

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5998229号
(P5998229)

(45) 発行日 平成28年9月28日 (2016.9.28)

(24) 登録日 平成28年9月2日 (2016.9.2)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

請求項の数 25 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-545901 (P2014-545901)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月16日 (2012.10.16)
 (65) 公表番号 特表2015-500645 (P2015-500645A)
 (43) 公表日 平成27年1月8日 (2015.1.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/060441
 (87) 国際公開番号 W02013/085624
 (87) 国際公開日 平成25年6月13日 (2013.6.13)
 審査請求日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
 (31) 優先権主張番号 61/568, 595
 (32) 優先日 平成23年12月8日 (2011.12.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/618, 689
 (32) 優先日 平成24年3月31日 (2012.3.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514144065
 ビロベック・インコーポレイテッド
 V I R O V E K, I N C.
 アメリカ合衆国94545カリフォルニア
 州ヘイワード、プロダクション・アベニュー
 ー26291番、スイート10
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 毒性遺伝子を保有するベクター、そのための方法および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

毒性ポリペプチドをコードする配列；および
 前記配列を中断するイントロン
 を含む核酸であって、

それにより、イントロンがインビトロでは昆虫細胞ではなく哺乳動物細胞においてスプライスされ、昆虫細胞ではなく哺乳動物細胞において、翻訳されて細胞毒性レベルの毒性ポリペプチドを形成するmRNAを形成する、核酸。

【請求項2】

前記毒性ポリペプチドが、ジフテリア毒素(DT-A)、バルナーゼ、リシン、アブリ
 ンおよびシュードモナス外毒素からなる群から選択される、請求項1に記載の核酸。 10

【請求項3】

前記毒性ポリペプチドがジフテリア毒素(DT-A)である、請求項1に記載の核酸。

【請求項4】

前記毒性ポリペプチドがバルナーゼポリペプチドである、請求項1に記載の核酸。

【請求項5】

前記配列と作動可能に連結される少なくとも1つの発現エレメントをさらに含む、請求
 項1に記載の核酸。

【請求項6】

前記発現エレメントが、プロモーター、IRES、エンハンサーおよびそれらの組合せ 20

からなる群から選択される、請求項 5 に記載の核酸。

【請求項 7】

前記発現エレメントが、CMVプロモーター、AFPプロモーター、AFPエンハンサー、hSURVプロモーター、CXCR4プロモーター、hTERTプロモーター、COX2プロモーターおよびCCARプロモーターからなる群から選択される、請求項 5 に記載の核酸。

【請求項 8】

前記発現エレメントが、hSURVプロモーターおよびCXCR4プロモーターからなる群から選択される、請求項 5 に記載の核酸。

【請求項 9】

前記イントロンがヒト成長ホルモンイントロンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 10】

前記イントロンがSV40ラージT抗原イントロンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、ウィルスベクター。

【請求項 12】

前記ベクターがアデノ随伴ウィルス(AAV)である、請求項 11 に記載のウィルスベクター。

【請求項 13】

前記ベクターがAAV2である、請求項 11 に記載のウィルスベクター。

【請求項 14】

前記ベクターがAAV9である、請求項 11 に記載のウィルスベクター。

【請求項 15】

前記ベクターがITRを含む、請求項 11 に記載のウィルスベクター。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、in vitro 昆虫細胞。

【請求項 17】

Trichoplusia ni BTI-Tn-5BI-4細胞、Spodoptera frugiperda Sf9細胞およびSpodoptera frugiperda Sf21細胞からなる群から選択される、請求項 16 に記載の昆虫細胞。

【請求項 18】

前記核酸がウィルスゲノムにより含まれる、請求項 16 に記載の昆虫細胞。

【請求項 19】

前記核酸がウィルスにより含まれる、請求項 16 に記載の昆虫細胞。

【請求項 20】

前記細胞が請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸で安定的に形質転換される、請求項 16 に記載の昆虫細胞。

【請求項 21】

複数の請求項 16 に記載の細胞；および
培地
を含む、細胞培養物。

【請求項 22】

癌を治療するための医薬組成物であって、治療的有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、医薬組成物。

【請求項 23】

癌を治療するための医薬組成物であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む治療的有効量のアデノ随伴ウィルスを含む、医薬組成物。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

前記癌が、前立腺癌、乳癌、脳腫瘍、子宮頸癌および鼻咽頭癌からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

癌を治療するための医薬組成物であって、治療的有效量の請求項 1 1 に記載のウイルスベクターを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連案件の相互参照

本出願は、2011年12月8日出願、米国特許仮出願第61/568,595号および2012年3月31日出願、米国特許仮出願第61/618,689号に対する優先権を主張する。これらの出願は、その全体が各々、参考として本明細書に援用される。

【0002】

配列表の参照による組み込み

本発明の開示の一部である配列表は、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列を含むコンピューター読み取り可能な形態および書面での配列表を含む。コンピューター読み取り可能な形態で記録される配列表情報は、書面での配列表と同一である。配列表の対象物は、その全体が参考として本明細書に援用される。

【0003】

序論

本発明の開示は、ウイルス学の分野に、さらに特定的には、昆虫細胞中で増殖され、癌のような哺乳動物疾患の処置のために用いられ得る核酸ベクターの分野に関する。

【背景技術】

【0004】

毒性遺伝子およびこのような遺伝子によりコードされるタンパク質は、細胞死を誘導することを伴う疾患の治療、例えば細胞死を引き起こす遺伝子の発現を伴う癌療法のために用いられてきた、または用いるために提案されてきた。自殺遺伝子治療は、癌処置のための魅力的な戦略になってきている（例えば、Rodriguez, R. と Simons, J. W. *Urology* 54: 401~406, 1999年参照）。自殺遺伝子治療は、産物が毒性であるか、またはプロドラッグの投与に併せて毒性産物を生産する遺伝子の送達に依存する（Denning, C. ら、*Human Gene Therapy* 8: 1825~1835, 1997年）。自殺遺伝子治療は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染の処置のために、移植片対宿主病を制御するために、および癌の治療のためにも、広範に研究されてきた。毒性遺伝子、例えばジフテリア毒素A断片（DT-A）、シュードモナス外毒素（PE）またはバルナーゼを含有するウイルスベクターの生成は、これらの毒素の極端な毒性のために、実行が難しかった。

【0005】

毒性遺伝子によりコードされるあるタンパク質は、非常に低レベルの発現で宿主細胞を死滅させ得る。例えば、ジフテリア毒素（DT-A）の単一分子は、細胞を死滅させ得る（Yamaizumi, M. ら、（1978年）*Cell* 15: 245~250）。DTは、伸長因子2（EF2）のADP-リボシル化を触媒することによりタンパク質合成を害すると考えられる。DTは、アポトーシス媒介性経路により主に死滅させ、および細胞周期非依存性様式で細胞を死滅させると考えられる。これは、いくつかの悪性疾患、例えば前立腺癌が非常に低い有糸分裂指数を有する傾向があるので、DTを魅力的な癌療法にする。同様に、リボヌクレアーゼバルナーゼは、癌細胞を標的にするための強力な毒性作用物質として示唆されてきた（Edelweiss, E ら、*PLoS ONE* 3: e2434, 2008年）。

【0006】

しかしながら、標的細胞、例えば癌細胞への毒性遺伝子の送達のために用いられ得るウイルスベクター、例えば組換えアデノウイルス、組換えパキウイルスおよびアデノ随

10

20

30

40

50

伴ウィルスの生産は、宿主細胞に対する毒性遺伝子の毒性により妨害され得る。したがって、毒性遺伝子を保有するウィルスベクターは、ベクターを増殖するために用いられる宿主細胞にとって致命的でない条件下で増殖されるだけでなく、ベクターは、癌細胞のような標的細胞に毒性を及ぼすことができなければならない。

【0007】

誘導性および/または組織特異的プロモーターの使用によるDT-Aのような毒性遺伝子の毒性を制限しようとする従来の試みは、多様な結果をもたらしてきた。例えば、Maxwellら(Cancer Res. 46:4660~4664、1986年)は、切断型メタロチオネインプロモーターを用いて、このプロモーターの基礎発現が、重金属の非存在下でも、タンパク質合成の実質的抑制を生じる、ということを実証した。この抑制は、免疫グロブリン・エンハンサーエレメントの付加により増大され得るが、カドミウムによつては最小限に過ぎなかった。著者は真の特異的細胞毒性を実証できなかったが、しかし、おそらくはこの高度毒性遺伝子の基礎発現の結果として、むしろDT-A媒介性細胞死に対する選択的細胞感受性を実証できなかったに過ぎない。この群は、DT-Aの弱毒化突然変異体も導入した(Maxwell, F.ら(1987年)Mol. Cell Biol. 7:1576~1579; Robinson, D.F.とMaxwell, I.H.(1995年)Hum. Gene Ther. 6:137~143)。この群および他のものによるその後の尽力は、DT-Aの弱毒化突然変異体を導入することに(Maxwell, F.ら(1987年)Mol. Cell Biol. 7:1576~1579)、または原核生物制御エレメントを用いて遺伝子発現を厳密に調節することに(Robinson, D.F.とMaxwell, I.H.(1995年)Hum. Gene Ther. 6:137~143; Paulus, W.ら(1997年)J. Neurosurg. 87:89~95)集中した。両方の場合に、選択的細胞死滅が実証されたが、非特異的細胞死滅の完全廃止は得られなかった。Keyvaniら(Life Sci. 64:1719~1724、1999年)は、弱毒化DT-A突然変異体を発現するためにtet抑制遺伝子ベースの系を用いたが、これらの研究者は、(1)DT-A突然変異体の発現はテトラサイクリン応答性プロモーターにより十分に制御され得るが、しかしその毒性はそうではない、と結論づけた。

【0008】

米国特許第7,582,290号(Rodriguez R.ら)は、前立腺癌のための自殺遺伝子治療に用いるための前立腺特異的プロモーターにより駆動されるジフテリア毒素のAサブユニット(DT-A)を発現する複製能欠損アデノウイルス(Ad)を開示する。本特許は、DTによるタンパク質合成の抑制に対する耐性を提供するEF-2タンパク質の位置705におけるグリシンからアルギニンへの突然変異を記載する。この特許における発明は、遺伝子療法における複製能欠損アデノウイルスの適用における大きな問題は、複製コンピテントアデノウイルス(RCA)の存在であって、これはAdベクター中の配列とヘルパー細胞中の相同Ad配列との間の組換えにより生成される、ということ力を説している。これらの発明者らは、細胞がRCAを作らない自殺遺伝子治療のためにDT発現アデノウイルスをパッケージするための、DT-耐性ヘルパー細胞株も開示する。これらの発明者らはさらに、かれらがTSU細胞(前立腺癌細胞株)からコドン705をスパニングするEF-2遺伝子から500bp領域を増幅した、ということを開示する。部位特異的突然変異誘発を用いて、これらの発明者らは、コドン705を「GGA」から「AGA」に変えて、グリシンの代わりにアルギニンをコードした。相同組換えを用いて、彼らは、PER.C6細胞(二倍体ヒト胚性網膜芽細胞(「HER」)由来であり、米国特許第5,994,128号、第6,265,212号、第6,033,908号および第6,306,652号に記載されている)におけるEF-2タンパク質の位置705においてグリシンをアルギニンに取り替えて、アデノウイルスベクターをパッケージングするためのDT耐性ヘルパー細胞株を生成した。これらの細胞は、ヒトホスホグリセラートキナーゼ(PGK)プロモーターの制御下でAd血清型5(Ad5)E1-A&E1-Bコード配列(Ad5ヌクレオチド459~3510)を含有する。これらの発明者ら

によれば、非重複E1 - 欠失アデノウイルスとともに用いられるこれらの細胞は、ウィルスプレップ中のRCAの存在を排除する。

【0009】

Wangら(Wang, C-Yら、Cancer Research 66:5798~5806, 2006年)は、神経膠原繊維性酸性タンパク質(GFAP)の転写調節配列を収容して、神経膠腫細胞中のDT-A遺伝子の発現を駆動する組換えバキュロウィルスを記載する。GFAPプロモーターは昆虫細胞中では不活性であるため、それらはDT-A毒性遺伝子を保有する組換えバキュロウィルスを生成し得た。しかしながら、細胞型特異的プロモーター、例えばGFAPプロモーターは、ウィルス由来の陽性対照配列、例えばヒトサイトメガロウィルス(CMV)媒介性初期遺伝子のエンハンサー/プロモーターと比較して相対的に弱い転写活性を示し、したがって、その適用を制限する。

10

【0010】

Kohlschutterら(Toxins 2:2754~2768, 2010年)は、DT-A遺伝子を保有するAAVベクターを記載する(この場合、Tet^R抑制因子系を用いて、DT-Aの発現を減少させた)。著者らが、HEK293T細胞中にDT-A遺伝子を保有するいくつかのAAVベクターを作製した場合でも、それらのAAVは一般的に、DT-A遺伝子を有さないAAVベクター、例えばPUMA遺伝子を保有するベクター(AAVTetO2-PUMA)より、2~3log低かった。著者らは、より低い力価をDTATanパク質の残りの発現のせいであるとした。

20

【0011】

米国特許第6,723,551号(Kotinら)は、昆虫細胞におけるアデノ随伴ウィルス(AAV)の産生方法を記載する。これらの発明者らは、AAV遺伝子により含まれるイントロンが昆虫細胞中で適正にスプライスされない、と力説する。これらの発明者らは、イントロンを欠くよう工学処理されたAAV遺伝子を用いることにより、昆虫細胞中でAAVを産生した。しかしながら、この特許は、昆虫細胞中で毒性遺伝子を保有するベクターを増殖させることを教示も示唆もしていない。

【0012】

現在、癌細胞を死滅させるのに用いるといったような治療的使用のための自殺遺伝子治療ベクターを産生するための付加的組成物および方法が必要とされている。

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

昆虫細胞中で毒性遺伝子を保有するウィルスベクターを増殖させる必要性にかんがみて、毒性遺伝子を含む修飾バキュロウィルスベクターおよびアデノ随伴ウィルスベクター、このようなベクターを含む昆虫細胞、このようなベクターおよび細胞の作製方法、ならびにこのようなベクターを用いる処置方法を、本発明者は開発した。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の教示の核酸は、昆虫細胞中で毒性遺伝子を増殖するための核酸であり得る。いくつかの形態では、核酸は、毒性ポリペプチドをコードする配列、および配列を中断するイントロンを含み、本質的にそれらからなり、またはそれらからなり、それによりイントロンを含むRNAは、昆虫細胞によってではなく哺乳動物細胞によってスプライスされ、昆虫細胞においてではなく哺乳動物細胞において、翻訳時に、細胞毒性レベルの毒性ポリペプチドを産生する翻訳可能なmRNAを形成し得る。いくつかの形態では、核酸は、毒性ポリペプチド、例えば、これらに限定されないが、ジフテリア毒素(DT-A)、バルナーゼ、リシン、アプリン、シュードモナス外毒素または前アポトーシス性ポリペプチドをコードする配列を含み得る。このような毒性ポリペプチド(およびペプチド)をコードする配列は、当業者に周知であり(例えば、Ellerby, H.M.,ら、Nature Medicine 5:1032~1038, 1999年参照)、公的にアクセス可能な情報源、例えば国立生物工学情報センターのウェブサイトから入手可能である。いく

40

50

つかの形態では、核酸は、毒性ポリペプチド、例えばジフテリア毒素、例えばDT-Aをコードし得る。いくつかの形態では、核酸は、毒性ポリペプチド、例えばバルナーゼをコードし得る。

【0015】

種々の形態において、本発明の教示のイントロンは、昆虫細胞では適正にスプライスされないが、しかし哺乳動物により適正にスプライスされる任意のイントロン、例えば、これらに限定されないが、ヒト成長ホルモン遺伝子からのイントロン、またはSV40ラージT抗原遺伝子からのイントロンであり得る。

【0016】

種々の形態において、本発明の教示の核酸は、毒性ポリペプチドをコードする配列と作動可能に連結される発現制御配列をさらに含み得る。発現制御配列は、例えばプロモーター、IRES、エンハンサーおよび/またはそれらの組合せであり得る。

【0017】

非限定的図解において、図1は、イントロンを含み、プロモーター、例えばCMVプロモーターと作動可能に連結されるDT-A遺伝子のような毒性遺伝子の遺伝子および転写地図を示す。哺乳動物細胞中への本発明の教示のイントロンを含むDT-A遺伝子の導入時、遺伝子は転写され、イントロンのスプライシングにより成熟DT-A mRNAが哺乳動物細胞中に形成される。成熟RNAは、機能性DT-Aタンパク質に翻訳されて、細胞を死滅させる。DT-Aコード配列に基づいた遺伝子地図上の数字(GenBank寄託番号X00703)は、イントロンが挿入されるヌクレオチド位置を示す。CMVpr = サイトメガロウィルスプロモーター; DT-A = ジフテリア毒素A核酸配列; pA = ポリアデニル化シグナル。

【0018】

いくつかの実施形態では、本発明の教示は、上記の核酸を含むウィルスベクターを包含する。種々の形態において、ウィルスベクターは、例えばバキュロウィルス、レトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス(AAV)またはそれらの組合せ、例えば、米国特許出願公開第20090203071号に記載されたような、しかしコード配列がイントロンで中断される毒性遺伝子をコードする配列も含むよう修飾された、例えばAAV配列を含むバキュロウィルスであり得る。

【0019】

いくつかの実施形態では、本発明の教示は、上記の核酸または上記の核酸を含むウィルスゲノムを含むin vitroでの昆虫細胞を包含する。

【0020】

種々の形態において、昆虫細胞は、これに限定されないが、当業者に既知の樹立昆虫細胞株の細胞、これに限定されないが、例えばTrichoplusia ni BTI-Tn-5BI-4細胞、Spodoptera frugiperda Sf9細胞またはSpodoptera frugiperda Sf21細胞であり得る。

【0021】

いくつかの実施形態では、本発明の教示は、上記の複数の細胞、および培地を含む細胞培養物を包含する。種々の形態において、このような細胞株は、ウィルス、例えばAAVを蓄積し、この場合、非濃縮細胞培地は、 10^9 AAVゲノム/mlを超える、 10^{10} AAVゲノム/mlを超える、 10^{11} AAVゲノム/mlを超えるまたは 10^{12} AAVゲノム/mlを超える力価でウィルスを含み得る。例えば種々の形態において、非濃縮培養細胞培地 1リットルは、少なくとも 10^{13} 、少なくとも 10^{14} または少なくとも 10^{15} AAVウィルス粒子を、本発明の教示のバキュロウィルスで昆虫細胞培養物を感染後、3日以内に含み得る。

【0022】

種々の形態において、本発明の教示の細胞株または細胞培養物はバキュロウィルスを蓄積し、この場合、非濃縮細胞培地は、 10^9 pfu/lを超える、 10^{10} pfu/lを超える、 10^{11} pfu/lを超える、または 10^{12} pfu/lを超える力価で、トラ

10

20

30

40

50

ンスフェクション後4日以内にウィルスを含み得る。

【0023】

いくつかの実施形態では、本発明の教示は、*in vitro*での毒性遺伝子を含むベクターの増殖方法を包含する。種々の形態において、これらの方法は、昆虫細胞を含む細胞培養物を提供すること；本発明の教示の核酸またはウィルスで細胞を感染させるかまたはトランスフェクトすること；およびウィルス産生に適した条件下で細胞をインキュベートすることを包含する。

【0024】

いくつかの実施形態では、本発明の教示は、癌の治療方法を包含する。種々の形態において、これらの方法は、治療を必要とする被験体に本発明の教示の核酸またはウィルスを投与することを包含する。いくつかの形態において、ウィルスは、バキュロウィルスまたはアデノ随伴ウィルスであり得る。本発明の核酸またはウィルスを用いる治療に対する癌対象は、これらに限定されないが、任意の癌、例えば、前立腺癌、乳癌、脳腫瘍、子宮頸癌または鼻咽頭癌であり得る。本発明の教示の種々の実施形態において、本発明の教示のウィルス、例えば本発明の教示のAAV、または本発明の教示のバキュロウィルスは、哺乳動物を感染させるが、しかし哺乳動物細胞内で複製し得ないウィルスであり得る。

10

【0025】

種々の実施形態において、本発明の教示は、疾患、例えば癌の治療のための上記の核酸またはウィルスの使用を包含する。

【0026】

種々の実施形態において、本発明の教示は、癌の治療に用いるための本明細書中に記載される核酸またはウィルスを包含する。種々の実施形態において、本発明の教示は、癌の治療のための医薬の製造における使用のための本明細書中に記載される核酸またはウィルスを包含する。

20

【0027】

種々の実施形態において、昆虫細胞内ではなく哺乳動物細胞が、宿主細胞により翻訳されて、宿主細胞に対して致死性であるポリペプチドを産生し得る成熟mRNAを発現できるように、イントロンをさらに含む毒性遺伝子（これらに限定されないが、例えば、DT-A遺伝子またはバルナーゼ遺伝子を含む）組換えバキュロウィルスまたは核酸を、本発明の教示は包含する。いくつかの形態において、毒性遺伝子のコード配列を中断するイントロンは、哺乳動物細胞により毒性遺伝子の転写体からスプライスされ得るが、しかし昆虫細胞ではそうならない（例えば、図1に記述）。哺乳動物細胞（例えば、*in vitro*または*in vivo*でのヒト細胞）中へのイントロンを含む毒性遺伝子の導入時に、細胞は、毒性遺伝子の成熟mRNAを産生し得る。成熟mRNAは、哺乳動物細胞により機能性DT-Aタンパク質（または他の毒性タンパク質）に翻訳されて、細胞を死滅させ得る。

30

【0028】

いくつかの実施形態では、本発明の教示は、昆虫細胞におけるイントロンを含む毒性遺伝子を保有する組換えバキュロウィルスの産生方法を包含する。これらの実施形態では、組換えバキュロウィルスは、当業者に周知の方法により生成され得る。このような方法としては、これに限定されないが、例えば*in vitro*での昆虫細胞、例えばSf9細胞中にバクミドDNAをトランスフェクトすることが挙げられるが、バクミドのようなベクターは、イントロンが挿入される毒性遺伝子を含むよう修飾される。

40

【0029】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、イントロンを含むDT-A遺伝子またはイントロンを含むバルナーゼ遺伝子のような毒性遺伝子を保有するAAVベクターを包含する。イントロンを伴う毒性遺伝子を含むAAVベクターは、昆虫細胞中で産生され得る。宿主哺乳動物細胞中への導入時に、本発明の教示のAAVベクターにより含まれる毒性遺伝子は、転写され、哺乳動物細胞中でスプライスされて、成熟毒性遺伝子mRNA（例えば、DT-A mRNAまたはバルナーゼmRNA）を形成し得る。成熟毒性遺伝子mRNA

50

は、宿主哺乳動物細胞により翻訳されて、毒性タンパク質（例えばDT-Aまたはバルナーゼ）を産生し、それにより宿主哺乳動物細胞を無能にするかまたは死滅させ得る。

【0030】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、昆虫細胞における毒性遺伝子、例えばDT-A遺伝子またはバルナーゼ遺伝子を保有するAAVベクターの産生方法を包含する。これらの方法では、バキュロウィルスおよびAAV配列、例えばBac-Rep-Cap（またはBac-inCap-inRep）を含む第1のベクター、およびバキュロウィルスおよびITR配列ならびにイントロンにより中断される毒性遺伝子（例えば、DT-Aまたはバルナーゼ）を含む第2のベクターは、宿主昆虫細胞と接触させて、宿主細胞を共感染し得る。感染細胞は、イントロンにより中断される毒性遺伝子を含むAAVを生じ得る。in vitroで増殖されるこのような感染細胞は、Sf9細胞のような昆虫細胞の培養の感染後3日以内に、非濃縮培地中で少なくとも 10^9 ウィルスゲノム/ml、少なくとも 10^{10} ウィルスゲノム/ml、少なくとも 10^{11} ウィルスゲノム/mlまたは少なくとも 10^{12} ウィルスゲノム/mlという、毒性遺伝子を含む組換えAAVの力価を生じ得る。

10

【0031】

本発明の教示のいくつかの態様は、昆虫細胞における毒性遺伝子を保有するAAVベクターの産生の付加的方法を包含する。これらの方法では、昆虫細胞は、イントロンを含む毒性遺伝子（例えばDT-Aまたはバルナーゼ）に隣接するAAVITRを含む導入遺伝子のような安定的に組み込まれた導入遺伝子を含むことを提供され得る（例えば図5参照）。これらの実施形態の細胞は、Bac-Rep-Capで感染され得る。Bac-Rep-Capでの感染後、細胞は、イントロンを含む毒性遺伝子（例えばDT-A）を含むAAVベクターを産生し得る。種々の形態において、in vitroで増殖される感染細胞の集団は、非濃縮培地中で少なくとも 10^9 ウィルスゲノム/ml、少なくとも 10^{10} ウィルスゲノム/ml、少なくとも 10^{11} ウィルスゲノム/mlまたは少なくとも 10^{12} ウィルスゲノム/mlという、組換えAAVの力価を生じ得る。いくつかの形態において、このような高い値は、感染後約3日以内に獲得され得る。

20

【0032】

いくつかの実施形態では、本発明の教示は、inDTAまたはinバルナーゼを保有する安定的に組み込まれたAAVゲノムを保有する昆虫細胞（例えばSf9）を用いる、毒性遺伝子を保有するAAVベクターの産生を包含する。種々の形態において、このような細胞は、3日間、RepおよびCap遺伝子を保有する組換えバキュロウィルスで感染させられ得る。細胞ペレットが収集され、処理されて、AAVベクターが精製され得る。

30

【0033】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明の教示は、毒性ポリペプチドをコードする配列、および配列を中断するイントロンを含む核酸であって、それにより、イントロンが昆虫細胞ではなく哺乳動物細胞においてスプライスされ、昆虫細胞ではなく哺乳動物細胞において、翻訳されて細胞毒性レベルの毒性ポリペプチドを形成するmRNAを形成する、核酸を包含する。いくつかの形態において、毒素遺伝子によりコードされる毒素ポリペプチドは、これらに限定されないが、ジフテリア毒素（DT-A）、バルナーゼ、リシン、アプリンまたはシュードモナス外毒素であり得る。いくつかの好ましい形態では、毒素は、それぞれジフテリア毒素（DT-A）遺伝子またはバルナーゼ遺伝子によりコードされるが、イントロン、例えば、これらに限定されないが、ヒト成長ホルモンイントロンまたはSV40ラージT抗原イントロンにより中断される、ジフテリア毒素（DT-A）またはバルナーゼであり得る。種々の形態において、本発明の教示の核酸は、配列と作動可能に連結される少なくとも1つの発現エレメントをさらに含み得る。このような発現エレメントは、プロモーター、IRES、エンハンサーおよびそれらの組合せのうちの1つ以上を包含し得る。いくつかの形態では、本発明の教示の核酸により含まれる発現エレメントは、CMVプロモーター、AFPプロモーター、AFPエンハンサー、SURVプロモーター、CXCR4プロモーター、TERTプロモーター、COX2プロモーターおよ

40

50

びCCKAPプロモーターのうちの1つ以上を包含し得る。いくつかの形態では、本発明の教示の核酸により含まれる発現エレメントは、hAFPプロモーター、hAFPエンハンサー、hSURVプロモーター、hCXCR4プロモーター、hTERTプロモーター、hCOX2プロモーターおよびhCCARプロモーターのうちの1つ以上を包含し得る。いくつかの形態において、発現制御エレメントは、腫瘍細胞において発現を指図し得るプロモーター、例えばhSURVプロモーターまたはCXCR4プロモーターであり得る。いくつかの好ましい形態では、発現エレメントは、hSURVまたはCXCR4プロモーターであり得る。

【0034】

いくつかの実施形態では、毒性遺伝子の配列を中断するイントロンは、哺乳動物細胞によりスプライスされるが、昆虫細胞にはスプライスされない任意のイントロンであり得る。種々の形態において、イントロンは、人工イントロン、ヒト成長ホルモンイントロンまたはSV40ラージT抗原イントロンであり得る。

10

【0035】

種々の実施形態において、本発明の教示の核酸またはウィルスベクターは、少なくとも1つのITRを含み得る。

【0036】

いくつかの実施形態では、本発明の教示の核酸またはウィルスベクターは、5'から3'への順序で、第1のITR、プロモーター、毒性遺伝子の第1の部分、イントロン、毒性遺伝子の第2の部分、ポリアデニル化シグナルおよび第2のITRを含み得る。種々の形態において、第1のITRはAAV ITRであり、第2のITRはAAV ITRであり得る。

20

【0037】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、本明細書中に記載される核酸を含むウィルスベクターを包含する。いくつかの形態において、ウィルスベクターは、バキュロウィルス、レトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス(AAV)またはそれらの組合せであり得るし、特にベクターは、バキュロウィルス、アデノ随伴ウィルス(AAV)またはそれらの組合せである。本発明の教示の核酸を含むAAVの非限定例としては、AAV2およびAAV9、好ましくはAAV2が挙げられる。

【0038】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、本明細書中に記載される核酸を含む*in vitro*での昆虫細胞を包含する。本発明の教示の種々の実施形態は、*in vitro*での個々の昆虫細胞、昆虫細胞株、昆虫細胞培養物および*in vitro*での昆虫細胞集団を包含する。種々の形態において、本発明の教示の昆虫細胞としては、*Trichoplusia ni* BTI-Tn-5BI-4細胞、*Spodoptera frugiperda* Sf9細胞または*Spodoptera frugiperda* Sf21細胞が挙げられるが、これらに限定されない。昆虫細胞集団または細胞株としては、*Trichoplusia ni* BTI-Tn-5BI-4細胞、*Spodoptera frugiperda* Sf9細胞、*Spodoptera frugiperda* Sf21細胞およびその任意の組合せが挙げられ得るが、これらに限定されない。種々の形態において、昆虫細胞は、ウィルスゲノムにより構成される核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、本発明の教示の昆虫細胞は、本発明の教示の核酸を含むウィルスを含み得る。種々の形態において、これらの実施形態のウィルスは、AAV、バキュロウィルスまたはそれらの組合せであり得る。いくつかの実施形態では、本発明の教示の昆虫細胞は、本発明の教示の核酸で安定的に形質転換され得る。

30

40

【0039】

本発明の教示の実施形態は、細胞培養物、例えば昆虫細胞培養物を包含する。種々の形態において、細胞培養物は、本発明の教示の核酸を含む細胞、および細胞培地を包含し得る。種々の形態において、細胞培養物は、細胞培地の濃度に伴うことなく1ml当たり 10^9 を超えるウィルスゲノムを、細胞培地の濃度に伴うことなく1ml当たり 10^{10} を

50

超えるウィルスゲノムを、細胞培地の濃度に伴うことなく1ml当たり 10^{11} を超えるウィルスゲノムを、細胞培地の濃度に伴うことなく1ml当たり 10^{12} を超えるウィルスゲノムを含み得る。種々の実施形態において、本発明の教示の細胞株、細胞培養物または細胞集団は、本発明の教示の核酸を含むバキュロウィルスを含み得る。種々の形態において、細胞株、細胞培養物または細胞集団は、非濃縮培地中に 10^6 PFU/mlを超える、非濃縮培地中に 10^7 PFU/mlを超える、非濃縮培地中に 10^8 PFU/mlを超える、または非濃縮培地中に 10^9 PFU/mlを超えるバキュロウィルスを含み得る。

【0040】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、*in vitro*での毒性遺伝子を含むベクターの増殖方法を包含する。種々の形態において、これらの方法は、昆虫細胞を含む細胞培養物を提供すること；毒性ポリペプチドをコードする配列および配列を中断するイントロンを含む本発明の教示の核酸で細胞を感染させるかまたはトランスフェクトすること；およびウィルス産生に適した条件下で細胞をインキュベートすることを包含する。種々の形態において、核酸は、ウィルス、例えばバキュロウィルス、AAVまたはそれらの組合せにより含まれ得る。したがって、種々の形態において、これらの方法は、昆虫細胞を含む細胞培養物を提供すること；およびウィルスベクター、例えば本発明の教示の核酸を含むAAVで、およびBac-inCap-inRepのような第2のベクターで細胞を感染させることを包含する。こうした感染は、少なくとも約1日に亘って、少なくとも2日間、少なくとも3日間、約3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、約5日までの間、少なくとも6日間、約6日までの間、7日間、または約7日までの間生じ得る。種々の形態において、これらの方法は、さらに、細胞を溶解して、AAVを含む溶解物を形成することを包含し得るため、この方法は、ベンゾナーゼで細胞残屑を消化することをさらに含む。種々の形態において、これらの方法の核酸を含むAAVは、任意のAAV、例えばAAV2またはAAV9であり得る。いくつかの形態において、昆虫細胞は、Trichoplusia niBTI-Tn-5BI-4細胞、Spodoptera frugiperda Sf9細胞またはSpodoptera frugiperda Sf21細胞であり得る。いくつかの好ましい形態では、これらの方法における昆虫細胞は、Spodoptera frugiperda Sf9細胞である。

【0041】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、HIV感染、移植片対宿主病または癌のような疾患または医学的症状を治療する方法を包含する。種々の形態において、これらの方法は、治療を必要とする被験体に、治療的有効量の本発明の教示の核酸を投与することを包含し得る。種々の形態において、核酸は、ウィルス、例えばAAVにより含まれ得るし、それゆえ、この方法は、本発明の教示の核酸を含む治療的有効量のウィルス、例えばAAVを、治療を必要とする被験体に投与することを包含し得る。いくつかの好ましい実施形態では、AAVはAAV2またはAAV9、さらに好ましくはAAV2であり得る。種々の形態において、開示された方法により治療され得る癌は、前立腺癌、乳癌、脳腫瘍、子宮頸癌または鼻咽頭癌であり得るが、これらに限定されない。

【0042】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、HIV感染、移植片対宿主病または癌の治療のための本発明の教示の核酸またはウィルスの使用を包含する。

【0043】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、HIV感染、移植片対宿主病または癌の治療に用いるための本発明の教示の核酸またはウィルスを包含する。

【0044】

本発明の教示のいくつかの実施形態は、HIV感染、移植片対宿主病または癌の治療に用いるための本発明の教示の核酸またはウィルスの使用を包含する。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

【図 1】図 1 は、イントロンを含み、プロモーター、例えば CMV プロモーターと作動可能に連結される DT - A 遺伝子のような毒性遺伝子の遺伝子および転写地図を示す。

【図 2】図 2 は、ヒト成長ホルモンイントロンにより中断される DT - A 遺伝子または SV40 ラージ T 抗原イントロンにより中断され、GFP と枠内融合されるバルナーゼ遺伝子を保有する組換えバキュロウィルスを昆虫細胞中で産生する方法を示す。

【図 3】図 3 は、オープンリーディングフレーム内にイントロンを含むよう修飾された DT - A 遺伝子のような毒性遺伝子を保有する代表的 AAV ベクターの遺伝子および転写地図を示す。

【図 4】図 4 は、昆虫細胞中で DT - A 遺伝子のような毒性遺伝子を保有する AAV ベクターを産生する方法を示す。

10

【図 5】図 5 は、安定的に組み込まれた AAV 導入遺伝子を有する昆虫細胞におけるイントロンを含む DT - A 遺伝子のような毒性遺伝子を保有する AAV ベクターを産生する代替的方法を示す。Bac、Rep、Cap および ITR は、米国特許出願公開第 20090203071 号に記載されたものと同じである。

【図 6】図 6 ~ 11 は、本発明の教示の種々の形態において用いられ得る pFastBac シャトルプラスミドの地図を示す。各ベクターは、Tn7R および Tn7L 標的部位；アンピシリン耐性選択マーカー（AMP）；ゲンタマイシン耐性選択マーカー；コード配列内に存在しない hGH イントロン；AAV ITR；および SV40 pA 144 bp ポリアデニル化配列 CATGGCCCAACTTGTTTAATTGCAGCTTATAAT
GGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTTCCACAAATA
AAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA
ACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCT（配列番号 1）を含む。しかしながら、これらの構成成分は、独立して、本発明の教示の種々の実施形態を実行するために必要とされるわけではない。略号：DT - A、ジフテリア A 断片；CMV、サイトメガロウィルスプロモーター；hGH、ヒト成長ホルモンイントロン；Bar、バルナーゼ；GFP、緑色蛍光タンパク質；SV40、シミアンウィルス 40 ラージ T - 抗原イントロン；hTERT、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター。図 6 は、AAV ITR 間に、DT - A コード配列と作動可能に連結される CMV プロモーターを含む pFastBac シャトルプラスミドの地図を示す。この場合、ベクターは、Tn7R および Tn7L 標的部位；アンピシリン耐性選択マーカー；ゲンタマイシン耐性選択マーカー；コード配列内に存在しない hGH イントロン；AAV ITR（複数）；および SV40 pA 144 bp ポリアデニル化配列を含む。略号：DT - A、ジフテリア A 断片；CMV、サイトメガロウィルスプロモーター；hGH、ヒト成長ホルモンイントロン。

20

30

【図 7】図 7 は、AAV ITR 間に、ヒト成長ホルモンイントロンにより中断される DT - A コード配列と作動可能に連結される CMV プロモーターを含む pFastBac シャトルプラスミドを示す。この場合、ベクターは、Tn7R および Tn7L 標的部位；アンピシリン耐性選択マーカー；ゲンタマイシン耐性選択マーカー；コード配列内に存在しない hGH イントロン；AAV ITR（複数）；および SV40 pA 144 bp ポリアデニル化配列を含む。略号：DT - A、ジフテリア A 断片；CMV、サイトメガロウィルスプロモーター；hGH、ヒト成長ホルモンイントロン；SV40、シミアンウィルス 40 ラージ T 抗原イントロン。

40

【図 8】図 8 は、AAV ITR 間に、GFP と枠内融合されるバルナーゼコード配列と作動可能に連結される CMV プロモーターを含む pFastBac シャトルプラスミドの地図を示す。この場合、ベクターは、Tn7R および Tn7L 標的部位；アンピシリン耐性選択マーカー；ゲンタマイシン耐性選択マーカー；コード配列内に存在しない hGH イントロン；AAV ITR（複数）；および SV40 pA 144 bp ポリアデニル化配列を含む。略号：CMV、サイトメガロウィルスプロモーター；hGH、ヒト成長ホルモンイントロン；Bar、バルナーゼ；GFP、緑色蛍光タンパク質；SV40、シミアンウィルス 40 ラージ T - 抗原イントロン。

50

【図9】図9は、AAV ITR間に、SV40ラージT抗原イントロンにより中断され、GFPと枠内融合されるバルナーゼコード配列と作動可能に連結されるCMVプロモーターを含むpFastBacシャトルプラスミドの地図を示す。この場合、ベクターは、Tn7RおよびTn7L標的部

位；アンピシリン耐性選択マーカー；ゲンタマイシン耐性選択マーカー；コード配列内に存在しないhGHイントロン；AAV ITR（複数）；およびSV40pA 144bpポリアデニル化配列を含む。略号：CMV、サイトメガロウイルスプロモーター；hGH、ヒト成長ホルモンイントロン；Bar、バルナーゼ；GFP、緑色蛍光タンパク質；SV40、シミアンウイルス40ラージT-抗原イントロン。

【図10】図10は、AAV ITR間に、ヒト成長ホルモンイントロンにより中断されるDT-Aコード配列と作動可能に連結されるhTERTプロモーターを含むpFastBacシャトルプラスミドの地図を示す。この場合、ベクターは、Tn7RおよびTn7L標的部

位；アンピシリン耐性選択マーカー；ゲンタマイシン耐性選択マーカー；コード配列内に存在しないhGHイントロン；AAV ITR（複数）；およびSV40pA 144bpポリアデニル化配列を含む。略号：DT-A、ジフテリアA断片；hGH、ヒト成長ホルモンイントロン；SV40、シミアンウイルス40ラージT-抗原イントロン；hTERT、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター。

【図11】図11は、AAV ITR間に、GFPコード配列と作動可能に連結されるhTERTプロモーターを含むpFastBacシャトルプラスミドの地図を示す。この場合、ベクターは、Tn7RおよびTn7L標的部

位；アンピシリン耐性選択マーカー；ゲンタマイシン耐性選択マーカー；コード配列内に存在しないhGHイントロン；AAV ITR（複数）；およびSV40pA 144bpポリアデニル化配列を含む。略号：hGH、ヒト成長ホルモンイントロン；Bar、バルナーゼ；GFP、緑色蛍光タンパク質；SV40、シミアンウイルス40ラージT-抗原イントロン；hTERT、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター。

【図12】図12は、バクミドDNAでトランスフェクトした後のSf9細胞中での組換えバキュロウィルスの生成（図12A、図12C）、および感染によるSf9細胞中での組換えバキュロウィルスの増幅（図12B、図12D）を示す。

【図13】図13は、ヒト成長ホルモンイントロンにより中断されるDT-A遺伝子、およびSV40ラージT抗原イントロンにより中断され、GFPと枠内融合されるバルナーゼ遺伝子を保有する代表的組換えバキュロウィルスの遺伝子および転写地図を示す。

【図14】図14は、毒性遺伝子を保有する組換えバキュロウィルスで48時間形質導入することにより哺乳動物（ヒト胚性腎臓HEK293）細胞に及ぼす死滅作用を示す。

【図15】図15は、安定的に組み込まれたAAV導入遺伝子を保有する昆虫細胞における、ヒト成長ホルモンイントロンを含むDT-A遺伝子またはSV40ラージT抗原イントロンを含みGFP遺伝子と枠内融合されるバルナーゼ遺伝子を保有するAAVベクターの産生方法を示す。

【図16】図16は、ヒト成長ホルモンイントロンを含むDT-A遺伝子、またはSV40ラージT抗原イントロンを含み、GFPと枠内融合されるバルナーゼ遺伝子を保有する代表的AAVベクターの遺伝子および転写地図を示す。

【図17】図17は、哺乳動物細胞に及ぼすAAV2-CMV-inDTA(hGH)の死滅作用を示す。

【図18】図18は、毒性遺伝子を保有するAAVベクターで形質導入することによる哺乳動物細胞に及ぼす死滅作用を示す。

【図19】図19は、AAV2-hSURV-inDTA(hGH)による細胞死滅の代表的結果を示す。

【図20】図20は、種々の腫瘍特異的プロモーターの制御下でのDT-Aを保有するAAV2ベクターによる腫瘍細胞の細胞生存度検定を示す。細胞を96ウェルプレート上に播種し、4倍連続希釈でAAV2ベクターで4日間形質導入して、Cell Titer Glo 発光細胞生存度検定キットで細胞生存度を検定した。（a）HepG2細胞、（b）

10

20

30

40

50

) Hep3B細胞および(c)BE(2)-M17細胞。

【発明を実施するための形態】

【0046】

詳細な説明

本発明の教示は、イントロンを含む毒性遺伝子を開示するが、この場合、昆虫細胞中での転写後、イントロンはスプライスされず、したがって毒性遺伝子産物は昆虫細胞中に形成されない。このようなイントロン中断毒性遺伝子を含むベクターは、昆虫細胞中で増殖され得る。しかしながら、哺乳動物細胞、例えば癌細胞中への導入時に、毒性遺伝子の転写は成熟mRNAの形成を生じ、これは、宿主哺乳動物細胞を死滅させる毒性タンパク質に翻訳される。

10

【0047】

図1は、イントロンを含み、CMVプロモーターと作動可能に連結されるDT-A遺伝子の例示的遺伝子および転写地図を示す。哺乳動物細胞中への本発明の教示のイントロンを含むDT-A遺伝子の導入時に、遺伝子は転写され、イントロンのスプライシングにより成熟DT-A mRNAが哺乳動物細胞中に形成される。成熟RNAは、機能性DT-Aタンパク質に翻訳されて、細胞を死滅させる。DT-Aコード配列(GenBank寄託番号X00703)に基づいた遺伝子地図上の数字は、イントロンが挿入されるヌクレオチド位置を示す。CMVpr = サイトメガロウイルスプロモーター; DT-A = ジフテリア毒素A核酸配列; pA = ポリアデニル化シグナル。

【0048】

本明細書中に記載される方法および組成物は、当業者に周知の実験室技法を利用するが、それらは、例えば以下のような実験室マニュアルに見出され得る: Sambrook, J., 5, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001年; Methods In Molecular Biology, ed. Richard, Humana Press, New Jersey, 1995年; Spector, D. L., 5, Cells: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、1998年; および Harlow, E., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999年。昆虫細胞における非相同ポリペプチドの発現の方法、ならびに昆虫細胞中にベクターおよび核酸を導入する方法、および昆虫細胞培養を維持する方法を記載する付加的参考文献としては、例えば O'Reilly, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, Oxford Univ. Press, 1994年; Samulski, J. Vir. 63: 3822~3288, 1989年; Kajigaya, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 88: 4646~4650, 1991年; Ruffing, J. Vir. 66: 6922~6930, 1992年; Kimbauer, Vir. 219: 37~44, 1996年; Zhao, Vir. 272: 382~393, 2000年; および米国特許第6,204,059号(Samulski)が挙げられる。

20

30

40

【0049】

本明細書中に記載される実験は、さらにまた、以下の材料および方法を使用し得る。

【0050】

細胞培養: HEK293細胞を、100U/mlのペニシリンおよび100mg/mlのストレプトマイシンを含有し、10%ウシ胎仔血清(Sigma-Aldrich, セントルイス、ミズーリ州)を補足されたダルベッコの変法イーグル培地(Invitrogen, カールスバッド、カリフォルニア州)中に、37°Cで保持した。HepG2、H

50

ep3BおよびWI38細胞を、100U/mlのペニシリンおよび100mg/mlのストレプトマイシンを含有し、10%ウシ胎仔血清を補足されたEMEM完全増殖培地（アメリカ培養細胞系統保存機関（American Type Culture Collection）中に37で保持した。BE(2)M17細胞（アメリカ培養細胞系統保存機関）を、100U/mlのペニシリンおよび100mg/mlのストレプトマイシンを含有し、10%ウシ胎仔血清を補足された50%EMEM+50%F12完全増殖培地中に保持した。Spodoptera frugiperda Sf9細胞（Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州）を、100U/mlのペニシリンおよび100mg/mlのストレプトマイシン（Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州）を含有するESF921無血清培地（Expression Systems、ウッドランド、カリフォルニア州）中に28で保持した。

10

【0051】

組換えバキュロウィルスの生成および滴定：上記のように構築されたプラスミドを、DH10Bacコンピテント細胞を形質転換するために用いて、組換えバクミドを生成した。標的遺伝子を含有するバクミドを、わずかな修飾で、メーカーのプロトコール（Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州）に従って、組換えバキュロウィルスを生成するために用いた。要するに、2ngのプラスミドDNAを、20μlのDH10Bacコンピテント細胞を形質転換するために用いた。500μlのSOC培地中で37でのインキュベーションの4時間後、25および2.5μlの培養を選択プレート中に別々にプレート化し、48時間インキュベートして、白色/青色コロニーを生成させた。一般的には、3つの白色コロニーを各構築物のために選び出して、ミニプレップバクミドDNAを調製した。バクミドDNAをSf9細胞をトランスフェクトするために用いて、組換えバキュロウィルスを生成した。組換えバキュロウィルスを一回増幅して、実時間定量的PCR（qPCR）検定で力価を確定し、20コピーを1pfuに変換した経験的試験に基づいたプラーク形成単位（pfu）に変換した。

20

【0052】

AAVベクター産生、精製および滴定：AAVベクター産生、精製および滴定のための方法は、従来、記載されている（Chen, H., Mol Ther 16:924~930, 2008年）。要するに、Sf9細胞を、100U/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを含有するESF921無血清培地中で28で~1×10⁷細胞/mlに増殖させて、~5×10⁶細胞/mlに希釈した後、感染させた。二重感染を用いて、AAVベクターを産生した。5感染多重度（moi）のBac-AAV導入遺伝子および10moiのBac-inCap-inRepを用いて、28で3日間、Sf9細胞を感染させて、AAVベクターを産生した。感染の3日後に、3,000rpmで15分間の遠心分離により細胞ペレットを収集した。改質Sf9溶解緩衝液（50mMトリス-HCl、pH8.0、1%サルコシル、1%トリトンX-100、2mM MgCl₂）中で細胞ペレットを溶解し、細胞核酸（DNAおよびRNA）を、ベンゾナーゼ（Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ州）を用いて消化した。8,000rpmで20分間の遠心分離により細胞溶解物を清澄化して、上清を2回の超遠心分離に付して、AAVベクターを精製した。2PD-10脱塩カラム（GE HealthCare Bio-Science Corp、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）を用いて、0.001%プルロニックF-68（Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ州）を含有するPBS中にAAVベクターを緩衝液交換した。精製後、実時間定量的PCR（qPCR）法でAAVベクターを滴定した。

30

40

【0053】

細胞増殖検定：HEK293細胞を24ウェルプレート中で一晚増殖させて（1.5e+5細胞/ウェル）、AAV2ベクター（1.5e+9vg/ウェル）で48時間、形質導入した。次に、細胞をトリプシン処理して、細胞数を計数した。コンフルエントに達するまでさらに48時間、細胞を培養して、トリプシン処理し、細胞数を計数して、次に、大型容器中に拡げた。さらに72時間培養後、細胞をトリプシン処理し、計数した。生存

50

可能細胞を、トリパンブルー染色で計数した。

【0054】

細胞生存度検定：メーカーのプロトコール（Promega, Madison, WI）に従って、Cell Titer Glo 発光細胞生存度検定キットを用いて細胞生存度を試験した。要するに、細胞（WI38、HepG2、Hep3BおよびBE(2)M17）を 3×10^4 細胞/ウェルで一晩、96ウェルプレート上に播種して、4倍連続希釈で4日間、AAV2ベクターで形質導入した。試薬を再構成して、細胞に付加した。軌道回転式振盪器上で2分間混合して細胞を溶解した後、プレートを室温で10分間インキュベートして、次に、発光シグナルを記録した。

【0055】

本発明の記述、図面およびあらゆる添付の特許請求の範囲で用いる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、別記しない限り、同様に複数形を包含するよう意図される。

【0056】

本発明者らは、昆虫細胞において毒性遺伝子を含むベクター、ならびに毒性遺伝子を含むベクターを含み得る昆虫細胞培養物を産生するための組成物および方法を開発して来ており、ウィルス、例えばAAVを、非濃縮培地中で少なくとも 10^9 ウィルスゲノム/ml、少なくとも 10^{10} ウィルスゲノム/ml、少なくとも 10^{11} ウィルスゲノム/mlまたは少なくとも 10^{12} ウィルスゲノム/mlの力価に産生し得る。種々の形態において、細胞培養物は、非濃縮培地中に少なくとも 10^6 プラーク形成単位(PFU)/ml、少なくとも 10^7 PFU/ml、少なくとも 10^8 PFU/ml、少なくとも 10^9 PFU/mlまたは少なくとも 10^{10} PFU/mlの力価にバキュロウィルスを産生し得る。

【0057】

本発明の教示の種々の形態において用いられ得る昆虫細胞は、*in vitro*培養で増殖し得る任意の昆虫細胞であり得る。このような細胞は当業者に周知であり、例としては、Kost, T.A.ら、Nature Biotechnology 23(567~575, 2005年)ならびに本明細書中で引用される参考文献に開示されたものが挙げられるが、これに限定されない。

【実施例】

【0058】

以下の実施例は本発明の教示の種々の実施形態の例証であって、いかなる特許請求の範囲をも限定するものではない。本発明の教示の範囲を逸脱しない限り、多数の変形形態がなされ得る、と当業者は理解する。

【0059】

実施例1

この実施例は、DT-Aコード配列と上流で作動可能に連結されるCMVプロモーターを含むpFastBacシャトルプラスミド(Invitrogen Corporation、カールスバッド、カリフォルニア州)であるプラスミドpFB-CMV-DTAの構造および構築を例証する(図6)。

【0060】

このプラスミドを構築するために、DT-A遺伝子(GenBank寄託番号X00703)を含有するプラスミドを制限エンドヌクレアーゼEcoRIおよびBamHIで消化して、EcoRIおよびBamHI粘着末端を有するDT-Aコード配列を含有する断片を生成した。この断片をプラスミドpFB-AAV-CMV-SV40pAのEcoRIおよびBamHI部位にライゲーションして、pFB-CMV-DTAを作成した。DT-A遺伝子中にヒト成長ホルモンイントロンを挿入するために、PCR法を用いた。まず、ヌクレオチド番号1から103までの5'-DT-A配列と一緒に上流接合配列を、フォワードプライマー5'-GATTAATGATCACTAGTCGAG-3'(配列番号2)およびリバースプライマー

10

20

30

40

50

【化1】

5' -GGGCGCTTACCTTTTTGAATGGAATCTACA-3'

(配列番号3)(太字は、ヒト成長ホルモンイントロン配列を示す)を用いて増幅した。ヒト成長ホルモンイントロンを、フォワードプライマー

【化2】

5' -ATTCAAAAAGGTAAGCGCCCCTAAAATCCC-3'

(配列番号4)(太字は、ヒト成長ホルモンイントロン配列を示す)およびリバースプライマー

10

【化3】

5' -TTTTGTATACCTGGGGAGAAACCAGAGGGC-3'

(配列番号5)(イタリック体文字は、BstZ17Iに関する制限部位を示す;太字は、ヒト成長ホルモンイントロン配列を示す)を用いて増幅した。次に、2つのPCR断片を、フォワードプライマー5'-GATTATGATCACTAGTCGAG-3'(配列番号6)およびリバースプライマー5'-TTTTGTATACCTGGGGAGAAACCAGAGGGC-3'(配列番号7)を用いる二次PCR増幅を介して一緒に接合した。次いで、接合PCR断片を、制限エンドヌクレアーゼEcoRIおよびBstZ17Iで消化し、pFB-CMV-DTAのEcoRIおよびBstZ17I部位にライゲーションして、pFB-CMV-indTA(hGH)を作成し(図1、図7)、およびpFB-CMVtetO-DTA-p10-TetRのEcoRIおよびBstZ17I部位にライゲーションして、pFB-CMVtetO-indTA-p10-TetRを作成した。DNA配列解析により、発現カセットを立証した。

20

【0061】

この実施例で用いられるDT-A遺伝子(GenBank寄託番号X00703)のDNA配列を以下に示す:

gtgagcagaaactgtttgctcaatcttaataaggggcgct
tactggggataggggccccacccttcagcccatgcaggcgct
tgatgatgttgatctctctaaatcttttgatggaa
aacttttcttcgtaccacgggactaaacctggttatgtag
attccattcaaaaagggtatacaaaaagccaaaatctggtac
acaaggaaattatgacgatgattggaagggttttatagtt
accgacaataaatacgcacgtgcgggatactctgtagata
atgaaaaccctctcttggaaaaagctggaggcgtggtcaa
agtgacgtatccaggactgacgaagggtctcgcactaaaa
gtggataaatgccgaaactattagaagaaggtaggtttaa
gtctcactgaaaccgttgatggagcaagtcggaaacggaaaga
gtttatcaaaaagggtctgggtgatgggtgcttcgcgtgtagtg
ctcagcccttccccttcgctgaggggaggtcttagcgttgaaat
atatataataactgggaacaggcgaagaagcgttaagcgtagga
acttgagattaattttgaaaaccgctggaaaacgtggcca
gatgcgatgtatgagtataatggctcaagcctgtgtaggaa
atcgtgtcaggcgcagtaggtagctcattgtcattgcat
aaaatcttgatgggatgtcataagggaataaaaactaagaca
aagatagagctctttgaaaagagcattggccctatacaaaaata
aaaatgagcgaaggatcccaataaaaacagtaattgaggaaaa
agctaaaacaataccctagaaagaatttcattcaaacggcatt

30

40

50

g a g c a t c c t g a a t t g t c a g a a c t t a a a a c c g t t a c t g g g a
c c a a t c c t g t a t t c g c t g g g g c t a a c t a t g c g g c g t g g g c
a g t a a a c g t t g c g c a a g t t a t c g a t a g c g a a a c a g c t g a t
a a t t t g g a a a a g a c a a c t g c t g c t c t t t c g a t a c t t c c t g
g t a t c g g t a g c g t a a t g g g c a t t g c a g a c g g t g c c g t t c a
c c a c a a t a c a g a a g a g a t a g t g g c a c a a t c a a t a g c t t t a
t c g t c t t t a a t g g t t g c t c a a g c t a t t c c a t t g g t a g g a g
a g c t a g t t g a t a t t g g t t t c g c t g c a t a t a a t t t t g t a g a
g a g t a t t a t c a a t t t a t t t c a a g t a g t t c a t a a t t c g t a t
a a t c g t c c c g c g t a t t c t c c g g g g c a t a a a a c g c a a c c a t
t t c t t c a t g a c g g g t a t g c t g t c a g t t g g a a c a c t g t t g a
a g a t t c g a t a a t c c g a a c t g g t t t t c a a g g g g a g a g t g g g
c a c g a c a t a a a a a t t a c t g c t g a a a a t a c c c c g c t t c c a a
t c g c g g g t g t c c t a c t a c c g a c t a t t c c t g g a a a g c t g g a
c g t t a a t a a g t c c a a g a c t c a t a t t t c c g t a a a t g g t c g g
a a a a t a a g g a t g c g t t g c a g a g c t a t a g a c g g t g a t g t a a
c t t t t t g t c g c c c t a a a t c t c c t g t t t a t g t t g g t a a t g g
t g t g c a t g c g a a t c t t c a c g t g g c a t t t c a c a g a a g c a g c
t c g g a g a a a a t t c a t t c t a a t g a a a t t t c g t c g g a t t c c a
t a g g c g t t c t t g g g t a c c a g a a a a c a g t a g a t c a c a c c a a
g g t t a a t t c t a a g c t a t c g c t a t t t t t g a a a t c a a a a g c
t g a (配列番号 8) 。

10

20

【 0 0 6 2 】

hGHイントロンを含むDT-Aコード配列は、以下のとおりである：

A T G G G C G C T G A T G A T G T T G T T G A T T C T T C T A A A T C T T T T G
T G A T G G A A A A C T T T T C T T C G T A C C A C G G G A C T A A A C C T G G
T T A T G T A G A T T C C A T T C A A A A A G g t a a g c g c c c c t a a a a t
c c c t t t g g c a c a a t g t g t c c t g a g g g g a g a g g c a g c g a c c
t g t a g a t g g g a c g g g g g c a c t a a c c c t c a g g g t t t g g g g t
t c t g a a t g t g a g t a t c g c c a t g t a a g c c c a g t a t t t g g c c
a a t c t c a g a a a g c t c c t g g c t c c c t g g a g g a t g g a g a g a g
a a a a c a a a c a g c t c c t g g a g c a g g g a g a g t g c t g g c c t c
t t g c t c t c c g g c t c c c t c t g t t g c c c t c t g g t t t c t c c c c
a g G T A T A C A A A A G C C A A A A T C T G G T A C A C A A G G A A A T T A T
G A C G A T G A T T G G A A A G G G T T T T A T A G T A C C G A C A A T A A A T
A C G A C G C T G C G G G A T A C T C T G T A G A T A A T G A A A C C C G C T
C T C T G G A A A A G C T G G A G G C G T G G T C A A A G T G A C G T A T C C A
G G A C T G A C G A A G G T T C T C G C A C T A A A A G T G G A T A A T G C C G
A A A C T A T T A A G A A A G A G T T A G G T T T A A G T C T C A C T G A A C C
G T T G A T G G A G C A A G T C G G A A C G G A A G A G T T T A T C A A A A G G
T T C G G T G A T G G T G C T T C G C G T G T A G T G C T C A G C C T T C C C T
T C G C T G A G G G G A G T T C T A G C G T T G A A T A T A T T A A T A A C T G
G G A A C A G G C G A A A G C G T T A A G C G T A G A A C T T G A G A T T A A T
T T T G A A A C C C G T G G A A A A C G T G G C C A A G A T G C G A T G T A T G
A G T A T A T G G C T C A A G C C T G T G C A G G A A A T C G T G T C A G G C G
A T G A (配列番号 3 9) 。

30

40

【 0 0 6 3 】

実施例 2

この実施例は、プラスミド pFB - CMV tetO - DTA - p10 - TetR の構造および構築を例証する。pFB - CMV tetO - DTA - p10 - TetR を構築する

50

ために、制限エンドヌクレアーゼH i n d I I IおよびA v r I Iで消化することにより、p 1 0 - 駆動性T e t R発現カセットをプラスミドから放出した。放出断片を、制限エンドヌクレアーゼH i n d I I IおよびA v r I Iで消化させておいたプラスミドp F B - C M V - D T AのH i n d I I IおよびA v r I I粘着末端中に挿入した。

【 0 0 6 4 】

実施例 3

この実施例は、毒素遺伝子O R Fを中断する哺乳動物イントロンの挿入を例証する。

【 0 0 6 5 】

本発明の教示のいくつかの実施形態のベクターを生成するために、ヒト成長ホルモン (h G H) イントロンを、ヌクレオチド1 0 3および1 0 4間のD T - A O R F中に挿入した (出発コドンA T Gの最初の文字は、ヌクレオチド番号1を割り当てられる) 。S V 4 0 ラージT 抗原 (S V 4 0 L T) イントロンを、ヌクレオチド9および1 0間のバルナーゼO R F中に挿入した。イントロン中断を伴わないD T - AおよびバルナーゼO R Fを、対照として用いた。毒素コード配列は、イントロン中断を伴うものも伴わないものもすべて、p F a s t B a cシャトルプラスミド中でクローン化した。発現カセットの模式図を図3に示す。

10

【 0 0 6 6 】

図3は、A A V I T Rが隣接する毒素発現カセットを保有する代表的組換えバキュロウィルスの遺伝子および転写地図を示す。A A V r e pおよびc a p遺伝子を保有する第2の組換えバキュロウィルスで昆虫細胞を共感染させることにより、A A Vベクターを産生した。哺乳動物細胞中へのバキュロウィルスまたはA A Vベクターの導入時に、成熟毒素m R N Aがイントロンのスプライシングにより形成され、機能性タンパク質に翻訳されて、細胞を死滅させる。(a) h G Hイントロンを挿入され、種々の腫瘍特異的プロモーターの制御下のD T - A遺伝子。D T - Aコード配列に基づいた遺伝子地図上の数字 (G e n B a n k 寄託番号X 0 0 7 0 3) は、イントロンが挿入されるヌクレオチド位置を示す。(b) S V 4 0 L T 抗原イントロンにより挿入され、G F P 遺伝子と枠内融合されるバルナーゼ遺伝子。遺伝子地図上の数字は、バルナーゼコード配列に基づいており (G e n B a n k 寄託番号M 1 4 4 4 2) 、イントロンが挿入されるヌクレオチド位置を示す。(c) イントロン挿入を伴わないD T - A 遺伝子およびバルナーゼ遺伝子。

20

【 0 0 6 7 】

S V 4 0 L T 抗原イントロンを含むバルナーゼコード配列の詳細な配列を、以下に示す：

30

A T G G C A C A G g t a t t t g c t t c t t c c t t a a a t c c t g g t g t t g
a t g c a a t g t a c t g c a a a c a a t g g c c t g a g t g t g c a a a g a a
a a t g t c t g c t a a c t g c a t a t g c t t g c t g t g c t t a c t g a g g
a t g a a g c a t g a a a a t a g a a a a t t a t a c a g g a a a g a t c c a c
t t g t g t g g g t t g a t t g c t a c t g c t t c g a t t g c t t t a g a a t
g t g g t t t g g a c t t g a t c t t t g t g a a g g a a c c t t a c t t c t g
t g g t g t g a c a t a a t t g g a c a a a c t a c c t a c a g a g a t t t a a
a g c t c t a a g g t a a a t a t a a a a t t t t a a g t g t a t a a t g t g
t t a a a c t a c t g a t t c t a a t t g t t t g t g t a t t t t a g G T T A T
C A A C A C G T T T G A C G G G G T T G C G G A T T A T C T T C A G A C A T A T
C A T A A G C T A C C T G A T A A T T A C A T T A C A A A A T C A G A A G C A C
A A G C C C T C G G C T G G G T G G C A T C A A A A G G G A A C C T T G C A G A
C G T C G C T C C G G G G A A A A G C A T C G G C G G A G A C A T C T T C T C A
A A C A G G G A A G G C A A A C T C C A G G G C A A A A G C G G A C G A A C A T
G G C G T G A A G C G G A T A T T A A C T A T A C A T C A G G C T T C A G A A A
T T C A G A C C G G A T T C T T T A C T C A A G C G A C T G G C T G A T T T A C
A A A A C A A C G G A C C A T T A T C A G A C C T T T A C A A A A A T C A G A A
T G G T G A G C A A G G G C (配列番号 4 0) 。 G F P と融合される場合、付加配列は

40

50

、 - - - G F P - - - G A G C T G T A C A A G T A A (配列番号 4 1) である。

【 0 0 6 8 】

実施例 4

この実施例は、緑色蛍光タンパク質 (G F P) コード配列と枠内融合されたバルナーゼコード配列と上流で作動可能に連結される C M V プロモーターを含むプラスミド p F B - C M V - B a r - G F P の構造および構築を例証する (図 8) 。

【 0 0 6 9 】

p F B - C M V - B a r - G F P (図 8) を構築するために、バルナーゼコード配列 (G e n B a n k 寄託番号 M 1 4 4 4 2) を、フォワードプライマー

【化 4】

10

5' -CCCGAATTGCGCCACCATGGCACAGGTTATCAAC-3'

(配列番号 9) (イタリック体は、 E c o R I に関する制限部位を示す) およびリバースプライマー 5' - T G C T C A C C A T T C T G A T T T T T G T A A A G G T C T - 3' (配列番号 1 0) を用いて、プラスミド p F 1 A - T 7 (P r o m e g a , M a d i s o n W I) から増幅した。 G F P コード配列 (G e n B a n k 寄託番号 U 5 5 7 6 2) を、フォワードプライマー 5' - C A A A A A T C A G A A T G G T G A G C A A G G G C G A G G - 3' (配列番号 1 1) およびリバースプライマー

【化 5】

20

5' -GGGGGGGTACCTCATTACTTGTACAGCTCGTCC-3'

(配列番号 1 2) (イタリック体は、 K p n I に関する制限部位を示す) を用いて、 p F B - G F P プラスミドから増幅した。 2 回目の P C R を実施して、フォワードプライマー 5' - C C C G A A T T C G C C A C C A T G G C A C A G G T T A T C A A C - 3' (配列番号 1 3) およびリバースプライマー 5' - G G G G G G T A C C T C A T T A C T T G T A C A G C T C G T C C - 3' (配列番号 1 4) を一緒に用いて、バルナーゼコード配列を G F P コード配列と融合した。融合 P C R 断片を、制限エンドヌクレアーゼ E c o R I および K p n I で消化して、 p F B - C M V - i n D T A (h G H) の E c o R I および K p n I 部位にライゲーションして、 D T - A 配列を取り替えて、 p F B - C M V - B a r - G F P を作成した。

【 0 0 7 0 】

この実施例で用いられるバルナーゼ遺伝子の D N A 配列 (G e n B a n k 寄託番号 M 1 4 4 4 2) は、以下のとおりである :

c t g g a a a a c g t c a c a t t g c t t c c g c a t a t c g g g t c a g c a a
c g g c t a a a a t c c g c t t g a a t a t g t t c a c a c a a g c c g c t c a
a a a c a t g a t t g a c g c c g t a t a c g g a a g a a c g c c g a a a a a c
c t t a c t a a g g a a t t t c a a t a a g a a g a a a a a t c c c g g t t g g
t t c a g c c g g g g t t t a t t t t t c g c t a g a t a a a a a g t a c t a t
t t t t a a a t t c t t t c t a t t c c t t t c t t t c g t t g c t g a t a c a
a t g a a a a g g a a t c a g c t t c a c a t g a t g a a a a t g g g a g g t a
t t g c t t t g a a a a a a c g a t t a t c g t g g a t t t c c g t t t g t t t
a c t g g t g c t t g t c t c c g c g g c g g g a t g c t g t t t t c a a c a
g c t g c c a a a a c g g a a a c a t c t t c t c a c a a g g c a c a c a c a g
a a g c a c a g g t t a t c a a c a c g t t t g a c g g g g t t g c g g a t t a
t c t t c a g a c a t a t c a t a a g c t a c c t g a t a a t t a c a t t a c a
a a a t c a g a a g c a c a a g c c c t c g g c t g g g t g g c a t c a a a a g
g g a a c c t t g c a g a c g t c g c t c c g g g g a a a a g c a t c g g c g g
a g a c a t c t t c t c a a a c a g g g a a g g c a a a c t c c c g g g c a a a

30

40

50

a g c g g a c g a a c a t g g c g t g a a g c g g a t a t t a a c t a t a c a t
c a g g c t t c a g a a a t t c a g a c c g g a t t c t t t a c t c a a g c g a
c t g g c t g a t t t a c a a a a c a a c g g a c c a t t a t c a g a c c t t t
a c a a a a a t c a g a t a a c g a a a a a a c g g c t t c c c t g c g g a g
g c c g t t t t t t t c a g c t t t a c a t a a a g t g t g t a a t a a a t t t
t t c t t c a a a c t c t g a t c g g t c a a t t t c a c t t t (配列番号 15)

【 0 0 7 1 】

この実施例で用いられる GFP 遺伝子の DNA 配列を以下に示す：

t a g t t a t t a a t a g t a a t c a a t t a c g g g g t c a t t a g t t c a t 10
a g c c c a t a t a t g g a g t t c c g c g t t a c a t a a c t t a c g g t a a
a t g g c c c g c c t g g c t g a c c g c c c a a c g a c c c c g c c c a t t
g a c g t c a a t a a t g a c g t a t g t t c c c a t a g t a a c g c c a a t a
g g g a c t t t c c a t t g a c g t c a a t g g g t g g a g t a t t t a c g g t
a a a c t g c c c a c t t g g c a g t a c a t c a a g t g t a t c a t a t g c c
a a g t a c g c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g g t a a a t g g c c c
g c c t g g c a t t a t g c c c a g t a c a t g a c c t t a t g g g a c t t t c
c t a c t t g g c a g t a c a t c t a c g t a t t a g t c a t c g c t a t t a c
c a t g g t g a t g c g g t t t t g g c a g t a c a t c a a t g g g c g t g g a
t a g c g g t t t g a c t c a c g g g g a t t t c c a a g t c t c c a c c c a 20
t t g a c g t c a a t g g g a g t t t g t t t t g g c a c c a a a a t c a a c g
g g a c t t t c c a a a a t g t c g t a a c a a c t c c g c c c c a t t g a c g
c a a a t g g g c g g t a g g c g t g t a c g g t g g g a g g t c t a t a t a a
g c a g a g c t g g t t t a g t g a a c c g t c a g a t c c g c t a g c g c t a
c c g g a c t c a g a t c t c g a g c t c a a g c t t c g a a t t c t g c a g t
c g a c g g t a c c g c g g g c c c g g g a t c c a c c g g t c g c c a c c a t
g g t g a g c a a g g g c g a g g a g c t g t t c a c c g g g g t g g t g c c c
a t c c t g g t c g a g c t g g a c g g c g a c g t a a a c g g c c a c a a g t
t c a g c g t g t c c g g c g a g g g c g a g g g c g a t g c c a c c t a c g g
c a a g c t g a c c c t g a a g t t c a t c t g c a c c a c c g g c a a g c t g 30
c c c g t g c c c t g g c c c a c c c t c g t g a c c a c c c t g a c c t a c g
g c g t g c a g t g c t t c a g c c g c t a c c c c g a c c a c a t g a a g c a
g c a c g a c t t c t t c a a g t c c g c c a t g c c c g a a g g c t a c g t c
c a g g a g c g c a c c a t c t t c t t c a a g g a c g a c g g c a a c t a c a
a g a c c c g c g c c g a g g t g a a g t t c g a g g g c g a c a c c c t g g t
g a a c c g c a t c g a g c t g a a g g g c a t c g a c t t c a a g g a g g a c
g g c a a c a t c c t g g g g c a c a a g c t g g a g t a c a a c t a c a a c a
g c c a c a a c g t c t a t a t c a t g g c c g a c a a g c a g a a g a a c g g
c a t c a a g g t g a a c t t c a a g a t c c g c c a c a a c a t c g a g g a c
g g c a g c g t g c a g c t c g c c g a c c a c t a c c a g c a g a a c a c c c 40
c c a t c g g c g a c g g c c c c g t g c t g c c c g a c a a c c a c t a
c c t g a g c a c c c a g t c c g c c c t g a g c a a a g a c c c c a a c g a g
a a g c g c g a t c a c a t g g t c c t g c t g g a g t t c g t g a c c g c c g
c c g g g a t c a c t c t c g g c a t g g a c g a g c t g t a c a a g t a a a g
c g g c c g c g a c t c t a g a t c a t a a t c a g c c a t a c c a c a t t t g
t a g a g g t t t t a c t t g c t t t a a a a a c c t c c c a c a c c t c c c
c c t g a a c c t g a a a c a t a a a a t g a a t g c a a t t g t t g t t g t t
a a c t t g t t t a t t g c a g c t t a t a a t g g t t a c a a a t a a a g c a
a t a g c a t c a c a a a t t t c a c a a a t a a a g c a t t t t t t c a c t
g c a t t c t a g t t g t g g t t t g t c c a a a c t c a t c a a t g t a t c t 50

t a a g g c g t a a a t t g t a a g c g t t a a t a t t t t g t t a a a a t t c
g c g t t a a a t t t t t g t t a a a t c a g c t c a t t t t t a a c c a a t
a g g c c g a a a t c g g c a a a a t c c c t t a t a a a t c a a a a g a a t a
g a c c g a g a t a g g g t t g a g t g t t g t t c c a g t t t g g a a c a a g
a g t c c a c t a t t a a a g a a c g t g g a c t c c a a c g t c a a a g g g c
g a a a a a c c g t c t a t c a g g g c g a t g g c c c a c t a c g t g a a c c
a t c a c c c t a a t c a a g t t t t t t g g g g t c g a g g t g c c g t a a a
g c a c t a a a t c g g a a c c c t a a a g g g a g c c c c c g a t t t a g a g
c t t g a c g g g g a a a g c c g g c g a a c g t g g c g a g a a a g g a a g g
g a a g a a a g c g a a a g g a g c g g g c g c t a g g g c g c t g g c a a g t
g t a g c g g t c a c g c t g c g c g t a a c c a c c a c c c g c c g c g c
t t a a t g c g c c g c t a c a g g g c g c g t c a g g t g g c a c t t t t c g
g g g a a a t g t g c g c g g a a c c c c t a t t t g t t t a t t t t t c t a a
a t a c a t t t c a a a t a t g t a t c c g c t c a t g a g a c a a t a a c c c t
g a t a a a t g c t t c a a t a a t a t t g a a a a g g a a g a g t c c t g a
g g c g g a a a g a a c c a g c t g t g g a a t g t g t g t c a g t t a g g g t
g t g g a a a g t c c c c a g g c t c c c a g c a g g c a g a a g t a t g c a
a a g c a t g c a t c t c a a t t a g t c a g c a a c c a g g t g t g g a a a g
t c c c c a g g c t c c c c a g c a g g c a g a a g t a t g c a a a g c a t g c
a t c t c a a t t a g t c a g c a a c c a t a g t c c c g c c c c t a a c t c c
g c c c a t c c c g c c c c t a a c t c c g c c c a g t t c c g c c c a t t c t
c c g c c c c a t g g c t g a c t a a t t t t t t t a t t t a t g c a g a g g
c c g a g g c c g c c t c g g c c t c t g a g c t a t t c c a g a a g t a g t g
a g g a g g c t t t t t t g g a g g c c t a g g c t t t t g c a a a g a t c g a
t c a a g a g a c a g g a t g a g g a t c g t t t c g c a t g a t t g a a c a a
g a t g g a t t g c a c g c a g g t t c t c c g g c c g c t t g g g t g g a g a
g g c t a t t c g g c t a t g a c t g g g c a c a a c a g a c a a t c g g c t g
c t c t g a t g c c g c c g t g t t c c g g c t g t c a g c g c a g g g g c g c
c c g g t t c t t t t t g t c a a g a c c g a c c t g t c c g g t g c c c t g a
a t g a a c t g c a a g a c g a g g c a g c g c g g c t a t c g t g g c t g g c
c a c g a c g g g c g t t c c t t g c g c a g c t g t g c t c g a c g t t g t c
a c t g a a g c g g g a a g g g a c t g g c t g c t a t t g g g c g a a g t g c
c g g g g c a g g a t c t c c t g t c a t c t c a c c t t g c t c c t g c c g a
g a a a g t a t c c a t c a t g g c t g a t g c a a t g c g g c g g c t g c a t
a c g c t t g a t c c g g c t a c c t g c c c a t t c g a c c a c c a a g c g a
a a c a t c g c a t c g a g c g a g c a c g t a c t c g g a t g g a a g c c g g
t c t t g t c g a t c a g g a t g a t c t g g a c g a a g a g c a t c a g g g g
c t c g c g c c a g c c g a a c t g t t c g c c a g g c t c a a g g c g a g c a
t g c c c g a c g g c g a g g a t c t c g t c g t g a c c c a t g g c g a t g c
c t g c t t g c c g a a t a t c a t g g t g g a a a a t g g c c g c t t t t c t
g g a t t c a t c g a c t g t g g c c g g c t g g g t g t g g c g g a c c g c t
a t c a g g a c a t a g c g t t g g c t a c c c g t g a t a t t g c t g a a g a
g c t t g g c g g c g a a t g g g c t g a c c g c t t c c t c g t g c t t t a c
g g t a t c g c c g c t c c c g a t t c g c a g c g c a t c g c c t t c t a t c
g c c t t c t t g a c g a g t t c t t c t g a g c g g g a c t c t g g g g t t c
g a a a t g a c c g a c c a a g c g a c g c c c a a c c t g c c a t c a c g a g
a t t t c g a t t c c a c c g c c g c c t t c t a t g a a a g g t t g g g c t t
c g g a a t c g t t t t c c g g g a c g c c g g c t g g a t g a t c c t c a g
c g c g g g g a t c t c a t g c t g g a g t t c t t c g c c c a c c c t a g g g
g g a g g c t a a c t g a a a c a c g g a a g g a g a c a a t a c c g g a a g g

10

20

30

40

50

a a c c c g c g c t a t g a c g g c a a t a a a a g a c a g a a t a a a a c g
c a c g g t g t t g g g t c g t t t g t t c a t a a a c g c g g g g t t c g g t
c c c a g g g c t g g c a c t c t g t c g a t a c c c c a c c g a g a c c c c a
t t g g g g c c a a t a c g c c c g c g t t t c t t c c t t t t c c c c a c c c
c a c c c c c c a a g t t c g g g t g a a g g c c c a g g g c t c g c a g c c a
a c g t c g g g g c g g c a g g c c c t g c c a t a g c c t c a g g t t a c t c
a t a t a t a c t t t a g a t t g a t t t a a a a c t t c a t t t t t a a t t t
a a a a g g a t c t a g g t g a a g a t c c t t t t t g a t a a t c t c a t g a
c c a a a a t c c c t t a a c g t g a g t t t t c g t t c c a c t g a g c g t c
a g a c c c c g t a g a a a g a t c a a a g g a t c t t c t t g a g a t c c t
t t t t t t c t g c g c g t a a t c t g c t g c t t g c a a a c a a a a a a c
c a c c g c t a c c a g c g g t g g t t t g t t t g c c g g a t c a a g a g c t
a c c a a c t c t t t t t c c g a a g g t a a c t g g c t t c a g c a g a g c g
c a g a t a c c a a a t a c t g t c c t t c t a g t g t a g c c g t a g t t a g
g c c a c c a c t t c a a g a a c t c t g t a g c a c c g c c t a c a t a c c t
c g c t c t g c t a a t c c t g t t a c c a g t g g c t g c t g c c a g t g g c
g a t a a g t c g t g t c t t a c c g g g t t g g a c t c a a g a c g a t a g t
t a c c g g a t a a g g c g c a g c g g t c g g g c t g a a c g g g g g g t t c
g t g c a c a c a g c c c a g c t t g g a g c g a a c g a c c t a c a c c g a a
c t g a g a t a c c t a c a g c g t g a g c t a t g a g a a a g c g c c a c g c
t t c c c g a a g g g a g a a a g g c g g a c a g g t a t c c g g t a a g c g g
c a g g g t c g g a a c a g g a g a g c g c a c g a g g g a g c t t c c a g g g
g g a a a c g c c t g g t a t c t t t a t a g t c c t g t c g g g t t t c g c c
a c c t c t g a c t t g a g c g t c g a t t t t t g t g a t g c t c g t c a g g
g g g g c g g a g c c t a t g g a a a a a c g c c a g c a a c g c g g c c t t t
t t a c g g t t c c t g g c c t t t t g c t g g c c t t t g c t c a c a t g t
t c t t t c c t g c g t t a t c c c c t g a t t c t g t g g a t a a c c g t a t
t a c c g c c a t g c a t (配列番号 1 6) 。

10

20

【 0 0 7 2 】

実施例 5

この実施例は、挿入SV40ラージT抗原イントロン(SV40)を有し、GFPコード配列と枠内融合されるバルナーゼコード配列と上流で作動可能に連結されるCMVプロモーターを含むプラスミドpFB-CMV-InBar(SV40)-GFPの構造および構築を例証する(図9)。

30

【 0 0 7 3 】

バルナーゼ中にSV40ラージT抗原イントロンを挿入し、pFB-CMV-inBar(SV40)-GFPを構築するために(図9)、PCR法を用いた。バルナーゼコード配列の5'-部分を、全長SV40ラージT抗原イントロンと一緒に、フォワードプライマー

【化6】

5' -CCCCGAATTTCGCCACCATGGCACAGGTATTTGCTTCTTCCTTAAA-3'

40

(配列番号17)(イタリック体は、EcoRI制限部位を示す;太字は、SV40ラージT抗原イントロン配列を示す)およびリバースプライマー

【化7】

5' -TGTTGATAACCTAAAATACACAAACAATTA-3'

(配列番号18)(太字は、SV40ラージT抗原イントロン配列を示す)を用いて、SV40プラスミド(pUCSV40-B2E、ATCC、マナッサス、バージニア州)か

50

らPCR増幅した。バルナーゼコード配列の3'-部分を、GFPコード配列と一緒に、
フォワードプライマー

【化8】

5' -TGTATTTTAGGTTATCAACACGTTTGACGG-3'

(配列番号19)(太字は、SV40ラージT抗原イントロン配列を示す)、およびリバー
スプライマー5'-GGGGGGTACCTCACTTGTACAGCTCGT
CC-3'(配列番号20)を用いて、鋳型としてpFB-CMV-Bar-GFPを伴
って、PCR増幅した。二次PCRを実施して、これら2つのPCR断片を、フォワード
プライマー5'-CCCCGAATTCGCCACCATGGCACAGGTATTTG
CTTCTTCTTAAA-3'(配列番号21)およびリバープライマー5'-G
GGGGGTACCTCACTTGTACAGCTCGTCC-3'(配列番号2
2)と一緒に接合した。接合PCR断片を、制限エンドヌクレアーゼEcoRIおよびKp
nIで消化して、pFB-CMV-indTA(hGH)のEcoRIおよびKpnI
位にライゲーションして、DTA配列を取り替えて、pFB-CMV-inBar(SV
40)-GFPを作成した。

【0074】

実施例6

この実施例は、挿入ヒト成長ホルモンイントロンを有するDT-Aコード配列と上流で
作動可能に連結されるヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター(hTERT)を含むプ
ラスミドpFB-hTERT-indTA(hGH)の構造および構築を例証する(図1
0)。

【0075】

pFB-hTERT-indTA(hGH)(図10)を構築するために、hTERT
を、フォワードプライマー

【化9】

5' -GCGCACGCGTATCATCAGCTTTTCAAAGAC-3'

(配列番号23)(イタリック体は、MluIに関する制限部位を示す)およびリバー
プライマー

【化10】

5' -CGCGACCGGTCGCTGCCTGAAACTCGCGCC-3'

(配列番号24)(イタリック体は、AgeIに関する制限部位を示す)を用いて、ヒト
胚性腎臓HEK293細胞から精製されたゲノムDNAから、PCRを用いて増幅した。
PCR断片をMluIおよびAgeIで消化し、pFB-CMV-indTA(hGH)
のMluIおよびAgeI部位にライゲーションして、pFB-hTERT-indTA
(hGH)を作成した。

【0076】

実施例7

この実施例は、緑色蛍光タンパク質(GFP)コード配列と上流で作動可能に連結され
るヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター(hTERT)を含むプラスミドpFB-h
TERT-GFP(hGH)の構造および構築を例証する(図11)。

【0077】

pFB-hTERT-GFPを構築するために、pFB-CMV-GFPを制限エンド
ヌクレアーゼKpnIおよびAgeIで消化して、CMVプロモーターを除去し、pFB
-hTERT-indTA(hGH)も、同一制限酵素で消化して、hTERTプロモ
ーターを含む断片を放出した。この断片を、消化pFB-CMV-GFP(CMBプロモ
ーターなし)中にライゲーションして、pFB-hTERT-GFPsを生成した。

【0078】

10

20

30

40

50

実施例 8

この実施例は、組換えバキュロウィルスの産生を例証する。

【0079】

これらの実験において、イントロン中断を伴うかまたは伴わない毒素コード配列を、実施例3に記載したように pFastBac シャトルプラスミド中でクローン化した。発現カセットの模式図を、図3に示す。その結果生じた pFastBac プラスミドを用いて、DH10Bac コンピテント細菌を形質転換して、白色コロニーからのバクミドDNAを調製した。バクミドDNAを用いて、上記と同様に組換えバキュロウィルスを産生した。結果は、図12に図示したように、組換えバキュロウィルスはイントロン挿入を伴わないDT-AまたはバルナーゼORFを含有するバクミドDNAから生成され得なかったが、一方、正常レベルの組換えバキュロウィルスが生成され、哺乳動物イントロンにより中断されるDT-AまたはバルナーゼORFを含有するバクミドDNAから増幅された、ということを示す。イントロン中断を伴わない毒素遺伝子を含有するバクミドDNAを有する組換えバキュロウィルスを生成できなかったことは、毒素遺伝子がCMVプロモーター（昆虫プロモーターでない）の制御下にあった場合でも、DT-Aまたはバルナーゼが昆虫細胞に対して致死性である、ということを実証している。他方で、イントロン中断毒素遺伝子を含有するバクミドDNAからの組換えバキュロウィルスの生成および増幅が首尾よくなされたことは、hGHおよびSV40LTイントロンがともに、昆虫細胞中でスプライスされず、したがって、DT-AおよびバルナーゼORFの中断のために、毒素が産生されなかった、ということを示している。

【0080】

図12は、バクミドDNAでのトランスフェクションによる Sf9 細胞中での組換えバキュロウィルスの生成 (A & C)、および感染による Sf9 細胞中での組換えバキュロウィルスの増幅 (B & D) を示す。

【0081】

これらの実験では、バキュロウィルス力価を、トランスフェクションの4日後、または増幅の3日後に採取した上清から決定した。CMV-inDTA (hGH) (CMVプロモーターの制御下でヒト成長ホルモンイントロン (hGH) を含むDT-Aコード配列を保有する組換えバキュロウィルス) ; CMV-GFP (CMVプロモーターの制御下でGFPコード配列を保有する組換えバキュロウィルス) ; CMV-Bar-GFP (GFPと枠内融合されるバルナーゼコード配列を保有する組換えバキュロウィルス) ; CMV-inBar (SV40) - GFP (SV40ラージT抗原イントロンを含み、GFPコード配列と枠内融合されるバルナーゼコード配列を保有する組換えバキュロウィルス) ; CMV-inDTA (hGH) (CMVプロモーターの制御下でヒト成長ホルモンイントロン (hGH) を含むDT-Aコード配列を保有する組換えバキュロウィルス) ; CMV-GFP (CMVプロモーターの制御下でGFPコード配列を保有する組換えバキュロウィルス) ; CMV-Bar-GFP (GFPと枠内融合されるバルナーゼコード配列を保有する組換えバキュロウィルス) ; CMV-inBar (SV40) - GFP (SV40ラージT抗原イントロンを含み、GFPコード配列と枠内融合されるバルナーゼコード配列を保有する組換えバキュロウィルス)。CMV-inBar (SV40) - GFPでトランスフェクション後、約 4.4×10^6 pfu/ml の、または pCMV-inDTA (hGH) でトランスフェクション後、約 9×10^7 pfu/ml の力価に昆虫細胞中で組換えバキュロウィルスを産生すること、および CMV-inBar (SV40) - GFP で感染後に約 6.1×10^8 pfu/ml の、あるいは CMV-inDTA (hGH) または CMV-GFP で感染後に約 1.2×10^9 pfu/ml の力価に昆虫細胞中で組換えバキュロウィルスを産生することに留意されたい。

【0082】

実施例 9

この実施例は、図2に示したように、イントロンを含むDT-Aコード配列を保有する組換えバキュロウィルスの生成を実証する。

【 0 0 8 3 】

これらの実験では、メーカーのプロトコル (Invitrogen) に従って、組換えバキュロウイルスを生成した。要するに、プラスミドを TE 緩衝液中に $1 \text{ ng} / \mu\text{l}$ にそれぞれ希釈して、各希釈プラスミド $2 \mu\text{l}$ を DH10Bac コンピテント細菌中で形質転換した。48 時間インキュベーション後、白色コロニーを選び出して、ミニプレップバクミド DNA を調製した。ミニプレップバクミド DNA を、4 日間、Sf9 細胞中にそれぞれトランスフェクトした。イントロンを含む DT - A 遺伝子を保有するバクミドでトランスフェクトされた Sf9 細胞に関して、細胞変性効果 (CPE) を観察したが、一方、Tetriプレッサー発現カセットが存在するか否かに関係なく、DT - A 遺伝子を保有するバクミドでトランスフェクトされた Sf9 細胞に関しては、CPE は観察されなかった。これらの結果は、DT - A 毒性遺伝子を保有するバクミドでトランスフェクトされた任意の細胞が絶滅させられ、組換えバキュロウイルスは生成されず、CPE は観察されなかった、ということを示している。トランスフェクト化 Sf9 細胞からの上清をバキュロウイルスストックとして採取し、バキュロウイルス gp64 遺伝子に対応するプライマーを用いて、定量的実時間 PCR でバキュロウイルス力価を確定した。見かけの CPE を示すものからの組換えバキュロウイルスを増幅し、力価を確定した。力価を確定するために、組換えバキュロウイルスをそれぞれ $2 \times \text{TE}$ 緩衝液中に希釈し、 95°C で 30 分間加熱して、ウイルス粒子を破壊し、ウイルス DNA 分子を放出した。室温に下げたのち、バキュロウイルス試料を QPCR 希釈緩衝液で希釈し、フォワードプライマー 5' - C C C T C T G T G T A C T T G G C T C T A A C G - 3' (配列番号 25) およびバースプライマー 5' - C G G T G A A A C G C A A A G T C G A G C A C C G - 3' (配列番号 26) を用いて、QPCR 法で検定した。20 の因数で割る (経験的に決定) ことにより、QPCR 力価 (ゲノムコピー数 / ml) をプラーク形成単位 (pfu / ml) に変換した。バキュロウイルス力価を、以下の表 1 および図 12 に示す。ヒト成長ホルモンイントロンを含む DT - A 遺伝子または SV40 ラージ T 抗原イントロンを含むバルナーゼ遺伝子を保有する組換えバキュロウイルスは高力価に生成され得ないが、一方、イントロン挿入を伴わない DT - A 遺伝子またはバルナーゼ遺伝子を保有するバクミドからは、組換えバキュロウイルスは生成されなかった、ということの結果は実証している。イントロン中断毒素 ORF を含有する組換えバキュロウイルスが首尾よく生成および増幅されたことは、哺乳動物イントロンが昆虫細胞中でスプライスされなかった、ということを示している。

【 0 0 8 4 】

それは昆虫プロモーターではないが、しかし CMV プロモーターは昆虫細胞中で何らかの活性を有し、低レベルのヘマグルチニン発現を駆動し得る (He, F, ら、BMC Microbiol 8 : 238, 2008 年)。この低レベルのプロモーター活性は、DT - A の何らかの基礎発現を駆動し得て、これが、毒素を発現する任意の昆虫細胞を死滅させた。CMV プロモーターに対してアンチセンス方向で $10 \times \text{P}$ 部位と隣接した DT - A ORF を含有するバクミド DNA からは、組換えバキュロウイルスは産生されなかったが、これは、 $10 \times \text{P}$ 部位の潜在性プロモーター TATA 様配列でさえ、昆虫細胞を死滅させ得る微量の DT - A 発現を駆動し得た、ということを示している。同じ現象はバルナーゼ遺伝子に関しても観察されたが、この場合、組換えバキュロウイルスは、その ORF が SV40 LT 抗原イントロンにより中断された場合にのみ生成され得ており (図 12c)、これは、バルナーゼが昆虫細胞に対しても毒性であることを示している。他方で、イントロン中断 DT - A またはバルナーゼ - GFP 遺伝子を保有する組換えバキュロウイルスが首尾よく生成されることは、hGH および SV40 LT 抗原イントロンが昆虫細胞中でスプライスされず、DT - A およびバルナーゼ - GFP 発現がこのイントロン中断により全体的に無効にされた、ということを示している。

表 1 QPCR 法により確定される組換えバキュロウイルスの力価

【表 1】

試料	説明	力価 (pfu/ml)
1	陰性対照：Sf9細胞培養物から採取した上清	1.3E+5
2	Bac-CMV-DTA：トランスフェクションの4日後に採取した上清	1.9E+5
3	Bac-CMVtetO-DTA-p10-TetR：トランスフェクションの4日後に採取した上清	8.3E+4
4	Bac-CMV-inDTA：トランスフェクションの4日後に採取した上清	9.5E+7
5	Bac-CMVtetO-inDTA-p10-TetR：トランスフェクションの4日後に採取した上清	1.1E+8
6	Bac-CMV-inDTA：1回の増幅後に採取した上清	1.2E+9
7	Bac-CMVtetO-inDTA-p10-TetR：1回の増幅後に採取した上清	9.7E+8
8	Bac-CMV-GFP (対照)：増幅1回	1.2E+9

10

【0085】

実施例 10

この実施例は、組換えバキュロウイルスにより保有される毒素ORFからのイントロンのスプライシング、ならびに哺乳動物細胞中での毒素タンパク質の発現を例証する。

20

【0086】

毒素ORF中に挿入されたイントロンが哺乳動物細胞中でスプライスされ得たか否かを確定するために、イントロン中断DT-Aまたはバルナーゼ遺伝子を保有する組換えバキュロウイルスを用いて、HEK293細胞中に形質導入した。細胞形態学を調べ、形質導入の2日後に撮影した。

【0087】

これらの実験では、コンフルエントになるまで、10% FBS、および100 U/mlのペニシリンおよび100 µg/mlのストレプトマイシン (Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州) を補足したDMEM培地中で、ヒトHEK293細胞を培養した。次いで、細胞をトリプシン処理し、無血清培地中で1.5e+5細胞/ウェルで24-ウェルプレート中にプレート化した。一晚増殖後、培地を除去し、250 µl培地+250 µl組換えバキュロウイルス、または400 µl培地+100 µl組換えバキュロウイルスに取り替えた。Sf9細胞培地を用いた以外は、同様にして陰性対照を実施した。

30

【0088】

図13は、ヒト成長ホルモンイントロンを含むDT-A遺伝子、およびSV40ラージT抗原イントロンを含み、GFPと枠内融合されるバルナーゼ遺伝子を保有する代表的組換えバキュロウイルスの遺伝子および転写地図を示す。哺乳動物細胞中への導入時に、成熟DT-A mRNAまたはBar-GFP mRNAがイントロンのスプライシングにより形成され、完全機能性DT-Aまたはバルナーゼタンパク質に翻訳されて、細胞を死滅させる。DT-Aおよびバルナーゼコード配列に基づいた遺伝子地図上の数字は、イントロンが挿入されたヌクレオチド位置を示す。

40

【0089】

これらの実験において、哺乳動物細胞中へのイントロンを含むバルナーゼ遺伝子の導入とさらに3日間のインキュベーションの後、顕微鏡下で細胞を調べ、細胞のCPEを記録した。結果を、表2および図14に示す。図14は、毒性遺伝子を保有する組換えバキュロウイルスで48時間形質導入することにより哺乳動物(ヒト胚性腎臓HEK293)細胞に及ぼす死滅作用を示す。A、BおよびC：タングステン光源を用いて明視野照明下で

50

20倍対物レンズを用いて撮影した代表的視野。D：GFP傾向に適した励起および透過波長でフィルタ組合せを用いて、蛍光照明により画像処理した、Cと同一の視野。A：Bac-CMV-inDTA(hGH)；B：Bac-CMV-inBar(SV40)-GFP；C：Bac-CMV-GFP；D：GFP発現を示すCと同一画像。図14における結果は、イントロン中断DT-Aまたはバルナーゼ遺伝子を保有する組換えバキュロウイルスはHEK293細胞の断片化(アポトーシスを受けている細胞の徴候)を引き起こしたが、一方、GFP遺伝子を保有する組換えバキュロウイルスはこの断片化を引き起こさなかった、ということを示す。Bar-GFPを保有するバキュロウイルスで形質導入された293細胞では、非常にかすかなGFP発現が観察された(データは示されていない)。hGHイントロンを含むDT-A遺伝子またはSV40ラージT抗原イントロンを含むバルナーゼ遺伝子を保有する組換えバキュロウイルスが100 μ lであれ、250 μ lであれ、形質導入されると、HEK293細胞の大半が寄せ集められ、ゆるく引き離されて、重度のCPEを示すが、一方、GFPを保有する組換えバキュロウイルスで形質導入されたHEK293細胞はすべて、CPEのいかなる徴候も示さず、陰性対照と同様に増殖していた。これらの結果は、哺乳動物HEK293細胞において、イントロン(hGHイントロンまたはSV40ラージT抗原イントロン)がスプライシングで切り出されて、DT-A mRNAまたはバルナーゼ-GFP mRNAを形成し、翻訳され、したがって、宿主細胞が機能性DT-Aまたはバルナーゼ-GFP-融合タンパク質を発現し、それにより宿主HEK293細胞を死滅させる、ということを実証する。

表2 バキュロウイルス形質導入によるヒトHEK293細胞におけるDT-Aの発現【表2】

試料	説明	添加容積(μ l)	観察されるCPE
1	ESF921培地	100	-
2	ESF921培地	250	-
3	バキュロウイルス Bac-CMV-GFP	100	-
4	バキュロウイルス Bac-CMV-GFP	250	-
5	バキュロウイルス Bac-CMV-inDTA	100	+++
6	バキュロウイルス Bac-CMV-inDTA	250	+++
7	バキュロウイルス Bac-CMVtetO-inDTA-p10-TetR	100	+++
8	バキュロウイルス Bac-CMVtetO-inDTA-p10-TetR	250	+++

【0090】

実施例11

この実施例は、昆虫細胞における毒素ORFを保有するAAVベクターの産生を例証する。

【0091】

これらの実験において、ヒト成長ホルモンイントロンを含むDT-A遺伝子、またはSV40ラージT抗原イントロンを含み、GFP遺伝子で枠内融合されるバルナーゼ遺伝子を保有するAAVベクターの産生を、昆虫細胞で調べた(図15、図16)。図15は、安定的に組み込まれたAAV導入遺伝子を保有する昆虫細胞における、ヒト成長ホルモンイントロンを含むDT-A遺伝子またはSV40ラージT抗原イントロンを含みGFP遺伝子と枠内融合されるバルナーゼ遺伝子を保有するAAVベクターの産生方法を示す。図16は、ヒト成長ホルモンイントロンを含むDT-A遺伝子、またはSV40ラージT抗原イントロンを含み、GFP遺伝子と枠内融合されるバルナーゼ遺伝子を保有する代表的AAVベクターの遺伝子および転写地図を示す。DT-Aコード配列およびバルナーゼコ

ード配列に基づいた遺伝子地図上の数字は、イントロンが挿入されたヌクレオチド位置を示す。

【0092】

イントロン中断毒素ORFを保有する組換えバキュロウィルスを用いて、Sf9細胞でAAVベクター産生を実施した。組換えバキュロウィルスを用いて、AAV RepおよびCap遺伝子を発現する第2の組換えバキュロウィルスとともにSf9細胞を3日間共感染させ、AAVベクターを精製し、滴定した。表3および表4における結果は、GFP遺伝子だけを保有するAAVベクターと比較して、ほぼ同じ収率のイントロン中断毒素ORFを保有するAAVベクターが産生されることを示す。

【0093】

これらの実験では、100U/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを補足したESF921培地(Expression Systems、カリフォルニア州)中で、Sf9細胞を約1E+9細胞/mlに増殖させた。次に、細胞を新鮮な培地で1:1希釈して、10moiのBac-RepCap9および5moiのBac-CMV-inDTAまたはBac-CMVtetO-inDTA-p10-TetRで3日間感染させた。2000rpmで10分間の遠心分離により細胞ペレットを採取して、SF9溶解緩衝液(50mMトリス-HCl、pH7.4、2mM MgCl₂、1%サルコシル、1%トリトンX-100、125単位/mlのベンゾナーゼ)中に溶解した。細胞性DNAを、37Cで60分間、インキュベートすることにより消化した。8000rpmで30分の遠心分離により細胞溶解物を清澄化し、1.55g/ccのCsCl溶液5mlおよび1.32g/ccのCsCl溶液10mlを含有するSW28遠心管上に載せた。15で約16時間、28,000rpmでの遠心分離後、注射針を用いて遠心管を穿刺することによりrAAV含有分画を収集し、2回目のCsCl超遠心分離に付した。再び注射針を用いて遠心管を穿刺することによりrAAV含有分画を収集し、PBS緩衝液中で透析して、塩および洗剤を除去した。メーカーのプロトコール(Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア州)に従って、定量的実時間PCR検定によりベクター力価を確定した。結果(表3および表4)は、tet抑圧を伴う場合も伴わない場合も、イントロンを含むDT-A遺伝子を保有する組換えバキュロウィルスを用いて、毒性DT-A遺伝子を保有するrAAVベクターの高力価がSf9細胞で生じ得る、ということを示すが、これは、イントロンの挿入がAAVベクター産生のために必要であることを示している。

表3 DT-A遺伝子を保有するAAVベクターの産生

【表3】

試料	説明	全収率(vg/リットル培養物)	相対収率(%)
1	AAV9-CMV-GFP(対照ベクター)	6.63E+14	100
2	AAV9-CMV-inDTA (hGH)	7.53E+14	114
3	AAV9-CMVtetO-inDTA	5.32E+14	80

表4 ヒト成長ホルモンイントロンを含むDT-A遺伝子またはSV40ラージT抗原イントロンを含むバルナーゼ遺伝子を保有するAAV9およびAAV2ベクターの産生

【表4】

試料	説明	全収率(vg/リットル培養物)
1	AAV9-CMV-GFP(対照ベクター)	6.63E+14
2	AAV9-CMV-inDTA	7.53E+14
3	AAV2-CMV-GFP (hGH)(対照ベクター)	1.15E+15
4	AAV2-CMV-inDTA (hGH)	1.15E+15
5	AAV2-CMV-inBar(SV40)-GFP	6.58E+14
6	AAV2-hTERT-inDTA(hGH)	9.30E+14

10

【0094】

これらの結果は、哺乳動物イントロンが昆虫細胞中で機能性ではなく、この結果、イントロン中断毒素ORFを保有するAAVベクターを首尾よく産生した、ということを確認する。さらに、AAV2およびAAV9ベクターはともに、同様の収率で産生されたが、これは、このAAVベクター産生が普遍的であり、血清型特異的でなかったことを示している。

【0095】

実施例12

この実施例は、CMVプロモーターの制御下での、DTAを含有するAAVベクター

20

による非特異的の死滅を例証する。

【0096】

イントロン中断毒素遺伝子を保有する組換えバキュロウィルスは形質導入により哺乳動物細胞を死滅させ得たため、毒素遺伝子を保有するAAVベクターがHEK293細胞に死滅作用を発揮し得るか否かを検査した。この可能性を試験するために、HEK293細胞を24ウェルプレート上で一晩プレート化し、AAV2およびAAV9ベクターで形質導入した。結果は、48時間形質導入後、DTAまたはバルナーゼ遺伝子を保有するAAV2またはAAV9ベクターで形質導入されたHEK293細胞は、アポトーシスを受けている細胞の典型的現象である断片化細胞形態学を示した。これに対比して、GFP遺伝子を保有するAAV2またはAAV9ベクターで形質導入された細胞においてはアポトーシスの徴候は認められなかった(データは示されていない)。これらの結果は、イントロンが毒素コード配列からスプライシングにより切り出されて、成熟mRNAを形成し、mRNAは、HEK293細胞を死滅させる毒素タンパク質に翻訳される、ということを実証する。AAV2はAAV9よりはるかに良好なin vitro形質導入効率を示すため、それはさらなるin vitro実験のために選択された。細胞増殖検定をHEK293細胞上で実施して、細胞死滅作用をさらに確認した。結果を図17aに示す。AAV2-CMV-inDTA(hGH)で形質導入されたHEK293細胞を抑制し、増殖の徴候はなかったが、一方、AAV2-CMV-GFPで形質導入された細胞は非処置細胞と同様に増殖した。さらに、細胞生存度検定を実施して、Hep3B細胞に及ぼすAAV2-CMV-inDTA(hGH)の細胞傷害性を立証した。結果を、図17bに示す。

見事な用量-応答曲線が観察された。DTAを保有するAAV2ベクターの減少に伴って、細胞生存度は増大したが、一方、AAV2-CMV-GFP処置細胞に関しては細胞生存度の変化は本質的に認められなかった。

30

40

【0097】

図17は、哺乳動物細胞に及ぼすAAV2-CMV-inDTA(hGH)の死滅作用を示す。(a) AAV2ベクターで形質導入された293細胞の増殖。細胞(1.5E+5細胞/ウェル)を24ウェルプレート中に一晩播種し、AAV2-CMV-inDTA(hGH)またはAAV2-CMV-GFPで形質導入した。細胞数を、異なる時点で計数した。それらがコンフルエントに達した後、細胞を大型培養域に分けて、増殖させた。(b) AAV2ベクターで形質導入されたHep3B細胞の生存度。Hep3B細胞(3

50

、 2×10^4 細胞/ウェル)を、96ウェルプレート中に一晩播種し、AAV2-CMV-GFPまたはAAV2-CMV-inDTA(hGH)の4倍連続希釈液で形質導入した。Cell Titer Glo発光細胞生存度検定キット(Promega)で細胞生存度を確定した。

【0098】

図18は、48時間、毒性遺伝子を保有するAAVベクターで形質導入することによるヒトHEK293細胞に及ぼす死滅作用を示す。タングステン照明(A、BおよびC)または蛍光照明(D)下で、20倍レンズで画像を撮影した。A: AAV2-CMV-inDTA(hGH); B: AAV2-CMV-inBar(SV40)-GFP; C: AAV2-CMV-GFP; D: GFP発現を示すCと同一画像。

10

【0099】

これらの実験では、CMV-inDTA(hGH)またはCMV-inBar(SV40)-GFPと共にAAVを保有するHEK293細胞が寄せ集められ、ゆるく引き離されて、重度のCPEを示した。しかしながら、GFPを保有する組換えバキュロウィルスで形質導入されたHEK293細胞はすべて、CPEのいかなる徴候も示さず、陰性対照と同様に増殖していた。これらの結果は、哺乳動物細胞において、イントロン(hGHイントロンまたはSV40ラージT抗原イントロン)がスプライシングで切り出されて、DT-A mRNAまたはバルナーゼ-GFP mRNAを形成し、翻訳され、宿主細胞が機能性DT-Aまたはバルナーゼ-GFP-融合タンパク質を発現し、それにより宿主HEK293細胞を死滅させた、ということを実証する。

20

【0100】

実施例13

この実施例は、制御AFPエンハンサーおよびプロモーター配列下で、イントロンで中断されたリーディングフレームを有するDT-A遺伝子を含むAAVベクターの産生を例証する。

【0101】

この実験では、ヒトAFPエンハンサーおよびプロモーター配列を、ヒト胚性腎臓HEK293細胞から精製されたゲノムDNAからともにPCR増幅した。AFPエンハンサーを、フォワードプライマー

【化11】

5' -CCGCACGCGTCTTAGAAATATGGGGGTAGGGGTGG-3'

30

(配列番号27)(イタリック体はMluIに関する制限部位を示す)およびリバースプライマー5'-CTCAAACTCTAGTGGCCTGGATAAAGCTGAGTG-3'(配列番号28)を用いて増幅した。AFPプロモーターを、フォワードプライマー5'-CTTTATCCAGGCCACTAGAGTTTGAGGAGAATATTTG-3'(配列番号29)およびリバースプライマー5'-ACTTACCTGACCGGTTGCTAGTTATTTTGTAT-3'(配列番号30)を用いて増幅した。上記のようなAFPエンハンサーに関するフォワードプライマーおよびAFPプロモーターに関するリバースプライマーを用いて、二次PCR増幅により、2つのPCR断片を一

40

緒に接合した。最終PCR断片を、MluIおよびAgeIで消化し、pFB-CMV-inDTA(hGH)のMluIおよびAgeI部位にライゲーションして、CMVプロモーターを取り替えて、pFB-hAFP-inDTA(hGH)を作成した。

【0102】

AAV2-hAFP-inDTA(hGH)を、本明細書中に記載された方法により、昆虫細胞中で、 1.69×10^{15} の力価に産生した。

【0103】

実施例14

この実施例は、ヒトサバイビン(SURV)の制御下で、イントロンで中断されるリーディングフレームを有するDT-A遺伝子を含むAAVベクターの産生を例証する。

50

【0104】

これらの実験では、ヒトサバイビン (SURV) プロモーター配列を、フォワードプライマー

【化12】

5' -GGGGACTAGTCTGGCCATAGAACCAGAGAAGTGA-3'

(配列番号31) (イタリック体はSpeIに関する制限部位を示す) およびリバースプライマー

【化13】

5' -TTTTACCGGTCCACCTCTGCCAACGGGTCCCGCG-3'

(配列番号32) (イタリック体はAgeIに関する制限部位を示す) を用いて、ヒト胚性腎臓HEK293細胞から精製したゲノムDNAでPCR増幅した。PCR断片をSpeIおよびAgeIで消化し、pFB-CMV-indTA(hGH)のSpeIおよびAgeI部位にライゲーションして、CMVプロモーターを取り替えて、pFB-hSURV-indTA(hGH)を作成した。

【0105】

AAV2-hSURV-indTA(hGH)を、本明細書中に記載される方法により、昆虫細胞中で培養力価1.41E+15vg/1リットルに産生した。

【0106】

実施例15

この実施例は、ヒトシクロオキシゲナーゼ-2(COX2)プロモーター配列の制御下で、イントロンで中断されるリーディングフレームを有するDT-A遺伝子を含むAAVベクターの産生を例証する。

【0107】

これらの実験では、ヒトシクロオキシゲナーゼ-2(COX2)プロモーターを、フォワードプライマー

【化14】

5' -GCCCACTAGTTGAGGTACCTGGTGTAGTTT-3'

(配列番号33) (イタリック体はSpeIに関する制限部位を示す) およびリバースプライマー

【化15】

5' -ATATACCGGTCAGCGGCGGGCAGGGCGCGG-3'

(配列番号34) (イタリック体はAgeIに関する制限部位を示す) を用いて、ヒト胚性腎臓HEK293細胞から精製されたゲノムDNAでPCR増幅した。PCR断片を、SpeIおよびAgeIで消化し、pFB-CMV-indTA(hGH)のSpeIおよびAgeI部位にライゲーションして、CMVプロモーターを取り替えて、pFB-hCOX2-indTA(hGH)を作成した。

【0108】

AAV2-hCOX2-indTA(hGH)を、本明細書中に記載される方法により、昆虫細胞中で培養力価2.22E+13vg/1リットルに産生した。

【0109】

実施例16

この実施例は、ヒトコレシストキニンA型受容体(CCKAR)プロモーター配列(Takata, Y.ら、J. Gastroenterol. 37:815~820, 2002年)の制御下で、イントロンで中断されるリーディングフレームを有するDT-A遺伝子を含むAAVベクターの産生を例証する。

【0110】

10

20

30

40

50

これらの実験では、ヒトコレシストキニンA型受容体(CCKAR)プロモーター配列を、フォワードプライマー

【化16】

5' -GCCCCTAGTACCCAGGTACCTATGTTCAAAAG-3'

(配列番号35)(イタリック体はSpeIに関する制限部位を示す)およびリバースプライマー

【化17】

5' -GCGCACCGGTTTGCCTGCTGCTTTCCACCAAG-3'

(配列番号36)(イタリック体はAgeIに関する制限部位を示す)を用いて、ヒト胚性腎臓HEK293細胞から精製されたゲノムDNAでPCR増幅した。PCR断片を、SpeIおよびAgeIで消化し、pFB-CMV-indTA(hGH)のSpeIおよびAgeI部位にライゲーションして、CMVプロモーターを取り替えて、pFB-hCCKAR-indTA(hGH)を作成した。

【0111】

AAV2-hCCKAR-indTA(hGH)を、本明細書中に記載される方法により、昆虫細胞中で培養力価 $1.96E+14$ vg/リットルに産生した。

【0112】

実施例17

この実施例は、ヒトCXCR4遺伝子プロモーター配列(Caruz, M.ら、FEBS Letters, 426:271~278, 1998年)の制御下で、イントロンで中断されるリーディングフレームを有するDT-A遺伝子を含むAAVベクターの産生を例証する。

【0113】

これらの実験では、ヒトCXCR4プロモーター配列を、フォワードプライマー

【化18】

5' -GCCCCTAGTTACCGACCCCGCAAACAG-3'

(配列番号37)(イタリック体はSpeIに関する制限部位を示す)およびリバースプライマー

【化19】

5' -GCGCACCGGTGTAACCGCTGGTTCTCCAGA-3'

(配列番号38)(イタリック体はAgeIに関する制限部位を示す)を用いて、ヒト胚性腎臓HEK293細胞から精製されたゲノムDNAでPCR増幅した。PCR断片を、SpeIおよびAgeIで消化し、pFB-CMV-indTA(hGH)のSpeIおよびAgeI部位にライゲーションして、CMVプロモーターを取り替えて、pFB-hCXCR4-indTA(hGH)を作成した。

【0114】

AAV2-hCXCR4-indTA(hGH)を、本明細書中に記載される方法により、昆虫細胞中で培養力価 $1.81E+15$ vg/リットルに産生した。

【0115】

実施例18

この実施例は、腫瘍特異的プロモーターの制御下で、DT-Aを保有するAAVベクターによる腫瘍特異的の死滅を例証する。

【0116】

これらの実験では、細胞を24ウェルプレート上に播種し、上記のような種々の腫瘍特異的プロモーターの制御下で、DT-Aを保有するAAV2ベクターで形質導入した。結果は、神経芽細胞腫BE(2)-M17細胞はhSURVまたはhCXCR4プロモータ

10

20

30

40

50

一の制御下でDT-Aにより死滅させたが、しかしhAFPプロモーターの制御下では死滅されず、一方、肝細胞癌Hep3BおよびHepG2細胞は、AFP、SURVまたはCXCR4プロモーターの制御下でDT-Aにより死滅させた、ということを示す。正常ヒト肺細胞株WI38は、AFP、SURVまたはhTERTプロモーターの制御下において、DT-Aによる影響を受けなかった。図19は、AAV2-hSURV-indTA(hGH)による細胞死滅の代表的結果を示す。これらの実験では、細胞を24ウェルプレート中に播種し、AAV2-CMV-GFP(a)、(c)、(e)および(g)、またはAAV2-hSURV-indTA(hGH)(b)、(d)、(f)および(h)で形質導入した。形質導入の3日後に、写真を撮影した。(a)&(b)WI38;(c)および(d)HepG2;(e)および(f)Hep3B、ならびに(g)および(h)BE(2)-M17細胞。

10

【0117】

3つの腫瘍細胞株も、ヒトCOX2、CCKARおよびhTERTプロモーターの制御下でDTAで試験したが、しかし有意な細胞死滅作用は観察されなかった。細胞死滅作用をさらに特性化するために、AFP、SURVおよびCXCR4プロモーターの制御下でDTAを用いて、細胞生存度検定を実施した。図20は、種々の腫瘍特異的プロモーターの制御下でのDT-Aを保有するAAV2ベクターによる腫瘍細胞の細胞生存度検定を示す。これらの実験では、細胞を96ウェルプレート上に播種し、4倍連続希釈でAAV2ベクターで4日間形質導入して、CellTiter Glo発光細胞生存度検定キットで細胞生存度を検定した。(a)HepG2細胞、(b)Hep3B細胞および(c)BE(2)-M17細胞。3つの腫瘍特異的プロモーターはすべて、HepG2細胞において転写活性を示す。この中で、CXCR4プロモーターは、高力価のAAV2ベクターを用いた場合、HepG2細胞を死滅させるようDTAを駆動する最高活性を示した(図20a)。Hep3B細胞に関しては、SURVプロモーターの制御下でのDTAは、最強死滅作用を示したが、一方、AFPおよびCXCR4は部分的死滅活性を示した(図20b)。興味深いことに、AFPプロモーターはBE(2)-M17細胞中では活性でなかったが、一方、CXCR4およびSURV両プロモーターの制御下でのDTAは強力な死滅作用を示した(図20c)。

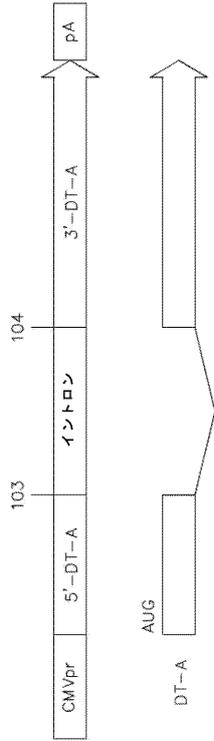
20

【0118】

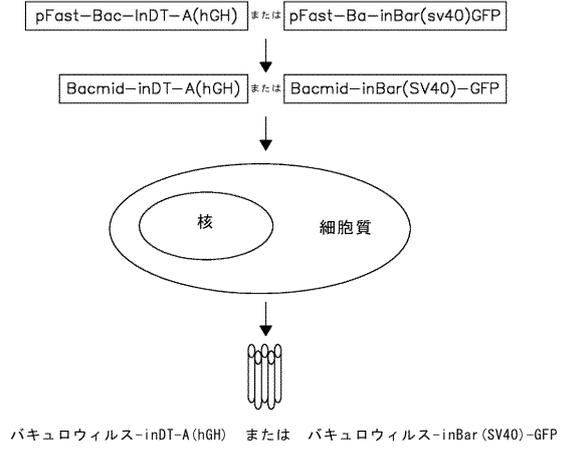
本明細書中で言及される出版物、例えば特許出願、特許およびその他の参考文献はすべて、これらの記載内容が各々、参照により本明細書中で援用される。本明細書中で引用される参考文献についての任意の考察は、それらの著者によってなされた主張を単に要約するものであって、任意の参考文献またはその部分が関連従来技術を構成するということの承認というわけではない。出願人は、引用参考文献についての正確さおよび妥当性に異議を申し立てる権利を保有する。

30

【 図 1 】

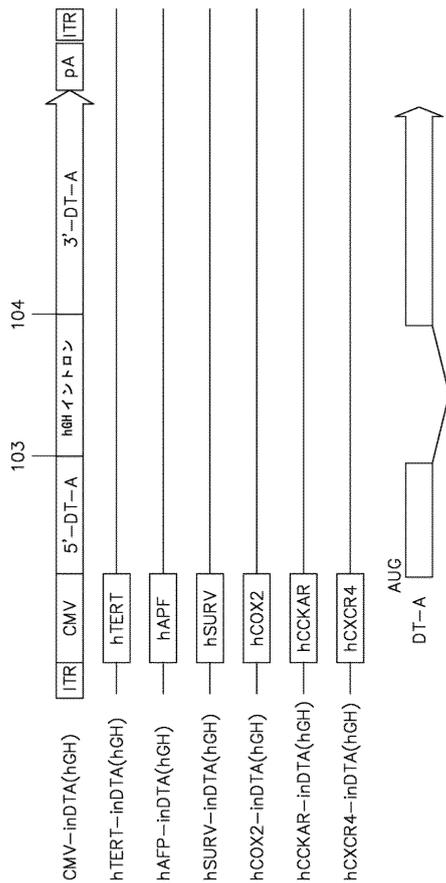


【 図 2 】



【 図 3 - 1 】

図 3 A



【 図 3 - 2 】

図 3 B

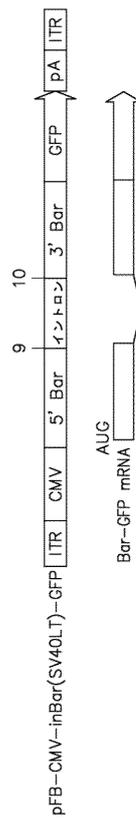
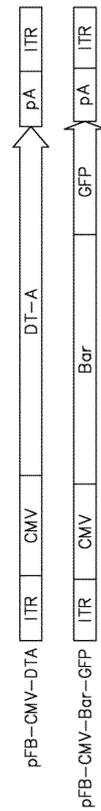
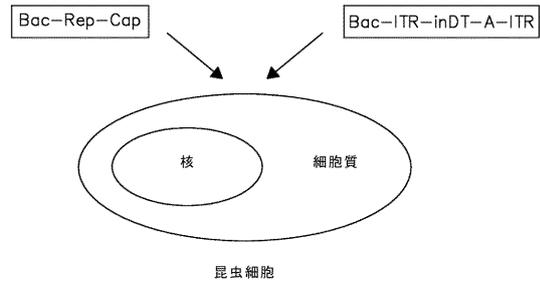


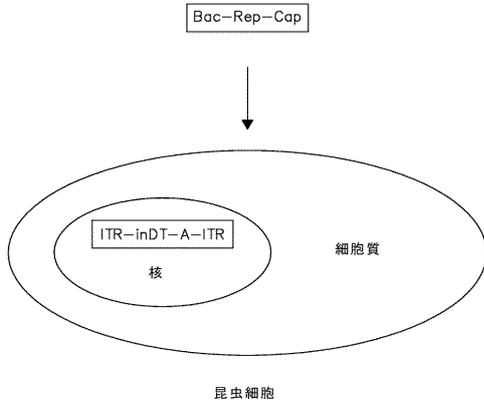
図 3 C



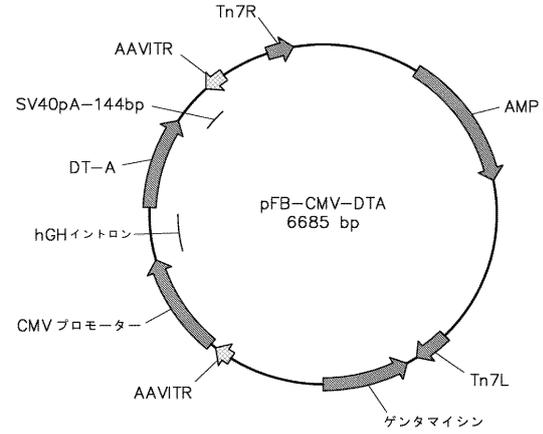
【図4】



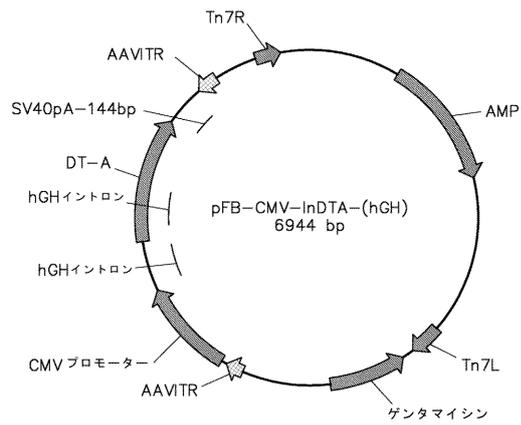
【図5】



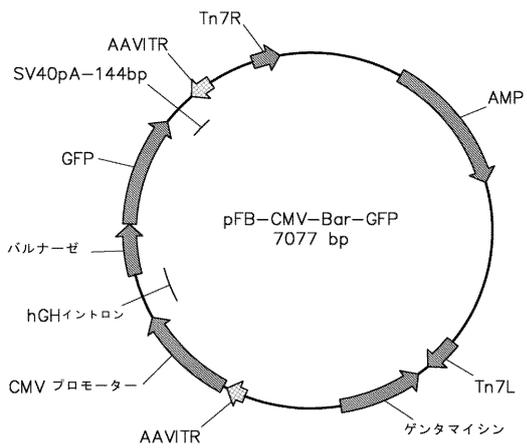
【図6】



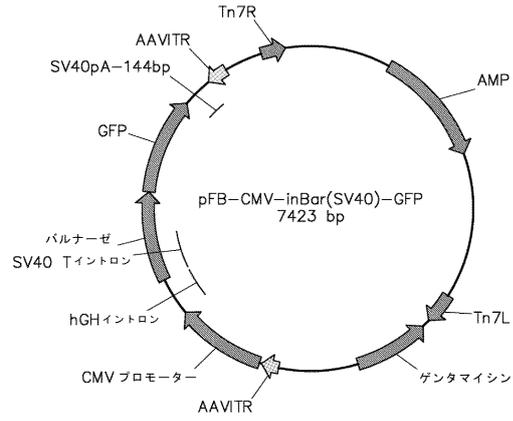
【図7】



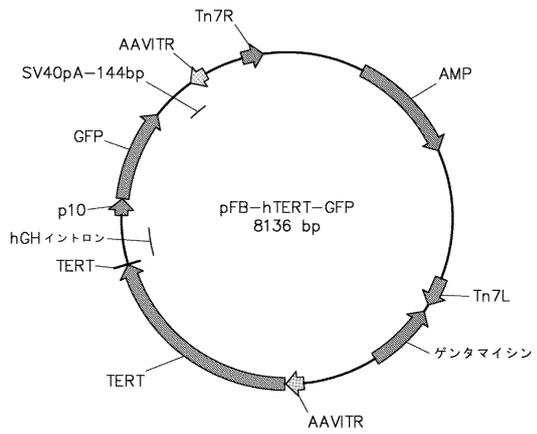
【図8】



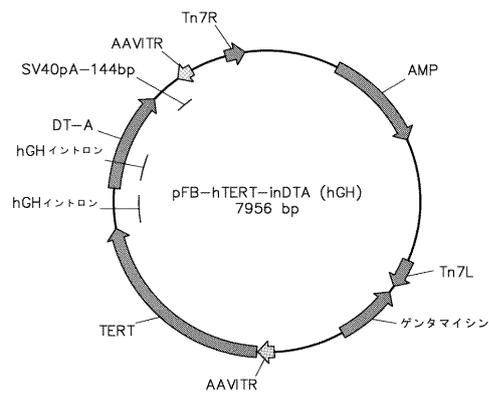
【図 9】



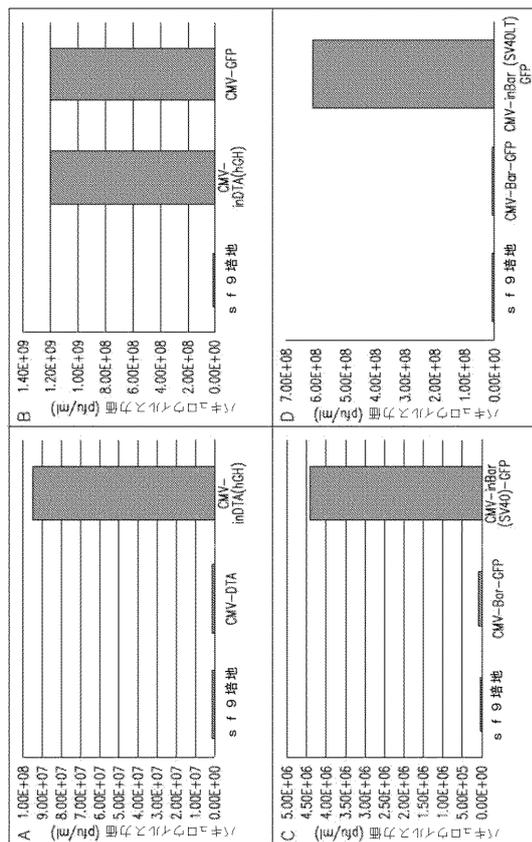
【図 11】



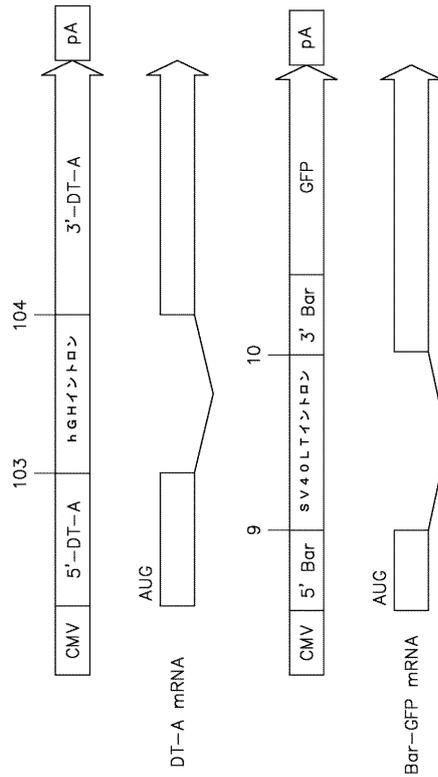
【図 10】



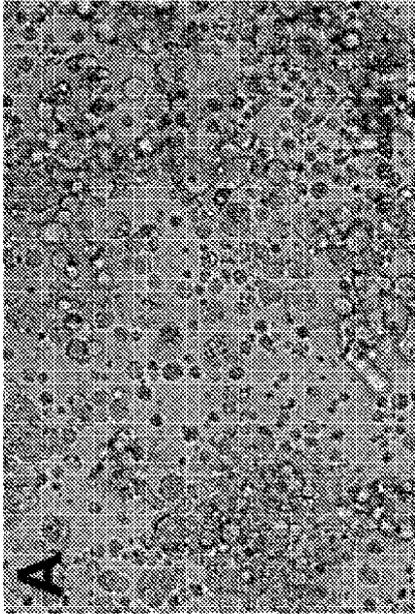
【図 12】



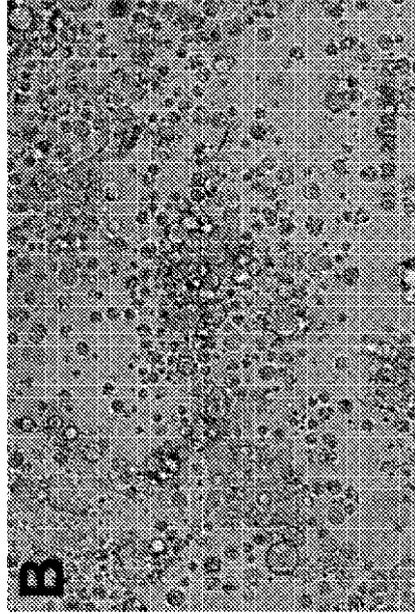
【図 13】



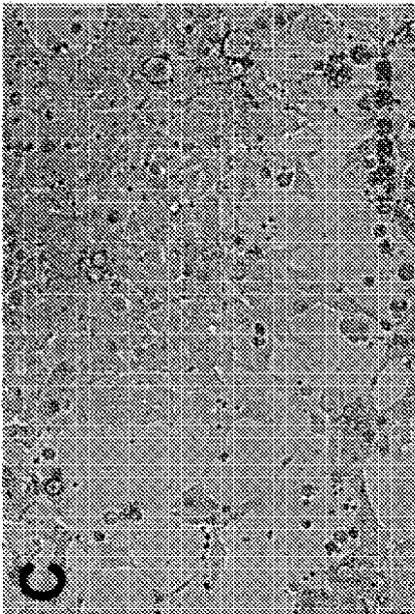
【図 14 A】



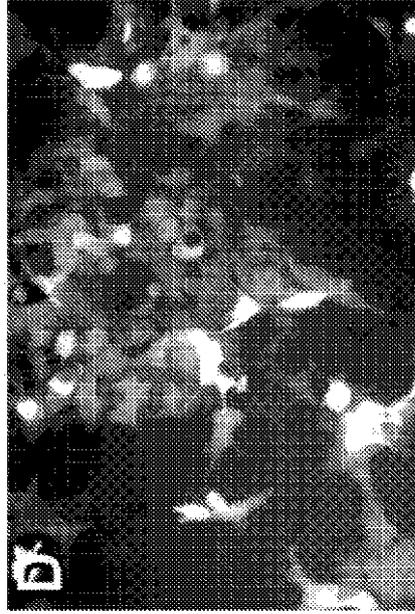
【図 14 B】



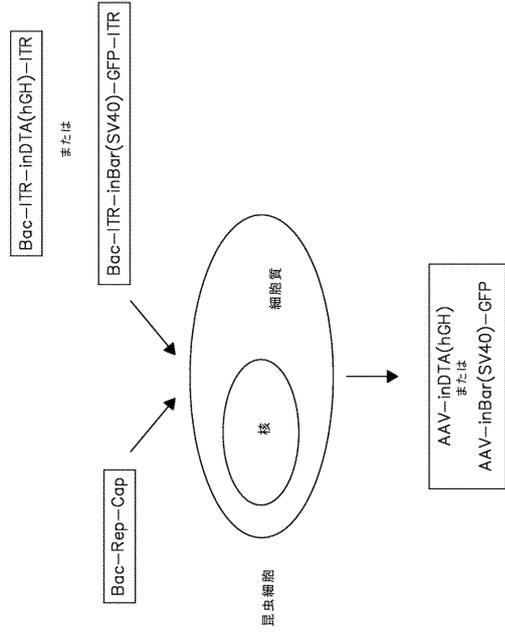
【図 14 C】



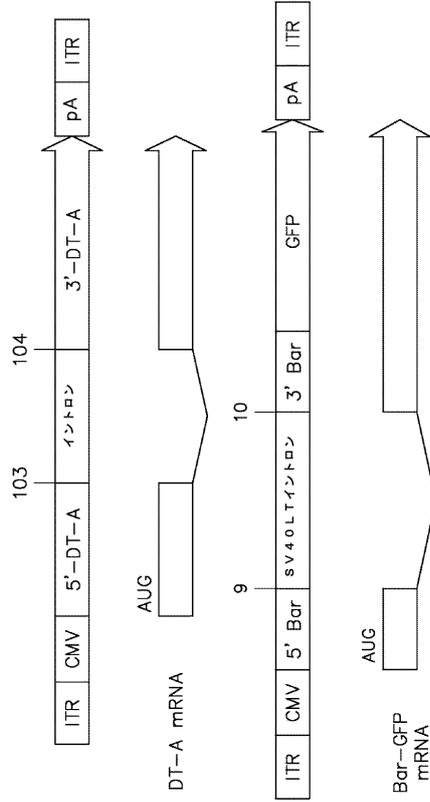
【図 14 D】



【 図 15 】



【 図 16 】



【 図 17 】

図 17 A

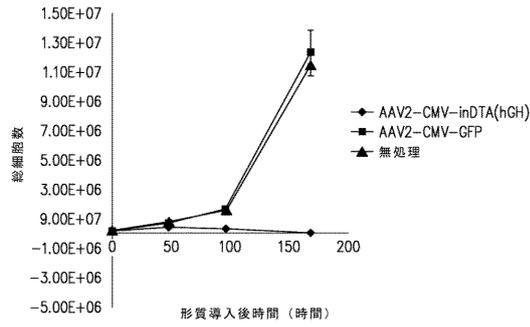
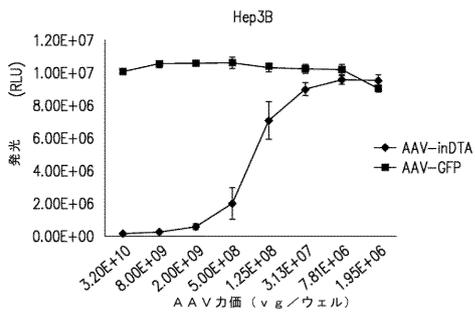
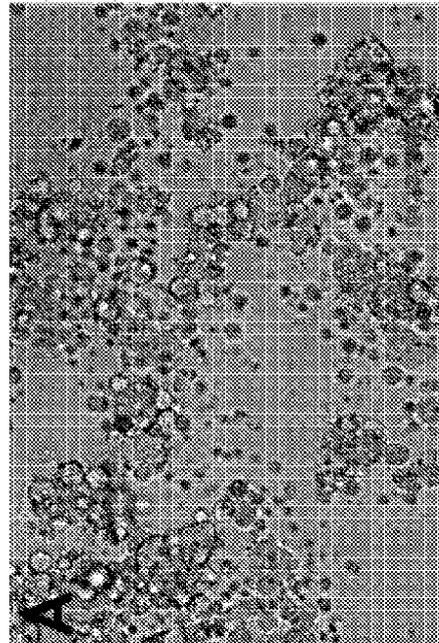


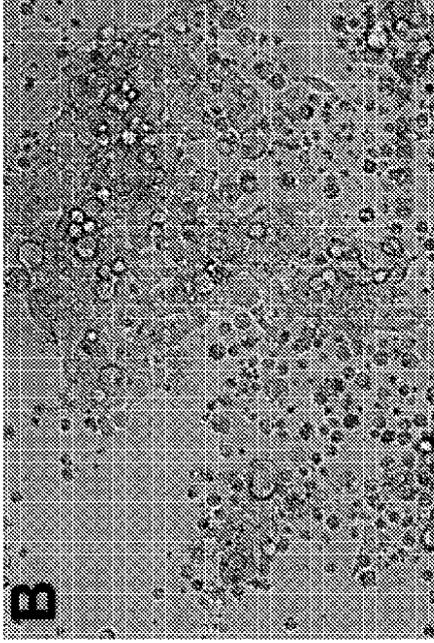
図 17 B



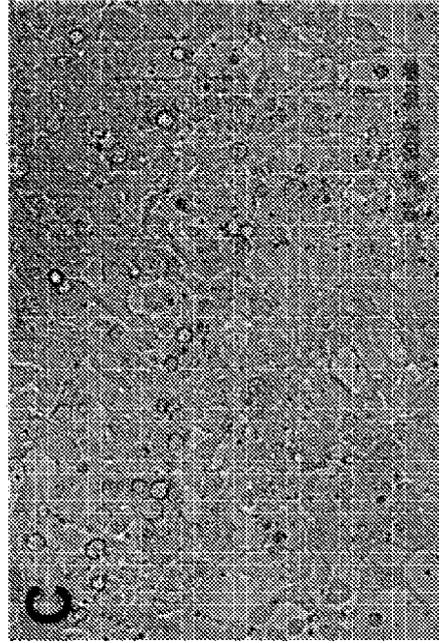
【 図 18 A 】



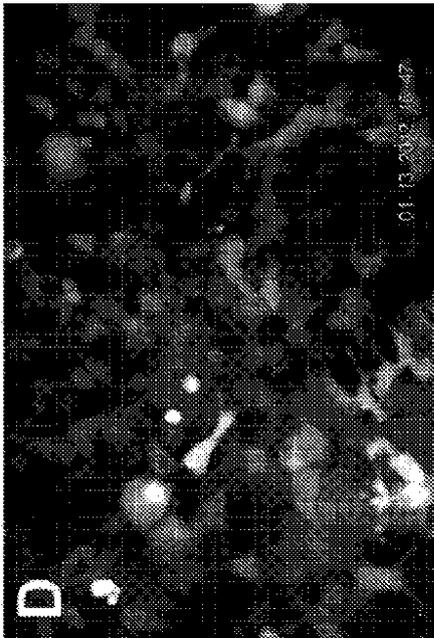
【 1 8 B】



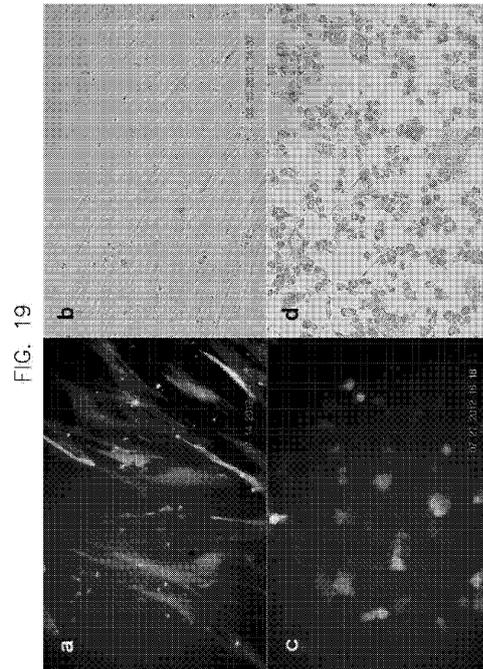
【 1 8 C】



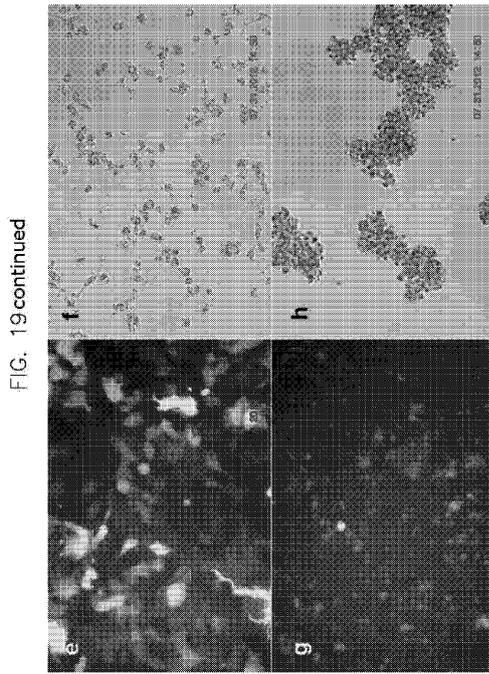
【 1 8 D】



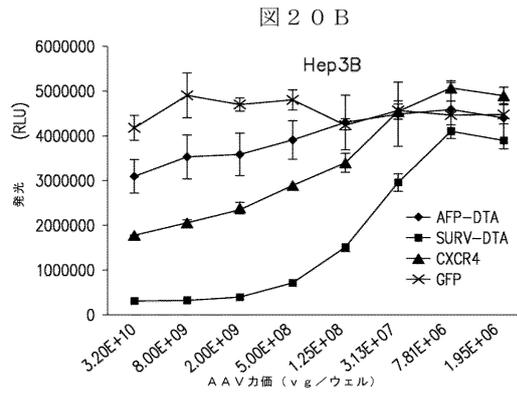
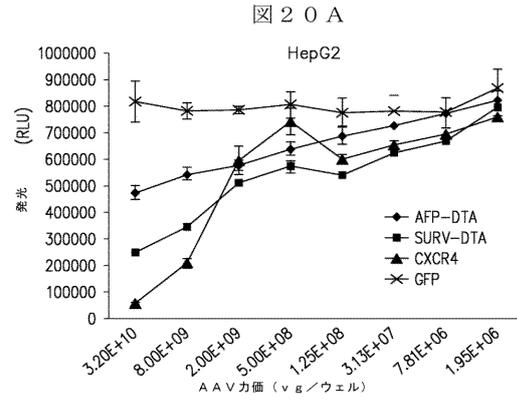
【 1 9 - 1】



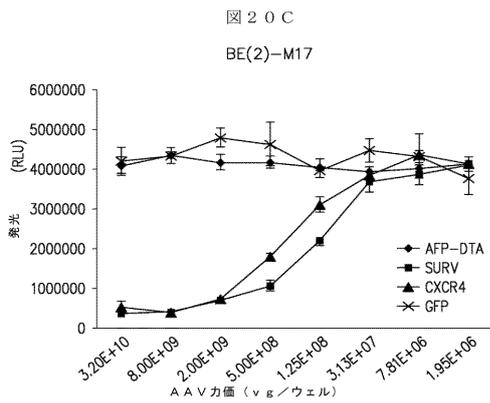
【 図 19 - 2 】



【 図 20 - 1 】



【 図 20 - 2 】



【配列表】

0005998229000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 Z

(74)代理人 100183254

弁理士 森山 彩子

(72)発明者 ハイフォン・チェン

アメリカ合衆国94545カリフォルニア州ハイワード、プロダクション・アベニュー26291
番、スウィート10、ピロベック・インコーポレイテッド

審査官 西 賢二

(56)参考文献 国際公開第2011/122950(WO, A1)

米国特許出願公開第2003/0148506(US, A1)

KOHLSCUTTER, Johannes et al., "Novel cytotoxic vectors based on adeno-associated viruses", *Toxins*, 2010年, Vol. 2, p. 2754-2768

JEANG, Kuan-Teh et al., "A baculovirus vector can express intron-containing genes", *J. Virol.*, 1987年, Vol. 61, p. 1761-1764

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)