

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-107134

(P2015-107134A)

(43) 公開日 平成27年6月11日 (2015.6.11)

(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 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-42141 (P2015-42141)	(71) 出願人	513167522
(22) 出願日	平成27年3月4日 (2015.3.4)		ブルーバード バイオ, インコーポレイ
(62) 分割の表示	特願2014-514899 (P2014-514899)		テッド
原出願日	平成24年6月8日 (2012.6.8)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(31) 優先権主張番号	61/495, 857		1 3 9, ケンブリッジ, メモリアル
(32) 優先日	平成23年6月10日 (2011.6.10)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 副腎脳白質ジストロフィおよび副腎脊髄神経障害のための遺伝子療法ベクター

(57) 【要約】

【課題】 副腎脳白質ジストロフィおよび副腎脊髄神経障害のための遺伝子療法ベクターの提供。

【解決手段】 本発明は、レトロウイルスベクターを含む組成物、形質導入された細胞、およびそれを遺伝子療法のために使用する方法を提供する。具体的には、本発明は、副腎脳白質ジストロフィおよび／または副腎脊髄神経障害を有する被験体に遺伝子療法を提供するためのレンチウイルスベクターおよびそれらのベクターを用いて形質導入された細胞に関する。

【選択図】 図 1

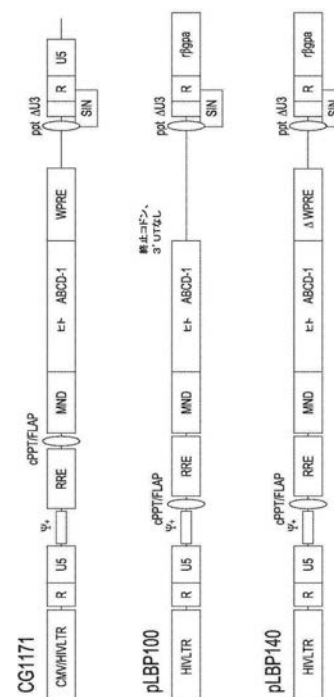


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】

明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2011年6月10日に提出された米国仮出願第 61/495, 857 号（これは、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

10

【0002】

配列表に関する記述

本出願に付随する配列表は、紙コピーの代わりにテキスト形式で提供され、これによって参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は BLBD_003_01WO_ST25.txt である。テキストファイルは 8 KB であり、2012年6月8日に作成され、本明細書の出願と同時に EFS-Web を介して電子的に提出されている。

【0003】

本発明は、一般には、遺伝子療法ベクターに関する。特に、本発明は、副腎脳白質ジストロフィおよび副腎脊髄神経障害に対する遺伝子療法を提供するレンチウイルスベクターに関する。

20

【背景技術】

【0004】

小児期大脳副腎脳白質ジストロフィ (CCALD) は、少年（発症年齢の中央値は 7 歳であり、3～15 歳にわたる）における、非常にまれな、時には急速に進行する X 連鎖遺伝性の神経障害であり、治療しないと植物状態に至り、最終的には診断後 5 年の中央値で死亡する。

【0005】

CCALD は、多くの場合、最初はアジソン病として現れるが、診断は通常磁気共鳴画像法 (MRI) における大脳の脱髄の確証的な所見を伴う注意力、思考力、集中力、および他の大脳機能の「突然の」低下に基づいて行われる。脱髄する前は患者の脳の MRI は正常であり、神経発生的な異常はない。臨床経過は、初めは「遅い」場合があるが、脳内のミエリンの広範にわたる損失を伴って急速に進行性かつ不可逆になる可能性がある。

30

「遅い」および「突然の」という用語は、脱髄の本当の持続時間は分からず、認知機能および運動機能の急速な低下はいかなる時点でも、また理由不明で起こり得るという点で相対的である。実際に、MRI の変化は症状に先行し、疾患の臨床症状発現がほとんどない時点で、広範にわたる脱髄を伴い、病勢盛んであるように異常である場合がある。米国における X 連鎖副腎脳白質ジストロフィ (ALD) の発生率はおよそ男児出生 21, 000 件に対して 1 件であり、約 35% が CCALD を発生しており、毎年約 35～40 人の少年が CCALD と診断されている。疾患の原因は ATP 結合性カセット、サブファミリー D (ALD)、メンバー 1 (ABCD1) 遺伝子の突然変異であり、それにより副腎脳白質ジストロフィタンパク質 (ALDP) 遺伝子産物が機能不全になるまたはそれが欠ける。ALDP は、細胞のペルオキシソームに局在化し、そこで非常に長鎖の脂肪酸 (VLCFA) (炭素 > 20 個の鎖長) の、細胞の構造および機能を維持するために使用される短い脂肪酸への分解に関与する。

40

【0006】

CCALD の中枢神経系 (CNS) の症状発現の病態生理はよく分かっていないが、欠陥のある ALDP は脳小膠細胞におけるそのプロセスを支持しないために代謝することができない VLCFA が局所的に蓄積することによって脱髄が生じる。疾患の急速進行相は、おそらくミエリンの損失を増大させる VLCFA による細胞タンパク質のアシル化によ

50

って引き起こされる炎症によって引き起こされる。C C A L Dの急速進行相の結果、数カ月以内に正常な機能が劣化して著しい障害をもった少年になり得る。

【0007】

利用可能な治療は、機能的A L D Pを産生する細胞を供給するための同種異系の造血幹細胞移植（H C T）のみである。脳小膠細胞は骨髄に由来するので、機能的A L D Pを産生する細胞を使用した、完全に適合する血縁ドナーヒト幹細胞移植により、脱髄の進行を潜在的に改善するまたは停止させることができる。しかし、同種異系のH C Tにより疾患を安定化するためには12～18カ月を要し、また疾患が進行性であるので、移植は診断されただけ早く行うべきである。これは、血縁または非血縁の適合する骨髄幹細胞ドナーを見つけるために必要なリードタイムに起因して問題がある時がある。同種異系の幹細胞を使用することにより、グラフト不全のリスクならびに急性および慢性の移植片対宿主病（G v H D）の発生も生じる。これらの合併症は死亡に至る可能性があり、また、非血縁ドナーを同種異系の造血幹細胞の供給源として利用する場合にはその発生率が上昇する。

10

【0008】

A L D P交換の別の供給源は、適合する、より一般には、部分的に適合する臍帯血細胞移植を使用することである。臍帯血幹細胞（C B S C）の使用は、グラフト不全のリスクがあり、生着までの時間が長く、それにより長期にわたる輸血支持が必要になり、問題がある。実際に、同種異系のH C Tの全形態に、10～15%の移植に関連する死亡率のリスク、および30%に至るまでの慢性移植片対宿主病のリスクが伴う。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、当技術分野において、より安全かつより効率的な副腎脳白質ジストロフィ療法の必要性がある。本発明は、これらおよび他の問題に対する解決策を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

したがって、本明細書全体を通して種々の箇所における「一実施形態では」または「ある実施形態では」という句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態について言及しているのではない。さらに、特定の特徴、構造、または特性を任意の適切な様式で1つまたは複数の実施形態に組み合わせることができる。

30

【0011】

種々の実施形態では、本発明は、一部において、左側の（5'）レトロウイルスL T Rと、中心ポリプリントラクト（*polypurine tract*）／DNAフラップ（*DNA flap*）（*cPPT*／*FLAP*）と、レトロウイルス輸送エレメント（*retroviral export element*）と、A T P結合性カセット、サブファミリーD、メンバー1（*ABCD1*）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した、小膠細胞において活性なプロモーターと、右側の（3'）レトロウイルスL T Rとを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント（*WPRE*）を含まないベクターを意図している。

40

【0012】

特定の実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。

【0013】

関連する実施形態では、レンチウイルスはH I Vである。

【0014】

より詳細な実施形態では、レンチウイルスはH I V－1である。

【0015】

ある特定の実施形態では、5' L T Rのプロモーターは異種プロモーターと置き換えられている。

【0016】

50

さらなる実施形態では、異種プロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、またはシミアンウイルス40（SV40）プロモーターである。

【0017】

追加的な特定の実施形態では、異種プロモーターはCMVプロモーターである。

【0018】

別の実施形態では、5'LTRまたは3'LTRはレンチウイルスLTRである。

【0019】

他の実施形態では、5'LTRおよび3'LTRはレンチウイルスLTRである。

【0020】

いくつかの特定の実施形態では、レンチウイルスはHIV-1である。

【0021】

特定の実施形態では、3'LTRは1つまたは複数の修飾を含む。

【0022】

いくつかの特定の実施形態では、3'LTRは1つまたは複数の欠失を含む。

【0023】

さらなる実施形態では、3'LTRは自己不活性化（self-inactivation）（SIN）LTRである。

【0024】

いくつかの実施形態では、レトロウイルス輸送エレメントはrev応答エレメント（RRE）である。

【0025】

さらなる実施形態では、cPPT/FLAPはHIV-1由来である。

【0026】

ある特定の実施形態では、プロモーターは、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域の欠失、dl587revプライマー結合部位置換（myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control region deleted, dl587rev primer-binding site substituted）（MND）プロモーターまたは転写的に活性なその断片を含む。

【0027】

特定の実施形態では、ABCD1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはcDNAである。

【0028】

関連する実施形態では、cDNAは最適化されたコザック配列を含む。

【0029】

ある特定の実施形態では、最適なコザック配列は（GCC）RCCATGGであり、Rはプリン（AまたはG）である。

【0030】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはヒトABCD1ポリペプチドをコードする。

【0031】

種々の実施形態では、本発明は、一部において、左側の（5'）LTRと、cPPT/FLAPと、RREと、ヒトABCD1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したMNDプロモーターと、右側の（3'）LTRと、ポリアデニル化配列とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント（WPRE）を含まないレンチウイルスベクターを意図している。

【0032】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターはプシー（Ψ）パッケージングシグナルを含む。

【0033】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、ポリアデニル化配列はウシ成長ホルモンポリアデニル化配列またはシグナルウサギβ-グロビンポリアデニル化配列である。

【0034】

いくつかの特定の実施形態では、レンチウイルスベクターはHIV-1由来の5'LTRまたは3'LTRを含む。

【0035】

さらなる実施形態では、3'LTRはSIN LTRである。

【0036】

種々の実施形態では、本発明は、一部において、左側の(5')HIV-1LTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、cPPT/FLAPと、RREと、ヒトABCD1ポリペプチドをコードするcDNAに作動可能に連結したMNDプロモーターと、右側の(3')自己不活性化(SIN)HIV-1LTRと、ウサギβ-グロビンポリアデニル化配列とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)を含まないレンチウイルスベクターを意図している。

【0037】

種々の実施形態では、本発明は、一部において、本明細書に記載の前述のベクターのいずれか1つによるベクターを含む哺乳動物細胞を意図している。

【0038】

特定の実施形態では、本発明は、一部において、gagをコードする第1のポリヌクレオチド、polをコードする第2のポリヌクレオチド、envをコードする第3のポリヌクレオチド、および本明細書に記載の前述のベクターのいずれか1つによるベクターを含むパッケージング細胞を意図している。

【0039】

ある特定の実施形態では、本発明は、一部において、本明細書に記載の前述のベクターのいずれか1つによるベクターを含む産生細胞を意図している。

【0040】

さらなる実施形態では、本発明は、一部において、産生細胞によって産生されるベクター粒子を意図している。

【0041】

種々の特定の実施形態では、本発明は、一部において、少なくとも1つのLTRと、中心ポリプリントラクト/DNAフラップ(cPPT/FLAP)と、レトロウイルス輸送エレメントと、ATP結合性カセット、サブファミリーD、メンバー1(ABCD1)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した、小膠細胞において活性なプロモーターとを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)を含まないベクターを意図している。

【0042】

種々の特定の実施形態では、本発明は、一部において、少なくとも1つのLTRと、cPPT/FLAPと、RREと、ヒトABCD1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したMNDプロモーターと、ポリアデニル化配列とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)を含まないベクターを意図している。

【0043】

種々のさらなる実施形態では、本発明は、一部において、少なくとも1つのSIN HIV-1LTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、cPPT/FLAPと、RREと、ヒトABCD1ポリペプチドをコードするcDNAに作動可能に連結したMNDプロモーターと、ウサギβ-グロビンポリアデニル化配列とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)を含まないベクターを意図している。

【0044】

種々の実施形態では、本発明は、一部において、ベクターを用いて形質導入された宿主細胞を意図している。特定の実施形態では、宿主細胞は、胚性幹細胞、体性幹細胞、または前駆細胞である。

10

20

30

40

50

【0045】

ある特定の実施形態では、細胞は造血幹細胞である。

【0046】

特定の実施形態では、本発明は、さらに、一部において、遺伝子療法における本発明のウイルスベクターの使用を意図している。

【0047】

好ましい実施形態では、遺伝子療法により、副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を治療または予防する。

【0048】

種々の他の実施形態では、本発明は、一部において、副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を治療する方法であって、被験体に、本発明のベクターを用いて形質導入された細胞を投与することを含む方法を意図している。

【0049】

特定の実施形態では、細胞は、胚性幹細胞、体性幹細胞、または前駆細胞である。

【0050】

ある特定の実施形態では、細胞は造血幹細胞である。

【0051】

配列識別子の簡単な説明

配列番号1はヒトABCD1をコードするcDNA配列である。

【0052】

配列番号2はヒトABCD1をコードするcDNA配列である。

【0053】

配列番号3は、MNDプロモーターのポリヌクレオチド配列である。

一実施形態において、例えば、以下の項目が提供される。

(項目1)

(a) 左側の(5')レトロウイルスLTRと、

(b) 中心ポリプリントラクト/DNAフラップ(cPPT/FLAP)と、

(c) レトロウイルス輸送エレメントと、

(e) ATP結合性カセット、サブファミリーD、メンバー1(ABCD1)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した、小膠細胞において活性なプロモーターと、

(f) 右側の(3')レトロウイルスLTRと、
を含み、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)を含まないベクター。

(項目2)

レンチウイルスベクターである、項目1に記載のベクター。

(項目3)

前記レンチウイルスがHIVである、項目2に記載のベクター。

(項目4)

前記レンチウイルスがHIV-1である、項目2に記載のベクター。

(項目5)

前記5'LTRのプロモーターが異種プロモーターと置き換えられている、項目1に記載のベクター。

(項目6)

前記異種プロモーターがサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、またはシミアンウイルス40(SV40)プロモーターである、項目5に記載のベクター。

(項目7)

前記異種プロモーターがCMVプロモーターである、項目5に記載のベクター。

(項目8)

前記5'LTRまたは前記3'LTRがレンチウイルスLTRである、項目1に記載の

10

20

30

40

50

ベクター。

(項目 9)

前記 5'LTR および前記 3'LTR がレンチウイルスLTR である、項目 1 に記載のベクター。

(項目 10)

前記レンチウイルスが HIV-1 である、項目 8 または 9 に記載のベクター。

(項目 11)

前記 3'LTR が 1 つまたは複数の修飾を含む、項目 10 に記載のベクター。

(項目 12)

前記 3'LTR が 1 つまたは複数の欠失を含む、項目 10 に記載のベクター。

10

(項目 13)

前記 3'LTR が自己不活性化 (SIN) LTR である、項目 10 に記載のベクター。

(項目 14)

前記レトロウイルス輸送エレメントが rev 応答エレメント (RRE) である、項目 1 に記載のベクター。

(項目 15)

前記 cPPT/FLAP が HIV-1 由来である、項目 1 に記載のベクター。

(項目 16)

前記プロモーターが、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域の欠失、 d1587 rev プライマー結合部位置換 (MND) プロモーターまたは転写的に活性なその断片を含む、項目 1 に記載のベクター。

20

(項目 17)

ABCD1 ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが cDNA である、項目 1 に記載のベクター。

(項目 18)

前記 cDNA が、最適化されたコザック配列を含む、項目 17 に記載のベクター。

(項目 19)

前記最適なコザック配列が (GCC) R C C A T G G であり、R がプリン (A または G) である、項目 18 に記載のベクター。

(項目 20)

30

前記ポリヌクレオチドがヒト ABCD1 ポリペプチドをコードする、項目 1 に記載のベクター。

(項目 21)

(a) 左側の (5') LTR と、

(b) cPPT/FLAP と、

(c) RRE と、

(d) ヒト ABCD1 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した MND プロモーターと、

(e) 右側の (3') LTR と、

(f) ポリアデニル化配列と、

40

を含み、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE) を含まないレンチウイルスベクター。

(項目 22)

プシー (Ψ) パッケージングシグナルを含む、項目 21 に記載のレンチウイルスベクター。

(項目 23)

前記ポリアデニル化配列がウシ成長ホルモンポリアデニル化配列またはシグナルウサギ β-グロビンポリアデニル化配列である、項目 21 に記載のレンチウイルスベクター。

(項目 24)

前記 5'LTR または前記 3'LTR が HIV-1 由来である、項目 21 に記載のレン

50

チウイルスベクター。

(項目 25)

前記 3'LTR が SIN LTR である、項目 21 に記載のレンチウイルスベクター。

(項目 26)

(a) 左側の (5') HIV-1 LTR と、

(b) プシー (Ψ) パッケージングシグナルと、

(c) cPPT/FLAP と、

(d) RRE と、

(e) ヒト ABCD1 ポリペプチドをコードする cDNA に作動可能に連結した MND プロモーターと、

10

(f) 右側の (3') 自己不活性化 (SIN) HIV-1 LTR と、

(g) ウサギ β-グロビンポリアデニル化配列と、

を含み、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE) を含まないレンチウイルスベクター。

(項目 27)

項目 1 から 26 までのいずれか一項に記載のベクターを含む哺乳動物細胞。

(項目 28)

gag をコードする第 1 のポリヌクレオチド、pol をコードする第 2 のポリヌクレオチド、env をコードする第 3 のポリヌクレオチド、および項目 1 から 26 までのいずれか一項に記載のベクターを含むパッケージング細胞。

20

(項目 29)

項目 1 から 26 までのいずれか一項に記載のベクターを含む産生細胞。

(項目 30)

項目 29 に記載の産生細胞によって産生されるベクター粒子。

(項目 31)

(a) 少なくとも 1 つの LTR と、

(b) 中心ポリプリントラクト/DNA フラップ (cPPT/FLAP) と、

(c) レトロウイルス輸送エレメントと、

(e) ATP 結合性カセット、サブファミリー D、メンバー 1 (ABCD1) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した、小膠細胞において活性なプロモーターと

30

を含み、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE) を含まないベクター。

(項目 32)

(a) 少なくとも 1 つの LTR と、

(b) cPPT/FLAP と、

(c) RRE と、

(d) ヒト ABCD1 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した MND プロモーターと、

(e) ポリアデニル化配列と

を含み、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE) を含まないベクター。

40

(項目 33)

(a) 少なくとも 1 つの SIN HIV-1 LTR と、

(b) プシー (Ψ) パッケージングシグナルと、

(c) cPPT/FLAP と、

(d) RRE と、

(e) ヒト ABCD1 ポリペプチドをコードする cDNA に作動可能に連結した MND プロモーターと、

(f) ウサギ β-グロビンポリアデニル化配列と

を含み、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE) を含まないベクター。

(項目 34)

50

項目 3 1 から 3 3 までのいずれか一項に記載のベクターを用いて形質導入された宿主細胞。

(項目 3 5)

胚性幹細胞、体性幹細胞、または前駆細胞である、項目 3 4 に記載の形質導入された宿主細胞。

(項目 3 6)

造血幹細胞である、項目 3 5 に記載の形質導入された宿主細胞。

(項目 3 7)

遺伝子療法における、項目 3 1 から 3 3 までのいずれか一項に記載のウイルスベクターの使用。

10

(項目 3 8)

前記遺伝子療法により副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を治療または予防する、項目 3 7 に記載の使用。

(項目 3 9)

副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を治療する方法であって、被験体に、項目 3 1 から 3 3 までのいずれか一項に記載のベクターを用いて形質導入された細胞を投与することを含む、方法。

(項目 4 0)

前記細胞が胚性幹細胞、体性幹細胞、または前駆細胞である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記細胞が造血幹細胞である、項目 3 9 に記載の方法。

20

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図 1】図 1 は、前臨床試験および臨床試験において使用した MND-A L D ベクター構築物の概略マップを示す。全てのベクターが、高レベルの発現のために MND プロモーターの制御下にあるヒト A B C D-1 の c D N A を有する。p L B P 1 0 0 および p L B P 1 4 0 に対する安全性修飾は、g a g コード領域内の 2 つの終止コドン、右側の H I V L T R の U 3 内に 4 0 0 b p の欠失、およびウサギ β -グロビンポリ A (r β g p p A) シグナルを含む。H I V L T R はヒト免疫不全 1 型ウイルスの長い末端反復であり、 Ψ + はパッケージングシグナルであり、c P P T / F L A P は中心ポリプリントラクトであり、R R E は R e v 応答性エレメントであり、p p t はポリプリントラクトである。p L B P 1 4 0 は、p L B P 1 0 0 ベクターとは、突然変異しているが (m u t 6) 機能的なウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (Δ W P R E) が導入されていることによって異なる。

30

【図 2】図 2 は、実験における p L B P 1 0 0 レンチウイルスベクターおよび p L B P 1 4 0 レンチウイルスベクターを用いた形質導入ならびに短期の液体培養およびメチルセルロース (m e t h y c e l l u l o s e) 培養を示す。

【図 3】図 3 は、p L B P 1 0 0 レンチウイルスベクターおよび p L B P 1 4 0 レンチウイルスベクターを用いた形質導入、その後の短期の液体培養およびメチルセルロース培養または支持 M S 5 間質における長期の培養を示す。

40

【図 4】図 4 は、正常なヒト C D 3 4 + 細胞を形質導入した後の骨髓系前駆体 (C F U - G M ; 図 4 A) および赤血球前駆体 (B F U - E ; 図 4 B) の数を示す。形質導入は、p L B P 1 0 0 (p 1 0 0) または p L B P 1 4 0 (p 1 4 0) のいずれかを使用して実施し、4 つの別々の実験を伴った。

【図 5】図 5 は、L T C - I C の頻度を示す。限界希釈および 5 週間の間質共培養の後、L - C a l c (商標) プログラムを使用した、9 5 % 信頼区間での二次的 C F C の計数および頻度の推定のためにメチルセルロース培養に移した。

【図 6-1】図 6 は、短期前駆体へのベクター組み込みの効率を示す。(A) 液体培養中 7 日、1 4 日、2 8 日、3 1 日および 3 5 日の時点の細胞におけるベクターのコピー数 (V C N)。(B) プールした 1 4 日目の C F C 培養物からの平均 V C N。(C) パーセン

50

トベクター陽性骨髄系コロニー。分析された陽性コロニー数および総コロニー数が示されている。

【図6-2】図6は、短期前駆体へのベクター組み込みの効率を示す。(A)液体培養中7日、14日、28日、31日および35日の時点の細胞におけるベクターのコピー数(VCN)。(B)プールした14日目のCF C培養物からの平均VCN。(C)パーセントベクター陽性骨髄系コロニー。分析された陽性コロニー数および総コロニー数が示されている。

【図7】図7は、短期前駆体対長期(LTC-IC)前駆体のベクター組み込みの効率を示す。(A)プールした14日目のCF C培養物からの平均VCN。(B)パーセントベクター陽性骨髄系コロニー。分析された陽性コロニー数および総コロニー数が示されている。

10

【図8-1】図8は、フローサイトメトリーによる、形質導入された細胞におけるALDタンパク質(ALDP)発現を示す。(A1およびA2)異なる実験からのモック形質導入細胞、pLBP100形質導入細胞およびpLBP140形質導入細胞についてのPE蛍光を示すヒストグラム。(B)7日(実験072010および091410)、14日(実験081010)および28日(実験080610)の時点のパーセントALDP陽性細胞。(C)ALDP+細胞の中でALDP発現の相対レベルを示すモック対照に対する比としてのMFI。

【図8-2】図8は、フローサイトメトリーによる、形質導入された細胞におけるALDタンパク質(ALDP)発現を示す。(A1およびA2)異なる実験からのモック形質導入細胞、pLBP100形質導入細胞およびpLBP140形質導入細胞についてのPE蛍光を示すヒストグラム。(B)7日(実験072010および091410)、14日(実験081010)および28日(実験080610)の時点のパーセントALDP陽性細胞。(C)ALDP+細胞の中でALDP発現の相対レベルを示すモック対照に対する比としてのMFI。

20

【図8-3】図8は、フローサイトメトリーによる、形質導入された細胞におけるALDタンパク質(ALDP)発現を示す。(A1およびA2)異なる実験からのモック形質導入細胞、pLBP100形質導入細胞およびpLBP140形質導入細胞についてのPE蛍光を示すヒストグラム。(B)7日(実験072010および091410)、14日(実験081010)および28日(実験080610)の時点のパーセントALDP陽性細胞。(C)ALDP+細胞の中でALDP発現の相対レベルを示すモック対照に対する比としてのMFI。

30

【図9】図9は、MND-ALDベクター構築物の概略マップを示す。ベクターは高レベルの発現のためにMNDプロモーターの制御下にあるヒトABCD-1のcDNAを有する。HIV LTRはヒト免疫不全1型ウイルスの長い末端反復であり、Ψ+はパッケージングシグナルであり、cPPT/FLAPは中心的なポリプリントラクトであり、RREはRev応答性エレメントであり、pptはポリプリントラクトである。ベクターはWPRE配列を含有しない。

【図10】図10は、p100およびp140を種々のMOIで用いて形質導入した4496細胞におけるモックに対するVLCFA補正の比対VCNを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0055】

A. 概要

本発明は、一般に、副腎脳白質ジストロフィおよび副腎脊髄神経障害に対するより安全かつより効率的なウイルスベクターおよび形質導入細胞療法を対象とする。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、出願人らは、ALDの少年の造血幹細胞は他の点では正常であり、また、小膠細胞は骨髄起源であるので、被験体の造血幹細胞において欠陥のあるABCD1遺伝子に正常なABCD1のcDNAを補充することにより、脳小膠細胞におけるALDPレベルを正常化することができることを意図している。したがって、本発明のベクターを使用して正常なABCD1のcDNAを自己由来のCD34+造

50

血幹細胞に *ex vivo* 遺伝子移入し、その後、骨髄アブレーション後に移植することにより、CNS機能の安定化およびALDの致死的影響に関連する血漿VLCFAレベルの低下をもたらすことができる。

【0056】

したがって、本発明の組成物および方法は、それにより、造血生着不全のリスクを有意に減少させ、また急性GvHDおよび慢性GvHDを排除しながら急速に治療することが可能になるので、ALDの少年の治療における大幅な医学的進歩を示す可能性がある。急速なCNSの悪化およびHCTを用いて疾患の安定化がみられるまでに12～18カ月の待ち時間の潜在性があるので、時間はこの集団において非常に核心的なものである。

【0057】

本発明の実施では、特に反対のことが示されなければ、分子生物学の従来の方法および当技術分野の技術の範囲内の組換えDNA技法が用いられ、その多くが例示のために下に記載されている。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版、1989年)；Maniatisら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982年)；DNA Cloning: A Practical Approach、I巻およびII巻(D. Glover編)；*Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait編、1984年)；*Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins編、1985年)；*Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins編、1984年)；*Animal Cell Culture* (R. Freshney編、1986年)；*A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal編、1984年)を参照されたい。

【0058】

本明細書において引用されている全ての刊行物、特許および特許出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0059】

B. 定義

別段の定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。本発明の目的に関して、以下の用語が下で定義されている。

【0060】

本明細書で使用される場合、「レトロウイルス」という用語は、そのゲノムRNAを直鎖状の二本鎖DNAコピーに逆転写し、その後、そのゲノムDNAを宿主ゲノム内に共有結合により組み込むRNAウイルスを指す。レトロウイルスは、短い二量体形成領域を有する一本鎖RNAゲノムの2つのコピーを保有する非正二十面体の、エンベロップを有する多数のウイルスで構成される *Retroviridae* 科に属する。レトロウイルスは遺伝子を送達するための一般的なツールである(Miller、2000年、*Nature*、357巻：455～460頁)。ウイルスが宿主ゲノムに組み込まれたら、そのウイルスは「プロウイルス」と称される。プロウイルスは、RNAポリメラーゼIIの鋳型としての機能を果たし、新しいウイルス粒子を産生するために必要な構造タンパク質および酵素をコードするRNA分子の発現を導く。

【0061】

例示的なレトロウイルスとしては、これだけに限定されないが、モロニーマウス白血病ウイルス(M-MuLV)、モロニーマウス肉腫ウイルス(MoMSV)、ハーベイマウス肉腫ウイルス(HaMuSV)、マウス乳腺癌ウイルス(MuMTV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、ネコ白血病ウイルス(FLV)、スプーマウイルス、フレンドマウス白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス(MSCV)およびラウス肉腫ウイルス(RSV)およびレンチウイルスが挙げられる。

【0062】

本明細書で使用される場合、「レンチウイルス」という用語は、複合レトロウイルスの群（または属）を指す。例示的なレトロウイルスとしては、これだけに限定されないが、H I V（H I V 1型、およびH I V 2型を含めたヒト免疫不全ウイルス）；ビスナ・マエディウイルス（V M V）ウイルス；ヤギ関節炎脳炎ウイルス（C A E V）；ウマ伝染性貧血ウイルス（E I A V）；ネコ免疫不全ウイルス（F I V）；ウシ免疫不全ウイルス（B I V）；サル免疫不全ウイルス（S I V）が挙げられる。一実施形態では、H I Vに基づくベクターの骨格（すなわち、H I Vシス作用性配列エレメント）が好ましい。

【0063】

レトロウイルスベクター、より詳細にはレンチウイルスベクターを本発明の実施において使用することができる。したがって、「レトロウイルス」または「レトロウイルスベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、それぞれ「レンチウイルス」および「レンチウイルスベクター」を包含するものとする。

【0064】

「ベクター」という用語は、本明細書では、別の核酸分子を移行または運搬することができる核酸分子を指すために使用される。移行される核酸は、一般に、ベクター核酸分子と連結している、例えば、それに挿入されている。ベクターは、細胞における自律複製を導く配列を含んでもよく、宿主細胞のD N Aへの組み込みを可能にするために十分な配列を含んでもよい。有用なベクターとしては、例えば、プラスミド（例えば、D N AプラスミドまたはR N Aプラスミド）、コスミド、細菌性人工染色体、およびウイルスベクターが挙げられる。有用なウイルスベクターとしては、例えば、複製欠損性のレトロウイルスおよびレンチウイルスが挙げられる。

【0065】

当業者には明らかになる通り、「ウイルスベクター」という用語は、広く使用されており、一般には核酸分子の移行または細胞のゲノムへの組み込みを容易にするウイルス由来の核酸エレメントを含む核酸分子（例えば、移行プラスミド）、または核酸の移行を媒介するウイルス粒子のいずれかを指す。ウイルス粒子は、一般には、種々のウイルスの構成成分を含み、時には核酸（複数可）に加えて宿主細胞の構成成分も含む。

【0066】

ウイルスベクターという用語は、核酸を細胞内に移行することができるウイルスもしくはウイルス粒子、または移行された核酸自体のいずれかを指す場合がある。ウイルスベクターおよび移行プラスミドは、主にウイルスに由来する構造的遺伝エレメントおよび／または機能的遺伝エレメントを含有する。「レトロウイルスベクター」という用語は、主にレトロウイルスに由来する構造的遺伝エレメントおよび機能的遺伝エレメントを含有するウイルスベクターまたはプラスミドを指す。「レンチウイルスベクター」という用語は、主にレンチウイルスに由来するL T Rを含めた構造的遺伝エレメントおよび機能的遺伝エレメントを含有するウイルスベクターまたはプラスミドを指す。「ハイブリッド」という用語は、レトロウイルス、例えば、レンチウイルスの配列と非レンチウイルスのウイルス配列の両方を含有するベクター、L T Rまたは他の核酸を指す。一実施形態では、ハイブリッドベクターとは、逆転写、複製、組み込みおよび／またはパッケージングのためのレトロウイルス、例えば、レンチウイルスの配列、ならびにアルファウイルスサブゲノムプロモーター配列、非構造タンパク質、ならびに／あるいはポリメラーゼ認識部位を含むベクターまたは移行プラスミドを指す。

【0067】

特定の実施形態では、「レンチウイルスベクター」、「レンチウイルス発現ベクター」という用語は、レンチウイルス移行プラスミドおよび／または感染性レンチウイルス粒子を指すために使用することができる。本明細書において、クローニング部位、プロモーター、調節エレメント、異種核酸などのエレメントに言及している場合、これらのエレメントの配列は、本発明のレンチウイルス粒子ではR N A形態で存在し、本発明のD N AプラスミドではD N A形態で存在することが理解されるべきである。

【0068】

プロウイルスの各末端は「長い末端反復」または「LTR」と称される構造である。「長い末端反復（LTR）」という用語は、それらの天然の配列の状況では、直接反復であり、U3領域、R領域およびU5領域を含有する、レトロウイルスのDNAの末端に位置する塩基対のドメインを指す。LTRにより、一般に、レトロウイルスの遺伝子の発現（例えば、促進、開始および遺伝子転写物のポリアダニル化）およびウイルス複製の基礎をなす機能がもたらされる。LTRは、転写制御エレメント、ポリアダニル化シグナルおよびウイルスのゲノムの複製および組み込みのために必要な配列を含めた多数の調節シグナルを含有する。ウイルスLTRは、U3、RおよびU5と称される3つの領域に分けられる。U3領域はエンハンサーエレメントおよびプロモーターエレメントを含有する。U5領域はプライマー結合部位とR領域の間の配列であり、ポリアダニル化配列を含有する。R（反復）領域にはU3領域およびU5領域が隣接する。U3領域、R領域およびU5領域で構成されるLTRは、ウイルスのゲノムの5'末端および3'末端の両方に出現する。5'LTRにはゲノムの逆転写のために必要な配列（tRNAプライマー結合部位）および粒子へのウイルスRNAの効率的なパッケージングのために必要な配列（プシー部位）が近接している。

10

【0069】

本明細書で使用される場合、「パッケージングシグナル」または「パッケージング配列」という用語は、ウイルスカプシドまたは粒子内へのウイルスRNAの挿入のために必要な、レトロウイルスのゲノム内に位置する配列を指す。例えば、Cleverら、1995年 J. of Virology、69巻、4号；2101～2109頁を参照されたい。いくつかのレトロウイルスベクターは、ウイルスのゲノムのキャプシド形成のために必要な最小のパッケージングシグナル（プシー〔Ψ〕配列とも称される）を使用する。したがって、本明細書で使用される場合、「パッケージング配列」、「パッケージングシグナル」、「プシー」という用語および「Ψ」という符号は、ウイルス粒子形成の間のレトロウイルスのRNA鎖のキャプシド形成のために必要な非コード配列への言及に使用される。

20

【0070】

種々の実施形態では、ベクターは、修飾された5'LTRおよび／または3'LTRを含む。3'LTRの修飾は、多くの場合、ウイルスを複製欠損性にすることによってレンチウイルス系またはレトロウイルス系の安全性を改善するために行われる。本明細書で使用される場合、「複製欠損性」という用語は、完全な、有効な複製ができず、したがって、感染性ビリオンが産生されない（例えば、複製欠損性レンチウイルス後代）ウイルスを指す。「複製コンピテント」という用語は、複製することができ、したがって、ウイルスのウイルス複製により感染性ビリオン（例えば、複製コンピテントレンチウイルス後代）を産生することができる野生型ウイルスまたは変異体ウイルスを指す。

30

【0071】

「自己不活性化」（SIN）ベクターとは、1回目のウイルス複製を越えてウイルスが転写されることを防ぐために、U3領域として公知の右側の（3'）LTRのエンハンサープロモーター領域が修飾された（例えば、欠失または置換によって）複製欠損性ベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを指す。これは、ウイルス複製の間に右側の（3'）LTRのU3領域が左側の（5'）LTRのU3領域の鋳型として使用され、したがって、ウイルスの転写物はU3エンハンサープロモーターなしでは生じ得ないことに起因する。本発明の別の実施形態では、3'LTRは、U5領域が、例えば、理想的なポリ（A）配列に置き換わるように修飾されている。LTRに対する修飾、例えば、3'LTR、5'LTR、または3'LTRと5'LTRの両方に対する修飾なども、本発明に包含されることに留意するべきである。

40

【0072】

5'LTRのU3領域を、ウイルス粒子の産生の間にウイルスのゲノムの転写を駆動するための異種プロモーターで置き換えることによって、さらなる安全性の増強がもたらさ

50

れる。使用することができる異種プロモーターの例としては、例えば、ウイルス性のシミアンウイルス40 (SV40) プロモーター (例えば、初期または後期)、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (例えば、最初期)、モロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、および単純ヘルペスウイルス (HSV) (チミジンキナーゼ) プロモーターが挙げられる。典型的なプロモーターは、Tat に依存しない様式で高レベルの転写を駆動することができる。この置き換えにより、ウイルス産生系に完全なU3配列が存在しないので、複製コンピテントウイルスが生成される組換えの可能性が低下する。

【0073】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、TAR エlementを含む。「TAR」という用語は、レンチウイルス (例えば、HIV) のLTRのR領域に位置する「トランス活性化反応」遺伝Elementを指す。このElementは、レンチウイルスのトランス活性化因子 (tat) 遺伝Elementと相互作用して、ウイルス複製を増強する。しかし、このElementは、5' LTRのU3領域が異種プロモーターで置き換えられている実施形態では必要ない。

【0074】

「R領域」とは、レトロウイルスLTR内の、キャップ形成基の開始点 (すなわち、転写の開始点) で始まり、ポリAトラクトの開始点の直前で終わる領域を指す。R領域は、U3領域およびU5領域と隣接しているとも定義される。R領域は、逆転写の間に新生DNAをゲノムの一方の末端から他方の末端まで移行させることにおいて役割を果たす。

【0075】

本明細書で使用される場合、「FLAP Element」という用語は、その配列がレトロウイルス、例えば、HIV-1 または HIV-2 の中心ポリプリントラクトおよび中心終結配列 (cPPT および CTS) を含む核酸を指す。適切なFLAP Elementは米国特許第6,682,907号およびZennouら、2000年、Cell、101巻:173頁に記載されている。HIV-1の逆転写の間、中心ポリプリントラクト (cPPT) にあるプラス鎖DNAの中心開始点および中心終結配列 (CTS) にある中心終結点により、3本鎖DNA構造: HIV-1 中心DNAフラップの形成が導かれる。いかなる理論に縛られることも望むものではないが、DNAフラップは、レンチウイルスのゲノム核内移行のシス活性決定因子として働く可能性があり、かつ/またはウイルスの力価を増大させる可能性がある。特定の実施形態では、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの骨格は、ベクター内の、目的の異種遺伝子の上流または下流の1つまたは複数のFLAP Elementを含む。例えば、特定の実施形態では、移行プラスミドはFLAP Elementを含む。一実施形態では、本発明のベクターは、HIV-1 から単離されたFLAP Elementを含む。

【0076】

一実施形態では、レトロウイルス移行ベクターまたはレンチウイルス移行ベクターは、1つまたは複数の輸送Elementを含む。「輸送Element」という用語は、核から細胞の細胞質へのRNA転写物の輸送を調節するシス作用性転写後調節Elementを指す。RNA輸送Elementの例としては、これだけに限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) rev 応答Element (RRE) (例えばCullenら、1991年 J. Virol. 65巻:1053頁; Cullenら、1991年 Cell 58巻:423頁を参照されたい)、およびB型肝炎ウイルス転写後調節Element (HPRE) が挙げられる。一般に、RNA輸送Elementは遺伝子の3' UTR内に配置され、1つまたは多数のコピーとして挿入することができる。

【0077】

特定の実施形態では、ウイルスベクターにおける異種配列の発現は、転写後調節Element、および効率的なポリアデニル化部位、および場合によって、転写終結シグナルをベクターに組み入れることによって増大する。種々の転写後調節Element、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節Element (WPRE; Zuffereyら、199

10

20

30

40

50

9年、J. Virol.、73巻：2886頁）；B型肝炎ウイルスに存在する転写後調節エレメント（HPRE）（Huangら、Mol. Cell. Biol.、5巻：3864頁）；および同様のもの（Liuら、1995年、Genes Dev.、9巻：1766頁）により、タンパク質における異種核酸の発現が増大し得る。転写後調節エレメントは、一般に、異種核酸配列の3'末端に位置づけられる。この構成により、5'部分に異種核酸コード配列を含み、3'部分に転写後調節エレメント配列を含むmRNA転写物の合成がもたらされる。いくつかの場合には、WPREまたはHPREなどの転写後調節エレメントにより、細胞の形質転換のリスクが増大し、かつ／またはmRNA転写物の量が実質的にもしくは有意に増大しない、またはmRNAの安定性が増大しないので、好ましい実施形態では、本発明のベクターはこれらのエレメントを欠くまたはそれを含まない。したがって、いくつかの実施形態では、本発明のベクターは、追加的な安全対策としてWPREまたはHPREを欠くまたはそれを含まない。

10

【0078】

異種核酸転写物の効率的な終結およびポリアデニル化を導くエレメントにより、異種性の遺伝子発現が増大する。転写終結シグナルは、一般に、ポリアデニル化シグナルの下流に見いだされる。「ポリA部位」または「ポリA配列」という用語は、本明細書で 사용되는場合、RNAポリメラーゼIIによる新生RNA転写物の終結およびポリアデニル化の両方を導くDNA配列を指す。ポリA尾部を欠く転写物は不安定であり、急速に分解されるので、組換え転写物の効率的なポリアデニル化が望ましい。本発明のベクターに使用することができるポリAシグナルの実例としては、理想的なポリA配列（例えば、AATAA、ATTAAAGTAA）、ウシ成長ホルモンポリA配列（BGHPA）、ウサギβ-グロビンポリA配列（rβgpA）、または当技術分野で公知の別の適切な異種性または内在性のポリA配列が挙げられる。

20

【0079】

ある特定の実施形態では、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターは、インスレーターエレメントをさらに含む。インスレーターエレメントは、レンチウイルスにより発現された配列、例えば、治療用ポリペプチドを、ゲノムDNA内に存在するシス作用性エレメントによって媒介され、移行した配列の調節解除された発現をもたらす可能性がある組み込み部位の影響（すなわち、位置の影響；例えば、Burgess-Beusseら、2002年、Proc. Natl. Acad. Sci.、USA、99巻：16433頁；Zhanら、2001年、Hum. Genet.、109巻：471頁を参照されたい）から保護することに寄与し得る。いくつかの実施形態では、移行ベクターはLTRの一方または両方、または、細胞のゲノムに組み込むベクターの領域内の他の場所にインスレーターエレメントを含む。本発明において使用するための適切なインスレーターとしては、これだけに限定されないが、ニワトリβ-グロビンインスレーターが挙げられる（参照により本明細書に組み込まれるChungら、1993年 Cell 74巻：505頁；Chungら、1997年 PNAS 94巻：575頁；およびBellら、1999年 Cell 98巻：387頁を参照されたい）。インスレーターエレメントの例としては、これだけに限定されないが、ニワトリHS4などのβ-グロビン遺伝子座由来のインスレーターが挙げられる。

30

40

【0080】

本発明の特定の実施形態によると、ウイルスベクターの骨格配列の大部分または全ては、レンチウイルス、例えば、HIV-1に由来する。しかし、レンチウイルスの配列の多くの異なる供給源を用いることができ、特定のレンチウイルスの配列における多数の置換および変更を、移行ベクターの本明細書に記載の機能を行う能力を損なうことなく適応させることができることが理解されるべきである。さらに、種々のレンチウイルスベクターが当技術分野で公知であり、そのいずれも本発明のウイルスベクターまたは移行プラスミドを作製するために適合させることができる。Naldiniら、（1996年a、1996年b、および1998年）；Zuffereyら、（1997年）；Dullら、1998年、米国特許第6,013,516号；および同第5,994,136号を参照さ

50

りたい。

【0081】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、メッセンジャーRNA (mRNA)、RNA、ゲノムRNA (gRNA)、プラス鎖RNA (RNA (+))、マイナス鎖RNA (RNA (-))、ゲノムDNA (gDNA)、相補DNA (cDNA) またはDNAを指す。ポリヌクレオチドは一本鎖ポリヌクレオチドおよび二本鎖ポリヌクレオチドを包含する。本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載の参照配列 (例えば、配列表を参照されたい) のいずれかに対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するポリヌクレオチドまたは変異体を包含し、一般には変異体が参照配列の少なくとも1つの生物活性を維持することが好ましい。種々の例示的な実施形態では、本発明は、一部において、ウイルスベクターおよび移行プラスミドのポリヌクレオチド配列、ならびにそれを含む組成物を意図している。特定の実施形態では、本発明は、治療用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

10

【0082】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド変異体」および「変異体」などの用語は、参照ポリヌクレオチド配列、または参照配列と下で定義されているストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドと実質的な配列同一性を示すポリヌクレオチドを指す。これらの用語は、参照ポリヌクレオチドと比較して1つまたは複数のヌクレオチドが付加もしくは欠失している、または異なるヌクレオチドに置き換えられているポリヌクレオチドを包含する。この点について、参照ポリヌクレオチドに、変更されたポリヌクレオチドに参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性が保持される突然変異、付加、欠失および置換を含めた特定の変更を行うことができることが当技術分野ではよく理解されている。

20

【0083】

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、そのネイティブな状態では通常それに付随する構成成分を実質的にまたは基本的に含まない材料を意味する。例えば、「単離されたポリヌクレオチド」とは、本明細書で使用される場合、天然に存在する状態で隣接する配列から精製されたポリヌクレオチド、例えば、通常はその断片に近接する配列から取り出されたDNA断片を指す。

30

【0084】

ポリヌクレオチドの方向を説明する用語としては、5' (通常、ポリヌクレオチドの遊離ホスフェート基を有する末端) および3' (通常、ポリヌクレオチドの遊離ヒドロキシル(OH)基を有する末端) が挙げられる。ポリヌクレオチド配列は、5' から3' の方向または3' から5' の方向にアノテートされ得る。

【0085】

「相補的な」および「相補性」という用語は、塩基対合規則によって関連するポリヌクレオチド (すなわち、ヌクレオチドの配列) を指す。例えば、DNA配列5' AGTCATG 3' の相補鎖は3' TCAGTAC 5' である。後者の配列は多くの場合、逆相補体として左側に5' 末端、右側に3' 末端の5' CATGACT 3' と書かれる。その逆相補体と等しい配列は、パリンドローム配列であると言える。相補性は、塩基対合規則に従って核酸の塩基の一部のみがマッチする場合、「部分的」であり得る。または、核酸間には「完全な」または「全体的な」相補性があり得る。

40

【0086】

「核酸カセット」という用語は、本明細書で使用される場合、RNA、その後、タンパク質を発現させることができるベクター内の遺伝子配列を指す。核酸カセットは、目的の遺伝子を含む。核酸カセットは、ベクター内で位置的におよび逐次的に方向付けられ、したがって、カセット内の核酸がRNAに転写され、必要な場合にはタンパク質またはポリペプチドに翻訳され、形質転換された細胞における活性のために必要な適切な翻訳後

50

修飾を受け、適切な細胞内区画にターゲティングされるまたは細胞外区画に分泌されることによって生物活性に適した区画にトランスロケーションされ得る。カセットは、ベクターへの迅速な挿入に適した3'末端および5'末端を有することが好ましく、例えば、カセットは、各末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を有する。本発明の好ましい実施形態では、核酸カセットは、副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を治療するために使用する治療用遺伝子の配列を含有する。カセットは、単一の単位としてプラスミドまたはウイルスベクターから除去することおよびそれに挿入することができる。

【0087】

ポリヌクレオチドとは目的のポリヌクレオチドを包含する。本明細書で使用される場合、「目的のポリヌクレオチド」という用語は、ポリヌクレオチド、例えば、発現することが望まれる発現ベクターに挿入された、ポリペプチド（すなわち、目的のポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドを指す。ある特定の実施形態では、目的のポリヌクレオチドは、「治療用ポリペプチド」と称することができる、疾患または障害の治療または予防における治療効果をもたらすポリペプチド、例えば、ATP結合性カセット、サブファミリーD（ALD）、メンバー1（ABCD1）遺伝子をコードする。目的のポリヌクレオチド、およびそれにコードされるポリペプチドは、野生型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにその機能的変異体および断片の両方を包含する。特定の実施形態では、機能的な変異体は、対応する野生型参照ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の同一性を有する。ある特定の実施形態では、機能的な変異体または断片は、対応する野生型ポリペプチドの生物活性の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%を有する。本発明において使用するために適した代表的なポリヌクレオチド配列としては、これだけに限定されないが、配列番号1～2に記載のヒトACBD1のcDNAが挙げられる。

【0088】

本発明のポリヌクレオチドは、コード配列自体の長さにかかわらず、他のDNA配列、例えば、本明細書の他の箇所で開示されているまたは当技術分野で公知のプロモーターおよび／またはエンハンサー、非翻訳領域（UTR）、コザック配列、ポリアデニル化シグナル、追加的な制限酵素部位、多重クロニング部位、配列内リボソーム進入部位（IRES）、リコンビナーゼ認識部位（例えば、LoxP部位、FRT部位、およびAtt部位）、終結コドン、転写終結シグナル、および自己切断性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、エピトープタグなどと組み合わせることができ、したがって、それらの全体の長さは相当に変動してよい。したがって、ほぼどんな長さのポリヌクレオチド断片も用いることができ、全長は調製の容易さおよび意図された組換えDNAプロトコールにおける使用によって限定されることが好ましいことが意図されている。

【0089】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼが結合するポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）の認識部位を指す。「エンハンサー」という用語は、転写の増強をもたらすことができ、いくつかの場合には別の制御配列に対するそれらの方向とは独立して機能することができる配列を含有するDNAのセグメントを指す。エンハンサーは、プロモーターおよび／または他のエンハンサーエレメントと協同的または相加的に機能することができる。「プロモーター／エンハンサー」という用語は、プロモーター機能とエンハンサー機能の両方をもたらすことができる配列を含有するDNAのセグメントを指す。一実施形態では、本発明のベクターは、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域の欠失、dl587revプライマー結合部位置換（MND）プロモーターを含む（Challitara、J Virol. 69巻（2号）：748～55頁（1995年）；配列番号3）。

【0090】

特定の実施形態では、本発明のベクターは、外因性、内在性、または異種性の制御配列、例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサーなどを含む。「内在性の」制御配列

とは、ゲノム内の所与の遺伝子と天然に連結している制御配列である。「外因性の」制御配列とは、遺伝子操作（すなわち、分子生物学的技法）によって遺伝子の近位に配置され、したがってその遺伝子の転写が、連結したエンハンサー／プロモーターによって導かれるような制御配列である。「異種性の」制御配列は、遺伝的に操作される細胞とは異なる種由来の外因性の配列である。

【0091】

「作動可能に連結した」という用語は、記載されている構成成分が、それらの意図された様式で機能することを可能にする関係にある近位を指す。一実施形態では、この用語は、核酸発現制御配列（例えば、プロモーター、および／またはエンハンサーなど）と第2のポリヌクレオチド配列、例えば、目的のポリヌクレオチドとの間の機能的な連結を指し、発現制御配列により、第2の配列に対応する核酸の転写が導かれる。

10

【0092】

本明細書で使用される場合、「構成的プロモーター」という用語は、作動可能に連結した配列の転写を継続的または連続的に可能にするプロモーターを指す。構成的プロモーターは、多種多様な細胞および組織の型における発現を可能にする「遍在するプロモーター」であってもよく、制限された種類の細胞および組織の型の発現を可能にする「組織特異的プロモーター」であってもよい。例示的な遍在するプロモーターとしては、これだけに限定されないが、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター、ウイルス性のシミアンウイルス40（SV40）（例えば、初期または後期）、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）LTRプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTR、単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）プロモーター、ワクシニアウイルス由来のH5プロモーター、P7.5プロモーター、およびP11プロモーター、伸長因子1-アルファ（EF1a）プロモーター、初期増殖応答1（EGR1）、フェリチンH（FerH）、フェリチンL（FerL）、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、真核生物翻訳開始因子4A1（EIF4A1）、熱ショック70kDaタンパク質5（HSPA5）、熱ショックタンパク質90kDaベータ、メンバー1（HSP90B1）、熱ショックタンパク質70kDa（HSP70）、β-キネシン（β-KIN）、ヒトROSA26遺伝子座（Irionsら、Nature Biotechnology 25巻、1477～1482頁（2007年））、ユビキチンCプロモーター（UBC）、ホスホグリセリン酸キナーゼ1（PGK）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ-アクチン（CAG）プロモーター、およびβ-アクチンプロモーターが挙げられる。

20

30

【0093】

特定の実施形態では、組織特異的プロモーターを使用して、所望のポリヌクレオチド配列の細胞型特異的、系列特異的、または組織特異的な発現を実現すること（例えば、ポリペプチドをコードする特定の核酸をある細胞型もしくは組織のサブセットにおいてのみ、または特定の発生段階にのみ発現させること）が望ましい場合がある。組織特異的プロモーターの実例としては、これだけに限定されないが、B29プロモーター（B細胞での発現）、runt転写因子（CBF2）プロモーター（幹細胞に特異的な発現）、CD14プロモーター（単核球細胞での発現）、CD43プロモーター（白血球および血小板での発現）、CD45プロモーター（造血細胞での発現）、CD68プロモーター（マクロファージでの発現）、CYP450 3A4プロモーター（肝細胞での発現）、デスミンプロモーター（筋肉での発現）、エラスターゼ1プロモーター（膵腺房細胞での発現、エンドグリンプロモーター（内皮細胞での発現）、線維芽細胞に特異的なタンパク質1プロモーター（FSP1）プロモーター（線維芽細胞での発現）、フィブロネクチンプロモーター（線維芽細胞での発現）、fms関連チロシンキナーゼ1（FLT1）プロモーター（内皮細胞での発現）、グリア線維酸性タンパク質（GFAP）プロモーター（星状膠細胞での発現）、インスリンプロモーター（膵ベータ細胞での発現）、インテグリン、アルファ2b（ITGA2B）プロモーター（巨核球）、細胞内接着分子2（ICAM-2）プロモーター（内皮細胞）、インターフェロンベータ（IFN-β）プロモーター（造血

40

50

細胞)、ケラチン5プロモーター(ケラチノサイトでの発現)、ミオグロビン(MB)プロモーター(筋肉での発現)、筋分化1(MYOD1)プロモーター(筋肉での発現)、ネフリンプロモーター(有足細胞での発現)、骨ガンマーカルボキシグルタミン酸タンパク質2(OG-2)プロモーター(骨芽細胞での発現)、3-オキソ酸CoAトランスフェラーゼ2B(Oxc2B)プロモーター、(一倍体-精子細胞での発現)、サーファクタントタンパク質B(SP-B)プロモーター(肺での発現)、シナプシンプロモーター(ニューロンでの発現)、ウィスコット・アルドリッチ症候群タンパク質(WASP)プロモーター(造血細胞での発現)が挙げられる。

【0094】

一実施形態では、本発明のベクターは、所望のポリペプチド、例えばABCD1を小腸細胞において発現させる組織特異的プロモーターおよび/またはエンハンサー、例えば、MNDプロモーター(配列番号3)を含む。

【0095】

本明細書で使用される場合、「条件発現」とは、これだけに限定されないが、誘導性発現;抑圧可能な発現;特定の生理的、生物学的、または疾患の状態を有する細胞または組織における発現などを含めた任意の種類の条件発現を指し得る。この定義は、細胞型または組織に特異的な発現を排除するものではない。本発明のある特定の実施形態は、例えば、細胞、組織、生物体などを、ポリヌクレオチドの発現を引き起こす処理もしくは条件、または目的のポリヌクレオチドによりコードされるポリヌクレオチドの発現の増大または減少を引き起こす処理または条件に供することによって発現が制御される、目的のポリヌクレオチドの条件発現を提供する。

【0096】

誘導性プロモーター/系の実例としては、これだけに限定されないが、ステロイド誘導性プロモーター、例えば、グルココルチコイドまたはエストロゲン受容体をコードする遺伝子のプロモーターなど(対応するホルモンで処理することによって誘導される)、メタロチオネイン(metallothionein)プロモーター(種々の重金属で処理することによって誘導される)、MX-1プロモーター(インターフェロンによって誘導される)、「GeneSwitch」ミフエプリストン調節可能系(Sirinら、2003年、Gene、323巻:67頁)、クメート(cumate)誘導性遺伝子スイッチ(WO2002/088346)、テトラサイクリン依存性調節系などが挙げられる。

【0097】

条件発現は、部位特異的DNAリコンビナーゼを使用することによって実現することもできる。本発明のある特定の実施形態によると、ベクターは、部位特異的リコンビナーゼによって媒介される組換えのための部位を少なくとも1つ(一般には2つ)含む。本明細書で使用される場合、「リコンビナーゼ」または「部位特異的リコンビナーゼ」という用語は、野生型タンパク質であってよい、1箇所または複数箇所の組換え部位(例えば、2箇所、3箇所、4箇所、5箇所、7箇所、10箇所、12箇所、15箇所、20箇所、30箇所、50箇所など)が関与する組換え反応に関与する切除的または統合的なタンパク質、酵素、補因子または関連するタンパク質(Landy、Current Opinion in Biotechnology 3巻:699~707頁(1993年)を参照されたい)、またはその突然変異体、誘導体(例えば、組換えタンパク質配列またはその断片を含有する融合タンパク質)、断片、および変異体を包含する。本発明の特定の実施形態において使用するために適したリコンビナーゼの実例としては、これだけに限定されないが、Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、ΦC31、Cin、Tn3リゾルバーゼ、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1、およびParAが挙げられる。

【0098】

ベクターは、多種多様な部位特異的リコンビナーゼのいずれかのための1箇所または複数箇所の組換え部位を含んでよい。部位特異的リコンビナーゼの標的部位は、ベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの組み込みのために必要

な任意の部位（複数可）に加えたものであることが理解されるべきである。本明細書で
使用される場合、「組換え配列」、「組換え部位」または「部位特異的な組換え部位」とい
う用語は、リコンビナーゼが認識し、結合する特定の核酸配列を指す。

【0099】

例えば、Creリコンビナーゼのための1つの組換え部位は、8塩基対のコア配列と隣
接した13塩基対の逆方向反復（リコンビナーゼ結合部位としての機能を果たす）を2つ
含む34塩基対の配列であるloxPである（Sauer, B., Current O
pinion in Biotechnology 5巻：521～527頁（1994
年）の図1を参照されたい）。他の例示的なloxP部位としては、これだけに限定され
ないが、lox511（Hoessら、1996年；BethkeおよびSauer、1
997年）、lox5171（LeeおよびSaito、1998年）、lox2272
（LeeおよびSaito、1998年）、m2（Langerら、2002年）、lo
x71（Albertら、1995年）、およびlox66（Albertら、1995
年）が挙げられる。

10

【0100】

FLPリコンビナーゼのために適切な認識部位としては、これだけに限定されないが、
FRT（McLeodら、1996年）、F₁、F₂、F₃（SchlakeおよびBo
de、1994年）、F₄、F₅（SchlakeおよびBo de、1994年）、FR
T（LE）（Senecoffら、1988年）、FRT（RE）（Senecoffら
、1988年）が挙げられる。

20

【0101】

認識配列の他の例は、attB配列、attP配列、attL配列、およびattR配
列であり、これらはリコンビナーゼ酵素λインテグラーゼ、例えばフィーC31によって
認識される。φC31SSRは、ヘテロタイプの部位attB（長さ34bp）とatt
P（長さ39bp）の間の組換えのみを媒介する（Grothら、2000年）。att
BおよびattPは、それぞれ、細菌ゲノムおよびファージゲノムに対するファージイン
テグラーゼの付着部位に対して名づけられ、どちらも、φC31ホモ二量体が結合する可
能性がある不完全な逆方向反復を含有する（Grothら、2000年）。産物の部位で
あるattLおよびattRは、さらなるφC31媒介性組換えに対して有効に不活性で
あり（Beltekirら、2003年）、それにより反応が不可逆になる。挿入を触媒
するために、ゲノムのattP部位へのattBを有するDNAの挿入が、ゲノムのatt
B部位へのattP部位の挿入よりも容易であることが見いだされている（Thyag
arajanら、2001年；Beltekirら、2003年）。したがって、典型的な
戦略では、相同組換えによってattPを有する「ドッキング部位」を定義済みの遺伝子
座に位置づけ、次いでそれを挿入のために、attBを有する入ってくる配列とパートナ
ーにする。

30

【0102】

本明細書で使用される場合、「配列内リボソーム進入部位」または「IRES」とは、
ATGなどの開始コドンへのシストロン（タンパク質をコードする領域）の直接配列内リ
ボソーム進入を促進し、それにより、キャップに依存しない遺伝子の翻訳を導くエレメン
トを指す。例えば、Jacksonら、1990年Trends Biochem Sci 15巻（12号）：477～83頁）およびJacksonおよびKaminski
、1995年RNA 1巻（10号）：985～1000頁を参照されたい。特定の
実施形態では、本発明によって意図されているベクターは、1つまたは複数のポリペプチ
ドをコードする1つまたは複数の目的のポリヌクレオチドを含む。複数のポリペプチドの
それぞれの効率的な翻訳を実現するために、ポリヌクレオチド配列を1つまたは複数のI
RES配列または自己切断性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列によって分
離することができる。

40

【0103】

本明細書で使用される場合、「コザック配列」という用語は、mRNAのリボソームの

50

小サブユニットへの最初の結合を著しく容易にし、翻訳を増大させる短いヌクレオチド配列を指す。コンセンサスコザック配列は (G C C) R C C A T G G であり、R はプリン (A または G) である (K o z a k、1986 年 C e l l、44 巻 (2 号): 283 ~ 92 頁、および K o z a k、1987 年 N u c l e i c A c i d s R e s.、15 巻 (20 号): 8125 ~ 48 頁)。特定の実施形態では、本発明によって意図されているベクターは、コンセンサスコザック配列を有するポリヌクレオチドおよび所望のポリペプチド、例えば、A B C D 1 をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0104】

特定の実施形態では、ベクターは、発現させようとするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの 3' 側にあるポリアデニル化配列を含む。ポリアデニル化配列は、コード配列の 3' 末端にポリ A 尾部を付加することによって mRNA の安定性を促進し、したがって、翻訳の効率の上昇に寄与し得る。認識されるポリアデニル化部位としては、理想的なポリ A 配列 (例えば、A A T A A A、A T T A A A A G T A A A)、ウシ成長ホルモンポリ A 配列 (B G H p A)、ウサギ β -グロビンポリ A 配列 (r β g p A)、または当技術分野で公知の別の適切な異種性または内在性のポリ A 配列が挙げられる。

【0105】

ある特定の実施形態では、ベクターは、選択マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、ハイグロマイシン、メトトレキセート、ゼオシン、ブラストサイジン、またはテトラサイクリンに対する耐性を付与する、(b) 栄養要求性欠損を補完する、または (c) 複合培地からは入手不可能な重大な栄養分を供給するタンパク質をコードする (例えば、バチルス属の D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子)。任意の数の選択系を用いて、形質転換された細胞株を回収することができる。それらとしては、これだけに限定されないが、それぞれ tk 細胞または a p r t 細胞において使用することができる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (W i g l e r ら、1977 年 C e l l 11 巻: 223 ~ 232 頁) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (L o w y ら、1990 年 C e l l 22 巻: 817 ~ 823 頁) が挙げられる。

【0106】

「宿主細胞」とは、i n v i v o または i n v i t r o において、本発明の組換えベクターまたはポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトするまたは感染させる細胞を包含する。宿主細胞は、パッケージング細胞、産生細胞、およびウイルスベクターを感染させる細胞を含んでよい。特定の実施形態では、本発明のウイルスベクターを感染させた宿主細胞を、療法を必要とする被験体に投与する。

【0107】

妥当なウイルス力価を実現するためには、多くの場合、大規模なウイルス粒子産生が必要である。ウイルス粒子は、移行ベクターをウイルスの構造遺伝子および/またはアクセサリ遺伝子、例えば、g a g 遺伝子、p o l 遺伝子、e n v 遺伝子、t a t 遺伝子、r e v 遺伝子、v i f 遺伝子、v p r 遺伝子、v p u 遺伝子、v p x 遺伝子、または n e f 遺伝子または他のレトロウイルスの遺伝子を含むパッケージング細胞系にトランスフェクトすることによって産生される。

【0108】

本明細書で使用される場合、「パッケージングベクター」という用語は、パッケージングシグナルを欠き、1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたはそれ以上のウイルスの構造遺伝子および/またはアクセサリ遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターまたはウイルスベクターを指す。一般には、パッケージングベクターはパッケージング細胞に含まれ、トランスフェクション、形質導入または感染によって細胞に導入される。トランスフェクション、形質導入または感染のための方法は当業者に周知である。本発明のレトロウイルス/レンチウイルス移行ベクターを、トランスフェクション、形質導入または感染によってパッケージング細胞系に導入して、産生細胞または産生細胞株を生成することができる。本発明のパッケージングベクターは、例えば、リン酸カルシウムトランスフェク

10

20

30

40

50

ション、リポフェクションまたは電気穿孔を含めた標準の方法によってヒト細胞または細胞株に導入することができる。いくつかの実施形態では、パッケージングベクターを、優性選択マーカー、例えば、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン、ゼオシン、チミジンキナーゼ、DHFR、Gln合成酵素またはADAなどと一緒に細胞に導入し、その後、適切な薬物の存在下でクローンを選択し、単離することができる。選択マーカー遺伝子は、コード遺伝子に、パッケージングベクターによって、例えば、IRESまたは自己切断性ウイルスペプチドによって物理的に連結させることができる。

【0109】

ウイルスエンベロープタンパク質 (env) により、細胞株から生成される組換えレトロウイルスによって最終的に感染させ、形質転換することができる宿主細胞の範囲が決定される。レンチウイルス、例えば、HIV-1、HIV-2、SIV、FIVおよびEIVなどの場合では、envタンパク質としてはgp41およびgp120が挙げられる。以前に記載されている通り、本発明のパッケージング細胞によって発現されるウイルスenvタンパク質は、ウイルスのgag遺伝子およびpol遺伝子とは別のベクター上にコードされることが好ましい。

【0110】

本発明において使用することができるレトロウイルス由来のenv遺伝子の実例としては、これだけに限定されないが、MLVエンベロープ、10A1エンベロープ、BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、Ebola、Sendai、FPV（家禽ペストウイルス）、およびインフルエンザウイルスエンベロープが挙げられる。同様に、RNAウイルス（例えば、Picornaviridae科、Calciviridae科、Astroviridae科、Togaviridae科、Flaviviridae科、Coronaviridae科、Paramyxoviridae科、Rhabdoviridae科、Filoviridae科、Orthomyxoviridae科、Bunyaviridae科、Arenaviridae科、Reoviridae科、Birnaviridae科、Retroviridae科のRNAウイルス）由来のエンベロープならびにDNAウイルス（Hepadnaviridae科、Circoviridae科、Parvoviridae科、Papovaviridae科、Adenoviridae科、Herpesviridae科、Poxviridae科、およびIridoviridae科）由来のエンベロープをコードする遺伝子を利用することができる。代表例としては、FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、狂犬病、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、AEV、AMV、CT10、EIAVが挙げられる。

【0111】

他の実施形態では、本発明のウイルスをシュードタイピングするためのエンベロープタンパク質としては、これだけに限定されないが、以下のウイルスのいずれかが挙げられる：A型インフルエンザ、例えば、H1N1、H1N2、H3N2およびH5N1（トリインフルエンザ）など、B型インフルエンザ、C型インフルエンザウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス群の任意のウイルス、腸内アデノウイルス、パルボウイルス、デング熱ウイルス、サル痘、モノネガウイルス目、リッサウイルス、例えば、狂犬病ウイルス、ラゴスコウモリウイルス、モコラウイルス、ドゥベンヘイジウイルス、ヨーロッパコウモリウイルス (European bat virus) 1&2およびオーストラリアコウモリウイルス (Australian bat virus) など、エフェメロウイルス、ベシクロウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、ヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス1型および2型、水痘帯状疱疹、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス (EBV)、ヒトヘルペスウイルス (HHV)、ヒトヘルペスウイルス6型および8型など、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、パピローマウ

10

20

30

40

50

ウイルス、マウスガンマヘルペスウイルス、アレナウイルス、例えば、アルゼンチン出血熱ウイルス、ポリビア出血熱ウイルス、サビア関連出血熱ウイルス (S a b i a - a s s o c i a t e d h e m o r r h a g i c f e v e r v i r u s)、ベネズエラ出血熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、マチュポウイルス、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (L C M V) など、B u n y a v i r i d i a e 科、例えば、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ハンタウイルス、腎症候群を伴う出血熱を引き起こすウイルス、リフトバレー熱ウイルスなど、エボラ出血熱およびマールブルグ出血熱を含めた F i l o v i r i d a e 科 (フィロウイルス)、キャサヌール森林病 (K a y s a n u r F o r e s t d i s e a s e) ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎を引き起こすウイルスを含めた F l a v i v i r i d a e 科ならびに P a r a m y x o v i r i d a e 科、例えば、ヘンドラウイルスおよびニパーウイルスなど、大痘瘡、小痘瘡 (天然痘)、アルファウイルス、例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、S A R S 関連コロナウイルス (S A R S - C o V)、西ナイルウイルス、任意の脳炎 (e n c e p h a l i t i s) を引き起こすウイルスなど。

【0112】

一実施形態では、本発明は、組換えレトロウイルス、例えば、V S V - G 糖タンパク質でシュードタイピングされたレンチウイルスを産生するパッケージング細胞を提供する。

【0113】

「シュードタイプ」または「シュードタイピング」という用語は、本明細書で使用される場合、ウイルスエンベロープタンパク質が、好ましい特性を保有する別のウイルスのウイルスエンベロープタンパク質で置換されたウイルスを指す。例えば、H I V は、水疱性口内炎ウイルス G タンパク質 (V S V - G) エンベロープタンパク質を用いてシュードタイピングすることができ、これにより、H I V エンベロープタンパク質 (e n v 遺伝子によりコードされる) は通常ウイルスを C D 4 + 提示細胞にターゲティングするので、H I V がより広い範囲の細胞に感染することが可能になる。本発明の好ましい実施形態では、レンチウイルスのエンベロープタンパク質は V S V - G でシュードタイピングされている。一実施形態では、本発明は、組換えレトロウイルス、例えば、V S V - G エンベロープ糖タンパク質を用いてシュードタイピングされたレンチウイルスを産生するパッケージング細胞を提供する。

【0114】

本明細書で使用される場合、「パッケージング細胞系」という用語は、パッケージングシグナルを含有しないが、ウイルス粒子の正しいパッケージングに必要であるウイルスの構造タンパク質および複製酵素 (例えば、g a g、p o l および e n v) を安定にまたは一過性に発現する細胞株への言及において使用される。本発明のパッケージング細胞を調製するために、任意の適切な細胞株を使用することができる。一般に、細胞は哺乳動物細胞である。特定の実施形態では、パッケージング細胞系を作製するために使用される細胞はヒト細胞である。使用することができる適切な細胞株としては、例えば、C H O 細胞、B H K 細胞、M D C K 細胞、C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞、F L Y 細胞、P s i - 2 細胞、B O S C 2 3 細胞、P A 3 1 7 細胞、W E H I 細胞、C O S 細胞、B S C 1 細胞、B S C 4 0 細胞、B M T 1 0 細胞、V E R O 細胞、W 1 3 8 細胞、M R C 5 細胞、A 5 4 9 細胞、H T 1 0 8 0 細胞、2 9 3 細胞、2 9 3 T 細胞、B - 5 0 細胞、3 T 3 細胞、N I H 3 T 3 細胞、H e p G 2 細胞、S a o s - 2 細胞、H u h 7 細胞、H e L a 細胞、W 1 6 3 細胞、2 1 1 細胞、および 2 1 1 A 細胞が挙げられる。好ましい実施形態では、パッケージング細胞は 2 9 3 細胞、2 9 3 T 細胞、または A 5 4 9 細胞である。別の好ましい実施形態では、細胞は A 5 4 9 細胞である。

【0115】

本明細書で使用される場合、「産生細胞株」という用語は、パッケージング細胞系およびパッケージングシグナルを含む移行ベクター構築物を含む、組換えレトロウイルス粒子を産生することができる細胞株を指す。感染性のウイルス粒子およびウイルスストック溶液の作製は、従来技法を用いて行うことができる。ウイルスストック溶液を調製する方

10

20

30

40

50

法は当技術分野で公知であり、例えば、Y. Soneokaら（1995年）Nucleic Acids Res. 23巻：628～633頁、およびN. R. Landauら（1992年）J. Virol. 66巻：5110～5113頁によって例示されている。感染性ウイルス粒子はパッケージング細胞から従来の技法を用いて収集することができる。例えば、感染性粒子は、当技術分野で公知の通り、細胞溶解、または細胞培養物の上清を収集することによって収集することができる。場合によって、収集されたウイルス粒子は、所望であれば精製することができる。適切な精製技法は当業者に周知である。

【0116】

レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを使用し、トランスフェクションではなくウイルス感染によって遺伝子（複数可）または他のポリヌクレオチド配列を送達することは、「形質導入」と称される。一実施形態では、感染およびプロウイルスの組み込みによってレトロウイルスベクターを細胞に形質導入する。ある特定の実施形態では、細胞は、ウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターを使用して感染によって細胞に送達された遺伝子または他のポリヌクレオチド配列を含む場合に「形質導入される」。特定の実施形態では、形質導入された細胞は、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターによって送達された遺伝子または他のポリヌクレオチド配列をその細胞のゲノム内に含む。

【0117】

特定の実施形態では、治療用ポリペプチド、例えば、ABCD1ポリペプチドを発現する、本発明のウイルスベクターを用いて形質導入された宿主細胞を被験体に投与して、疾患、障害、または状態、例えば、副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を治療および／または予防する。本発明のある特定の実施形態に従って利用することができる遺伝子療法におけるウイルスベクターの使用に関する他の方法は、例えば、Kay, M.

A. (1997年) Chest 111巻（補遺6）：138S～142S頁；Ferry, N. およびHeard, J. M. (1998年) Hum. Gene Ther. 9巻：1975～81頁；Shiratory, Y. ら（1999年）Liver 19巻：265～74頁；Oka, K. ら（2000年）Curr. Opin. Lipidol. 11巻：179～86頁；Thule, P. M. およびLiu, J. M. (2000年) Gene Ther. 7巻：1744～52頁；Yang, N. S. (1992年) Crit. Rev. Biotechnol. 12巻：335～56頁；Alt, M. (1995年) J. Hepatol. 23巻：746～58頁；Brody, S. L. およびCrystal, R. G. (1994年) Ann. N. Y. Acad. Sci. 716巻：90～101頁；Strayer, D. S. (1999年) Expert Opin. Investig. Drugs 8巻：2159～2172頁；Smith-Arica, J. R. およびBartlett, J. S. (2001年) Curr. Cardiol. Rep. 3巻：43～49頁；Lee, H. C. ら（2000年）Nature 408巻：483～8頁に見いだすことができる。

【0118】

「治療（treatment）」および同様の単語、例えば、「治療される（treated）」、「治療すること（treating）」などは、本明細書で使用される場合、文脈からそうでないことが明らかでない限り、好ましくは臨床結果を含めた有益なまたは所望の結果を得るための手法を示す。治療は、場合によって、疾患もしくは状態の症状の軽減もしくは改善、または疾患もしくは状態の進行の遅延を伴ってよい。

【0119】

「予防する（prevent）」および同様の単語、例えば、「予防される（prevented）」、「予防すること（preventing）」などは、本明細書で使用される場合、文脈からそうでないことが明らかでない限り、疾患または状態の発生または再発を予防するため、阻害するため、またはその可能性を低下させるための手法を示す。こ

10

20

30

40

50

の単語は、疾患もしくは状態の発症もしくは再発を遅延させること、または疾患もしくは状態の症状の発生もしくは再発を遅延させることも指す。本明細書で使用される場合、「予防 (prevention)」および同様の単語は、疾患または状態が発症または再発する前に、疾患または状態の強さ、影響、症状および／または負荷を軽減することも包含する。

【0120】

形質導入された宿主細胞または物質の「有効量」または「治療有効量」とは、本明細書で使用される場合、所望の生物学的効果、例えば、臨床結果を含めた有益な結果などに影響を及ぼすために十分な量である。

【0121】

「薬学的に許容される担体」とは、本明細書で使用される場合、薬学的に許容される細胞培養培地を含めた生理的に適合性の任意のかつ全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを包含する。一実施形態では、担体は、非経口投与に適している。担体は、血管内投与（例えば、静脈内投与または動脈内投与）、腹腔内投与または筋肉内投与に適するものであってよい。薬学的に許容される担体としては、滅菌水溶液または滅菌注射用溶液もしくは分散物を即時調製するための分散物および滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質へのそのような媒体および作用物質の使用は当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または作用物質が形質導入された細胞と適合しない場合を除く限りでは、本発明の医薬組成物におけるそれらの使用が意図されている。

【0122】

冠詞「a (1つの)」、「an (1つの)」、および「the (その)」は、本明細書では、その冠詞の文法上の目的語の1つ、または1つより多く（すなわち少なくとも1つ）を指すために使用される。例として、「an (1つの) エlement」とは、1つのElementまたは1つより多いElementを意味する。

【0123】

選択肢（例えば、「or (または)」）の使用は、その選択肢のいずれか一方、その両方、またはそれらの任意の組み合わせを意味すると理解されるべきである。本明細書で使用される場合、「含む (include)」および「含む (comprise)」という用語は同義に使用される。

【0124】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」という用語は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量または長さに対して15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%または1%だけ変動する数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量または長さを指す。一実施形態では、「約」または「およそ」という用語は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量または長さに関して±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、または±1%の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量または長さの範囲を指す。

【0125】

「含む (comprise)」、「含む (comprises)」および「含む (comprising)」という単語は、本明細書全体を通して、文脈上異なる解釈を要する場合を除き、明記されているステップもしくはElementまたはステップもしくはElementの群を包含するが、任意の他のステップもしくはElementまたはステップもしくはElementの群を排除するものではないと理解されたい。「からなる (consisting of)」とは、「からなる (consisting of)」という句に続くいかなるものも含み、それに限定されることを意味する。したがって、「からなる (consisting of)」という句は、列挙されているElementが必要または必須であること、および他のElementは存在してはならないことを示す。「から本質的になる (consisting essentially of)」とは、この句の後に列挙されて

いる任意のエレメントを包含し、列挙されているエレメントに関する本開示に明記されている活性または作用に干渉または寄与しない他のエレメントに限定されるものとする。したがって、「から本質的になる (consisting essentially of)」という句は、列挙されているエレメントが必要または必須であるが、他のエレメントは任意選択ではなく、それらが列挙されているエレメントの活性または作用に影響を及ぼすかどうかに応じて存在するかもしれないし、存在しないかもしれないことを示す。

【0126】

本明細書全体を通して「一実施形態」または「ある実施形態」との言及は、実施形態に関連して記載されている特定の特徴、構造または特性が本発明の少なくとも1つの実施形態に包含されることを意味する。したがって、本明細書全体を通して種々の箇所において出現する「一実施形態では」または「ある実施形態では」という句は、必ずしも全てが同じ実施形態について言及しているのではない。さらに、特定の特徴、構造、または特性を任意の適切な様式で組み合わせる1つまたは複数の実施形態にすることができる。

【0127】

以下の説明において、特定の詳細は、本発明の種々の実施形態の徹底的な理解をもたらすために記載されている。しかし、当業者には、これらの詳細なしで本発明を実施することができることが理解されよう。さらに、本明細書に記載の構造および置換基の種々の組み合わせに由来する個々のベクター、またはベクターの群が、各ベクターまたはベクターの群が個別に記載されているのと同じ程度に本出願により開示されていることが理解されるべきである。したがって、特定のベクター構造または特定の置換基の選択は本開示の範囲内である。

【0128】

C. ウイルスベクター

レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターは試験され、目的の遺伝子を広範囲の標的細胞のゲノムに安定に導入するための適切な送達ビヒクルであることが見いだされている。最大の形質導入の効率および導入遺伝子の発現のために、FLAP配列、RRE配列、およびHPRE配列またはWPRE配列を含めることによって多くのベクター設計が最適化されている。特に、当業者は、多くの場合、導入遺伝子の発現を増大させるために転写後調節配列を含める。驚いたことに、本発明者らは、WPRE配列を含めることでは発現が有意に増大しないことを発見した。

【0129】

この構成により、5'部分に異種核酸コード配列を含み、3'部分に転写後調節エレメント配列を含むmRNA転写物の合成がもたらされる。好ましい実施形態では、いくつかの場合には、WPREまたはHPREなどの転写後調節エレメントにより細胞の形質転換のリスクが増大し、かつ／または、mRNA転写物の量が実質的にもしくは有意に増大しない、またはmRNAの安定性が増大しないので、本発明のベクターはこれらのエレメントを欠くまたはそれを含まない。したがって、いくつかの実施形態では、本発明のベクターは、追加的な安全対策としてWPREまたはHPREを欠くまたはそれを含まない。

【0130】

本発明は、本発明の方法を実施するために使用することができる移行ベクターをさらに提供する。

【0131】

そのような移行ベクターは種々の異なるウイルスベクターを使用して作製することができることが当業者には理解されるが、特定の実施形態では、レンチウイルスベクターが*in vitro*および*in vivo*のどちらにおいても非分裂細胞への導入遺伝子の効率的な送達、組み込みおよび長期発現をもたらすことができることに一部起因して、移行ベクターはレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである。種々のレンチウイルスベクターが当技術分野で公知であり、いずれも本発明の移行ベクターを作製するために適合させることができる。Naldiniら、(1996年a、1996年b、および1998年)；Zuffereyら、(1997年)；Dullら、1998年、米

国特許第 6, 0 1 3, 5 1 6 号；および同第 5, 9 9 4, 1 3 6 号を参照されたい。一般に、これらのベクターは、プラスミドに基づくかウイルスに基づき、治療用ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞内に移行させるために必須な配列を有するように構成されている。

【0132】

レンチウイルスのゲノムおよびプロウイルスの DNA は、レトロウイルスに見いだされる 3 つの遺伝子：g a g、p o l および e n v を含み、これらは 2 つの長い末端反復（L T R）配列と隣接している。g a g 遺伝子は内部の構造タンパク質（マトリックスタンパク質、カプシドタンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質）をコードし、p o l 遺伝子は RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ（逆転写酵素）、プロテアーゼおよびインテグラーゼをコードし、e n v 遺伝子はウイルスエンベロープ糖タンパク質をコードする。5' L T R' および 3' L T R は、それぞれビリオン RNA の転写およびポリアデニル化を促進する機能を果たす。レンチウイルスは v i f、v p r、t a t、r e v、v p u、n e f および v p x を含めた追加的な遺伝子を有する。ゲノムの逆転写に必要な配列（t RNA プライマー結合部位）およびウイルス RNA を粒子内に入れる効率的なキャプシド形成に必要な配列（プシー部位）が 5' L T R に近接する。

【0133】

別の実施形態では、レンチウイルスベクターは H I V ベクターである。したがって、ベクターは、ヒト免疫不全-1（H I V-1）、ヒト免疫不全-2（H I V-2）、サル免疫不全ウイルス（S I V）、ネコ免疫不全ウイルス（F I V）、ウシ免疫不全ウイルス（B I V）、ジェンブラナ病ウイルス（J D V）、ウマ伝染性貧血ウイルス（E I A V）、ヤギ関節炎脳炎ウイルス（C A E V）などに由来してよい。本発明の大部分の態様に関して、H I V に基づく構築物がヒト細胞の形質導入において最も効率的であるという点で、H I V に基づくベクターの骨格（すなわち、H I V のシス作用性配列エレメントならびに H I V の g a g 遺伝子、p o l 遺伝子および r e v 遺伝子）が一般に好ましい。

【0134】

種々の実施形態では、本発明のベクターは、副腎脳白質ジストロフィおよび／または副腎脊髄神経障害に対する療法を提供するポリペプチドをコードする遺伝子に作動可能に連結した、小膠細胞において作動可能なプロモーターを含む。ベクターは、1 つまたは複数の L T R を有してよく、L T R のいずれかが 1 つまたは複数の修飾、例えば、1 つまたは複数のヌクレオチドの置換、付加、または欠失などを含む。本発明のベクターは W P R E も H P R E も含まないことを除いては、ベクターは、形質導入の効率を上昇させるための 1 つ以上の補助的なエレメント（例えば、c P P T / F L A P）、ウイルスのパッケージング（例えば、プシー（Ψ）パッケージングシグナル、R R E）、および／または治療用遺伝子の発現を増大させる他のエレメント（例えば、ポリ（A）配列）をさらに含んでよい。

【0135】

特定の実施形態では、本発明の移行ベクターは、左側の（5'）レトロウイルス L T R と、中心ポリプリントラクト / DNA フラップ（c P P T / F L A P）と、レトロウイルス輸送エレメントと、A T P 結合性カセット、サブファミリー D、メンバー 1（A B C D 1）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した、小膠細胞において活性なプロモーターと、右側の（3'）レトロウイルス L T R とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント（W P R E）を含まない。

【0136】

特定の実施形態では、本発明の移行ベクターは、左側の（5'）レトロウイルス L T R と、レトロウイルス輸送エレメントと、A T P 結合性カセット、サブファミリー D、メンバー 1（A B C D 1）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した、小膠細胞において活性なプロモーターと、右側の（3'）レトロウイルス L T R と、ポリ（A）配列とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント（W P R E）を含まない。別の特の実施形態では、本発明は、左側の（5'）L T R と、c P P T / F L A P と、

R R Eと、ヒトA B C D 1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号1～2）に作動可能に連結したM N Dプロモーターと、右側の（3'）L T Rと、ポリアデニル化配列とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント（W P R E）を含まないレンチウイルスベクターを提供する。

【0137】

ある特定の実施形態では、本発明は、左側の（5'）H I V-1 L T Rと、プシー（Ψ）パッケージングシグナルと、c P P T / F L A Pと、R R Eと、ヒトA B C D 1ポリペプチドをコードするc D N Aに作動可能に連結したM N Dプロモーターと、右側の（3'）自己不活性化（S I N）H I V-1 L T Rと、ウサギβ-グロビンポリアデニル化配列とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント（W P R E）を含まないレンチウイルスベクターを提供する。

10

【0138】

別の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのL T Rと、中心ポリプリントラクト / D N Aフラップ（c P P T / F L A P）と、レトロウイルス輸送エレメント、A T P結合性カセット、サブファミリーD、メンバー1（A B C D 1）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した、小膠細胞において活性なプロモーターとを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント（W P R E）を含まないベクターを提供する。

【0139】

特定の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのL T Rと、c P P T / F L A Pと、R R Eと、ヒトA B C D 1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したM N Dプロモーターと、ポリアデニル化配列とを含み、ウッドチャック転写後調節エレメント（W P R E）を含まないベクターを提供する。

20

【0140】

ある特定の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのS I N H I V-1 L T Rと、プシー（Ψ）パッケージングシグナルと、c P P T / F L A Pと、R R Eと、ヒトA B C D 1ポリペプチドをコードするc D N Aに作動可能に連結したM N Dプロモーターと、ウサギβ-グロビンポリアデニル化配列を提供し、ベクターはウッドチャック転写後調節エレメント（W P R E）を含まない。

【0141】

W P R EエレメントまたはH P R Eエレメントを欠くレトロウイルスベクター内の治療用導入遺伝子が小膠細胞において発現されるように、現存する本発明の実施形態から多くの他の異なる実施形態を適合させることができることが当業者には理解されよう。

30

【0142】

D. 組成物および製剤

本発明は、本明細書に記載の方法に従って作製された形質導入された細胞と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物をさらに含む。一実施形態では、担体は非経口投与に適している。担体は、静脈内投与、腹腔内投与または筋肉内投与に適している。薬学的に許容される担体としては、滅菌水溶液または分散物、および滅菌注射用溶液または分散物を即時調製するための滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質へのそのような媒体および作用物質の使用は当技術分野において周知である。

40

【0143】

本発明の組成物は、細胞または動物に投与するために薬学的に許容されるまたは生理的に許容される溶液中に、単独で、または1つまたは複数の他の療法のモダリティと組み合わせて製剤化された本明細書に記載の1つまたは複数のポリペプチド、ポリヌクレオチド、それを含むベクター、形質導入された細胞などを含んでよい。所望であれば、本発明の組成物は、例えば他のタンパク質、ポリペプチド、小分子または種々の薬学的に活性な作用物質などの他の作用物質とも組み合わせて投与することができることも理解されよう。同様に組成物に含めることができる他の構成成分に対する限定は、追加的な作用物質が意図された遺伝子療法を送達する組成物の能力に悪影響を及ぼさないのであれば、実質的に存在しない。

50

【0144】

本発明の医薬組成物では、薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の処方は、本明細書に記載の特定の組成物を、例えば、経口的、非経口的、静脈内、鼻腔内、および筋肉内への投与および処方を含めた種々の治療レジメンにおいて使用するための適切な投薬および治療レジメンの開発と同様に当業者に周知である。

【0145】

ある特定の状況では、本明細書に開示されている組成物を、例えば、米国特許第5, 543, 158号；同第5, 641, 515号および同第5, 399, 363号（そのそれぞれの全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる）に記載の通り、非経口的に、静脈内に、筋肉内に、またはさらには腹腔内に送達することが望ましい。遊離塩基または薬理学的に許容される塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水中に調製することができる。分散物をグリセロール、液体ポリエチレングリコール、ならびにそれらの混合物中に、および油中に調製することもできる。通常の保管および使用の条件下では、これらの調製物は、微生物の成長を予防するために防腐剤を含有する。

【0146】

注射による使用に適した医薬形態としては、滅菌水溶液または分散物、および滅菌の注射可能な溶液または分散物を即時調製するための滅菌粉末が挙げられる（米国特許第5, 466, 468号、その全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる）。全ての場合において、形態は滅菌されているべきであり、また、容易に注射可能である程度まで流体であるべきである。形態は製造および保管の条件下で安定であるべきであり、また、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、適切なそれらの混合物、ならびに／または植物油を含有する溶媒または分散媒であってよい。妥当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散の場合では必要な粒度を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。微生物の作用の予防は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって容易にすることができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に使用することによってもたらしすることができる。

【0147】

水溶液中で非経口投与するためには、例えば、溶液は、必要であれば適切に緩衝されているべきであり、液体希釈剤は最初に十分な食塩水またはグルコースを用いて等張性にされる。これらの特定の水溶液は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、使用することができる滅菌水性媒体は本開示を考慮すれば当業者に公知になろう。例えば、1投与量を、等張性のNaCl溶液1mlに溶解させ、皮下注入用流体1000mlに添加するか、提唱された注入部位に注射することができる（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins、2000年を参照されたい）。治療されている被験体の状態に応じて、投与量にいくらかの変動が必ず生じる。いずれにしても、投与に関与する人が個々の被験体に対する適切な用量を決定する。さらに、ヒトに投与するためには、調製物は、FDA Office of Biologics standardsにより必要とされる滅菌、発熱性、および一般的な安全性および純度の標準に適合すべきである。

【0148】

滅菌注射用溶液は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上に列挙されている種々の他の成分を含む適切な溶媒中に組み入れ、その後、濾過滅菌することによって調製すること

ができる。一般に、分散物は、種々の滅菌された活性成分を、基本的な分散媒および上に列挙されているものからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み入れることによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合では、好ましい調製方法は、活性成分の粉末と、それに加えて任意の追加的な所望の成分を、予め滅菌濾過したその溶液から得る真空乾燥および凍結乾燥技法である。

【0149】

本明細書に開示されている組成物は、中性の形態または塩の形態に製剤化することができる。薬学的に許容される塩としては酸付加塩（タンパク質の遊離のアミノ基と形成される）が挙げられ、これは、例えば、塩酸またはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成される。遊離のカルボキシル基と形成される塩も、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から得ることができる。製剤化の際、溶液を投与製剤と適合する様式および治療的に有効な量で投与する。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセル剤などの種々の剤形で容易に投与される。

【0150】

本明細書で使用される場合、「担体」とは、任意のかつ全ての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁物、コロイドなどを包含する。薬学的に活性な物質へのそのような媒体および作用物質の使用は当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または作用物質が活性成分と適合しない場合を除く限りでは、治療用組成物におけるその使用が意図されている。補足的な活性成分も組成物に組み入れることができる。

【0151】

「薬学的に許容される」という句は、ヒトに投与された際にアレルギー性または同様の不都合な応答を生じさせない分子実体および組成物を指す。タンパク質を活性成分として含有する水性組成物の調製は当技術分野ではよく理解されている。一般には、そのような組成物は、液体の溶液または懸濁物のいずれかとしての注射剤として調製され、注射前に液体での溶液、または液体での懸濁物に適した固体形態も調製することができる。調製物は乳化されていてもよい。

【0152】

ある特定の実施形態では、組成物は、鼻腔内噴霧、吸入、および／または他のエアロゾル送達ビヒクルによって送達することができる。遺伝子、ポリヌクレオチド、およびペプチド組成物を経鼻エアロゾル噴霧によって肺に直接送達するための方法は、例えば、米国特許第5,756,353号および同第5,804,212号（そのそれぞれの全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる）に記載されている。同様に、鼻腔内微小粒子樹脂（Takenagaら、1998年）およびリゾホスファチジルグリセロール化合物（米国特許第5,725,871号、その全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる）を使用した薬物の送達も、製薬技術分野において周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン（polytetrafluoroethylene）支持マトリックスの形態での経粘膜薬物送達は、米国特許第5,780,045号（その全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0153】

ある特定の実施形態では、送達は、本発明の組成物を適切な宿主細胞に導入するために、リポソーム、ナノカプセル、微小粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞を、場合によって、CPPポリペプチドなどと混合して使用することによって起こり得る。具体的には、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、ナノ粒子などのいずれかに封入して送達するために製剤化することができる。そのような送達ビヒクルの製剤化および使用は、公知かつ従来の技法を用いて行うことができる。本発明の製剤および組成物は、細胞または動物に投与するために、単独で、または1つまたは複数の他の療法のモダリティと組み合わせて、薬学的に許容されるまたは生理的に許容される溶液（例えば

、培養培地）中に製剤化された、本明細書に記載の任意の数のポリペプチド、ポリヌクレオチド、および小分子の組み合わせで構成される1つまたは複数の抑制因子および／または活性化因子を含んでよい。所望であれば、本発明の組成物は、他の作用物質、例えば、細胞、他のタンパク質またはポリペプチドまたは種々の薬学的に活性な作用物質などとも組み合わせる投与することができることも理解されよう。

【0154】

特定の実施形態では、本発明による製剤または組成物は、本明細書に記載の任意の数のポリペプチド、ポリヌクレオチド、および小分子の組み合わせと接触した細胞を含む。

【0155】

ある特定の態様では、本発明は、これだけに限定されないが、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）ベクターを含めたウイルスベクター系を送達するため（すなわち、ウイルス媒介性形質導入）に適した製剤または組成物を提供する。

10

【0156】

ex vivo送達のための例示的な製剤は、当技術分野で公知の種々のトランスフェクション薬剤、例えば、リン酸カルシウム、電気穿孔、熱ショックおよび種々のリボソーム製剤（すなわち、脂質媒介性トランスフェクション）などの使用も含んでよい。下でより詳細に説明されている通り、リボソームは、水性流体の画分が閉じ込められた脂質二重層である。DNAは、自発的にカチオン性リボソームの外表面と会合し（その電荷によって）、これらのリボソームは細胞膜と相互作用する。

【0157】

ある特定の態様では、本発明は、1種または複数種の薬学的に許容される担体（添加物）および／または希釈剤（例えば、薬学的に許容される細胞培養培地）と一緒に製剤化された治療有効量の本明細書に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む薬学的に許容される組成物を提供する。

20

【0158】

本発明の特定の実施形態は、他の製剤、例えば、製薬技術分野で周知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版 Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins、2000年に記載されているものなどを含んでよい。

【0159】

E. 遺伝子療法の方法

レトロウイルスベクターにより、副腎脳白質ジストロフィおよび副腎脊髄神経障害の遺伝子療法の改善された方法がもたらされる。本明細書で使用される場合、「遺伝子療法」という用語は、遺伝子を細胞のゲノムに導入することを指す。種々の実施形態では、本発明のウイルスベクターは、副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を有すると診断された被験体またはそれを有する疑いがある被験体に治療的、予防的、または改善的な利益をもたらすポリペプチドをコードする治療用導入遺伝子を発現させるプロモーターを含む。ウイルスを細胞にin vivo、ex vivo、またはin vitroで感染させ、形質導入することができる。ex vivoにおける実施形態およびin vitroにおける実施形態では、次いで、形質導入された細胞を、療法を必要とする被験体に投与することができる。本発明は、本発明のベクター系、ウイルス粒子、および形質導入された細胞を使用して、被験体における副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を治療、予防、および／または改善することができることを意図している。

30

40

【0160】

種々の実施形態では、レトロウイルスベクターを、遺伝子療法を必要とする被験体の細胞、組織、または器官にin vivoで直接注射することによって投与する。種々の他の実施形態では、細胞に、本発明のベクターを用いてin vitroまたはex vivoで形質導入する。次いで、形質導入された細胞を副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害を有する被験体に投与する。

【0161】

50

本発明の遺伝子療法の方法における形質導入および投与に適した細胞としては、これだけに限定されないが、幹細胞、前駆細胞、および分化細胞が挙げられる。ある特定の実施形態では、形質導入された細胞は骨髄幹細胞、臍帯幹細胞、または間葉系幹細胞である。

【0162】

種々の実施形態では、幹細胞を使用することが好ましく、これは、幹細胞が *in vivo* で特定の生物学的ニッチに投与されると適切な細胞型に分化する能力を有するためである。「幹細胞」という用語は、(1) 長期にわたって自己再生できること、または元の細胞と同一のコピーを少なくとも1つ生成することができること、(2) 単一細胞レベルで、多数の、またいくつかの例ではただ1つの特殊化した細胞型に分化することができること、および(3) *in vivo* で組織の機能的再生をすることができる未分化細胞である細胞を指す。幹細胞は、それらの発生上の能力に従って、全能性、多能性、多分化能 (*multipotent*) および少能性 (*oligopotent*) / 単能性に細分類される。「自己再生」とは、変更されていない娘細胞を産生する独特の能力および特殊化した細胞型を生成する独特の能力 (潜在力) を有する細胞を指す。自己再生は、2つのやり方で実現することができる。非対称細胞分裂により、親の細胞と同一である娘細胞が1つと、親の細胞とは異なり、前駆細胞または分化細胞である娘細胞が1つ産生される。非対称細胞分裂では細胞の数は増大しない。対称細胞分裂により、同一の娘細胞が2つ産生される。細胞の「増殖」または「拡大」とは、対称的に分裂する細胞を指す。

【0163】

本明細書で使用される場合、「多能性」という用語は、細胞の、体または体質 (すなわち、胚本体 (*embryo proper*)) の全ての系列を形成する能力を意味する。例えば、胚性幹細胞は、3つの胚葉、外胚葉、中胚葉、および内胚葉のそれぞれから細胞を形成することができる多能性幹細胞の一種である。本明細書で使用される場合、「多分化能」という用語は、成体幹細胞の、1つの系列の多数の細胞型を形成する能力を指す。例えば、造血幹細胞は、血液細胞系列の全ての細胞、例えば、リンパ系細胞および骨髄性細胞を形成することができる。

【0164】

本明細書で使用される場合、「前駆体」または「前駆細胞」という用語は、自己再生する能力、およびより成熟した細胞に分化する能力を有する細胞を指す。多くの前駆細胞は単一の系列に沿って分化するが、かなり大規模な増殖能力を有する可能性がある。

【0165】

造血幹細胞 (HSC) は、生物体の生存期間にわたって成熟血液細胞のレパートリー全体を生成することができる拘束された造血前駆細胞 (HPC) を生じさせる。「造血幹細胞」または「HSC」という用語は、骨髄系列 (例えば、単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球 / 血小板、樹状細胞)、およびリンパ系列 (例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)、および当技術分野で公知のその他の系列を含めた、生物体の血液細胞の種類の全てを生じさせる多分化能幹細胞を指す (Fei, R. ら、米国特許第5,635,387号; McGlave ら、米国特許第5,460,964号; Simmons, P. ら、米国特許第5,677,136号; Tsukamoto ら、米国特許第5,750,397号; Schwartz ら、米国特許第5,759,793号; DiGiusto ら、米国特許第5,681,599号; Tsukamoto ら、米国特許第5,716,827号を参照されたい)。致死的に放射線照射した動物またはヒトに移植すると、造血幹細胞および前駆細胞は赤血球、好中球-マクロファージ、巨核球およびリンパ系の造血細胞プールを再配置させることができる。

【0166】

好ましい実施形態では、形質導入される細胞は、骨髄、臍帯血、または末梢循環から単離された造血幹細胞および / または前駆細胞である。特に好ましい実施形態では、形質導入される細胞は、骨髄、臍帯血、または末梢循環から単離された造血幹細胞である。

【0167】

本発明の細胞は、自己由来 / 自源性 (*autogeneic*) (「自己」) であっても

10

20

30

40

50

非自己由来（「非自己」、例えば、同種異系、同系または異種）であってもよい。「自己由来」とは、本明細書で使用される場合、同じ被験体由来の細胞を指す。「同種異系」とは、本明細書で使用される場合、比較する細胞とは遺伝的に異なる同じ種の細胞を指す。「同系」とは、本明細書で使用される場合、比較する細胞と遺伝的に同一である、異なる被験体の細胞を指す。「異種」とは、本明細書で使用される場合、比較する細胞とは異なる種の細胞を指す。好ましい実施形態では、本発明の細胞は同種異系のものである。

【0168】

「被験体」とは、本明細書で使用される場合、本明細書の他の箇所で開示されている遺伝子療法ベクター、細胞に基づく治療薬、および方法を用いて治療することができる副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害の症状を示す任意の動物を包含する。適切な被験体（例えば、患者）としては、実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど）、農場動物、および家畜動物または愛玩動物（例えば、ネコまたはイヌなど）が挙げられる。非ヒト霊長類、および好ましくはヒト患者が含まれる。典型的な被験体としては、遺伝子療法によって調節することができる1つまたは複数の生理的活性の量が異常である（「正常な」または「健康的な」被験体よりも少量または多量である）動物が挙げられる。

【0169】

本明細書で使用される場合、「治療（treatment）」または「治療すること（treating）」とは、疾患または病的状態の症状または病態に対する任意の有益なまたは望ましい効果を包含し、また、治療されている疾患または状態の1種または複数種の測定可能なマーカーの最低限の減少でさえ含んでよい。治療は、場合によって、疾患もしくは状態の症状の軽減もしくは改善、または疾患もしくは状態の進行の遅延を含んでよい。「治療（treatment）」とは、必ずしも疾患もしくは状態、またはそれに付随する症状の完全な根絶もしくは治癒を示すものではない。

【0170】

本明細書で使用される場合、「予防する（prevent）」および同様の単語、例えば、「予防される（prevented）」、「予防すること（preventing）」などは、疾患または状態の発生または再発を予防するため、阻害するため、またはその可能性を低下させるための手法を指す。この用語は、疾患もしくは状態の発症もしくは再発を遅延させること、または疾患もしくは状態の症状の発生もしくは再発を遅延させることも指す。本明細書で使用される場合、「予防（prevention）」および同様の単語は、疾患または状態が発症または再発する前に、疾患または状態の強さ、影響、症状および／または負荷を軽減することも包含する。

【0171】

本明細書で使用される場合、「量」という用語は、臨床結果を含めた有益なまたは所望の予防結果または治療結果を実現するためのウイルスまたは形質導入された治療用細胞の「有効な量（an amount effective）」または「有効量（an effective amount）」を指す。

【0172】

「予防有効量」とは、所望の予防結果を実現するために有効なウイルスまたは形質導入された治療用細胞の量を指す。必ずではないが一般には、予防的な用量は疾患の前に、または疾患のより早い段階で被験体に用いられるので、予防有効量は治療有効量よりも少ない。

【0173】

ウイルスまたは形質導入された治療用細胞の「治療有効量」は、個体の病態、年齢、性別、および体重、ならびに、幹細胞および前駆細胞の個体における所望の応答を引き出す能力などの要因に応じて変動してよい。治療有効量は、ウイルスまたは形質導入された治療用細胞のいかなる毒性の影響または有害な影響よりも治療的に有益な影響が上回る量でもある。「治療有効量」という用語は、被験体（例えば、患者）を「治療する」ために有効な量を包含する。

10

20

30

40

50

【0174】

好ましい一実施形態では、本発明は、脳小膠細胞に発生する潜在性を有する形質導入された細胞を提供する。特定の実施形態では、造血幹細胞を、本発明のベクターを用いて形質導入し、副腎脳白質ジストロフィまたは副腎脊髄神経障害に対する療法を必要とする個体に投与する。造血幹細胞は脳小膠細胞を起源とし、したがって好ましい。

【0175】

形質導入された細胞は、骨髄切除療法を受けた個体または受けていない個体において骨髄移植片の一部として投与することができる。一実施形態では、骨髄移植片中の本発明の形質導入された細胞を、化学的切除 (chemoablative) または放射線切除 (radioablative) 骨髄療法を受けた個体に投与する。好ましい実施形態では、被験体は若年男性である。

【0176】

一実施形態では、ある用量の形質導入された細胞を被験体の静脈内に送達する。好ましい実施形態では、形質導入された造血幹細胞を被験体に静脈内投与する。

【0177】

特定の実施形態では、患者は、1 kg 当たり細胞約 1×10^5 個、1 kg 当たり細胞約 5×10^5 個、1 kg 当たり細胞約 1×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 2×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 3×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 4×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 5×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 6×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 7×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 8×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 9×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 1×10^7 個、1 kg 当たり細胞約 5×10^7 個、1 kg 当たり細胞約 1×10^8 個、またはそれ以上の用量の形質導入された造血幹細胞を1回の単回静脈内用量で受ける。ある特定の実施形態では、患者は、1 kg 当たり細胞約 1×10^5 個～1 kg 当たり細胞約 1×10^8 個、1 kg 当たり細胞約 1×10^6 個～1 kg 当たり細胞約 1×10^8 個、1 kg 当たり細胞約 1×10^6 個～1 kg 当たり細胞約 9×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 2×10^6 個～1 kg 当たり細胞約 8×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 2×10^6 個～1 kg 当たり細胞約 5×10^6 個、1 kg 当たり細胞約 3×10^6 個～1 kg 当たり細胞約 4×10^8 個、または間の任意の1 kg 当たりの細胞数の用量の形質導入された造血幹細胞を受ける。

【0178】

形質導入された細胞を拡大させるために、当技術分野における既存の方法を用いてサイトカインで刺激することができる。種々の実施形態では、必要に応じて療法を維持するまたは増大させるために、被験体に1、2、3、4、5、またはそれ以上の用量を数日、数カ月、または数年にわたって投与する。

【0179】

特定の実施形態では、造血幹細胞を、被験体における副腎脳白質ジストロフィおよび/または副腎脊髄神経障害を治療、予防または改善するために用いることができるポリペプチド、例えば、ABCD1をコードする遺伝子に作動可能に連結した、小膠細胞において活性なプロモーター、例えば、MNDプロモーターを含む本発明のベクターを用いて形質導入する。

【0180】

ここで、本発明を以下の実施例によってより詳細に説明する。しかし、本発明は多くの異なる形態で具体化されてよく、本明細書に記載の実施形態に限定されると解釈されるべきではなく、これらの実施形態は、本開示が徹底的かつ完全なものになるよう、また本発明の範囲が当業者に完全に伝わるように提供される。

【実施例】

【0181】

(実施例1)

WPREを伴うまたは伴わないABCD1レンチウイルスベクターを使用した、正常な

10

20

30

40

50

ヒト造血幹細胞における遺伝子形質導入の比較

実験の概要：

ヒト A C B D 1 をコードする c D N A に作動可能に連結した M N D プロモーターと、W P R E エlement (図 1 参照；C G 1 7 1 1 M N D - A L D) ベクターとを含むレンチウイルスベクターは、商業的開発のためには入手不可能である。結果として、出願人らは、今後の臨床試験に進めるための適切なレンチウイルスベクターを同定するためにベクター開発プログラムを行った。ベクター開発プログラムの結果として商業的に許容されるベクターが作出され、M N D プロモーターに作動可能に連結した A B C D - 1 遺伝子は変更しなかった。驚いたことに、ベクターから W P R E を除去することにより、ヒト造血細胞における形質導入の効率および導入遺伝子の発現は変更されなかった。造血細胞に対する以下の一連の実験は、W P R E の存在に関して異なる 2 種の M N D - A L D ベクター、p L B P 1 0 0 (図 1 および配列番号 1 参照；W P R E が除去されている) および p L B P 1 4 0 (図 1 参照；機能性 W P R E を有する) を比較するために短期および長期の前駆体アッセイを用いて実施した。

10

【0182】

レンチウイルスベクター構築物

レンチウイルスベクターは全て、M N D プロモーターの制御下にある正常なヒト A T P 結合性カセット、サブファミリー D (A L D)、メンバー 1 (A B C D 1) の c D N A を含有した。図 1 および表 1 に、C G 1 7 1 1 M N D - A L D ベクター、p L B P 1 0 0

M N D - A L D ベクターおよび p L B P 1 4 0 M N D - A L D ベクターの種々の構成成分およびそれらの位置が要約されている。

20

【0183】

【表 1】

表1:ベクターの概要

	pLBP100	pLBP140	
HIV 供給源	HIV1(NL4-3)受託番号 m19921	HIV1(NL4-3)受託番号 m19921	
5'LTR:			
ハイブリッド/WT	WT	WT	
R	+	+	
U5	+	+	
Gag 配列:			
ORF 破壊	2つの終止コドン	2つの終止コドン	
長さ	Nsi I 部位まで、120bp、より長い	Nsi I 部位まで、120bp、より長い	
RRE および cPPT および S/A	cPPT/CTS	cPPT/CTS	ベクターのこの領域は異なる群ごとに独特に設計された
	RRE (500bp)	RRE (500bp)	
プロモーター	MND	MND	
ABCD-1 seq	Nt. 346-2638	Nt. 346-2638	受託番号 NM_000033
5'UT	+	+	
3'UT	-	+	
WPRE	なし	あり(変異)	
SIN 3'LTR	+	+	同じ欠失
ポリ A	U5 の代わりに合成ウサギ β -グロビンポリ A(r β gpA)	U5 の代わりに合成ウサギ β -グロビンポリ A(r β gpA)	合成 r β gpA により、LTR スクレオチド配列の大部分を除去することによるさらなる程度の自己不活化が加わる

10

20

30

【0184】

形質導入

レンチウイルスの pLBP100 および pLBP140 の上清を、5-プラスミド (pLBP100 ベクターまたは pLBP140 ベクター、HPV275-gag-pol、 Ψ N15-VSV-G env、p633-rev、HPV601-tat) を用いた 293T 細胞のリン酸カルシウムトランスフェクションによって作製した。超遠心後に濃縮 pLBP100 を得、SCGM (Cell Genix Inc.、Germany GmbH) 培地に再懸濁させ、使い捨てのクライオバイアル中、 -70°C で凍結保存した。形質導入された 3T3 細胞のフローサイトメトリー分析から感染力価を決定した。

40

【0185】

ヒト造血幹細胞の形質導入についての pLBP100 レンチウイルスベクターと pLBP140 レンチウイルスベクターの比較を、表 2 に要約されている 4 つの別々の実験の間で実施した。実施した実験についての手順およびアッセイはそれぞれ図 2 および図 3 に例

50

示されている。

【0186】

【表2】

表2:実験の概要

実験	CD34+細胞 の供給源	MND- ALD ベ クター	LV の ロット 番号	力価 (TU/mL)	MOI	RN	培養物 のアッ セイ
072010 (BBB6)	Lonza: Fresh BM Lonza: Lot # 0F3668C	pLBP100	100701	1.3×10^8	12	-	液体お よび CFC
		pLBP140	100717	1.9×10^7	8.6	-	
081010 (BBB8)	AllCells: Fresh mPB Lot# A2186	pLBP100	100701	1.3×10^8	25	-	液体お よび CFC
		pLBP140	100724	1.0×10^8	25	-	
091410 (BBB9)	AllCells: Frozen mPB Lot# A2186	pLBP100	100820	1.2×10^8	25	-	液体お よび CFC
		pLBP140	100730	1.3×10^8	25	-	
080610	Lonza: Fresh BM Lonza: Lot # 0F3739B	pLBP100	100701	1.3×10^8	25	+	液体、 CFC お よび LTC-IC
		pLBP140	100724	1.0×10^8	25	+	

10

20

【0187】

新鮮なヒト骨髄 (BM) CD34⁺細胞 (Lonza、Walkersville、MD) または新鮮なもしくは凍結保存されたヒトG-CSF動員末梢血 (mPB) CD34⁺細胞 (AllCells、LLC、Emeryville、CA) を洗浄し、ヒト組換えIL-3 (60 ng/ml)、Flt-3L (100 ng/ml)、TPO (100 ng/ml) およびSCF (100 ng/ml) (PeproTech) を補充したSCGM中、1 mL当たり細胞 1×10^6 個の細胞濃度で18時間培養した。

【0188】

次いで、細胞を取り出し、洗浄し、単一の (実験080610) または3連の (実験072010、081010および091410) 平底96ウェルのウェルプレート中200 μL 体積に、SCGM (モック対照)、または同じ濃度のサイトカイン、およびウイルスを添加した8 $\mu\text{g/ml}$ の硫酸プロタミンを補充した8.6~25のMOI (最終的な力価1.7~5.0 $\times 10^7 \text{ TU/ml}$) のpLBP100またはpLBP140の上清中1 mL当たり細胞 2×10^6 個の濃度で再懸濁させた。実験080610では、20 $\mu\text{g/mL}$ のレトロネクチン (Takara Bio Inc、Shiga、Japan) を用いて予めコーティングした96ウェルプレートにおいて4℃で一晩のインキュベーションを伴って形質導入を実施した。

30

【0189】

短期の前駆体アッセイ

ウイルスを添加した24時間後に、細胞を洗浄し、(1) 同じ濃度のサイトカインを補充したSCGM培地に再懸濁させ、さらに21日間インキュベートしたか、または(2) コロニー形成細胞 (CFC) のためにMethoCult H4434培地 (Stem Cell Technologies) で1-培養した。

40

【0190】

全ての骨髄系コロニー (CFU-GM) および赤血球コロニー (BFU-E) を14日目に計数し、細胞をPBSに懸濁させ、洗浄し、DNEasyキット (QIAGEN) を使用してゲノムDNAを調製した (生存細胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個)。

【0191】

50

長期培養開始細胞 (LTC-IC) アッセイ

96ウェルプレート8個に、10%ウシ胎仔血清を補充したアルファ培地中のマウス骨髄間質細胞系MS-5を播種し、ほぼコンフルエントになったところでガンマ線照射した(30Gy)。

【0192】

照射した2日後に、予め樹立したMS-5間質層に、StemSpan SFEM(無血清培地、Stem Cell Technologies、Vancouver、Canada)200μL中のヒトCD34+試験細胞を、種々の希釈、希釈当たり16ウェル(16ウェル中の1ウェル当たり細胞2000個、16ウェル中の1ウェル当たり細胞1000個、16ウェル中の1ウェル当たり細胞500個、16ウェル中の1ウェル当たり細胞250個、16ウェル中の1ウェル当たり細胞125個、16ウェル中の1ウェル当たり細胞62個、16ウェル中の1ウェル当たり細胞31個、16ウェル中の1ウェル当たり細胞16個、16ウェル中の1ウェル当たり細胞8個)で播種した。さらなるCD34+細胞100,000個をMS-5フィーダー細胞上で5週間にわたりバルクで培養した。毎週、培地100μLを新鮮なStemSpan SFEM100μLと交換した。5週間後に、培養物を収集し、次いで、コロニーを14日間成長させるために全内容物をMethoCult(商標)GF+H4434に播いた(12ウェルプレートのウェル当たりメチルセルロース500μL)。次いで、個々のコロニーを選び出し、その後のベクターのgag配列を対象とするプライマーおよび抽出後のゲノムDNAの存在を証明する陽性対照を有するためにゲノム配列(Epo遺伝子)を対象とするプライマーを使用したPCR分析のためにDNAを抽出した(SOP#GTX/RE/PBM/M-023およびLTGC/RE/PBM/M-07)。LTC-ICの頻度および95%信頼区間を、L-calcソフトウェア、バージョン1.1(Stem Cell Technologies)を使用して計算した。

【0193】

ベクターのコピー数(VCN)の決定

PBSで希釈し洗浄した後の、液体培養物またはメチルセルロース培養物中にプールしたコロニー細胞由来のDNAの調製物に対する定量的(リアルタイム)PCR(QPCR)から細胞当たりの平均VCNを決定した。QPCRはABI Prism 7000 Sequence Detection Systemで、ABI試薬および96ウェルプレートを使用して実施した。

【0194】

ベクターを定量化するために使用したヒトgagプロンプおよびプライマー:

【0195】

【化1】

GAG-F(フォワードプライマー) 5'ggagctagaacgattcgcagtta 3'

GAG-R(リバースプライマー) 5' ggtgttagctgtccagttattgtc 3'

GAG-P(プローブ、アンチセンス) 5'-(FAM)-acagccttctgatgtctctaaaaggccagg-(TAMRA)-3'

【0196】

正規化するためのゲノムDNAを定量化するために使用したヒトベータアクチンプローブおよびプライマー:

【0197】

【化2】

プローブ: 5' VIC-cctggcctcgtgtccacctcca-TAMRA

フォワード -5' tccgtgtggatcgccggctcca 3'

リバース -5' ctgcttgatccacatctg 3'

10

20

30

40

50

【0198】

溶出したゲノムDNA（およそ50～100ng）の1/100を、Absolute Quantificationプログラムおよび初期設定のサーマルサイクリングプログラムを用い、25μlの反応において1×TaqMan（登録商標）Universal Master Mix、0.72μMの各プライマーおよび0.35μMのプロープを使用してアッセイした。

【0199】

フローサイトメトリーによる導入遺伝子の発現

ABCD1（ALDP）タンパク質の発現を、固定し透過処理した細胞（Fix & Perm Reagents AおよびB、cat番号GAS001 & GAS002、Invitrogen）において、マウス抗ヒトALDP（ABCD1）モノクローナル抗体（クローン1D6、ロット番号LV1383343、Chemicon）を使用し、その後、PEとコンジュゲートしたラット抗マウスIgG1 mAb（クローンA85-1、BD Pharmingen）を用いて染色して実施した。マウスIgG1モノクローナル抗体クローンMOPC-21（BioLegend）をアイソタイプ対照として使用した。

10

【0200】

統計分析

各実験内の群の値の比較を、両側ノンパラメトリックマンホイットニーU検定（GraphPad Prism v. 3.0）を使用して十分なサンプルサイズ（ $n \geq 3$ ）で分析した。群間の有意性を0.05未満のp値で決定した。

20

【0201】

結果：

前駆細胞の頻度に対する影響

機能的な骨髓系前駆体（CFU-GM）および赤血球前駆体（BFU-E）の収率を図4における4つの実験全てについて比較し、実験の第1のセット（実験072010、081010および091410）における3連の形質導入についてpLBP100の上清またはpLBP140の上清を添加することの有意な影響は示されなかった。単一の形質導入について6セットのメチルセルロース培養物を比較した実験の第2のセット（実験080610）については、pLBP100を添加すると骨髓系前駆体の有意な増大が観察されたが、pLBP100で処理した後に赤血球コロニーの収率には有意な減少が見られ、pLBP140を用いて形質導入した後にさらに減少した。

30

【0202】

より原始的なLTC-ICの頻度は、2つのレンチウイルスベクターを用いた形質導入後には平均して低かったが（図5）、95%信頼区間が重複したのでこれらの差は有意ではなかった（ $p > 0.05$ ）。

【0203】

ベクターPCRによる形質導入の効率

液体培養物中で35日にわたって維持した細胞から単離されたゲノムDNAのリアルタイムPCR分析により、実験の第2のセットにおいて、全ての時点で、pLBP100についての推定ベクターのコピー数（VCN）がpLBP140と比較して多いことが示された（図6A）。

40

【0204】

これは、メチルセルロース培養物中で成長しているプールしたCFCについての平均VCNが多いことおよび同じ実験からのパーセントベクター陽性骨髓系コロニーにも反映された（図6BおよびC）。しかし、実験の第1のセットの3連の実験の間での比較では、プールしたコロニーのVCNまたはベクターについて陽性の試験コロニーのパーセントに有意差は示されなかった。

【0205】

図7は、ベクター群のどちらについても5週間のLTC-IC後に平均VCNおよびパ

50

ーセントベクター陽性骨髄系コロニーが減少し、再度、p L B P 1 0 0を用いて形質導入された細胞がより高いV C N (1 . 1コピー対0 . 4コピー) および陽性コロニーの割合 (5 1 %対3 5 %) を有することを示す。

【0206】

フローサイトメトリーによるA L D P 導入遺伝子の発現

抗A L D P抗体を使用して細胞内染色した細胞の蛍光プロファイルの例が図8 A 1 および図8 A 2 のヒストグラムに示されており、それからパーセント陽性 (それぞれのモック対照の0 . 5 %を超えたもので決定) および蛍光強度 (M F I) の中央値の比を決定し、それが図8 B およびCに示されている。導入遺伝子の発現のレベルは、実験間で変動し、実験072010および080610では、発現している細胞の平均パーセントがp L B P 1 0 0についてp L B P 1 4 0群と比較して高かった。しかし、実験091410では逆のことが観察され、実験081010では匹敵するレベルであった。3連の実験間での統計比較により、パーセントA L D P ⁺細胞にもM F I にも有意差は示されなかった (p > 0 . 0 5) 。

【0207】

結論：

前臨床的なp L B P 1 0 0レンチウイルスベクターの調製物2つおよびp L B P 1 4 0ベクターを含有するW P R Eの調製物3つを使用し、骨髄またはG C S F 動員末梢血に由来する正常なヒトC D 3 4 ⁺細胞の形質導入を伴う4つの別々の実験間の比較を実施した。実験080610における骨髄系前駆体の増大および赤血球前駆体の減少は例外として、初期の前駆体またはより原始的なL T C - I Cのいずれについても上清の有意な毒性はなかった。平均V C Nまたはベクターを含有する骨髄系コロニーまたはL T C - I Cの割合によるとp L B P 1 4 0について形質導入の効率が低い傾向があったが、これは、十分なサンプルサイズ (n = 3) のこれらの実験に関しては統計的に有意ではなかった。2つのベクターによりもたらされた導入遺伝子の発現のレベルにより、p L B P 1 0 0由来のA L D P ⁺細胞のパーセントが高いことを示す2つの実験とパーセントがp L B P 1 4 0と比較して低いことを示す1つの実験を伴う混在する結果が生じた。これらの差は統計的に有意ではなかった。

【0208】

全体的に、W P R EをM N D - A L Dベクターに加えることの利点はないと思われる。したがって、本発明のベクターは、W P R Eを含有するベクターと比較して増大した安全性および同等の優れた有効性を提供する。さらに、結果は、本発明のベクターがさらなる開発および臨床的な適用によく適合することを示している。

【0209】

(実施例2)

A L D 欠損初代ヒト線維芽細胞におけるA L D タンパク質欠乏の機能的補正の評価

実験の概要

非常に長鎖の脂肪酸 (V L C F A) 、特にC 2 6 鎖の蓄積は、多くの場合、A L D の生化学的「特徴」と称される。Hubbard、Mol Genet. Metab. 97巻：212～220頁 (2009年) 。欠損細胞にA B C D 1 のc D N Aを含有するレトロウイルスベクターを用いて形質導入することにより、機能的なA L D タンパク質 (A L D P) レベルが回復し、V L C F A のレベルが低下する。これは、A L D 患者由来の初代線維芽細胞株を含めた種々の細胞集団において示されている。

【0210】

Kennedy Krieger Institute (Baltimore, MD) において開発されたC 2 6 : 0 l y s o - P C アッセイ (L P C アッセイ) では、液体クロマトグラフィーおよびタンデム質量分光測定によってV L C F A を測定する。この方法は、新生児の血斑のために開発され、血漿および培養した皮膚線維芽細胞に対して検証もされた。本実施例では、C 2 6 : 0 l y s o - P C アッセイを用いて、A L D 患者の線維芽細胞における生化学的欠損の機能的補正を実証した。この実験の目的は、ベクター

により改変されたALD欠損線維芽細胞におけるVLCFAレベルの低下におけるベクターpLBP100 (p100) およびpLBP140 (p140) の有効性を比較することであった。

【0211】

細胞株

初代ヒト線維芽細胞であるGM04496およびAG01440をCoriell Cell Repository (Camden, NJ, USA) から入手した。GM04496細胞は、ABCD1遺伝子の未知の突然変異を有するALD陰性患者から単離された形質転換されていないヒト線維芽細胞である。AG01440細胞は正常なヒト線維芽細胞である。細胞を、加湿したインキュベーターの中で、15% FBS (HyClone FBS、GIBCO Life Technologies) を伴うDMEM (GIBCO Life Technologies、Carlsbad、CA) 中、37℃、5% CO₂で成長させた。

【0212】

TF-1細胞(ATCC(登録商標) Number CRL-2003(商標))は骨髓赤白血病に由来するヒトリンパ芽球株である。細胞を、10% FBSを伴うRPMI-1640 (GIBCO Life Technologies) 中で成長させた。

【0213】

レンチウイルスベクターを作製するために使用する293T細胞(Stanford University)を、10% FBSを伴うDMEM中で成長させた。

【0214】

形質導入プロトコールおよびLyso-PCアッセイのためのプレーティング

サブコンフルエントの細胞に、培地+8 µg/mlのポリブレン(Hexadimethrine Bromide、Sigma、St Louis MO)中のウイルスの上清を用いて14~16時間にわたって形質導入した。次の日に新鮮な培地と交換した。早ければ形質導入の3日後に、大多数の細胞を12ウェルプレートに3連でプレーティングした(脂質抽出用に2つの反復およびタンパク質分析用に1つの反復(Falcon#35-3043))。同等数の正常な対照細胞(293T、AG01440またはTF-1)もプレーティングまたはペレットにした。細胞の単層を1×HBSS緩衝液(GIBCO Life Technologies)で2回洗浄し、in situ、-20℃で凍結させた。凍結方法は最初にKennedy Kriegerにおいて検定し、新鮮な細胞単層を収集することに匹敵することが決定された。残りの細胞を培養物中で保持した。

【0215】

ゲノムDNAの単離およびベクターのコピー数(VCN)の決定

LP Cアッセイのためにプレーティングした後に残った細胞を、DNAを単離し、VCNを分析するためのゲノムDNAを収集するために、形質導入の少なくとも9日後まで培養物中で保持した。脂質およびタンパク質の抽出をKennedy Krieger Instituteにおいて完了した。

【0216】

結果：

4496細胞および種々の正常対照および陰性対照のLyso-PC分析

4496細胞および正常な線維芽細胞1440細胞を分析のためにプレーティングした。TF-1細胞および293細胞において、免疫染色およびフローサイトメトリーによってALDPが検出可能であった。したがって、これらの細胞も、C26:0 LPCのベースラインレベルについての代替の陽性(すなわち、正常なALDP-表現型)対照としてアッセイした。試料を4つの独立した分析でアッセイした。

【0217】

C26:0 LPCのベースラインレベルは、正常な表現型を有する細胞においてタンパク質1mg当たり3~50 pmolにわたり、各分析において4496細胞のレベルは上

10

20

30

40

50

昇していた。全体的に、通常の細胞における C 2 6 : 0 L P C のレベルには、4 4 9 6 と比較して少なくとも 5 倍の差異（0. 2 を下回る比）が存在した。この比は、患者の血斑について報告された結果と同様であった。

【0 2 1 8】

p 1 0 0 を用いて形質導入された 4 4 9 6 細胞と p 1 4 0 を用いて形質導入された 4 4 9 6 細胞の比較

4 4 9 6 細胞に、p 1 0 0 および p 1 4 0 を用いて形質導入した。細胞を、本明細書に記載の通り V L C F A および V C N について分析した。L y s o P C アッセイ結果は表 3 に示されている。2 連のウェルを平均し、モック形質導入された細胞に対して正規化した。モックに対する V L C F A 補正の比対 V C N が図 1 0 に示されている。V C N が ≤ 1 コピーまで減少すると、細胞集団は、形質導入されていない細胞と、細胞当たり 1 つまたは 2 つのベクターコピーを有する細胞の混合物であることが予想され、したがって、V L C F A は減少することが予想される（図 1 0）。

【0 2 1 9】

【表 3】

表 3:Lenti-D p100 を用いて形質導入された 4496 細胞および LVVp140 を用いて形質導入された 4496 細胞における C26:0LPC の結果

	MOI	タンパク質 1mg 当たりの C26:0LPC の総 p モル(反復ウェル)		反復ウェルの平均	モック形質導入に対する比
モック形質導入された 4496		50.53	58.94	54.73	1.00
Lenti-D p100	3	8.82	8.47	8.65	0.16
	1	11.05	12.57	11.81	0.21
	0.3	20.59	25.57	23.08	0.42
p140	3	15.55	10.81	13.18	0.24
	1	10.35	15.37	12.86	0.23
	0.3	22.74	33.34	28.04	0.51
正常な 293T		6.98	6.75	6.87	0.12

【0 2 2 0】

0. 2 の比を、モック形質導入された 4 4 9 6 細胞と比較した正常な表現型を有する細胞のレベルとして確立した。V C N が $\geq$ 約 1. 5 である場合、両方のベクターについて、4 4 9 6 細胞における V L C F A の蓄積が通常の細胞のレベルまで補正される。V C N が 1. 0 ~ 0. 6 では両方のベクターで補正の減少の傾向が存在する。

【0 2 2 1】

結論：

C 2 6 : 0 l y s o - P C アッセイを Kennedy Krieger Institute において実施し（Hubbard 2009 年）、液体クロマトグラフィーおよびタンデム質量分光光度法によって V L C F A を測定し、A L D 患者の細胞株 G M 0 4 4 9 6 細胞における C 2 6 の蓄積の生化学的欠損が確認された。p 1 0 0 および p 1 4 0 を用いて形質導入した後、細胞はフローサイトメトリーによって実証された通り A L D P 発現について陽性であり（データは示していない）、平均 V C N が $\geq 1. 5$ である細胞は、正常な表現型を有する細胞のレベルまでの V L C F A 蓄積の完全な補正を示した。p 1 0 0 を用いて形質導入された細胞と p 1 4 0 を用いて形質導入された細胞を比較した場合に同等の結果が得られ、これにより、W P R E 配列を欠く p 1 0 0 の有効性が裏付けられる。

【0 2 2 2】

上記の種々の実施形態を組み合わせる別の実施形態をもたらしすることができる。本明細書において参照され、かつ／または本出願データシートに列挙されている米国特許、米国特

許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許刊行物は全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。必要であれば、実施形態の態様を、種々の特許、出願および刊行物の概念を用いるように改変して、さらに別の実施形態をもたらすことができる。

【0223】

これらおよび他の変化は、上記の発明の詳細な説明を踏まえて実施形態に行うことができる。一般に、以下の特許請求の範囲において使用される用語は、特許請求の範囲を本明細書および特許請求の範囲に開示されている特定の実施形態に限定するものと解釈されるべきではなく、可能性のある実施形態の全てをそのような特許請求の範囲に権利が与えられる等価物の全範囲と一緒に包含するものと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は本開示により限定されない。

【図 1】

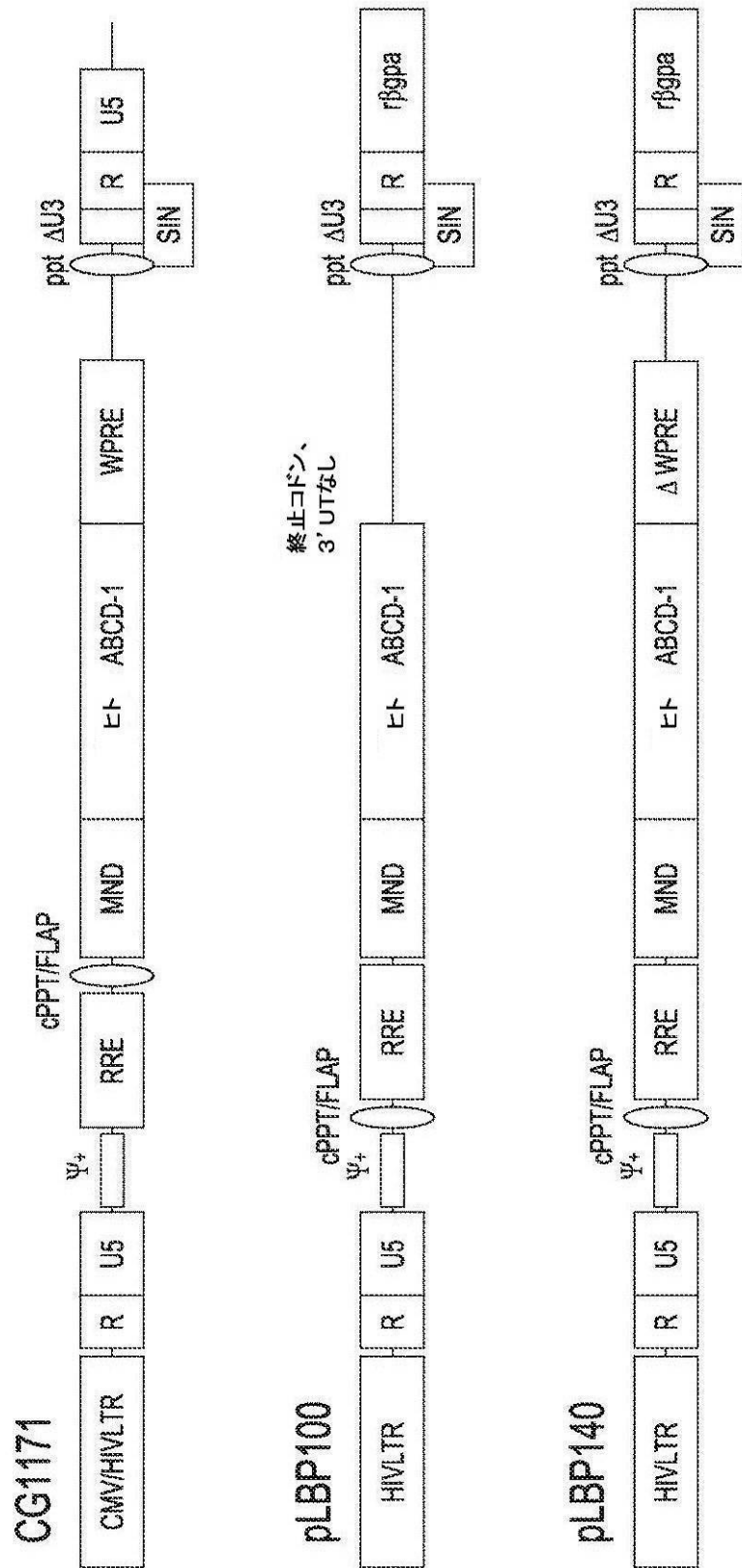
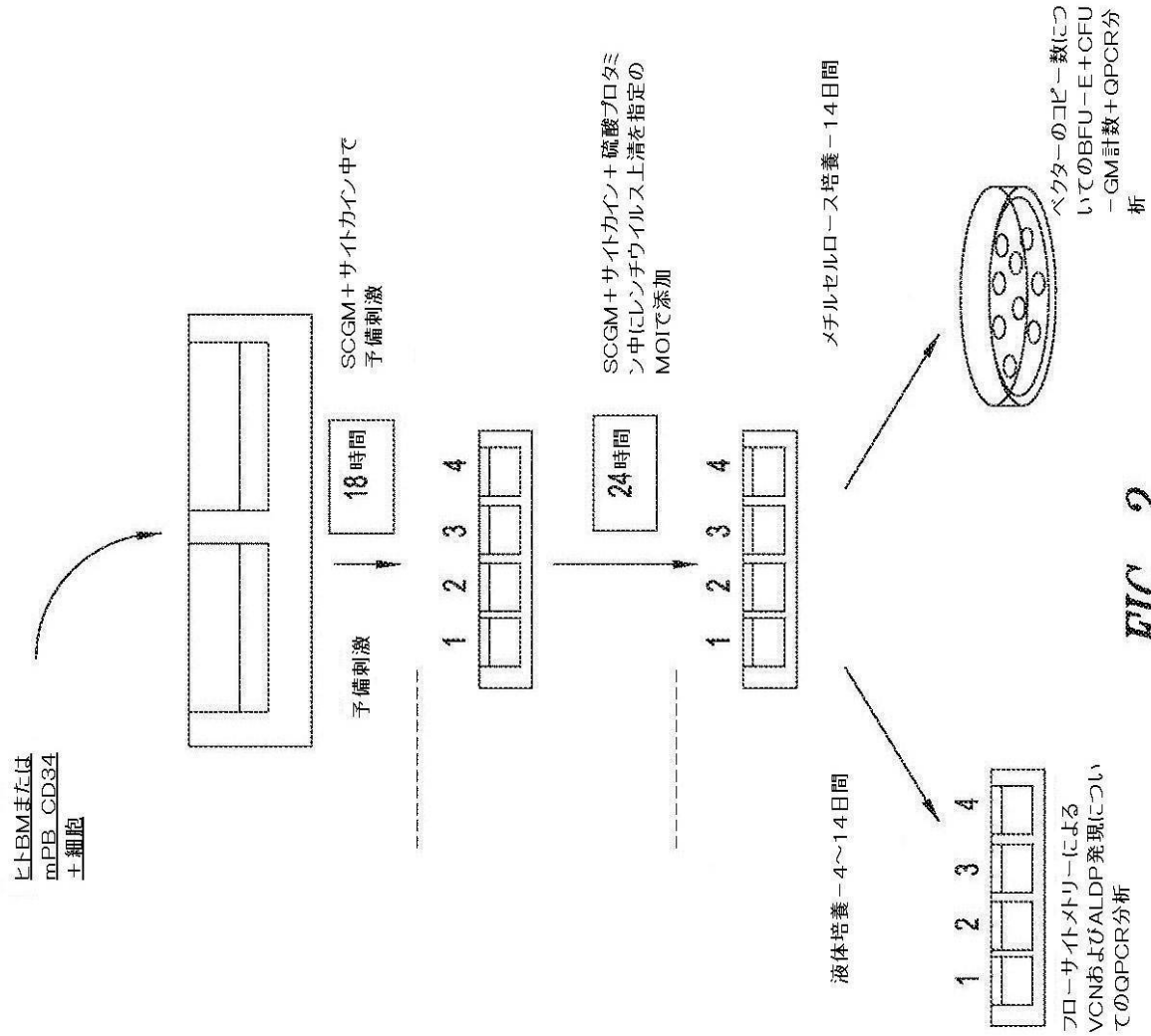


FIG. 1

【図2】



【図 3】

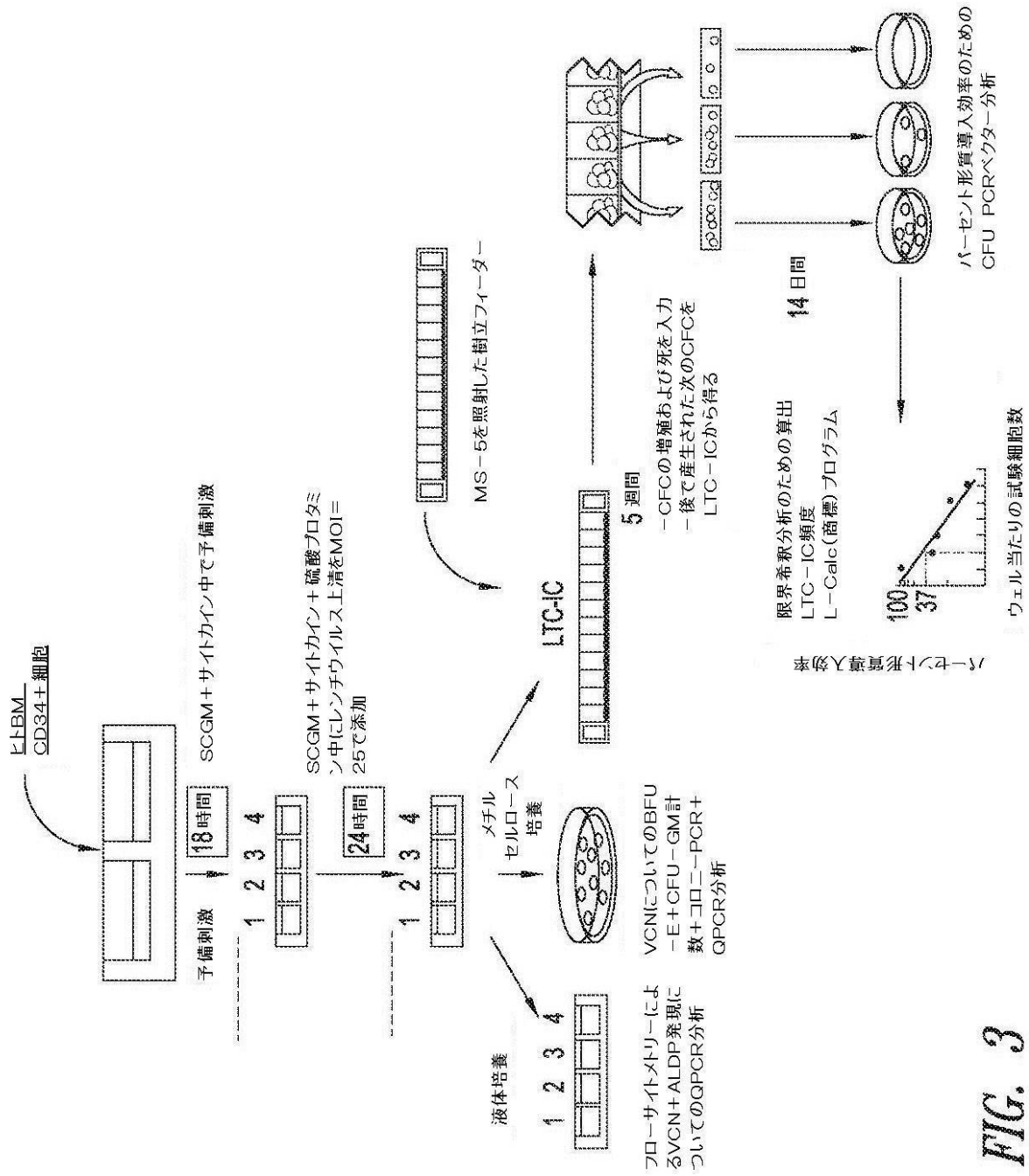


FIG. 3

【図 4】

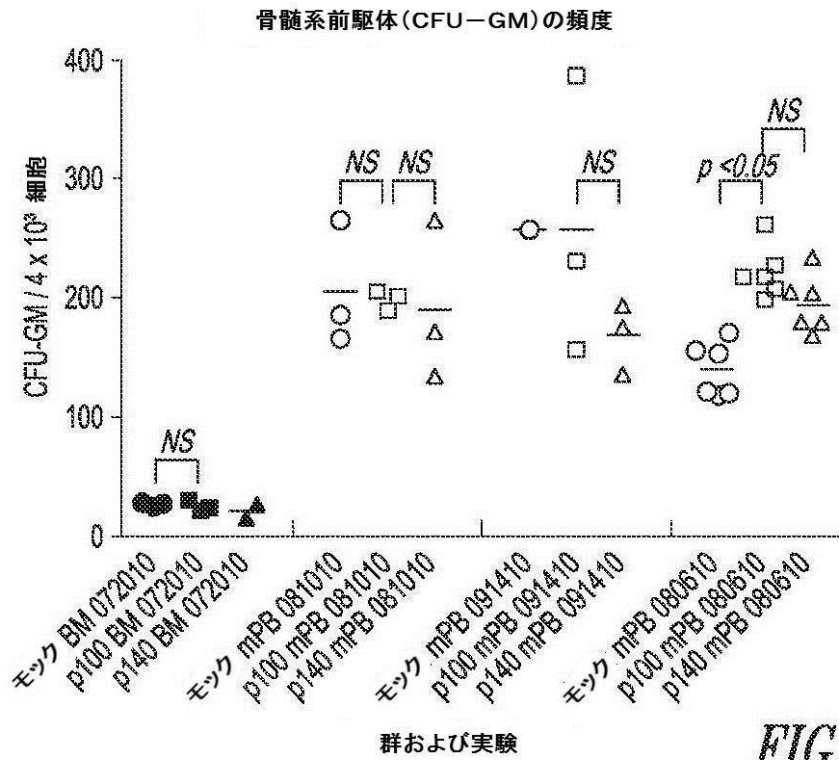


FIG. 4A

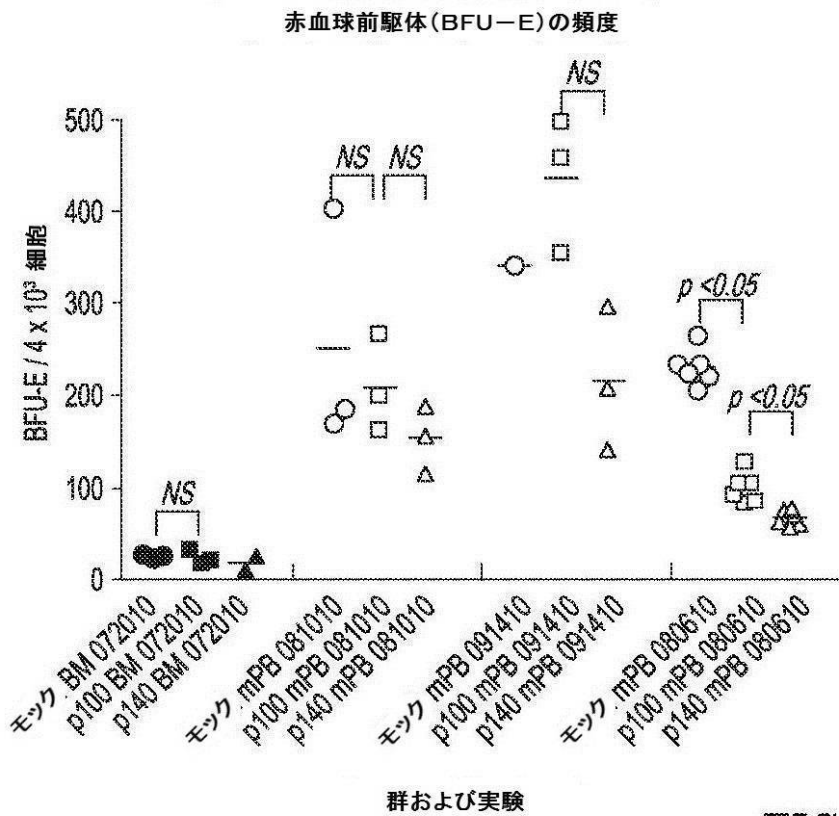


FIG. 4B

【図 5】

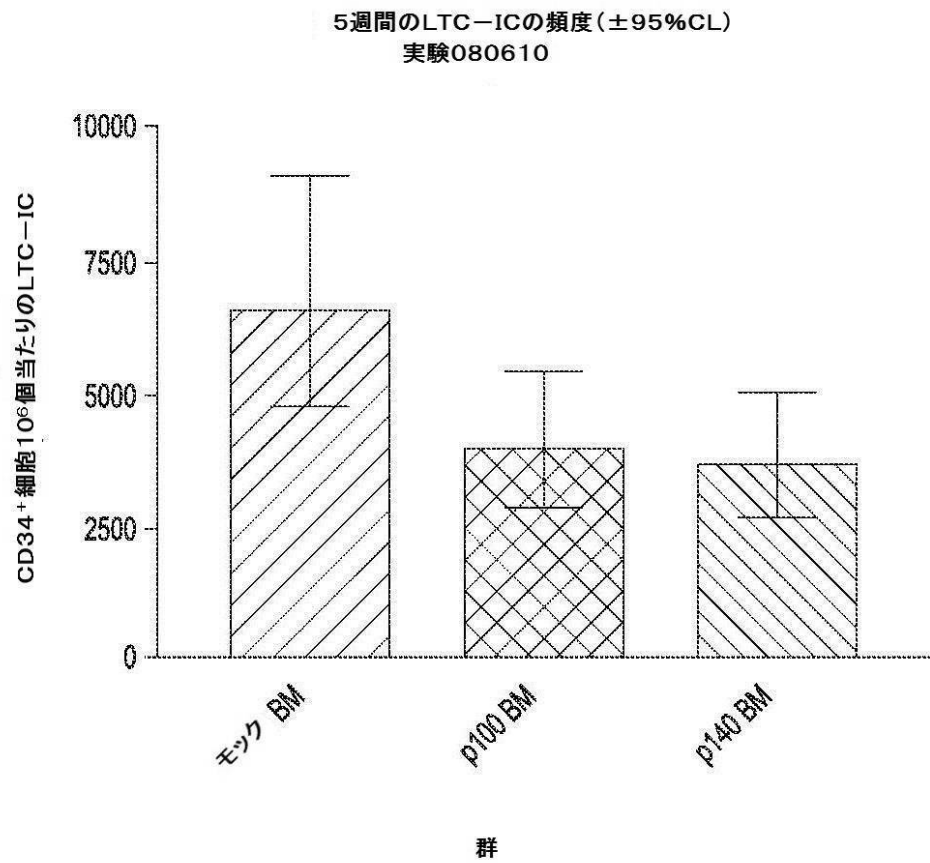
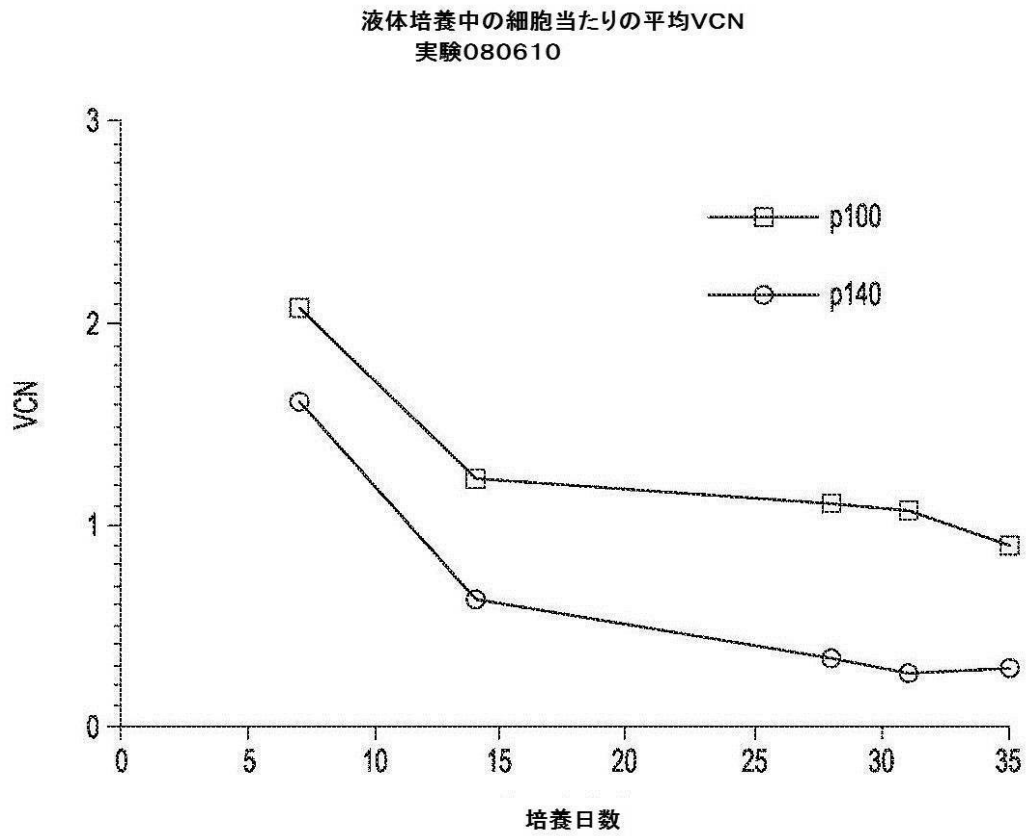


FIG. 5

【図 6 - 1】

*FIG. 6A*

【図 6 - 2】

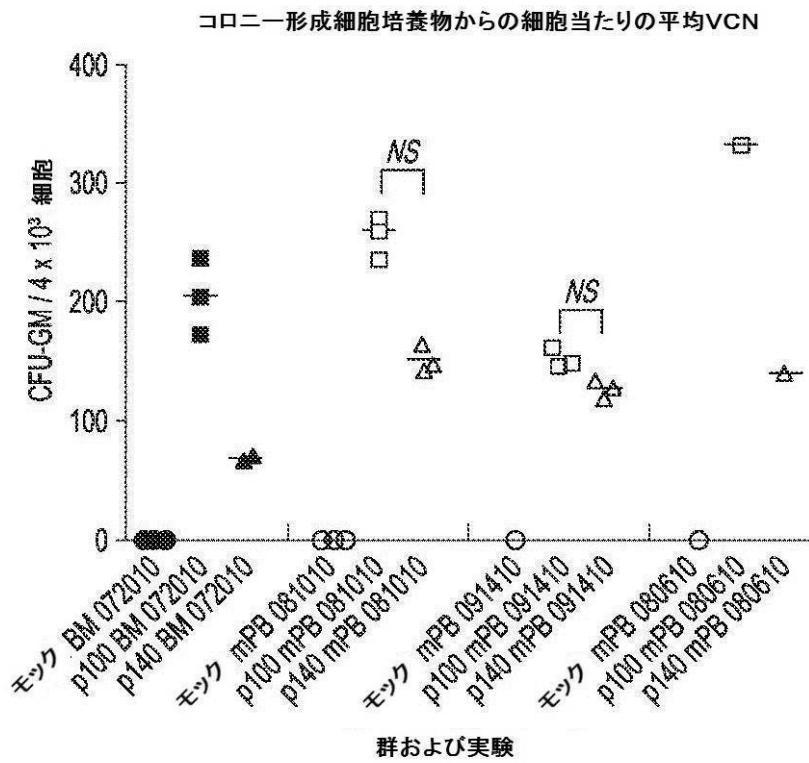


FIG. 6B

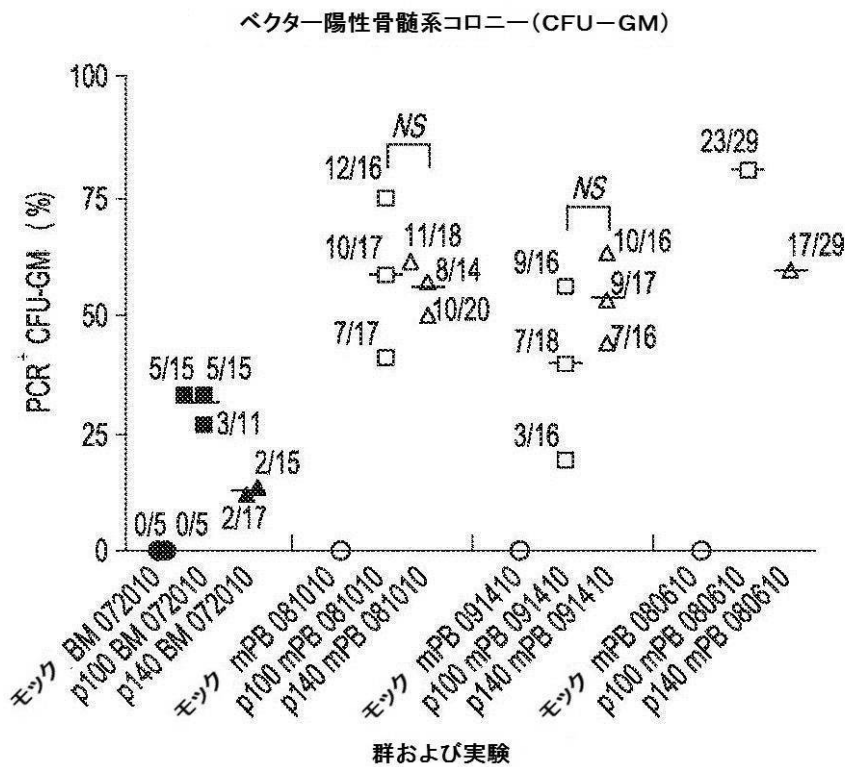


FIG. 6C

【図 7】

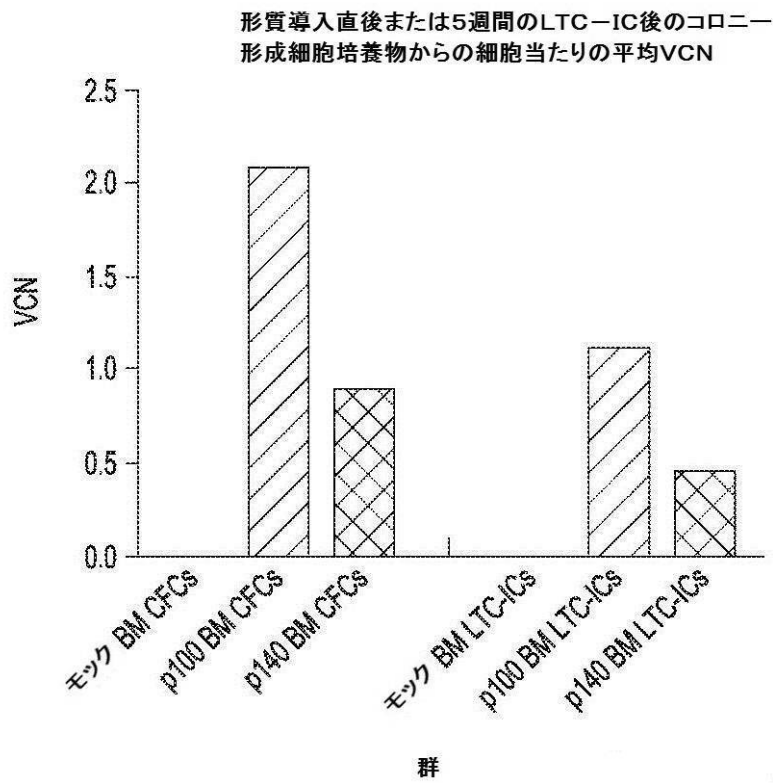


FIG. 7A

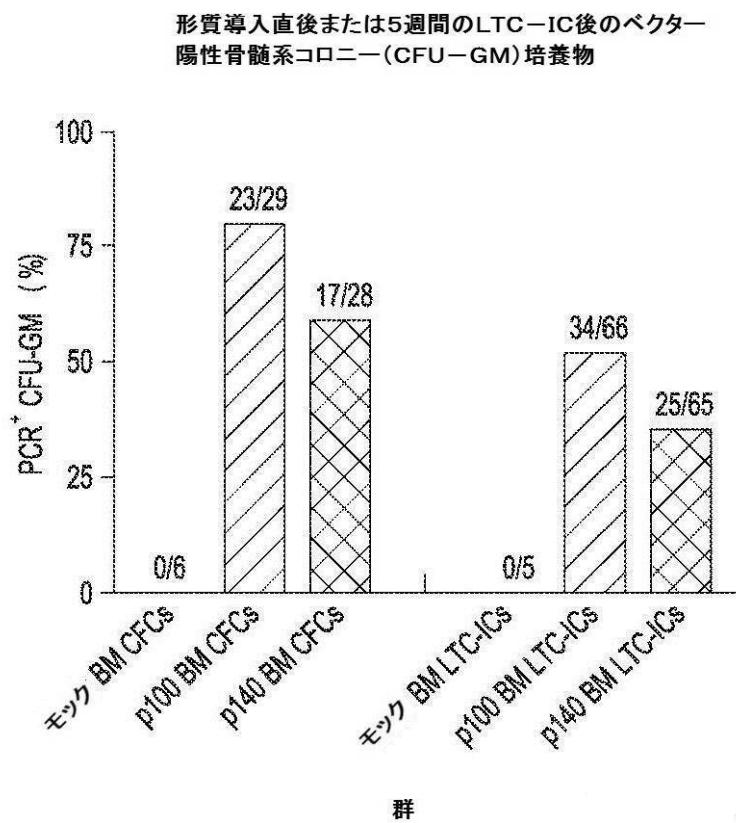


FIG. 7B

【図 8 - 1】

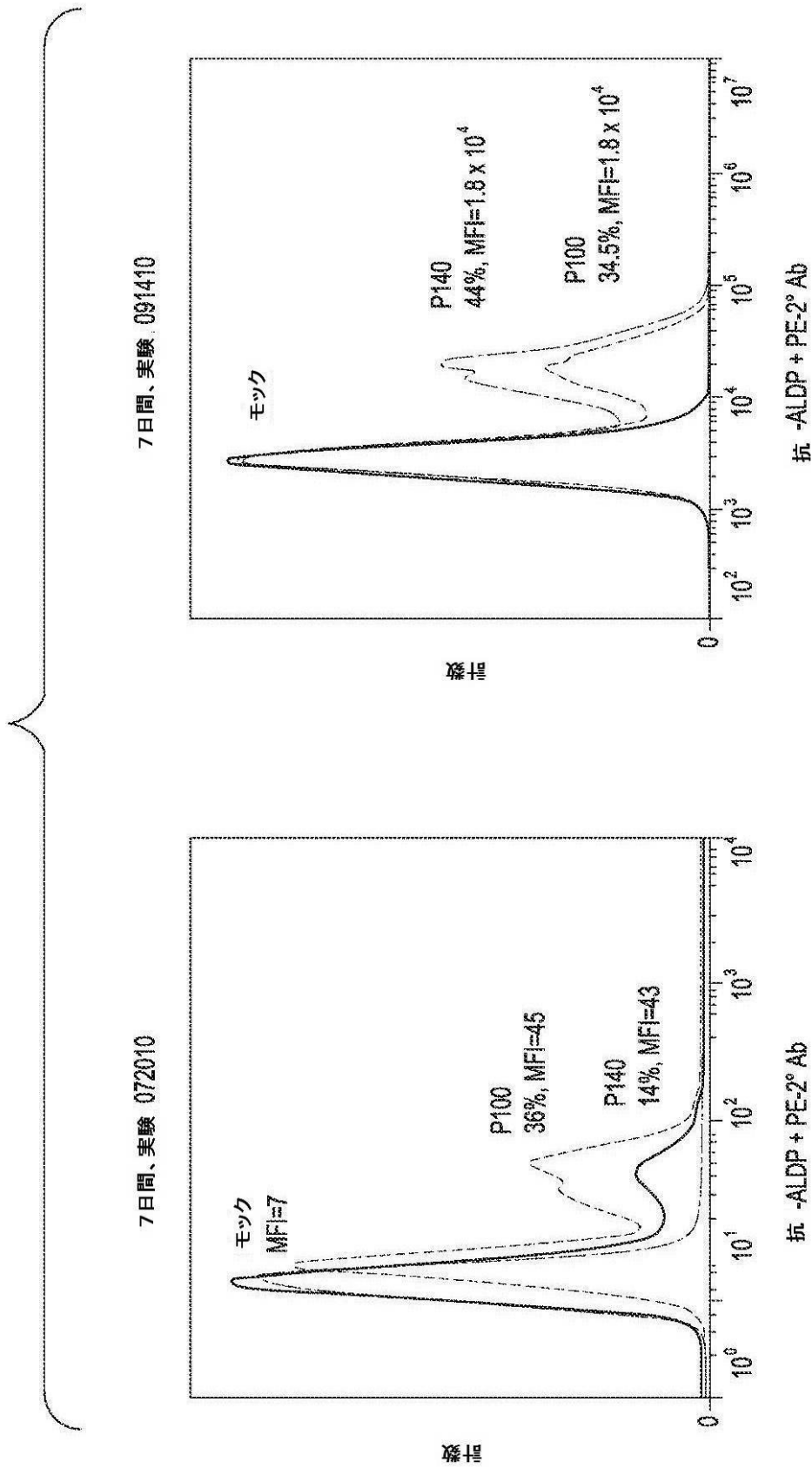


FIG. 8A1

【図 8 - 2】

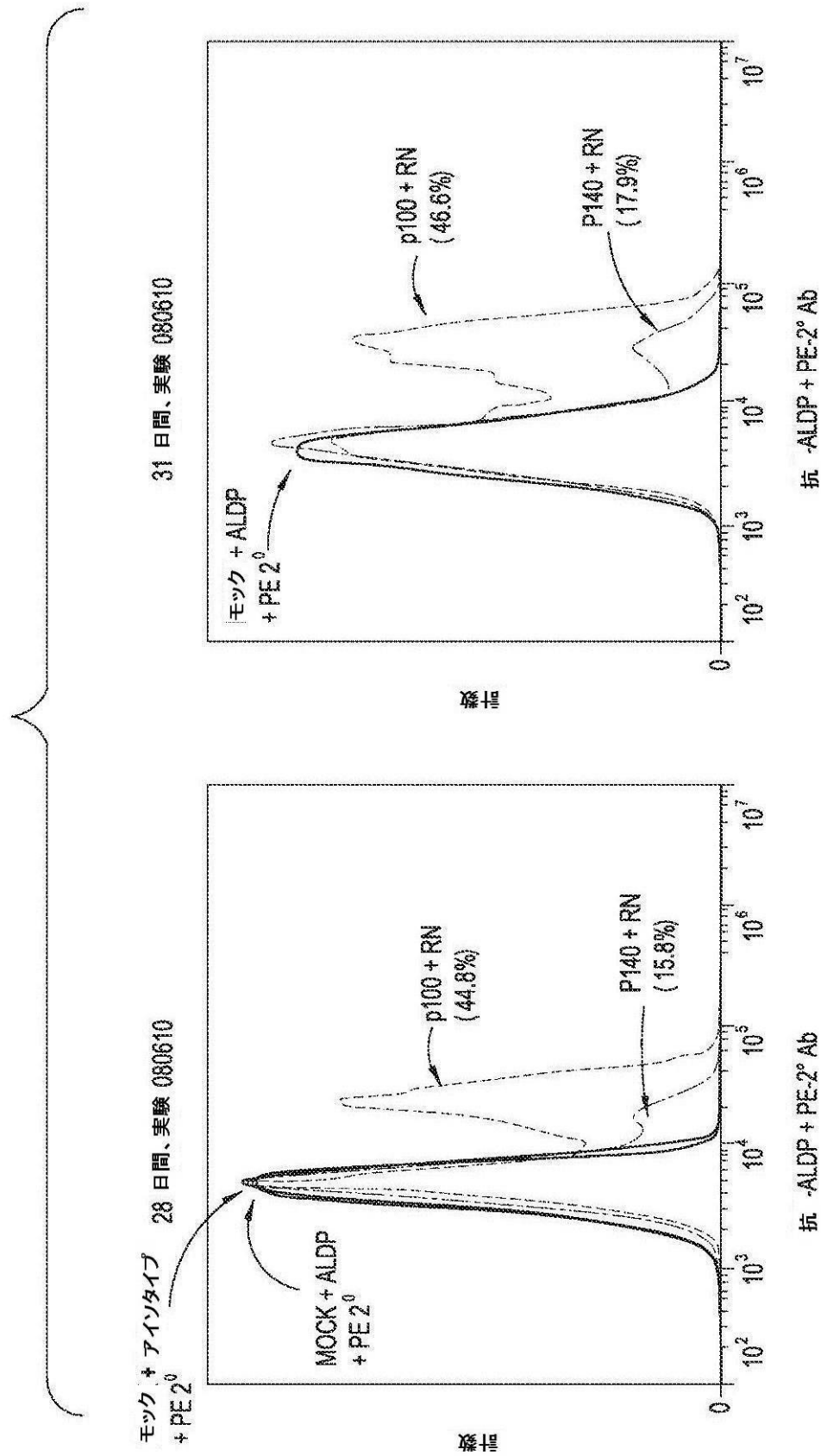


FIG. 8A2

【図 8 - 3】

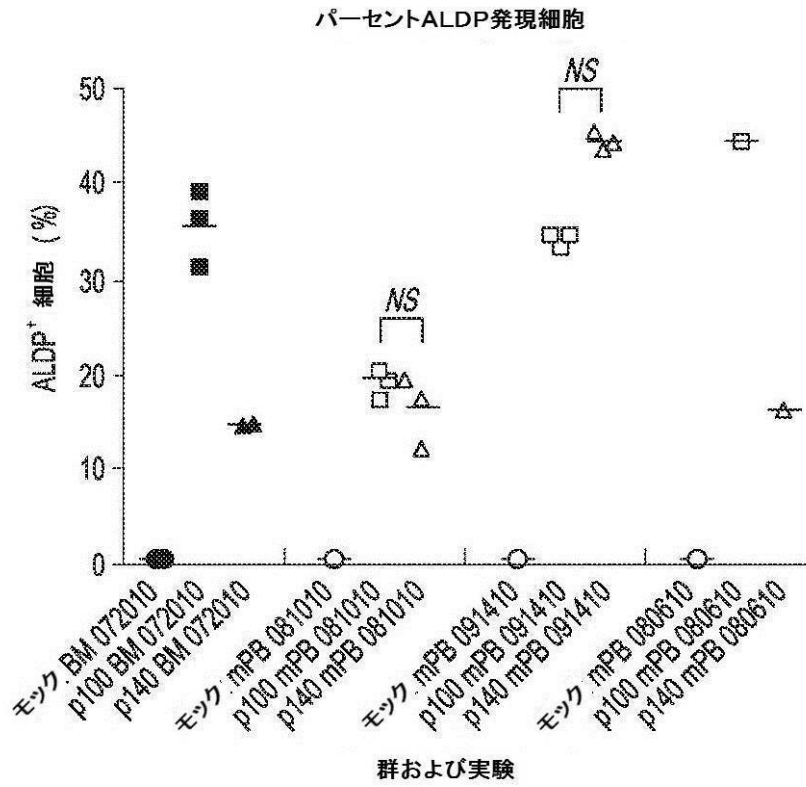


FIG. 8B

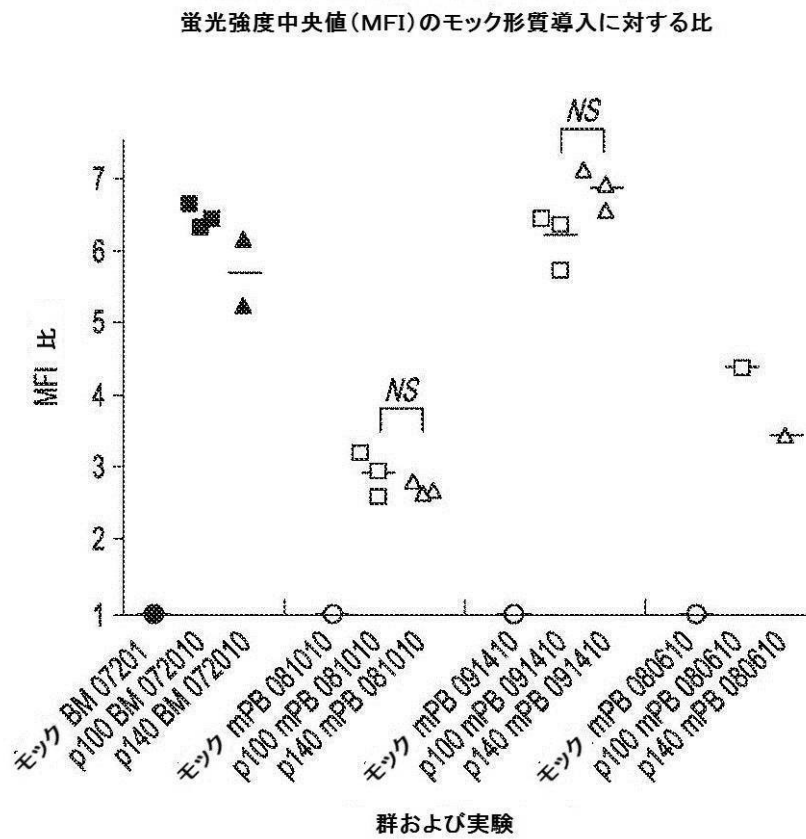


FIG. 8C

【図 9】

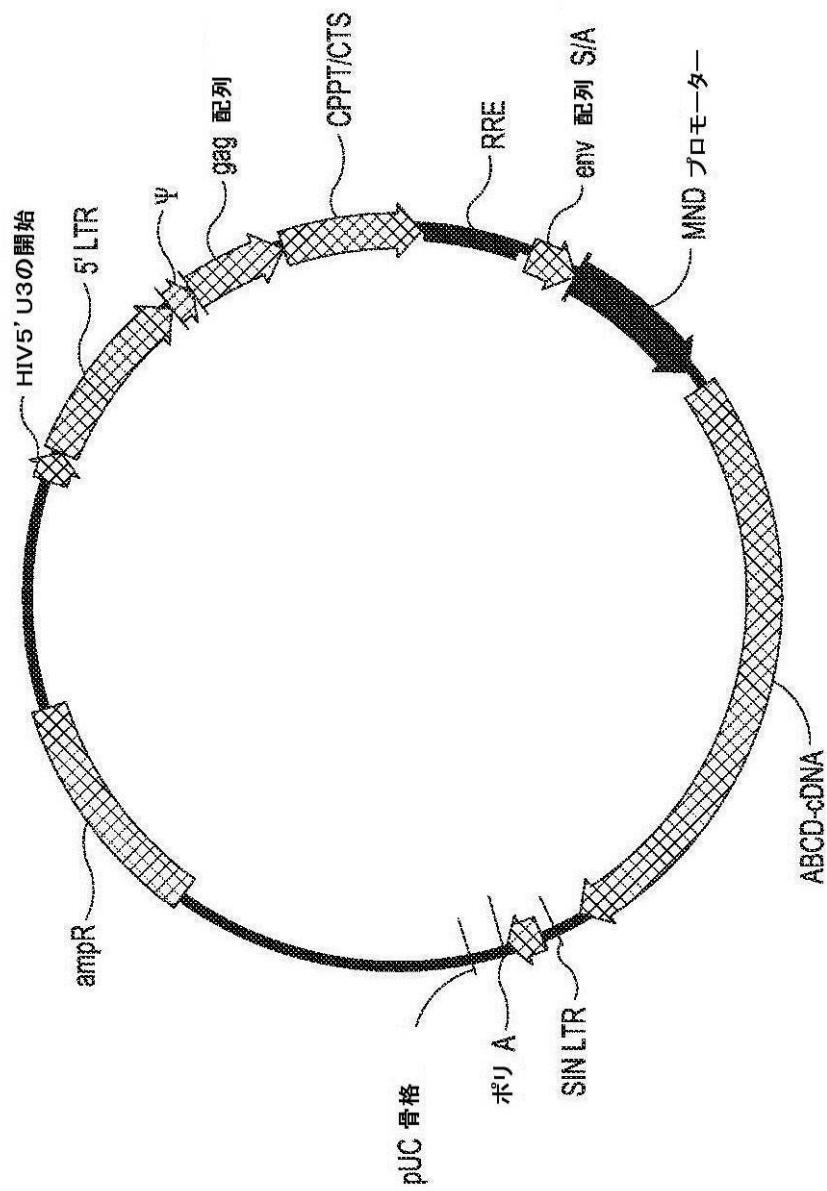
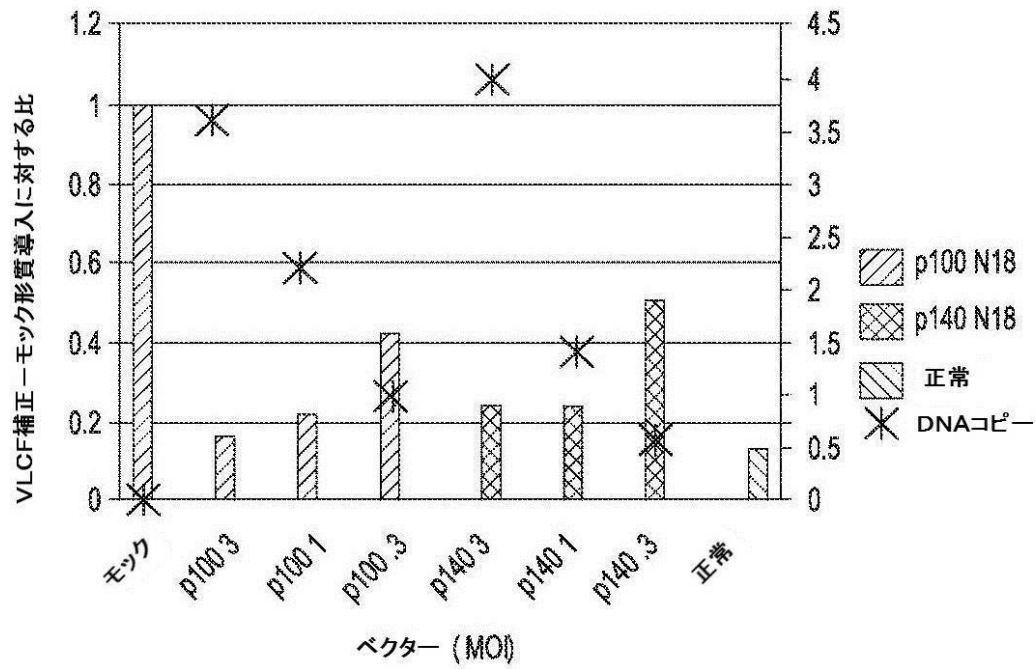


FIG. 9

【図 10】

*FIG. 10*

【配列表】

2015107134000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01) A 6 1 P 25/00

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 マリア ジョアン ディナーロ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 9 4 5, マーブルヘッド, ピックウィック ロード
3 9

(72)発明者 ミッチェル ハワード ファイナー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 2, ウッドサイド, オーク ヘブン ウェイ 2
1

(72)発明者 ガボール ベレス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 5 5, メドフォード, ミスティック リバー ロ
ード 4 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 EA02 EA04 FA02
GA11 HA01 HA17
4B065 AA90X AA90Y AA95X AA95Y AA97X AA97Y AB01 BA02 CA44
4C084 AA13 NA14 ZA022
4C087 AA01 AA02 BB64 BC83 NA13 NA14 ZA02

【外国語明細書】
2015107134000001.pdf