

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7623299号  
(P7623299)

(45)発行日 令和7年1月28日(2025.1.28)

(24)登録日 令和7年1月20日(2025.1.20)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N 5/0789(2010.01)	C 1 2 N	5/0789	
請求項の数 25 (全38頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2021-569298(P2021-569298)	(73)特許権者	521067485
(86)(22)出願日	令和2年5月22日(2020.5.22)		スペースクラフト セブン リミテッド
(65)公表番号	特表2022-532802(P2022-532802 A)		ライアビリティ カンパニー
(43)公表日	令和4年7月19日(2022.7.19)		アメリカ合衆国 0 8 5 1 2 ニュージャージー州 クランベリー シダー ブルック
(86)国際出願番号	PCT/US2020/034394	(74)代理人	ドライブ 9
(87)国際公開番号	WO2020/237219		100102978
(87)国際公開日	令和2年11月26日(2020.11.26)		弁理士 清水 初志
審査請求日	令和5年5月17日(2023.5.17)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	62/852,216		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	令和1年5月23日(2019.5.23)	(74)代理人	100119507
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74)代理人	100148699
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 乳児性悪性大理石骨病に対する遺伝子療法ベクター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

T細胞免疫調節因子1 ( T c e l l i m m u n e r e g u l a t o r 1 ) ( T C I R G 1 ) ポリペプチドをコードするコードポリヌクレオチドと、プロモーターを含む発現カセットを含む、トランスファープラスミドであって、前記ポリヌクレオチドが、前記プロモーターに動作可能に連結されており、前記トランスファープラスミドが、RNA-OUTリプレッサーおよびCMV IEプロモーターを含み、かつ、配列番号23、25、または27と少なくとも95%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む、トランスファープラスミド。

【請求項2】

前記RNA-OUTリプレッサーが、配列番号32と少なくとも95%の同一性または少なくとも99%の同一性を共有する、請求項1に記載のトランスファープラスミド。

【請求項3】

前記CMV IEプロモーターが、配列番号33と少なくとも95%の同一性または少なくとも99%の同一性を共有する、請求項1または請求項2に記載のトランスファープラスミド。

【請求項4】

p C C L 骨格を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のトランスファープラスミド。

【請求項5】

前記p C C L 骨格が、配列番号39と少なくとも95%、少なくとも98%、または10

0%の同一性を共有する、請求項4に記載のトランスファープラスミド。

【請求項6】

前記プロモーターがEFSプロモーターである、請求項1～5のいずれか一項に記載のトランスファープラスミド。

【請求項7】

前記EFSプロモーターが、配列番号2と少なくとも95%、少なくとも99%、または100%の同一性を共有する、請求項6に記載のトランスファープラスミド。

【請求項8】

前記コードポリヌクレオチドが、配列番号3と少なくとも95%、少なくとも99%、または100%の同一性を共有する、請求項1～7のいずれか一項に記載のトランスファープラスミド。

10

【請求項9】

前記TCIRG1ポリペプチドが、配列番号5と少なくとも95%、少なくとも99%、または100%の同一性を共有する、請求項1に記載のトランスファープラスミド。

【請求項10】

前記発現カセットが、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載のトランスファープラスミド。

【請求項11】

前記WPREが配列番号4と少なくとも95%、少なくとも98%、または100%の同一性を有する、請求項10に記載のトランスファープラスミド。

20

【請求項12】

前記発現カセットが、配列番号1と少なくとも95%、少なくとも98%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のトランスファープラスミド。

【請求項13】

前記発現カセットが、5'長末端反復配列(LTR)および3'LTRと隣接しており、任意で前記5'LTRが配列番号34であり、かつ/または前記3'LTRが配列番号28である、請求項1～12のいずれか一項に記載のトランスファープラスミド。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか一項に記載のトランスファープラスミドを宿主細胞にトランスフェクトすることにより産生された、レンチウイルス粒子であって、前記発現カセットが配列番号1のポリヌクレオチド配列を含む、レンチウイルス粒子。

30

【請求項15】

請求項14に記載のレンチウイルス粒子を細胞にトランスフェクトすることによって産生された、改変細胞。

【請求項16】

(a) 内因性機能性TCIRG1遺伝子を欠く；  
(b) 乳児性悪性大理石骨病(IMO)を有するかもしくは有する疑いがある対象に由来する；

(c) 機能性TCIRG1遺伝子を有する破骨細胞において観察されるTCIRG1の発現レベルに類似したレベルで、TCIRG1を発現する；かつ/または

40

(d) IMOを有していないかもしくは有する疑いのない対象に由来する破骨細胞において観察されるTCIRG1の発現レベルに類似したレベルで、TCIRG1を発現する、請求項15に記載の改変細胞。

【請求項17】

造血幹細胞(HSC)またはCD34+前駆細胞である、請求項15～16のいずれか一項に記載の改変細胞。

【請求項18】

任意選択的にG-CSF、プレリキサホル(plerixafor)、またはG-CSFとプレリキサホルの組み合わせの投与によるHSCの動員後に、IMOを有するかまた

50

は有する疑いがある対象からアフェレーシスによって単離されたHSCに由来し、任意で磁気捕捉によりCD34+細胞が濃縮された細胞の集団に由来する、請求項17に記載の改変細胞。

【請求項19】

請求項15～18のいずれか一項に記載の改変細胞を含む、医薬組成物。

【請求項20】

I MOを有するかまたは有する疑いがある対象の1つ以上の細胞を改変するインビトロまたはエクスピボでの方法であって、

(a) G-CSF、プレリキサホル、またはG-CSFとプレリキサホルの組み合わせを含む組成物を前記対象に投与することによって前記対象から動員された末梢血単核細胞(PBMC)を提供することと、

(b) 磁気分離によって前記PBMCからCD34+細胞を濃縮し、CD34に富む細胞の集団を生成することと、

(c) 前記CD34に富む細胞を、5'から3'の順序で

(i) レンチウイルス5'長末端反復配列(LTR)、

(ii) 発現カセット、および

(iii) レンチウイルス3'LTR

を含む組換えレンチウイルスゲノムを含む、請求項14に記載のレンチウイルス粒子と接触させることと

を含み、前記組換えレンチウイルスゲノムが複製能力を有しない、方法。

【請求項21】

請求項15～18のいずれか一項に記載の改変細胞を含む、乳児性悪性大理石骨病(IMO)を有するかまたは有する疑いがあるヒト対象においてIMOを治療する方法に使用するための医薬組成物であって、前記方法が自家治療を含み、かつ任意で前記医薬組成物の投与が静脈内注入を介して実施される、医薬組成物。

【請求項22】

(a) 前記方法が、TCIRG1を発現する改変細胞をHSCニッチに再配置させる；  
 (b) 前記方法が、TCIRG1を発現する改変細胞を破骨細胞ニッチに再配置させる；  
 (c) 前記方法が、IMOを治療する、改善する、予防する、低減させる、阻害する、もしくは緩和する；かつ/または

(d) 前記方法が、治療された対象の平均全生存期間を、少なくとも1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、もしくはそれ以上、延長させる、請求項21に記載の医薬組成物。

【請求項23】

(a) 前記対象が、治療前にIMOの症状を呈した；  
 (b) 前記対象が、治療前にTCIRG1の発現の減少もしくは検出不能な発現を有すると特定された；  
 (c) 前記対象が、変異TCIRG1遺伝子を有すると特定された；かつ/または  
 (b) 前記対象が、乳児である、

請求項21～22のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項24】

請求項1～13のいずれか一項に記載のトランスファープラスミドおよび任意選択的に1つ以上の追加のプラスミドをパッケージング細胞株にトランスフェクトすることと、前記パッケージング細胞株を培養することと、を含む、レンチウイルス粒子を産生する方法であって、前記トランスファープラスミドが安定的に増殖し、任意で前記トランスファープラスミドが、振とうフラスコまたは少なくとも1、2、3、4、5、6、または7日間の発酵を使用して、細菌宿主において30～37℃で安定的に増殖する、方法。

【請求項25】

請求項24に記載の方法に従って産生された、レンチウイルス粒子。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2019年5月23日に出願された米国仮特許出願第62/852,216号の優先利益を主張するものであり、本出願の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

## 配列表に関する記述

本出願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名前は、ROPA\_\_003\_\_01WO\_\_ST25.txtである。テキストファイルは、2020年5月22日に作成された約62KBで、EFS-Webを介して電子的に提出されている。

## 【0003】

## 分野

本開示は、概して、T細胞免疫調節因子1, ATPase H<sup>+</sup>輸送V0サブユニットa3遺伝子(T cell immune regulator 1, ATPase H<sup>+</sup> transporting V0 subunit a3)(TCIRG1)の変異に関連する疾患のための遺伝子療法に関する。特に本開示は、TCIRG1タンパク質(TCIRG1)をコードする発現カセットを含む遺伝子療法ベクターおよびプラスミドを提供する。

## 【背景技術】

## 【0004】

乳児性悪性大理石骨病(IMO)は、機能不全性破骨細胞によって引き起こされる骨量の増加を特徴とする希少な劣性疾患である。この疾患は、ほとんどの場合、T細胞免疫調節因子1, ATPase H<sup>+</sup>輸送V0サブユニットa3(TCIRG1)の変異によって引き起こされる。TCIRG1は、破骨細胞が骨を再吸収する能力に関与する。

## 【0005】

破骨細胞機能は、TCIRG1のレンチウイルスベクター介在性発現によって回復することができる。Moscatelli et al. Bone 57:1-9(2013)(非特許文献1)。さらなる研究は、構成的生理学的プロモーターを有するレンチウイルスベクターによって発現されているにもかかわらず、TCIRG1のレンチウイルス介在性発現が、内因性遺伝子産物と同じ様式で調節されていることを示す。Thudium et al. Calcif Tissue Int. 99:638-648(2016)(非特許文献2)。さらに、彼らは、天然のTCIRG1遺伝子配列が、遺伝子のコドン最適化cDNAからのmRNAレベルがかなり高いにもかかわらず、遺伝子のコドン最適化cDNAよりも、破骨細胞における高レベルのタンパク質発現および機能的救済につながることを立証した。さらに、データは、機能的TCIRG1を有するヒト前破骨細胞のごく一部のみが、インビトロで、吸収機能を大幅に増加させるために必要であることを示し、これは、大理石骨病のoc/ocマウスモデルからの以前の結果と一致して、吸収性破骨細胞および非吸収性破骨細胞が融合している可能性が高い。有効性と安全性の両方の観点から、この発見は、大理石骨病に対する遺伝子療法のさらなる開発を後押しするものである。

## 【0006】

TCIRG1の遺伝子療法ベクターおよびそのようなベクターを使用する治療方法に対する当技術分野のニーズが依然として存在する。さらに、こうした遺伝子療法ベクターを産生するための信頼できる方法に対するニーズがある。本開示は、そのような遺伝子療法ベクター、その製造方法、その使用方法、医薬組成物などを提供する。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0007】

10

20

30

40

50

【文献】Moscatelli et al. Bone 57:1-9 (2013)

【文献】Thudium et al. Calcif Tissue Int. 99:638-648 (2016)

【発明の概要】

【0008】

本開示は、TCIRG1ポリペプチドまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチド配列を含む改善された遺伝子療法ベクター、その使用方法、医薬組成物などを提供する。

【0009】

一態様では、本開示は、T細胞免疫調節因子1 (TCIRG1) のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするコードポリヌクレオチドと、プロモーターを含む発現カセットを含む、トランスファープラスミドを提供し、ポリヌクレオチドはプロモーターに動作可能に連結されており、トランスファープラスミドはRNA-OUTリプレッサーおよびCMV IEプロモーターを含む。

10

【0010】

いくつかの実施形態では、RNA-OUTリプレッサーは、配列番号32と少なくとも95%の同一性または少なくとも99%の同一性を共有する。

【0011】

いくつかの実施形態において、CMV IEプロモーターは、配列番号33と少なくとも95%の同一性または少なくとも99%の同一性を共有する。

20

【0012】

いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、pCCL骨格を含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、pCCL骨格は、RNA-OUTリプレッサーを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号39と少なくとも95%の同一性を共有する。

【0015】

いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号39を含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、EFSプロモーターである。

30

【0017】

いくつかの実施形態において、EFSプロモーターは、配列番号2と少なくとも95%の同一性を共有する。

【0018】

いくつかの実施形態において、EFSプロモーターは、配列番号2である。

【0019】

いくつかの実施形態において、コードポリヌクレオチドは、配列番号3と少なくとも95%の同一性を共有する。

【0020】

いくつかの実施形態において、コードポリヌクレオチドは、配列番号3と少なくとも99%の同一性を共有する。

40

【0021】

いくつかの実施形態では、コードポリヌクレオチドは、配列番号3である。

【0022】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、ウッドチャック肝炎ウイルス (WHP) 転写後調節エレメント (Posttranscriptional Regulatory Element) (WP RE) を含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、WP RE は、配列番号4である。

50

## 【0024】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号1と少なくとも95%の同一性を共有する。

## 【0025】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、5'長末端反復配列(long terminal repeat)(LTR)および3'LTRに隣接している。

## 【0026】

いくつかの実施形態では、5'LTRは配列番号34であり、かつ/または3'LTRは配列番号28である。

## 【0027】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号1と少なくとも95%の同一性を共有する。

## 【0028】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号1である。

## 【0029】

別の態様では、本開示は、T細胞免疫調節因子1(TCIRG1)のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドと、EFSプロモーターとを含む発現カセットであって、任意選択的にポリヌクレオチドがEFSプロモーターに動作可能に連結されている、発現カセットを提供する。

## 【0030】

いくつかの実施形態では、コードポリヌクレオチドは、配列番号3と少なくとも95%の同一性を共有する。いくつかの実施形態において、コードポリヌクレオチドは、配列番号3と少なくとも99%の同一性を共有する。いくつかの実施形態では、コードポリヌクレオチドは、配列番号3である。いくつかの実施形態において、EFSプロモーターは、配列番号2と少なくとも95%の同一性を共有する。いくつかの実施形態において、EFSプロモーターは、配列番号2である。

## 【0031】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)転写後調節エレメント(WPRE)を含む。いくつかの実施形態では、WPREは、配列番号4である。

## 【0032】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号1と少なくとも95%の同一性を共有する。いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号1である。

## 【0033】

別の態様では、本開示は、組換えレンチウイルスゲノムであって、5'から3'の順序で、レンチウイルス5'長末端反復配列(LTR)と、本明細書に開示される発現カセットと、レンチウイルス3'LTRとを含み、前記組換えレンチウイルスゲノムが複製能力を有しない、組換えレンチウイルスゲノムを提供する。

## 【0034】

別の態様では、本開示は、こうした組換えレンチウイルスゲノムを含むレンチウイルス粒子を提供する。

## 【0035】

別の態様では、本開示は、こうした組換えレンチウイルスゲノムを含むトランスファープラスミドを提供する。特定の实施形態では、トランスファープラスミドは、RNA-OUT配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA-OUT配列は、配列番号22である。いくつかの実施形態では、RNA-OUT配列は、トランスファープラスミドがパッケージング細胞株において安定的な増殖をすることができるように構成されている。

## 【0036】

特定の实施形態では、トランスファープラスミドは、抗生物質耐性遺伝子を含まないか、またはAmpRなどのアンピシリン耐性遺伝子を含まない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 7 】

特定の実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号 2 3 に記載される配列を含む。

## 【 0 0 3 8 】

別の態様では、本開示は、本開示の任意のトランスファープラスミドおよび任意選択的に 1 つ以上の追加のプラスミドをパッケージング細胞株にトランスフェクトすることと、パッケージング細胞株を培養することと、を含む、レンチウイルス粒子を生成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、振とうフラスコまたは少なくとも 1、2、3、4、5、6、または 7 日間発酵を使用して、細菌宿主内で 3 0 ~ 3 7 で安定的に増殖する。

10

## 【 0 0 3 9 】

関連の態様では、本開示は、本明細書に開示されるトランスファープラスミドを使用して産生されるレンチウイルス粒子を提供する。

## 【 0 0 4 0 】

別の態様では、本開示は、本開示の任意のレンチウイルス粒子を含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 0 4 1 】

別の態様では、本開示は、本開示の任意の発現カセットを含む改変細胞を提供する。

## 【 0 0 4 2 】

別の態様では、本開示は、本開示の任意の組換えレンチウイルスゲノムを含む改変細胞を提供する。

20

## 【 0 0 4 3 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、内因性機能性 T C I R G 1 遺伝子を欠く。

## 【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、乳児性悪性大理石骨病 ( I M O ) を有するか、または有することが疑われる対象に由来する。

## 【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、機能性 T C I R G 1 遺伝子を有する破骨細胞において観察される T C I R G 1 の発現レベルに類似したレベルで、 T C I R G 1 またはその機能的バリエーションを発現する。

30

## 【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、 I M O を有していないかまたは有する疑いのない対象に由来する破骨細胞において観察される T C I R G 1 の発現レベルに類似したレベルで、 T C I R G 1 またはその機能的バリエーションを発現する。

## 【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、造血幹細胞 ( H S C ) である。

## 【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、 C D 3 4 + 前駆細胞である。

## 【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、 I M O を有するかまたは有する疑いがある対象からアフエレーシスによって単離された H S C に由来する。

40

## 【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、 G - C S F、プレリキサホル ( p l e r i f a x o r )、または G - C S F とプレリキサホルの組み合わせの投与による H S C の動員後に、 I M O を有するかまたは有する疑いがある対象からアフエレーシスにより単離された、 H S C に由来する。

## 【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、磁気捕捉により C D 3 4 + 細胞が濃縮された細胞の集団に由来する。

## 【 0 0 5 2 】

50

別の態様では、本開示は、本開示の任意の改変細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0053】

別の態様では、本開示は、IMOを有するかまたは有する疑いがある対象の1つ以上の細胞を改変するインビトロでの方法であって、G-CSF、プレリキサホル、またはG-CSFとプレリキサホルの組み合わせを含む組成物を対象に投与することによって対象から動員された末梢血単核細胞(PBMC)を提供することと、磁気分離によって前記PBMCからCD34+細胞を濃縮し、CD34に富む(CD34-enriched)細胞の集団を生成することと、前記CD34に富む細胞を、組換えレンチウイルスゲノムであって、5'から3'の順序で、レンチウイルス5'長末端反復配列(LTR)と、本開示の任意の発現カセットと、レンチウイルス3'LTRと、を含む組換えレンチウイルスゲノム、を含む、レンチウイルス粒子と、接触させることと、を含み、組換えレンチウイルスゲノムが複製能力を有しない、方法を提供する。

10

【0054】

別の態様では、本開示は、乳児性悪性大理石骨病(IMO)を有するか、またはIMOを有すると疑われる対象においてIMOを治療する方法を提供し、本開示の任意の改変細胞または本開示の任意の医薬組成物を対象に投与することを含む。

【0055】

いくつかの実施形態では、本方法は、TCIRG1またはその機能的バリエーションを発現する改変細胞をHSCニッチに再配置させる。

【0056】

いくつかの実施形態では、本方法は、TCIRG1またはその機能的バリエーションを発現する改変細胞を破骨細胞ニッチに再配置させる。

20

【0057】

いくつかの実施形態では、本方法は、IMOを治療する、改善する、予防する、減少させる、抑制する、または緩和する。

【0058】

いくつかの実施形態において、本方法は、治療された対象の平均全生存期間を、少なくとも1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、またはそれ以上、延長する。

【0059】

いくつかの実施形態において、本方法は、IMOによる対象の死を予防する。

30

【0060】

いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【0061】

いくつかの実施形態では、対象は、治療前にIMOの症状を呈した。

【0062】

いくつかの実施形態では、対象は、治療前にTCIRG1の発現の減少または検出不能な発現を有するとして特定された。

【0063】

一実施形態では、対象は、変異TCIRG1遺伝子を有すると特定された。

40

【0064】

いくつかの実施形態では、対象は乳児である。

【0065】

いくつかの実施形態では、方法は、自家治療を含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、投与は、静脈内注入を介して行われる。

【0067】

別の態様では、本開示は、乳児性悪性大理石骨病(IMO)を治療または予防するための薬剤の調製における使用のための組換えレンチウイルスゲノムを提供し、レンチウイルスゲノムは、5'から3'の順序で、レンチウイルス5'長末端反復配列(LTR)と、本開

50

示の任意の発現カセットと、レンチウイルス3'LTRとを含み、組換えレンチウイルスゲノムは複製能力を有しない。

【0068】

別の態様では、本開示は、組換えレンチウイルスゲノムを含む、乳児性悪性大理石骨病（IMO）を治療または予防するための薬剤の調製における使用のためのレンチウイルス粒子を提供し、レンチウイルスゲノムは、5'から3'の順序で、レンチウイルス5'長末端反復配列（LTR）と、本開示の任意の発現カセットと、レンチウイルス3'LTRとを含み、組換えレンチウイルスゲノムは複製能力を有しない。

【0069】

[本発明1001]

T細胞免疫調節因子1（T cell immune regulator 1）（TCIRG1）のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするコードポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む発現カセットを含む、トランスファープラスミドであって、前記ポリヌクレオチドが、前記プロモーターに動作可能に連結されており、前記トランスファープラスミドが、RNA-OUTリプレッサーおよびCMV IEプロモーターを含む、トランスファープラスミド。

10

[本発明1002]

前記RNA-OUTリプレッサーが、配列番号32と少なくとも95%の同一性または少なくとも99%の同一性を共有する、本発明1001のトランスファープラスミド。

[本発明1003]

前記CMV IEプロモーターが、配列番号33と少なくとも95%の同一性または少なくとも99%の同一性を共有する、本発明1001または本発明1002のトランスファープラスミド。

20

[本発明1004]

pCCL骨格を含む、本発明1001～1003のいずれかのトランスファープラスミド。

[本発明1005]

前記pCCL骨格が、前記RNA-OUTリプレッサーを含む、本発明1004のトランスファープラスミド。

[本発明1006]

配列番号39と少なくとも95%または100%の同一性を共有する、本発明1005のトランスファープラスミド。

30

[本発明1007]

前記プロモーターがEFSプロモーターである、本発明1001～1007のいずれかのトランスファープラスミド。

[本発明1008]

前記EFSプロモーターが、配列番号2と少なくとも95%の同一性を共有する、本発明1007のトランスファープラスミド。

[本発明1009]

前記EFSプロモーターが配列番号2である、本発明1008のトランスファープラスミド。

40

[本発明1010]

前記コードポリヌクレオチドが、配列番号3と少なくとも95%の同一性を共有する、本発明1001～1009のいずれかのトランスファープラスミド。

[本発明1011]

前記コードポリヌクレオチドが、配列番号3と少なくとも99%の同一性を共有する、本発明1010のトランスファープラスミド。

[本発明1012]

前記コードポリヌクレオチドが配列番号3である、本発明1011のトランスファープラスミド。

50

[本発明 1 0 1 3]

前記発現カセットが、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)転写後調節エレメント(WPRE)を含む、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 1 2 のいずれかのトランスファープラスミド。

[本発明 1 0 1 4]

前記WPREが配列番号 4 である、本発明 1 0 1 3 のトランスファープラスミド。

[本発明 1 0 1 5]

前記発現カセットが、配列番号 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 1 4 のいずれかのトランスファープラスミド。

[本発明 1 0 1 6]

前記発現カセットが、5'長末端反復配列(LTR)および3'LTRと隣接している、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 1 5 のいずれかのトランスファープラスミド。 10

[本発明 1 0 1 7]

前記 5'LTR が配列番号 3 4 であり、かつ/または前記 3'LTR が配列番号 2 8 である、本発明 1 0 1 6 のトランスファープラスミド。

[本発明 1 0 1 8]

発現カセットが、配列番号 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 1 7 のいずれかのトランスファープラスミド。

[本発明 1 0 1 9]

発現カセットが配列番号 1 である、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 1 7 のいずれかのトランスファープラスミド。 20

[本発明 1 0 2 0]

本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 2 0 のいずれかのトランスファープラスミドを宿主細胞にトランスフェクトすることによって産生された、レンチウイルス粒子。

[本発明 1 0 2 1]

T細胞免疫調節因子 1(TCIRG1)のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするコードポリヌクレオチドと、EFSプロモーターとを含む、発現カセットであって、前記ポリヌクレオチドが前記EFSプロモーターに動作可能に連結されている、発現カセット。

[本発明 1 0 2 2]

前記コードポリヌクレオチドが、配列番号 3 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、本発明 1 0 0 1 の発現カセット。 30

[本発明 1 0 2 3]

前記コードポリヌクレオチドが、配列番号 3 と少なくとも 9 9 % の同一性を共有する、本発明 1 0 0 2 の発現カセット。

[本発明 1 0 2 4]

前記コードポリヌクレオチドが配列番号 3 である、本発明 1 0 0 3 の発現カセット。

[本発明 1 0 2 5]

前記EFSプロモーターが、配列番号 2 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 0 4 のいずれかの発現カセット。

[本発明 1 0 2 6]

前記EFSプロモーターが配列番号 2 である、本発明 1 0 2 5 の発現カセット。 40

[本発明 1 0 2 7]

ウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)転写後調節エレメント(WPRE)を含む、本発明 1 0 2 1 ~ 1 0 2 6 のいずれかの発現カセット。

[本発明 1 0 2 8]

前記WPREが配列番号 4 である、本発明 1 0 2 7 の発現カセット。

[本発明 1 0 2 9]

配列番号 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を共有する、本発明 1 0 2 1 ~ 1 0 2 8 のいずれかの発現カセット。

[本発明 1 0 3 0]

配列番号1である、本発明1029の発現カセット。

[本発明1031]

組換えレンチウイルスゲノムであって、5'から3'の順序で、

(a) レンチウイルス5'長末端反復配列(LTR)と、

(b) 本発明1021~1030のいずれかの発現カセットと、

(c) レンチウイルス3'LTRと

を含み、複製能力を有しない、組換えレンチウイルスゲノム。

[本発明1032]

本発明1031の組換えレンチウイルスゲノムを含む、トランスファープラスミド。

[本発明1033]

本発明1031の組換えレンチウイルスゲノムを含む、レンチウイルス粒子。

[本発明1034]

本発明1033のレンチウイルス粒子を含む、医薬組成物。

[本発明1035]

本発明1021~1030のいずれかの発現カセットを含む、改変細胞。

[本発明1036]

本発明1031の組換えレンチウイルスゲノムを含む、改変細胞。

[本発明1037]

内因性機能性TCIRG1遺伝子を欠く、本発明1036の改変細胞。

[本発明1038]

乳児性悪性大理石骨病(IMO)を有するかまたは有する疑いがある対象に由来する、本発明1036または1037の改変細胞。

[本発明1039]

機能性TCIRG1遺伝子を有する破骨細胞において観察されるTCIRG1の発現レベルに類似したレベルで、TCIRG1またはその機能的バリエーションを発現する、本発明1036~1038のいずれかの改変細胞。

[本発明1040]

IMOを有していないかまたは有する疑いのない対象に由来する破骨細胞において観察されるTCIRG1の発現レベルに類似したレベルで、TCIRG1またはその機能的バリエーションを発現する、本発明1036~1039のいずれかの改変細胞。

[本発明1041]

造血幹細胞(HSC)である、本発明1036~1040のいずれかの改変細胞。

[本発明1042]

CD34+前駆細胞である、本発明1036~1041のいずれかの改変細胞。

[本発明1043]

任意選択的にG-CSF、プレリキサホル(plerixafor)、またはG-CSFとプレリキサホルの組み合わせの投与によるHSCの動員後に、IMOを有するかまたは有する疑いがある対象からアフエーシスによって単離されたHSCに由来する、本発明1041または1042のいずれかの改変細胞。

[本発明1044]

磁気捕捉によりCD34+細胞が濃縮された細胞の集団に由来する、本発明1035~1043のいずれかの改変細胞。

[本発明1045]

本発明1035~1044のいずれかの改変細胞を含む、医薬組成物。

[本発明1046]

IMOを有するかまたは有する疑いがある対象の1つ以上の細胞を改変するインビトロでの方法であって、

(a) G-CSF、プレリキサホル、またはG-CSFとプレリキサホルの組み合わせを含む組成物を前記対象に投与することによって前記対象から動員された末梢血単核細胞(PBMC)を提供することと、

10

20

30

40

50

( b ) 磁気分離によって前記 P B M C から C D 3 4 + 細胞を濃縮し、 C D 3 4 に富む細胞の集団を生成することと、

( c ) 前記 C D 3 4 に富む細胞を、 5 ' から 3 ' の順序で

( i ) レンチウイルス 5 ' 長末端反復配列 ( L T R )、

( i i ) 本発明 1 0 2 1 ~ 1 0 3 0 のいずれかの発現カセット、および

( i i i ) レンチウイルス 3 ' L T R

を含む組換えレンチウイルスゲノムを含むレンチウイルス粒子と接触させることと

を含み、前記組換えレンチウイルスゲノムが複製能力を有しない、方法。

[本発明 1 0 4 7]

乳児性悪性大理石骨病 ( I M O ) を有するかまたは有する疑いがある対象において I M O を治療する方法であって、本発明 1 0 3 5 ~ 1 0 4 4 のいずれかの改変細胞または本発明 1 0 4 5 の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

10

[本発明 1 0 4 8]

T C I R G 1 またはその機能的バリエントを発現する改変細胞を H S C ニッチに再配置させる、本発明 1 0 4 7 の方法。

[本発明 1 0 4 9]

T C I R G 1 またはその機能的バリエントを発現する改変細胞を破骨細胞ニッチに再配置させる、本発明 1 0 4 7 または 1 0 4 8 の方法。

[本発明 1 0 5 0]

I M O を治療する、改善する、予防する、低減させる、阻害する、または緩和する、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 4 9 のいずれかの方法。

20

[本発明 1 0 5 1]

治療された対象の平均全生存期間を、少なくとも 1 年、 2 年、 3 年、 4 年、 5 年、 6 年、 7 年、 8 年、 9 年、 1 0 年、またはそれ以上、延長させる、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 0 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 5 2]

I M O による前記対象の死を予防する、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 1 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 5 3]

前記対象がヒトである、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 2 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 5 4]

前記対象が、治療前に I M O の症状を呈した、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 3 のいずれかの方法。

30

[本発明 1 0 5 5]

前記対象が、治療前に T C I R G 1 の発現の減少または検出不能な発現を有すると特定された、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 4 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 5 6]

前記対象が、変異 T C I R G 1 遺伝子を有すると特定された、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 5 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 5 7]

前記対象が、乳児である、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 6 のいずれかの方法。

40

[本発明 1 0 5 8]

自家治療を含む、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 7 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 5 9]

投与が、静脈内注入を介して実施される、本発明 1 0 4 7 ~ 1 0 5 8 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 6 0]

乳児性悪性大理石骨病 ( I M O ) を治療または予防するための薬剤の調製における使用のための組換えレンチウイルスゲノムであって、前記レンチウイルスゲノムが、 5 ' から 3 ' の順序で、

( i ) レンチウイルス 5 ' 長末端反復配列 ( L T R ) と、

( i i ) 本発明 1 0 2 1 ~ 1 0 3 0 のいずれかの発現カセットと、

50

( i i i ) レンチウイルス 3 ' L T R と  
を含み、前記組換えレンチウイルスゲノムが複製能力を有しない、組換えレンチウイルス  
ゲノム。

[本発明 1 0 6 1]

組換えレンチウイルスゲノムを含む、乳児性悪性大理石骨病 ( I M O ) を治療または予  
防するための薬剤の調製における使用のためのレンチウイルス粒子であって、

前記レンチウイルスゲノムが、5 ' から 3 ' の順序で、

( i ) レンチウイルス 5 ' 長末端反復配列 ( L T R ) と、

( i i ) 本発明 1 0 2 1 ~ 1 0 5 0 のいずれかの前記発現カセットと、

( i i i ) レンチウイルス 3 ' L T R と

を含み、前記組換えレンチウイルスゲノムが複製能力を有しない、レンチウイルス粒子。

[本発明 1 0 6 2]

本発明 1 0 2 4 ~ 1 0 3 0 のいずれかの発現カセットを含む、トランスファープラスミ  
ド。

[本発明 1 0 6 3]

R N A - O U T 配列をさらに含む、本発明 1 0 6 2 のトランスファープラスミド。

[本発明 1 0 6 4]

前記 R N A - O U T 配列が配列番号 2 2 である、本発明 1 0 6 3 のトランスファープラ  
スミド。

[本発明 1 0 6 5]

前記 R N A - O U T 配列が、前記トランスファープラスミドがパッケージング細胞株に  
おいて安定的に増殖することができるように構成されている、本発明 1 0 6 2 または本発  
明 1 0 6 3 のトランスファープラスミド。

[本発明 1 0 6 6]

レンチウイルス粒子を産生する方法であって、トランスファープラスミドが複製するよ  
うに、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 1 9 または本発明 1 0 6 2 ~ 1 0 6 5 のいずれかのトランス  
ファープラスミドを用いて細菌細胞を形質転換することと、複製した前記トランスファ  
ープラスミドを単離することと、複製した前記トランスファープラスミドおよび任意選択的  
に 1 つ以上の追加のプラスミドをパッケージング細胞株に形質導入ことと、を含み、それ  
によって前記レンチウイルス粒子が産生される、方法。

[本発明 1 0 6 7]

本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 1 9 または本発明 1 0 6 2 ~ 1 0 6 5 のいずれかのトランスファ  
ープラスミドおよび任意選択的に 1 つ以上の追加のプラスミドをパッケージング細胞株に  
トランスフェクトすることと、前記パッケージング細胞株を培養することと、を含む、レ  
ンチウイルス粒子を産生する方法。

[本発明 1 0 6 8]

前記トランスファープラスミドが安定的に増殖する、本発明 1 0 6 7 の方法。

[本発明 1 0 6 9]

前記トランスファープラスミドが、振とうフラスコまたは少なくとも 1、2、3、4、  
5、6、または 7 日間の発酵を使用して、細菌宿主において 3 0 ~ 3 7 で安定的に増殖  
する、本発明 1 0 6 8 の方法。

[本発明 1 0 7 0]

本発明 1 0 6 6 ~ 1 0 6 9 のいずれかの方法に従って産生された、レンチウイルス粒子。

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかで  
あり、それらによって包含される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 0 】

【図 1】図 1 は、T C I R G 1 ( p C C L . P P T . E F S . t c i r g 1 h . w p r e ) をコードするレンチウイルス遺伝子療法ベクターを産生するためのトランスファープラ  
スミドの図を提供する。

10

20

30

40

50

【図2】図2は、5'から3'の順番で、伸長因子1 - ショート (EFS) プロモーター (下線、配列番号2)、TCIRG1をコードするポリヌクレオチド (黒地に白の文字、配列番号3)、およびウッドチャック肝炎ウイルス (WHP) 転写後調節エレメント (WPRE) (下線および太字、配列番号4)を含む、発現カセット (配列番号1)の遺伝子配列を示す。

【図3】図3A~3Bは、2つの異なるレンチウイルスプラスミドの安定性の比較を提供する。図3Aは、制限酵素で消化されていないか (「アンカット (Uncut)」、またはAflIII (「AflIII」) またはAflIIIおよびNarI (「AflIII/NarI」) で消化されたプラスミドpRRL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreを示す臭化エチジウムで染色されたアガロースゲルの写真を示す。図3Bは、制限酵素で消化されていないか (「アンカット」)、またはAflIII (「AflIII」) またはAflIIIおよびNarI (AflIII/NarI) で消化されたプラスミドpCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreを示す臭化エチジウムで染色されたアガロースゲルの写真を示す。図3Cは、pRRL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreおよびpCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreプラスミドの概略図を示す。

10

【図4】図4は、レンチウイルス粒子製造のための例示的なプロセスを示す。

【図5】図5A~5Bは、形質導入の6日後 (図5A) および12日後 (図5B) のバルクCD34+細胞液体培養中のベクターコピー数 (VCN)を示す。VCNは、形質導入されたCD34+細胞をSCGM完全培地中で培養した後に抽出されたgDNAのqPCRにより評価した。各ドナーに対するVCNおよび平均は、各形質導入条件について表される。

20

【発明を実施するための形態】

【0071】

詳細な説明

本発明者らは、TCIRG1をコードするレンチウイルスベクターで形質導入された自家細胞の移植が、乳児性悪性大理石骨病 (IMO) の治療に効果的であることを示した。さらに、TCIRG1をコードする遺伝子療法ベクターの発現カセット配列に特定の配列要素を含めることにより、IMOに対する安全かつ有効な遺伝子療法がもたらされる。本開示は、レンチウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターを産生するのに有利な安定的トランスファープラスミドを含む、TCIRG1をコードするプラスミドを提供する。

30

【0072】

ベクターおよびプラスミド

発明者らは驚くべきことに、TCIRG1遺伝子療法のためのレンチウイルスベクターの大規模な産生が、(i) pRRLベクター骨格をpCCLベクター骨格に置き換えることおよび、(ii) pCCL骨格の従来抗生物質耐性カセットをRNA-OUT選択マーカーに置き換えること、の2つの方法で所望の発現カセットを含有するpRRLプラスミドを改変することによって、改善されることを発見した。次に、改善されたプラスミドを、ヘルパープラスミドと共にレンチウイルス粒子産生系にトランスフェクトして、所望のレンチウイルスベクターを産生する。

40

【0073】

結果として得られるTCIRG1遺伝子療法のためのpCCL/RNA-OUTベクター (例えば、図1に図示されたベクター) は、安定性を改善し、E.coliベースのプラスミド産生からのプラスミド収率の向上に反映され、精製プラスミド中の望ましくない組み換え産物のレベルが低減される (実施例1および図3A~3Cに示される)。トランスファープラスミドに対するこの改善により、臨床試験および使用に十分な収率で、TCIRG1発現カセットを含むレンチウイルス粒子の製造が可能となる。本明細書に提供されるさらなるデータは、本明細書に開示される方法および組成物を使用して産生されたレンチウイルス粒子が、臨床的に意義のあるベクターコピー数 (VCN) レベルに達するの

50

に十分な効率でCD34<sup>+</sup>細胞に形質導入されることを示す。

【0074】

いくつかの実施形態では、本開示は、第三世代のレンチウイルスベクター系で使用されるpCCLTランスファープラスミドに基づくレンチウイルスベクターであるトランスファープラスミドを提供する。pCCLTランスファープラスミドは、キメラサイトメガロウイルス(CMV)-HIV 5'LTRおよびベクター骨格を含有し、この中で、シミアンウイルス40ポリアデニル化および(エンハンサーを欠く)複製起点配列は、HIV 3'LTRの下流に含まれ、HIV組込み部位から残っているヒト配列の大部分を置き換える。CCLT 5'ハイブリッド長末端反復配列(LTR)は、HIV-1 LTRのR領域に結合したサイトメガロウイルス(CMV)のエンハンサーおよびプロモーター(転写開始部位に対してヌクレオチド-673~-1、GenBankアクセッション番号K03104)である。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、上流のRREおよびcPPT/CTSエレメントと下流のWPREエレメントとを有するTCIRG1遺伝子に連結されたEFSプロモーターを含む(図1)。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、上流のRREおよびcPPT/CTSエレメントと下流WPREエレメントとを有するTCIRG1遺伝子に連結されたPGKプロモーター(配列番号24)を含む。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、RNA-OUTエレメントを含む。有利なことに、RNA-OUT配列は、パッキング細胞株におけるトランスファープラスミドの安定的な増殖に寄与する。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、抗生物質耐性遺伝子、例えば、AmpRを含まない。

10

20

【0075】

いくつかの実施形態において、PGKプロモーターは、配列番号24と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、PGKプロモーターは、配列番号24と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、PGKプロモーターは、配列番号24の配列を有する。

30

```

GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAAGGCAGCCCTGGGGTTT
GCGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGA AAC
GCAGCGGCGCCGACCCCTGGGTCTCGCACATTCCTTACGTC
CGTTTCGCAGCGTCACCCGGATCTTCGCCCGCTACCCCTTGTG
GGCCCCCGGCGACGCTTCTCTGCTCCGCCCCCTAAGTCGGG
AAGGTTCTTTGCGGTTTCGCGGCGTGGCCGGACGTGACAAAC
GGAAGCCGCACGCTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAG
CGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTG
TGGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAG
CGGCGGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCG
GTAGTGTGGGCCCTGTTCTCTGCCCGCGCGGTGTTCCGCAT
TCTGCAAGCCTCCGGAGCGCACGTCGGCAGTCGGCTCCCT
CGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCAAG(配列番号24)

```

40

【0076】

特定の実施形態では、トランスファープラスミドは、E.coli中で培養または増殖されたとき、同じ発現カセットを含む別のプラスミドよりも安定的であり、したがって、プラスミドの収率が高くなり、これはベクターの産生における使用に有利である。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、pRRL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreトランスファープラスミドよりも安定している。特定の実施形態では、同じ培養条件下で産生されるpRRL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreトランスファープラスミドの量と比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、または少なく

50

とも10倍多くトランスファープラスミドが産生される。

【0077】

特定の実施形態では、トランスファープラスミドは、pCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreまたはその機能的バリエーション、例えば、本明細書に開示されるものである。本開示は、特定の実施形態では、トランスファープラスミドpCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreまたはその機能的バリエーションを提供する。トランスファープラスミドpCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreは、配列番号23の配列を有してもよい。

【0078】

あるいは、トランスファープラスミドpCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreは、配列番号25の配列を有してもよく、配列GATCACGAGACTAGCCTCGAGAAGCTTGATCGATTGGCTCCGGTGCC(配列番号26)が削除される。

10

【0079】

配列番号25の配列は、環状プラスミドを表す。塩基対1でのEFSプロモーターで始まるように置換された同じ配列が、配列番号27として提供される。

【0080】

いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号23と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号23と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号23の配列を有する。

20

【0081】

いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号25と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号25と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号25の配列を有する。

30

【0082】

いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号27と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号27と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、配列番号27の配列を有する。

40

【0083】

いくつかの実施形態では、トランスファープラスミドは、表1に列挙されるベクター要素のうちの一つ以上を含む。

【0084】

(表1) pCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreベクター要素

名前	タイプ	最小-最大 参照配列内の位置 (ヌクレオチド)	長さ (塩基対)	配列番号
EFS	プロモーター	1-243	243	配列番号 2
TCIRG1	CDS	257-2,749	2,493	配列番号 3
WPRE	調節	2,782-3,384	603	配列番号 4
3'LTR	LTR	3,471-3,704	234	配列番号 28
SV40 ポリ(A)	ポリ A シグナル	3,776-3,907	132	配列番号 29
SV40ori	複製起点	3,917-4,076	160	配列番号 30
pUC 起点	複製起点	4,115-5,129	1,015	配列番号 31
RNA-OUT	リプレッサー	5,146-5,284	139	配列番号 32
CMV IE	プロモーター	5,334-5,910	577	配列番号 33
5-LTR	LTR	5,933-6,120	188	配列番号 34
psi	パッケージング	6,222-6,266	45	配列番号 35
gag	CDS	6,267-6,628	362	配列番号 36
RRE	調節	6,629-7,486	858	配列番号 37
cPPT/CTS	ポリプリントラクト	7,505-7,622	118	配列番号 38
-	骨格	3,776-7,622	3,847	配列番号 39

## 【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態では、レンチウイルス粒子は、pCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreを含む第三世代のレンチウイルスベクターシステムの一過性トランスフェクションによって生成される。

## 【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態において、発現カセットは、配列番号 1 と少なくとも 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、発現カセットは、配列番号 1 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、99%、または 100% の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、配列番号 1 の配列を有する。

## 【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、5' から 3' の順序で、EFSプロモーター、T細胞免疫調節因子 1, ATPase H+輸送 V0サブユニット a3 (TCIRG1) またはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチド、およびウッドチャック肝炎ウイルス (WHP) 転写後調節エレメント (WPRE) を含む。いくつかの実施形態では、EFSプロモーターは、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドに動作可能に連結される。関連する実施形態は、発現カセットを含むトランスファープラスミド、およびトランスファープラスミドを使用して産生されたベクターを含む。

## 【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、EFSプロモーターは、配列番号 2 と少なくとも 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、EFSプロモーターは、配列番号 2 と少なくとも 80%

、 85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、EFSプロモーターは、配列番号2の配列を有する。

GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA  
CAGTCCCCGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC  
CGGTGCCTAGAGAAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAGT  
GATGTCGTGTACTGGCTCCGCCCTTTTCCCGAGGGTGGGG  
GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT  
TTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGCCAGAACACAGGTGTCGTGA  
CGC (配列番号2)

10

【0089】

いくつかの実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、配列番号3と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、配列番号3と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、配列番号3の配列を有する。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、WPREは、配列番号4と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、WPREは、配列番号4と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、WPREは、配列番号4の配列を有する。

ATTCGAGCATCTTACC GCCATT TATACCCATATTTGTTCT  
GTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAA  
CAAAATGGTGGGGCAATCATT TACATTTT TAGGGATATGT  
AATTA CTAGTT CAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTT  
AAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCCTGTTAATC  
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATAT  
TCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCT  
GCTTTAATGCCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGG  
CTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTC  
TCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGC  
GTGGTGTGCTCTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGCT  
GGGGCATTGCCACCACTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTT  
CGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCC  
GCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGG  
GCACTGATAAATTCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTC  
CTTTCG (配列番号4)

30

40

【0091】

いくつかの実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、配列番号5と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、9

50

8%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションは、配列番号5の配列を有する。

M G S M F R S E E V A L V Q L F L P T A A A Y T C V S R L G E L G L V E F R D L  
 N A S V S A F Q R R F V V D V R R C E E L E K T F T F L Q E E V R R A G L V L P  
 P P K G R L P A P P P R D L L R I Q E E T E R L A Q E L R D V R G N Q Q A L R A  
 Q L H Q L Q L H A A V L R Q G H E P Q L A A A H T D G A S E R T P L L Q A P G G  
 P H Q D L R V N F V A G A V E P H K A P A L E R L L W R A C R G F L I A S F R E  
 L E Q P L E H P V T G E P A T W M T F L I S Y W G E Q I G Q K I R K I T D C F H  
 C H V F P F L Q Q E E A R L G A L Q Q L Q Q Q S Q E L Q E V L G E T E R F L S Q  
 V L G R V L Q L L P P G Q V Q V H K M K A V Y L A L N Q C S V S T T H K C L I A  
 E A W C S V R D L P A L Q E A L R D S S M E E G V S A V A H R I P C R D M P P T  
 L I R T N R F T A S F Q G I V D A Y G V G R Y Q E V N P A P Y T I I T F P F L F  
 A V M F G D V G H G L L M F L F A L A M V L A E N R P A V K A A Q N E I W Q T F  
 F R G R Y L L L M G L F S I Y T G F I Y N E C F S R A T S I F P S G W S V A A  
 M A N Q S G W S D A F L A Q H T M L T L D P N V T G V F L G P Y P F G I D P I W  
 S L A A N H L S F L N S F K M K M S V I L G V V H M A F G V V L G V F N H V H F  
 G Q R H R L L L E T L P E L T F L L G L F G Y L V F L V I Y K W L C V W A A R A  
 A S A P S I L I H F I N M F L F S H S P S N R L L Y P R Q E V V Q A T L V V L A  
 L A M V P I L L L G T P L H L L H R H R R R L R R R P A D R Q E E N K A G L L D  
 L P D A S V N G W S S D E E K A G G L D D E E E A E L V P S E V L M H Q A I H T  
 I E F C L G C V S N T A S Y L R L W A L S L A H A Q L S E V L W A M V M R I G L  
 G L G R E V G V A A V V L V P I F A A F A V M T V A I L L V M E G L S A F L H A  
 L R L H W V E F Q N K F Y S G T G Y K L S P F T F A A T D D (配列番号5)

10

20

【0092】

一実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、ヒト宿主細胞における発現のためにコドン最適化されている。一実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、まれに表されるコドンをより頻繁に表されるコドンで置き換えることによって発現を増強するように、改変されるか、または「コドン最適化」される。一実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化されていない。一実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、改変されていない。一実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化されていない。一実施形態では、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、天然ポリヌクレオチド配列である。

30

40

【0093】

本明細書で使用される場合、用語「導入遺伝子」は、TCIRG1のアイソフォームまたはその機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドを指す。

【0094】

コード配列は、翻訳のためのアミノ酸をコードするmRNA配列の一部である。翻訳中、61個のトリヌクレオチドコドンの各々が、20個のアミノ酸のうちの一つに翻訳され、遺伝コードにおいて縮重性または冗長性をもたらす。しかしながら、異なる細胞タイプ、および異なる動物種は、異なる頻度で同じアミノ酸をコードするtRNA（各々、アンチコドン）を有する）を利用する。遺伝子配列が、対応するtRNAによってまれに表されるコドンを含む場合、リボソーム翻訳機構は速度を緩め、効率的な翻訳を妨げる場合

50

がある。特定の種について「コドン最適化」を介して、発現を改善することができ、コード配列は、同じタンパク質配列をコードするように改変されるが、高度に発現されたヒトタンパク質によって高度に表され、および/または利用されるコドンを利用する (Cid-Arregui et al., 2003; J. Virol. 77: 4928)。

【0095】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子のコード配列は、哺乳類または霊長類においてまれに発現されるコドンを、霊長類において頻繁に発現されるコドンで置換するように改変される。例えば、いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、参照ポリペプチド (例えば、野生型TCIRG1、配列番号3) と少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドをコードし、コード配列の少なくとも1つのコドンは、上記または本明細書に開示される配列において、対応するコドンよりも高いヒトにおけるtRNA頻度を有する。

10

【0096】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号3よりも少ない代替のオープンリーディングフレームを含む。一実施形態では、導入遺伝子は、所望の導入遺伝子をコードしないオープンリーディングフレーム(ORF)の終了または除去によって発現を増強するように改変される。オープンリーディングフレーム(ORF)は、開始コドンに続く核酸配列であり、終止コドンを含有しない。ORFは、順方向または逆方向であってもよく、対象となる遺伝子と比較して、「インフレーム」または「アウトオブフレーム」であってもよい。こうしたオープンリーディングフレームは、対象となる遺伝子と共に発現カセットに発現される可能性を有し、望ましくない有害作用をもたらす可能性がある。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、コドン使用をさらに変更することによってオープンリーディングフレームを除去するために改変されている。これは、1つ以上の開始コドン(ATG)を除去すること、および/または1つ以上の終止コドン(TAG、TAA、またはTGA)を所望のORFに対して逆方向またはアウトオブフレームに導入することによって行われるが、一方で、対象となる遺伝子においてコードされたアミノ酸配列を保持し、任意選択的に、高度に利用されるコドンを維持する(すなわち、頻度<20%を有するコドンを回避する)。

20

【0097】

本開示の変形では、導入遺伝子コード配列は、コドン最適化および非導入遺伝子ORFの除去のいずれかによって、または両方の技術を使用して最適化されてもよい。いくつかの事例では、コドン最適化中に導入されたORFを除去するために、コドン最適化後に非導入遺伝子ORFを除去または最小化する。

30

【0098】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号3よりも少ないCpG部位を含有する。理論に拘束されるものではないが、ポリヌクレオチド配列中のCpG部位の存在は、ポリヌクレオチド配列を含むウイルスベクターに対する宿主の望ましくない免疫反応と関連すると考えられる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、CpG部位の数を減少させるよう設計される。例示的な方法は、米国特許出願公開第US2002/0065236A1号に提示されている。

40

【0099】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号3よりも少ないクリプティックスプライス部位(cryptic splice site)を含有する。最適化のために、GeneArt(登録商標)ソフトウェアを使用して、例えば、転写サイレンシングを回避するため、GC含量を増加させ、および/またはクリプティックスプライス部位を除去し、したがって導入遺伝子の発現を増加させることができる。あるいは、当技術分野で周知の任意の最適化方法を使用してよい。クリプティックスプライス部位の除去は、例えば、国際特許出願公開第WO2004/015106A1号に記載されている。

【0100】

50

また、本明細書では、TCIRG1、例えば、本明細書に開示されるTCIRG1配列をコードする発現カセットおよび遺伝子療法ベクターも開示されており、この配列は、コンセンサス最適コザック配列、全長ポリアデニル化（ポリA）配列（または切断されたポリAの全長ポリAでの置換）、および最小または上流のない（すなわち、5'）開始コドン（すなわち、ATG部位）を含む。

【0101】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、5'長末端反復配列（LTR）、エンハンサー/プロモーター領域、コンセンサス最適コザック配列、導入遺伝子（例えば、本明細書に開示されるTCIRG1をコードする導入遺伝子）、全長ポリA配列を含む3'非翻訳領域、および3'LTRのうちの2つ以上を含有する。

【0102】

一実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子に動作可能に連結されたコザック配列を含む。一実施形態では、コザック配列は、配列番号6を含むか、または配列番号6からなるコンセンサス最適コザック配列である。

GCCGCCACCATGG（配列番号6）

【0103】

様々な実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子に動作可能に連結された代替のコザック配列を含む。一実施形態では、コザック配列は、配列番号14～18のうちのいずれか1つを含むか、またはそれらからなる、代替のコザック配列である。

(gcc)gccRccAUGG（配列番号14）

AGNNAUGN（配列番号15）

ANNAUGG（配列番号16）

ACCAUGG（配列番号17）

GACACCAUGG（配列番号18）

【0104】

配列番号14では、小文字は、塩基がやはり変化し得る位置の最も一般的な塩基を示し、大文字は、高度に保存された塩基を示し、アデニンまたはグアニンを示す。配列番号14では、括弧内の配列（gcc）は任意である。配列番号15～17では、「N」は任意の塩基を示す。

【0105】

様々な配列を、このコンセンサス最適コザック配列の代わりに、翻訳開始部位として使用することができるが、他の配列を特定し、試験することは、当業者の範囲内である。Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115(4): 887-903 (1991)を参照されたい。

【0106】

一実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子に動作可能に連結された全長ポリA配列を含む。一実施形態では、全長ポリA配列は配列番号7を含む。

TGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTTCATTGCAATAGTGTGT  
TGGAAATTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGA  
GGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTA  
GAGTTTGGCAAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAAC  
AAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGC  
CCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCATAGAAAAGCCTTGAC  
TTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTT  
TTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTAC  
TAGCCAGATTTTTCTCTCTCTGACTACTCCAGTCAAT  
AGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATC（配列番号7）

【0107】

10

20

30

40

50

限定されるものではないが、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル ( b G H p A ) ( 配列番号 1 9 )、S V 4 0 初期 / 後期ポリアデニル化シグナル ( 配列番号 2 0 )、およびヒト成長ホルモン ( H G H ) ポリアデニル化シグナル ( 配列番号 2 1 ) を含む、本開示の発現カセットに様々な代替のポリ A 配列を使用してもよい。

T C G A C T G T G C C T T C T A G T T G C C A G C C A T C T G T T G T T T G C C C C T C C C C G T G C C T T C C T T G A C C C T G G A A G G T G C C A C T C C C A C T G T C C T T T C C T A A T A A A A T G A G G A A A T T G C A T C G C A T T G T C T G A G T A G G T G T C A T T C T A T T C T G G G G G T G G G G T G G G G C A G G A C A G C A A G G G G A G G A T T G G G A G G A C A A T A G C A G G C A T G C T G G G A T G C G G T G G G C T C T A T G G C T T C T G ( 配列番号 1 9 )

10

C A G A C A T G A T A A G A T A C A T T G A T G A G T T T G G A C A A A C C A C A A C T A G A A T G C A G T G A A A A A A T G C T T T A T T T G T G A A A T T T G T G A T G C T A T T G C T T T A T T T G T A A C C A T T A T A A G C T G C A A T A A A C A A G T T A A C A A C A A C A A T T G C A T T C A T T T T A T G T T T C A G G T T C A G G G G A G A T G T G G G A G G T T T T T A A A G C A A G T A A A A C C T C T A C A A A T G T G G T A ( 配列番号 2 0 )

C T G C C C G G G T G G C A T C C C T G T G A C C C C T C C C C A G T G C C T C T C C T G G C C C T G G A A G T T G C C A C T C C A G T G C C C A C C A G C C T T G T C C T A A T A A A A T T A A G T T G C A T C A T T T T G T C T G A C T A G G T G T C C T T C T A T A A T A T T A T G G G G T G G A G G G G G T G G T A T G G A G C A A G G G C C C A A G T T G G G A A G A A A C C T G T A G G G C C T G C ( 配列番号 2 1 )

20

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、ポリ A 配列の活性断片を含む。特定の実施形態では、ポリ A 配列の活性断片は、例えば、本明細書に開示されるポリ A 配列のいずれかの 2 0 塩基対 ( b p ) 未満、5 0 b p 未満、1 0 0 b p 未満、または 1 5 0 b p 未満を含むか、またはそれからなる。

【 0 1 0 9 】

いくつかの事例では、発現カセットが競合する O R F を含有しないことを保証することによって、導入遺伝子の発現が増加する。一実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子の開始コドンの 5 ' から 2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0 または 5 0 0 塩基対内に開始コドンを含まない。一実施形態では、発現カセットは、導入遺伝子の開始コドンの 5 ' に開始コドンを含まない。

30

【 0 1 1 0 】

一実施形態では、発現カセットは、5 ' から 3 ' の方向に、動作可能に連結された、第 1 の逆末端反復配列 ( i n v e r s e t e r m i n a l r e p e a t )、エンハンサー / プロモーター領域、イントロン、コンセンサス最適コザック配列、導入遺伝子、全長ポリ A 配列を含む 3 ' 非翻訳領域、および第 2 の逆末端反復配列を含み、発現カセットは導入遺伝子の開始コドンの 5 ' に開始コドンを含まない。

40

【 0 1 1 1 】

一実施形態では、エンハンサー / プロモーター領域は、5 ' から 3 ' の方向に、C M V I E エンハンサーおよびニワトリベータ - アクチンプロモーターを含む。一実施形態では、エンハンサー / プロモーター領域は、C A G プロモーターを含む。本明細書で使用される場合、「C A G プロモーター」は、C M V 初期エンハンサー要素、ニワトリベータ - アクチンプロモーター、ニワトリベータ - アクチン遺伝子の第 1 のエクソンおよび第 1 のイントロン、ならびにウサギベータ - グロビン遺伝子のスプライスアクセプターを含むポリヌクレオチド配列を指す。

【 0 1 1 2 】

一実施形態では、エンハンサー / プロモーター領域は、伸長因子 1 ショートプロモ-

50

ター（EFSプロモーター）を含み、より短いイントロンなしバージョンの伸長因子1プロモーターである。本明細書で使用される場合、「EFSプロモーター」は、EF1alphaの短いイントロンなし形態を含むポリヌクレオチド配列を指す。EFSプロモーターは最近多くの臨床試験で使用されている。これは、近くのプロモーターの交差活性化（cross-activation）が減少した細胞由来エンハンサー/プロモーターであり、そのため仮説的に、遺伝毒性のリスクを減少させる。

【0113】

一実施形態では、発現カセットは、配列番号1から選択される配列と少なくとも95%の同一性を共有する。一実施形態では、発現カセットは、配列番号1から選択される配列に完全な同一性を共有するか、または配列番号1から選択される配列に対し少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を共有する。特定の実施形態では、発現カセットは、配列番号1から選択される配列と比較して、1つ以上の修飾を含む。特定の実施形態では、1つ以上の修飾は、1つ以上（例えば、全て）の上流ATG配列の除去、本明細書に開示するもののいずれかを含むがこれに限定されない最適化されたコンセンサスコザック配列もしくは別のコザック配列によるコザック配列の置換、および/または本明細書に開示するもののいずれかを含むがこれに限定されない全長ポリアデニル化配列または別のポリアデニル化配列によるポリアデニル化配列の置換のうちの1つ以上を含む。これらの例示的な発現カセット内の遺伝要素の例示的な構成を図1に記載する。

【0114】

関連の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される発現カセットを含む遺伝子療法ベクターを提供する。概して、本明細書に記載される遺伝子療法ベクターは、TCIRG1の1つ以上のアイソフォームをコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットを含み、これによりTCIRG1の発現が、欠損TCIRG1タンパク質発現レベルおよび/またはそれを必要とする対象（例えば、TCIRG1発現の欠損により少なくとも部分的に破骨細胞形成の欠損を特徴とする、乳児性悪性大理石骨病または別の障害を有する対象）における破骨細胞形成の欠損を部分的または完全に回復させることを可能にする。特定の実施形態では、発現カセットは、本明細書に開示されるTCIRG1をコードするポリヌクレオチド配列、例えば、配列番号3または配列番号3のいずれかと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。遺伝子療法ベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターであってもよい。例示的な非ウイルスベクターとして、例えば、ネイキッドDNA、カチオン性リポソーム複合体、カチオン性ポリマー複合体、カチオン性リポソームポリマー複合体、およびエクソソームが挙げられる。ウイルスベクターの例として、限定されないが、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、およびアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターが挙げられる。

【0115】

本発明の実施に有用な遺伝子送達ウイルスベクターは、分子生物学の技術分野で周知の方法論を利用して構築され得る。典型的には、導入遺伝子を担持するウイルスベクターは、導入遺伝子、適切な調節因子、およびウイルスタンパク質の産生に必要な要素をコードするポリヌクレオチドから構築され、これは細胞形質導入を媒介する。かかる組換えウイルスは、当技術分野で周知の技術によって、例えば、パッケージング細胞にトランスフェクトすることによって、またはヘルパープラスミドもしくはウイルスによる一過性トランスフェクションによって生成され得る。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例には、HeLa細胞、SF9細胞（任意選択的にバキュロウイルスヘルパーベクターを有する）、293細胞などが含まれるが、これらに限定されない。US2017/0218395A1に記載されるように、ヘルペスウイルス系システムを使用してAAVベクターを産生することができる。かかる複製欠損組換えウイルスを産生するための詳細なプロトコルは、例えば、W095/14785、W096/22378、米国特許第5,882,877号、米国特許第6,013,516号、米国特許第4,861,719号、米国特許第

10

20

30

40

50

5, 278, 056号およびW094/19478に見出すことができ、それぞれの完全な内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0116】

いくつかの実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクター、またはより具体的には、レンチウイルスベクターである。本明細書で使用される場合、用語「レトロウイルス」または「レトロウイルスの」は、そのゲノムRNAを線状二本鎖DNAコピーに逆転写し、その後そのゲノムDNAを宿主ゲノムに共有結合的に組み込むRNAウイルスを指す。レトロウイルスベクターは、遺伝子送達のための一般的なツールである(Miller, 2000, Nature, 357: 455-460)。ウイルスが宿主ゲノムに組み込まれると、それは“プロウイルス”と呼ばれる。プロウイルスは、RNAポリメラーゼIIの鋳型として機能し、ウイルスによってコードされるRNA分子の発現を指示する。

10

【0117】

例示的レトロウイルス(Retroviridae科)には、限定されないが、(1)モロニー Maus 白血病ウイルス(M-MuLV)、モロニー Maus 肉腫ウイルス(MoMSV)、マウス乳癌ウイルス(MuMTV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、およびネコ白血病ウイルス(FLV)などのガンマレトロウイルス属、(2)サル泡沫状ウイルスなどのスプーマウイルス属、(3)ヒト免疫不全ウイルス1型およびサル免疫不全ウイルスなどのレンチウイルス、が挙げられる。

【0118】

本明細書で使用される場合、用語「レンチウイルスの」または「レンチウイルス」は、複雑なレトロウイルスの群(または属)を指す。例示的レンチウイルスには、以下に限定されないが、HIV(ヒト免疫不全ウイルス、HIV1型およびHIV2型を含む)、ピスナ・マエディウイルス(VMV)ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)、ウマ感染性貧血ウイルス(EIAV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)、およびサル免疫不全ウイルス(SIV)が含まれる。一つの実施形態では、HIVベースのベクター骨格(すなわち、HIVシス作用配列要素)が好ましい。

20

【0119】

レトロウイルスベクター、より具体的には、レンチウイルスベクターは、本発明を実施するために使用され得る。したがって、本明細書で使用される場合、用語「レトロウイルスベクター」は、「レンチウイルスベクター」を含むことを意味し、本明細書で使用される場合、用語「レトロウイルス」は、レンチウイルスを含むことを意味する。

30

【0120】

ウイルスベクターという用語は、核酸を細胞内に導入することができるベクターまたはウイルス粒子、あるいは導入された核酸自体のいずれかを指し得る。ウイルスベクターは、主にウイルスに由来する構造的および/または機能的遺伝的要素を含有する。用語「レトロウイルスベクター」は、主にレトロウイルスに由来する構造的および機能的遺伝的要素、またはその一部分を含有するウイルスベクターを指す。用語「レンチウイルスベクター」は、主にレンチウイルスに由来する、LTRを含む、構造的および機能的遺伝的要素、またはその一部分を含有するウイルスベクターを指す。用語「ハイブリッド」は、ベクター、LTR、またはレトロウイルス配列、例えばレンチウイルス配列、および非レンチウイルス配列の両方を含有する他の核酸を指す。一実施形態では、ハイブリッドベクターは、逆転写、複製、組込みおよび/またはパッケージングのためのレトロウイルス配列、例えばレンチウイルス配列を含むベクターまたはトランスファープラスミドを指す。

40

【0121】

特定の実施形態では、用語「レンチウイルスベクター」および「レンチウイルス発現ベクター」は、レンチウイルストランスファープラスミドおよび/または感染性レンチウイルス粒子を指すように使用され得る。本明細書において、クローニング部位、プロモーター、調節エレメント、異種核酸などの要素に言及する場合、これらの要素の配列は、本発明のレンチウイルス粒子中にRNA形態で存在し、本発明のDNAプラスミド中にDNA

50

形態で存在することが理解されるべきである。

【0122】

ある特定の実施形態によると、ウイルスベクター骨格配列の大部分または全ては、レンチウイルス、例えば、HIV-1に由来する。しかしながら、レンチウイルス配列の多くの異なる供給源を使用することができ、特定のレンチウイルス配列における多数の置換および改変が、本明細書に記載される機能を実施するトランスファーベクターの能力を損なうことなく、対応され得ることが理解されるべきである。さらに、様々なレンチウイルスベクターが当該技術分野で既知であり、Naldini et al., (1996a, 1996b, and 1998)、Zufferey et al., (1997)、Dull et al., 1998, 米国特許第6,013,516号、および第5,994,136号を参照されたく、その多くは、本発明のウイルスベクターまたはトランスフェーラスミドを産生するように適合され得る。

10

【0123】

レンチウイルスベクターを調製する際に、例えば哺乳類細胞（例えば、HEK293T細胞）を含む、レンチウイルスベクターを産生するための任意の宿主細胞を用いることができる。宿主細胞はまた、レンチウイルスgag/pol遺伝子およびrev遺伝子が、レンチウイルスベクターゲノムが安定的に維持されパッケージされている宿主細胞または産生細胞において安定的に維持されるパッケージング細胞であってもよい。レンチウイルスベクターは、当該技術分野で公知の標準的な技術を使用して精製および製剤化される。

【0124】

ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書に開示される遺伝子発現カセット、遺伝子導入カセット、または組換えレンチウイルスベクターを含む細胞を含む。関連する実施形態では、細胞は、本明細書に開示される発現カセットを含む組換えレンチウイルスベクターを形質導入されているか、または本明細書に開示される発現カセットが細胞のゲノム内に組み込まれている。特定の実施形態では、細胞は、組換えレトロウイルスベクター、例えば、パッケージング細胞を産生するために使用される細胞である。

20

【0125】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、シュードタイプ化されている。例えば、異種env遺伝子を含むプラスミドを、シュードタイプ化に使用することができる。適切なenv遺伝子には、限定されるものではないが、VSV-Gが含まれる。

30

【0126】

いくつかの実施形態では、トランスフェーラスミドの骨格は、RNA-OUT配列を含む。RNA-OUTは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,109,012号および第9,737,620号に記載されるように、抗生物質の使用の範囲内でトランスフェーラスミドを保有する細胞の選択を容易する選択マーカースystemである。いくつかの実施形態では、RNA-OUT配列は、以下のものである。

G T A G A A T T G G T A A A G A G A G T C G T G T A A A A T A T C G A G T T C G  
C A C A T C T T G T T G T C T G A T T A T T G A T T T T G G C G A A A C C A T  
T T G A T C A T A T G A C A A G A T G T G T A T C T A C C T T A A C T T A A T G  
A T T T T G A T A A A A A T C A T T A G G (配列番号22)

40

【0127】

有利なことに、RNA-OUT配列は、パッケージング細胞株におけるトランスフェーラスミドの安定的な増殖に寄与する。

【0128】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号1と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドを含む、トランスフェー発現カセットを提供する。いくつかの実施形態において、発現カセットは、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%の同一性

50

を共有するポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、発現カセットは、配列番号1の配列を有する。

#### 【0129】

AAVは4.7kbの一本鎖DNAウイルスである。野生型AAVは非病原性であり、既知の疾患との病因との関連がないため、AAVに基づく組み換えベクターは優れた臨床安全性と関連している。さらに、AAVは、多数の組織において、非常に効率的な遺伝子送達および持続的導入遺伝子発現の能力を提供する。「AAVベクター」とは、アデノ随伴ウイルス血清型に由来するベクターを意味し、限定されるものではないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh.10、AAVrh.74等を含む。AAVベクターは、全体的にまたは部分的に削除された1つ以上のAAV野生型遺伝子、例えば、rep遺伝子および/またはcap遺伝子を有することができるが、機能的に隣接している末端逆位反復(ITR)配列を保持することができる。機能的ITR配列は、AAVビリオンの救出、複製およびパッケージングに必要である。したがって、AAVベクターは、ウイルスの複製およびパッケージング(例えば、機能性ITR)のためにシスで必要とされる少なくともそれらの配列を含むように本明細書に定義される。ITRは、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的救済、複製およびパッケージングを提供する限り、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失、または置換によって、改変され得る。AAVベクターは、限定されるものではないが、1つ以上の改変キャプシドタンパク質(例えば、VP1、VP2および/またはVP3)を含む、他の改変を含み得る。例えば、キャプシドタンパク質は、指向性を変化させ、および/または免疫原性を減少させるように改変されてもよい。AAV発現ベクターは、周知の技術を使用して構築されて、転写の方向に動作可能に連結された構成要素として、転写開始領域、対象のDNA(すなわち、TCIRG1遺伝子)および転写終結領域を含む制御要素を少なくとも提供する。

#### 【0130】

##### 医薬組成物および使用方法

本開示はまた、本明細書に開示される発現カセットまたはベクター(例えば、遺伝子療法ベクター)、および1つ以上の薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に開示される発現カセットを含むレンチウイルス粒子を含み、例えば、発現カセットは、TCIRG1をコードするコドン導入遺伝子、例えば配列番号3を含む。例えば、破骨細胞形成の欠乏を特徴とする障害(例えば、乳児性悪性大理石骨病)の予防または治療に使用するために、TCIRG1の1つ以上のアイソフォームをコードするポリヌクレオチドの核酸配列を含む治療有効量のレンチウイルス粒子を含む、医薬組成物を提供する。

#### 【0131】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるレンチウイルス粒子は、対象に由来する自家CD34+造血幹細胞(HSC)に形質導入するために使用され、したがって遺伝的欠損を補完する。形質導入は、インビボまたはエクスピボで起こりうる。CD34+に富む細胞集団は、いくつかの実施形態では、組換えヒトサイトカインを含むCellGenix幹細胞増殖培地(SCGM)中で培養され、5%CO<sub>2</sub>および5%O<sub>2</sub>中、37°Cでインキュベートされる。CD34+に富む細胞集団は、いくつかの実施形態では、前刺激に使用されるのと同じ添加剤と共にインキュベートされ、任意選択的に形質導入エンハンサー、および発現カセットEFS-TCIRG1-WPREを含むレンチウイルス粒子(例えば、MOI50で)の添加と共にインキュベートされる。形質導入後、細胞懸濁液は、いくつかの実施形態では、細胞の一部を洗浄し、上清を放出試験のために取り出し、製剤を注入準備のために凍結させる。いくつかの実施形態では、HSCは、患者をG-CSF、プレリキサホル、またはG-CSFとプレリキサホルの組み合わせで治療することによって動員される。次いで、HSCは、アフエレーシスにより患者の末梢血から収集される。CD34+細胞は、例えば、磁気捕捉(例えば、Miltenyi Biotec CliniMACシステムで)を使用して濃縮され、CD34+に富む細胞は、レンチウイル

ス粒子を用いて *ex vivo* で形質導入される。いくつかの実施形態では、形質導入プロセスは、ポリアキサマー (polyaxamer) およびプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) などの形質導入エンハンサーの使用を組み入れるが、これらに限定されない。

【0132】

いくつかの実施形態では、形質導入された HSC は、次いで、少なくとも  $2.0 \times 10^6$  個の CD34 + 細胞 / kg を注入することによって、対象、例えば、ヒト対象に移植される。いくつかの実施形態では、それらは、TCIRG1 発現細胞を HSC ニッチに再配置 (repopulate) させる。いくつかの実施形態では、それらは、TCIRG1 発現細胞を破骨細胞ニッチに再配置させる。

【0133】

例えば、破骨細胞形成の欠乏を特徴とする障害 (例えば、乳児性悪性大理石骨病) の予防または治療に使用するための、TCIRG1 の 1 つ以上のアイソフォームをコードするポリヌクレオチドの核酸配列を含む治療有効量の改変細胞を含む、医薬組成物もまた提供する。いくつかの実施形態では、改変細胞は、機能性 TCIRG1 遺伝子を有する破骨細胞において観察される TCIRG1 の発現レベルに類似したレベルで、TCIRG1 またはその機能的バリエーションを発現する。いくつかの実施形態では、改変細胞は、IMO を有していないかまたは有する疑いのある対象に由来する破骨細胞において観察される TCIRG1 の発現レベルに類似したレベルで、TCIRG1 またはその機能的バリエーションを発現する。いくつかの実施形態では、改変細胞は、造血幹細胞 (HSC) である。いくつかの実施形態では、改変細胞は、CD34 + 前駆細胞である。いくつかの実施形態では、改変細胞は、IMO を有するかまたは有する疑いがある対象からアフエーシスによって単離された HSC に由来する。いくつかの実施形態では、改変細胞は、対象にとって自家のものである。いくつかの実施形態では、改変細胞は、G-CSF、プレリキサホル、または G-CSF とプレリキサホルの組み合わせの投与による HSC の動員後に、IMO を有するかまたは有する疑いがある対象からアフエーシスにより単離された、HSC に由来する。いくつかの実施形態では、改変細胞は、磁気捕捉により CD34 + 細胞が濃縮された細胞の集団に由来する。いくつかの実施形態では、改変細胞は、本明細書に開示されるベクター、例えば、本明細書に開示されるトランスファープラスミドを使用して産生されるレンチウイルスベクターを使用して形質導入された。

【0134】

発現カセットまたはレンチウイルス粒子もしくは改変細胞を含有する医薬組成物は、例えば、脳室内、心筋内、冠動脈内、静脈内、動脈内、腎内、尿道内、硬膜外、または筋肉内投与のための選択された投与モードに好適な任意の形態であってもよい。1 つ以上の TCIRG1 アイソフォームをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子改変細胞は、単独の活性剤として、または他の活性剤と組み合わせて、単位投与形態で、従来の医薬支持体との混合物として、動物およびヒトに投与することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本開示の遺伝子療法ベクターのいずれかを用いて *ex vivo* で形質導入された細胞を含む。

【0135】

様々な実施形態において、医薬組成物は、注射され得る製剤に薬学的に許容されるビヒクル (例えば、担体、希釈剤、および賦形剤) を含有する。これらは、特に、等張性の滅菌生理食塩水溶液 (リン酸ナトリウムもしくはリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウムもしくはマグネシウムなど、またはそのような塩の混合物) であってもよく、または場合に応じて、滅菌水もしくは生理食塩水を添加すると注射用溶液の構成を可能にする乾燥、特に凍結乾燥組成物であってもよい。注射用に好適な例示的な医薬品形態として、例えば、滅菌水溶液または分散液、ゴマ油、落花生油、または水性プロピレングリコールを含む配合物、および滅菌注射液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。

【0136】

別の態様では、本開示は、それを必要とする対象において、乳児性悪性大理石骨病また

10

20

30

40

50

は別の障害の1つ以上の症状を予防する、軽減させる、改善する、低減させる、抑制する、排除する、および/または逆転させる方法を提供し、本開示の遺伝子療法ベクターを対象に投与することを含む。用語「乳児性悪性大理石骨病」または「悪性乳児性大理石骨病」または「乳児常染色体劣性大理石骨病」または「乳児性大理石骨病」または「I M O」は、典型的には乳児期に現れる希少な骨硬化症型の骨格異形成症を指し、全身型骨化過剰症の独特のX線写真的外観 - 骨の過剰増殖を特徴とする。骨密度の全体的増加は、皮質の相対的な温存を伴う髄質部分に関する、特別な偏向を有する。骨髄腔の閉塞およびそれに続く細胞機能の低下は、重篤な血液学的合併症を引き起こす可能性がある。骨増殖に続発する視神経萎縮および脳神経損傷は、著しい病的状態をもたらす可能性がある。未治療の症例では、予後が非常に悪い単純X線写真は診断に重要な情報を提供する。また、臨床的

10

## 【0137】

一実施形態では、改変細胞、例えば、本開示のレンチウイルス粒子を形質導入された自家細胞は、非経口、静脈内、動脈内、心臓内、冠動脈内、心筋内、腎内、尿道内、硬膜外、および筋肉内からなる群から選択される経路を介して投与される。いくつかの実施形態では、改変細胞は、注入、例えば、静脈内注入によって投与される。一実施形態では、改変細胞は、複数回投与される。一実施形態では、改変細胞は、注入によって投与される。

## 【0138】

一実施形態では、本開示は、疾患または障害、任意選択的にI M Oを治療する方法をそれを必要とする対象に提供し、本開示に従って細胞を遺伝子療法ベクターと接触させ、細胞を対象に投与することを含む。一実施形態では、細胞は幹細胞であり、任意選択的に多能性幹細胞である。一実施形態では、幹細胞は骨細胞に分化することができる。一実施形態では、幹細胞は破骨細胞に分化することができる。一実施形態では、幹細胞は自家性である。一実施形態では、幹細胞はC D 3 4 + 幹細胞である。

20

## 【0139】

一実施形態では、対象は、I M Oまたは別の障害の症状を呈している。一実施形態では、対象は、減少したまたは検出不能なT C I R G 1発現を有するとして特定されている。一実施形態では、対象は、変異T C I R G 1遺伝子を有するとして特定されている。

## 【0140】

本明細書に記載される方法を使用した治療に適している対象/患者は、破骨細胞が不十分であることを特徴とする疾患または障害（例えば、I M O、ならびに破骨細胞形成の他の既知の障害のリスクを有する個人が含まれる。いくつかの実施形態では、対象は症状を示さない。いくつかの実施形態では、対象は、現在、症状を示している。そのような対象は、変異T C I R G 1遺伝子を有するか、またはT C I R G 1発現のレベルが減少したかまたは検出不能であるとして同定されている可能性がある。症状は、活発に現れていてもよく、または抑制もしくは制御されてもよく（例えば、投薬により）、または寛解であってもよい。対象は、例えば、資格を有する医師によって、障害と診断されても、診断されていないだけでもよい。

30

## 【0141】

定義

「T細胞免疫調節因子1, A T P a s e H + 輸送 V 0 サブユニット a 3 遺伝子」という用語は、互換的に核酸およびポリペプチド多型バリエーション、対立遺伝子、変異体、および種間相同体を指し、(1) T C I R G 1 核酸によってコードされるアミノ酸配列（例えば、G e n B a n k アクセッション番号 N M \_ 0 0 6 0 1 9 . 4 (バリエーション1)、N M \_ 0 0 6 0 5 3 . 3 (バリエーション2)、N M \_ 0 0 1 3 5 1 0 5 9 . 1 (バリエーション3)を参照されたい)と、またはT C I R G 1 ポリペプチドのアミノ酸配列（例えば、G e n B a n k アクセッション番号 N P \_ 0 0 6 0 4 4 . 1 (アイソフォームA)、N P \_ 0 0 6 0 4 4 . 1 (アイソフォームB)、N P \_ 0 0 1 3 3 7 9 8 8 . 1 (アイソフォームC)を参照されたい)と、好ましくは、少なくとも約25、50、100、200、300

40

50

、400、またはそれ以上のアミノ酸の領域にわたって、または全長にわたって、約90%を超えるアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%以上のアミノ酸配列同一性を有し、(2)TCIRG1ポリペプチドのアミノ酸配列(例えば、本明細書に記載されるTCIRG1ポリペプチド)、またはTCIRG1核酸(例えば、本明細書に記載されるTCIRG1ポリヌクレオチド)によってコードされるアミノ酸配列、およびその保存的に修飾されたバリエーション、を含む免疫原に対して産生される抗体、例えばポリクローナル抗体に結合し、(3)厳格なハイブリダイゼーション条件下で、TCIRG1タンパク質をコードする核酸配列に対応するアンチセンス鎖、およびその保存的に修飾されたバリエーションに特異的にハイブリダイズし、(4)TCIRG1核酸(例えば、本明細書に記載のTCIRG1ポリヌクレオチド、および本明細書に記載のTCIRG1ポリペプチドをコードするTCIRG1ポリヌクレオチド)と、好ましくは、少なくとも約25、50、100、200、500、1000、2000またはそれ以上のヌクレオチドの領域にわたって、または全長にわたって、約90%超、好ましくは約91%超、92%超、93%超、94%超、95%超、96%超、97%超、98%超、99%超、またはそれ以上のヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列、を有する。

10

#### 【0142】

TCIRG1遺伝子は、2つの主要なアイソフォームを含むいくつかのタンパク質アイソフォームをコードする。全長アイソフォームa(OC116)は、破骨細胞の細胞内コンパートメントおよび小器官のpHを含む、真核細胞の細胞内コンパートメントおよび小器官のpHの調節に関与する、液胞型H(+)-ATPaseのA3サブユニットをコードする。短いアイソフォームb(TIRC7)は、Tリンパ球の活性化および免疫反応において重要な役割を果たすT細胞特異的膜タンパク質をコードする。

20

#### 【0143】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関連する「同一の」または「同一性」割合という用語は、以下の配列比較アルゴリズムを使用して、または手動のアライメントおよび目視検査を使用して測定される、比較ウィンドウまたは指定された領域で最大相関性(maximum correspondence)について比較および配列比較を行う場合、同じであるか、または同じアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの特定のパーセンテージを有する(すなわち参照配列、例えば、本明細書に記載のTCIRG1ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と、特定の領域にわたり、少なくとも約80%の同一性、例えば、少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を共有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。その場合、そのような配列は、「実質的に同一」とは言われる。この定義はまた、試験配列の補完を指す。好ましくは、同一性は、少なくとも約25アミノ酸長またはヌクレオチド長の領域、例えば、50、100、200、300、400アミノ酸長またはヌクレオチド長の領域、または参照配列の全長にわたって存在する。

30

#### 【0144】

配列比較については、典型的には、一つの配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて部分配列の座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムのパラメータが指定される。デフォルトのプログラムパラメータを使用する、または代替パラメータを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性の割合を計算する。TCIRG1核酸およびタンパク質に対する核酸およびタンパク質の配列比較については、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムおよびデフォルトパラメータが使用される。

40

#### 【0145】

本明細書で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、20~600、通常では約50~約200、より通常では約100~約150からなる群から選択される連続位置の数のい

50

いずれか1つのセグメントへの参照を含み、配列は、2つの配列が最適に整列された後、同じ数の連続位置の参照配列と比較されてもよい。比較のための配列のアライメントの方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアライメントは、例えば、Smith & Watermanの局所相同性アルゴリズム、Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)によって、Needleman & Wunschの相同性アライメントアルゴリズム、J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)によって、Pearson & Lipmanの類似法の検索、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または手動のアライメントおよび目視検査(例えば、Ausubelら、eds., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)を参照のこと)によって、実施することができる。配列同一性および配列類似性の割合を決定するのに適したアルゴリズムの例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これはAltschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1977)およびAltschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)にそれぞれ記載される。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(ワールドワイドウェブ、ncbi.nlm.nih.gov)を通じて公開されている。

10

20

## 【0146】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であるという指標は、以下に記載されるように、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、第2の核酸によってコードされるポリペプチドに対して産生される抗体と免疫学的に交差反応性であることである。したがって、ポリペプチドは、典型的には、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合に、第2のポリペプチドに対し実質的に同一である。二つの核酸配列が実質的に同一であるという別の指標は、二つの分子またはその相補体が、厳しい条件下で互いにハイブリダイズすることである。さらに、二つの核酸配列が実質的に同一であるという別の指標は、同じプライマーを使用して配列を増幅することができることである。

30

## 【0147】

本明細書で使用される場合、「投与」は、局所投与および全身投与を指し、例えば、経腸投与、非経口投与、肺投与、および局所/経皮投与を含む。本明細書に記載の方法における使用を見出す化合物(例えば、1つ以上のTCIRG1アイソフォームをコードするポリヌクレオチド)の投与経路としては、対象に対して、例えば、経口(per os (P.O.))投与、経鼻または吸入投与、坐薬としての投与、局所接触、経皮的送達(例えば、経皮パッチを介して)、くも膜下腔内(IT)投与、静脈内(「iv」)投与、腹腔内(「ip」)投与、筋肉内(「im」)投与、病巣内投与、または皮下(「sc」)投与、または徐放装置、例えば、ミニ浸透圧ポンプの埋め込み、デポー製剤の投与等が挙げられる。投与は、非経口および経粘膜的(例えば、経口、鼻腔、膣、直腸、または経皮)を含む任意の経路によってもよい。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、腎内、尿道内、心臓内、冠動脈内、心筋内、皮内、硬膜外、皮下、腹腔内、脳室内、イオン泳動(ionophoretic)、および頭蓋内が含まれる。他の送達様式としては、限定されるものではないが、リポソーム製剤、静脈内注入、経皮パッチなどの使用が挙げられる。

40

## 【0148】

用語「全身投与」および「全身投与される」は、化合物または組成物が循環系を介して、薬学的作用の標的部位を含む体内の部位に送達されるように、化合物または組成物を哺乳類に投与する方法を指す。全身投与には、限定されないが、経口、鼻腔内、直腸および非経口(例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、経皮、および皮下などの消化管以外の)投与

50

が含まれる。

【0149】

用語「共投与」または「同時投与」は、例えば、化合物（例えば、TCIRG1ポリヌクレオチド）および/またはその類似体ならびに別の活性剤に関して使用される場合、両方が生理学的効果を同時に達成できるように、化合物および/または類似体ならびに活性剤を投与することを指す。しかしながら、二つの薬剤は一緒に投与される必要はない。特定の実施形態では、一つの薬剤の投与は、他方の投与に先行することができる。同時生理学的効果は、必ずしも循環中の両方の薬剤の存在を同時に必要としない。しかしながら、特定の実施形態では、共投与は、典型的には、任意の所与の用量についてそれらの最大血清濃度のかなりの割合（例えば、20%以上、例えば、30%もしくは40%以上、例えば、50%もしくは60%以上、例えば、70%もしくは80%もしくは90%以上）で、両方の薬剤が体内（例えば、血漿中）に同時に存在する結果となる。

10

【0150】

用語「有効量」または「医薬有効量」は、所望の結果、例えば、オートファジーの障害または欠乏を特徴とする疾患（例えば、IMO）の最終的な重症度を低減させるのに十分な量の1つ以上のTCIRG1アイソフォームの発現の増加、をもたらすために必要な1つ以上の組成物（例えば、遺伝子療法ベクター、改変細胞）の量および/または投与量、および/または投与レジメンを指す。

【0151】

「投与させること」という語句は、医療従事者（例えば、医師）、または対象の医療を管理する者が、対象に問題となる薬剤/化合物の投与を管理および/または許可する行為を指す。投与させることには、適切な治療または予防レジメンの診断および/または決定、ならびに/または対象に対する特定の薬剤/化合物の処方を伴いうる。こうした処方には、例えば、処方書の草案作成、医療記録の注釈付けなどが含まれうる。

20

【0152】

本明細書で使用される場合、用語「治療する」および「治療」は、当該用語が適用される疾患もしくは病態、または当該疾患もしくは病態の1つ以上の症状のいずれかの発症を遅らせること、進行を遅らせることもしくは逆転させること、重症度を減少させること、または軽減する（alleviating）もしくは予防することを指す。用語「治療する」および「治療」はまた、疾患または病態の1つ以上の症状を予防する、軽減させる（mitigating）、改善する、低減させる、抑制する、排除する、および/または逆転させることを含む。

30

【0153】

用語「軽減させる」は、その病理または疾患の1つ以上の症状の低減または排除、および/またはその病理または疾患の1つ以上の症状の発症率の減少または発症もしくは重症度の遅延、および/またはその病理または疾患の予防を指す。特定の実施形態では、病理または疾患の1つ以上の症状の低減または排除は、例えば、TCIRG1の1つ以上のアイソフォームの発現レベルの測定可能かつ持続的な増加を含み得る。

【0154】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という語句は、方法または組成物に列挙された活性医薬品の属または種を指し、さらに、それ自体は、列挙された表示または目的に対して実質的な活性を有しない他の薬剤を含み得る。

40

【0155】

用語「対象」、「個体」、および「患者」は、哺乳類、好ましくはヒトまたは非ヒト霊長類であるが、家畜化された哺乳類（例えば、イヌまたはネコ）、実験哺乳類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット）、および農業哺乳類（例えば、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ）を互換的に指す。様々な実施形態において、対象は、ヒト（例えば、成人男性、成人女性、青年男性、青年女性、男性子供、女性子供）であってもよい。

【0156】

用語「遺伝子導入」または「遺伝子送達」は、外来DNAを宿主細胞に確実に挿入する

50

ための方法またはシステムを指す。こうした方法は、組み込まれていない導入されたDNAの一過性の発現、染色体外複製および導入されたレプリコン（例えばエピソーム）の発現、または宿主細胞のゲノムDNAへの導入された遺伝物質の組み込みをもたらし得る。

【0157】

用語「ベクター」は、本明細書において、別の核酸分子を導入または輸送することができる核酸分子を指すために使用される。導入された核酸は、一般にベクター核酸分子に連結され、例えば、挿入される。ベクターは、細胞内の自律的複製または逆転写を方向付ける配列を含んでもよく、または宿主細胞DNAへの組み込みを可能にするのに十分な配列を含んでもよい。「ベクター」は遺伝子療法ベクターを含む。本明細書で使用される場合、用語「遺伝子療法ベクター」は、例えば、治療用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を対象に送達する、遺伝子療法の実施に使用できるベクターを指す。遺伝子療法ベクターは、治療的に活性なポリペプチド、例えば、TCIRG1、または対象に導入された場合に置換遺伝子療法に有用な他の遺伝子をコードする核酸分子（「導入遺伝子」）を含み得る。有用なベクターには、ウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0158】

本明細書で使用される場合、用語「発現カセット」は、該発現カセットに組み込まれる治療的に活性なポリペプチド（例えば、TCIRG1）をコードするポリヌクレオチド（例えば、導入遺伝子）の発現を駆動する適切な設定において能力を有するDNAセグメントを指す。宿主細胞に導入されると、発現カセットは特に、導入遺伝子をRNAに転写するように細胞の機構に指示することができ、その後RNAは、通常さらにプロセッシングされ、最終的に治療活性ポリペプチドに翻訳される。発現カセットは、遺伝子療法ベクター内に含まれてもよい。一般に、発現カセットという用語は、5'から5'LTRおよび3'から3'LTRのポリヌクレオチド配列を除外する。

20

【0159】

本明細書において参照および特定される全ての特許、特許刊行物、およびその他の刊行物は、参照によりその全体がすべての目的に対して個別におよび明示的に本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0160】

実施例1：トランスファープラスミドの安定的増殖

最小限のTCIRG1発現カセットであるEFS-TCIRG1-WPRE（配列番号1）を含む異なるプラスミドの安定性を試験した。アンピシリン耐性（Amp<sup>R</sup>）を有するプラスミド構築物pRRL.PPT.EFS.tcirg1h.wpre（図3C）は、プラスミドの低収率および不安定性を示す分解されたDNAの一般的なスメア（smear）によって示されるように（図3A）、パッケージング細胞株へトランスフェクションする前にプラスミドを増殖させるために使用されるE.coli細胞における培養中に、予想外に不十分な増殖および不安定性を示した。様々な他のプラスミド骨格も不安定性を示した（データは示さず）。しかしながら、最小発現カセットEFS-TCIRG1-WPRE（配列番号1）が、pRRLベクターからRNA-OUT配列を有するpCCLベクターにクローン化された場合（図3C）、得られたプラスミド構築物、pCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpre（配列番号27）は、E.coliで増殖させた場合、予想外に良好な増殖および安定性を示した。これは、高収率のプラスミドおよび観察された制限消化パターンによって示された（図3B）。完全ベクター配列は、配列番号27として提供され、各ベクター要素の位置は表2に提供される。

30

40

【0161】

（表2）pCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreベクター要素

50

名前	タイプ	最小-最大 参照配列内の位置 (ヌクレオチド)	長さ (塩基対)
EFS	プロモーター	1-243	243
TCIRG1	CDS	257-2,749	2,493
WPRE	調節	2,782-3,384	603
3'LTR	LTR	3,471-3,704	234
SV40 ポリ(A)	ポリ A シグナル	3,776-3,907	132
SV40ori	複製起点	3,917-4,076	160
pUC 起点	複製起点	4,115-5,129	1,015
RNA-OUT	リプレッサー	5,146-5,284	139
CMV IE	プロモーター	5,334-5,910	577
5-LTR	LTR	5,933-6,120	188
psi	パッケージング	6,222-6,266	45
gag	CDS	6,267-6,628	362
RRE	調節	6,629-7,486	858
cPPT/CTS	ポリプリントラクト	7,505-7,622	118

10

20

## 【0162】

レンチウイルスベクターは、パッケージングプラスミド (pCMV R8.91)、およびエンベローププラスミド (VSV-G pMDG) と共に、293T細胞へのpCCL/RNA-OUTベクターの一過性トランスフェクションによって産生され、図4に示されるプロトコルによって産生された。

## 【0163】

実施例2: pCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreを用いたIMO患者からの破骨細胞の骨吸収機能の回復

30

本実施例は、患者由来HSCにおけるレンチウイルス介在性TCIRG1遺伝子導入のためのpCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreの使用を示す。HSCは、実施例1に記載されるpCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreを担持するレンチウイルス粒子を用いて取得され、増殖し、および形質導入されて、遺伝子改変HSCが取得される。注入後、遺伝子改変されたHSCは破骨細胞に分化する。使用される方法は、基本的にMoscatelli et al. Hum. Gene Therap. 29: 938~949 (2017)に記載されている。

## 【0164】

IMO患者由来の末梢血または正常分娩由来の臍帯血(CB)の試料が取得される。これらの供給源由来の単核細胞は、Ficollを用いた密度勾配遠心分離を使用して単離され、CD34+細胞は、磁気活性化セルソーティング(MACS)カラム(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を使用して単核細胞画分から分離される。増殖のために、細胞を、ヒト組換えサイトカインM-CSF (50 ng/ml)、GM-CSF (30 ng/ml)、SCF (200 ng/ml)、IL-6 (10 ng/ml)、およびFlt3L (50 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis MN)を含むSFEM StemSpan培地 (StemCell Technologies, Vancouver, BC) 中で培養する。CD34+細胞は、24ウェルの細菌学的プレートを使用して1mlの培地中に $5 \times 10^4$ 細胞の密度で播種し、37°Cで1週間インキュベートした後、収集し、 $1 \times 10^5$  /

40

50

ウェルの密度で再播種する。7日目から、培地を、2～3日ごとに半枯湯 (demi-depletion) により交換する。移植については、CD34+細胞を、ヒト組換えサイトカインであるSCF (100 ng/ml)、Flt3L (100 ng/ml)、およびTPO (100 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis MN) を含むSFEM StemSpan培地 (StemCell Technologies社、バンクーバー、BC) 中で30時間培養する。

【0165】

形質導入は、RetroNectin (タカラバイオ、大津、日本) で被覆された24ウェルプレートで実施される。インビトロ実験では、3日目にCD34+細胞を、30の感染多重度 (MOI) での第1回目のヒットで6時間形質導入し、および7日目にMOI 30での2回目のヒットで6時間形質導入し、続いて骨髓性サイトカインカクテルで1週間培養し、その後に破骨細胞に分化させた。インビボ実験では、CD34+集団の幹/前駆細胞の性質を維持しながら効率的な形質導入を可能するため、短い形質導入プロトコルが使用される。単核細胞は単離され、1回目のヒット (MOI 30または100) を一晩、形質導入され、その後、2回目のヒット (MOI 30または100) で6時間、翌日に形質導入され、その後、細胞を対象 (マウスまたはヒト患者) に移植する準備が整う。

10

【0166】

破骨細胞形成は、50 ng/mlのM-CSFおよび50 ng/mlのRANKLの存在下で約10日間、分化させた後、細胞のさらなる分析のため4%ホルムアルデヒドによる細胞の固定またはウェスタンブロット分析のための細胞の溶解することによって評価できる。吸収は、c末端I型コラーゲン断片 (CTX-I) の放出、およびCa<sup>2+</sup>の培地への放出に対するアッセイ、および固定細胞のヘマトキシリン染色を使用した吸収ピットの形成の可視化によって評価される。

20

【0167】

動物試験では、形質導入された破骨細胞がNSGマウスに移植される。8～15週齢のNSGマウスを、300 cGyで亜致死的に照射し、6時間後に、尾静脈注射により、pCCL.PPT.EFS.tcirg1h.wpreに由来するレンチウイルス粒子を形質導入された1×10<sup>5</sup>個の非形質導入CB CD34+細胞またはIMO CD34+細胞を移植する。マウスは、移植後感染を避けるために、2週間、飲料水を介してシプロフロキサシンを投与される。末梢血は、異なる時点で採取されて、骨髓細胞は、マウスの終了後、大腿骨を乳鉢で粉砕することによって採取される。

30

【0168】

ベクターコピー数解析は、移植の9～19週間後にマウスから採取されたサンプルからの全骨髓ゲノムDNAに対して実施される。移植されたNSGマウスの末梢血および骨髓は、huCD45-APC陽性細胞の割合を決定することによってヒト再構成について分析される。系統解析については、細胞を、CD33-PEcy7、CD15-PEcy7、CD19-BV605、およびCD3-PEに対する抗体で染色した。

【0169】

上述の方法は、レンチウイルス介在性TCIRG1遺伝子導入および形質導入されたCD34+細胞の長期生着後のIMO患者からの破骨細胞の吸収機能の回復を確認するために使用される。

40

【0170】

実施例3：臨床的に確立された遺伝子導入プロトコルを使用したヒトCD34+に富む細胞のインビトロ遺伝子導入

本実施例は、(1) 生存CD34+細胞%および多系統分化能による形質導入CD34+細胞の表現型の特徴付け、および(2) ベクターコピー数 (液体培養およびコロニーの両方におけるVCN決定) による、実施例1に記載のプラスミドを使用した、EFS-TCIRG1-WPRE (配列番号25または27) のGMP前 (pre-GMP) バッチの適合性を示す。

【0171】

50

EFS - TCIRG1 - WPREを用いた形質導入後のmPB CD34+細胞の保存された表現型および多系統能力

GMP前のEFS - TCIRG1 - WPREバッチの性能を、他の障害の治療のために産生されたLV(4つのバッチ)と比較した。動員されたPB CD34+細胞を、想定されたIMO臨床試験で同様に標的細胞として使用した。様々なMOIを試験した。形質導入の20時間後に高細胞生存率(>95%)、すべてのベクターおよび試験されたMOIにわたって得られ、短期毒性がないことを示した。CD34+細胞の割合は、形質導入の直後に試験されたすべての条件で非常に高く(>97%)、液体培養の2日後、このタイプの培養で予想されるように、すべての条件において同等のレベルで時間の経過と共に次第に失われた。

10

#### 【0172】

形質導入されたCD34+細胞の多系統能力を、半固体メチルセルロース培地培養物中の分化CFUの定量化によって評価した。赤血球系および骨髄系を説明する、総CFUならびにBFU-E、CFU-GM、およびCFU-GEMMを評価した。EFS - TCIRG1 - WPREの存在は、モック対照と比較して、実験条件間でそれらの総数に有意差が観察されなかったため、CFU増殖に影響を与えなかった。いずれのコロニー型においてもモックと比較して差異は観察されなかったため、高いMOI値であってもEFS - TCIRG1 - WPREを用いた形質導入後のインピトロでの多系統能力の維持が確認された。

#### 【0173】

EFS - TCIRG1 - WPREは、mPB CD34+細胞の高い形質導入効率を示す治療の使用に適した形質導入効率を提供するために必要なEFS - TCIRG1 - WPREのベクター用量を決定するために、確立された臨床形質導入プロトコルを使用してレンチウイルスベクターを試験した。形質導入されたCD34+細胞を、VCN評価前にエピソームLVゲノムコピーの細胞クリアランスを可能にするため、最大12日間液体培養中で維持した。高いVCN/細胞値は、用量依存性のIMOベクターで得られた。用量増加の効果は、試験されたすべてのベクターにわたって一貫しており、同じMOIで形質導入すると、LAD-IおよびFAベクターよりもIMOベクターのVCN/細胞値が高く、(図5A-5B)を示す。EFS - TCIRG1 - WPREの高い形質導入効率を示す。

20

#### 【0174】

また、VCN/細胞は、表現型に応じて単離されたCFU(BFU-E、CFU-GM、またはCFU-GEMM)でも評価され、さまざまな前駆細胞における形質導入を確認した。EFS - TCIRG1 - WPREは、両方のドナーからの細胞においてより高いコロニーVCN値を示した。液体培養の結果と同様に、IMOベクターを用いた形質導入の結果と同様に、高い形質導入効率をもたらし、およびメチルセルロース培地中で培養されたコロニーのVCN/細胞をもたらした。

30

#### 【0175】

さまざまなCFUタイプ(BFU-E、CFU-GM、およびCFU-GEMM)におけるVCNパターンは、他のベクターと類似しており、Carrier et al. Gene Therapy 18:479-487(2011)で以前に説明されているように、赤血球コロニーで通常みられる最も高い値であることがわかった。

40

#### 【0176】

IMOベクターEFS - TCIRG1 - WPREは、レンチウイルスの臨床ロットと同等のレベルでヒトCD34+細胞に形質導入される。高い形質導入効率が達成されている間に、CD34+細胞の表現型および多系列の能力は保存された。IMOベクターは、対照ベクターよりも低いMOIで成功裏に実行され、IMO患者の遺伝子療法での使用に対するその適合性が実証された。

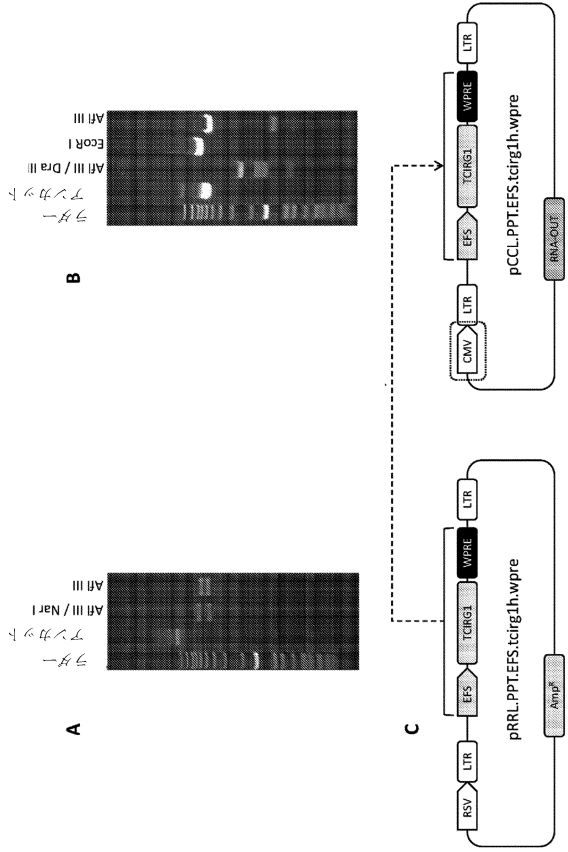
#### 【0177】

これらの研究は、VCNおよび形質導入効率が、インピボ遺伝子改変造血細胞の補正レベルに匹敵する効率を達成し、TCIRG1の変異による乳児性悪性大理石骨病の治療に

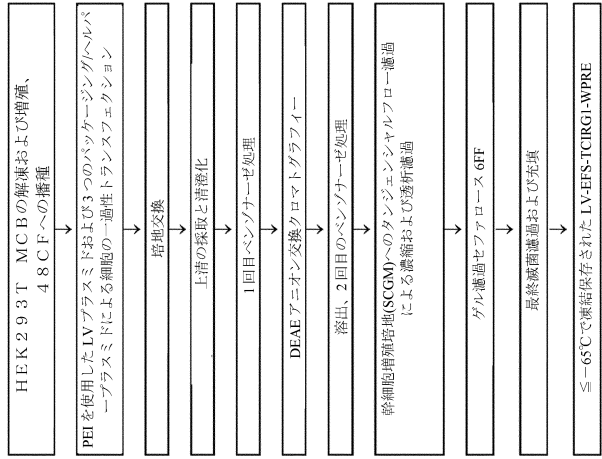
50



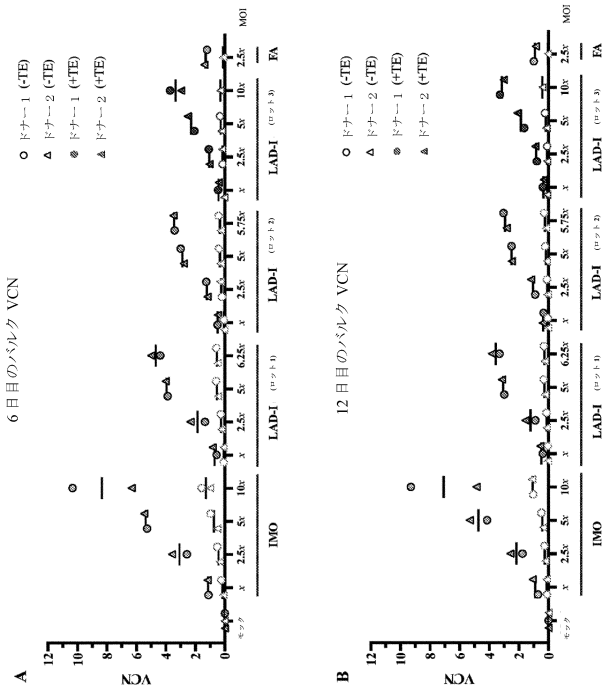
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0007623299000001.app

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N	7/01 (2006.01)	F I	C 1 2 N	7/01
A 6 1 K	35/76 (2015.01)		A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	35/28 (2015.01)		A 6 1 K	35/28
A 6 1 P	19/08 (2006.01)		A 6 1 P	19/08

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ピアード ブライアン

アメリカ合衆国 0 8 5 1 2 ニュージャージー州 クランベリー シダー ブルック ドライブ 9  
スペースクラフト セブン リミテッド ライアビリティ カンパニー内

(72)発明者 リックス デイビッド

アメリカ合衆国 0 8 5 1 2 ニュージャージー州 クランベリー シダー ブルック ドライブ 9  
スペースクラフト セブン リミテッド ライアビリティ カンパニー内

(72)発明者 ブラバカール ラジ

アメリカ合衆国 0 8 5 1 2 ニュージャージー州 クランベリー シダー ブルック ドライブ 9  
スペースクラフト セブン リミテッド ライアビリティ カンパニー内

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 8 / 0 4 9 2 7 3 ( W O , A 1 )

特表 2 0 0 2 - 5 0 8 1 8 4 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 4 / 0 7 7 8 6 6 ( W O , A 2 )

MOSCATELLI, I., et al., Targeting NSG mice engrafting cells with a clinically applicable lentiviral vector corrects osteoclasts in infantile malignant osteopetrosis., Human Gene Therapy, 2017年, pp.1-12, Supplementary Data

LUKE, J., et al., Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system., Vaccine, 2009年, Vol.27, No.46, pp.6454-6459

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

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

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

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

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d