

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-526920

(P2016-526920A)

(43) 公表日 平成28年9月8日 (2016.9.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04 Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 5
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-533383 (P2016-533383)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月5日 (2014.8.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年3月25日 (2016.3.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/049831
 (87) 国際公開番号 W02015/021077
 (87) 国際公開日 平成27年2月12日 (2015.2.12)
 (31) 優先権主張番号 61/862, 433
 (32) 優先日 平成25年8月5日 (2013.8.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510337436
 トカジェン インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 92109 カリフォル
 ニア州, サンディエゴ, スイート 230
 , バンカー ヒル ストリート 3030
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (74) 代理人 100169971
 弁理士 菊田 尚子

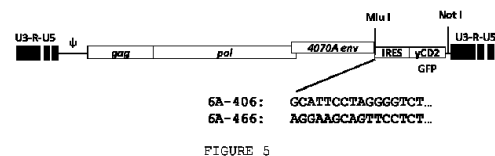
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 最適化A-バルジを有する組換えベクター

(57) 【要約】

本開示は、遺伝子療法及び遺伝子送達のための複製コンピテントレトロウイルスベクター(RCR)を記載する。RCRは、分岐領域のAバルジに6~7A'sを有するIRES配列を含む。本開示は、レトロウイルスGAGタンパク質；レトロウイルスPOLタンパク質；レトロウイルスエンベロープ；レトロウイルスポリヌクレオチド配列の3'末端に長末端反復(LTR)配列、及びレトロウイルスポリヌクレオチドの5'末端にプロモーター配列を含むレトロウイルスポリヌクレオチド、を含む組換え複製コンピテントレトロウイルスを提供する。

【選択図】図5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

組換え複製コンピテントレトロウイルスであって、
レトロウイルスGAGタンパク質；
レトロウイルスPOLタンパク質；
レトロウイルスエンベロープ；
レトロウイルスポリヌクレオチドであって、レトロウイルスポリヌクレオチド配列の3'末端に長末端反復（LTR）配列、レトロウイルスポリヌクレオチドの5'末端に哺乳動物の細胞における発現に適しているプロモーター配列、gag核酸ドメイン、pol核酸ドメイン及びenv核酸ドメインを含む前記レトロウイルスポリヌクレオチド；

10

IRESの分岐領域においてAパルジの6A'sからなる内部リボソーム侵入部位（IRES）を含むカセットであって、前記IRESが異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結されており、前記カセットが3'LTRの5'側、及びレトロウイルスエンベロープをコードするenv核酸ドメインの3'側に位置するカセット；並びに

標的細胞における逆転写、パッケージング及び組み込みのために必要なシス作用性配列を含み、

RCRが配列番号21を含むベクター（pACE）と比較して、6回の継代後に高い複製能を維持する、上記組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2】

ウイルスが標的細胞に複数回感染し、5以上の平均コピー数/二倍体ゲノムをもたらす、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

20

【請求項 3】

レトロウイルスポリヌクレオチド配列が、マウス白血病ウイルス（MLV）、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）、ネコ白血病ウイルス（FeLV）、ヒビ内在性レトロウイルス（BEV）、ブタ内在性ウイルス（PERV）、ネコ由来レトロウイルスRD114、リスザルレトロウイルス、異種指向性マウス白血病関連ウイルス（XMRV）、トリ細網内皮症ウイルス（REV）、及びテナガザル白血病ウイルス（GALV）からなる群より選択されるウイルスに由来する、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 4】

レトロウイルスエンベロープが、広宿主性MLVエンベロープである、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

30

【請求項 5】

レトロウイルスが、ガンマレトロウイルスである、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 6】

標的細胞が、細胞増殖性障害を有する細胞である、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 7】

標的細胞が、新生細胞である、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

40

【請求項 8】

細胞増殖性障害が、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、脳癌、頭頸部癌、脾癌、黒色腫、胃癌及び卵巣癌、関節リウマチ及び他の自己免疫疾患からなる群より選択される、請求項 6 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 9】

プロモーター配列が、成長調節遺伝子に関連する、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 10】

プロモーター配列が、組織特異的プロモーター配列を含む、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

50

【請求項 1 1】

組織特異的プロモーター配列が、少なくとも一つのアンドロゲン応答エレメント (ARE) を含む、請求項 1 0 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 1 2】

プロモーターが、配列番号19、20、22又は42に記載の配列のヌクレオチド1から約ヌクレオチド582を有するCMVプロモーターを含み、転写を誘導し開始させることができる、一以上の核酸塩基の改変を含み得る、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 1 3】

プロモーターが、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

10

【請求項 1 4】

CMV-R-U5ドメインが、MLV R-U5領域に連結したヒトサイトメガロウイルス由来の最初期プロモーターを含む、請求項 1 3 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 1 5】

CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドが、配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド1から約ヌクレオチド1202、又は配列番号19、20、22又は42に記載の配列と少なくとも95%同一である配列を含み、かつ前記ポリヌクレオチドが、それに対して機能可能に連結した核酸分子の転写を促す、請求項 1 4 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

20

【請求項 1 6】

gagポリヌクレオチドが、ガンマレトロウイルスに由来する、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 1 7】

gag核酸ドメインが、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数1203から約ヌクレオチド2819、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む、請求項 1 6 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 1 8】

ポリヌクレオチドのpolドメインが、ガンマレトロウイルスに由来する、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

30

【請求項 1 9】

polドメインが、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数2820から約ヌクレオチド6358、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む、請求項 1 8 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2 0】

envドメインが、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数6359から約ヌクレオチド8323、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.9%の同一性を有する配列を含む、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2 1】

IRESが、配列番号41に記載の配列からなる、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

40

【請求項 2 2】

レトロウイルスポリヌクレオチド配列が、(i) 配列番号42に記載の配列、又は(ii) TがUである配列番号42に記載の配列を含む、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2 3】

異種核酸が、配列番号3、5、11、13、15又は17に記載の配列を有するポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2 4】

異種核酸が、配列番号4に記載の配列を含むポリペプチドをコードする、請求項 1 に記

50

載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2 5】

異種核酸が、ヒトコドン最適化されており、配列番号4に記載のポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2 6】

異種核酸が、配列番号19又は22の約ヌクレオチド数8877から約9353に記載の配列を含む、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2 7】

3'LTRが、ガンマレトロウイルスに由来する、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

10

【請求項 2 8】

3'LTRが、U3-R-U5ドメインを含む、請求項 2 7 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 2 9】

3'LTRが、配列番号19又は22の約ヌクレオチド9405から約9988に記載の配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%又は99.5%同一である配列を含む、請求項 2 8 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 3 0】

異種核酸配列が、生物学的応答修飾物質、又は免疫賦活サイトカインをコードする、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

20

【請求項 3 1】

免疫賦活サイトカインが、インターロイキン1~15、インターフェロン、腫瘍壊死因子 (TNF)、及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) からなる群より選択される、請求項 3 0 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 3 2】

免疫賦活サイトカインが、インターフェロンガンマである、請求項 3 0 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 3 3】

異種核酸が、非毒性のプロドラッグを毒性の薬剤に変換するポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

30

【請求項 3 4】

非毒性のプロドラッグを毒性の薬剤に変換するポリペプチドが、チミジンキナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP)、又はシトシンデアミナーゼである、請求項 3 3 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 3 5】

異種核酸配列が、受容体ドメイン、抗体、又は抗体断片をコードする、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 3 6】

異種核酸配列が、阻害性ポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

40

【請求項 3 7】

阻害性ポリヌクレオチドが、miRNA、RNAi、又はsiRNA配列を含む、請求項 3 6 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 3 8】

請求項 1 に記載のレトロウイルスを生産するための、組換えレトロウイルスポリヌクレオチドゲノム。

【請求項 3 9】

シトシンデアミナーゼポリヌクレオチドが発現される条件下で請求項 3 4 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルスを被験者に接触させること、及び5-フルオロシトシンを被験者に接触させることを含む、細胞増殖性障害を治療する方法。

50

【請求項 4 0】

細胞増殖性障害が、多形神経膠芽腫である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

細胞増殖性障害が、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、脳癌、頭頸部癌、膀胱癌、黒色腫、胃癌及び卵巣癌からなる群より選択される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

J-K分岐領域のAバルジに6個のAを有するECMV IRESから、哺乳動物細胞において異種遺伝子を発現するベクター。

【請求項 4 3】

ウイルスベクターである、請求項 4 2 に記載のベクター。

【請求項 4 4】

レトロウイルス複製ベクターである、請求項 4 2 又は 4 3 に記載のベクター。

【請求項 4 5】

ガンマレトロウイルス由来のレトロウイルス複製ベクターである、請求項 4 2 ~ 4 4 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 4 6】

ガンマレトロウイルスが、マウス白血病ウイルス、ヒビ内在性ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルスのいずれか一つに由来する、請求項 4 5 に記載のベクター。

【請求項 4 7】

異種遺伝子が、哺乳動物における治療活性を有する遺伝子である、請求項 4 2 ~ 4 6 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 4 8】

治療活性が、抗癌活性である、請求項 4 7 に記載のベクター。

【請求項 4 9】

異種遺伝子が、プロドラッグ活性化遺伝子である、請求項 4 7 に記載のベクター。

【請求項 5 0】

PTB-1タンパク質の非存在下で、ECMV IRESから哺乳動物細胞において異種遺伝子を発現し得る、請求項 4 2 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 5 1】

請求項 4 2 ~ 5 0 のいずれか一項に記載のベクターを投与することによる、癌の治療方法。

【請求項 5 2】

組換え複製コンピテントレトロウイルスであって、

レトロウイルスGAGタンパク質；

レトロウイルスPOLタンパク質；

レトロウイルスエンベロープ；

レトロウイルスポリヌクレオチドであって、レトロウイルスポリヌクレオチド配列の3'末端に長末端反復(LTR)配列、レトロウイルスポリヌクレオチドの5'末端に哺乳動物の細胞における発現に適しているプロモーター配列、gag核酸ドメイン、pol核酸ドメイン及びenv核酸ドメインを含む前記レトロウイルスポリヌクレオチド；

(i) 異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結された最小内部リボソーム侵入部位(IRES)、(ii) miRNAに連結されたpol IIIプロモーター、又は(iii) (ii) に先行するか又は続く異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結されたミニプロモーターを含むカセットであって、3'LTRの5'側、及びレトロウイルスエンベロープをコードするenv核酸ドメインの3'側に位置するカセット；及び

標的細胞における逆転写、パッケージング及び組み込みのために必要なシス作用性配列；

を含む、上記組換え複製コンピテントレトロウイルス。

10

20

30

40

50

【請求項 5 3】

最小IRESが、配列番号41の約塩基123から544の配列からなる、請求項 5 2 に記載の複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 5 4】

最小IRESが、配列番号41の約塩基183から544の配列からなる、請求項 5 2 に記載の複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 5 5】

IRESがAバルジに6個のAを有する、請求項 5 2 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 5 6】

10

ウイルスが標的細胞に複数回感染し、5以上の平均コピー数/二倍体ゲノムをもたらす、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 5 7】

レトロウイルスポリヌクレオチド配列が、マウス白血病ウイルス(MLV)、モロニーマウス白血病ウイルス(MoMLV)、ネコ白血病ウイルス(FeLV)、ヒビ内在性レトロウイルス(BEV)、ブタ内在性ウイルス(PERV)、ネコ由来レトロウイルスRD114、リスザルレトロウイルス、異種指向性マウス白血病関連ウイルス(XMRV)、トリ細網内皮症ウイルス(REV)、又はテナガザル白血病ウイルス(GALV)からなる群より選択されるウイルスに由来する、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 5 8】

20

レトロウイルスエンベロープが、広宿主性MLVエンベロープである、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 5 9】

レトロウイルスが、ガンマレトロウイルスである、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 6 0】

標的細胞が、細胞増殖性障害を有する細胞である、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 6 1】

標的細胞が、新生細胞である、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

30

【請求項 6 2】

細胞増殖性障害が、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、脳癌、頭頸部癌、脾癌、黒色腫、胃癌及び卵巣癌、関節リウマチ及び他の自己免疫疾患からなる群より選択される、請求項 6 0 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 6 3】

プロモーター配列が、成長調節遺伝子に関連する、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 6 4】

プロモーター配列が、組織特異的プロモーター配列を含む、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

40

【請求項 6 5】

組織特異的プロモーター配列が、少なくとも一つのアンドロゲン応答エレメント(ARE)を含む、請求項 6 4 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 6 6】

プロモーターが、配列番号19、20、22又は42に記載の配列のヌクレオチド1から約ヌクレオチド582を有するCMVプロモーターを含み、転写を誘導し開始させることができる、一以上の核酸塩基の改変を含み得る、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 6 7】

50

プロモーターが、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドを含む、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項68】

CMV-R-U5ドメインが、MLV R-U5領域に連結したヒトサイトメガロウイルス由来の最初期プロモーターを含む、請求項67に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項69】

CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドが、配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド1から約ヌクレオチド1202、又は配列番号19、20、22又は42に記載の配列と少なくとも95%同一である配列を含み、かつ前記ポリヌクレオチドが、それに対して機能可能に連結した核酸分子の転写を促す、請求項68に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

10

【請求項70】

gagポリヌクレオチドが、ガンマレトロウイルスに由来する、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項71】

gag核酸ドメインが、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数1203から約ヌクレオチド2819、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む、請求項70に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項72】

ポリヌクレオチドのpolドメインが、ガンマレトロウイルスに由来する、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

20

【請求項73】

polドメインが、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数2820から約ヌクレオチド6358、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.9%の同一性を有する配列を含む、請求項72に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項74】

envドメインが、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数6359から約ヌクレオチド8323、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項75】

30

異種核酸が、配列番号3、5、11、13、15又は17に記載の配列を有するポリヌクレオチドを含む、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項76】

異種核酸が、配列番号4に記載の配列を含むポリペプチドをコードする、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項77】

異種核酸が、ヒトコドン最適化されており、配列番号4に記載のポリペプチドをコードする、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項78】

異種核酸が、配列番号19又は22の約ヌクレオチド数8877から約9353に記載の配列を含む、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

40

【請求項79】

3'LTRが、ガンマレトロウイルスに由来する、請求項52に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項80】

3'LTRが、U3-R-U5ドメインを含む、請求項79に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項81】

3'LTRが、配列番号19又は22の約ヌクレオチド9405から約9988に記載の配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%又は99.5%同一である配列を含む、請求項79に記載の組換え

50

え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 8 2】

異種核酸配列が、生物学的応答修飾物質、又は免疫賦活サイトカインをコードする、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 8 3】

免疫賦活サイトカインが、インターロイキン1~15、インターフェロン、腫瘍壊死因子 (TNF)、及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) からなる群より選択される、請求項 8 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 8 4】

免疫賦活サイトカインが、インターフェロンガンマである、請求項 8 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 8 5】

異種核酸が、非毒性のプロドラッグを毒性の薬剤に変換するポリペプチドをコードする、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 8 6】

非毒性のプロドラッグを毒性の薬剤に変換するポリペプチドが、チミジンキナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP)、又はシトシンデアミナーゼである、請求項 8 5 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 8 7】

異種核酸配列が、受容体ドメイン、抗体、又は抗体断片をコードする、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 8 8】

異種核酸配列が、阻害性ポリヌクレオチドを含む、請求項 5 2 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 8 9】

阻害性ポリヌクレオチドが、miRNA、RNAi、又はsiRNA配列を含む、請求項 8 8 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルス。

【請求項 9 0】

請求項 5 2 に記載のレトロウイルスを生産するための、組換えレトロウイルスポリヌクレオチドゲノム。

【請求項 9 1】

シトシンデアミナーゼポリヌクレオチドが発現される条件下で請求項 8 6 に記載の組換え複製コンピテントレトロウイルスを被験者に接触させること、及び5-フルオロシトシンを被験者に接触させることを含む、細胞増殖性障害を治療する方法。

【請求項 9 2】

細胞増殖性障害が、多形神経膠芽腫である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

細胞増殖性障害が、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、脳癌、頭頸部癌、膀胱癌、黒色腫、胃癌及び卵巣癌からなる群より選択される、請求項 9 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2013年8月5日に提出された米国仮出願番号61/862,433号に対する優先権を主張し、その開示を参照により本明細書に組込む。

【0002】

本開示は、最適化内部リボソーム侵入部位 (IRES)、ベクターをはじめとするかかる最適化IRESを含む組成物に関する。より具体的には、本開示は、細胞増殖性障害を治療するための複製コンピテントレトロウイルスベクターに関する。本開示はさらに、異種核酸の

10

20

30

40

50

送達及び発現のためのかかる複製コンピテントレトロウイルスベクターの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

遺伝子及び異種核酸の細胞及び被験者への効率的な送達方法は、科学の発展並びに疾患及び障害の潜在的治療について研究者の目標となっている。

配列表の組み込み

【0004】

本出願は、電子フォーマットの配列表と共に出願される。配列表は、2014年8月5日に作成され、「00014-019W01Sequence_ST25」というタイトルであり、202Kbのサイズである。配列表の電子フォーマット中の情報を、全体として参照により本明細書に組込む。

10

【発明の概要】

【0005】

本開示は、組換え複製コンピテントレトロウイルスであって、レトロウイルスGAGタンパク質；レトロウイルスPOLタンパク質；レトロウイルスエンベロープ；レトロウイルスポリヌクレオチドであって、レトロウイルスポリヌクレオチド配列の3'末端に長末端反復（LTR）配列、レトロウイルスポリヌクレオチドの5'末端に哺乳動物の細胞における発現に適しているプロモーター配列、gag核酸ドメイン、pol核酸ドメイン及びenv核酸ドメインを含む前記レトロウイルスポリヌクレオチド；IRESの分岐領域のAバルジに6A'sからなる内部リボソーム侵入部位（IRES）を含むカセットであって、前記IRESが異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結されており、前記カセットが3'LTRの5'側、及びレトロウイルスエンベロープをコードするenv核酸ドメインの3'側に位置するカセット；並びに標的細胞における逆転写、パッケージング及び組み込みのために必要なシス作用性配列を含み、かつRCRが配列番号21を含むベクター（pACE）と比較して、6回の継代後に高い複製能を維持する、上記組換え複製コンピテントレトロウイルスを提供する。一実施形態では、ウイルスは標的細胞に複数回感染し、5以上の平均コピー数/二倍体ゲノムをもたらす。上記のいずれかの他の実施形態では、レトロウイルスポリヌクレオチド配列は、マウス白血病ウイルス（MLV）、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMLV）、ネコ白血病ウイルス（FeLV）、ヒビ内在性レトロウイルス（BEV）、ブタ内在性ウイルス（PERV）、ネコ由来レトロウイルスRD114、リスザルレトロウイルス、異種指向性マウス白血病関連ウイルス（XMRV）、トリ細網内皮症ウイルス（REV）、及びテナガザル白血病ウイルス（GALV）からなる群より選択されるウイルスに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、レトロウイルスエンベロープは、広宿主性MLVエンベロープである。上記のいずれかの他の実施形態では、レトロウイルスは、ガンマレトロウイルスである。上記のいずれかの他の実施形態では、標的細胞は、細胞増殖性障害を有する細胞である。上記のいずれかの他の実施形態では、標的細胞は、新生細胞である。上記のいずれかの他の実施形態では、細胞増殖性障害は、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、脳癌、頭頸部癌、脾癌、黒色腫、胃癌及び卵巣癌、関節リウマチ及び他の自己免疫疾患からなる群より選択される。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーター配列は、成長調節遺伝子に関連する。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーター配列は、組織特異的プロモーター配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、組織特異的プロモーター配列は、少なくとも一つのアンドロゲン応答エレメント（ARE）を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーターは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列のヌクレオチド1から約ヌクレオチド582を有するCMVプロモーターを含み、転写を誘導し開始させることができる、一以上の核酸塩基の改変を含み得る。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーターは、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、CMV-R-U5ドメインは、MLV R-U5領域に連結したヒトサイトメガロウイルス由来の最初期プロモーターを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド1から約ヌクレオチド1202、又は配列番号19、20、22又は42に記載の配列と少なくとも95%同一である配列を含み、かつ前記ポリヌクレオチドは、それに対して機能可能に連結した核酸分子の転写を促す。上記のいずれかの他の

20

30

40

50

実施形態では、gagポリヌクレオチドは、ガンマレトロウイルスに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、gag核酸ドメインは、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数1203から約ヌクレオチド2819、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、ポリヌクレオチドのpolドメインは、ガンマレトロウイルスに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、polドメインは、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数2820から約ヌクレオチド6358、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.9%の同一性を有する配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、envドメインは、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数6359から約ヌクレオチド8323、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、IRESは、配列番号41に記載の配列からなる。上記のいずれかの他の実施形態では、レトロウイルスポリヌクレオチド配列は、(i)配列番号42に記載の配列、又は(ii)TがUである配列番号42に記載の配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、配列番号3、5、11、13、15又は17に記載の配列を有するポリヌクレオチドを含むポリペプチドをコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、配列番号4に記載の配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、ヒトコドン最適化されており、配列番号4に記載のポリペプチドをコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、配列番号19又は22の約ヌクレオチド数8877から約9353に記載の配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、3'LTRは、ガンマレトロウイルスに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、3'LTRは、U3-R-U5ドメインを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、3'LTRは、配列番号19又は22の約ヌクレオチド9405から約9988に記載の配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%又は99.5%同一である配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸配列は、生物学的応答修飾物質、又は免疫賦活サイトカインをコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、免疫賦活サイトカインは、インターロイキン1~15、インターフェロン、腫瘍壊死因子(TNF)、及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)からなる群より選択される。上記のいずれかの他の実施形態では、免疫賦活サイトカインは、インターフェロンガンマである。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、非毒性のプロドラッグを毒性の薬剤に変換するポリペプチドをコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、非毒性のプロドラッグを毒性の薬剤に変換するポリペプチドは、チミジンキナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)、又はシトシンデアミナーゼである。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸配列は、受容体ドメイン、抗体、又は抗体断片をコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸配列は、阻害性ポリヌクレオチドを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、阻害性ポリヌクレオチドは、miRNA、RNAi、又はsiRNA配列を含む。

【0006】

本開示は、上記の複製コンピテントレトロウイルスを生産するための、組換えレトロウイルスポリヌクレオチドゲノムもまた提供する。

【0007】

本開示は、シトシンデアミナーゼポリヌクレオチドが発現される条件下で本開示の組換え複製コンピテントレトロウイルスを被験者に接触させること、及び5-フルオロシトシンを被験者に接触させることを含む、細胞増殖性障害を治療する方法もまた提供する。他の実施形態では、細胞増殖性障害は、多形神経膠芽腫である。上記のいずれかの他の実施形態では、細胞増殖性障害は、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、脳癌、頭頸部癌、膵癌、黒色腫、胃癌及び卵巣癌からなる群より選択される。

【0008】

本開示は、J-K分岐領域のAバルジに6個のAを有するECMV IRESから、哺乳動物細胞において異種遺伝子を発現するベクターもまた提供する。他の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。上記のいずれかの他の実施形態では、ベクターは、レトロウイルス複製ベクターである。上記のいずれかの他の実施形態では、ベクターは、ガンマレトロウイルス由来のレトロウイルス複製ベクターである。上記のいずれかの他の実施形態では

、ガンマレトロウイルスは、マウス白血病ウイルス、ヒビ内在性ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルスのいずれか一つに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、異種遺伝子は、哺乳動物における治療活性を有する遺伝子である。上記のいずれかの他の実施形態では、治療活性は、抗癌活性である。上記のいずれかの他の実施形態では、異種遺伝子は、プロドラッグ活性化遺伝子である。上記のいずれかの他の実施形態では、ベクターは、PTB-1タンパク質の非存在下で、ECMV IRESから哺乳動物細胞において異種遺伝子を発現し得る。

【0009】

本開示は、上記のベクターを投与することによる、癌の治療方法もまた提供する。

【0010】

本開示は、組換え複製コンピテントレトロウイルスであって、レトロウイルスGAGタンパク質；レトロウイルスPOLタンパク質；レトロウイルスエンベロープ；レトロウイルスポリヌクレオチドであって、レトロウイルスポリヌクレオチド配列の3'末端に長末端反復（LTR）配列、レトロウイルスポリヌクレオチドの5'末端に哺乳動物の細胞における発現に適しているプロモーター配列、gag核酸ドメイン、pol核酸ドメイン及びenv核酸ドメインを含む前記レトロウイルスポリヌクレオチド；（i）異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結された最小内部リボソーム侵入部位（IRES）、（ii）miRNAに連結されたpol IIIプロモーター、又は（iii）（ii）に先行する（proceeds）か又は続く（follows）異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結されたミニプロモーターを含むカセットであって、3'LTRの5'側、及びレトロウイルスエンベロープをコードするenv核酸ドメインの3'側に位置するカセット；並びに標的細胞における逆転写、パッケージング及び組み込みのために必要なシス作用性配列；を含む、上記組換え複製コンピテントレトロウイルスもまた提供する。一実施形態では、最小IRESは、配列番号41の約塩基123から544の配列からなる。上記のいずれかの他の実施形態では、最小IRESは、配列番号41の約塩基183から544の配列からなる。上記のいずれかの他の実施形態では、IRESがAバルジに6個のAを有する。上記のいずれかの他の実施形態では、ウイルスは標的細胞に複数回感染し、5以上の平均コピー数/二倍体ゲノムをもたらす。上記のいずれかの他の実施形態では、レトロウイルスポリヌクレオチド配列は、マウス白血病ウイルス（MLV）、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）、ネコ白血病ウイルス（FeLV）、ヒビ内在性レトロウイルス（BEV）、ブタ内在性ウイルス（PERV）、ネコ由来レトロウイルスRD114、リスザルレトロウイルス、異種指向性マウス白血病関連ウイルス（XMRV）、トリ細網内皮症ウイルス（REV）、及びテナガザル白血病ウイルス（GALV）からなる群より選択されるウイルスに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、レトロウイルスエンベロープは、広宿主性MLVエンベロープである。上記のいずれかの他の実施形態では、レトロウイルスは、ガンマレトロウイルスである。上記のいずれかの他の実施形態では、標的細胞は、細胞増殖性障害を有する細胞である。上記のいずれかの他の実施形態では、標的細胞は、新生細胞である。上記のいずれかの他の実施形態では、細胞増殖性障害は、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、脳癌、頭頸部癌、膀胱癌、黒色腫、胃癌及び卵巣癌、関節リウマチ及び他の自己免疫疾患からなる群より選択される。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーター配列は、成長調節遺伝子に関連する。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーター配列は、組織特異的プロモーター配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、組織特異的プロモーター配列は、少なくとも一つのアンドロゲン応答エレメント（ARE）を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーターは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列のヌクレオチド1から約ヌクレオチド582を有するCMVプロモーターを含み、転写を誘導し開始させることができる、一以上の核酸塩基の改変を含み得る。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーターは、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、CMV-R-U5ドメインは、MLV R-U5領域に連結したヒトサイトメガロウイルス由来の最初期プロモーターを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド1から約ヌクレオチド1202、又は配列番号19、20、22又は42に記載の配列と少なくとも95%同一である

10

20

30

40

50

配列を含み、かつ前記ポリヌクレオチドは、それに対して機能可能に連結した核酸分子の転写を促す。上記のいずれかの他の実施形態では、gagポリヌクレオチドは、ガンマレトロウイルスに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、gag核酸ドメインは、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数1203から約ヌクレオチド2819、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、ポリヌクレオチドのpolドメインは、ガンマレトロウイルスに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、polドメインは、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数2820から約ヌクレオチド6358、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.9%の同一性を有する配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、envドメインは、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数6359から約ヌクレオチド8323、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、配列番号3、5、11、13、15又は17に記載の配列を有するポリヌクレオチドを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、配列番号4に記載の配列を含むポリペプチドをコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、ヒトコドン最適化されており、配列番号4に記載のポリペプチドをコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、配列番号19又は22の約ヌクレオチド数8877から約9353に記載の配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、3'LTRは、ガンマレトロウイルスに由来する。上記のいずれかの他の実施形態では、3'LTRは、U3-R-U5ドメインを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、3'LTRは、配列番号19又は22の約ヌクレオチド9405から約9988に記載の配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%又は99.5%同一である配列を含む。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸配列は、生物学的応答修飾物質、又は免疫賦活サイトカインをコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、免疫賦活サイトカインは、インターロイキン1~15、インターフェロン、腫瘍壊死因子（TNF）、及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）からなる群より選択される。上記のいずれかの他の実施形態では、免疫賦活サイトカインは、インターフェロンガンマである。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸は、非毒性のプロドラッグを毒性の薬剤に変換するポリペプチドをコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、非毒性のプロドラッグを毒性の薬剤に変換するポリペプチドは、チミジンキナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）、又はシトシンデアミナーゼである。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸配列は、受容体ドメイン、抗体、又は抗体断片をコードする。上記のいずれかの他の実施形態では、異種核酸配列は、阻害性ポリヌクレオチドを含む。上記のいずれかの他の実施形態では、阻害性ポリヌクレオチドは、miRNA、RNAi、又はsiRNA配列を含む。

【0011】

本開示の一以上の実施形態の詳細は、添付の図面及び以下の詳細な説明において記載される。他の特徴、目的、及び利点は、詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A-C】図1A-Cは、Aバルジに様々な数のA'sを有するIRESを含む複製レトロウイルスベクター及びその力価を示す。（A）ECMV内部リボソーム侵入部位の予測二次構造。配列は位置680から始まる。丸で囲んだ大文字のJ、K、L及びMは、IRESにおける既定された領域を示す。矢印は、J-K領域における分岐ループを示す。AUG8、AUG9、AUG10及びAUG11には下線を付した。（B）yCD2又はGFPを発現するRRVに組込んだECMV IRES中のJ-K分岐におけるAバルジの模式図。ネイティブなATG8（RNAではAUG）及びATG9には下線を付した；拡大し下線を付した配列は、J-K分岐領域におけるAバルジを示す；小文字は、3' IRESのポリピリミジントラクトにおける5'配列を示す；（C）感染HT1080細胞により産生されたAバルジに様々な数のAを含むRRVのウイルス力価。

【図2A-C】図2A-Dは、細胞ウイルス由来RNA、及びAバルジに様々な数のA'sを有するRRVによるタンパク質発現を示す。（A）細胞ウイルスRNAアイソフォームの模式図。Env2プ

ライマー及びプローブ、並びにyCD2プライマー及びプローブは、それぞれenv及びyCD2領域においてスプライシングされていないウイルスRNA及びスプライシングされたRNAの両方を認識し、qRT-PCRによって細胞ウイルスRNAのレベルを測定するために用いられた。黒三角：env2プライマー及びプローブセット；白三角：yCD2プライマー及びプローブセット。（B）yCD2及びGAPDHタンパク質の免疫プロット。20マイクログラムの細胞溶解物を各レーンに供し、ユビキタスマーカーであるGAPDHの検出によって、等量の供試とプロッティング効率を制御した。PC、陽性対照；NC、陰性対照。グラフは、yCD2-6Aベクターに対するRNA及びタンパク質発現レベルを示す。（C）GFP-6Aベクターに対するRNA及びGFP発現レベル。GFP陽性細胞の割合は、GFP陰性細胞を除く適切なゲーティングを使用してフローサイトメトリーにより決定した。GFPタンパク質発現レベルは、平均蛍光強度を用いることによって定量した。

10

【図2D】図2A-Cの続き。（D）qPCRによる、感染U87-MG細胞（0.01のMOI）のプロウイルスベクターコピー数。ゲノムDNAを、7個のAを有するベクターが最大に感染すると予測される感染14日後に単離する。データは、最大に感染させたU87-MG細胞のベクターコピー数に有意な差はないことを示す。これは、変異体間でウイルス力価に有意な効果が認められないウイルス産生データと一致する。

【図3-1】図3は、下線を付し、太字にした7A'sを含むAバルジを有するベクター配列（配列番号22）を示す。

【図3-2】図3-1の続きである。

【図3-3】図3-2の続きである。

20

【図3-4】図3-3の続きである。

【図4A-B】図4A-Bは、ウイルス安定性データを示す。（A）エンドポイントPCRによる、感染U87-MG細胞（0.01のMOI）におけるウイルス安定性。ゲノムDNAを感染14日後に単離し、IRES-yCD2領域を、envの3'及び3'UTR領域にまたがるプライマーセットを用いて増幅する（Perez et al., 2012）。（B）段階感染によるベクターの安定性の評価。約 10^6 のナীবU87-MG細胞を、最初に0.1のMOIでウイルスベクターに感染させ、単一の感染サイクルを完了させるために、1週間増殖させた。完全に感染させた細胞由来の2mlのウイルス上清の100 μ Lを、ナীব細胞に感染させるために用い、12サイクルまで繰り返した。IRES-yCD2領域のベクターの安定性を、感染させた細胞からの、組み込まれたプロウイルスのPCR増幅によって評価する。予測PCR産物のサイズは、約1.2 kbである。1.2kbより短いいずれかのバンドの出現は、IRES-yCD2領域における欠失を示す。

30

【図5】図5は、最小IRES（配列番号41の塩基123～139；及び183～198）を有する、設計された本開示の構築物の模式図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される、単数形は、文脈により明確に別段の規定がなされない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞」への言及は、複数のそのような細胞を含み、「薬剤」への言及は、当業者に知られる1つ以上の薬剤への言及を含む、などである。

【0014】

40

また、「又は」、又は「若しくは」の使用は、別段の指定のない限り、「及び/又は」を意味する。同様に、「含む」、「包含する」、及びその変化形等は、互換的であり、限定することを意図しない。

【0015】

種々の実施形態の説明に「含む」という用語が使用されている場合、いくつかの特定の場合では、ある実施形態は、その代わりに、「から本質的になる」又は「からなる」という言葉を使用して記載できることを当業者が理解していることを、さらに理解されたい。

【0016】

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及び科学用語は、本開示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。本開示の

50

方法及び組成物の実施において本明細書に記載のものと同様又は同等である方法及び材料を使用できるが、本明細書では代表的な方法、デバイス及び材料を記載する。

【0017】

ベクター、プロモーター及び他の多くの関連するトピックの使用を含む本発明に有用な分子生物学的手法を説明した一般的な教科書として、Berger及びKimmel、Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology Volume 152, (Academic Press, Inc., San Diego, Calif.) ("Berger"); Sambrook ら、Molecular Cloning--A Laboratory Manual, 2d ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 ("Sambrook")及びCurrent Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel ら、eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 1999) ("Ausubel")が挙げられる。例えば、本開示の同種の核酸の生産のために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、Q レプリカーゼ増幅及び他のRNAポリメラーゼ媒介技術(例えば、NASBA)を含む、in vitroの増幅法に当業者を導くのに十分なプロトコルの例は、Berger、Sambrook、及びAusubel、並びにMullisら (1987) U.S. Pat. No. 4,683,202; Innisら、eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press Inc. San Diego, Calif.) ("Innis"); Arnheim & Levinson (Oct. 1, 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; Kwoh ら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli ら、(1990) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomell ら、(1989) J. Clin. Chem 35: 1826; Landegren ら、(1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291-294; Wu and Wallace (1989) Gene 4:560; Barringerら、(1990) Gene 89:117; 及びSooknanan and Malek (1995) Biotechnology 13: 563-564に見られる。in vitro で増幅された核酸をクローニングするための改善された方法はWallaceら、U.S. Pat. No. 5,426,039に記載されている。大きな核酸を増幅するための改善された方法は、Chengら(1994) Nature 369: 684-685及びそこに引用されている参考文献に要約されており、本文献では40kbに及ぶPCR増幅産物が生成されている。実質的にいかなるRNAも、逆転写酵素及びポリメラーゼを用いて、制限酵素による消化、PCRによる延長及び配列決定に適した二本鎖DNAに変換できることが当業者には理解されるだろう。たとえば、Ausubel, Sambrook及びBerger (全て上掲)を参照されたい。

【0018】

本文全体を通して議論されている刊行物は、単に本出願の出願日より前のそれらの開示のために示されているに過ぎない。本明細書におけるいずれも、本発明者らが、先の開示によりそのような開示に先行する権利がないことを容認するものと解釈されるべきではない。

【0019】

本開示は、細胞又は被験者への遺伝子又はタンパク質の送達に有用な方法及び組成物を提供する。かかる方法及び組成物は、癌及び他の細胞増殖性疾患及び障害をはじめとする様々な障害及び疾患を治療するために用いられ得る。一態様において、本開示は、最適化IRESを提供する。かかる最適化IRESは、タンパク質発現を促すために、様々なベクターにおいて用いられ得る。他の態様において、本開示は、遺伝子送達のための複製コンピテントレトロウイルスベクターを提供する。本開示は、一般に用いられるJ-K分岐のA-バルジに7A'sを含むIRESが最適でないことを示し、したがって本開示は、より少ない(3~5個の)又はより多い(7~8個の)Aを有するIRESに対して改善されたポリペプチド発現を有する最適Aバルジ配列を有するIRESを提供する。

【0020】

内部リボソーム侵入部位(「IRES」)は、たいていIRESの3'側にあるコード配列の翻訳中にリボソームの侵入又は保持を促す核酸の領域を意味する。幾つかの実施形態では、IRESはスプライシングのアクセプター/ドナー部位を含み得るが、好ましいIRESは、スプライシングのアクセプター/ドナー部位を欠く。通常、リボソームのメッセンジャーRNAへの進入は全ての真核生物のmRNAの5'末端に位置するキャップを介して起こる。しかしながら

、この一般法則には例外がある。幾つかのウイルスmRNAにおけるキャップの不存在は、これらのRNAの内部部位でリボソームの侵入を可能とする代替的構造の存在を示唆している。現在までに、その機能からIRESとされるこれらの多数の構造が、キャップされていないウイルスmRNAの5'非コード領域、例えば、ポリオウイルス(Pelletierら、1988, Mol. Cell Biol., 8, 1103-1112)及びEMCVウイルス(脳心筋炎ウイルス (Jangら、J. Virol., 1988, 62, 2636-2643))等のピコナウイルスのものが同定されている。本開示は、ベクター、及びより具体的には複製コンピテントレトロウイルス(RCR)ベクターの文脈における最適化IRESの使用を提供する。

【0021】

内部リボソーム侵入部位(IRES)は、CAP非依存式にウイルスRNAの翻訳を可能とする。脳心筋炎ウイルス(EMCV)由来のIRESは網羅的に研究されており、レトロウイルス及び他の哺乳動物発現ベクターにおいて広く使用されている。IRESの適切なフォールディング及び二次構造は、その機能性を規定し、配列変更はこれに影響してもしなくてもよい。Palmenberg及びその共同研究者は、5'-IRES領域とは独立に、IRESの3'末端のJ-Kエレメントが翻訳の開始に重要な役割を果たしていることを示した(図1A)。様々なベクターにおけるIRESの配列は、A-バルジに様々な数のポリAを含むことが見出され得る。例えば、Logg et al. (J. Virol. 75:6989-6998, 2001)には、分子領域のAバルジに6個のアデノシン残基(A、As)の代わりに7個のAを有するIRESが記載されている(例えば、Duke et al., J. Virol. 66:1924-1932, 1992を参照されたい)。本明細書の他の箇所でもより完全に記載するように、A-バルジにおけるA'sの数は、機能可能に付随する異種配列の発現に影響する。例えば、本開示は、6A'sでピークに達し、いずれの側においても最適数のA'sからわずかに発現が減少する、A-バルジのA'sの最適数を特定する。例えば、4A'sは6A'sより有効でなく、8A'sは6A'sより有効でない。

【0022】

本明細書で使用される「最適化IRES」は、J-K分岐領域のA-バルジに6個のAを有する脳心筋炎ウイルスに由来するIRESを指す。最適化IRESは、発現される遺伝子又は配列(「異種ポリヌクレオチド」又は「遺伝子」)を含むカセットの部分であり得る。そのような場合、最適化IRESは異種ポリヌクレオチドの上流に機能可能に連結されており、連結された異種ポリヌクレオチドの翻訳を引き起こすように機能可能である。最適化IRESカセットは、非最適化IRES(例えば、A-バルジに3~5又は7~8のA'sを有するIRES)と比較して、連結された異種ポリヌクレオチドからの増加したタンパク質発現を示す。最適化IRES又はIRESカセットは、連結された異種ポリヌクレオチドの発現のために、任意の数のベクターにクローニングされ得る。例えば、最適化IRES又はIRESカセットを含み得、最適化IRES又はIRESカセットと共に用い得る本開示のベクターとして、プラスミド、発現ベクター、及びウイルスベクター(複製欠失及び複製コンピテント)等が挙げられる。

【0023】

一実施形態では、本開示は：(i)配列番号41と95%の同一性を有し、J-K分岐領域に6A'sを有する配列；(ii)分岐領域に6A'sを含む配列番号41に記載の配列を含み、配列番号41の塩基対1から約塩基183の後任意の箇所から始まり、544まで続き、分岐領域に7個のAを有する同様のIRESに対して改善されたポリペプチド発現を有するトランケートされたIRES(例えば、配列番号41の約123~544又は183~544)；又は(iii)配列番号41に記載の配列、及び(iv)TがUであり得る上記のいずれか(例えば、RNAバージョン)からなる群より選択される配列を含む最適化IRESを提供する。

【0024】

異種核酸配列は、一実施形態ではA-バルジ領域の6個の「A」からなる最適化IRESに機能可能に連結される。本明細書で用いられる用語「異種」核酸配列又は導入遺伝子は、(i)野生型レトロウイルスに通常存在しない配列、(ii)異種に由来する配列、(iii)IRESの下流に通常見られない配列、又は(iv)同種に由来する場合、その元の形態から実質的に改変され得るものを指す。あるいは、細胞において通常発現されない変更されていない核酸配列は、異種核酸配列である。

10

20

30

40

50

【0025】

一実施形態では、本開示は、発現されるポリヌクレオチド配列に機能可能に連結された、J-K分岐領域に6個のAからなるAバルジを含む最適化IRESをカセット中に含むベクターを提供する。以下でより詳細に記載する様に、6A'sからなるA-バルジは、驚くべきことに、3~5又は7~8のA'sを含む同様のIRESカセットと比較して、優れたタンパク質発現を提供する。理解される様に、特に遺伝子送達においては、組換えベクターからのタンパク質発現は、in vitroのタンパク質産生のためだけでなく、in vitroの治療タンパク質の産生のためにも重要である。例えば、Logg et al. (J. Virol. 75:6989-6998, 2001)には、J-K分岐領域のAバルジに6個のA'sの代わりに7個のアデノシン残基(A、As)を有するIRESが記載されている。

10

【0026】

最適化IRESカセットは、任意の数の本分野で認識されるベクターにクローニングされ得る。かかるベクターは以下に記載されるが、プラスミド及びウイルスベクターが挙げられる。例えば、本開示は、発現ベクターにクローニングされた本開示の最適化IRESであって、発現される異種ポリヌクレオチドのすぐ上流(例えば0~約50bp上流)に位置する最適化IRESを熟慮する。とりわけ興味深いのは、組換え受容体又はヘルパー細胞を必要とせずに哺乳動物組織に感染し、伝播することができる、複製コンピテントガンマレトロウイルスベクターの使用である。かかるRCRベクターとして、mo-MLV、MLV、GALV、及びFELV等が挙げられる。典型的なガンマレトロウイルスは、LTR、gag、pol及びenv遺伝子、並びに宿主ゲノムにおける逆転写及び組み込みのために必要な因子(例えば、psi因子)を含む。典型的なガンマレトロウイルスベクターの改変は、約20年にわたって実施されており、例えば複製インコンピテントベクター、様々な位置に異種遺伝子を有するベクター、及びIRESカセットを含むベクターの作製が挙げられる。例えば、Kasahara et al.の米国特許第6,410,313号には、env遺伝子の下流及び3'LTRの上流にIRESカセットを有するMLV由来の複製レトロウイルスベクターの作製が記載されている。Gruber et al.(米国特許第8,722,867号)には、env遺伝子のすぐ下流及び3'LTRの上流にIRESカセットを含む、さらなる最適化ベクターが記載されている。Gruber et al.では、IRESカセットは、JK分岐領域において7個のAのA-バルジを示す。

20

【0027】

本開示は、一実施形態では、env遺伝子のすぐ下流及び3'LTRの上流に最適化IRESカセットを含む複製コンピテントガンマレトロウイルスベクターを提供し、ここで最適化IRESカセットの最適化IRESは6個のAの分岐領域におけるA-バルジからなる。さらなる実施形態では、RCRは、3~5又は7~8のA'sを有するA-バルジ含むベクターに比べて、増加したタンパク質発現を有する。

30

【0028】

本開示は、これまでの複製コンピテントレトロウイルスベクター(例えば、参照により本明細書に組込まれる、A-バルジにおいて7A'sを示す、米国特許公開第2011/0287020-A1; 及び2011/0217267-A1を参照されたい)において見出されるものに比べて、J-K分岐領域において6A'sからなるA-バルジを有するベクターを提供する。驚くべきことに、単一のAの(すなわち、7A'sから6A'sへの)変化が7A'sのものと比較して増加したタンパク質の生産をもたらす。したがって、6A'sを含むベクターは、「6個のA」のA-バルジを有するIRESカセットに連結した異種遺伝子の、改善されたタンパク質発現を有する。

40

【0029】

用語「ベクター」、「ベクター構築物」及び「発現ベクター」は、DNA又はRNA配列(例えば外来遺伝子)を宿主細胞に導入し、それにより宿主を形質転換し導入配列の発現(例えば転写及び翻訳)を促進することができる媒体(ベヒクル)を意味する。ベクターは典型的には伝達性媒介物のDNA又はRNAを含み、その中にはタンパク質をコードする異種のDNA又はRNAが制限酵素技術によって挿入されている。ベクターの代表例は「プラスミド」であり、これは一般に、容易に追加の(異種の)DNAを受け入れることができる自己(内蔵)の二本鎖DNA分子であり、容易に適切な宿主細胞に導入することができる。様々な原核

50

及び真核の宿主における複製及び/又は発現のためのプラスミド及び真菌のベクターをはじめとする多くのベクターが、記載されている。非限定例として、本明細書で開示されるか、若しくは引用される、又は当業者に知られる方法を用いる、pKKプラスミド(Clontech)、pUCプラスミド、pETプラスミド(Novagen, Inc., Madison, Wis.)、pRSET又はpREPプラスミド(Invitrogen, San Diego, Calif.)、又はpMALプラスミド(New England Biolabs, Beverly, Mass.)及び多くの適切な宿主細胞が挙げられる。組換えクローニングベクターは、多くの場合クローニング又は発現のための一以上の複製システム、宿主における選択のための一以上のマーカー、例えば抗生物質、及び一以上の発現カセットを含むだろう。

【0030】

用語「発現する」及び「発現」は、遺伝子若しくはDNA配列の情報の顕在化を可能にし、又は引き起こすことを意味し、例えば対応する遺伝子、RNA又はDNA配列の転写及び翻訳に関わる細胞機能の活性化によるタンパク質の生産を意味する。DNA又はRNA配列は細胞内で又は細胞により発現され、タンパク質のような「発現産物」を形成する。例えば結果として生じるタンパク質のような発現産物はそれ自身も、細胞によって「発現された」といえる。ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、例えば、異種の若しくは天然のプロモーターの制御下で異種の宿主細胞において、又は異種のプロモーターの制御下で天然の宿主細胞において発現若しくは生産される場合に、組換えによって発現される。

【0031】

本開示は改変レトロウイルスベクターを提供する。改変レトロウイルスベクターはレトロウイルス科のメンバーに由来していてもよい。レトロウイルス科は3つのグループで構成される: ヒトフォーミーウイルス(HFV)のようなスプーマウイルス(spumaviruses)(又はフォーミーウイルスfoamy virus); レンチウイルス及び羊のビスナウイルス; 並びにオンコウイルス(このグループに含まれる全てのウイルスに発癌性があるわけではないが)である。用語「レンチウイルス」は慣習上、逆転写酵素を有するウイルスの属をあらわすために用いられる。レンチウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)タイプ1及びタイプ2(HIV-1及びHIV-2)やサル免疫不全ウイルス(SIV)を含む「免疫不全ウイルス」を含む。オンコウイルスは、ウイルスの成熟の最中に電子顕微鏡でみられる粒子の形態に基づいて、さらにA、B、C及びDグループに歴史的に細分されている。A型の粒子は感染した細胞の細胞質でみられるB及びD型のウイルスの未熟な粒子を表している。これらの粒子は感染性ではない。B型の粒子は、細胞質内のA型粒子のエンベロープ化によって、成熟したビリオンとして原形質膜から出芽する。この膜においてウイルスはドーナツ型の75nmの核を有しており、そこから長い糖タンパクのスパイクが突出する。出芽後、B型の粒子は偏心的に位置した高電子密度の核を有する。B型ウイルスのプロトタイプはマウス乳癌ウイルス(MMTV)である。C型のウイルスが感染した細胞では細胞質内に粒子は認められない。代わりに、三日月の「C」の形をした濃縮物を介して成熟した粒子が細胞表面から直接出芽し、その後それ自身が閉じ、原形質膜によって包み込まれる。均一に電子密度の高い核とともに、エンベロープの糖タンパクのスパイクが見られる。出芽は表面原形質膜から、又は直接細胞内の液胞中に起こり得る。C型のウイルスは最もよく研究されており、トリ白血病ウイルスやマウス白血病ウイルス(MLV)の多くが含まれている。ウシ白血病ウイルス(BLV)、及びヒトT細胞白血病ウイルスタイプI及びII(HTLV-I/II)は細胞表面からの出芽の形態からC型の粒子として同様に分類される。しかしながら、それらは規則的な六角形の形態も有し、またマウス白血病ウイルス(MLV)のようなプロトタイプのC型ウイルスよりも複雑なゲノム構造を有する。D型の粒子は感染細胞の細胞質においてリングの様な構造を示す点でB型の粒子と似ており、細胞表面から出芽するが、ビリオンは短い表面糖タンパクのスパイクを取り込む。また、高電子密度の核は粒子の中で偏心的に位置している。マソンファイザーサルウイルス(Mason Pfizer monkey virus (MPMV))はD型のウイルスのプロトタイプである。

【0032】

レトロウイルスは様々な方法で分類されるがこの10年間で命名法が標準化された(ICTVd B - The Universal Virus Database, v 4 on the World Wide Web (www) at ncbi.nlm.nih.gov)

10

20

30

40

50

h.gov/ICTVdb/ICTVdB/ 及び教科書“Retroviruses” Eds Coffin, Hughs及びVarmus, Cold Spring Harbor Press 1997を参照; その開示内容を参照し本明細書に組み込む)。一実施形態では、複製コンピテントレトロウイルスベクターはオルソレトロウイルス又はより典型的にガンマレトロウイルスベクターを含んでもよい。

【0033】

レトロウイルスはその遺伝物質を複製する方法によって規定される。複製の際RNAはDNAに変換される。細胞への感染に続いて、ウイルス粒子中の二分子のRNA分子から、逆転写として知られる分子的な過程によって二本鎖のDNA分子が作られる。DNAはプロウイルスとして宿主細胞のゲノムの中に共有結合的に組み込まれ、そこからウイルスのRNAは細胞及び/又はウイルスの因子を用いて発現される。発現されたウイルスのRNAは粒子中にパッケージされ感染性のあるビリオンとして放出される。

10

【0034】

レトロウイルス粒子は二つの同一なRNA分子で構成される。野生型のゲノムは各々が、5'末端がキャップされており3'末端がポリアデニル化されているRNA一本鎖分子であるポジティブセンスを有する。二倍体のウイルス粒子はgagタンパク質、ウイルスの酵素(pol遺伝子の産物)及びgagタンパク質の「核」の構造の中にある宿主のtRNA分子と複合体を形成した二つのRNA鎖を含む。このカプシドを囲み保護しているのは宿主の細胞膜に由来し、ウイルスエンベロープ(env)タンパク質を含む脂質二重層である。envタンパク質はウイルスにとっての細胞側の受容体に結合し、典型的に粒子は受容体が介在するエンドサイトーシス及び/または膜融合によって宿主細胞に進入する。

20

【0035】

外側のエンベロープが脱落した後、ウイルスRNAは逆転写によりDNA中にコピーされる。これはpol領域にコードされている逆転写酵素によって触媒され、DNA合成のためのプライマーとしてビリオンにパッケージされた宿主細胞のtRNAを用いる。このようにしてRNAゲノムはより複雑なDNAゲノムに変換される。

【0036】

逆転写によって作られた二本鎖の直鎖DNAは核の中で環状化されなければならないことがある。プロウイルスは両末端に長末端反復配列(LTR)として知られる二つの同一の反復配列を有する。これら二つのLTR配列の末端は組み込みを触媒するpol産物 インテグラーゼタンパク質 によって認識される部位を形作り、それによりプロウイルスは常にLTRの末端から二つの塩基対で宿主DNAに進入する。細胞の配列の複製は両方のLTRの末端で観察され、転移可能な遺伝要素の組み込みパターンを連想させる。レトロウイルスは自身のDNAを宿主DNAの多くの場所に組み込むことができるが、異なるレトロウイルスは異なる組み込みサイトの選好性を有する。HIV-1とサル免疫不全ウイルスのDNAは発現される遺伝子中に優先的に組み込まれ、マウス白血病ウイルス(MLV)DNAは転写開始位置(TSS)の近くに優先的に組み込まれ、トリ肉腫白血病ウイルス(ASLV)及びヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)のDNAはほとんど不規則に組み込まれ遺伝子の嗜好性は軽微である(Derse Dら(2007) Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. J Virol 81:6731-6741; Lewinski MKら(2006) Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. PLoS Pathog 2:e601)。

30

40

【0037】

組み込まれたウイルスDNAの転写、RNAスプライシング及び翻訳は宿主細胞のタンパク質に媒介される。さまざまなにスプライシングされた転写産物が作られる。ヒトレトロウイルスHIV-1/2及びHTLV-1/IIの場合にはウイルスのタンパク質もまた遺伝子発現の調節のために使われる。細胞とウイルスの因子間の相互作用は、ウイルスの潜伏期間及びウイルス遺伝子の発現する時間的順序の制御の際の要因となる。

【0038】

レトロウイルスは水平的にも垂直的にも伝播されうる。レトロウイルスの効率的な感染性伝達にはウイルスのエンベロープタンパク質を特異的に認識する受容体の標的細胞での

50

発現が必要であるが、ウイルスは受容体非依存性の非特異的で低効率な進入経路を用いることもある。通常ウイルス感染により、重複感染に対する抵抗性をもたらす受容体のマスキング又は発現抑制のために細胞あたり1又は少数のウイルスゲノムコピーが生じる(Ch3 p104 in “Retroviruses “ JM Coffin, SH Hughes, & HE Varmus 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY; Fanら、J.Virol 28:802, 1978)。さらに、標的細胞タイプはウイルスが結合し侵入した後の複製サイクルの全てのステージを支持できなければならない。ウイルスゲノムが宿主の生殖系列に組み込まれたときには、垂直伝播が起こる。プロウイルスは細胞の遺伝子であるかのように世代から世代へ伝わる。こうして、しばしば潜伏するが、宿主が適切な薬剤にさらされたときに活性化される内在性プロウイルスが確立される。

10

【0039】

組み換え複製コンピテントレトロウイルスを治療的に用いる多くの場面では、組み換え複製コンピテントレトロウイルスにコードされている導入遺伝子の高レベルの発現を有することが有利である。例えば、プロドラッグを活性化するシトシンデアミナーゼ遺伝子のような遺伝子を用いて、より高いレベルのCDタンパクを細胞内で発現させプロドラッグである5-FCを5-FUにより効率的に変換できるようにすることは有利である。同様に、siRNA又はshRNAの高レベルの発現は、より効率的な標的遺伝子発現の抑制をもたらす。サイトカイン又は一本鎖抗体(scAbs)についても、サイトカイン又はscAbを高レベルに発現することが通常有利である。さらに、ベクター又は導入遺伝子の活性を不活性化するか又は損なう幾つかのコピーの突然変異が存在する場合には、標的細胞におけるベクターの複数のコピーが、インタクトな導入遺伝子の効率的な発現の高確率でもらすため、該複数のコピーを有することが有利である。本開示は、標的細胞又は標的細胞集団に複数回感染し、二倍体のゲノムに対して平均して5以上の平均コピー数をもたらす組み換え複製コンピテントレトロウイルスを提供する。本開示は、この特性を試験する方法も提供する。また標的細胞又は標的細胞集団に複数回感染し、二倍体のゲノムに対して5以上の平均コピー数をもたらす組み換え複製コンピテントレトロウイルスを用いて細胞増殖性障害を治療する方法も提供する。

20

【0040】

上述したように、組み込まれたDNA中間体はプロウイルスと呼ばれる。従前の遺伝子治療又は遺伝子送達システムでは、適切なヘルパーウイルスの存在下において、又は混入したヘルパーウイルスの同時生産なしにキャプシド形成を可能にする適切な配列を含む細胞株において、プロウイルスの転写及び感染性のウイルスへの組み立てを必要とする方法及びレトロウイルスを用いる。以下に述べるように、ヘルパーウイルスは開示の組み換えレトロウイルスの生産にとって必要ではない。なぜなら、キャプシド形成に必要な配列はゲノムに提供され、従って遺伝子送達や治療のための複製コンピテントレトロウイルスベクターが得られるからである。

30

【0041】

他の既存の複製コンピテントレトロウイルスベクターもまた、不安定であり、感染細胞や宿主細胞への水平伝播や垂直伝播の際及び複製の際に配列を失ってしまう傾向がある。これは、反復配列を含むか、又はポリメラーゼの効率を下げる余分なヌクレオチド配列の存在に部分的に起因し得る。

40

【0042】

本開示におけるレトロウイルスゲノム及びプロウイルスDNAは少なくとも3つの遺伝子：gag、pol及びenvを有し、これらの遺伝子は一つ又は二つの長末端反復配列(LTR)と隣接しているか、又はプロウイルスでは二つの長い末端反復配列(LTR)及びpsiのようなシス作用性配列を含む配列に隣接している。gag遺伝子は内部構造(基質、カプシド及びヌクレオカプシド)のタンパク質をコードしており；pol遺伝子はRNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)、プロテアーゼ及びインテグラーゼをコードしており；env遺伝子はウイルスエンベロープの糖タンパク質をコードしている。5'及び/又は3'LTRはポリオンRNAの転写及びポリアデニル化を促すのに働く。LTRはウイルスの複製に必要な他の全てのシス作用性配列

50

を含む。レンチウイルスはvif、vpr、tat、rev、vpu、nef及びvpx(HIV-1、HIV-2及び/又はSIVにおける)を含むさらなる遺伝子を有する。

【0043】

5'LTRに隣接しているのは、ゲノムの逆転写に不可欠な配列(tRNAプライマー結合部位)及びウイルスRNAの粒子への効率的なキャプシド形成に必要な配列(Psi部位)である。キャプシド形成(又はレトロウイルスRNAの感染性ビリオンへのパッケージング)に不可欠な配列がウイルスゲノムから欠失した場合、その結果シス欠損となりゲノミックなウイルスRNAのキャプシド形成が妨げられる。このタイプの改変ベクターは、従前の遺伝子送達システム(すなわち、ビリオンのキャプシド形成に必要な要素を欠失したシステム)において、パッケージ可能だが複製できないRNAゲノムをパッケージするウイルスタンパク質をトランスにおいて提供する「ヘルパー」要素として、一般に用いられてきた。

10

【0044】

本開示は、最適化IRSを含むベクターを提供する。最適化IRESは、典型的に異種ポリヌクレオチド、例えば細胞又は被験者に送達され得るシトシンデアミナーゼ又はその変異体、チミジンキナーゼ又はその変異体、miRNA又はsiRNA、サイトカイン、抗体結合ドメイン等に連結される。一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、麻疹ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター(レンチウイルスベクターを含む)、水泡性口内炎ウイルスベクター等のラブドウイルスベクター、レオウイルスベクター、Seneca Valleyウイルスベクター、ボックスウイルスベクター(動物のボックスウイルス又はワクシニア由来のベクターを含む)、パルボウイルスベクター(AAVベクターを含む)、アルファウイルスベクター又は当業者に知られている他のウイルスベクターであり得る(例えば、Concepts in Genetic Medicine, ed. Boro Dropulic and Barrie Carter, Wiley, 2008, Hoboken, NJ.; The Development of Human Gene Therapy, ed. Theodore Friedmann, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold springs Harbor, New York, 1999; Gene and Cell Therapy, ed. Nancy Smyth Templeton, Marcel Dekker Inc., New York, New York, 2000 and Gene Therapy: Therapeutic Mechanism and Strategies, ed. Nancy Smyth Templeton and Danilo D Lasic, Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 2004; Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies, Third Edition, ed. Nancy Smyth Templeton, CRC Press, 2008もまた参照されたい;これらの開示内容を参照により本明細書に組み込む)。

20

30

【0045】

一実施形態では、本開示のレトロウイルスゲノムは、最適化IRESの下流に、所望の/異種ポリヌクレオチドの挿入のためのクローニング部位を含む最適化IRESを含む。一実施形態では、最適化IRESはレトロウイルスベクターのenv遺伝子の3'側であるが、所望の異種ポリヌクレオチドの5'側及び3'LTRの5'側に位置する。上記の実施形態の全てにおいて、最適化IRESは、6A'sを有するA-パルジを含む。所望のポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドは、最適化IRESに機能可能に連結され得る。

【0046】

一実施形態では、ウイルスベクターは、複製哺乳動物細胞に感染することができるガンマレトロウイルスから得られるか、又はこれに由来する複製コンピテントレトロウイルスであり得る。複製コンピテントレトロウイルスベクターは、例えば、シトシンデアミナーゼ(配列番号3)、チミジンキナーゼ(配列番号37)、miRNA、siRNA、サイトカイン、受容体、又は抗体等をコードする異種ポリヌクレオチドの5'側に位置する6A'sからなるA-パルジを含む最適化内部リボソーム侵入部位(IRES)を含む。異種ポリヌクレオチドが、siRNA、miRNA又はRNAi等の非翻訳RNAをコードする場合、他の翻訳ポリヌクレオチドのために、IRESは必ずではないが、含まれ得る。一実施形態では、異種ポリヌクレオチドを含む最適化IRESカセットは、レトロウイルスベクターのENVポリヌクレオチドの3'側であるが、3'LTRの5'側である。一実施形態では、ウイルスベクターは標的細胞に複数回(例えば、二倍体細胞に5以上)感染することができるレトロウイルスベクターである。

40

50

【0047】

本開示は、これまでの及びA-バルジに6A'sを有する最適化IRESを含むレトロウイルスベクターと比べて増加した安定性を有する複製コンピテントレトロウイルスベクターを提供する。感染及び複製中のかかる増加した安定性は、細胞増殖性障害の治療にとって重要である。さらに、最適化A-バルジからの増加したタンパク質発現は、標的細胞/組織への治療タンパク質のさらなる送達をもたらす。導入効率、導入遺伝子の安定性、導入遺伝子の発現及び標的選択性の組み合わせが、複製コンピテントレトロウイルスによって提供される。本組成物及び方法は、挿入安定性を提供し、導入遺伝子の転写活性及びコードされるポリペプチドの転写実効性を維持する。

【0048】

本開示のベクター又はレトロウイルスベクターの使用目的によって、任意の数の異種ポリヌクレオチド又は核酸配列がベクター又はレトロウイルスベクターに挿入され得る。例えば、*in vitro*研究のために、抗生物質耐性及び蛍光分子（例えばGFP）を含む一般的に使用されるマーカー遺伝子又はレポーター遺伝子が用いられ得る。任意の所望のポリヌクレオチド配列をコードする追加のポリヌクレオチド配列もまた、本開示のベクターに挿入され得る。異種核酸配列の*in vivo*送達を目的とする場合には、治療及び非治療配列の両方が用いられ得る。例えば、異種の配列はアンチセンス分子（miRNA、siRNA）を含む治療分子、又は細胞増殖性障害又は他の遺伝子関連疾患若しくは障害に関連する特定の遺伝子に関するリボザイムをコードし得；異種配列は自殺遺伝子（例えば、HSV-tk又はPNP又はシトシンデアミナーゼ；改変又は非改変、ヒト化又は非ヒト化を問わない）、成長因子又は治療タンパク質（例えばFactor IX、及びIL2等）であり得る。本開示に利用できる他の治療タンパク質は、本分野において容易に特定される。本開示に適用され得る他の治療タンパク質は、本分野において容易に特定される。

【0049】

一実施形態では、ベクター中の異種ポリヌクレオチドはヒト細胞での発現に最適化されたシトシンデアミナーゼを含む。さらなる実施形態では、シトシンデアミナーゼはヒトコドンに最適化された配列を含み、また野生型のシトシンデアミナーゼと比較して、シトシンデアミナーゼの安定性を増加する（例えば、低減された分解又は増加した熱安定性）変異を含む（例えば、配列番号4を参照されたい）。また別の実施形態では、異種のポリヌクレオチドは、UPRT又はOPRT活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に連結したシトシンデアミナーゼ（ヒトコドン最適化又は非最適化のいずれか、変異型又は非変異型のいずれか）を含む融合構築物をコードする（例えば、配列番号11、13、15及び17を参照されたい）。シトシンデアミナーゼを有するかかるポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの例は、国際公開第WO2010/045002号に見出すことができ、その内容を本明細書に参照により組み込む。

【0050】

他の実施形態では、ベクター又は複製コンピテントレトロウイルスベクターは、（本明細書に記載される様な）シトシンデアミナーゼを含むポリペプチドをコードする異種のポリヌクレオチドを含み得、さらにウイルスプロモーターの一次転写物の一部として、または細胞タイプ又は組織特異的であり得るプロモーターに連結したmiRNA又はsiRNA分子を含むポリヌクレオチドをさらに含み得る。

【0051】

またさらに別の実施形態では、異種のポリヌクレオチドはインターロイキン、又はインターフェロン等のサイトカインを含んでもよい。本開示のレトロウイルスベクターから発現され得るサイトカインには、限定されるものではないが、IL-1、IL-1、IL-2（配列番号40）、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、及びIL-21、anti-CD40、CD40L、IFN-（ヒト - 配列番号38；マウス - 配列番号39）及びTNF-、可溶性TNF-、リンボトキシン-（LT-、TNF-としても知られる）、LT-（LT-2-の複合体ヘテロ三量体として見出される）、OPGL、FasL、CD27L、CD30L、CD40L、4-1BBL、DcR3、OX40L、TNF-（国

10

20

30

40

50

際公開第WO 96/14328号)、AIM-I(国際公開第WO 97/33899号)、エンドカイン (国際公開第WO 98/07880号)、OPG、及びニュートロカイン (国際公開第WO 98/18921号)、OX40、及び神経成長因子(NGF)、可溶性Fas、CD30、CD27、CD40及び4-1BB、TR2(国際公開第WO 96/34095号)、DR3(国際公開第WO 97/33904号)、DR4(国際公開第WO 98/32856号)、TR5(国際公開第WO 98/30693号)、TRANK、TR9(国際公開第WO 98/56892号)、TR10(国際公開第WO 98/54202号)、312C2(国際公開第WO 98/06842号)、及びTR12、及び可溶性CD154、CD70、及びCD153が含まれる。いくつかの実施形態では、特に細胞株からのタンパク生産には血管新生タンパク質が有用であるかもしれない。かかる血管新生因子には、限定されるものではないが、神経膠腫由来成長因子(GDNF)、血小板由来成長因子-A(PDGF-A)、血小板由来成長因子-B(PDGF-B)、胎盤成長因子(PIGF)、胎盤成長因子2(PIGF-2)、血管内皮増殖因子(VEGF)、血管内皮増殖因子A(VEGF-A)、血管内皮増殖因子2(VEGF-2)、血管内皮増殖因子B(VEGF-3)、血管内皮増殖因子B-186(VEGF-B186)、血管内皮増殖因子D(VEGF-D)、及び血管内皮増殖因子E(VEGF-E)がある。線維芽細胞増殖因子が本開示のベクターによって送達されてもよく、限定されるものではないが、FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14及びFGF-15を含む。造血性の成長因子が本開示のベクターを用いて送達されてもよく、かかる成長因子には、限定されるものではないが、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)(サルグラモスチムsargramostim)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)(フィルグラスチムfilgrastim)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF、CSF-1)、エリスロポエチン(エポエチン)、幹細胞因子(SCF、c-kitリガンド、造血性幹細胞因子)、巨核球コロニー刺激因子、PIXY321(a GMCSF/IL-3)融合タンパク等が含まれる。

【0052】

マイクロRNA(miRNA)は小さな非コードRNAである。それらは、コード又は非コード遺伝子のイントロン、非コード遺伝子のエキソン、又は遺伝子間領域に位置する。miRNA遺伝子は、初期前駆体miRNA(pri-miRNA)と呼ばれる前駆体ポリヌクレオチドを生成するRNAポリメラーゼIIによって転写される。核においてpri-miRNAは、リボヌクレアーゼであるDroshaによって加工され、短いヘアピン構造を形成するmiRNA前駆体(pre-miRNA)を生産する。続いて、pre-miRNAがExportin 5を介して細胞質に移行し、Dicerと呼ばれる他のリボヌクレアーゼによってさらに加工され、活性な成熟miRNAを生成する。

【0053】

成熟miRNAは約21ヌクレオチドの長さである。それは、標的遺伝子のmRNAの3'非翻訳領域に結合すること、及びタンパク質翻訳の抑制又はmRNAの分解のいずれかによりタンパク質発現を抑制することによって、機能を発揮する。miRNAは、発生、細胞増殖、分化、及び癌の進行をはじめとする生物学的プロセスに關与する。miRNAプロファイリングの研究は、幾つかのmiRNAの発現が組織特異的であるか、幾つかの組織において豊富であることを示している。例えば、miR-142-3p、miR-181及びmiR-223の発現は、ヒト及びマウスの造血組織において豊富であることが証明されている(Baskerville et al., 2005 RNA 11, 241-247; Chen et al., 2004 Science 303, 83-86)。miR-142-3pの標的配列は、配列番号35に示される。miR-142-3p4Xの標的配列は、配列番号36に示される。

【0054】

幾つかのmiRNAは、幾つかの腫瘍において上方制御(発癌miRNA)又は下方制御(リプレッサー)されることが観察されている(Spizzo et al., 2009 Cell 137, 586e1)。例えば、miR-21は、神経膠芽腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、及び子宮頸癌、子宮平滑筋肉腫、DLBCL、頭頸部癌において過剰発現される。対照的に、let-7のメンバーは、神経膠芽腫、肺癌、乳癌、胃癌、卵巣癌、前立腺癌、及び大腸癌において下方制御されることが報告されている。癌におけるmiRNA発現の恒常性の再確立は、癌の進行を阻害し、又は反転させるための不可避の機構である。

【0055】

癌において、生命機能がmiRNAによって修飾される結果として、潜在的な治療アプロー

10

20

30

40

50

チの開発において、発癌性miRNAのアンチセンス媒介阻害（アンチゴマー、antigomers）が注目されている。しかしながら、miRNA置換が同等に有効な戦略を代表し得る。このアプローチでは、最も治療に有用なmiRNAは、腫瘍において低レベルで発現されるが、通常組織において高レベルで発現され、したがって許容されるmiRNAである。

【0056】

癌において下方制御されるmiRNAは抗癌剤として有用であり得る。例としてmir-128-1/2（それぞれ配列番号31及び32）、let-7、miR-26、miR-124、及びmiR-137が含まれる(Esquele-Kerschら、2008 Cell Cycle 7, 759-764; Kumarら、2008 Proc Natl Acad Sci USA 105, 3903-3908; Kotaら、2009 Cell 137, 1005-1017; Silberら、2008 BMC Medicine 6:14 1-17)。miR-128の発現は中枢神経系で強いと報告されており、神経膠芽腫では下方制御されることが認められている(Sempereら、2004 Genome Biology 5:R13.5-11; Godlewskiら、2008 Cancer Res 68: (22) 9125-9130)。miR-128はmiR-128-1及びmiR-128-2の二つの異なる遺伝子によりコードされている。どちらも同一の成熟配列にプロセシングされる。Bmi-1及びE2F3aはmiR-128の直接の標的であることが報告されている(Godlewskiら、2008 Cancer Res 68: (22) 9125-9130; Zhangら、2009 J. Mol Med 87:43-51)。さらに、Bmi-1の発現は、神経膠腫、マントル細胞リンパ種、非小細胞性肺癌、B細胞非ホジキンリンパ腫、乳癌、結腸直腸癌及び前立腺癌を含む様々なヒトの癌で上方制御されることが認められている。さらに、Bmi-1は、神経幹細胞、及び神経膠腫での「幹細胞様」細胞集団も含む異なる組織由来の幹細胞の自己複製に必要であることが実証されている。

10

20

【0057】

miRNAが媒介する細胞機能の阻害の可能性について、多くのin vitro実証があるが、他の分子について真であるのと同様に、これらをオリゴヌクレオチドとして、又はウイルスベクターとして、in vivoの効果を有するのに必要なほど効率的に送達することは困難である（例えば、Li et al., Cell Cycle 5:2103-2109 2006）。

【0058】

複製欠損レトロウイルス及びレンチウイルスベクターは、CMV又はLTR等のポリメラーゼIIプロモーターによってpri-miRNAを安定に発現するために用いられ、成熟miRNAの生産を示した。複製欠損レトロウイルス及びレンチウイルスベクターにおいて、U6及びH1プロモーター等のIII型RNAポリメラーゼIIIのプロモーターの導入は、短いヘアピン構造のRNAを生産する機能的な低分子干渉RNA（siRNA）を発現するために広く用いられてきた（Bromberg-White et al., 2004 J Virol 78:9, 4914-4916; Sliva et al., 2006 Virology 351, 218-225; Haga et al., 2006, Transplant Proc 38(10):3184-8）。ループ配列はDicerによって切断されて21~22ヌクレオチド長の成熟siRNAが生産される。shRNAは、標的遺伝子発現を下方調節するために安定に発現され得る。配列番号33及び34は、H1プロモーターに連結されたpre-miR-128を含む。

30

【0059】

他の実施形態では、Aバルジに6A'sを含む最適化IRESは、コアプロモーターと組み合わせて用いられ得、ここで最適化IRESは第一の異種コード配列に機能可能に連結され、コアプロモーター又はミニプロモーターは第二の異種コード配列又はsiRNA、miRNA、又はshRNA配列に連結される（例えば、参照によって組込まれるWO 2014/066700を参照されたい）。

40

【0060】

本明細書で使用される場合、「コアプロモーター」とは、約50~100bpを含み、エンハンサーエレメントを欠く最小のプロモーターを指す。そのようなコアプロモーターとしては、限定されるものではないが、SCP1、AdML及びCMVコアプロモーターが挙げられる。より具体的には、コアプロモーターカセットが存在する場合、第2のカセット（例えば、第2のミニプロモーターカセット、polIIIプロモーターカセット又はIRESカセット）が存在する。幾つかの実施形態では、コアプロモーターを有するカセットを含むベクターでは、SCP1、AdML及びCMVコアプロモーターの使用を特異的に排除し、代わりに、本明細書に、及び以下にさらに記載されているデザイナーコアプロモーターを利用する。

50

【0061】

コアプロモーターとしては、特定のウイルスプロモーターが挙げられる。ウイルスプロモーターとは、本明細書で使用される場合、コア配列を有し、通常はいくつかの別の補助的なエレメントも有するプロモーターである。例えば、SV40の初期プロモーターは、3種類のエレメント:TATAボックス、開始部位及びGC反復を含有する(Barrera-Saldanaら、EMBO J、4:3839-3849、1985; Yaniv、Virology、384:369-374、2009)。TATAボックスは、転写開始部位の約20塩基対上流に位置する。GC反復領域は、6つのGCボックスを含有する21塩基対の反復であり、転写の方向を決定する部位である。このコアプロモーター配列は約100bpである。追加的な72塩基対の反復を付加し、したがって「ミニプロモーター」にすることは、プロモーターの機能性を約10倍増大させる転写エンハンサーとして有用である。SP1タンパク質が21bpの反復と相互作用する際、SP1タンパク質は最初又は最後の3つのGCボックスのいずれかに結合する。最初の3つに結合すると初期発現が開始され、最後の3つに結合すると後期発現が開始される。72bpの反復の機能は、安定なRNAの量を増強すること、及び合成の速度を上昇させることである。これは、AP1(活性化因子タンパク質1)と結合(二量体形成)して、3'ポリアデニル化され、5'キャップ形成された一次転写物を生じることによって行われる。ラウス肉腫ウイルス(RSV)、HBV X遺伝子プロモーター、及びヘルペスチミジンキナーゼコアプロモーターなどの他のウイルスプロモーターも、所望の機能を選択するための基礎として使用することができる。

10

【0062】

コアプロモーターは、典型的に、RNAポリメラーゼII機構によって転写が開始される位置を規定する+1転写開始部位に対して-40~+40を包含する(Juven-Gershon及びKadonaga、Dev. Biol. 339:225-229、2010)。典型的に、RNAポリメラーゼIIは、プロモーター内のDNAモチーフに結合するいくつかの転写因子と相互作用する。これらの因子は、一般に、「一般的な」又は「基本の」転写因子として公知であり、それらとしては、限定されるものではないが、TFIIA(RNAポリメラーゼIIAに対する転写因子)、TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、及びTFIIHが挙げられる。これらの因子は、全てのコアプロモーターと共に「一般的な」様式で作用し、したがって、多くの場合、「基本の」転写因子と称される。

20

【0063】

Juven-Gershonら、2006(Nat. Methods, 3(11):917-922, 2006)には、コアプロモーターのエレメントが記載されている。例えば、pRC/CMVコアプロモーターは、TATAボックスからなり、81bpの長さである。CMVコアプロモーターは、TATAボックス及び開始部位からなる。一方、SCP合成コアプロモーター(SCP1及びSCP2)はTATAボックス、Inr(開始因子)、MTE部位(モチーフ10エレメント)、及びDPE部位(下流プロモーターエレメント)からなり、長さが約81bpである。SCP合成プロモーターは、単純なpRC/CMVコアプロモーターと比較して改善された発現を有する。

30

【0064】

本明細書で使用される場合、「ミニプロモーター」又は「小さいプロモーター」とは、機能可能に連結した遺伝子又はコード核酸配列の転写を促進する調節ドメインを指す。ミニプロモーターは、名称により示される通り、機能可能に連結したコード配列の有効な転写及び/又は翻訳に必要な最低限の量のエレメントを含む。ミニプロモーターは、追加的な調節要素と組み合わせた「コアプロモーター」、又は「改変コアプロモーター」を含んでもよい。典型的に、ミニプロモーター又は改変コアプロモーターは約100~600bpの長さになり、コアプロモーターは、典型的に、約100bp未満(例えば、約70~80bp)である。他の実施形態では、コアプロモーターが存在する場合、カセットは、典型的に、コアプロモーター配列の上流又は下流のいずれかに、コアプロモーター単独による発現レベルを上回る機能可能に連結したコード配列の発現を促進する、エンハンサーエレメント又は別のエレメントを含む。

40

【0065】

したがって、本開示は、一般に、標的細胞において有意なレベルでの遍在的な発現を可能にし、またベクターに安定に組み入れるために有用な「コアプロモーター」エレメント

50

(<100bp、<200bp、<400bp又は<600bp)に関して定義されるような細胞エレメントに由来するミニプロモーター(例えば、改変コアプロモーター)、及び、特に導入遺伝子の効率的な発現を可能にするための複製レトロウイルスベクターを提供する。コアプロモーターに加えて、エンハンサー配列及び/又はコザック配列を欠くコアプロモーター配列と比較してより良好な遺伝子発現を可能にするための、最小限のエンハンサー配列及び/又はコザック配列とを含み、それでもなお200bp、400bp又は600bpを下回るミニプロモーターも提供される。そのようなミニプロモーターとしては、改変コアプロモーター及び天然に存在する組織特異的プロモーター、例えば、エラスチンプロモーター(膵腺房細胞に特異的である)(204bp; Hammerら、Mol Cell Biol., 7:2956-2967、1987)並びにマウス及びヒト由来の細胞周期依存性ASK遺伝子由来のプロモーター(63~380bp; Yamadaら、J. Biol. Chem., 277: 27668-27681、2002)などが挙げられる。遍在的に発現される小さいプロモーターとして、ウイルスプロモーター、例えば、SV40初期プロモーター及び後期プロモーター(約340bp)、RSV LTRプロモーター(約270bp)、並びに標準的な「TATTAAボックス」を有さず、13bpのコア配列5'-CCCCGTTGCCCGG-3'(配列番号43)を有するHBV X遺伝子プロモーター(約180bp)(例えば、R Anishら、PLoS one, 4: 5103、2009)などが挙げられる。さらに他の実施形態では、少なくとも1つのミニプロモーターカセットを含む治療カセットは、RRV内に存在するIRESカセットの発現レベルを超えるか、それとほぼ同等であるか、又はその約1倍~2.5倍低い、発現レベルを有するだろう。

10

【0066】

コアプロモーター又はミニプロモーターからの転写は、種々のエレメントの相互作用によって起こる。集中型の転写では、例えば、いくつかのヌクレオチドの狭い領域内に単一の主要な転写開始部位又はいくつかの開始部位のいずれかが存在する。集中型の転写はより単純な生物体において優勢な転写様式である。分散型の転写では、約50~100ヌクレオチドの広範な領域にわたっていくつかの弱い転写開始部位が存在する。分散型の転写は脊椎動物において最も一般的な転写様式である。例えば、分散型の転写は、ヒト遺伝子の約3分の2で観察される。脊椎動物では、集中型の転写は調節されたプロモーターに付随する傾向があるが、一方、分散型の転写は一般には構成的プロモーターにおいてCpGアイランドで観察される。

20

【表 1】

表1：集中型のコアプロモーターに寄与し得る結合部位(大抵TATAボックス及び単一の転写開始部位(TSS)を含む)、又はTATAボックスを含まず、通常はDPEエレメントを含む分散型のプロモーターに寄与し得る結合部位(R. Dickstein、Trasncription、2(5):201-206、2011; Juven-Gershonら、Nat. Methods、2006、上記を参照されたい)。ヌクレオチドの記号は国際的な慣習に従う(ワールドワイドウェブ: chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html)。

転写因子	正式名称	転写開始部位(TSS+1)に対する結合部位wrt
BREu	TFIIB認識エレメント、上流	TATAボックスの上流、SSRCGCC
TATA box	TATAボックス	-31/-30 TATAWAARにおけるT、重要な集中型のプロモーターエレメント
BREd	TFIIB認識エレメント、下流	-23から-17のRTDKKKK
XCPE1	HBV Xコアプロモーターエレメント1	HBV X遺伝子由来の-8から+2のDSGYGGRAS M
XCPE2	HBV Xコアプロモーターエレメント2	HBV X遺伝子由来のVCYCRTTRCMY
Inr	開始因子	-2から+4のYYANWYY
DCE SI	下流のコアエレメント部位I	+6から+11のCTTC
DCE SII	下流のコアエレメント部位II	+16から+21のCTGT
DCE SIII	下流のコアエレメント部位III	+30から+34のAGC
MTE	モチーフ10エレメント	主にショウジョウバエにおける+18から+27のCSARCSSAAC
DPE	下流のプロモーターエレメント	ショウジョウバエにおいて一般的な+28から+33のRGWYVT、重要な分散型のプロモーターエレメント

【0067】

表2は、エンハンサーエレメントを構築し、コアプロモーター領域にクローニングするために使用することができるオリゴヌクレオチドを示す。上記の通り、本開示の改変/最適化されたコアプロモーターは、表1のエレメントの付加を含むコア配列を含んでよく、表2に記載のクローニングされたエンハンサーをさらに含んでよい。そうすることで、ミニプロモーターのサイズが大きくなり得る。しかし、最終的なミニプロモーターは600bpを超えるべきではなく、一般には、約100bp、200bp、300bp、400bp、500bp及びその間の任意の整数になるだろう。

【表 2】

表2. エンハンサーセグメントを構築するために使用するオリゴヌクレオチド

番号	オリゴヌクレオチド	モチーフ配列	参考文献
1	AP-1	5'-TGTCTCAG-3'	Hallahan et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 36:355-360, 1996
2	CAR _G	5'-CCATATAAGG-3'	Datta et al. Proc. Natl. Acad. Sci. US A 89:10149-10153, 1992
3	NF- κ B1	5'-GGAAATCCCC-3'	Ueda et al. FEBS Lett. 491:40-44, 2001
4	NF- κ B2	5'-GGAAAGTCCCC-3'	Kanno et al. EMBO J. 8:4205-4214, 1989
5	NF- κ B3	5'-GGAGTTCCC-3'	Hong et al. J. Biol. Chem. 275:18022-18028, 2000
6	NF-Y	5'-CATTGGG-3'	Hu et al. J. Biol. Chem. 275:2979-2985, 2000

AP-1、活性化タンパク質-1；NF- κ B、核因子 κ B

【0068】

一実施形態では、本開示は、非分裂宿主細胞、宿主分裂細胞、又は細胞増殖性障害を有する宿主細胞に感染可能な組換え複製コンピテントレトロウイルスを提供する。本開示の組換え複製コンピテントレトロウイルスは、ウイルスGAG、ウイルスPOL、ウイルスENVをコードするポリヌクレオチド配列、ピリオン内に封入されたIRESのA-バルジにおける6A'sを有する、最適化内部リボソーム侵入部位（IRES）に続く異種ポリヌクレオチドを含む。

【0069】

一般的に、本開示の組換えベクターは、標的細胞に核酸配列を移行させることができる。用語「非分裂」細胞は有糸分裂を経ない細胞を意味する。非分裂細胞は細胞が活発に分裂していない限り、細胞周期の任意の点で阻止されうる（例えば、G₀/G₁、G₁/S、G₂/M）。ex vivoの感染では、分裂細胞は、当業者に用いられる標準的な技術、例えば照射、アフィジコリン（aphidocolin）処理、血清飢餓、及び接触障害によって、細胞分裂を阻止するために処理され得る。しかしながら、ex vivoの感染が、多くの細胞が既に停止しているため（例えば、幹細胞）、細胞を阻止することなしに実施されることを理解されたい。例えば、組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することができる。体内の既存の非分裂細胞の例として、神経、筋肉、肝臓、皮膚、心臓、肺、及び骨髓細胞及びその誘導細胞が挙げられる。分裂細胞には、オンコレトロウイルスベクターが用いられ得る。

【0070】

「分裂」細胞は活発な有糸分裂又は減数分裂を経ている細胞を意味する。そのような分裂細胞として、幹細胞、皮膚細胞（例えば、線維芽細胞及び角化細胞）、生殖細胞及び本分野で知られている他の分裂細胞が挙げられる。分裂細胞という用語に含まれ、かつとりわけ興味深いのは新生細胞等の細胞増殖性障害を有する細胞である。用語「細胞増殖性障害」は、異常な数の細胞で特徴付けられる状態を意味する。この状態は、肥大的な（組織中での細胞集団の異常増殖をもたらす、細胞の連続的な増殖）及び發育不全的な（組織中での細胞の欠失又は欠乏）細胞の増殖または体内の領域への細胞の過剰な流入又は転移を含み得る。該細胞集団は必ずしも癌化、腫瘍化または悪性化細胞ではなく、通常の細胞もまた同様に含み得る。細胞増殖性障害として、強皮症、関節炎、及び肝硬変を含む様々な線維症等の結合組織の異常増殖に関連する障害が挙げられる。細胞増殖性障害として、頭頸部の細胞腫などの新生物疾患が挙げられる。頭頸部の細胞腫として、例えば、口腔、食道、咽頭、喉頭、甲状腺、舌、唇、唾液腺、鼻、副鼻腔、上咽頭の細胞腫、上鼻腔（superior nasal vault and sinus）の腫瘍、感覚神経芽腫、扁平上皮癌、悪性黒色腫、副鼻腔（sinonasal）未分化癌腫（SNUC）又は血液新生物が含まれる。また、頸リンパ節、喉頭

10

20

30

40

50

前リンパ節、肺食道傍リンパ節及び顎下リンパ節等の局部リンパ節の癌腫も含まれる (Harrison's Principles of Internal Medicine (eds., Isselbacher, et al., McGraw-Hill, Inc., 13th Edition, pp1850-1853, 1994))。他の癌主として、限定するものではないが、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌リンパ腫、口腔癌、膵臓癌、白血病、黒色腫、胃癌、皮膚癌、及び卵巣癌が挙げられる。細胞増殖性疾患はまた、間接リウマチ (O'Dell NEJM 350:2591 2004) 及びしばしば免疫系の細胞の不適切な細胞増殖によって特徴づけられる他の自己免疫疾患 (Mackayら、NEJM 345:340 2001) を含む。

【 0 0 7 1 】

他の実施形態では、本開示の複製コンピテントレトロウイルスベクターをトランスフェクトした宿主細胞が提供される。宿主細胞として、酵母細胞、昆虫細胞、又は動物細胞等の真核細胞が挙げられる。宿主細胞として、細菌細胞等の原核細胞もまた挙げられる。他の実施形態では、宿主細胞は無血清懸濁において連続的に増殖されるように改変又は選択されている (例えば、参照により本明細書に組込まれる米国特許公開第2012/0087894-A1号を参照されたい。)。

【 0 0 7 2 】

本明細書で提供されるベクター (例えば、複製コンピテントレトロウイルスベクター) により形質導入 (形質転換又はトランスフェクト) された、操作された宿主細胞もまた提供される。操作された宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選択、又はコードポリヌクレオチドの増幅に適切に改変された従来の栄養培地において培養され得る。温度及びpH等の培養条件は、発現について選択される宿主細胞により以前に用いられたものであり、当業者には明らかであり、例えば、Sambrook, Ausubel and Berger、及び例えば、Freshney (1994) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd ed. (Wiley-Liss, New York) をはじめとする、本明細書で引用した文献、並びにそれらにおいて引用された文献において、明らかである。

【 0 0 7 3 】

適切な発現宿主の例として、CHO、COS、BHK、HEK293又はBowes黒色腫等の哺乳動物細胞が挙げられる。典型的に、ヒト細胞又は細胞株が用いられるだろう。しかしながら、本開示のベクター及びポリヌクレオチドを、配列決定、増幅及びクローニングの目的のために、非ヒト宿主細胞へクローニングすることが望ましいものであり得る。

【 0 0 7 4 】

他の実施形態では、ターゲティングポリヌクレオチド配列が、本開示の組換えレトロウイルスベクターの一部として含まれる。ターゲティングポリヌクレオチド配列はターゲティングリガンド (例えば、ヘレグリン等のペプチドホルモン、単鎖抗体、受容体又は受容体のリガンド)、組織特異的又は細胞タイプ特異的調節要素 (例えば組織特異的又は細胞タイプ特異的プロモーター又はエンハンサー)、又はターゲティングリガンドと組織特異的/細胞タイプ特異的調節要素の組み合わせである。ターゲティングリガンドは、レトロウイルスのenvタンパク質と機能可能に連結されて、キメラレトロウイルスenvタンパク質を形成する。ウイルスGAG、ウイルスPOL及びウイルスENVタンパク質は適したいずれのレトロウイルス由来であってもよい (例えば、MLV又はレンチウイルス由来)。他の実施形態では、ウイルスENVタンパク質は非レトロウイルス (例えばCMV又はVSV) に由来する。

【 0 0 7 5 】

一実施形態では、レトロウイルスベクターは、細胞の外表面に分子を有する細胞に結合することによって、細胞にターゲティングされる。このレトロウイルスターゲティング法は、レトロウイルスの表面にターゲティングリガンドと相互作用する受容体又は結合分子を有する細胞又は組織にウイルスをターゲティングするのを補助するために、レトロウイルスの外殻上のターゲティングリガンドの発現を利用する。細胞のウイルスによる感染後、ウイルスは細胞にその核酸を注入し、レトロウイルスの遺伝物質は、宿主細胞のゲノムに組みこまれ得る。

【 0 0 7 6 】

したがって、一実施形態では、本開示は、ターゲティングポリペプチドに機能可能に連

10

20

30

40

50

結したレトロウイルスのENVタンパク質を含むキメラenvタンパク質を含む。ターゲティングポリペプチドは、細胞特異的な受容体分子、細胞特異的な受容体のリガンド、細胞特異的な抗原エピトープに対する抗体又は抗体断片又は本分野において容易に特定できる標的細胞と結合又は相互作用し得る他の任意のリガンドであり得る。ターゲティングポリペプチド又は分子の例として、ビオチン - ストレプトアビジンをリンカーとして用いた2価抗体 (Etienne-Julanら、J. Of General Virol., 73, 3251-3255, 1992; Rouxら、Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, 9079-9083, 1989)、ハプテンに対する単鎖抗体の可変領域をコードしている配列をエンベロープ中に含む組換えウイルス (Russellら、Nucleic Acids Research, 21, 1081-1085 (1993))、レトロウイルスのエンベロープ中にペプチドホルモンリガンドをクローニングしたもの (Kasaharaら、Science, 266, 1373-1376, 1994)、キメラEPO/env構築物 (Kasaharaら、1994)、低密度リボタンパク質 (LDL) 受容体を発現するHeLa細胞への特異的な感染をもたらす、狭宿主性のMLVのLDL受容体に対する単鎖抗体 (Somia ら、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 92, 7570-7574 (1995)) が挙げられ、同様にALVの宿主範囲は、インテグリンリガンドの導入によって変更され得、ウイルスは、種を超えてラット神経膠芽腫細胞に特異的に感染できるようにすることができ (Valsesia-Wittmann ら、J. Virol. 68, 4609-4619 (1994))、Dornberg及び共同研究者 (Chu and Dornberg, J. Virol 69, 2659-2663 (1995); M. Engelstadterら、Gene Therapy 8, 1202-1206 (2001)) は、腫瘍マーカーに対する単鎖抗体を含むエンベロープを用いた脾臓壊死ウイルス (SNV)、トリレトロウイルスの組織特異的なターゲティングを報告している。

10

20

【0077】

一実施形態では、本開示の組換えレトロウイルスは、ウイルスが特定の細胞タイプ (例えば、平滑筋細胞、肝細胞、腎臓細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨髄細胞、軟骨細胞、上皮細胞、腸細胞、乳腺細胞、新生細胞、神経膠腫細胞、神経細胞及び当業者に知られる他の細胞) をターゲティングするよう遺伝的に改変されており、それにより、レトロウイルスベクターの組換えゲノムは、標的非分裂細胞、標的分裂細胞、又は細胞増殖性障害を有する標的細胞に送達される。

【0078】

他の実施形態では、以下でより完全に記載する様に、ターゲティングは細胞又は組織特異的調節要素を用いて、該調節要素を活発に利用する標的細胞においてウイルスゲノムの発現及び転写を促す。移行されたレトロウイルス遺伝物質は、その後宿主細胞中で転写され、タンパク質に翻訳される。ターゲティング調節要素は、典型的に5'及び/又は3'LTRに連結され、キメラLTRを形成する。

30

【0079】

一実施形態では、本開示は、増殖シビリオンを生産するためにヘルパーウイルス又は追加の核酸配列若しくはタンパク質を必要としない複製コンピテントレトロウイルスを提供する。例えば、上述したように、本開示のレトロウイルスの核酸配列は、グループ特異的な抗原及び逆転写酵素 (並びに成熟及び逆転写に必要なインテグラーゼ及びプロテアーゼ酵素) を、それぞれコードしている。ウイルスgag及びpolは、レンチウイルス、例えばHIV又はオンコウイルス又はガンマレトロウイルス、例えばMoMLVに由来し得る。さらに、本開示のレトロウイルスの核酸ゲノムはウイルスエンベロープ (ENV) タンパク質をコードする配列を含む。env遺伝子は任意のレトロウイルスに由来し得る。envはヒト及び他の種の細胞への形質導入を可能とする広宿主性のエンベロープタンパク質であり得、又はマウス及びラット細胞にしか形質導入することができない狭宿主性のエンベロープタンパク質であり得る。さらに、エンベロープタンパク質を抗体又は特定のリガンドに連結することによって、組換えウイルスを、特定の細胞タイプの受容体にターゲティングすることが望ましいものであり得る。上述の通り、レトロウイルスベクターは、例えば糖脂質又はタンパク質を挿入することにより標的特異的にすることができる。ターゲティングはしばしばレトロウイルスベクターを特定の細胞タイプ (例えばある組織中にみられる細胞タイプ又は癌細胞タイプ) の抗原にターゲティングする抗体を用いて達成される。当業者は過度の実験なしに、レトロウイルスベクターの特定の標的への送達を達成するための特定の方法

40

50

を知っているかまたは容易に確かめることができる。一実施形態では、env遺伝子は非レトロウイルス（例えばCMV又はVSV）に由来する。レトロウイルス由来のenv遺伝子の例として、限定されるものではないが：モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMuLV）、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳癌ウイルス（MuMTV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）及びラウス肉腫ウイルス（RSV）が挙げられる。水泡性口内炎ウイルス（VSV）（Protein G）、サイトメガロウイルスエンベロープ（CMV）、又はインフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）等の他のenv遺伝子もまた用いることができる。

【0080】

一実施形態では、レトロウイルスゲノムは、オンコレトロウイルス、より具体的には哺乳類のオンコレトロウイルスに由来する。さらなる実施形態では、レトロウイルスゲノムはガンマレトロウイルス、より具体的には哺乳類のガンマレトロウイルスに由来する。「由来する」は、親ポリヌクレオチド配列が、挿入又は天然の配列の除去（例えばIRESの挿入、目的のポリペプチド又は抑制性核酸をコードする異種のポリヌクレオチドの挿入、野生型のプロモーターの、異なるレトロウイルス又はウイルス由来のより効率的なプロモーターへの交換等）により改変されている野生型オンコウイルスであることを意味する。

【0081】

不完全であり、感染性のウイルス粒子を生産するために補助を必要とする、本分野における標準的な方法によって生産される組換えレトロウイルスとは異なり、本開示は、複製コンピテントであるレトロウイルスを提供する。

【0082】

他の実施形態では、本開示は、調節配列を用いてターゲティングされるレトロウイルスベクターを提供する。細胞又は組織特異的な調節配列（例えばプロモーター）を特定の細胞集団での遺伝子配列の発現をターゲティングするために用いることができる。本開示に好適な哺乳類及びウイルスのプロモーターは本明細書の別の箇所で述べる。したがって、一実施形態では、本開示はレトロウイルスゲノムの5'末端に組織特異的なプロモーターエレメントを有するレトロウイルスを提供する。典型的に、例えば、新生細胞にとっての細胞又は組織特異的なプロモーター及びエンハンサー（例えば腫瘍細胞特異的なエンハンサー及びプロモーター）並びに誘導性のプロモーター（例えばテトラサイクリン）をはじめとする組織特異的な調節要素/配列は、レトロウイルスゲノムのLTRのU3領域に存在する。

【0083】

幾つかの場合では、発現を調節することが望ましいものであり得る。例えば、活性の強さが異なる様々なウイルスプロモーターが、望まれる発現のレベルによって利用され得る。哺乳類細胞では、CMV最初期プロモーターが、強い転写活性を提供するためにしばしば用いられる。あまり強力でないCMVプロモーターの改変版も、導入遺伝子の低減されたレベルの発現が望ましい場合には、用いられている。造血細胞における導入遺伝子の発現が望ましい場合、MTV又はMMTV由来のLTR等のレトロウイルスプロモーターが用いられ得る。用いられ得る他のウイルスプロモーターとして、SV40、RSV LTR、HIV-1及びHIV-2 LTR、アデノウイルスプロモーター（例えばE1A、E2A、又はMLP領域由来）、AAV LTR、カリフラワーマイクウイルス、HSV-TK、及びトリ肉腫ウイルスが挙げられる。

【0084】

同様に、標的ではない組織への潜在的な毒性又は望ましくない効果を抑制するために、組織特異的又は選択的なプロモーターが、特定の組織又は細胞での転写をもたらすために用いられ得る。例えば、PSA、プロバシン、前立腺酸性フォスファターゼ又は前立腺特異的腺性カリクレイン（hK2）等のプロモーターが前立腺での遺伝子発現をターゲティングするために用いられ得る。乳組織での発現のために乳清アクセサリタンパク質（Whey accessory protein（WAP））が用いられ得る（Andresら、PNAS 84:1299-1303, 1987）。用いられ得る他のプロモーター/調節ドメインは、表3に記載される。

【0085】

10

20

30

40

50

「組織特異的調節要素」は、他の組織タイプではほぼ「沈黙」を保つ一方で、一つの組織で遺伝子の転写を駆動することができる調節要素（例えばプロモーター）である。しかしながら、組織特異的なプロモーターが、それらが沈黙している組織において、検出可能な量の「背景」又は「基礎」の活性を有し得る点は理解されるだろう。プロモーターが標的組織において選択的に活性化される程度は選択比（標的組織での活性/対照組織での活性）として表すことができる。この点において、本開示の実施に有用な組織特異的プロモーターは、典型的に約5より大きい選択比を有する。好適には、選択比は約15より大きい。

【0086】

幾つかの指示においては、本開示の組換え複製コンピテントレトロウイルス（RRCR）の投与の特定の時間後に転写を活性化することが望ましいものであり得る。これはホルモン又はサイトカインにより調節可能なプロモーターによりなされ得る。例えば、特定のステロイドが生産されまたは送られてくる性腺組織が指標となる治療の適用においては、アンドロゲン又はエストロゲンに調節されるプロモーターの使用が有利であり得る。ホルモンにより調節可能なかかるプロモーターとしては、MMTV、MT-1、エクジソン及びルビスコが挙げられる。胸腺、下垂体及び副腎ホルモンの反応性のあるもの等の、他のホルモン調節性プロモーターが用いられ得る。用いられ得るサイトカイン及び炎症性タンパク質応答性のプロモーターとして、K及びTキニノーゲン（Kageyamaら、1987）、c-fos、TNF- α 、C反応性タンパク質（Arconeら、1988）、ハプトグロビン（Olivieroら、1987）、血清アミロイドA2、C/EBP α 、IL-1、IL-6（Poli及びCortese、1989）、補体C3（Wilsonら、1990）、IL-8、 α 1酸性糖タンパク質（Prowse及びBaumann、1988）、 α 1アンチトリプシン、リボタンパク質リパーゼ（Zechnerら、1988）、アンジオテンシノーゲン（Ronら、1990）、フィブリノーゲン、c-jun（ホルボールエステル、TNF- α 、UV照射、レチノイン酸及び過酸化水素によって誘導可能）、コラゲナーゼ（ホルボールエステル及びレチノイン酸により誘導される）、メタロチオネイン（重金属及びグルココルチコイドにより誘導される）、ストロメライン（ホルボールエステル、インターロイキン1及びEGFにより誘導される）、 α 2マクログロブリン及びアンチキモトリプシンが挙げられる。オステオカルシン、低酸素応答性領域（hypoxia-responsive element（HRE））、MAGE-4、CEA、フェトプロテイン、GRP78/BiP及びチロシナーゼ等の腫瘍特異的プロモーターもまた、腫瘍細胞での遺伝子発現を調節するために用いられ得る。

【0087】

さらに、このプロモーターの一覧表は網羅的又は限定的であると解釈されるべきではなく、当業者は本明細書で開示したプロモーター及び方法と併せて用いることができる他のプロモーターを知っているだろう。

10

20

30

【表 3】

表3 組織特異的プロモーター

組織	プロモーター
膵臓	インスリンエラスチン アミラーゼ pdr-1 pdx-1 グルコキナーゼ
肝臓	アルブミン PEPCK HBV エンハンサー αフェトプロテイン アポリポタンパク質C α1 アンチトリプシン ビテロゲニン NF-AB トランスサイレチン
骨格筋	ミオシンH鎖 筋クレアチンキナーゼ ジストロフィン カルパインp94 骨格のαアクチン 速筋トロポニン1
皮膚	ケラチンK6 ケラチンK1
肺	CFTR ヒトサイトケラチン18 (K18) 肺サーファクタントタンパク質 A, B 及び C CC-10 P1
平滑筋	sm22 α SM-アルファ-アクチン
内皮	エンドセリン-1 E-セレクトリン フォンウィルブランド因子TIE (Korhonenら、1995) KDR/flk-1 メラニン細胞チロシナーゼ
脂肪組織	リポタンパク質リパーゼ(Zechnerら、1988) アディプシン(Spiegelmanら、1989) アセチル-CoA カルボキシラーゼ(Pape and Kim, 1989) グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ(Daniら、1989) 脂肪細胞P2 (Huntら、1986)
胸	乳清酸性タンパク質(WAP)(Andresら、PNAS 84:1299-1303 1987)
血液	β-グロビン

10

20

【0088】

さらに、幾つかのプロモーターが、活性において一つの組織タイプに制限されない一方で、にもかかわらず一つの組織グループでは活性であり得、他のグループではあまり活性でないか沈黙しているという選択性を示すことは理解されるだろう。そのようなプロモーターもまた、「組織特異的」という用語が用いられ、本開示の使用のために熟慮される。例えば、様々な中枢神経系(CNS)のニューロンにおいて活性なプロモーターは、脳の多くの異なった領域のいずれかに影響を及ぼし得る脳卒中によるダメージを保護するのに治療的に有用であり得る。したがって、本開示で用いられる組織特異的な調節エレメントは、本レトロウイルスベクターのターゲティングポリヌクレオチド配列として適用性があるだけでなく、異種のタンパク質の調節にも適用性がある。

30

【0089】

さらに別の実施形態では、本開示は、組換えレトロウイルス由来構築物を含むプラスミドを提供する。本プラスミドは、NIH 3T3又は他の組織培養細胞等の標的細胞又は細胞培養物中に直接導入され得る。得られる細胞は、培養培地にレトロウイルスベクターを放出する。

40

【0090】

上記、及び以下の実施例を考慮して、本開示は、一実施形態では、最適化IRESカセットを含む組換え複製コンピテントレトロウイルス(RCR)を提供する。一実施形態では、レトロウイルスポリヌクレオチド配列は、マウス白血病ウイルス(MLV)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、ネコ白血病ウイルス(FeLV)、ヒヒ内在性レトロウイルス(BEV)、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)、ネコ由来レトロウイルスRD114、リスザルレトロウイルス、異種指向性マウス白血病関連ウイルス(XMRV)、トリ細網内皮症ウイルス(REV)、又はテナガザル白血病ウイルス(GALV)からなる群より選択されるウイルスに由来する。別の実施形態では、RCRは、レトロウイルスGAGタンパク質；レトロウイルスPOLタンパク質；レトロウイルスエンベロープ(キメラ、狭宿主性、及び広宿主性であり得る)；レ

50

トロウイルスポリヌクレオチド配列の3'末端に長末端反復 (LTR)、gag、pol及びenv遺伝子、並びに最適化IRESカセット (及び/又は任意に追加の要素、例えばコアプロモーター、miRNA等の阻害核酸)、及びレトロウイルスポリヌクレオチドの5'末端のLTR中にプロモーターを含むレトロウイルスポリヌクレオチド、を含む。一実施形態では、3'LTRは、配列番号19、22又は42の約ヌクレオチド9405から約9988に記載の配列と少なくとも98%同一である配列を含む。他の実施形態では、レトロウイルスポリヌクレオチドの5'末端のプロモーター配列は、哺乳動物細胞における発現に適している。上記のいずれかの他の実施形態では、プロモーター、gag、pol及びenvドメインは、配列番号19、22又は42の約1から約8323の配列と少なくとも98%同一である配列を含み、ここでレトロウイルスポリヌクレオチドは、配列番号21のベクターと比較して3'LTRからMLV配列下流の70塩基対を欠く。上記のいずれかのさらに他の実施形態では、カセットは、配列番号19、22又は42の約8327から8875の配列と少なくとも98%同一である配列を含み、J-K分岐領域のA-バルジに6個のAからなる最適化内部リボソーム侵入部位 (IRES) を含む。さらなる実施形態では、最適化IRESは異種ポリヌクレオチドに機能可能に連結され、ここでカセットは3'LTRの5'側及びレトロウイルスエンベロープをコードするenv核酸ドメインの3'側に位置し、配列番号21のベクター (pACE-CD) と比べてカセットのいずれかの側の短い反復を欠く。上記のいずれかのさらに他の実施形態では、ベクターは標的細胞における逆転写、パッケージング及び組み込みのために必要なシス作用性配列を含む。また他の実施形態では、RCRは配列番号21を含むベクター (pACE) と比較して、6回の継代後に高い複製能を維持し、ここで異種ポリヌクレオチドが発現され、pAC3-yCD2 (配列番号22) ベクターと比較して、少なくとも20%、30%、40%、又は50%以上発現される異種ポリペプチドを生産する。他の実施形態では、RCRは標的細胞に複数回感染し、5以上の平均コピー数/二倍体ゲノムをもたらす。他の実施形態では、レトロウイルスエンベロープは、広宿主性MLVエンベロープである。一実施形態では、プロモーターは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列のヌクレオチド1から約ヌクレオチド582を有するCMVプロモーターを含み、転写を誘導し開始させることができる、一以上の核酸塩基の改変を含み得る。他の実施形態では、プロモーターは、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドを含む。またさらなる実施形態では、CMV-R-U5ドメインは、MLV R-U5領域に連結したヒトサイトメガロウイルス由来の最初期プロモーターを含む。また更なる実施形態では、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド1から約ヌクレオチド1202、又は配列番号19、20、22又は42に記載の配列と少なくとも99%同一である配列を含み、かつ前記ポリヌクレオチドが、それに対して機能可能に連結した核酸分子の転写を促す。他の実施形態では、gag核酸ドメインは、配列番号19、20、22又は42の約ヌクレオチド数1203から約ヌクレオチド2819、又はそれに対して少なくとも99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む。他の実施形態では、ポリヌクレオチドのpolドメインは、ガンマレトロウイルスに由来する。さらなる実施形態では、polドメインは、配列番号19、22又は42の約ヌクレオチド数2820から約ヌクレオチド6358、又はそれに対して少なくとも99%又は99.9%の同一性を有する配列を含む。さらに他の実施形態では、envドメインは、配列番号19、22又は42の約ヌクレオチド数6359から約ヌクレオチド8323、又はそれに対して少なくとも99%又は99.8%の同一性を有する配列を含む。さらに他の実施形態では、IRESは、配列番号41に記載の配列からなる。さらに他の実施形態では、異種核酸は、配列番号3、5、11、13、15又は17に記載の配列を有するポリヌクレオチドを含む。他の実施形態では、異種核酸は、配列番号4に記載の配列を含むポリペプチドをコードする。さらなる実施形態では、異種核酸は、ヒトコドン最適化されており、配列番号4に記載のポリペプチドをコードする。さらに他の実施形態では、異種核酸は、配列番号19、22、又は42の約ヌクレオチド数8877から約9353に記載の配列を含む。他の実施形態では、3'LTRは、U3-R-U5ドメインを含む。またさらなる実施形態では、3'LTRは、配列番号19、22又は42の約ヌクレオチド9405から約9988に記載の配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%又は99.5%同一である配列を含む。一実施形態では、本開示は、配列番号42を含むレトロウイルスポリヌクレオチドを提供する。他の実施形態では、配列番号42のレトロウイルスポリヌクレオチドは、TがUに置換されるRNA配列であ

10

20

30

40

50

る。TがUである配列番号42に記載のレトロウイルスRNAポリヌクレオチドは、ウイルスカプシドに封入される。上記のいずれかのさらに他の実施形態では、レトロウイルスポリヌクレオチドは、さらに標的細胞に送達され得るmiRNA、siRNA又はshRNA配列を含み得る。miRNA、siRNA又はshRNAは、polyIIIプロモーターに機能可能に連結され得る。miRNAは、最適化IRESカセットの上流又は下流に位置し得る。他の実施形態では、異種ポリヌクレオチドは、任意の数のコード配列、例えばサイトカイン、免疫賦活化剤、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、受容体、抗体、及び断片等であり得る。

【0091】

本開示は、本明細書に記載のレトロウイルスを被験者に接触させることを含む、細胞増殖性障害を治療する方法もまた提供する。一実施形態では、最適化IRESに連結された異種ポリヌクレオチドがシトシンデアミナーゼ活性を含む条件で、最適化IRESを含むレトロウイルス、及び5-フルオロシトシンを被験者に接触させることを含む。一実施形態では、レトロウイルスは細胞に感染し、配列番号42を含むポリヌクレオチドの組み込みをもたらす。他の実施形態では、細胞増殖性障害は、多形神経膠芽腫である。他の実施形態では、細胞増殖性障害は、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、脳癌、頭頸部癌、膵癌、黒色腫、胃癌及び卵巣癌からなる群より選択される。本方法は、治療される被験者をレトロウイルスと接触させ、さらに抗癌剤又は化学療法剤と接触させる併用療法を含む。例えば、抗癌剤又は化学療法剤は、ベバシズマブ (bevacizumab)、ペガブタニブ (pegaptanib)、ラニビズマブ (ranibizumab)、ソラフェニブ (sorafenib)、スニチニブ (sunitinib)、AE-941、VEGF Trap、パゾパニブ (pazopanib)、バンデタニブ (vandetanib)、パタラニブ (vatalanib)、セジラニブ (cediranib)、フェンレチニド (fenretinide)、スクアラミン (squalamine)、INGN-241、経口テトラチオモリブデート (oral tetrathiomolybdate)、テトラチオモリブデート (tetrathiomolybdate)、パンゼムNCD (Panzem NCD)、2-メトキシエストラジオール (2-methoxyestradiol)、AEE-788、AG-013958、ベバシラニブナトリウム (bevasiranib sodium)、AMG-706、アキシチニブ (axitinib)、BIBF-1120、CDP-791、CP-547632、PI-88、SU-14813、SU-6668、XL-647、XL-999、IMC-1121B、ABT-869、BAY-57-9352、BAY-73-4506、BMS-582664、CEP-7055、CHIR-265、CT-322、CX-3542、E-7080、ENMD-1198、OSI-930、PTC-299、Sirna-027、TKI-258、ベグリリン (Veglin)、XL-184、及びZK-304709からなる群より選択され得る。

【0092】

上記のいずれかの他の実施形態では、レトロウイルスは、約 $10^3 \sim 10^7$ TU/脳重量gで投与される。他の実施形態では、レトロウイルスは、約 $10^4 \sim 10^6$ TU/脳重量gで投与される。

【0093】

本開示は5'から3'にかけて：転写を開始するために有用なプロモーター又は調節領域；psiパッケージングシグナル；gagをコードする核酸配列、polをコードする核酸配列；envをコードする核酸配列；A-バルジに6A'sを含む内部リボソーム侵入部位核酸配列；マーカー、治療又は診断ポリペプチドをコードする異種のポリヌクレオチド；並びにLTR核酸配列を含むポリヌクレオチド構築物を提供する。本明細書の別の箇所及び以下に記載するように、本開示のポリヌクレオチド構築物の様々な部分（例えば、組換え複製コンピテントレトロウイルスのポリヌクレオチド）は、所望の宿主細胞、発現のタイミング又は量、及び異種のポリヌクレオチドに部分的に依存して設計される。本開示の複製コンピテントレトロウイルス構築物は、幾つかの領域に分割することができ、それらは当業者によって各々改変されうる。

【0094】

例えば、プロモーターは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列のヌクレオチド1から約ヌクレオチド582を有するCMVプロモーターを含み得、改変されたプロモーターが転写を誘導し開始させることができる限りにおいて、一以上の改変（例えば、2~5、5~10、10~20、20~30、30~50、又はそれ以上の核酸塩基）を含み得る。一実施形態では、プロ

モーター又は調節領域はCMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドを含む。CMV-R-U5ドメインは、MLVのR-U5領域にヒトサイトメガロウイルス由来の最初期のプロモーターを含む。一実施形態では、CMV-R-U5ドメインポリヌクレオチドは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド1から約ヌクレオチド1202、又は配列番号19、20、22又は42に記載の約ヌクレオチド1から約ヌクレオチド1202の配列と少なくとも95%同一である配列を含み、ここで該ポリヌクレオチドは、それに対して機能可能に連結した核酸分子の転写を促す。ポリヌクレオチドのgagドメインは、任意の数のレトロウイルスに由来し得るが、典型的には、オンコレトロウイルス、及びより具体的には哺乳動物のオンコレトロウイルスに由来する。一実施形態では、gagドメインは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド数1203から約ヌクレオチド2819までの配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%（最も近い10分の1の値まで四捨五入する）の同一性を有する配列を含む。ポリヌクレオチドのpolドメインは任意の数のレトロウイルスに由来し得るが、典型的には、オンコレトロウイルス、及びより具体的には哺乳動物のオンコレトロウイルスに由来する。一実施形態ではpolドメインは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列のヌクレオチド数約2820から約6358までの配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%若しくは99.9%（最も近い10分の1の値まで四捨五入する）の同一性を有する配列を含む。ポリヌクレオチドのenvドメインは任意の数のレトロウイルスに由来し得るが、典型的には、オンコレトロウイルスまたはガンマレトロウイルス、及びより具体的には哺乳動物のオンコレトロウイルスまたはガンマレトロウイルスに由来する。幾つかの実施形態ではenvをコードするドメインは広宿主性のenvドメインを含む。一実施形態では、envドメインは、配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド数6359から約ヌクレオチド8323までの配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%、99%又は99.8%（最も近い10分の1の値まで四捨五入する）の同一性を有する配列を含む。ポリヌクレオチドの最適化IRESドメインは、任意の数の内部リボソーム侵入部位から得られ得る。一実施形態では、最適化IRESは、脳筋炎ウイルスに由来する。一実施形態では、最適化IRESドメインは、配列番号41に記載の配列、又は該ドメインがリボソームの侵入を可能にし、A-バルジに6A'sを含む限りにおいて、それに対して少なくとも95%、98%、又は99%（最も近い10分の1の値まで四捨五入する）の同一性を有する配列を含む。異種ドメインは、本開示のシトシンデアミナーゼを含み得る。一実施形態では、CDポリヌクレオチドは、ヒトコドンに最適化された配列を含む。さらに別の実施形態では、CDポリヌクレオチドはシトシンデアミナーゼを有する変異体ポリペプチドをコードしており、ここで該変異体は、融点（T_m）を10上げる熱安定性の向上に寄与し、それにより広い温度範囲での力学的活性の維持及び蓄積されるタンパク質のレベルの増加が可能となる。別の実施形態では、本開示はヒトコドン最適化チミジンキナーゼを含む。異種ドメインの後に、ポリプリンリッチドメインが続き得る。3'LTRは、任意の数のレトロウイルス、典型的にはオンコレトロウイルス及び好適には哺乳類オンコレトロウイルスに由来し得る。一実施形態では、3'LTRは、U3-R-U5ドメインを含む。さらに別の実施形態では、LTRは配列番号19、20、22又は42に記載の配列の約ヌクレオチド9405から約ヌクレオチド9988までの配列、又はそれに対して少なくとも95%、98%、又は99.5%（最も近い10分の1の値まで四捨五入する）同一である配列を含む。

10

20

30

40

50

【0095】

本開示は、5'から3'にかけて、CMV-R-U5、MLVのR-U5領域への、ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期プロモーターの融合物；PBS、逆転写酵素のためのプライマー結合部位；5'スプライス部位；パッケージングシグナル；gag、MLVグループ特異的な抗原のためのORF；pol、MLVポリメラーゼポリタンパク質のORF；3'スプライス部位；4070A env、MLV 4070A株のエンベロープタンパク質のORF；A-バルジの6A'sからなる最適化IRES；改変シトシンデアミナーゼ（熱安定化及びコドン最適化）又はヒトコドン最適化チミジンキナーゼ；PPT、ポリプリントラクト；並びにU3-R-U5、MLV長末端反復を含む組換えレトロウイルスベクターもまた提供する。

【0096】

本開示は、発現のために最適化されたA-バルジを含む、配列番号42（又はTがUであり得

る配列番号42)に記載の配列を含むレトロウイルスベクターもまた提供する。一実施形態ではIRESの最適化A-パルジは6A'sからなる。

【0097】

レトロウイルスベクターは、多数の細胞増殖性疾患及び障害を含む広範囲の疾患及び障害を治療するために用いることができる(例えば、U.S. Pat. Nos. 4,405,712及び4,650,764; Friedmann, 1989, Science, 244:1275-1281; Mulligan, 1993, Science, 260:926-932, R. Crystal, 1995, Science 270:404-410、各々の全体を参照し、それら各々を本明細書に組み込む。また、The Development of Human Gene Therapy, Theodore Friedmann, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. ISBN 0-87969-528-5も参照し、その全体を参照により本明細書に組み込む)。

10

【0098】

本開示は、細胞増殖性障害の治療のための遺伝子療法もまた提供する。かかる療法は、適切な治療ポリヌクレオチド(例えば、アンチセンス、リボザイム、自殺遺伝子、siRNA)を増殖性障害を有する被験者の細胞に導入することによりその治療効果を達成する。ポリヌクレオチド構築物の送達本開示の組み換えレトロウイルスベクター、特にMLVに基づく場合、分裂細胞に感染可能なものを用いて達成されうる。

【0099】

さらに、本明細書に記載される治療法(例えば、遺伝子療法又は遺伝子送達方法)は、*in vivo*又は*ex vivo*で実施することができる。遺伝子療法に先立って、例えば外科的に又は放射線によって腫瘍の大部分が除去されていることが好ましいものであり得る。幾つかの態様では、レトロウイルス療法は外科的、化学的、又は放射線治療に先立って、又は続いてなされ得る。

20

【0100】

したがって、本開示は、非分裂細胞、分裂細胞、又は新生細胞に感染することができる複製レトロウイルスを提供し、ここで組換えレトロウイルスは、ウイルスGAG; ウイルスPOL; ウイルスENV; Aパルジの6A'sからなるIRESに機能可能に連結された異種核酸; 並びにパッケージング、逆転写、及び組み込みに必要なシス作用性配列を含む。組換えレトロウイルスはHIV等のレンチウイルスであり得、又はオンコウイルスであり得る。組換えレトロウイルスを生産する方法について上記した通り、本開示の組換えレトロウイルスは、さらにVPR、VIF、NEF、VPX、TAT、REV、及びVPUタンパク質の少なくとも一つを含み得る。特定の理論によって拘束されることを望むものではないが、一以上のこれらの遺伝子/タンパク質産物(例えば、NEF)が、生産される組換えレトロウイルスのウイルス力価を増加させるのに重要であるか、又はビリオンの感染及びパッケージングに必要であり得る。

30

【0101】

本開示は、特定の核酸(例えば、異種配列)の発現をもたらす標的細胞への核酸移行法もまた提供する。したがって、他の実施形態では、本開示は、本開示の組換えウイルスを標的細胞に感染させること、及び標的細胞において異種核酸を発現させることを含む、標的細胞における異種核酸の導入及び発現のための方法を提供する。上記の通り、標的細胞は、レトロウイルスによる感染が可能である限り、任意の細胞タイプ、例えば分裂、非分裂、新生、不死化、改変細胞、及び当業者に認識される他の細胞タイプであり得る。

40

【0102】

本開示の方法による核酸配列(例えば、異種核酸配列)の導入によって、細胞における遺伝子の発現が改変されることが望ましいものであり得、ここで核酸配列は、例えばアンチセンス又はリボザイム分子を生じる。用語「改変」は、遺伝子が過剰発現される場合の遺伝子の発現の抑制、又は遺伝子が低発現である場合の発現の増強を意図する。細胞増殖性障害が遺伝子の発現に関連する場合、翻訳レベルで遺伝子の発現に干渉する核酸配列が用いられ得る。このアプローチは、例えばアンチセンス核酸、リボザイム、又はアンチセンス核酸若しくはトリプレックス剤(triplex agent)を利用し、アンチセンス核酸又はトリプレックス剤によってmRNAをマスキングすること、又はリボザイムによってそれを切断することのいずれかによって、特定のmRNAの転写又は翻訳を阻害する。

50

【0103】

生物学的応答修飾物質（例えば、サイトカイン）をコードする核酸を細胞又は被験者に移行させることが望ましいものであり得る。このカテゴリーに含まれるのは、免疫賦活剤、例えば「インターロイキン」として分類される多数のサイトカインをコードする核酸である。これらには、例えば、インターロイキン1~15、並びに本明細書の他の箇所で記載した他の応答修飾物質及び因子が含まれる。また、このカテゴリーに含まれるのは、必ずしも同じメカニズムによって作用するわけではないが、インターフェロン、及び特にガンインターフェロン、腫瘍壊死因子（TNF）及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）である。他のポリペプチドとして、例えば、血管新生因子及び抗血管新生因子が挙げられる。酵素欠陥又は免疫欠陥を治療するために、骨髄細胞又はマクロファージにかかる核酸を送達することが望ましいものであり得る。成長因子、毒素ペプチド、リガンド、受容体、又は他の生理学的に重要なタンパク質をコードする核酸もまた、特定の標的細胞に導入され得る。

10

【0104】

本開示は、薬剤特異的ターゲティング及び効果を促す異種ポリヌクレオチドの送達にも用いられ得る。例えば、EGF受容体ファミリーのメンバーであるHER2は、薬剤であるトラストズマブ（trastuzumab）（ハーセプチンTM、Genentech）の結合の標的である。トラストズマブは抗体依存性細胞傷害（ADCC）のメディエーターである。活性は、1+及び非発現細胞よりも、免疫組織化学によって2+及び3+のレベルの過剰発現を有するHER2発現細胞を、優先的に標的とする（Herceptin処方情報、Crommelin 2002）。HER2又はトランケートされたHER2を発現する（細胞外及び膜貫通ドメインのみを発現する）ベクターの導入によって、低HER2の腫瘍においてHER2の発現を増加させることによって、ADCCの最適なトリガリング（triggering）を促すことができ、臨床使用において観察されるHerceptinに対して急速に生じる耐性を克服し得る。

20

【0105】

（配列番号19の約8877~9353を含む）yCD2のHER2の細胞内ドメインへの置換は、HER2の細胞表面発現及びyCD2の細胞基質での局在を可能とする。HER2細胞外ドメイン（ECD）及び膜貫通ドメイン（TM）（配列番号23の約2026bpから約175位の2200まで）は、PCRによって増幅され得る（Yamamoto et al., Nature 319:230-234, 1986; Chen et al., Canc. Res., 58:1965-1971, 1998）か、又は化学的に合成され得（BioBasic Inc., Markham, Ontario, Canada）、配列番号19のpAC3-yCD2ベクターのIRES及びyCD2遺伝子の間（例えば、配列番号19の約ヌクレオチド8876及び8877の間）に挿入され得る。あるいは、yCD2遺伝子は切り取られ、HER2ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドに置換され得る。ECD及びTMドメインのHerceptin結合ドメインIVしか有さない、さらにトランケートされたHER2（位置1910から2200までの約290bp）が、上記の通り増幅又は化学的に構成され、用いられ得る（Landgraf 2007; Garrett et al., J. of Immunol., 178:7120-7131, 2007）。ドメインIV及びTMに融合させたネイティブなシグナルペプチド（位置175~237から約69 bp）によるこのトランケート型のさらなる修飾は、化学的に合成され、上記の通り用いられ得る。得られるウイルスは、被験者において細胞増殖性障害を治療するために、トラストズマブ又はトラストズマブ及び5-FCと組み合わせて用いられ得る。

30

40

【0106】

あるいは、HER2及び上記の修飾は、異なるENV遺伝子又は他の適切な表面タンパク質を含む別々のベクターにおいて発現され得る。このベクターは、複製コンピテント（Logg et al. J. Mol Biol. 369:1214 2007）又はエンベロープ及び目的の遺伝子をコードする非複製「第一世代」レトロウイルスベクターであり得る（Emi et al. J. Virol 65:1202 1991）。後者の場合、既存のウイルスの感染が、相補的なgag及びpolをもたらし、任意の先に感染させた細胞からの「非複製」ベクターの複製感染を可能とするであろう。代替のENV及び糖タンパク質として、ヒト細胞に感染できる異種指向性（xenotropic）及び多種指向性（polytropic）のENV及び糖タンパク質、例えばMLVのNZB株由来のENV配列、並びにMCF、VSV、GALV及び他のウイルス由来の糖タンパク質が挙げられる（Palu 2000, Baum et

50

al., Mol. Therapy, 13(6):1050-1063, 2006)。例えば、ポリヌクレオチドは配列を含み得、ここで配列番号19のGAG及びPOL及びyCD2遺伝子が欠失し、NZB MLV又はVSV-gの異種指向性のENVドメインに相当するENV、及びIRES又はRSV等のプロモーターがHER2、HER2 ECDTM、HER2 ECDIVTM、又はHER2 SECDIVTMに機能可能に連結している。

【0107】

VSVGで偽型化したウイルス及び広宿主性レトロウイルスによる細胞の混合感染は、他方のエンベロープタンパク質によってキャプシド形成された一方のウイルスのゲノムを有する後代ビリオンの生産をもたらす。レトロウイルス粒子を偽型化した他のエンベロープについても、同じことが真である。例えば、上記のレトロウイルスによる感染は、感染細胞においてyCD2及びHER2（又は変異体）をコードし得る後代ビリオンの生産をもたらす。得られるウイルスは、トラスツズマブ又はトラスズマブ及び5-FCと組み合わせて、被験者における細胞増殖性障害を治療するために用いられ得る。

10

【0108】

トラスツズマブに対する耐性の発達の他の側面は、トラスツズマブの活性に必要な細胞内シグナリングの干渉に関する。耐性細胞は、PTENの欠失及びp27kip1の低発現を示す（Fujita, Brit J. Cancer, 94:247, 2006; Lu et al., Journal of the National Cancer Institute, 93(24): 1852-1857, 2001; Kute et al., Cytometry Part A 57A:86-93, 2004）。例えば、PTENをコードするポリヌクレオチドは、組換え的に生成され、又は化学的に合成され（BioBasic Inc., Markham, Canada）、配列番号19又は22のpAC3-yCD2ベクターにおいてyCD2ポリヌクレオチドの直後に、又は上記のリンカー配列と共に、又はyCD2の置換として機能可能に挿入され得る。さらなる例において、PTENコードポリヌクレオチド（配列番号25）は、上記の通り合成され、IRES及びyCD2配列の間に、又はリンカーと共に、上記の通り挿入され得る。

20

【0109】

あるいは、PTENは、異なるENV遺伝子又は他の適切な表面タンパク質を含む別々のベクターにおいて発現され得る。このベクターは、複製コンピテント（Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007）又はエンベロープ及び目的の遺伝子をコードする非複製「第一世代」レトロウイルスベクターであり得る（Emi et al. J.Virology 65:1202 1991）。後者の場合、既存のウイルスの感染が、相補的なgag及びpolをもたらす、任意の先に感染させた細胞からの「非複製」ベクターの複製感染を可能とするであろう。代替りのENV及び糖タンパク質として、ヒト細胞に感染できる異種指向性（xenotropic）及び多種指向性（polytropic）のENV及び糖タンパク質、例えばMLVのNZB株由来のENV配列、並びにMCF、VSV、GALV及び他のウイルス由来の糖タンパク質が挙げられる（Palu 2000, Baum et al., Mol. Therapy, 13(6):1050-1063, 2006）。例えば、ポリヌクレオチドは配列を含み得、ここで配列番号19のGAG及びPOL及びyCD2遺伝子が欠失し、NZB MLV又はVSV-gの異種指向性のENVドメインに相当するENV、及びIRES又はRSV等のプロモーターがPTENに機能可能に連結している。

30

【0110】

VSVGで偽型化したウイルス及び広宿主性レトロウイルスによる細胞の混合感染は、他方のエンベロープタンパク質によってキャプシド形成された一方のウイルスのゲノムを有する後代ビリオンの生産をもたらす（Emi 1991）。レトロウイルス粒子を偽型化した他のエンベロープについても、同じことが真である。例えば、上記のレトロウイルスによる感染は、感染細胞においてyCD2及びPTEN（又は変異体）又はPTEN単独をコードし得る後代ビリオンの生産をもたらす。得られるウイルスは、トラスツズマブ又はトラスツズマブ及び5-FCと組み合わせて、被験者における細胞増殖性障害を治療するために用いられ得る。

40

【0111】

同様に、p27kip1（配列番号27及び28）をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成され（BioBasic Inc., Markham, Canada）、配列番号19又は配列番号42のpAC3-yCD2ベクターにおけるyCD2遺伝子の直後又はリンカー配列と共に機能可能に挿入され得る。さらなる例において、p27kip1コードポリヌクレオチドは上記の通り合成され、Aバルジの6A's

50

からなるIRES及びyCD2配列の間に、又は上記の通りリンカーと共に、又はyCD2遺伝子の代わりに挿入される。

【0112】

あるいは、p27kip1は、異なるENV遺伝子又は他の適切な表面タンパク質を含む別々のベクターにおいて発現され得る。このベクターは、複製コンピテント (Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007) 又はエンベロープ及び目的の遺伝子をコードする非複製「第一世代」レトロウイルスベクターであり得る (Emi et al. J.Virol 65:1202 1991)。後者の場合、既存のウイルスの感染が、相補的なgag及びpolをもたらし、任意の先に感染させた細胞からの「非複製」ベクターの複製感染を可能とするであろう。代替りのENV及び糖タンパク質として、ヒト細胞に感染できる異種指向性 (xenotropic) 及び多種指向性 (polytropic) のENV及び糖タンパク質、例えばMLVのNZB株由来のENV配列、並びにMCF、VSV、GALV及び他のウイルス由来の糖タンパク質が挙げられる (Palu 2000, Baum et al、上掲)。例えば、ポリヌクレオチドは配列を含み得、ここで配列番号19のGAG及びPOL及びyCD2遺伝子が欠失し、NZB MLV又はVSV-gの異種指向性のENVドメインに相当するENV、及びAバルジの6A'sからなるIRES、又はRSV等のプロモーターがp27kip1に機能可能に直接的に連結している。

10

【0113】

VSVGで偽型化したウイルス及び広宿主性レトロウイルスによる細胞の混合感染は、他方のエンベロープタンパク質によってキャプシド形成された一方のウイルスのゲノムを有する後代ビリオンの生産をもたらす (Emi 1991)。レトロウイルス粒子を偽型化した他のエンベロープについても、同じことが真である。例えば、配列番号19、22及び42のいずれにも由来する上記のレトロウイルスによる感染は、感染細胞においてyCD2及びp27kip1 (又は変異体) をコードし得る後代ビリオンの生産をもたらす。得られるウイルスは、トラスズマブ又はトラスズマブ及び5-FCと組み合わせて、被験者における細胞増殖性障害を治療するために用いられ得る。

20

【0114】

他の例では、CD20が薬剤であるリツキシマブ (rituximab) (リツキサン (RituxanTM)、Genetech) の結合の標的である。リツキシマブは、補体依存性細胞傷害 (CDC) 及びADCのメディエーターである。フローサイトメトリーによって高い平均蛍光強度を有する細胞は、リツキシマブに対して高められた感受性を示す (van Meerten et al., Clin Cancer Res 2006; 12(13):4027-4035, 2006)。CD20の低いB細胞における、CD20を発現するベクターの導入によるCD20の発現の向上は、ADCCの最適なトリガリングを促し得る。

30

【0115】

例えば、CD20をコードするポリヌクレオチド (配列番号29及び30) は、化学的に合成され (BioBasic Inc., Markham, Canada)、配列番号19、22又は42のpAC3-yCD2(-2)ベクターにおけるyCD2遺伝子の直後に上記の通りリンカー配列と共に、又はyCD2遺伝子の代わりとして機能可能に挿入され得る。さらなる例において、CD20コードポリヌクレオチドは上記の通り合成され、Aバルジの6A'sからなるIRES及びyCD2配列の間に、又は上記の通りリンカーと共に挿入される。さらなる代替例として、CD20配列は、Psi1及びNot1消化によるCD遺伝子の切除の後にpAC3-yCD2ベクターに挿入され得る。

40

【0116】

また更なる例において、CD20 (配列番号29及び30) をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成され (BioBasic Inc., Markham, Canada)、非広宿主性ENV遺伝子又は他の適切な表面タンパク質 (Tedder et al., PNAS, 85:208-212, 1988) を含むベクターに挿入され得る。代替りのENV及び糖タンパク質として、ヒト細胞に感染できる異種指向性 (xenotropic) 及び多種指向性 (polytropic) のENV及び糖タンパク質、例えばMLVのNZB株由来のENV配列、並びにMCF、VSV、GALV及び他のウイルス由来の糖タンパク質が挙げられる (Palu 2000, Baum 2006)。例えば、ポリヌクレオチドは配列を含み得、ここで配列番号19のGAG及びPOL及びyCD2遺伝子が欠失し、NZB MLV又はVSV-gの異種指向性のENVドメインに相当するENV、及びAバルジの6A'sからなるIRES、又はRSV等のプロモーターがCD20に機

50

能可能に直接的に連結している。

【0117】

VSVGで偽型化したウイルス及び広宿主性レトロウイルスによる細胞の混合感染は、他方のエンベロープタンパク質によってキャプシド形成された一方のウイルスのゲノムを有する後代ビリオンの生産をもたらす(Emi 1991)。レトロウイルス粒子を偽型化した他のエンベロープについても、同じことが真である。例えば、配列番号19、22又は42にも由来する上記のレトロウイルスによる感染は、感染細胞においてyCD2及びCD20をコードし得る後代ビリオンの生産をもたらす。得られるウイルスは、リツキサン及び/又は5-FCと組み合わせ、被験者における細胞増殖性障害を治療するために用いられ得る。同様に、CD20マーカーのみをコードするベクターによる腫瘍の感染は、腫瘍をリツキサンの使用によって治療可能なものにし得る。

10

【0118】

ピリミジン同化に関わる酵素及び補助因子は限定的であり得る。OPRT、チミジンキナーゼ(TK)、ウリジンモノホスフェートキナーゼ、及びピリミジヌクレオシドホスホリラーゼ発現は、感受性株に比べて5-FU耐性癌細胞において低い(Wang et al., Cancer Res., 64:8167-8176, 2004)。多くの集団分析が、酵素のレベルと疾患の結果の相関を示している(Fukui et al., Int'l. J. Of Mol. Med., 22:709-716, 2008)。CD及び他のピリミジン同化酵素(PAE)の共発現は、活性、したがってフルオロピリミジン薬剤の治療係数を増加させるために利用され得る。

20

【0119】

本開示は、本開示のRCRベクターを投与することに続いて、化学療法剤又は抗癌剤による治療することを含む、癌及び新生物等の細胞増殖性障害を治療するための方法を提供する。一態様では、化学療法又は抗癌剤の投与の前に、RCRの感染及び複製を可能とする期間、RCRベクターが被験者に投与される。被験者はその後、増殖を抑制し、又は癌細胞を殺す投与量及び期間、化学療法剤又は抗癌剤で処置される。一態様において、化学療法又は抗癌剤による治療が癌/腫瘍を縮小させるが、殺すことはできない場合(例えば部分的な寛解又は一時的な寛解)、被験者はその後RCR由来の細胞毒性遺伝子(例えばシトシンデアミナーゼ)を発現する細胞で毒性の治療薬に変換される、非毒性の治療薬(例えば5-FC)で処置され得る。

30

【0120】

かかる方法を使用して、本開示のRCRベクターは、腫瘍細胞の複製過程の間に拡散し、その後かかる細胞は抗癌又は化学療法剤による処置によって殺傷され、さらなる殺傷が、本明細書に記載のRCR処置過程を用いて生じ得る。

【0121】

本開示のまた他の実施形態では、異種遺伝子は、標的抗原のためのコード配列を含み得る(例えば、癌抗原)。この実施形態では、細胞増殖性障害を含む細胞を、標的抗原の発現(例えば、癌抗原の過剰発現)をもたらす、標的抗原をコードする異種ポリヌクレオチドを含むRCRに感染させる。その後、標的抗原と特異的に相互作用する、ターゲティングコグネート部分を含む抗癌剤が、被験者に投与される。ターゲティングコグネート部分は、細胞傷害性薬剤と機能可能に連結され得るか、又はそれ自身が抗癌剤であり得る。したがって、標的抗原コード配列を含むRCRに感染させた癌細胞は、癌細胞における標的の発現が増加し、それによって細胞傷害性ターゲティングの増加した効率/効果がもたらされる。

40

【0122】

さらに他の実施形態では、本開示のRCRは、コグネート抗原又はリガンドと特異的に相互作用する結合ドメイン(例えば、抗体、抗体断片、抗体ドメイン又は受容体リガンド)を含むコード配列を含み得る。結合ドメインのコード配列を含むRCRは、癌又は新生細胞等の細胞増殖性障害を含む被験者における細胞に感染させるために用いられ得る。その後、感染した細胞は結合ドメイン又は抗体を発現するだろう。その後、細胞傷害性薬剤と機能可能に連結した、又はそれ自身が細胞傷害性である抗原又はコグネートが、被験者に投

50

与され得る。その後、細胞傷害性コグネートは、選択的に結合ドメインを発現する感染した細胞を殺傷するだろう。あるいは、結合ドメインそれ自身が抗癌剤であり得る。

【0123】

本明細書で用いられる用語「抗体」は、少なくとも一つの免疫グロブリン可変ドメイン又は免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を指す。例えば、抗体は重(H)鎖可変領域(本明細書ではVHと省略される)、及び軽(L)鎖可変領域(本明細書ではVLと省略される)を含み得る。他の例では、抗体は二つの重(H)鎖可変領域及び二つの軽(L)鎖可変領域を含む。用語「抗体」は、抗体の抗原結合断片(例えば、一本鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂、Fd断片、Fv断片、及びdAb断片)、及び完全な抗体を包含する。

【0124】

本開示は、細胞増殖性障害を有する被験者の治療方法を提供する。被験者はいずれの哺乳類であってもよく、好ましくはヒトである。被験者は本開示の組み換え複製コンピテントレトロウイルスベクターに接触させられる。接触はin vivo又はex vivoであり得る。本発明のレトロウイルスベクターを投与する方法は当業者に知られており、例えば全身投与、局所投与、腹腔内投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、脳脊髄投与、並びに腫瘍又は細胞増殖性障害の部位への直接投与を含む。他の投与経路も本分野において知られている。

【0125】

したがって、本開示は、細胞増殖性障害を治療するために有用な様々な医薬組成物を含む。本開示に従う医薬組成物は、本開示に従って細胞増殖性障害を治療又は調節するために有用な異種のポリヌクレオチド配列を含むレトロウイルスベクターを、担体、賦形剤及び添加剤又は補助剤を用いて被験者への投与に適した形にすることによって、調製される。よく用いられる単体又は補助剤としては、炭酸マグネシウム、二酸化チタン、ラクトース、マンニトール及び他の糖、タルク、ミルクタンパク質、ゼラチン、デンプン、ビタミン、セルロース及びその誘導体、動物油及び植物油、ポリエチレングリコール及び無菌水、アルコール、グリセロール及び多価アルコール等の溶媒が挙げられる。静脈内の媒体として、流体及び栄養補充剤が挙げられる。保存剤として、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤及び不活性ガスが含まれる。他の薬学的に使用可能な担体として、例えば、その内容を参照により本明細書に組み込むRemington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed. Easton: Mack Publishing Co., 1405-1412, 1461-1487 (1975)及びThe National Formulary XIV., 14th ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975)に記載の、水溶液、非毒性賦形剤、例えば塩、保存剤、及び緩衝液等が挙げられる。医薬組成物の様々な成分のpH及び正確な濃度は、当分野における通常の技術にしたがって調整される。Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7th ed.)を参照のこと。

【0126】

例えば、限定されるものではないが、細胞増殖性障害の治療に有用なレトロウイルスベクターは広宿主性のENVタンパク質、GAG、及びPOLタンパク質、レトロウイルスゲノムのU3領域におけるプロモーター配列、並びに複製、パッケージング及びレトロウイルスゲノムの標的細胞への組み込みに必要な全てのシス作用性配列を含む。

【0127】

以下の実施例は本開示を説明することを意図しており、本開示を限定するものではない。かかる実施例は、用いられ得る典型的なものであって、当業者に知られる他の手順が代わりに利用され得る。

【実施例】

【0128】

yCD2の発現レベル、及びyCD2による5-FCから5-FUへの変換は、細胞をToca511(pAC3-yCD2、配列番号22)に完全に感染させた場合に、in vivo及びin vitroの両方において効率的であり、安定であることが示された。しかしながら、長期(約180日)のin vivoパイロット試験においては、幾つかの組織からの感染Balb/c統合プロウイルスは、J-K分岐ループにおいて、伸長した又は収縮したオリゴA配列を有することが示された。分子PCRクロニングによって分析された、生物局在研究の四匹のマウス由来の組織では、不均一な7個

10

20

30

40

50

のAから8個のA、9個のA、10個のA、11個のA、及び12個のAへの伸長、並びに7個のAから6個のAへの収縮が観察された。この観察、及び最初に記載されたECMV IRESの6個のAに対するpEMCFにおける7個のAは、Aバルジに様々な数のAを有するIRESによって媒介されるyCD2発現の影響、及び特にRRVの文脈におけるタンパク質翻訳への影響の研究を導いた。したがって、分岐領域のAバルジに特異的な一連の欠失及び挿入変異体を作成した。データは、AバルジのオリゴA配列の欠失も挿入もRRVの産生には影響しないこと、6個のAが最大のCD及び緑色蛍光タンパク質（GFP）発現をもたらすこと、及び6個のAからのAの数の小さな変化は中程度の効果を有すること、しかしながらより大きな変化は導入遺伝子からのmRNAのIRES媒介翻訳の効率に劇的な効果を有することを示している。

【0129】

10

J-K分岐領域のAバルジに様々な数のA'sを含むRRVの構築

J-K分岐領域のA-バルジに4、5、6、7、8、10又は12個のAを有し、EMCV IRESを含み、CD又はGFPをコードするRRVを作製した。RRV骨格（図1B）における同等のカセットの直接的置換のために、それぞれの構築物を、5'末端にMlu I、及び3'末端にPsi Iを有する全体のIRESカセットのDNA合成によってそれぞれ作製した。全てのDNA断片を、RRV骨格へのクローニングの前後に配列分析によって確認した。yCD2導入遺伝子を含むRRV構築物を、導入遺伝子の名前、及びそれに続くAバルジのA'sの数をを用いて命名した（例えば、yCD2-4Aは、yCD2導入遺伝子及びIRESのAバルジに4個のAを含む）。

【0130】

Aバルジに様々な数のA'sを含むRRVは、同様の力価をもたらす

20

ウイルスストックを、カルシウムリン酸沈殿法を用いて293T細胞の一過性トランスフェクションによって生産した。ウイルス上清を、トランスフェクションの42時間後に回収した。力価を決定するためのウイルス感染を行った。続いて、各ベクターのウイルス上清を用いてHT1080細胞に感染させ、RRV産生細胞を作製した。ナイーブU87-MG細胞に感染させる前に、得られたウイルスの力価を測定した。図1Cは、様々な数のAを含むRRVを感染させたHT1080細胞が、同様のレベルのウイルスを産生したことを示し、これは分岐ループにおけるAの数が、ウイルス複製に影響しないことを示唆している。

【0131】

J-K分岐領域に様々な数のA'sを含むRRVは、同等のレベルの転写産物を発現するが、異なるレベルのタンパク質を発現する

30

その後、HT1080細胞からのウイルス上清を、0.1の感染効率（MOI）でナイーブU87-MG細胞に感染させるために用いた。細胞が完全に感染した感染の10日後、細胞のウイルスRNAレベルを、定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）によって測定し、yCD2のタンパク質の発現レベルを、免疫プロットによって調べた（Perez et al., 2012）。細胞のウイルスRNA発現レベルを、それぞれenv領域（5' Env2: 5'-ACCCTCAACCTCCCCTACAAGT-3'、3' Env2: 5'-GTTAAGCGCCTGATAGGCTC-3'、プローブ: 5' FAM-AGCCACCCCCAGGAAGTGGAGA TAGA-3' BHQ）及びyCD2領域（5' yCD2: 5'-ATCATCATGTACGGCATCCCTAG-3'、3' yCD2: 5'-TGAA CTGCTTCATCA GCTTCTTAC-3'、プローブ: 5' FAM-TCATCGTCAACAACCAACCACTCGT-3' BHQ）に位置する二つの異なるプライマーセットを用いて測定した（図2A）。各ベクターからのRNAの相対レベルを、6個のAを含むベクターと比較して2-^(Ct)法を用いて計算した。細胞のウイルスRNAレベル比は0.8~1.1の範囲であり（図2B）、これはIRESの修飾によってウイルスRNA転写物に有意な差がないことを示している。ウェスタンブロットによるこれらのベクターのyCD2タンパク質発現レベルの試験では、5個及び7個のAを含むベクターのyCD2タンパク質の発現レベルは、yCD2-6Aベクターの発現レベルの69%及び77%であると特定された。対照的に、yCD2タンパク質発現の実質的な低下が、4、8、10及び12個のAを含むベクターにおいて観察された。これらのベクターのCDタンパク質発現レベルは、yCD2-6Aベクターの発現レベルの4~25%の範囲である（図2B）。同等の細胞のウイルスRNAレベルとyCD2タンパク質発現の劇的な低下は、IRESの分岐領域のオリゴAの長さが、転写後のレベルで遺伝子発現に大きな影響を有し得ることを示唆した。相対細胞内CD酵素活性もまた、5 FCを培養液に添加し、一時間後に5-FUを測定することによって測定し

40

50

た。活性の相違は、ウェスタンブロットのデータと同様に位置づけされたが、顕著ではなかった。これは、細胞ベースのアッセイの限界、及び利用されるアッセイにおいて酵素の K_m 未満である細胞内5-FCの低い利用可能性に起因し得る。したがって、ループのA'sの数の効果を、タンパク質発現アッセイが十分に定義された他の導入遺伝子で分析した。また、異なる導入遺伝子を用いることは、AバルジのA'sの数の変化を有するyCD2タンパク質発現の変化が、導入遺伝子特異的であるか否かを決定することを可能にするだろう。

【 0 1 3 2 】

GFPをコードするRRVの同等のセットを作製した。これらのベクターのウイルス力価もまた、もう一方と同等であり、このデータはyCD2導入遺伝子のデータと非常に類似することが認められた（図1C）。GFDP発現レベルを、フローサイトメトリーを用いて、GFP陽性細胞をゲーティングすることによって測定した。各ベクターの平均蛍光強度（MFI）を、細胞のウイルスRNAレベルに対して標準化し、GFP-6Aベクターに対して計算した。ベクターのこのセット由来の結果（図2C）は、yCD2ベクターにおいて観察されたもの（図2B）と一致し、6個のAを含むベクターが、ベクターの両方のセットにおいて、導入遺伝子からの最も高いレベルのタンパク質を発現する。さらに、検出方法の感受性のために、GFP発現レベルの顕著な差が認められ、10個のA及び12個のAを含むベクターによるGFP発現においては、それぞれ約96%及び99%の減少が示される。両方のセットのベクターにおいて、7個のAを有するRRVは、タンパク質発現において約30%の減少を示した。Hoffman et al.によって報告された発見と一致して、4個のA及び5個のAを有するRRVは、Hoffman et al.によって記載された、6個のAを有するRRVに比べて顕著に低減されたタンパク質翻訳効率を有する、868 4と同様の表現型をそれぞれ示した。

【 0 1 3 3 】

本開示は、J-K分岐領域のA-バルジの長さが、おそらく翻訳効率に対する効果を介して、IRESの下流の導入遺伝子の発現に影響を与えることを示す。これまでの発見は、AUG11付近の文脈、3' IRESに位置するポリピリミジントラクトとシストロンにおける最初のAUGの間の間隔、並びにmRNAにおけるシストロンの配置のいずれもが、タンパク質翻訳を修飾する役割を果たすことを暗示している。本データは、6個のAの存在が導入遺伝子タンパク質発現の最も高いレベルをもたらし、2~4のヌクレオチドの収縮又は伸長によるAバルジにおけるAの数の変更が、IRESの下流の導入遺伝子の発現レベルに有意に影響し得ることを示している。タンパク質発現結果は、最適なIRES配置は一般的に分岐ループに6個のAを有するが、Kaminiski et al.によって以前に記載されたポリピリミジントラクト結合タンパク質（PTB）によるレスキューによって、7個のAも許容可能であることを示唆しており、これは6個のAから7個のAへのバルジAの延長が、IRESの機能をポリピリミジントラクト結合タンパク質（PTB）依存的にすることを示している。4、5、8、10、及び12個のAを有するベクター変異体もまた、効率的なタンパク質翻訳のためにPBTのポリピリミジントラクトへの結合を必要とすること、及びこれらのベクター変異体が、IRESの二次及び三次構造を歪め、したがってPBT及び/又は他のトランス作用因子のポリピリミジントラクトへの結合を損ない、それゆえにPBTが媒介する翻訳活性のレスキューを消失させることもあり得る。バイシストロニックな発現ベクターのために作成されたEMCV IRES合成構築物以外に、EMCVのA-バルジのアデノシン残基の数の変異は記載されていない。アデノシン残基の数の変化が、ある種の選択圧によって駆動されたとは考え難く、むしろ変異傾向のある逆転写活性によってマウスにおける180日間にわたる広範なRRV複製の間に生じたと考えられる。結論的に、EMCV IRESを含むRRVにおいて、高められた導入遺伝子発現のためだけでなく、オリゴA数ドリフトのより頻繁な誘導が、バルジのより長いAへ優先的に認められるようである点からも、IRESの6A版を用いることが好適である。したがって、バルジが6A'sから始まる場合、導入遺伝子について、単一の余分なアデノシンヌクレオチドの獲得へのより高い耐性が存在する。

【 0 1 3 4 】

6個のAを有する最小IRESを含むRRVの構築物は、6A単独を含むRRVと同様のレベルの力価、ウイルス転写物、及び導入遺伝子タンパク質発現をもたらす

10

20

30

40

50

5'EMCV IRESからの進行的欠失によって作製した変異体が、示差的な翻訳効率を有することが示されている (Duke et al., J Virol. 66:1602-9 1992)。本明細書では、6A-406 (例えば、配列番号41の塩基123~544) 及び6A-466 (配列番号41の塩基183~544) (図5を参照されたい) と命名した、様々な長さの最小IRESを含むRRVを作成する。他の数のA's及び406又は466IRES配列のいずれかを有する他の同様の構築物も構築され得 (7A-406及び7A-466と命名する (最小IRESを含む7A等を指す))、同等の数のA's及び最大長のIRESを有する構築物とおおよそ釣り合って実施され得る。RRV骨格における同等のカセットの直接的置換のために、それぞれの構築物を、5'末端にMlu I、及び3'末端にPsi Iを有する全体のIRESカセットのDNA合成 (BioBasics Inc.) によってそれぞれ作製する。全てのDNA断片を、RRV骨格へのクローニングの前後に配列分析によって確認する。yCD2導入遺伝子を含むRRV構築物を、導入遺伝子の名前、及びそれに続くAバルジのA'sの数を用いて命名した (例えば、yCD2-4Aは、yCD2導入遺伝子及びIRESのAバルジに4個のAを含む)。データは、一過的にトランスフェクションした293T及び最大に感染させたHT1080細胞に由来する力価が、バルジA変異体のものと同様であることを示している。yCD2のタンパク質発現を、完全に感染させたU87-MG細胞から測定する。6A-406変異体は、完全長IRESを有する6A変異体と比べて同等のレベル (2、5、又は10倍以内) のyCD2タンパク質を発現する。5' IRESのさらなる欠失を有する6A-466変異体はyCD2の発現を示す。さらに、段階感染による複製動態及びベクター安定性のデータもまた、6A-406及び6A-466の両方が、少なくとも10感染サイクルまで安定であることを示している。

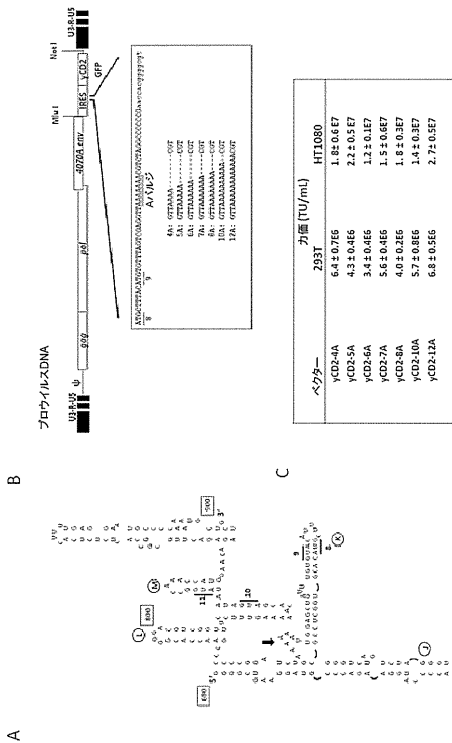
10

20

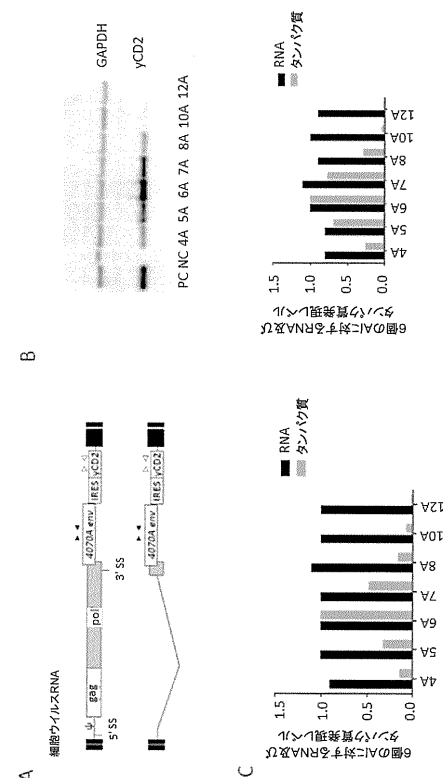
【0135】

本開示の幾つかの実施形態を記載した。にもかからわず、本開示の精神及び範囲から離れることなく、様々な改変がなされ得ることを理解されたい。したがって、他の実施形態は添付の特許請求の範囲内である。

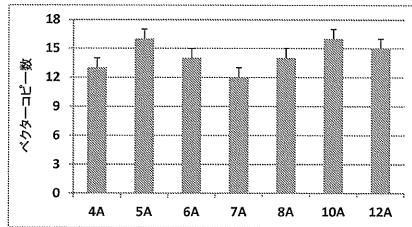
【図1A - C】



【図2A - C】



【図 2 D】



【図 3 - 1】

RCRベクター - pAC3-yCD2 (配列番号22)

```

tagttattaa tagtaatacaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
cgttataata acacgggttaa atgcccggccc tgggtgacgc cccacagacc cccggccatt 120
agcgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aaagccaata gggacttcc attgacgtca 180
atgggttgag tatttacggtt aaactgccca ctggcgagta catcaagtgt atcatattgcc 240
aagtacggcc cccatttgacg toaatgacgg taaatggccc gctgtgcat attgccagta 300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacattac gtattagta ctgctattac 360
catgggtgct cggtttttgc agtacaacaa tggcggtgga tagcgtttg actcaacggg 420
atttccaagt ctcaacccca ttgacgttca tgggagtttg ttttggcacc aaatacaacg 480
gacttttcca aaatgttgtt acaactccgc ccatctgacg aaatgggcy gtagggctgt 540
acggttgagc agtattataa gcaagctgtt ttatgtaac cggcgccagt cctccgtatt 600
actgagtgcc cgggttancg gtgtatccaa taaacccctt tgcagtgtca tccgactgtt 660
gggtctgtgt ttctttggga gggctctctc tgaagtattg actaccgtc agcggggttc 720
tttcatgttg gggctctgtc gggatcgagg gaccctgcc caggaccac ccaccacca 780
ccggaggata agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gatgtctag tgtctatgac 840
tgattttatg cgcctgctgc ggtactagtt agctaacag ctctgtatct gggcgaccgc 900
tgggtgaact gacpacttgc gaacacccgc cgaacacctt gggagactgc ccaaggactt 960
ccggggcgct ttgtgtggcc cgaactgagt tcaaaaatcc cgtctgtt ggcactttt 1020
gtgcaacccc cttagaggag ggtatgttgg ttctgttagg agacagaaac ctaaaacagt 1080
tcccgcctcc gtctgaattt ttgcttttgg tttgggacgc aagccgcgcc gcgcgtctt 1140
tctgtctcag catcgttctt tgttctctct gctgtactgt gtttctgtat ttgtctgaga 1200
atagtggcca gactgttaac actcccttaa gtttgacctt aggtcaactg aaagatgtcg 1260
agcggtatgc tcaaacacag tccgttagtg tcaaaaagag acgttgggtt accttctgct 1320
ctgaagaatg gcaaaccttt actcgtgat ggcctggaga cggacacttt aacggagacc 1380
tcaaacacca ggttaagatc aaggtctttt cactgggccc gctgtgagac gctgtgagc 1440
tcccctaatc ctgtacactg gaagccttgg cttttgacc cctcctctg gtaaacacct 1500
tgttaaaccc taagctctcg cctcctcttc ctcaatccgc cccgtctctc ccccttgacc 1560
cctcctgttc gaccocgctc cgtactctcc ttatccagc cctcaactct cctctaggcg 1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatgcac ctacttcaag 1680
aagacggcgc gctctatagg gaccacaag caccoccttc cgaacaggac ggaattgtgt 1740
cgaagacggc gacgacccgc acccttccac aatggcatct cgtctactgt 1800
ggagacggga gcccccctgt gccacttcca ctactctgca ggcattcccc ctcgcgcgag 1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt ttctctcttc tgacttttac aactgaaaa 1920
ataatacccc ttctttttct gaagatccag gtaaacctgac agctctgac gactgtgtc 1980
tcatcaccca tcaagccacc tgggacagct gtcagcagct gttggggact ctgctgacc 2040
gagaaagaaa acacaggttg cttctagagg ctgaaagagg gttgcggggc gatgatgggc 2100
ggccacttca actgcacagt agctgtgccc cctggagaga cggacacttt cagacttggg 2160
attacaccac ccaagcaggt aggaacacac tagtccacta tgcgcagttt cctcgtagg 2220
gttctcaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggttaaaagg ataacacag 2280
ggcccaatga gtctcctcgc gctctcttag agagacttaa ggaacccat cgcaggtata 2340
ctccttatga ccttgaggac caggggcaag aaactaatgt gctatgtct tcatattggc 2400
agtcgtcccc agacattggg agaaattagg agaggtttag agatttaaaa acaagacgc 2460
ttggagattt ggttagagtg gcagaaagta tcttataaa acgagaacac ccgaaagaaa 2520
gagaggaagc tatcagctgc ttggttcaag aaaaagaga acgctgtgag acagagtag 2580
agcagaagaa gaaagaaaga gatcgttaga gacatagaga gatgacagc ctattggcca 2640
ctgtcttag ttgacagaaa cagatagac aggaagagga acgaagagag tcccaactcg 2700
atcgcgacca gtgtgctcac tgcaagaaa aggggcactg ggcataagat tgcctcaaga 2760
aaacacaggg acctcgggga ccaagacccc agacctcccc cctgacctta gatgactagg 2820
gaggtcaggg tcaggagccc ccccttgacc caagataac cctcaagtc ggggggcaac 2880
cgcctacact cctgttagat actggggccc aacacttccg gctgacccaa atctctggac 2940
tccaaagtag taagctgccc ttggttcaag ggtgactgag aggaagaggt tatcgttgg 3000
ccaaggtatg caaagtacat ctactatcgc gtaaggtcac ccaacttttc tccatgtac 3060
cagactgtcc ctatctctgt tttagaagag atttctgac taaactaaaa gcccaatcc 3120
acttttaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcaagccctg caagtgttga 3180
ccctaaatat agaagatgag catcggtcac atgagacctt aaaaagacca gatgttctc 3240
tagggtccac atggctgtct gattttctcc agggctgggc ggaacccggg ggcattgggac 3300
tggcagttgt ccaagctctc ctgatcacac ccttgaagac aacctctaac cccgtgtcca 3360
taaaaacata ccccatgtca caagaagcca gactggggat ccaagccccc atacagagac 3420

```

【図 3 - 2】

```

tgttgaccac ggggaactgt gtacccctgc agtccccctg gaacacggcc ctgctacccc 3480
ttaagaacac agggactaat gattatagcg ctgtccagga tctgagagaa gtcaaacagg 3540
gggttggaaga catcaccccc accgtgccca acccttatac cctcttgacg gggctccccc 3600
cgtcccccac gtggtagaac tgtgttgatt taagaagatgc ctttttctgc ctgagactcc 3660
accacacag tcaagctctc ttgcctcttg agtggagaga tccggagatg ggaacttccg 3720
gacaattgac ctggaccaga ctccacagag gtttcaaaaa cgttccccc ctgtttgatg 3780
agcactctga cagagaacct gaagacttcc ggatccagaa cccagactgt atctgtctac 3840
agtaacttga tgaactactg ctggccgcga cttctgagct agactgccaa caagttactc 3900
gggcctctgt acaaacctta gggaaacctcg ggtatcgggc ctgcggcaag aaagcccaaa 3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga 4020
ctgagggcag aaaaagagat gtgtgtgggc agctactacc gaagaccccc cgaaactaaa 4080
gggagttctc aggaacgga ggtctctgtc gctcttgagt cctgtgggtt gaaagaaagg 4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggaacttgtt taattggggc ccaagacaaa 4200
aaaaagctta tcaagaatat aagaacagtc ttctaaactc cccagccccg gggttccagc 4260
atttgactaa gccctttgaa ccttttggcg acagagaaga gggctacgcc aaaggtgtcc 4320
taacgcaaaa actgggactt tggctggcgc cggttggcta cctgtccaaa aagctagacc 4380
cagttagcgc tgggtggccc ccttgctaac ggatgtgacg agcactgtgc gtaactgaaa 4440
aggtatcgag caagtaaac atgggacagc cacttagtat tctggcccc catgactag 4500
agcactatg caaacaccc cccgacccgt ggttttcaaa cgcgcggatg actactatc 4560
agccttgtct tttagaacag gaccgggtcc agttcgaaac ggtgttagcc ctgaaacccc 4620
ctacgtgtct ccaactgctc gagggaaggc tgcaacacaa cctgttgtat atctctggcc 4680
aagccacagg aaccggacc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacact 4740
ggtaacagga tgaagcagt ctcttaacag agggacagcg taagcgggga gctgcggtga 4800
cacacggagc cagagttaact tgggtcaaaag cccctgcacgc cgggacatcc gctcagctg 4860
ctgactagct agactctaa agagcctaaa agatggcaga aggttaagc cttaagcttt 4920
atactgatag cgttatgct ttgtactag cccatataca tgggaaata tacaagagcg 4980
gtgggttgtc cactacagaa gggcaagctg aaaaaataa agacagatc ttggccctac 5040
taaaagccct cttctgcgc aaaaagacta gataatacca ttgtccagga catcaaaaag 5100
gacacagcgc cagagctaga cttgtgacca ttgctgacca agcgcccca aagcagacca 5160
tcacagagac tcacagaccc tctacccctc tcatgaaaa tcatcacccc taacactcag 5220
acaatttcca ttacacagt actgatataa agaacctaac caagttgggg gccatttatg 5280
ataaaaacaa gaattattg tctacacaa gaaacacctg gatcgtgac cagtttact 5340
tgtatttatt agactttctt catcagctga ctcaactcag cttctcaaaa atgaagctc 5400
tcttagagag aagccacagt cctactaca ttctcaacgg gtagcgaaca ctcaaaaaa 5460
tcactgagac ctgcacaaagt ttgtcacaa tcacagccag caagtctgcg gttaaacagg 5520
gaactagggt cgcggcgcat cggccggcca ctcatggga gatcgatttc accagataaa 5580
agcccgattt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataacct ttctgtgga 5640
tagaagcctt ccaacacag aaagacagc caaggtgtg aaacagagac ctactagagg 5700
agacttcccc caggttccgc atgtctcag ttatgggaa ttccggagg cctgctctg 5760
tctcaaggtt gactcaagca gtcggccatc ttgtgggat tgaattgaaa ttacatttgt 5820
cacaagcctc ccaagctca gggcagctga aaagatgaa tagaacacat aaggagactt 5880
taactaaatt aagcgttgca actggtctta aaagatgaa gctctactac cctactgcc 5940
tgtaccagc cgcacacag cggcgcccc atggctcac cccatagag atcttatag 6000
gggacccccc gcccttgta aaactccctg accctgagat gacagaggtt actaacagc 6060
cctcttccca agtcaacta caggtctctc acttagtcaa gacagagtc tggagcctc 6120
tgccggcagc ctacaagaa caactgacac gaccgtgact actcaacctc taccagatcg 6180
gcgaacagat gtgggttcgc cccacacaga ctaagacctt agaactccgc tggaaaggac 6240
cttaacagct cctgtgacc accccacag cctcaagatg agacggatc cagacttga 6300
tacacggccc cccagtgaa gctgcacac cgggggtgtg accatctctc agactgacat 6360
ggcggttcca acgcttcaa agccocctca agataaagat aaccgttga agccctaat 6420
agtcagga gtctgttag gagtaggat ggcagagac cccacacag tctttaatg 6480
actctggga gtcaaacacc tgatgactg ggttacggcc aatgcacact cccctctgg 6540
aactgtacaa gatccttcc caaataatta ttttgatca ttgtgatctg tccgagagga 6600
gtgggacctc tcagacagac accgatgat cgggtatgct tcaagtaacc cccagggag 6660
acagcgacc cgaactttg acttttagt gtgctctgg gtaacccgta agtcgggtg 6720
tggggacaa ggaaggggt actgtgttaa atgggggtgt gaacacccg gacagagta 6780
ctggaacgc acatctgtt ggaactaat cctccctaa cccgttaaca cccctgtcca 6840
caggggtgct tctaaagtgt cctgtgccc ctgtcacac cttctcaaa tatcaaatc 6900

```

【図 3 - 3】

```

cttccagggt gctactcgag ggggcaagat caaccctcta gtccatgaat tcaactgatc 6960
aggaaaaaag gctactggg acgggcccaa atctgggga ctgagactct accgacagc 7020
aacagactct ataccactt ttccctcgac cgcgcagctc cttaattgtg gaccggagt 7080
cccataagg cccaacacag tatataccga ccaaaagctc cctctctac caatagatag 7140
tggacggct ccaagcagc ctacgccctc taacactcgt taacccccct caactacag 7200
taacacctca acctcccta caagtcagc gttccacag cctcccccag gaactgaga 7260
tagactacta gctctagtaa aagagccta tcaaggcgct aaactcaaca atccgacaa 7320
ggaccaagaa ttgttgctgt gcttagtgc gggacccctt tatagcagc gactggctg 7380
ctgtggcact tatacactc attcaacac tcgcggcaac tgcacggca cttcccaaca 7440
taagtttacc ctatctgaag tgacagga caaggctatg atgtggctag caactaaaac 7500
tcacacgggc ttatgttaaa ccccccacag cgcgcgctca ggaactact actctcagc 7560
accgcgggga caagttggg ctgagacac cctgttgtt taacacaggt taacacaggt 7620
gctcaactca accacagtt attgttatt attgtgaact tggccacag taatttcaag 7680
ctccccgat tatattgat gtaagttga acagctacc aaataaaa gagcgcaagt 7740
atactgacc cctggccctt tactagagg attaacactt gaggagattg caagtgaa 7800
aggaaggggg accactgct taattaaac ccaagcattt gagcagcttc atggcgat 7860
ccaagacca ctcaacagag tccaaaagtc aaattaccac ctgaaaggt actgacctc 7920
gtgtctgaa gtagctctac agaacgcag agggctagat ttgatcttc taaagaggg 7980
aggtctctca gaaagctaa aagaagatg ttgtttat gaaacacca cgggtgatg 8040
gagagacgc atggcccaa taagaagaa gcttaagtc atgcaaaaac tatttagac 8100
agggcaagga ttgttgaag ggtctgttaa tagatcccc ttgtttacca cttaatctc 8160
cacactatg ggaactctaa tagtactctt actgatctt ttcttgtagc ttgtttgac 8220
caatctagt tccaatttg ttaagacag gatctcagc gtcacagctc tggttttgac 8280
tcaagaaat caccagctaa aaccataga gtacagacca tgaacccgtt actggccgaa 8340
gcgcttga ataaagcgc ttgtgttgt tctatagt ttcttcca atattgagc 8400
cttttgcaa ttgtagggcc cggaaactgt gccctgtctt ctttagcagg atctcagg 8460
gttttcccc ttctgcacaa ggaatgcaag gttctgtgaa ttctgtgag aagcagcttc 8520
ctgtgaagc ttcttgaag caaacacgt cttagcagc ccttttcagg cagcggaacc 8580
ccccatgt cgacaggtgc cctctggccc aaagacacac tgtataagat acactgcaa 8640
agggcgaca acccagctgc cagcttgtga gttgtgagt ttgtgaaaga gtcacatggc 8700
tctctcaac cgtattcaa aagggcgtga aggtagccca ggaactacc catltgatg 8760
gactgatct gggcctgcg tgcactgtc ttactgtgt ttgtgtgag tttaaaaaac 8820
cttagagccc cccgacacac ggggacgtg tttctctt aaaaacaga ttataaagt 8880
tgacccggcg catggcctc aagtgggat aaaaagcgt ggaatctgt lacaggagg 8940
cctctgtgg ctacagagg ggcggctgc ctaatggcg cttctgtac caacacagg 9000
acggactgt ctggggcag ggcacacaa ttgagttca gaagggcttc gccacctgc 9060
acggcgagat ctacacctg gagaactgt gaaagctgga gggcagagtg tcaagagca 9120
caccctgtc cactacagtc tcaactgtc actgtgtac cggcgctac atcatgag 9180
gactcccc tagttgtgtt gcgagaagc tgaacttcaa gtcacaggc gagaagacc 9240
tgcaaacag gggccacag gtgtgtgt ttgacagta gagggttaag aagctgatga 9300
cagacttcat cgacagagag cctcagagat ggttcagaga tatcgcgag taacggcgc 9360
cagataaatt aaagatttt attagttctc cagaaaaagg ggggaatgaa agacccacc 9420
tgtagttgt gaaagctagc taaagtacg catlttga caggatgaaa aaatacata 9480
cagcagatat ctgtgttag cagttctgc cccggctcag gtcacagac actgtgaaa 9540
gtgaatatg ggcocaaacg gatattctg gtaagcaqt cctgcgccg ctagggcca 9600
agaacagat gtcccagat cgggtccag cctcagcat ttttagagaa ccatagatg 9720
ttccagggt gccocaaaga cctgaatga cctgtctgt tatttgaac accaatgac 9780
ttcgtcttc gctctgttc ggcgcttct gctcccagc ctcaataaa gagccacaa 9840
cccactctc gggcgctgc tcccgcgc cagcagctg cgggctgag cgtgatcca 9900
taaaccttc ttgcagttg atcgactgt ttgtctgct gtctctgg aggtctcc 9960
ctgagtatt gactacccg cagcggggt ctttcaatc atgtgaaa aggcacaga 10020
aaaggccag aaccgtaaa aggcgcgtt gctggcgtt tccatagtt cccgccccc 10080
tgacagcat caaaaaatc gacgtcaag tcaagagtg cgaacacga cagagcata 10140
aagatacag cgttttccc ctggaagtc cctcgtgct tctctgttc cagcctgpc 10200
gcttacgga tactgtgct cctttctcc ttccggagc gtagcgctt ctaatgtc 10260
acgtgatg actgttacc agtctgact gttgtgac aggtgggt cgtgtgaca 10320
accctcgct cagcccgac gctgcgctt atccgtaac tatgtcttg agtcaacc 10380

```

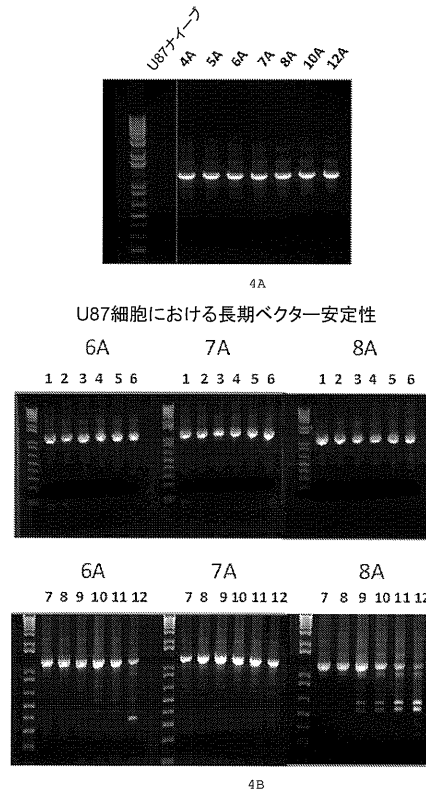
【 図 3 - 4 】

```

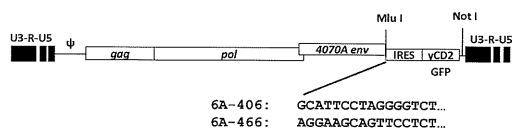
ggtaaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 10440
gtatgtaggc ggtgtcacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag 10500
gacagtatit gglatctgcg ctctgctgaa gccagtlacc ttccgaaaaa gaggtaggtag 10560
ctcttgatcc ggcaaaacaa ccaacgctgg tagcggtggt ttttttggtt gaaagcgaca 10620
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatccttctg atcttttcta cggggtctga 10680
cgctcagtag aacgaaaaact caggttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 10740
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 10800
gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 10860
tcattttcgt tcattccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga 10920
gggcttacca tctgcccaca gtgctgcaat gataccgcga gccccacgct caccggctcc 10980
agattttaca gcaataaac cgcacgcggg aaggggcgag cgcagaggtg gtcctgcaac 11040
ttatccgcgc tccatccagt ctatttaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 11100
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcagcg atcggtggtg cagctcgctc 11160
gtttgtagtg gcttcattca gctcgggttc ccaacgatca aggcagatta catgatcccc 11220
catgttgtag aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt 11280
ggcgcagtg ttatcactca tgggttatgg agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
atccgtaaga tgcctttctg tgactgggtga gtaactcaac aagtcattct gagaatagtg 11400
tatggggcga ccaggttgct ctgcccgcgc gtcaaacagg gataataacg cgcacaaag 11460
cagacttta aaagtgtca tcattgaaa acgttcttcg ggcgaaaaac tctcaaggat 11520
cttacgcgtg ttgagatcca gttcgatgta acccaactgt gcaccaacat gatcttcagc 11580
atcttttact ttaccacagc tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgcgcgaaa 11640
aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aataactata ctcttccttt ttcaatatta 11700
ttgaagcatt tatcagggtt atgtgtcat gagcgatcac atatttgaaat gtatttagaa 11760
aaataacaa ataggggttc cgcgcacatt tcccgaaaa gtgcacactg acgtctaaga 11820
aacctattt atcatgacat taactataa aaataggcgt atcagagggc cctttgctt 11880
tcaagaattc at

```

【 図 4 A - B 】



【 図 5 】



【配列表】

2016526920000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/049831																					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/113 (2014.01) CPC - C12N 2840/203 (2014.12) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 35/76, 39/21; C07K 14/15; C12N 7/00, 7/01, 15/48, 15/67, 15/69, 15/86, 15/867, 15/113 (2014.01) USPC - 424/93.6; 435/69.1, 320.1; 536/23.4, 24.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 35/76, 39/21, 48/0008; C07K 14/15, 2319/00; C12N 7/00, 9/1211, 15/67, 15/69, 15/86, 15/867, 15/113, 2740/13043, 2840/203; C12Y 305/0400 (2014.12) (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar. Search terms: retroviral, envelope, promoter, gag, pol, env, bifurcation region, IRES, minimum IRES, EMCV, A-bulge, 6A, 7A																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X - Y</td> <td>US 2011/0287020 A1 (GRUBER et al) 24 November 2011 (24.11.2011) entire document</td> <td>52-54, 56-93 1-21, 23-41, 44, 55</td> </tr> <tr> <td>X - Y</td> <td>KAMINSKI et al. "The polypyrimidine tract binding protein (PTB) requirement for internal initiation of translation of cardiovirus RNAs is conditional rather than absolute," RNA, 01 June 1998 (01.06.1998), Vol. 4, No. 6, Pgs. 626-638. entire document</td> <td>42, 43 1-21, 23-41, 44, 55</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0130986 A1 (GRUBER et al) 23 May 2013 (23.05.2013) entire document</td> <td>1-44, 52-93</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012/0087894 A1 (JOLLY et al) 12 April 2012 (12.04.2012) entire document</td> <td>1-44, 52-93</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011/0217267 A1 (GRUBER et al) 08 September 2011 (08.09.2011) entire document</td> <td>1-44, 52-93</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 4,937,190 A (PALMENBERG et al) 26 June 1990 (26.06.1990) entire document</td> <td>1-44, 52-93</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X - Y	US 2011/0287020 A1 (GRUBER et al) 24 November 2011 (24.11.2011) entire document	52-54, 56-93 1-21, 23-41, 44, 55	X - Y	KAMINSKI et al. "The polypyrimidine tract binding protein (PTB) requirement for internal initiation of translation of cardiovirus RNAs is conditional rather than absolute," RNA, 01 June 1998 (01.06.1998), Vol. 4, No. 6, Pgs. 626-638. entire document	42, 43 1-21, 23-41, 44, 55	A	US 2013/0130986 A1 (GRUBER et al) 23 May 2013 (23.05.2013) entire document	1-44, 52-93	A	US 2012/0087894 A1 (JOLLY et al) 12 April 2012 (12.04.2012) entire document	1-44, 52-93	A	US 2011/0217267 A1 (GRUBER et al) 08 September 2011 (08.09.2011) entire document	1-44, 52-93	A	US 4,937,190 A (PALMENBERG et al) 26 June 1990 (26.06.1990) entire document	1-44, 52-93
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X - Y	US 2011/0287020 A1 (GRUBER et al) 24 November 2011 (24.11.2011) entire document	52-54, 56-93 1-21, 23-41, 44, 55																					
X - Y	KAMINSKI et al. "The polypyrimidine tract binding protein (PTB) requirement for internal initiation of translation of cardiovirus RNAs is conditional rather than absolute," RNA, 01 June 1998 (01.06.1998), Vol. 4, No. 6, Pgs. 626-638. entire document	42, 43 1-21, 23-41, 44, 55																					
A	US 2013/0130986 A1 (GRUBER et al) 23 May 2013 (23.05.2013) entire document	1-44, 52-93																					
A	US 2012/0087894 A1 (JOLLY et al) 12 April 2012 (12.04.2012) entire document	1-44, 52-93																					
A	US 2011/0217267 A1 (GRUBER et al) 08 September 2011 (08.09.2011) entire document	1-44, 52-93																					
A	US 4,937,190 A (PALMENBERG et al) 26 June 1990 (26.06.1990) entire document	1-44, 52-93																					
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 10 December 2014		Date of mailing of the international search report 24 DEC 2014																					
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/049831

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- ☐ on paper
☒ in electronic form

b. (time)

- ☒ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs:1-5, 11, 13, 17, 41, 42; nucleotides 1-582 of SEQ ID NO: 19, nucleotides 1-582 of SEQ ID NO: 20, nucleotides 1-582 of SEQ ID NO: 22, nucleotides 1-582 of SEQ ID NO: 42, nucleotides 1-1202 of SEQ ID NO: 19, nucleotides 1-1202 of SEQ ID NO: 20, nucleotides 1-1202 of SEQ ID NO: 22, nucleotides 1-1202 of SEQ ID NO: 42, nucleotides 1203-2819 of SEQ ID NO: 19, nucleotides 1203-2819 of SEQ ID NO: 20, nucleotides 1203-2819 of SEQ ID NO: 22, nucleotides 1203-2819 of SEQ ID NO: 42, nucleotides 2820-6358 of SEQ ID NO: 19, nucleotides 2820-6358 of SEQ ID NO: 20, nucleotides 2820-6358 of SEQ ID NO: 22, nucleotides 2820-6358 of SEQ ID NO: 42, nucleotides 6359-8323 of SEQ ID NO: 19, nucleotides 6359-8323 of SEQ ID NO: 20, nucleotides 6359-8323 of SEQ ID NO: 22, nucleotides 6359-8323 of SEQ ID NO: 42, nucleotides 8877-9353 of SEQ ID NO: 19, nucleotides 8877-9353 of SEQ ID NO: 20, nucleotides 8877-9353 of SEQ ID NO: 22, nucleotides 8877-9353 of SEQ ID NO: 42, nucleotides 9405-9998 of SEQ ID NO: 19, nucleotides 9405-9998 of SEQ ID NO: 20, nucleotides 9405-9998 of SEQ ID NO: 22, nucleotides 9405-9998 of SEQ ID NO: 42, nucleotides 123-544 of SEQ ID NO: 41, and nucleotides 183-544 of SEQ ID NO: 41.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/049831

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 45-51
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

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 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	4 H 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	H
A 6 1 K 31/505 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 31/505	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
C 0 7 K 14/395 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 K 14/395	

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

(74)代理人 100196966

弁理士 植田 渉

(72)発明者 リン, エイミー, エイチ.

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サンディエゴ, ソノマ プレイス 5 4 8 8

(72)発明者 グルーバー, ハリー, イー.

アメリカ合衆国 9 2 0 6 7 カリフォルニア州, ランチョ サンタ フェ, ピー. オー. ボッ
クス 6 7 5 2 7 2

(72)発明者 イバネス, カルロス

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州, サンディエゴ, ミルボンド ウェイ 1 3 5 9
2

(72)発明者 ジョリー, ダグラス, ジェイ.

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州, エンシニータス, サンセット ドライブ 3 8
2

F ターム(参考) 4B065 AA80X AA80Y AA97X AA97Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44

4C084 AA02 AA03 AA13 BA44 DA12 DA19 DA21 DA25 DC50 MA02

NA14 NA15 ZA961 ZB071 ZB151 ZB261 ZC752

4C085 AA13 AA14 CC08 EE01 EE03

4C086 AA01 AA02 AA03 BC42 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 NA15

ZA96 ZB07 ZB15 ZB26 ZC75

4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 MA02 NA14 NA15 ZA96 ZB07 ZB15

ZB26 ZC75

4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 CA10 DA75 EA20 FA74