS	マウス IL-6 エピトープ	5' GGCCGGCGGAGGTCTGGA GGAATTCCTGAAGGTGACCC TGAGAAGCGGGGTGGCGGT G 3' (SEQ ID NO: 95)	5' CGCGCACCGCCACCCCC GCTTCTCAGGGTCACCTTC AGGAATTCCTCCAGACCTC CGCC 3' (SEQ ID NO: 96)	タイプ I
Aβ(1-9) DAEFRHDSG	ヒト アミロイド β エピトープ	5' GGCCGCAGGCGGAGGGGG AGGCGACGCCGAGTTCAGAC ACGACAGCGGCGGCGGAGGG GGAGGCGCGG 3' (SEQ ID NO: 97)	5' CGCGCCGCGCCTCCCCC TCCGCCGCGCTGTCGTGT CTGAACTCGGCGTCGCCTC CCCCTCCGCCTGC 3' (SEQ ID NO: 98)	タイプ III

10

20

30

40

【 0 2 8 4 】

(表 5) 様々なVLPの小規模産生

名前	I-587におけるエピトープ	力価(キャプシド/ml)
VLP-TP18	CETP TP18 DISVTGAPVITATYL (SEQ ID NO: 99)	1.2 E+13(*)
VLP-3Depi3	3Depi-3 DSNPRGV SAYLSR (SEQ ID NO: 100)	2.1 E+12
VLP-Kricek	Kricek VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 101)	2.6 E+12
VLP-TNF α	TNFα-V1 SSQNSSDKPVAHV VANHQVE (SEQ ID NO: 102)	9.8 E+12
VLP-IL-17	IL-17-V1 NAEGKLDH HMNSVL (SEQ ID NO: 103)	5.6 E+12
VLP-IL-6	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 104)	5.6 E+12
VLP-A β	Aβ(1-9) DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 105)	6.2 E+12

10

20

(*) 大規模パッケージング

【 0 2 8 5 】

(表6) I-453へのエピトープ配列のクローニングに使用したオリゴヌクレオチド

名前/ ペプチド配列	タイプ	センス オリゴヌクレオチド	アンチセンス オリゴヌクレオチド
TNFα-V1 SSQNSSDKPVA HV VANHQVE	マウス TNF α エピトープ	5' GGCCGCCGGTGGAGGCAG CAGCCAGAACAGCAGCGACA AGCCCGTGGCCACGTGGTG GCTAACCACCAGGTGGAGGG CGGTGGAGGG 3' (SEQ ID NO: 106)	5' CGCGCCCTCCACCGCCCTCCAC CTGGTGGTTAGCCACCACGTGGGC CACGGGCTTGTCGCTGCTGTTCTG GCTGCTGCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 107)
IL-17-V1 NAEGKLDH HMN SVL	マウス IL-17 エピトープ	5' GGCCGCCGGTGGAGGCAA CGCCGAGGGCAAGCTTGACC ACCACATGAACAGCGTGCTG GGCGGTGGAGGG 3' (SEQ ID NO: 108)	5' CGCGCCCTCCACCGCCAGCAC GCTGTTCATGTGGTGGTCAAGCTT GCCCTCGGCGTTGCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 109)
IL-6-V2 LEEFLKVTLRS	マウス IL-6 エピトープ	5' GGCCGCCGGTGGAGGCCT GGAGGAATTCCTGAAGGTGA CCCTGAGAAGCGGCGGTGGA GGG 3' (SEQ ID NO: 110)	5' CGCGCCCTCCACCGCCGCTTCT CAGGGTCACCTTCAGGAATTCCTC CAGGCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 111)

30

40

【 0 2 8 6 】

(表7) I-453およびI-587にエピトープを有するVLPの産生

組み合わせ	I-453におけるエピトープ	I-587におけるエピトープ	力価 (キャプシド/ml)
TNF-α / IL-17	TNF α -V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE (SEQ ID NO: 112)	IL-17-V1 NAEGKLDHMHMNSVL (SEQ ID NO: 113)	7.9E+12
TNF-α / IL-6	TNF α -V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE (SEQ ID NO: 114)	IL-6-V2 LEEFLKVTLS (SEQ ID NO: 115)	8.5E+12
IL-17 / TNF-α	IL-17-V1 NAEGKLDHMHMNSVL (SEQ ID NO: 116)	TNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE (SEQ ID NO: 117)	1.0E+13
IL-6 / TNF-α	IL-6-V2 LEEFLKVTLS (SEQ ID NO: 118)	TNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE (SEQ ID NO: 119)	1.0E+13
IL-17 / IL-6	IL-17-V1 NAEGKLDHMHMNSVL (SEQ ID NO: 120)	IL-6-V2 LEEFLKVTLS (SEQ ID NO: 121)	3.9E+12
IL-6 / IL-17	IL-6-V2 LEEFLKVTLS (SEQ ID NO: 122)	IL-17-V1 NAEGKLDHMHMNSVL (SEQ ID NO: 123)	8.9E+12

10

20

【 0 2 8 7 】

10.3. 結論

VP3粒子は挿入を許容し、従って、ワクチンなどの医用薬剤として、例えば、B細胞エピトープを挿入することによって使用することができる。

【 0 2 8 8 】

11. 異なるAAV血清型のVP3キャプシド集合

11.1. AAV1欠失構築物

これらの知見を他の血清型に付与できるかどうか分析するために、類似構成のAAV1構築物を試験した。

【 0 2 8 9 】

以下の構築物をクローニングした。

- ・ pCI_VP2/2539_AAV1: 完全AAV1 VP2+VP1の95bpをpCI (Promega, Mannheim, Germany) にクローニングした。VP2 ACG開始コドンを変異させなかった。
- ・ pCI_VP3/2539_AAV1mutACG: 完全AAV1 VP2+VP1の95bpをpCI にクローニングした。VP2 ACG開始コドンをACCに変異させた。
- ・ pCI_VP3/2634_AAV1mutACG: VP1部分を完全に欠失させ、VP2 ACG開始コドンをACCに変異させた。

30

【 0 2 9 0 】

クローニング

全ての構築物のクローニングは、改変プライマーを用いた部位特異的変異誘発の標準的な手順によって行った(部位特異的変異誘発に使用したプライマーを以下に列挙した)。

【 0 2 9 1 】

pCI_VP2/2539_AAV1は、VP2 ACG開始コドンの95bp上流にNheI部位を挿入し、VP3停止コドンの下流にXmaI部位を挿入することによって作製した。pUCrep/fs/cap_AAV1_1588(PCT/EP2008/004366に記載)の中に変異を生じさせた。結果として生じたプラスミドをNheIおよびXmaIによって消化した。作製された断片を、pCI-VP2ベクター(PCT/EP2008/004366に記載)にクローニングした。

プライマー:

40

50

AAV1 NheI VP2plus95bp: 5'-GAG CGT CTG CTA GCA GAT ACC TCT TTT GGG G-3'
(SEQ ID NO: 124)

AAV1 VP3 Xma rev: 5'-GAA ACG AAT CAC CCG GGT TAT TGA TTA AC-3'
(SEQ ID NO: 125)

【 0 2 9 2 】

pCI_VP3/2539_AAV1mutACGは、pCIVP2/2539_AAV1の中のACG開始コドンをACCに変異させることによって作製した。

プライマー:

10

AAV1 VP2ko for: 5'-GGC GCT AAG ACC GCT CCT GGA AAG-3' (SEQ ID NO: 126)

AAV1 VP2ko rev: 5'-CTT TCC AGG AGC GGT CTT AGC GCC-3' (SEQ ID NO: 127)

【 0 2 9 3 】

pCI_VP3/2634_AAV1mutACGは、VP2 ACG開始コドンのすぐ上流にある95bpを欠失させ、同じ工程によって、pCIVP2_AAV1の中のACG開始コドンをACCに変異させることによって作製した。

プライマー:

AAV1 VP2ko_VP1del for: 5'-ACG ACT CAC TAT AGG CTA GCA GGC GCT AAG ACC
GCT CCT GGA AAG-3' (SEQ ID NO: 128)

20

AAV1 VP2ko_VP1del rev: 5'-CTT TCC AGG AGC GGT CTT AGC GCC TGC TAG CCT
ATA GTG AGT CGT-3' (SEQ ID NO: 129)

【 0 2 9 4 】

それぞれのプラスミドによって293細胞をトランスフェクションした後に、粗溶解産物の中でAAV1キャプシドの集合は制御された。キャプシド力価は、AAV1力価測定ELISA(Progen, Heidelberg, Germany)によって製造業者のマニュアルに従って求めた。3種類のAAV1構築物の集合効率同等であった。構築物pCI_VP3/2634_AAV1mutACGは 10^{13} 粒子/mlの力価を示した。このことは、一般的に、AAV1粒子のキャプシド生成の効率が、AAV2粒子のキャプシド生成の効率より高いことを裏付けている。ウエスタンブロット分析において、VP2およびVP3タンパク質は構築物pCI_VP2/2539_AAV1について検出可能であり、pCI_VP3/2539_AAV1mutACGおよびpCI_VP3/2634_AAV1mutACGそれぞれについて、VP3のみが検出可能であった(図13)。

30

【 0 2 9 5 】

キャプシドタンパク質発現の対照として、pUCAV1をトランスフェクトした。pUCAV1は、AAV1のVP1、VP2、およびVP3をコードする完全AAV1 Capオープンリーディングフレームを含有する。pUCAV1は、PCT提出物PCT/EP2008/004366において詳述されている(PCT/EP2008/004366では「pUCAV1_AgeI」と呼ばれている)。

【 0 2 9 6 】

40

11.2.pCMVによって駆動されるAAV1 VP3構築物のトランス相補

実施例5に記載のトランス相補実験を他の血清型に移しかえることができるかどうか理解するために、AAV1のpCMV-VP3/2809(AAV2)類似構築物をクローニングした。

【 0 2 9 7 】

11.2.1. クローニング

pCMV_AAV1VP3/2829を以下のようにクローニングした。以下に示したプライマーを用いた変異誘発によって、HindIII制限部位を、プラスミドpUCrep/fs/cap_AAV1(PCT/EP2008/004366に記載)のVP3 ATG開始コドンの直前に導入した。結果として生じたプラスミドをAgeIによって消化した。AgeI部位をKlenowポリメラーゼによって平滑断端にし、その後に、構築物をHindIIIによって消化した。作製された断片を、HindIII/HincIIによって消化し

50

たpBSCMVバックボーンにクローニングした。650bp BamHI CMVプロモーター断片を、Wistuba et al, 1997に記載のBluescriptII SK+ベクター(Stratagene, Amsterdam, Netherlands)のBamHI部位に挿入することによって、pBSCMVを作製した。プライマーHindIII変異誘発:

フォワード: 5'-CGC TGC TGT GGG ACC TAA GCT TAT GGC TTC AGG CGG TGG CG-3'
(SEQ ID NO: 130)

リバー: 5'-CGC CAC CGC CTG AAG CCA TAA GCT TAG GTC CCA CAG CAG CG-3'
(SEQ ID NO: 131)

10

【0298】

11.2.2. トランス相補アッセイ

トランス相補は、実施例3に記載したAAV2に由来するpVP2N-gfp構築物を用いて行った。細胞を、pVP2N-gfpのコトランスフェクションと共に、またはコトランスフェクション無く、AAV2のプラスミドpCMV-VP3(pCMV_VP3/2809)またはAAV1のプラスミドpCMV-VP3(pCMV_AAV1VP3/2829)によってトランスフェクトした(図14)。同じモル比のVP3構築物およびpVP2N-gfpをトランスフェクトした。タンパク質発現はウエスタンブロットによって分析し、粒子形成効率はELISAによって測定した。

【0299】

11.2.3. 結果および結論

20

AAV1 ELISA(Progen, Heidelberg)によって分析したAAV1の粒子集合は、AAV2に由来するpVP2N-gfpを用いたトランス相補によって救出された。本発明者らが、pCMV_AAV1VP3/2829およびpVP2N-gfpのコトランスフェクションと、pCIVP3/2634_AAV1mutACG(前記の11.1章を参照されたい)のトランスフェクションを比較しなかったため、救出効率は示すことができない。また、本発明者らは、AAV1トランス相補プラスミドpVP2N-Gfpをまだクローニングおよび試験していなかった。

【0300】

トランス相補されたAAV2 VP3について測定した粒子力価は 2.1×10^{11} であった。AAV1 VP3について得られた力価は 3.4×10^{10} であった(異なるELISAを用いたために、AAV1力価とAAV2力価を直接比較することはできない)。

30

【0301】

結果から、AAV1は、キャプシド集合のためにAAV2と同じ機構を利用し、断片ZおよびVP3は異なるAAV血清型と交換可能であることが分かる。

【0302】

11.3. AAV1 1588の中へのポリペプチドの挿入は許容される

ここでは、本質的にVP3粒子である空のAAV1がアミノ酸位置588の中への挿入を許容するかどうか調べた。

【0303】

エピトープ配列をpUCAV1-AgeI-1588(PCT/EP2008/004366に記載)にクローニングするために、それぞれのエピトープとグリシンアダプター配列をコードするセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計した。両方のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズすると、pUCAV1-AgeI-1588のNotI制限およびAscI制限によって作製されるオーバーハングと適合する5'-オーバーハングおよび3'-オーバーハングが作製される。調べられたオリゴヌクレオチド配列およびそれぞれのエピトープ配列を表4にまとめた。挿入エピトープにはそれぞれ、以下の式:Ser(588)-(Ala)₂-(Gly)₅-X_n-(Gly)₅-Thr(589)に従うアダプターが隣接する(X_nはエピトープ配列を表す)。

40

【0304】

ヒトIgEエピトープ「Kricek」をクローニングするためのオリゴヌクレオチド

アミノ酸配列： VNLTWSRASG

センスオリゴ： 5'-g gcc gca gcc gca gtg aac ctg acc tgg agc aga gcc tcc
ggc gcg gca gct gca gct-3' (SEQ ID NO: 132)

アンチセンスオリゴ： 5'-c gcg agc tgc agc tgc cgc gcc gga ggc tct gct cca ggt
cag gtt cac tgc ggc tgc-3' (SEQ ID NO: 133)

【 0 3 0 5 】

ヒトIgEエピトープ「3Depi-3」をクローニングするためのオリゴヌクレオチド

10

アミノ酸配列： DSNPRGV SAYLSR

センスオリゴ： 5'-GGCC GGC GGT GGA GGC GGT GAC AGC AAC CCT AGA GGC GTG
AGC GCC TAC CTG AGC AGA GGA GGC GGT GGA GGG-3'
(SEQ ID NO: 134)

アンチセンスオリゴ： 5'-CGCG CCC TCC ACC GCC TCC TCT GCT CAG GTA GGC GCT CAC
GCC TCT AGG GTT GCT GTC ACC GCC TCC ACC GCC-3'
(SEQ ID NO: 135)

20

【 0 3 0 6 】

使用した正確なクローニング手順は、実施例10に記載のAAV2 1587へのエピトープの挿入に使用したプロトコールと一致する。

【 0 3 0 7 】

1-588にエピトープ配列を含有する、本質的にVP3タンパク質からなる空のAAV1 VLPを作製するために、1-588にエピトープを含有するpUCAV1-AgeI-1588のBsiWI/SphI制限断片を、標準的な手順に従って、ベクターpCIVP3/2634-AAV1mutACG(実施例11.1に記載)にサブクローニングした。

【 0 3 0 8 】

結果として生じたベクターを、前記(実施例1.2.)のように293-T細胞のトランスフェクションによってAAV1 VLPの産生に使用した。

30

【 0 3 0 9 】

力価は、市販のAAV1 ELISA(Progen, Heidelberg, Germany)によって求めた。3.6E13/ml(Kricek)および9.2E13/ml(3Depi-3)の高力価が得られた。このことから、AAV1 588(AAV2 587と相同)の中への挿入は良好に許容され、AAV1 VP3粒子はワクチン担体として使用できることが分かる。

【 0 3 1 0 】

12. ORF2は断片Zを含み、AAPをコードする。

詳細な配列分析から、断片Zは、新たな「集合活性化タンパク質」(AAP)のかなりの部分をコードすることが明らかになった。図16は概要を示し、図17は、cap遺伝子を基準にしたORF2およびコードされるタンパク質AAPの位置、ならびにCapタンパク質VP1、VP2、およびVP3の翻訳開始コドンの位置、ならびに断片ZおよびEcoNI制限部位およびBsiWI制限部位の場所をさらに詳細に示す。3種類のCapタンパク質VP1、VP2、およびVP3は、cap遺伝子の同じ1つのORF(第1のORF、ORF1とも呼ぶ)から翻訳されるのに対して、AAPは、異なる読み枠(第2のORF、ORF2と呼ぶ)から翻訳される。VP1、VP2、およびVP3について、詳細に明らかにされた翻訳開始部位の番号を示したのに対して、AAPの翻訳開始部位の番号はまだはっきりと分かっていない。

40

【 0 3 1 1 】

図17には、NCBIエントリー番号NC_001401から抜き出された、AAV2のORF2(627ヌクレオチド、SEQ ID NO:23)およびそれぞれのAAPタンパク質配列(208アミノ酸、SEQ ID NO:1)の

50

配列を示した。

【 0 3 1 2 】

他のいくつかのパルボウイルスのそれぞれのオープンリーディングフレームおよびタンパク質の配列を、NCBIデータベースにおいて入手可能なキャプシド遺伝子配列から抜き出し、表8に列挙したようにSEQ ID No 2～44に詳細に示した。

【 0 3 1 3 】

(表8)異なるパルボウイルスに由来するAAPコードヌクレオチドおよびタンパク質配列のNCBIエントリー番号および対応するSEQ IDの番号

パルボウイルス	NCBIエントリー 番号	それぞれの ORF2	ORF2の 長さ/nt	コードされる タンパク質APP	AAPの 長さ/AA	
AAV2	NC_001401	SEQ ID NO: 23	627	SEQ ID NO: 1	208	10
AAV1	NC_002077	SEQ ID NO: 24	678	SEQ ID NO: 2	225	
AAV3b	AF028705	SEQ ID NO: 25	627	SEQ ID NO: 3	208	
AAV4	NC_001829	SEQ ID NO: 26	597	SEQ ID NO: 4	198	
AAV5	NC_006152	SEQ ID NO: 27	681	SEQ ID NO: 5	226	
AAV6	AF028704	SEQ ID NO: 28	678	SEQ ID NO: 6	225	
AAV7	NC_006260	SEQ ID NO: 29	681	SEQ ID NO: 7	226	
AAV8	NC_006261	SEQ ID NO: 30	684	SEQ ID NO: 8	227	
AAV9	AY530579	SEQ ID NO: 31	681	SEQ ID NO: 9	226	
AAV10	AY631965	SEQ ID NO: 32	606	SEQ ID NO: 10	201	20
AAV11	AY631966	SEQ ID NO: 33	594	SEQ ID NO: 11	197	
AAV12	DQ813647	SEQ ID NO: 34	621	SEQ ID NO: 12	206	
b-AAV (ウシ)	NC_005889	SEQ ID NO: 35	600	SEQ ID NO: 13	199	
トリ AAV ATCC VR-865	AY186198	SEQ ID NO: 36	789	SEQ ID NO: 14	262	
トリ AAV DA-1 株	AY629583	SEQ ID NO: 142	723	SEQ ID NO: 143	240	
AAV13	EU285562	SEQ ID NO: 37	627	SEQ ID NO: 15	208	
マウス AAV1	DQ100362	SEQ ID NO: 38	534	SEQ ID NO: 16	177	
トリ AAV DA-1 株	AY629583	SEQ ID NO: 39	723	SEQ ID NO: 17	240	30
ヤギ AAV1 AAV- Go.1 分離菌	AY724675	SEQ ID NO: 40	581	SEQ ID NO: 18	226	
ラット AAV1	DQ100363	SEQ ID NO: 41	756	SEQ ID NO: 19	251	
ガチョウ パルボウイルス DB3 株	EU088102	SEQ ID NO: 42	639	SEQ ID NO: 20	212	
アヒル パルボウイルス 90-0219 株	AY382892	SEQ ID NO: 43	693	SEQ ID NO: 21	230	
ヘビ パルボウイルス1	AY349010	SEQ ID NO: 44	600	SEQ ID NO: 22	199	40

【 0 3 1 4 】

配列比較のために、いくつかのパルボウイルスのcap遺伝子のORF2に由来する予測されたAAPタンパク質配列のアラインメントを図27に示した。

【 0 3 1 5 】

構築物pVP2N-gfpにおいて、pTAV2.0に由来するEcoNI/BsiWI断片を、CMVプロモーターの下流、かつベクターpEGFP-N1のGFP cdsの上流に挿入した(実施例3.1/図6Aおよび実施例13/図19A)。BsiWI部位は、ORF2の3'末端の約90ヌクレオチド上流に位置するので、ベクターpVP2N-gfpは、完全長ORF2から発現したAAPとしてトランス相補において活性のあるC末

端切断型AAP(AAPtruと呼ぶ)をコードする(例えば、図21を参照されたい)。

【0316】

13. コドン改変によって、ORF2からの機能タンパク質の発現がトランス相補に必要であることが裏付けられる

ORF2のトランス相補活性がどういったものか調べるために、EcoNI/BsiWI制限断片の間にある配列をコドン改変(cm)した。

【0317】

第1の変異DNA配列をORF1cmと名付けた。キャプシドタンパク質をコードする第1の読み枠が損なわれていないのに対して、AAPをコードする第2の読み枠が変化するように、この変異体のDNA配列を変えた。結果として、この配列は野生型キャプシドタンパク質をコードするが、機能活性AAPをもはやコードしない。pVP2N/ORF1cm-gfpのDNA配列に対するpVP2N-gfpのDNA配列の同一性は71%であるのに対して、第1の読み枠におけるタンパク質同一性は100%である。

10

【0318】

第2の変異DNA配列をORF2cmと名付け、第1の読み枠が変化している。このことは、第2の変異DNA配列が機能活性キャプシドタンパク質をもはやコードしないが、機能が損なわれていないAAPを発現できることを意味している。pVP2N/ORF2cm-gfpのDNA配列に対するpVP2N-gfpのDNA配列の同一性は79%であるのに対して、第2の読み枠におけるタンパク質同一性は100%である。

20

【0319】

ORF1cmおよびORF2cmの配列をそれぞれ図18Aおよび図18Bに示した。実施例5において既に説明したように、コドン改変はGENEART(Regensburg, Germany)によって行った。コドンを、哺乳動物細胞において優先的に使用するコドンに改変した。

【0320】

実施例3.1に記載のように、pVP2N-gfpは、pTAV2.0のEcoNI/BsiWI制限断片をpEGFP-N1のマルチクローニングサイトに挿入することによって作製した。コドンが改変されたEcoNI/BsiWI断片を対応するベクターバックボーンに挿入した以外は同様に、構築物pVP2N/ORF1cm-gfpおよびpVP2N/ORF2cm-gfpを作製した。

【0321】

ウエスタンブロット分析において、pVP2N/ORF1cm-gfpおよびpVP2N/ORF2cm-gfpのタンパク質発現(図20A)と非改変pVP2N-gfpのタンパク質発現(図20B)を比較した。pCMV-VP3/2809のキャプシド形成を救出する能力を、実施例3に記載したトランス相補アッセイにおいて試験した。プラスミドを1:1のモル比でコトランスフェクトした(図20C)。

30

【0322】

結果および結論

実施例3において既に説明し、図6に示したように、モノクローナル抗体A69を用いたウエスタンブロット分析から、GFP融合構築物pVP2N-gfp(図19A)の中にVP2 N末端(VP2N-gfp、図19B)を含むキャプシドタンパク質の発現が確かめられた。293-T細胞におけるプラスミドpCMV-VP3/2809を、漸減量のコトランスフェクトされたpVP2N-gfpに対応する様々なモル比のpVP2N-gfpによって相補することによって、定量の際にキャプシド集合が減少することが分かった(図19C)。集合したキャプシドの数を求めることによって、pVP2N-gfpとコトランスフェクトされた欠失変異体pCMV-VP3/2809のキャプシド集合の効率は、正常なキャプシド形成を示した欠失変異体である変異体pCMV-VP3/2696(図5)とほぼ同程度であることも明らかになった。集合は、コトランスフェクトされたpVP2N-gfpプラスミドが1/500の量でも検出することができた。

40

【0323】

従って、VP3翻訳開始部位の上流にcap配列を含有する構築物に関連する集合促進活性をトランスで提供できることは明らかであった。

【0324】

実施例5、図8Bについて既に説明したように、哺乳動物細胞に合わせてコドン改変を最

50

適化したので、コドン改変構築物からのコドン改変構築物pVP2N/ORF1cmタンパク質発現は、非改変構築物pVP2N-gfpからのタンパク質発現よりかなり高かった。同時発現したpCMV-VP3/2809からのVP3レベルは正常であった。しかしながら、ヘルパー構築物pVP2N/ORF1cmを用いた時に、キャプシド集合は検出されなかった(図20C)。少量のpVP2N/ORF1cmのトランスフェクションによる、それぞれのタンパク質の発現低下もVP3のキャプシド形成を支援しなかった(データ示さず)。

【0325】

対照的に、ヘルパー構築物pVP2N/ORF2cmを用いた時に、集合したキャプシドを検出することができた(図20C)。前記のように、ORF2cmだけが、機能が損なわれていないAAPを発現するのに対して、pVP2N/ORF1cmにおいては、AAP配列は機能せず、このコドン改変構築物はキャプシドタンパク質のみをコードする。従って、トランス相補においてpVP2N/ORF2cmだけがキャプシド集合を救出しなかった。

10

【0326】

この結果から、断片Zのトランス相補活性が、ORF2にある、コードされるタンパク質AAPによって媒介されることがはっきりと分かる。コドン改変実験から、ORF1にあるキャプシド機能タンパク質の発現はトランス相補に必要ないが、ORF2にある機能的AAPの発現の発現は必要であることが裏付けられた。

【0327】

14. AAPの予測された翻訳開始コドンの変異

AAPが媒介するキャプシド集合をさらに特徴付けるために、図17に示したORF2の配列を詳細に分析した。ORF2はVP3開始コドンの前にATGを含まない。nt2765にある断片Zの規定された最小5'末端の上流にある非標準開始コドンが用いられると考えなければならない。特に、Kozak(2002)によって定義されたような、開始コドンの局所環境における配列要件を考慮に入れると、本発明者らは、位置2729-2731にある、ロイシンをコードする5番目のコドンCTG(図17において下線を引いた)がAAP翻訳の非標準開始コドンであると予測している。発現効率に及ぼす影響を観察するために、この部位をATGおよびTTGに変異させた。

20

【0328】

ウエスタンブロット分析において、ORF2のAU1タグ化バージョン、すなわち、pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1、およびpORF2/TTG-AU1(図21A)のタンパク質発現を、非改変pVP2N-gfpの発現と比較した(図21B)。実施例3に記載したトランス相補アッセイにおいて、pCMV-VP3/2809のキャプシド形成を救出する能力を試験した。プラスミドを1:1のモル比でコトランスフェクトした(図21C)。

30

【0329】

構築物pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1、およびpORF2/TTG-AU1は、AU1-タグをコードする配列と融合した、cap遺伝子のORF2全体(AAV2 nt 2717-3340)を含む(図21A)。

【0330】

構築物pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1、およびpORF2/TTG-AU1を作製するために、テンプレートpTAV2.0およびフォワードプライマー

5'-GGATCGCAAGCTTATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCC-3'

40

(SEQ ID NO: 136),

5'-GGATCGCAAGCTTATTTTGGTCAGAATGGAGACGCAGACTCAG-3' (SEQ ID NO: 137),

または

5'-GGATCGCAAGCTTATTTTGGTCAGATTGGAGACGCAGACTCAG-3' (SEQ ID NO: 138)

およびリバースプライマー

5'-GCGGTGTCTCGAGTTATATATAGCGATAGGTGTGCGGGTGAGGTATCC

ATACTGTGGCACCATGAAGAC-3' (SEQ ID NO: 139)

50

を用いてPCRを行った。

【0331】

HindIII/XhoIによって消化された増幅産物を、pBS-CMVsenseのHindIII/XhoIバックボーンに挿入した。pBS-CMVsenseは、pHCMV-Luci(K. Butz, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germanyの厚意により提供された)からの560bp BamHIヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター断片をプラスミドBluescript II SK+(pBS, Stratagene, La Jolla, CA, USA)のBamHI部位に挿入することによって作製された。

【0332】

結果および結論

想定されたタンパク質の発現は、構築物pORF2/CTG-AU1およびpORF2/ATG-AU1についてはAU1-タグに対するモノクローナル抗体(抗AU1)を用いて証明することができたが(図21B)、構築物pORF2/TTGからの発現は検出レベルより低かった。ORF2を含有するプラスミドpORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1、およびpORF2/TTG-AU1と、VP3発現プラスミドpCMV-VP3/2809とのコトランスフェクションによってキャプシド形成が起こった(図21C)。ここで、体積当たりに測定した集合したキャプシドの数は、ウエスタンブロットから概算した発現タンパク質の量と相関関係にあった。pORF2/ATG-AU1をpCMV-VP3/2809とトランスフェクションした後に得られたキャプシド力価は、pVP2N-gfpをpCMV-VP3/2809とコトランスフェクションした後に得られたキャプシド力価と同等であった。対照的に、TTG開始コドンにコードするプラスミドによって刺激されたキャプシド集合は、pVP2N-gfpプラスミドによって刺激されたキャプシド集合の約1/1000であった。ORF2ペプチドに対するポリクローナル抗血清はAAPの発現をはっきりと示し、AU1タグ化完全長AAPに加えて、pVP2N-gfpから発現したC末端切断型AAP(AAP_{tru})も検出した(図21B)。

【0333】

まとめると、推定非標準CTG開始コドンに強力なATG開始コドンに変異させると、タンパク質合成およびキャプシド集合が増加したのに対して、通常、タンパク質合成の開始コドンとして好ましくないコドンに変異させると、タンパク質レベルおよび集合したキャプシドの数が大幅に低下する。この結果は、ORF2のタンパク質産物がキャプシド集合プロセスを促進するという本発明者らの結論を裏付けるだけでない。さらに、この結果は、非標準CTG開始コドンがTTGに変異するとAAP発現が大幅に低下するので、非標準CTG開始コドンが翻訳開始として用いられる可能性が高いことを示している。

【0334】

15. ORF2における停止コドンの挿入により、機能的AAPの発現がトランス相補に必要であることが裏付けられる

さらに、機能的AAPの発現がトランス相補に必要であることを確かめるために、停止コドンをORF2に導入することによって、AAPをコードする読み枠において変異を行った。

【0335】

望ましい置換を含む2つの相補的PCRプライマーを用いたテンプレートpVP2N-gfpの部位特異的変異誘発(QuickChange部位特異的変異誘発キット, Stratagene)によって、プラスミドpVP2N/ORF2stopA-gfp、pVP2N/ORF2stopB-gfp、およびpVP2N/ORF2stopC-gfpを作り出した。pVP2N/ORF2stopA-gfpにおいては、コドン tgg_{2811} をtagに変異させ、pVP2N/ORF2stopB-gfpにおいては、コドン $c_{2831}aa$ をtaaに変異させ、pVP2N/ORF2stopC-gfpにおいては、コドン $g_{2879}aa$ をtgaに変異させた(図22A)。位置はRuffing et al.(1994)に従う。変異は全てORF1を破壊しない。次いで、いずれの場合も、EcoNI/BsiWI断片をpVP2N-gfpのEcoNI/BsiWIバックボーンにクローニングした。

【0336】

結果および結論

ウエスタンブロット分析によって、VP3は全ての試料において発現することが裏付けられた(図22Bにおいてモノクローナル抗体B1によって検出された)。また、Bluescriptベクター(pBS)は、トランス相補アッセイにおいてキャプシド集合を引き起こさなかった(図22C)。(図22Aに示したように)停止コドンをcap遺伝子のORF2の3種類の部位に導入しても、V

P2N-gfpの発現は影響を受けなかったが(図22B)、ORF2に停止コドンをもつ変異体は全てキャプシド集合において全く活性を示さなかった(図22C)。

【0337】

従って、pVP2N-gfpからのCap発現ではトランス相補アッセイにおけるキャプシド集合に十分でない。この結果は、cap遺伝子と重複する異なる読み枠(ORF2)から発現したAAPが存在し、AAPがキャプシド集合ヘルパー機能を提供することをはっきりと裏付けている。

【0338】

16. 機能的AAPの発現はAAVゲノムの状況でのキャプシド集合を救出する

次に、本発明者らは、新たに発見された「集合活性化タンパク質」AAPの発現が、AAVゲノム全体の状況でのキャプシド集合に必要なかどうかを分析したかった。従って、pV P2N/ORF1cm-gfp(実施例13)のEcoNI/BsiWI断片をpTAV2.0(実施例1.2.1.)のEcoNI/BsiWIバックボーンにクローニングすることによって、構築物pTAV/ORF1cmを作り出した。従って、プラスミドpTAV/ORF1cm(図23Aに図示した)は、Capタンパク質をコードする第1の読み枠(ORF1)が変わることなく、第2の読み枠(ORF2)においてcap遺伝子のコドンが改変されているので、既知のAAV2キャプシドおよびRepタンパク質をコードするが、AAPの合成に欠陥があるはずである。

【0339】

結果および結論

実際に、4種類のRepタンパク質(Rep40、Rep52、Rep68、およびRep78)は正しく発現された(データ示さず)。ウエスタンブロット分析によって、3種類のVPタンパク質の発現パターンはわずかに変化したことが分かった。ポリクローナル抗AAP血清を用いた時に、野生型プラスミドpTAV2.0からの内因性AAPの発現はすぐに判明したが、コドンが改変されたプラスミドであるpTAV/ORF1cmからの内因性AAPの発現は判明しなかった(図23B)。予想どおりに、pVP2N-gfpが同時発現された時に、切断型AAPは検出可能である。

【0340】

野生型プラスミドpTAV2.0およびコドンが改変されたプラスミドpTAV/ORF1cmを、空の Bluescriptベクター(pBS)またはpVP2N-gfpとコトランスフェクションした後に、2つの構築物のキャプシド集合を比較した。予想どおりに、pTAV/ORF1cmは3種類全てのキャプシドタンパク質を発現するが、pTAV/ORF1cmもpBSも機能活性AAPを発現しないので、pTAV/ORF1cmをpBSとトランスフェクションしても、検出可能なキャプシド形成は示されなかった。対照的に、pVP2N-gfpからC末端切断型であるが活性のあるAAPが発現するので、pTAV/ORF1cmをpVP2N-gfpとトランスフェクションすることによってキャプシド集合は少なくとも部分的に回復した(図23C)。

【0341】

pVP2N/ORF1cm-gfp(実施例13に記載)およびpVP2N/ORF2stopA-gfp(実施例15を参照されたい)のような変異体プラスミドによって、機能活性AAPの発現に欠陥のあるpTAV/ORF1cmを相補してもキャプシド形成につながらなかった。pVP2N/ORF1cm-gfpおよびpVP2N/ORF2stopA-gfpは両方とも(それぞれ、コドン改変または停止コドンの導入により)AAPタンパク質を発現することができなかった。対照的に、機能活性AAPは、pVP2N-gfpに加えて、プラスミドpVP2N/ORF2cm-gfp(実施例13に記載)、pORF2/CTG-AU1、およびpORF2/ATG-AU1(実施例14を参照されたい)から発現することができ、トランス相補においてキャプシド集合を救出した(図23D)。

【0342】

まとめると、完全ウイルスゲノムの状況でのキャプシド形成は、内因性AAPまたは相補AAPの発現に依存する。

【0343】

17. 機能的AAPの発現はAAVゲノムの状況でのキャプシド集合に必要なこと

AAPがAAVゲノム全体の状況でのキャプシド集合に必要なことをさらに証明するために、停止コドンをORF2に導入して、AAPアミノ酸配列を破壊した。

【0344】

10

20

30

40

50

従って、pVP2N/ORF2stopB-gfp(詳細については実施例15を参照されたい)のEcoNI/BsiWI断片をpTAV2.0(実施例1.2.1)のEcoNI/BsiWIバックボーンにクローニングすることによって、構築物pTAV/ORF2stopBを作り出した。pVP2N/ORF2stopB-gfpにおいては、ヌクレオチド2831から開始するcaaコドンにtaa停止コドンに変異させた。従って、プラスミドpTAV/ORF2stopB(図24Aに図示した)は、既知のAAV2キャプシドおよびRepタンパク質をコードするが、停止コドンが挿入されているためにAAP合成に欠陥があるはずである。

【0345】

結果および結論

これもまた、ウエスタンブロット分析において、4種類のRepタンパク質の正しい発現を検出することができ(データ示さず)、ならびに3種類のVPタンパク質のわずかに変化した発現パターンを検出することができた。ポリクローナル抗AAP血清を用いた時に、野生型プラスミドpTAV2.0からの内因性AAPの発現はすぐに判明したが、停止コドンを含むプラスミドからの内因性AAPの発現は判明しなかった(図24B)。

【0346】

野生型プラスミドpTAV2.0および変異体プラスミドpTAV/ORF2stopBと空のBluescriptベクター(pBS)またはpVP2N-gfpをコトランスフェクションした後に、2つの構築物のキャプシド集合を比較した。予想どおりに、pTAV/ORF2stopBは3種類全てのキャプシドタンパク質を発現するが、pTAV/ORF2stopBもpBSも機能活性AAPを発現しないので、pTAV/ORF2stopBをpBSとトランスフェクションしても、検出可能なキャプシド形成は示されなかった。対照的に、pVP2N-gfpからC末端切断型であるが活性のあるAAPが発現するので、pTAV/ORF2stopBをpVP2N-gfpとトランスフェクションすることによってキャプシド集合は少なくとも部分的に回復した(図24C)。

【0347】

この結果から、完全ウイルスゲノムの状況でのキャプシド形成は機能的AAPの発現に依存することがさらに裏付けられた。

【0348】

18.「集合活性化タンパク質」AAPはVPタンパク質を核小体に標的化する

実施例8に加えて、トランスフェクト細胞内での発現タンパク質の場所および集合効率を比較するために、いくつかの構築物を293-T細胞にトランスフェクトした。

【0349】

18.1. 構築物のクローニング

構築物pCMV-NLS-VP3のクローニングを実施例8.1において説明する。pCMV-NoLS-VP3を作製するアプローチは、相補プライマーペア

5'-GGAAT TCGAT ATCAA GCTTG CCATG GCACG GCAGG CCCGG CGGAA TAGAC GGAGA CGGTG GCGGG AACGG CAGCG GATGG CTACA GGCAG TGG-3' (SEQ ID NO: 140), および
5'-CCACT GCCTG TAGCC ATCCG CTGCC GTTCC CGCCA CCGTC TCCGT CTATT CCGCC GGGCC TGCCG TGCCA TGGCA AGCTT GATAT CGAAT TCC-3' (SEQ ID NO: 141)

が用いられる以外はpCMV-NLS-VP3を作製するアプローチと一致する。従って、cap遺伝子産物NoLS-VP3は、VP3のN末端に、HIV Rev MARQARRNRRRRWRERQRの核小体局在化シグナルのアミノ酸配列を含有する。両構築物とも図25Aに図示した。

【0350】

18.2. 免疫蛍光による構築物の分析

実施例8において説明した実験構成と同様に、HeLa細胞を、示されたように様々な構築物によってトランスフェクトした。キャプシドタンパク質の発現およびキャプシドの形成を、前記のように、ポリクローナルVP抗血清またはモノクローナルA20抗体を用いた免疫蛍光によって分析した。

【0351】

18.3. 結果および結論

10

20

30

40

50

AAV増殖性感染を分析した文献(例えば、Wistuba et al., 1997)から、キャプシド集合はまず最初に感染細胞の核小体において検出できることが知られている。HeLa細胞においてpCMV-VP3/2809から発現したキャプシドタンパク質VP3は(図11Bに示したように)細胞核および細胞質の全体にわたって分布し、核小体から排除された。キャプシド特異的モノクローナル抗体A20によって染色すると、これらの細胞においてキャプシドを検出することができなかった。しかし、pVP2N-gfpをコトランスフェクトすることによってAAPを同時発現させた場合は、VP3タンパク質のかなりの部分が核小体に移行し、キャプシドの形成を検出することができた。

【0352】

実施例8において説明したように、本発明者らは構築物pCMV-NLS-VP3を発現させ、SV40の核局在化シグナル(NLS)と融合したVP3の強力な核蓄積を観察した。しかしながら、これは核小体から排除され、キャプシド集合を引き起こさなかった(図11B)。しかしながら、プラスミドpVP2N-gfpからのAAPの同時発現によって、NLS-VP3タンパク質の一部が核小体に再標的化され、核小体においてキャプシド形成を検出することができた。

【0353】

興味深いことに、pORF2/ATG-AU1(実施例14に記載)から発現され、抗AU1抗体によって染色されたAAPタンパク質は、フィブリラリンと同じ核小体にあった(図25C、右側にある位相差画像は染色部位における核小体の場所を裏付けている)。

【0354】

この結果から、AAPはVPタンパク質を核小体に共輸送し、これは後のキャプシド集合のための必要条件であることが示唆された。

【0355】

構築物pCMV-NoLS-VP3を発現させた時に、本発明者らは、少なくとも部分的に、HIV REVに由来する核小体局在化シグナルに融合したVP3の核小体局在を観察したが、驚いたことに、キャプシド集合は検出できなかった(図25B)。従って、VPタンパク質の核小体への移行ではキャプシド形成に十分でないように見えた。また、pVP2N-gfpからのAAPの同時発現によってキャプシド形成が促進された。このことから、AAPは、VPタンパク質を核小体に標的化するだけでなく、集合反応においてさらに積極的な役割を果たしていることが証明された。本実施例はまた、高度に正に荷電した17マー-NoLS配列がVLP力価を部分的に妨害するように見えても、VP3 N末端挿入(1-203)が許容されることも示している。

【0356】

19. 機能的AAPの発現がキャプシド集合に必要である。

実施例18において見られる免疫蛍光画像に加えて、本発明者らは、それぞれの変異体構築物pCMV-NLS-VP3およびpCMV-NoLS-VP3のタンパク質発現をウエスタンブロットによって分析した。さらに、本発明者らは、モノクローナル抗体A20キャプシドELISAによって、それぞれの構築物のキャプシド集合活性を定量した。

【0357】

結果および結論

ウエスタンブロット分析によって、pCMV-VP3/2809からのVP3の発現、ならびにそれよりわずかに長いタンパク質であるpCMV-NLS-VP3からのNLS-VP3およびpCMV-NoLS-VP3からのNoLS-VP3の発現が確かめられた(図26A)。

【0358】

実施例18において既に観察されたように、NLS-VP3もNoLS-VP3も、Bluescriptベクター(pBS)とのコトランスフェクションがあってもキャプシド形成を救出しなかったが、(pVP2N-gfpからの)AAP発現の存在下ではキャプシド形成は検出可能であった(図26B)。

【0359】

この結果から、AAPは、VPタンパク質を核小体に標的化するだけでなく(核小体への標的化は、キャプシド集合につながるNoLS-VP3融合構築物によっても達成された)、集合反応それ自体においても必須の役割を果たしていることを裏付けている。

【0360】

10

20

30

40

50

20. 野生型およびVP3 VLPの集合

VP1、VP2、およびVP3から組み立てられたウイルス様粒子(VP1,2,3 VLP)の形態と、VP3のみから組み立てられたVLP(VP3 VLP)の形態を比較するために、それぞれの試料が、前記のように2%酢酸ウラニルを用いた逆染色法後の電子顕微鏡によって調べられている。

【0361】

野生型キャプシドに対応するVP1、VP2、およびVP3から組み立てられたウイルス様粒子は、293-T細胞において完全cap遺伝子を発現させることによって産生させた。VP3のみから組み立てられたVLPは、pCMV-VP3/2809およびpVP2N-gfp(VP3 VLP)のコトランスフェクションによって産生させた。

【0362】

結果および結論

電子顕微鏡画像から、VP1、VP2、およびVP3から組み立てられたウイルス様粒子(VP1,2,3 VLP)の形態は、VP3のみから組み立てられたVLP(VP3 VLP、図28)の形態と同等であることが裏付けられた。両画像において、内部の染色は目に見えず、従って、このことは、全ての粒子が空であることをはっきりと裏付けている。空の粒子と比較して、内部が詰まった(DNAを含有する)粒子の画像は、例えば、Xie et al.(2004)に示されている。

【0363】

21. 様々な血清型からクローニングされたAAPおよびVP3のトランス相補

あるパルボウイルスからのAAPの発現が、別のパルボウイルスからのVP3のキャプシド集合を媒介できることを確かめるために、本発明者らは、トランス相補アッセイにおいて、AAV1、AAV2、およびAAV5のそれぞれの配列を使用した。

【0364】

SEQ ID NO:24として示されたAAV1の配列およびSEQ ID NO:27として示されたAAV5の配列を増幅するようにプライマーペアを選択した以外はAAV2と同様に(3.1と比較のこと)、AAV1およびAAV5のpVP2N-gfpのクローニングを行った。トランス相補のために、細胞を、前記のAAV2のプラスミドpCMV-VP3(pCMV_VP3/2809)、AAV1のプラスミドpCMV-VP3(pCMV_AAV1VP3/2829)、または対応するAAV5 VP3発現構築物によって、それぞれのAAV血清型のpVP2N-gfpのコトランスフェクションと共に、またはそれぞれのAAV血清型のpVP2N-gfpのコトランスフェクション無くトランスフェクトした(図29)。同じモル比のVP3構築物およびpVP2N-gfpをトランスフェクトした。粒子形成効率はELISAによって測定した。

【0365】

結果および結論

AAV1からクローニングされたVP3、AAV2からクローニングされたVP3、およびAAV5からクローニングされたVP3のキャプシド集合を、AAV2からクローニングされたpVP2N-gfpおよびAAV1からクローニングされたpVP2N-gfp、またはBluescriptベクター(pBS)のコトランスフェクション後に比較した(図29を参照されたい)。予想どおりに、他のウイルスタンパク質の非存在下(pBS対照)でのVP3の発現は、その由来に関係なく、検出可能なキャプシド形成を示さなかった。対照的に、血清型AAV1に由来するAAPの発現(それぞれのpVP2N-gfp構築物から発現した)はAAV2 VP3集合を完全に回復させた(AAV2に由来するAAPによって媒介される集合と比較)。逆もまた同じであり、AAV2に由来するAAPはAAV1 VP3集合を完全に回復させた(AAV1に由来するAAPによって媒介される集合と比較)。AAV5に由来するAAPは、AAV2 VP3集合を部分的にしか補うことができず、AAV1 VP3集合を補わなかった。さらに、AAV2 AAPおよびAAV1 AAPはAAV5 VP3集合を補わなかった。AAV5構築物に関してトランス相補が無いことは、これらの実験においてAAPがGFPと融合して、近縁関係にある血清型には活性が十分であるが、遠い関係にあるパルボウイルスの相補を妨害し得るAAPの短いC末端欠失につながったためであるかもしれない。さらに可能性が高い説明は、遠い関係にあるAAV血清型が、VP3集合に関して部分的にしか互いに補うことができなかったということである。AAV1に由来するAAPおよびAAV2に由来するAAPには71.5%の同一性および81.0%の類似性があるが(Smith-Waterman Alignment)、AAV2およびAAV5には56.2%の同一性および60.8%の類似性しかない。これらの数字は、AAV1についてAAV5と比較した場合にはさらに低い

10

20

30

40

50

(53.8%の同一性および58.1%の類似性)。従って、当業者であれば、AAPの同一性/類似性を調べることによって、異なる血清型に由来する機能活性AAPまたは他の機能活性変種を選択することができるだろう。

【 0 3 6 6 】

さらに、実施例11に加えて、これらの結果から、AAV2以外のパルボウイルスが機能的AAPをコードし、キャプシド集合のために同じ機構を利用することが裏付けられる。さらに、AAPおよびVP3は、原則的に、異なるパルボウイルス間で、特に、近縁関係にあるウイルス間で交換可能である。

【 0 3 6 7 】

文献

10

ARNOLD, G. S., SASSER, A. K., STACHLER, M. D. & BARTLETT, J. S. (2006) Metabolic biotinylation provides a unique platform for the purification and targeting of multiple AAV vector serotypes. *Mol Ther*, 14, 97-106.

- ASOKAN, A. & SAMULSKI, R. J. (2006) AAV does the shuffle. *Nat Biotechnol*, 24, 158-60.
- BACHMANN, M. F., ROHRER, U. H., KUNDIG, T. M., BURKI, K., HENGARTNER, H. & ZINKERNAGEL, R. M. (1993) The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science*, 262, 1448-51.
- BECERRA, S. P., KOCZOT, F., FABISCH, P. & ROSE, J. A. (1988) Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol*, 62, 2745-54.
- BECERRA, S. P., ROSE, J. A., HARDY, M., BAROUDY, B. M. & ANDERSON, C. W. (1985) Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 7919-23.
- CORPET, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16, 10881-90.
- GIROD, A., RIED, M., WOBUS, C., LAHM, H., LEIKE, K., KLEINSCHMIDT, J., DELEAGE, G. & HALLEK, M. (1999) Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med*, 5, 1438.
- GRIEGER, J. C., JOHNSON, J. S., GURDA-WHITAKER, B., AGBANDJE-MCKENNA, M. & SAMULSKI, R. J. (2007) Surface-exposed adeno-associated virus Vp1-NLS capsid fusion protein rescues infectivity of noninfectious wild-type Vp2/Vp3 and Vp3-only capsids but not that of fivefold pore mutant virions. *J Virol*, 81, 7833-43.
- GRIEGER, J. C. & SAMULSKI, R. J. (2005) Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 99, 119-45.
- GRIFMAN, M., TREPEL, M., SPEECE, P., GILBERT, L. B., ARAP, W., PASQUALINI, R. & WEITZMAN, M. D. (2001) Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids. *Mol Ther*, 3, 964-75.
- GRIMM, D. (2002) Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods*, 28, 146-57.
- GRIMM, D., KERN, A., PAWLITA, M., FERRARI, F., SAMULSKI, R. & KLEINSCHMIDT, J. (1999) Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Ther*, 6, 1322-30.
- GRIMM, D. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1999) Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther*, 10, 2445-50.
- HEILBRONN, R., BURKLE, A., STEPHAN, S. & ZUR HAUSEN, H. (1990) The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J Virol*, 64, 3012-8.
- HOQUE, M., ISHIZU, K., MATSUMOTO, A., HAN, S. I., ARISAKA, F., TAKAYAMA, M., SUZUKI, K., KATO, K., KANDA, T., WATANABE, H. & HANDA, H. (1999a) Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J Virol*, 73, 7912-5.
- HOQUE, M., SHIMIZU, N., ISHIZU, K., YAJIMA, H., ARISAKA, F., SUZUKI, K., WATANABE, H. & HANDA, H. (1999b) Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 266, 371-6.
- HUTTNER, N. A., GIROD, A., PERABO, L., EDBAUER, D., KLEINSCHMIDT, J. A., BUNING, H. & HALLEK, M. (2003) Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. *Gene Ther*, 10, 2139-47.
- KING, J. A., DUBIELZIG, R., GRIMM, D. & KLEINSCHMIDT, J. A. (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J*, 20, 3282-91.
- KOERBER, J. T., JANG, J. H. & SCHAFFER, D. V. (2008) DNA shuffling of adeno-associated virus yields functionally diverse viral progeny. *Mol Ther*, 16, 1703-9.
- KOZAK, M. (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299, 1-34.
- KRONENBERG, S., KLEINSCHMIDT, J. A. & BOTTCHE, B. (2001) Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Rep*, 2, 997-1002.

10

20

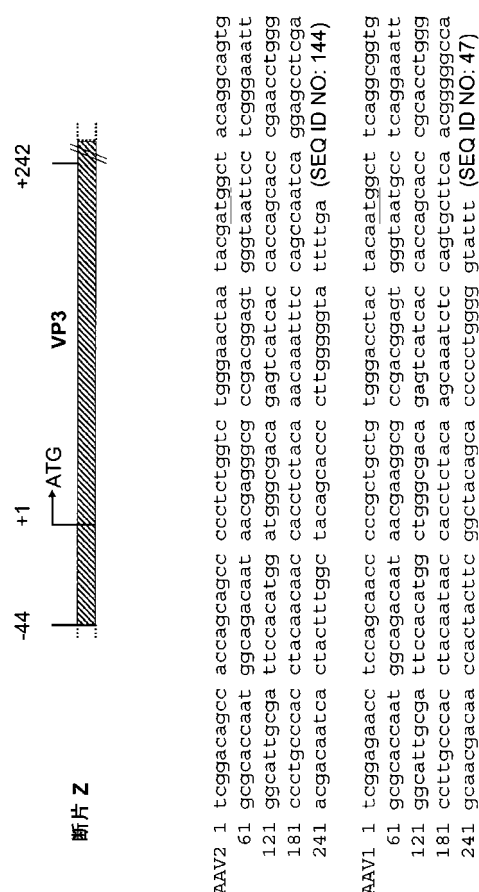
30

40

- LAUGHLIN, C. A., TRATSCHIN, J. D., COON, H. & CARTER, B. J. (1983) Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene*, 23, 65-73.
- LI, W., ASOKAN, A., WU, Z., VAN DYKE, T., DIPRIMIO, N., JOHNSON, J. S., GOVINDASWAMY, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., LEICHTLE, S., REDMOND, D. E., JR., MCCOWN, T. J., PETERMANN, K. B., SHARPLESS, N. E. & SAMULSKI, R. J. (2008) Engineering and selection of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. *Mol Ther*, 16, 1252-60.
- MAHESHRI, N., KOERBER, J. T., KASPAR, B. K. & SCHAFFER, D. V. (2006) Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol*, 24, 198-204.
- MITTEREDER, N., MARCH, K. L. & TRAPNELL, B. C. (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol*, 70, 7498-509. 10
- MOSKALENKO, M., CHEN, L., VAN ROEY, M., DONAHUE, B. A., SNYDER, R. O., MCARTHUR, J. G. & PATEL, S. D. (2000) Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol*, 74, 1761-6.
- MUZYCZKA, N. & BERNIS, K. I. (2001) Parvoviridae: the viruses and their replication. IN KNIPE, T. M. & HOWLEY, P. M. (Eds.) *Fields Virology*. Fourth Edition ed. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- NICKLIN, S. A., BUENING, H., DISHART, K. L., DE ALWIS, M., GIROD, A., HACKER, U., THRASHER, A. J., ALI, R. R., HALLEK, M. & BAKER, A. H. (2001) Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther*, 4, 174-81. 20
- NYGREN, P. A. & SKERRA, A. (2004) Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods*, 290, 3-28.
- RABINOWITZ, J. E., XIAO, W. & SAMULSKI, R. J. (1999) Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology*, 265, 274-85.
- RIED, M. U., GIROD, A., LEIKE, K., BUNING, H. & HALLEK, M. (2002) Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol*, 76, 4559-66.
- RUFFING, M., HEID, H. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1994) Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif. *J Gen Virol*, 75 (Pt 12), 3385-92.
- RUFFING, M., ZENTGRAF, H. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1992) Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol*, 66, 6922-30. 30
- SHI, W., ARNOLD, G. S. & BARTLETT, J. S. (2001) Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum Gene Ther*, 12, 1697-711.
- SHI, W. & BARTLETT, J. S. (2003) RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism. *Mol Ther*, 7, 515-25.
- STACHLER, M. D. & BARTLETT, J. S. (2006) Mosaic vectors comprised of modified AAV1 capsid proteins for efficient vector purification and targeting to vascular endothelial cells. *Gene Ther*, 13, 926-31.
- STEINBACH, S., WISTUBA, A., BOCK, T. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1997) Assembly of adeno-associated virus type 2 capsids in vitro. *J Gen Virol*, 78 (Pt 6), 1453-62. 40
- SZOMOLANYI-TSUDA, E., BRIEN, J. D., DORGAN, J. E., GARCEA, R. L., WOODLAND, R. T. & WELSH, R. M. (2001) Antiviral T-cell-independent type 2 antibody responses induced in vivo in the absence of T and NK cells. *Virology*, 280, 160-8.
- SZOMOLANYI-TSUDA, E., BRIEN, J. D., DORGAN, J. E., WELSH, R. M. & GARCEA, R. L. (2000) The role of CD40-CD154 interaction in antiviral T cell-independent IgG responses. *J Immunol*, 164, 5877-82.
- SZOMOLANYI-TSUDA, E., LE, Q. P., GARCEA, R. L. & WELSH, R. M. (1998) T-Cell-independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles. *J Virol*, 72, 6665-70.

- 20

【 図 2 - 1 】



b-AAV 1 cccagagaagg accatcttcc ggagctatgt ctactgagac tgaatgggt gcagcagctg
 61 ggggaaatgg tggcgatgcg ggacaaagtg cggaggagtg gggtaatgcc tccggtgatt
 121 ggcattgcga ttccatttgg tcagagagcg acgtcaccac cactccaacc cgcacctggg
 181 tctgcgcgac ctacaacaac cacttgtacc tggggtctcg ctagagcaac gccagcgaca
 241 ccttcaacgg attctccacc ccttggggat actttgactt taacog (SEQ ID NO: 56)

AAV3b 1 tcggagaacc accagcagcc cccacaagtt tgggatctaa tacaatggct tcaggcgggtg
 61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgagggtg cggatggagt gggtaattcc tcaggaaatt
 121 ggcattgcga ttcccaatgg ctggggcgaca ggtcattcac caccagcacc agaactcggg
 181 ccttgcgcac ttacaacaac catctctaca agcaaatctc cagccaatca ggagcttcaa
 241 acgacaacca ctacttggc tacagcacc ctgggggta ttttga (SEQ ID NO: 48)

AAV4 1 cccctgaggg atcaacttcc ggagccatgt ctgatgacag tgagatggct gcagcagctg
 61 gcggagctgc agtcaggggc ggacaaagtg cggatggagt gggtaatgcc tggggtgatt
 121 ggcattgcga ttccacctgg tctgagggcc acgtcacgac caccagcacc agaactcggg
 181 tcttgcgcac ctacaacaac cactctaca agcactcgg agagagctcg cagtccaaca
 241 cctacaacgg attctccacc ccttggggat actttgactt caacog (SEQ ID NO: 49)

AAV5 1 tgcaaatccc agccaacca gcctcaagtt tgggagctga tacaatgtct ggggaggtg
 61 gcggccattt gggcgacaat aaccaagtg cggatggagt gggcaatgcc tggggagatt
 121 ggcattgcga ttccacttgg atgggggaca ggtcgtcac caagtccacc cgaactcggg
 181 tctgcccag ctacaacaac caccagtacc gagagatcaa aagcggctcc gtcgacggaa
 241 gcaacgccaa cgcctacttt ggatacagca cccctggggg gtactt (SEQ ID NO: 50)

AAV6 1 tcggagaacc tccagcaacc cccgctgctg tgggacctac tacaatggct tcaggcgggtg
 61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg cgcagcagtg gggtaatgcc tcaggaaatt
 121 ggcattgcga ttccacttgg cggggcgaca ggtcgtcac caccagcacc cgaactcggg
 181 ccttgcgcac ctataacaac cactctaca agcaaatctc cagtgttcca acgggggcca
 241 gcaacgacaa ccactacttc ggtacagca cccctggggg gtattt (SEQ ID NO: 51)

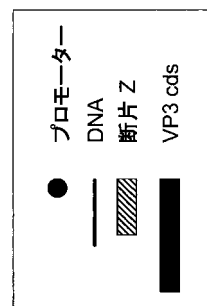
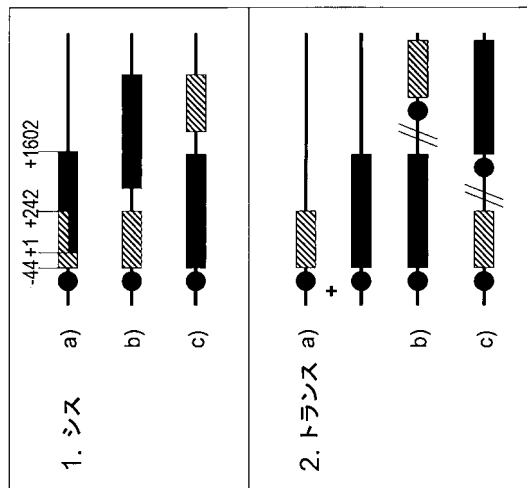
AAV7 1 ctagtgtggg atctgtgaca gtggtcgag cgggtggcgc accaatggca gacaataacg
 61 aaggtgcgga cggagtgggt aatgcctcag gaaattggca ttgcgattcc acatggctgg
 121 gcgacagagt cattaccacc agcaccgaa cctgggacct gccacctac acaaccacc
 181 tctacaagca aatctccagt gaaactcgag tagtaccaca cgcacacacc tacttggtg
 241 acagcaccgc ctggggggtat ttgacttta acagattcca ctgcca (SEQ ID NO: 52)

AAV8 1 tcggagaacc tccagcagcg cctctgtgtg tgggaacctaa tacaatggct gcaggcgggtg
 61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg cgcagcagtg gggtagttcc tcgggaaatt
 121 ggcattgcga ttccacttgg ctggcgaca ggtcgtcac caccagcacc cgaactcggg
 181 ccttgcgcac ctacaacaac cactctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggagagag
 241 ccaccaacga caaacacctac ttgggttaca gcacctctg ggggta (SEQ ID NO: 53)

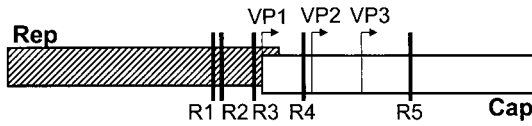
AAV10 1 tcggagaacc accagcagcg cctctgtgtc tgggatctgg tacaatggct gcaggcgggtg
 61 gcgctccaat ggcagacaat aacgaaggcg cgcagcagtg gggtagttcc tcaggaaatt
 121 ggcattgcga ttccacttgg ctggcgaca ggtcgtcac caccagcacc cgaactcggg
 181 ccttgcgcac ctacaacaac cactctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggagagaa
 241 gcaccaacga caaacacctac ttgggttaca gcacctctg ggggta (SEQ ID NO: 54)

AAV11 1 cccctgaagg atcagatacc agcgccatgt cttcagacat tgaatggct gcagcaccgg
 61 ggggaaatgc tctcagtcg ggacaaggtt cggatggagt gggtaatgcc tcgggtgatt
 121 ggcattgcga ttccacttgg tctgagggca aggtcacaac aactcagcc agaactcggg
 181 tcttgcgcac ctacaacaac cacttgtacc tgcgtctcgg aacctatca agagcaaca
 241 cctacaacgg attctccacc ccttggggat atttgaactt caacag (SEQ ID NO: 55)

【 図 3 】

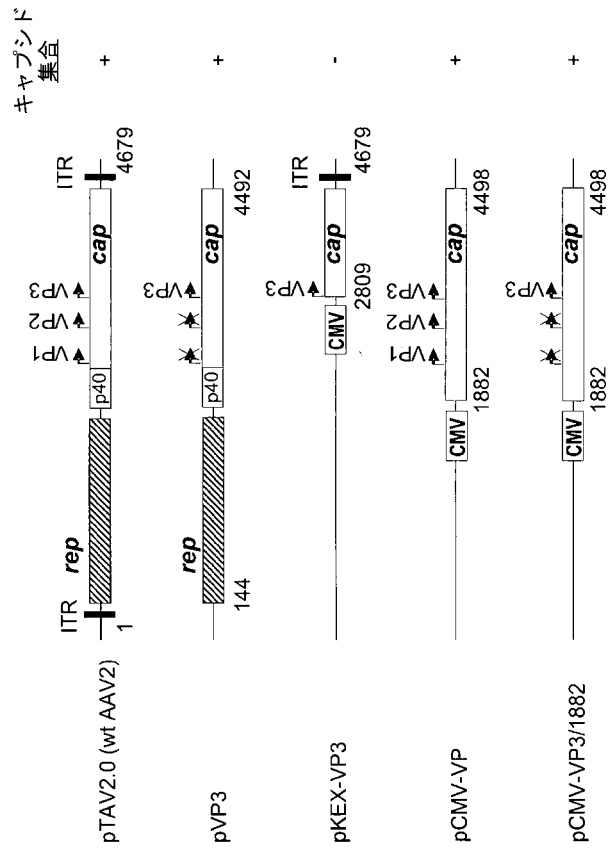


【図 4】

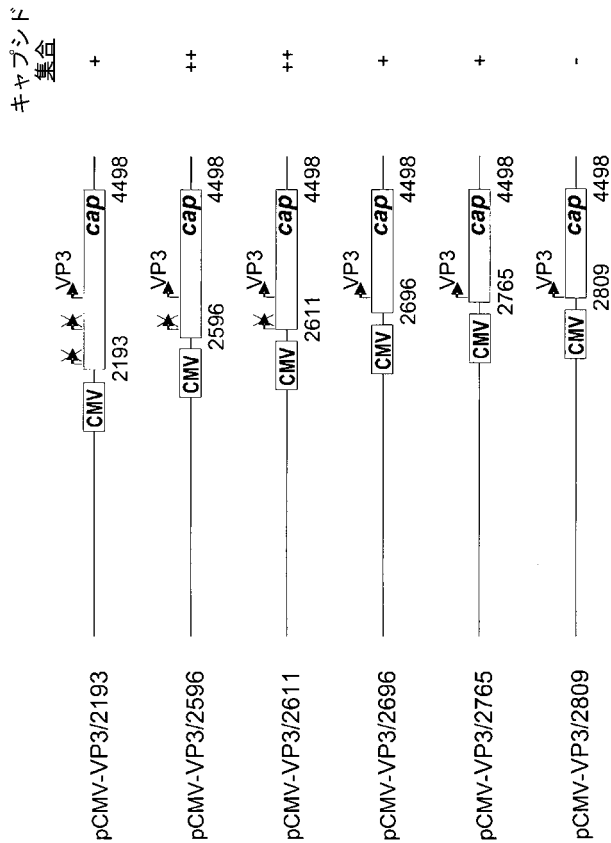


制限部位 1 (R1): FspI bp 1858
 制限部位 2 (R2): HindIII bp 1882
 制限部位 3 (R3): DraI bp 2193
 制限部位 4 (R4): EcoNI bp 2596
 制限部位 5 (R5): BsiWI bp 3254

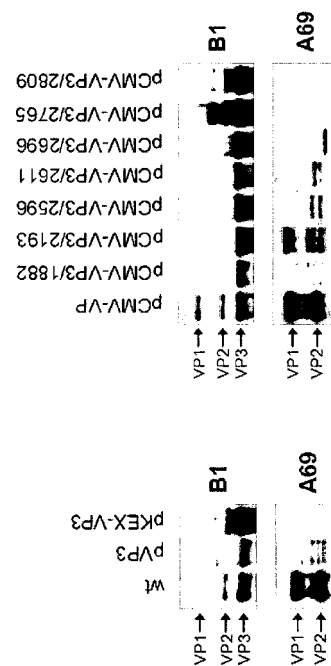
【図 5 A - 1】



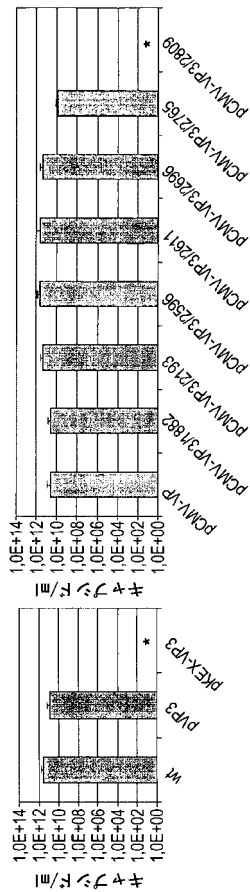
【図 5 A - 2】



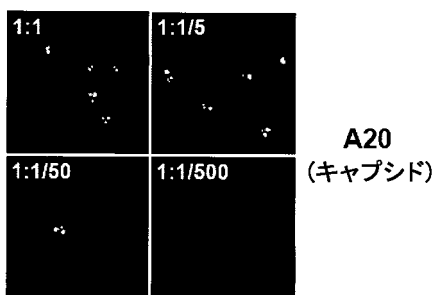
【図 5 B】



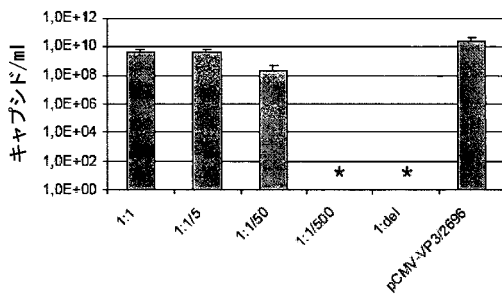
【図 5 C】



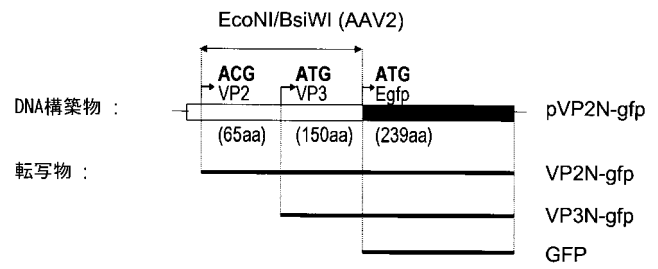
【図 6 C】



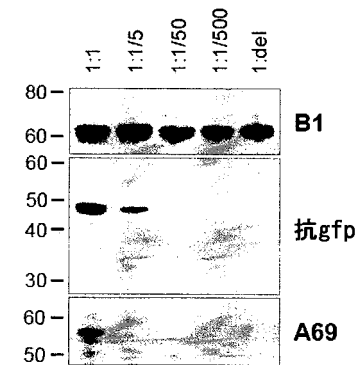
【図 6 D】



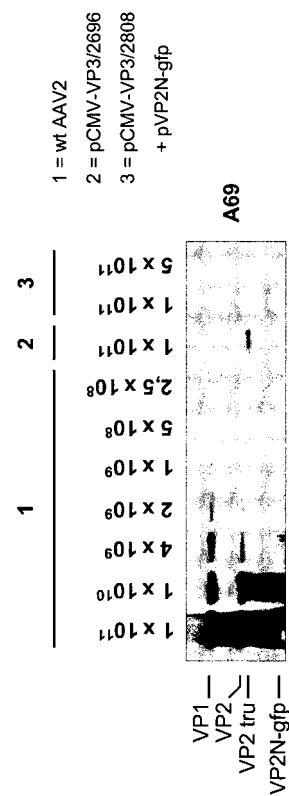
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 7】



【図 8 A - 1】

アラインメントされた配列：

1: pVP2N-gfp

2: pVP2Ncm-gfp

(VP2翻訳開始コドンからBsiWI制限部位まで)

DNA配列の同一性：459/646 (71.1%)

コドン使用頻度の同一性：60/215 (27.9%)

タンパク質配列の同一性：215/215 (100%)

```

=====
              10      20      30      40      50
VP2N      ACGGCTCCGGGAAAAAGAGGCGGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGA
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     ACGGCCCTGGCAAGAAACGGCCCGTGGAGCACAGCCCCGTGGAGCCCGA
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              10      20      30      40      50
          T  A  P  G  K  K  R  P  V  E  H  S  P  V  E  P
VP2N      CTCCTCTCGGGAACCGGAAAGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGAT
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     CAGCAGCAGCGGCACCGGCAAGGCGGACAGCAGCCCGCAGAAAGCGGC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              60      70      80      90     100
          D  S  S  S  G  T  G  K  A  G  Q  Q  P  A  R  K  R
VP2N      TGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCACTCAGTACCTGACCCCCAGCCT
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     TGAACCTTCGGCCAGACCGGCGAGCTGATAGCTGCCCGACCCCTCAGCCC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              110     120     130     140     150
          L  N  F  G  Q  T  G  D  A  D  S  V  P  D  P  Q  P
=====

```

【図 8 A - 2】

```

              160      170      180      190      200
VP2N      CTCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTCTGGGAACTAATACGATGGC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     CTGGGCCAGCCTCCTGCTGCTCCTAGCGGCTCTGGCACCACACCATGGC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              160      170      180      190      200
          L  G  Q  P  P  A  A  P  S  G  L  G  T  N  T  M
VP2N      TACAGGCAGTGGCGCACCATGGCAGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAG
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     CACCGGCAGCGGAGCCCCCATGGCCGATAACAATGAAGGGGCAGACGGCG
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              210      220      230      240      250
          A  T  G  S  G  A  P  M  A  D  N  N  E  G  A  D  G
VP2N      TGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGATGGGCGAC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     TGGGCAACAGCTCCGGCAACTGGCACTGCGACAGCACCTGGATGGGAGAT
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              260      270      280      290      300
          V  G  N  S  S  G  N  W  H  C  D  S  T  W  M  G  D
VP2N      AGAGTCATCACCACAGCACCAGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAA
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     CGGGTGATCACAACCTCCACCCGACATGGGCTCTCCCTACTTATAATAA
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              310      320      330      340      350
          R  V  I  T  T  S  T  R  T  W  A  L  P  T  Y  N
VP2N      CCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGAACGACAATC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     TCACCTGTACAAGCAGATCAGCAGCCAGAGCGGGCCGCAATGATAAAC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              360      370      380      390      400
          N  H  L  Y  K  Q  I  S  S  Q  S  G  A  S  N  D  N
=====

```

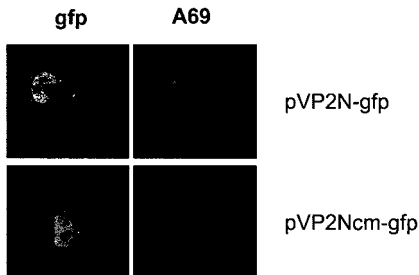
【図 8 A - 3】

```

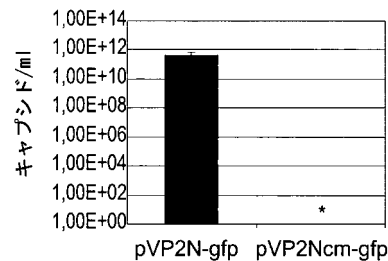
              410      420      430      440      450
VP2N      ACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     ACTACTTCGGGTACTCTACACCCTGGGGTACTTCGATTTCATCGGTTT
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              410      420      430      440      450
          H  Y  F  G  Y  S  T  P  W  G  Y  F  D  F  N  R  F
VP2N      CACTGCCACTTTTACCACGCTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAATG
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     CACTGTCACTTCAGCCCCAGAGACTGGCAGCGGCTGATTAATAATAATTG
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              460      470      480      490      500
          H  C  H  F  S  P  R  D  W  Q  R  L  I  N  N  N
VP2N      GGGATTCCGACCCAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTTAATTCAGTCA
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     GGGCTTCGGCCCAAGCGGCTGAATTTCAAGCTGTTCATATCCAGGTGA
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              510      520      530      540      550
          W  G  F  R  P  K  R  L  N  F  K  L  F  N  I  Q  V
VP2N      AAGAGGTACCGCAGAATGACGGTACGACGAGTTCGCAATAACCTTACC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     AGGAAGTGACCCAGAACGATGGCACCACCAATCGCCAACAACCTGACC
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              560      570      580      590      600
          K  E  V  T  Q  N  D  G  T  T  I  A  N  N  L  T
VP2N      AGCACGGTTCAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCGCTCCCGTACG
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
VP2Ncm     TCAACCGTGCAGGTGTTTACCGACAGCGAGTACCGCTGCCGTACG
          :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
              610      620      630      640
          S  T  V  Q  V  F  T  D  S  E  Y  Q  L  P  Y
=====

```

【図 8 C】



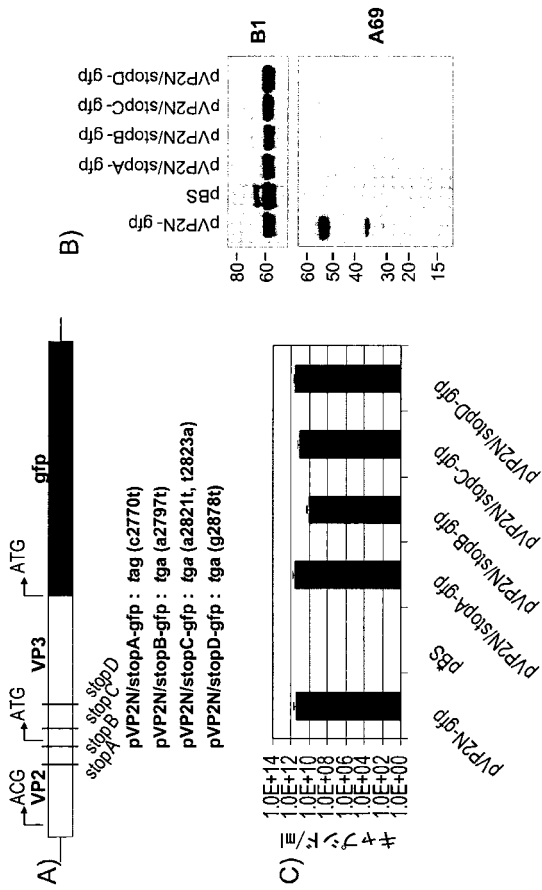
【図 8 D】



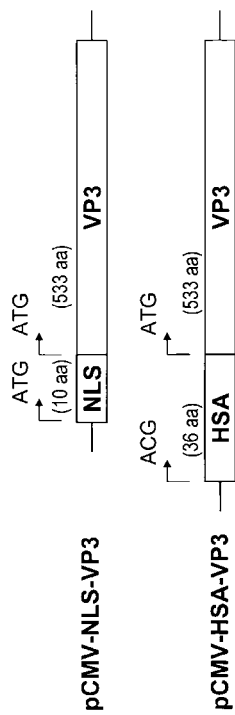
【図 8 B】



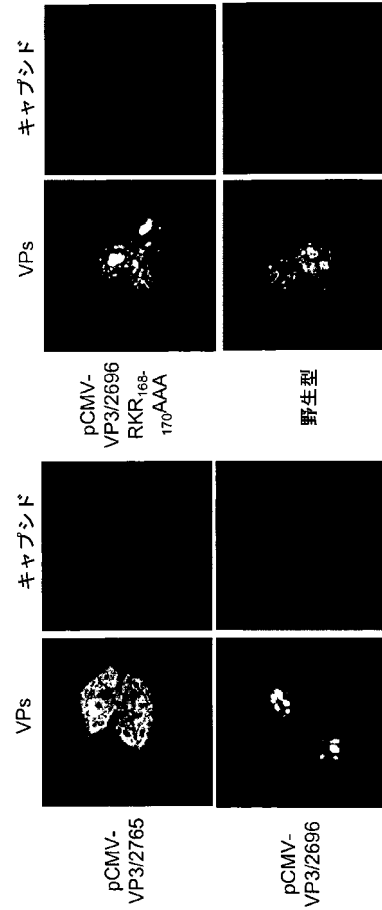
【図 9】



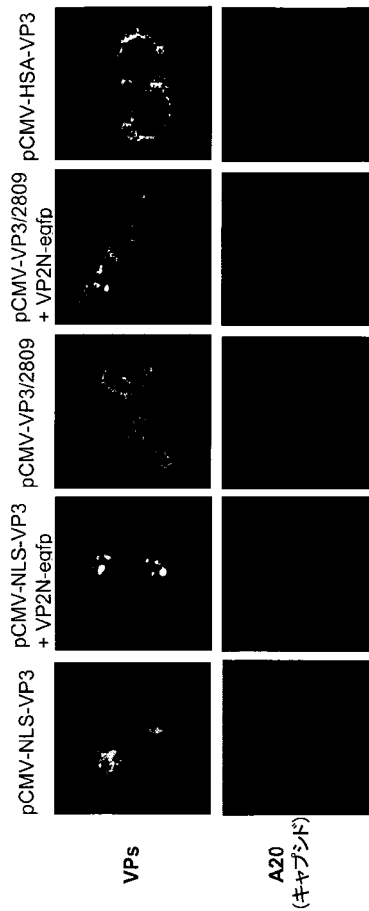
【図 11 A】



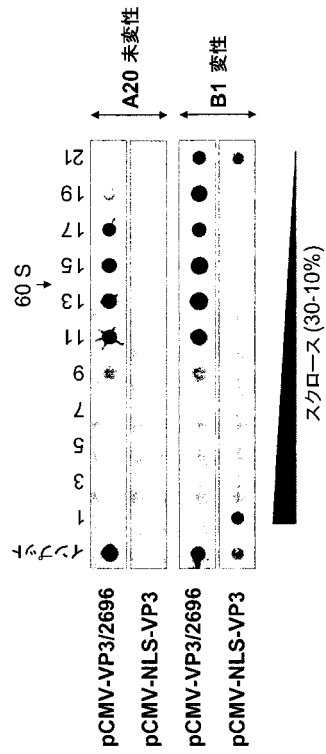
【図 10】



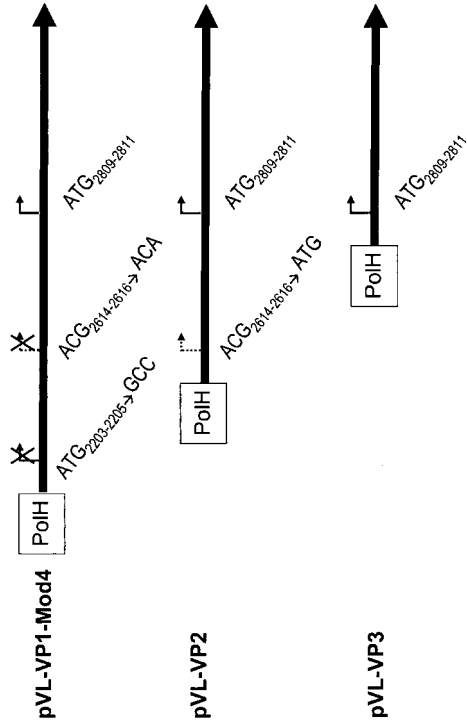
【図 11 B】



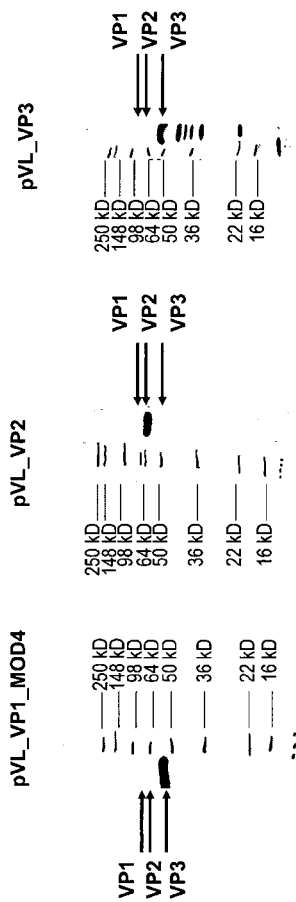
【図 1 1 C】



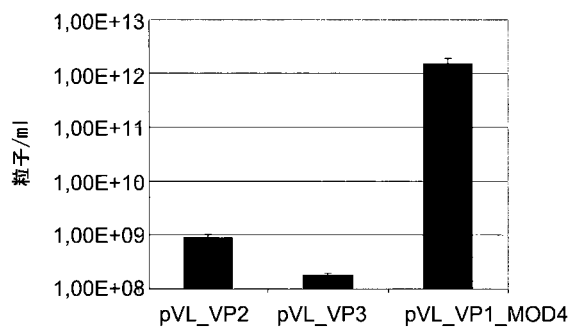
【図 1 2 A】



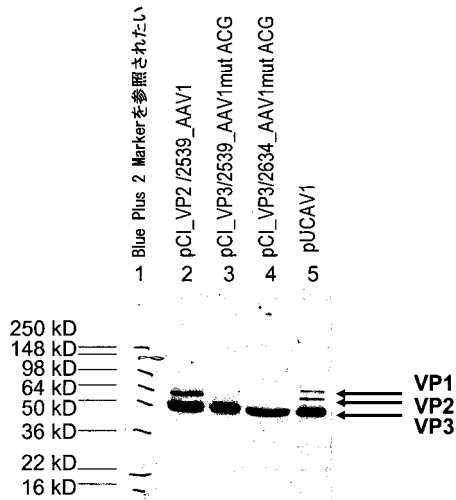
【図 1 2 B】



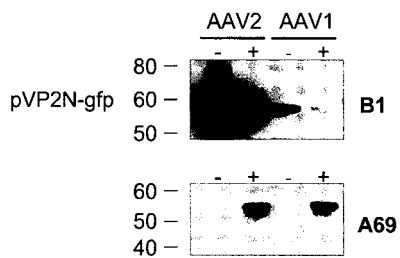
【図 1 2 C】



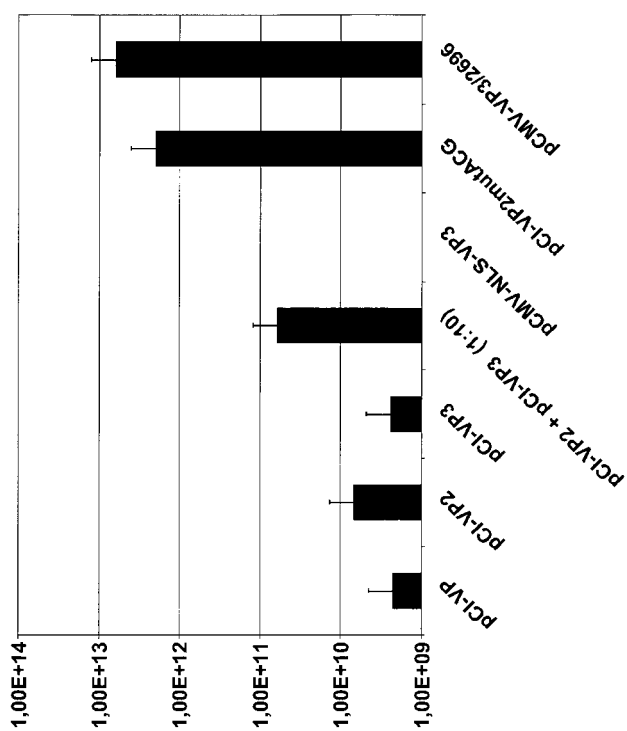
【 図 1 3 】



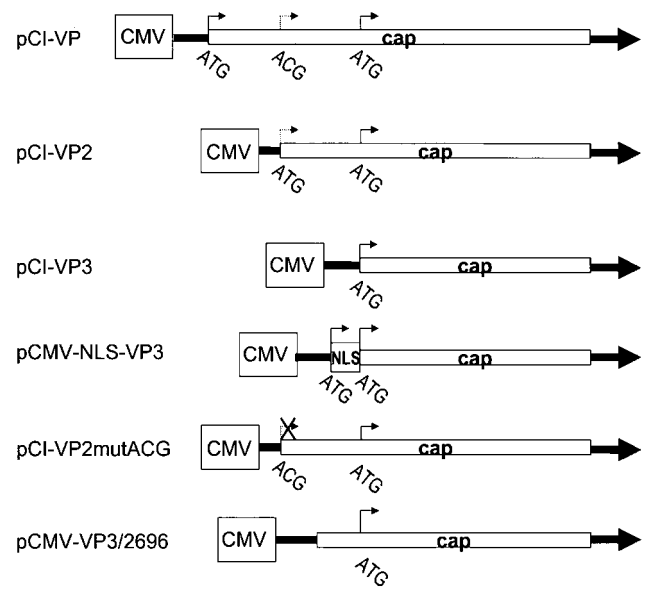
【 図 1 4 】



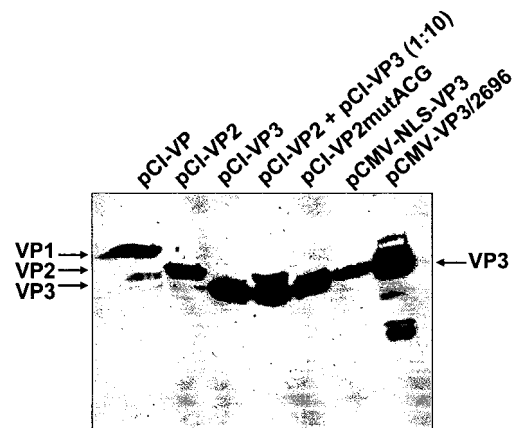
【 図 1 5 B 】



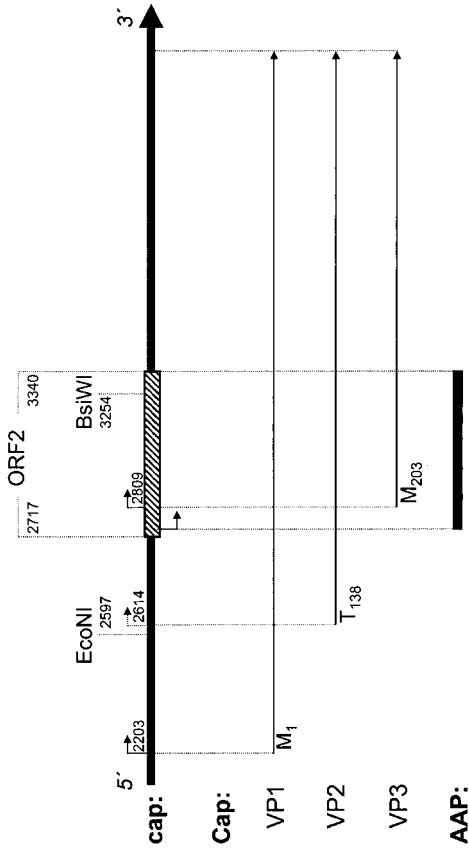
【 図 1 5 A 】



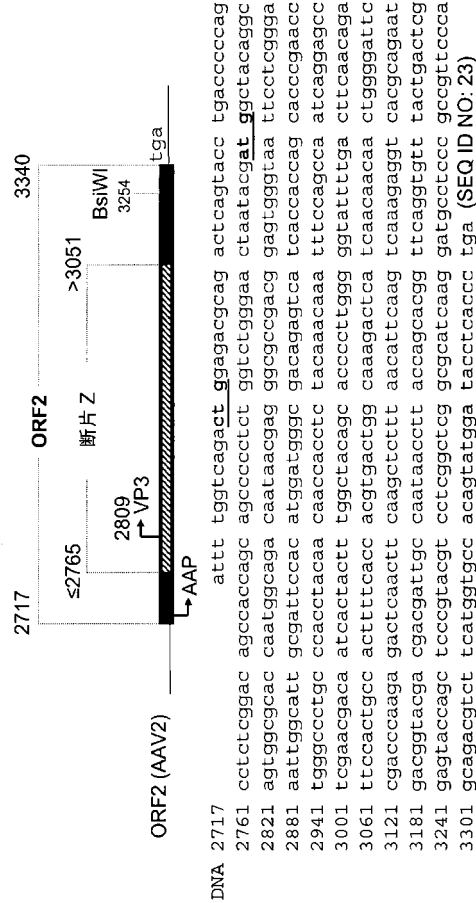
【 図 1 5 C 】



【 1 6 】



【 1 7 】



DNA 2717 attt tggctcagact ggagacgcag actcagtlacc tgacccccag
2761 cctctcggac agccaccagc agcccccctt ggtctgggaa ctaatacgat ggtctcagggc
2821 agtggcgac caalggcaga caataacgag ggcgcgcagc gagtgggtaa ttctcggga
2881 aattggcatt gcatctccac atggtatggc gacagagtca tcaccaccag caccggaacc
2941 tgggccccgc ccactacaa caaccacact tacaaacaaa ttctcagcca atcaggagcc
3001 tcgaacgaca atcactactt tggctacagc accccttggg ggtattttga ctcaacaga
3061 ttccactgcc acttttacc acgtgactgg caaagactca tcaaacacaa ctggggaltc
3121 cgaccocaaaga gactcaactt caagctcttt aacattcaag tcaaaagagt cagcagaat
3181 gacggtacga cgacgattgc caataacott accagcacgg ttacagtggt tactgactcg
3241 gactaccagc tcccgtaagt cctcggtacgt cgcgtacag gatgcctccc gcggttccca
3301 gcagacgtct tcatgtgcc acagtatgga tacctacccc tga (SEQ ID NO: 23)

AAP 1 ILVRLETQ YLTPSLSDSH QPPLVWELI RWLQAVAHQW QTITRAPEW
51 VIPREIGAI PHGWATESSP PAPEPGPCPP TTTTSTNKFP ANQEPRTIT
101 TLATAPLGGI LTSTDTSTATF HHVTGKDSST TTGSDPRDS TSSSLTFKSK
151 RSRMTVRRR LPITLPAFR CLLTRSTSSR TSSARRIKDA SRRSQQTSSW
201 CHSMDTSP (SEQ ID NO: 1)

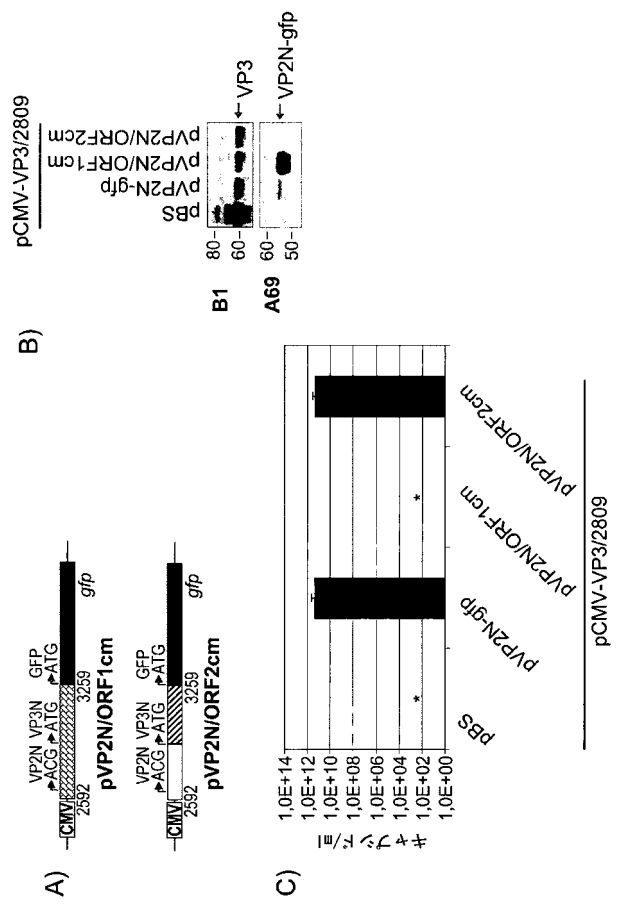
【 1 8 A 】

ORF1cm 1 TTGAGGAACC TGTTAAGACG GCCCCTGGCA AGAAACGGCC CGTGAGCAC
51 AGCCCCGTGG AGCCGACAG CAGCAGCGC ACCGGCAAG CCGGACAGCA
101 GCCGCCAGA AAGCGCTGA ACTTCGGCCA GACTGGGAC GCTGATAGC
151 TGCCCCGACC TCAGCCCCG GCGCAGCCTC CTGCTGTCC TAGCGCCCTC
201 GGCACCAACA CCATGGCCAC CGGCAGCGGA GCCCCCATGG CCGATAACAA
251 TGAAGGGGCA GACGCGTGG GCAACAGCTC CGGCAACTGG CACTCGGACA
301 GCACCTGGAT GGGAGATCGG GTGATCACAA CCTCCACCCG GACATGGGCT
351 CTCCTACTT ATAATAATCA CCGTACAAAG CAGATCAGA CCGAGAGCGG
401 CGCAGCAAT GATAACCACT ACTTCGGGTA CTCTACACC TGGGGTACT
451 TCGATTTCAA TCGGTTTCAC TGTCACTTCA GCCCCAGAGA CTGCAGCGG
501 GTGATTAATA ATAATTGGG CTTCGGGCC AAGCGGTGA ATTTCAAGCT
551 GTTCAATATC CAGGTGAAG AAGTGACCCA GAACGATGGC ACCACACAA
601 TCGCCAAACA CCGTACCTCA ACCGTGAGG TGTTCACCGA CAGCAGTAC
651 CAGTGCCTG AC (SEQ ID NO: 57)

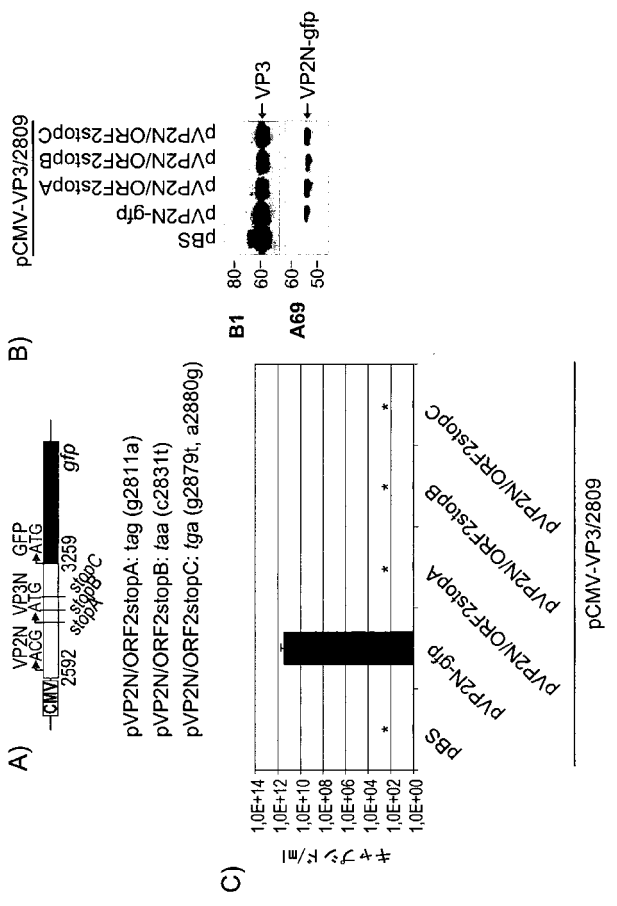
【 1 8 B 】

ORF2cm 1 TTGAGGAACC TGTTAAGACG GCTCCGGGAA AAAAGAGGCC GGTAGAGCAC
51 TCTCTGTGG AGCCAGACTC CTCTCTGGGA ACCGGAAGG CGGGCAGCA
101 GCTTCAAGA AAAAGATTGA ATTCTGTCA GACTGAGAC GCAGACTCAG
151 TACCTGACCC CCAGCCTCTC GGACAGCCAC CAGCAGCCC CTCTGTCTG
201 GGAACCTAATA CGATGGCTGC AGGCGGTGG CCACAGTGG CAGACCATCA
251 CCAGACCCC CACCGAGTGG GTGATCCCTC GGGAGATCGG CATTGCCATC
301 CCTCAGGCT GGGCCACAGA GTCTAGCCCT CCAGCCCTTG AGCTGSCCC
351 TTGTCCCTT ACCACACCA CCTCCACCA CAAGTTCCC GCCAACGAG
401 AACCCGGAC CACCATCAC CACTGGCCA CAGCCCTCT GGGCGGCATC
451 CTGACAGCA CCGACAGCAC CGCCACCTTT CACCACGTGA CCGGCAAGGA
501 CAGCAGCAC ACCACGGCG ACAGGACC CAGACAGC ACCAGCTCCA
551 GCCTGACCTT CAAGACAA CCGGACAGC GCATGACCGT GCGGCGGAGA
601 CTGCCTATCA CCTGCCCCG CAGATTCCGG TGCCTGCTGA CCAGAAGCAC
651 CAGCAGCCGT AC (SEQ ID NO: 58)

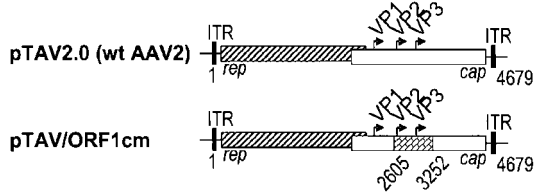
【 図 2 0 】



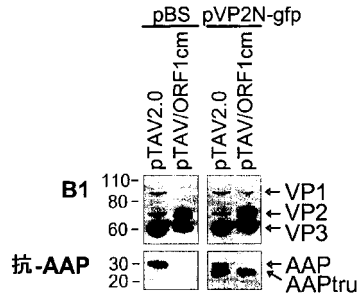
【 図 2 2 】



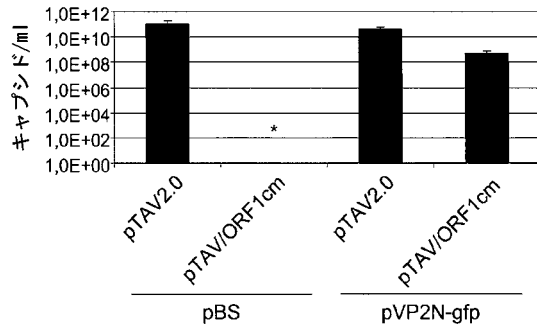
【図 2 3 A】



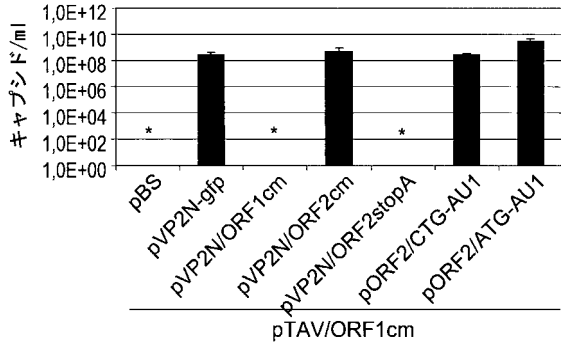
【図 2 3 B】



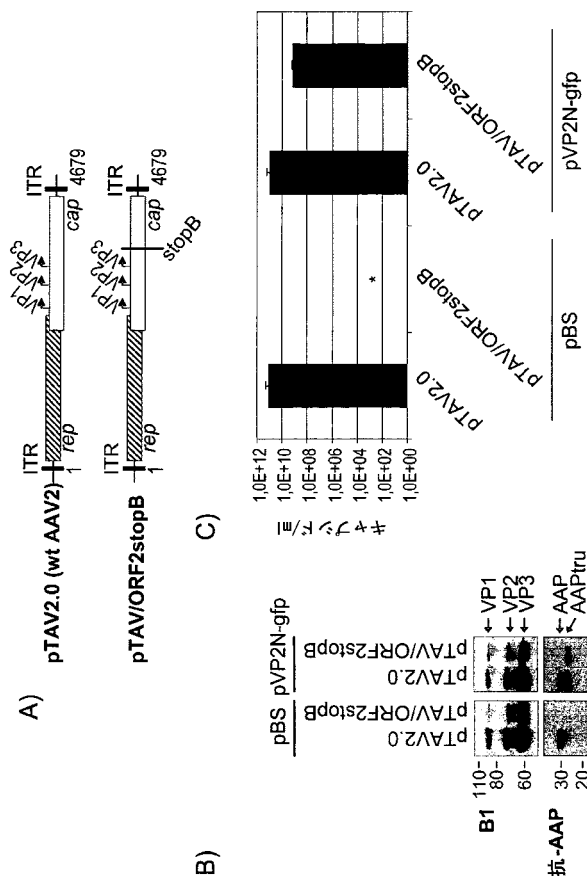
【図 2 3 C】



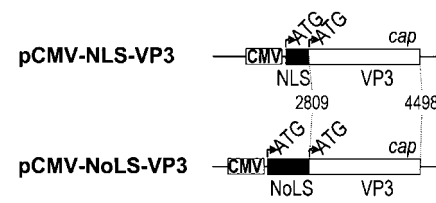
【図 2 3 D】



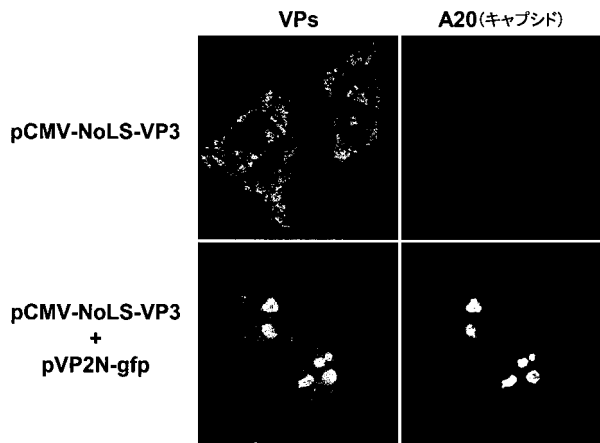
【図 2 4】



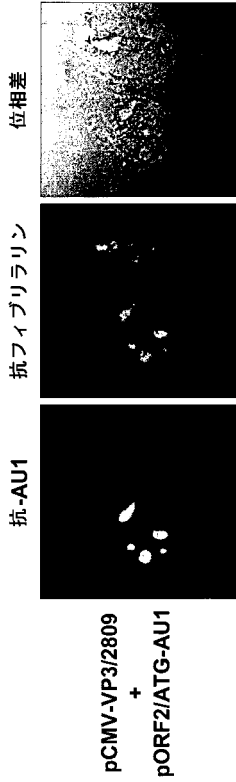
【図 2 5 A】



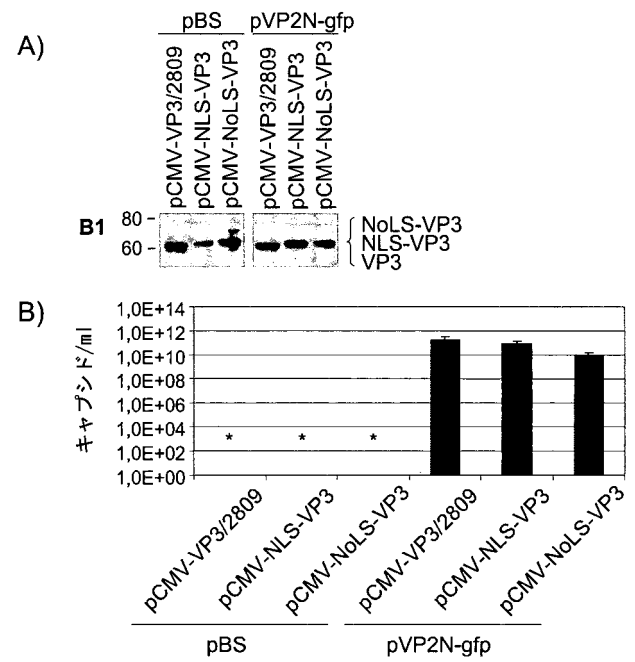
【図 2 5 B】



【図 25C】



【図 26】



【図 27 - 1】

AAV2
AAV10
AAV1
マウス_AAV1
トリ_AAV
ヤギ_AA
ラット_AA
ガチョウ_PV
アヒル_PV
b-AAV
ヘビ_PV1
保存

AAV2
AAV10
AAV1
マウス_AAV1
トリ_AAV
ヤギ_AA
ラット_AA
ガチョウ_PV
アヒル_PV
b-AAV
ヘビ_PV1
保存

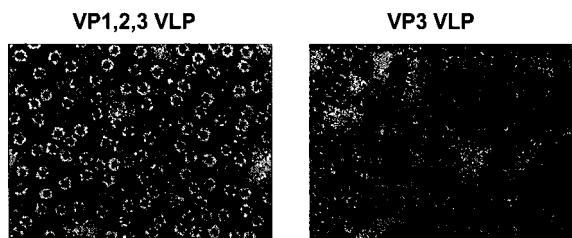
AAV2
AAV10
AAV1
マウス_AAV1
トリ_AAV
ヤギ_AA
ラット_AA
ガチョウ_PV
アヒル_PV
b-AAV
ヘビ_PV1
保存

【図 27 - 2】

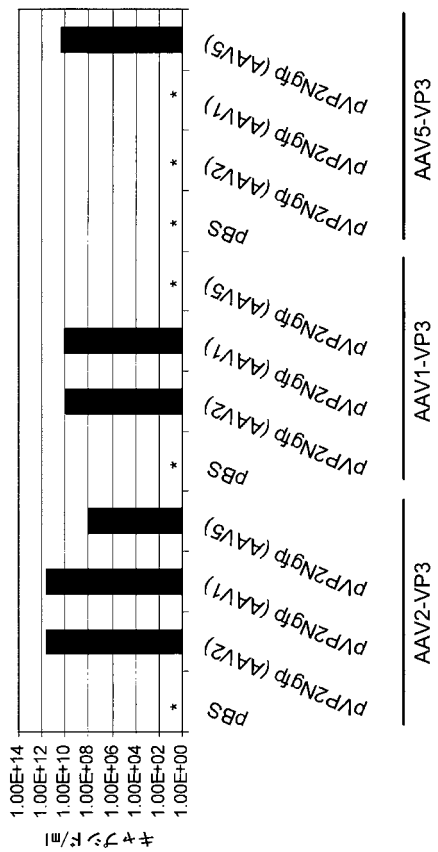
AAV2
AAV10
AAV1
マウス_AAV1
トリ_AAV
ヤギ_AA
ラット_AA
ガチョウ_PV
アヒル_PV
b-AAV
ヘビ_PV1
保存

(SEQ ID NO: 1)
(SEQ ID NO: 10)
(SEQ ID NO: 16)
(SEQ ID NO: 143)
(SEQ ID NO: 18)
(SEQ ID NO: 19)
(SEQ ID NO: 20)
(SEQ ID NO: 21)
(SEQ ID NO: 13)
(SEQ ID NO: 22)

【図 28】



【 図 2 9 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成23年12月1日 (2011.12.1)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2012519008000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/001343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/015 C12N7/04 C12N15/35 A61K39/23
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HOQUE M ET AL: "Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation" 19990901; 19990900, vol. 73, no. 9, 1 September 1999 (1999-09-01), pages 7912-7915, XP002290874</p> <p>the whole document ----- -/-</p>	<p>25-28, 30-32, 44,45, 47,52, 54,69, 71-74, 77, 79-83, 97,98, 102,103, 105</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 November 2010

Date of mailing of the international search report

16/11/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schulz, Regine

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/001343

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RUFFING M ET AL: "MUTATIONS IN THE CARBOXY TERMINUS OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS 2 CAPSID PROTEINS AFFECT VIRAL INFECTIVITY: LACK OF AN RGD INTEGRIN-BINDING MOTIF" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 75, no. 12, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 3385-3392, XP008030694 ISSN: 0022-1317 * abstract	1-24
A	& DATABASE EMBL [Online] 8 December 2008 (2008-12-08), Ruffing, M. et al.: "Adeno-associated virus-2" XP002592832 Database accession no. NC_001401	1-24
A	WO 02/053703 A2 (CHILDRENS HOSPITAL INC [US]) 11 July 2002 (2002-07-11) examples 1-10; table 1	33-46, 84-96
A	WO 2008/145401 A2 (MEDIGENE AG [DE]; LUDWIG MAXIMILIANS UNI [DE]; KLINIKUM DER UNI ZU KOE) 4 December 2008 (2008-12-04) page 68 - page 154	33-46, 84-96
A	RABINOWITZ J E ET AL: "Insertional Mutagenesis of AAV2 Capsid and the Production of Recombinant Virus" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US LNKD-DOI:10.1006/VIRO.1999.0045, vol. 265, no. 2, 20 December 1999 (1999-12-20), pages 274-285, XP004439668 ISSN: 0042-6822 the whole document	33-46, 84-96
A	WARRINGTON K H ET AL: "ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2 VP2 CAPSID PROTEIN IS NONESSENTIAL AND CAN TOLERATE LARGE PEPTIDE INSERTIONS AT ITS N TERMINUS" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD-DOI:10.1128/JVI.78.12.6595-6609.2004, vol. 78, no. 12, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 6595-6609, XP001194467 ISSN: 0022-538X the whole document	28-46, 52, 53, 69-96, 103-105
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/001343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2004/027019 A2 (UNIV FLORIDA [US]; WARRINGTON KENNETH H [US]; OPIE SHAUN R [US]; MUZYC) 1 April 2004 (2004-04-01)</p> <p>page 57 - page 82</p> <p>-----</p>	<p>28-46, 52,53, 69-96, 103-105</p>
A	<p>WU P ET AL: "MUTATIONAL ANALYSIS OF THE ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2 (AAV2) CAPSID GENE AND CONSTRUCTION OF AAV2 VECTORS WITH ALTERED TROPISM"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD-DOI:10.1128/JVI.74.18.8635-8647.2000, vol. 74, no. 18, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 8635-8647, XP001028219 ISSN: 0022-538X figure 1</p> <p>-----</p>	<p>33-46, 84-96</p>
A	<p>STEINBACH S ET AL: "Assembly of adeno-associated virus type 2 capsids in vitro"</p> <p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 78, no. 6, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 1453-1462, XP002346582 ISSN: 0022-1317 the whole document</p> <p>-----</p>	<p>28-46, 69-92</p>
A	<p>RUFFING M ET AL: "ASSEMBLY OF VIRUSLIKE PARTICLES BY RECOMBINANT STRUCTURAL PROTEINS OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2 IN INSECT CELLS"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 66, no. 12, 1 December 1992 (1992-12-01), pages 6922-6930, XP001032438 ISSN: 0022-538X the whole document</p> <p>-----</p>	<p>28-46, 69-92</p>
T	<p>SONNTAG FLORIAN ET AL: "A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 1 JUN 2010 LNKD- PUBMED:20479244, vol. 107, no. 22, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 10220-10225, XP002591761 ISSN: 1091-6490 the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/001343

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02053703	A2	11-07-2002	AU 2002248297 A1	16-07-2002
WO 2008145401	A2	04-12-2008	AU 2008258090 A1	04-12-2008
			CA 2687728 A1	04-12-2008
			EP 2012122 A1	07-01-2009
			EP 2158488 A2	03-03-2010
			JP 2010530737 T	16-09-2010
WO 2004027019	A2	01-04-2004	AT 405295 T	15-09-2008
			AU 2003295312 A1	08-04-2004
			CA 2483624 A1	01-04-2004
			DK 1496944 T3	01-12-2008
			EP 1496944 A2	19-01-2005
			HK 1071518 A1	24-04-2009
			NZ 536274 A	30-04-2008
			NZ 561656 A	31-03-2009
			SI 1496944 T1	28-02-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	7/04	(2006.01)	C 1 2 N	7/04	4 C 0 8 7	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	35/76	(2006.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	39/23	(2006.01)	A 6 1 K	39/23		
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/00		
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	25/30	(2006.01)	A 6 1 P	25/30		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	11/02		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	
			A 6 1 P	27/02		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 509327817

メディジーン アーゲー

ドイツ連邦共和国 プラネグ/マーティンスリエド ロシュハマー シュトラッセ 1 1

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100130845
 弁理士 渡邊 伸一
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72)発明者 ソンターク フロリアン
 ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク シュルツェンガッセ 2 0
 (72)発明者 クラインシュミット ユルゲン
 ドイツ連邦共和国 バンメンタール ヴァーヴィーゼンヴェーグ 5
 (72)発明者 ヘーラー マーカス
 ドイツ連邦共和国 プラネック ヨーゼフ - バイエル - シュトラッセ 1 0
 (72)発明者 ルクス ケルスティン
 ドイツ連邦共和国 ミュンヘン アルフレット - シュミット - シュトラッセ 3 7
 F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA02 DA02 EA04 GA11 GA18 GA30
 4B064 AG32 BJ12 CA10 CA19 CC15 CC24 DA01
 4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45 CA60
 4C084 AA13 NA14 ZA011 ZA161 ZA331 ZA341 ZA361 ZA451 ZA591 ZA621
 ZA681 ZA891 ZA961 ZB071 ZB111 ZB131 ZB151 ZB261 ZB321 ZC211
 ZC391
 4C085 AA03 BA75 CC08 DD62 EE01 EE06
 4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA08 NA14 ZA01 ZA16 ZA33 ZA34
 ZA36 ZA45 ZA59 ZA62 ZA68 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13
 ZB15 ZB26 ZB32 ZC21 ZC39
 4H045 AA11 BA09 CA01 DA86 EA31 FA74