

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6532653号  
(P6532653)

(45) 発行日 令和1年6月19日(2019.6.19)

(24) 登録日 令和1年5月31日(2019.5.31)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	5/0789	(2010.01)	C 12 N	5/0789
A 61 K	31/712	(2006.01)	A 61 K	31/712
A 61 K	35/28	(2015.01)	A 61 K	35/28
A 61 P	7/06	(2006.01)	A 61 P	7/06
A 61 P	43/00	(2006.01)	A 61 P	43/00

1 O 7

請求項の数 10 外国語出願 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2014-123573 (P2014-123573)

(22) 出願日

平成26年6月16日(2014.6.16)

(65) 公開番号

特開2015-64 (P2015-64A)

(43) 公開日

平成27年1月5日(2015.1.5)

審査請求日

平成29年6月16日(2017.6.16)

(31) 優先権主張番号

13/919, 241

(32) 優先日

平成25年6月17日(2013.6.17)

(33) 優先権主張国

米国(US)

(73) 特許権者 514152369

ホン ガオ

Hong Gao

アメリカ合衆国 O 2 4 5 9 マサチュー

セツツ州 ニュートン メイプルウッド

アベニュー 48

(73) 特許権者 514152370

ジエンルン ジュー

Z h e n g l u n Z h u

アメリカ合衆国 O 2 4 5 9 マサチュー

セツツ州 ニュートン メイプルウッド

アベニュー 48

(74) 代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】造血幹細胞の増殖方法

(57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

造血幹細胞または前駆細胞を増殖させる方法であって、

対象から単離された造血幹細胞または前駆細胞を、 V e n t X ポリペプチドの発現を阻害するモルホリノオリゴヌクレオチドと接触させ、それによって前記造血幹細胞または前駆細胞の増殖を高める工程、

を含み、

前記モルホリノオリゴヌクレオチドが、配列番号 6 8 または配列番号 6 9 の配列を有する、方法。

## 【請求項 2】

前記造血幹細胞または前駆細胞は、前記対象の骨髄、末梢血、または臍帯血から得ることによって単離される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

対象における一次性または二次性骨髄不全症候群を治療するための細胞医薬を製造する方法であって、

一次性または二次性骨髄不全症候群を有する対象から単離された造血幹細胞または前駆細胞を、 V e n t X ポリペプチドの発現を阻害するモルホリノオリゴヌクレオチドと接触させ、それによって前記造血幹細胞または前駆細胞の増殖を高める工程を含み、

前記対象への投与用の前記細胞医薬は、増殖を経た前記造血幹細胞または前駆細胞の有効量を含み、

10

20

前記モルホリノオリゴヌクレオチドが、配列番号 6 8 または配列番号 6 9 の配列を有する、方法。

【請求項 4】

前記造血幹細胞または前駆細胞は、前記対象の骨髓、末梢血、または臍帯血から得ることによって単離される、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

一次性または二次性骨髓不全症候群が、貧血症、脊髓形成異常症候群、または、化学療法もしくは放射線療法の合併症である、請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

一次性または二次性骨髓不全症候群が貧血症である、請求項5に記載の方法。 10

【請求項 7】

一次性または二次性骨髓不全症候群が脊髓形成異常症候群である、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

一次性または二次性骨髓不全症候群が化学療法の合併症である、請求項5に記載の方法。  
。

【請求項 9】

対象における造血幹細胞または前駆細胞を増殖させるための医薬組成物であって、

Vent X ポリペプチドの発現を阻害するモルホリノオリゴヌクレオチドを含み、必要としている対象への投与によって前記対象における前記造血幹細胞または前駆細胞の増殖を高めるものであり、 20

前記モルホリノオリゴヌクレオチドが、配列番号 6 8 または配列番号 6 9 の配列を有する、医薬組成物。

【請求項 10】

対象における一次性または二次性骨髓不全症候群の治療用の医薬組成物であって、

Vent X ポリペプチドの発現を阻害するモルホリノオリゴヌクレオチドを含み、必要としている前記対象への投与によって前記対象における造血幹細胞または前駆細胞の増殖を高めるものであり、

前記モルホリノオリゴヌクレオチドが、配列番号 6 8 または配列番号 6 9 の配列を有する、医薬組成物。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示の技術は、造血幹細胞の増殖方法に関する。

【背景技術】

【0002】

造血は、造血幹細胞（HSC）の増殖およびそれらの前駆細胞（たとえば、赤血球前駆細胞）への分化を含む。HSCは、血液系および免疫系の全系列の成熟細胞を生じさせる。  
。

【0003】

数十年の間に、複数の系列特異的転写因子、たとえばGATA-1およびEKLF等が、造血 / 赤血球生成において重要な役割を果たすことが証明されている。しかしそれでも、造血および赤血球生成の増大を可能にする細胞固有の因子は、完全に理解されていないままである。幾つかの細胞固有因子、たとえばWNT3a、-カテニン、およびHOXB4等の過剰発現は、マウスにおけるHSCの有意な発現につながることが証明されている。しかし、ヒトHSCの増殖に対するそれらの作用は限られている。 40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

ヒトHSCをエクスピボで増殖させる上での困難は、ヒトHSCベースの治療適用、た 50

とえば、造血系の再構成における大きな課題を代表する。ヒトHSCを効果的に増殖させる方法を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、インビボにおいて、モルホリノオリゴヌクレオチドを使用したVentXのダウンレギュレーションが、ヒト造血幹細胞または前駆細胞(CD34+である)の増殖をもたらすという予期せぬ結果に基づく。

【0006】

本発明の一態様は、造血幹細胞または前駆細胞の増殖方法に関する。本方法は、2工程：(1)造血幹細胞または前駆細胞を対象(たとえば、ヒトおよび非ヒト哺乳動物)から単離する工程および、(2)単離された細胞を、VentXポリペプチドの発現または活性を阻害する作用剤と接触させ、それによって細胞の増殖を高める工程、を含む。単離工程は、造血幹細胞または前駆細胞を含有する生体試料(たとえば、骨髄、末梢血、および臍帯血)を対象から得ることおよび該生体試料から細胞を採取することによって実行することができる。

【0007】

別の態様では、VentXポリペプチドの発現または活性を阻害する作用剤を対象に投与し、それによって対象における造血幹細胞または前駆細胞を増殖させることにより、造血幹細胞または前駆細胞を増殖させる方法を記述する。

【0008】

作用剤は、干渉RNA(iRNA)剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、または抗体であり得る。iRNA剤は、VentX蛋白質をコードする遺伝子の領域と相同な第1のヌクレオチド配列を有する第1鎖を有する。iRNA剤は、5'非翻訳領域を含む、遺伝子から転写されたmRNAをターゲットにする。

【0009】

第1ヌクレオチド配列は、RNAバージョン、たとえば、

UUCAGAAUCGCCGCAUGAAACACAAACGGG(配列番号5)、

UCUACUCAACGUCCUUCUGGCCUUGGCCAU(配列番号6)、

CAAAUCUGCCUGCGCCGGAGAGGGACCAUG(配列番号7)、

GGUUGAGUAAGGAGCCAAAUACCUUGCGG(配列番号8)、

CGGGUUGAGUAAGGAGGCCAAUA(配列番号9)、

CCGCAUGAACACAAACGGCAA(配列番号10)、

CCCCAGCUUUCUACUCAACGUCU(配列番号11)、

GGGUUGAGUAAGGAGCCAA(配列番号29)、

GGUUGAGUAAGGAGGCCAA(配列番号30)、

GCUCUCAGAGGUCCAGAUA(配列番号31)、

GGUUUCAGAAUCGCCGCAU(配列番号32)、

UCAGAAUCGCCGCAUGAAA(配列番号33)、

UCGCCGCAUGAAACACAAA(配列番号34)、

GCCGCAUGAACACAAACG(配列番号35)、

GCAUGAACACAAACGGCA(配列番号36)、

GCUUUCUACUCAACGUCUU(配列番号37)、

UCUCUGCAGUGGGCACAA(配列番号38)、

GGACUCAGUUGUUCUGUUU(配列番号39)、

CCCGGCCUGAGAAUUAUUAU(配列番号40)、

CCGGCCCUGAGAAUUAUUAU(配列番号41)、

GGUCAGUGAACAGAGUCAA(配列番号42)、

GCAGAACAGUGGGCUUGUCAU(配列番号43)、

GCAGGUGUGUUUAUAGCGU(配列番号44)、

GGAAAGCAGGGAGGGAACAA(配列番号45)、

10

20

30

40

50

G C G U U G A U G G A C C G U U C U U (配列番号 4 6 )、  
 C C U G A C U G C G U G C A U G A A A (配列番号 4 7 )、または  
 G C C U G G A C A G C A C U G A U U U (配列番号 4 8 )または  
 その対応するDNAバージョン、すなわち、

T T C A G A A T C G C C G C A T G A A A C A C A A A C G G (配列番号 1 2 )、  
 T C T A C T C A A C G T C T T C T G G C C T T G C C A A T (配列番号 1 3 )、  
 C A A A T C T G C C T G C G C G G A G A G G A C C A T G (配列番号 1 4 )、  
 G G T T G A G T A A G G A G C C A A A T A C C T T G C G G (配列番号 1 5 )、  
 C G G G T T G A G T A A G G A G C C A A A T A (配列番号 1 6 )、  
 C C G C A T G A A A C A C A A A C G G C A A A (配列番号 1 7 )、  
 C C C C A G C T T T C T A C T C A A C G T C T (配列番号 1 8 )、  
 G G G T T G A G T A A G G A G C C A A (配列番号 4 9 )、  
 G G T T G A G T A A G G A G C C A A A (配列番号 5 0 )、  
 G C T C T C A G A G G T C C A G A T A (配列番号 5 1 )、  
 G G T T T C A G A A T C G C C G C A T (配列番号 5 2 )、  
 T C A G A A T C G C C G C A T G A A A (配列番号 5 3 )、  
 T C G C C G C A T G A A A C A C A A A (配列番号 5 4 )、  
 G C C G C A T G A A A C A C A A A C G (配列番号 5 5 )、  
 G C A T G A A A C A C A A A C G G C A (配列番号 5 6 )、  
 G C T T T C T A C T C A A C G T C T T (配列番号 5 7 )、  
 T C T C T G C C A A G T G G C A C A A (配列番号 5 8 )、  
 G G A C T C A G T T G T T C T G T T T (配列番号 5 9 )、  
 C C C G G C C C T G A G A A T A T A T (配列番号 6 0 )、  
 C C G G C C C T G A G A A T A T A T T (配列番号 6 1 )、  
 G G T C A G T G A A C A G A G T C A A (配列番号 6 2 )、  
 G C A G A A G T G G G C T T G T C A T (配列番号 6 3 )、  
 G C A G G T G T G T T A T A G C G T (配列番号 6 4 )、  
 G G A A A G C A G G A G G G A A C A A (配列番号 4 5 )、  
 G C G T T G A T G G A C C G T T C T T (配列番号 6 5 )、  
 C C T G A C T G C G T G C A T G A A A (配列番号 6 6 )、または  
 G C C T G G A C A G C A C T G A T T T (配列番号 6 7 )

であってよい。

#### 【0010】

iRNA剤は、上記配列の1つを有するモルホリノオリゴヌクレオチドであることができる。

iRNA剤は、第1配列と相補的な第2のヌクレオチド配列を有する第2鎖をさらに含むことができる。

#### 【0011】

さらに別の態様で、本発明は一次性または二次性骨髄不全症候群の治療方法を特色とする。本方法は、3工程：(1)造血幹細胞または前駆細胞を、一次性または二次性骨髄不全症候群を有する対象から単離する工程、(2)単離された造血幹細胞または前駆細胞を、Vento Xポリペプチドの発現または活性を阻害する作用剤と接触させ、それによって造血幹細胞または前駆細胞の増殖を高める工程、および(3)増殖を経た造血幹細胞または前駆細胞の有効量を対象に投与する工程、を含む。単離工程は、造血幹細胞または前駆細胞を含有する生体試料を対象から得ることおよび該生体試料から細胞を採取することによって実行することができる。一次性または二次性骨髄不全症候群は、貧血症、脊髄形成異常症候群、または、化学療法もしくは放射線療法の合併症であり得る。

#### 【0012】

本発明の1つまたは複数の例の詳細を、以下の解説で説明する。本発明の他の特徴および利点は、以下の、幾つかの実施態様の詳細な説明から、また添付のクレームからも、明

10

20

30

40

50

自になるであろう。

#### 【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

*VentX*、ヒトホメオボックス転写因子は、基本的なWntシグナリングの新規なアンタゴニストである。*VentX*は、それぞれ配列番号1および配列番号4（以下に表示）のアミノ酸配列およびスクレオチド配列を有する。

[ 0 0 1 4 ]

## V e n t X のアミノ酸配列（配列番号1）：

[ 0 0 1 5 ]

【表1】

10

mrlsspprg pqqlssfgsv dwlsqsscsq pthtpadslgslpgpq tsgareppqa  
vsikeagss nlpapertma g1skepntlr aprvttaftm eqvrtlegvf qbhqylsple  
rkrlaremql sevqiktwfq nrrmkhkrqm qdpqlhsfps gslhappafy stssglangl  
qllcpwaps gpqalmppg sfwglcqvaq ealasagasc cggplashpp tpgrpslgsa  
lsgprqjca mpqtdadaf (下線: aa. 91-151/ホメオドメイン-配列番号3)

[ 0 0 1 6 ]

## V e n t X のヌクレオチド配列（配列番号 4）：

[ 0 0 1 7 ]

【表2】

20

30

40

[ 0 0 1 8 ]

VentXは、BMP4シグナル経路の脊椎動物アフリカツメガエル (*Xenopus*)・ホメオボックス蛋白質Xomのヒト相同体である。VentXは、新規なLEF/T

50

C F 関連のW n t リプレッサーであり、また想定される腫瘍抑制因子である。さらに、V e n t X は、細胞増殖および分化に関する重要な遺伝子、たとえば、p 5 3 / p 1 6 およびc - m y c の発現を調節する。

#### 【 0 0 1 9 】

V e n t X は、全系列の造血細胞における制御の下で発現され、その発現は予想外にも、造血幹細胞または前駆細胞のクローン形成能および増殖と逆相関関係を示す。したがって、エクスピボにおいてヒト造血幹細胞または前駆細胞でV e n t X を一時的に阻害する工程を含む造血幹細胞または前駆細胞の増殖を高める方法は、本発明の範囲内である。

#### 【 0 0 2 0 】

V e n t X の阻害物質としては、i R N A 剤、アンチセンスR N A ( a s R N A )、リボザイムおよび抗体を含む。10

i R N A 剤、たとえば、二本鎖低分子干渉R N A ( s i R N A )、低分子ヘアピン型R N A ( s h R N A )、または一本鎖マイクロR N A ( m i R N A )は、特定のm R N A の接触（触媒）分解を引き起こす。i R N A 剤は、遺伝子発現を低下または阻害するために使用され得る。i R N A 剤は、R N A 干渉 ( R N A i ) を介した標的R N A の分解を引き起こすように、標的R N A と十分な配列相補性を有する。R N A 干渉 ( R N A i ) とは、配列特異的または配列選択性的なプロセスであり、これにより標的分子（たとえば、標的遺伝子、標的蛋白質または標的R N A ）がダウンレギュレートされる。i R N A 剤はまた、R N A に転写できるD N A であってもよい。

#### 【 0 0 2 1 】

20

R N A i と関連したメカニズムを介して機能する他の分子も使用することができ、そうした分子としては、化学修飾されたs i R N A ( たとえば、モルホリノオリゴヌクレオチドまたはモルホリノアンチセンスオリゴ )、および後にs i R N A に開裂するヘアピンR N A の発現駆動性ベクターを含む。

#### 【 0 0 2 2 】

本明細書に記述されている有用な核酸分子または構築物は、1 6 ~ 3 0 ヌクレオチドを各鎖に含むd s R N A ( たとえば、s i R N A ) 分子を含み、その鎖の一方は、配列番号4の相補的D N A 配列を有するV e n t X のm R N A における標的領域に実質的に同一である。実質的に同一とは、たとえば、少なくとも8 0 % ( または、それより多く、たとえば、8 5 %、9 0 %、9 5 %、もしくは1 0 0 % ) 同一であり、たとえば、3、2、1、または0個のミスマッチヌクレオチドを有する。他方の鎖は第1鎖と相補的である。d s R N A 分子は、化学的に合成ができる、インビトロでD N A 鑄型から転写ができる。あるいはインビボで、たとえば、s h R N A から、転写されることがある。

30

#### 【 0 0 2 3 】

50

アンチセンス核酸は、V e n t X を阻害するのに有用である。そのようなアンチセンス核酸分子は、そのヌクレオチド配列が、V e n t X をコードするm R N A の全部または一部と相補的である核酸分子である。アンチセンス核酸分子は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域の全部または一部とアンチセンスであってもよい。非コード領域（「5' 非翻訳領域および3' 非翻訳領域」）は、コード領域に隣接する5' 配列および3' 配列であり、アミノ酸に翻訳されない。

40

#### 【 0 0 2 4 】

V e n t X を阻害するための上記作用剤としては、モルホリノオリゴヌクレオチドが含まれる。モルホリノオリゴヌクレオチドは、リボースまたはデオキシリボース糖部分の代わりにモルホリン環が、またD N A およびR N A の陰イオン性リン酸の代わりに非イオン性ホスホジアミデート結合が付いた、塩基を有する。モルホリノオリゴヌクレオチドは、当技術分野で知られている方法で合成するか、または、たとえば、ジーン・ツールズ社 ( G e n e T o o l s , L L C . ) から商業的に得ることができる。

#### 【 0 0 2 5 】

用語「R N A 」または「R N A 分子」または「リボ核酸分子」は、リボヌクレオチドの

50

ポリマーを指す。用語「DNA」または「DNA分子」または「デオキシリボ核酸分子」は、デオキシリボヌクレオチドのポリマーを指す。DNAおよびRNAは、自然の力で(たとえば、それぞれ、DNA複製またはDNAの転写によって)合成することができる。RNAは、転写後修飾することができる。DNAおよびRNAは、化学的に合成したり化学的に修飾したりすることもできる。DNAおよびRNAは、一本鎖(すなわち、それぞれssRNAおよびssDNA、)であることもでき、多重鎖(たとえば、二本鎖、すなわち、それぞれdsRNAおよびdsDNA)であることもできる。

#### 【0026】

ポリヌクレオチドは、以下の方法によって投与されることがある。すなわち、「裸の」核酸分子(米国特許第5,679,647号明細書)の直接注入、または、細胞による核酸分子の取り込みを促進するサポニン類(たとえば、米国特許第5,739,118号明細書参照)もしくは陽イオン性ポリアミン類(たとえば、米国特許第5,837,533号明細書参照)等の1以上の他剤とともに組成物中に配合された核酸分子の直接注入によって;微小粒子衝撃(たとえば、「遺伝子銃」;バイオリスト( Biolistic )、デュポン社( Du pont )の使用)によって;脂質、細胞-表面受容体または遺伝子導入剤で核酸分子をコーティングすることによって;リポソーム、微小粒子、またはマイクロカプセル中へ核酸分子を封入することによって;核に入ることが知られているペプチドに連結された核酸分子の投与によって;または、受容体を特異的に発現する細胞型をターゲットするために使用され得る受容体仲介エンドサイトーシスを受けるリガンドに連結された核酸分子の投与によって、投与されることがある。あるいは、静電力または共有結合力によってポリ-L-リシンに結合したプラスミドまたは他のベクターから成る分子複合体を調製することができる。ポリ-L-リシンは、標的細胞上の受容体に結合することができるリガンドに結合する(クリスチアーノ( Cristiano )ら、1995年、ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン( J. Mol. Med. )、第73巻、p. 479)。

#### 【0027】

核酸-リガンド複合体を形成することができ、該リガンドは、エンドソームを破壊する融合性ウイルスペプチドを含んでおり、核酸のリソソーム分解の回避を可能にする;または、核酸分子は、特定の受容体をターゲットにすることにより、インビポでの細胞特異的取り込みおよび発現の標的とされ得る。加えて、細胞核におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入、発現および蓄積のための能率的な方法は、米国特許第6,265,167号明細書に記述されており、核内でアンチセンスオリゴヌクレオチドがセンスmRNAにハイブリダイズすることを可能にし、それによってアンチセンスオリゴヌクレオチドが処理されたり細胞質内に輸送されたりするのを防止する。本発明はまた、当技術分野で知られた相同組換えによる発現のため、核酸分子の細胞内導入およびそれに続く宿主細胞DNA内への組み込みも意図する。

#### 【0028】

ポリヌクレオチドはまた、好適な発現ベクターに組み込まれることもできる。遺伝子療法適用に好適な幾つかのベクターが当技術分野で知られている(たとえば、ウイルスペクター( Viral Vectors ):基礎科学および遺伝子療法( Basic Science and Gene Therapy )、イートン・パブリッシング社( Eaton Publishing Co. )(2000年)参照)。

#### 【0029】

発現ベクターは、プラスミドベクターであってよい。プラスミドDNAの生成方法および精製方法は、迅速かつ直接的である。加えて、プラスミドDNAは一般に宿主細胞のゲノムに統合されないが、別個の実体としてエピソームの位置に維持され、染色体統合が起こす可能性がある遺伝毒性を排除する。種々のプラスミドが、今や商業的に容易に入手でき、大腸菌( Escherichia coli )および枯草菌( Bacillus subtilis )に由来するものが含まれ、多くは哺乳類系で使用するために個別に設計されている。本発明で使用することが可能なプラスミドの例としては、真核発現ベクター

10

20

30

40

50

p R c / C M V (インビトロジェン (In vitro gene))、p C R 2 . 1 (インビトロジェン)、p A d / C M V および p A d / T R 5 / G F P q (マッシー (Massie) ら、1998年サイトテクノロジー (Cytotechnology)、第28巻、p. 53~64)などがあるが、その限りではない。代表的な実施態様において、プラスミドはp R c / C M V、p R c / C M V 2 (インビトロジェン)、p A d C M V 5 (I R B - N R C )、p c D N A 3 (インビトロジェン)、p A d M L P 5 (I R B - N R C )、またはP V A X (インビトロジェン)である。

#### 【0030】

発現ベクターは、ウイルスベースのベクターであってよい。ウイルスベースのベクターの例としては、複製欠損性のレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスに由来するものなどがあるが、その限りではない。レトロウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターは、現在、インビボでの、特にヒトへの、外因性オリゴヌクレオチドまたは遺伝子の移入のために選択される組換え遺伝子送達システムである。これらのベクターは、細胞内への遺伝子の能率的な送達を提供し、移入された核酸は、宿主の染色体D N Aに安定して組み込まれる。レトロウイルス使用の重要な必要条件は、特に細胞集団における野生型ウイルスの広がりの可能性に関して、それらの使用の安全性を確実にすることである。レトロウイルスベクターが由来するレトロウイルスとしては、モロニーマウス白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳房腫瘍ウイルスなどがあるが、その限りではない。具体的なレトロウイルスとしては、p L J、p Z I P、p W E およびp E Mなどがあり、当業者に周知である。

#### 【0031】

s i R N A分子、m i R N A分子、およびa s R N A分子は、当技術分野で周知の方法でデザインすることができる。R N Aを特異的に分解するために必要な配列特異性を提供するのに十分な相同性を有するこれらのR N A分子は、アンビオン社 (A m b i o n , I n c . ) およびダーマコン社 (D h a r m a c o n , I n c ) のウェブサイトで維持されているもの (s i D E S I G N C E N T E R参照) および、インターネット上、m p i b p c . g w d g . d e / a b t e i l u n g e n / 1 0 0 / 1 0 5 / s i r n a . h t m lで利用できる、「s i R N Aユーザーガイド (T h e s i R N A U s e r G u i d e )」を含む、当技術分野で知られているプログラムを使用してデザインすることができる。

#### 【0032】

モルホリノオリゴはまた、当技術分野で知られている方法、たとえば、ビボ・モルホリノ (ジーン・ツールズ社 (G e n e T o o l s , L L C )) を用いて、静脈注射、腹腔内注射、または局所注射により、対象に送達することもできる。

#### 【0033】

V e n t X 核酸配列に特異性を有するリボザイムはまた、V e n t X 発現を阻害するために使用することもできる。リボザイムは、相補的な領域を有する、m R N A等の一本鎖核酸を開裂することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性R N A分子である。したがって、リボザイム (たとえば、ハンマーヘッド型リボザイム (ハッセルホフ (H a s e l h o f f ) ら、1988年、ネイチャー (N a t u r e )、第334巻、p. 585~591に記述されている) ) を使用してm R N A転写物を触媒的に開裂し、それによって、m R N Aによりコードされる蛋白質の翻訳を阻害することができる。リボザイムのデザイン方法および生成する方法は、当技術分野で知られている (たとえば、スキャンロン (S c a n l o n )、1999年、リボザイムの治療適用 (T h e r a p e u t i c A p p l i c a t i o n s o f R i b o z y m e s 、フマーナプレス (H u m a n a P r e s s ) 参照) ) 。V e n t X 核酸分子またはそのフラグメントに特異性を有するリボザイムは、V e n t X c D N Aのヌクレオチド配列に基づいてデザインすることができる。

10

20

30

40

50

## 【0034】

抗体（ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体）は、免疫原としての V e n t X ポリペプチドで、適当な対象に免疫性を与えることによって調製することができる。さらに、標準組換え D N A 技術を使用して作ることができる、組換え抗体、たとえば、ヒト部分と非ヒト部分の両者を含む、キメラ抗体やヒト化モノクローナル抗体等が、本明細書で提供される。そのようなキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当技術分野で知られている組換え D N A 技術で、たとえば、国際公開第 8 7 / 0 2 6 7 1 号、欧州特許出願第 1 8 4 , 1 8 7 号明細書；欧州特許出願第 1 7 1 , 4 9 6 号明細書；欧州特許出願第 1 7 3 , 4 9 4 号明細書；国際公開第 8 6 / 0 1 5 3 3 号；米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号明細書；欧州特許出願第 1 2 5 , 0 2 3 号明細書；ベター (B e t t e r) ら、サイエンス (S c i e n c e) 、第 2 4 0 卷、p . 1 0 4 1 ~ 1 0 4 3 、1 9 8 8 年；リウ (L i u) ら、米国科学アカデミー紀要 (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A) 、第 8 4 卷、p . 3 4 3 9 ~ 3 4 4 3 、1 9 8 7 年；リウ (L i u) ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J . I m m u n o l . ) 、第 1 3 9 卷、p . 3 5 2 1 ~ 3 5 2 6 、1 9 8 7 年；サン (S u n) ら、米国科学アカデミー紀要 (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A) 、第 8 4 卷、p . 2 1 4 ~ 2 1 8 、1 9 8 7 年；西村ら、キャンサー・リサーチ (C a n c . R e s . ) 、第 4 7 卷、p . 9 9 9 ~ 1 0 0 5 、1 9 8 7 年；ウッド (W o o d) ら、ネイチャー (N a t u r e) 、第 3 1 4 卷、p . 4 4 6 ~ 4 4 9 、1 9 8 5 年；およびショウ (S h a w) ら、ジャーナル・オブ・ザ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート (J . N a t l . C a n c e r I n s t . ) 、第 8 0 卷、p . 1 5 5 3 ~ 1 5 5 9 、1 9 8 8 年；モリソン (M o r r i s o n) 、サイエンス (S c i e n c e) 、第 2 2 9 卷、p . 1 2 0 2 ~ 1 2 0 7 、1 9 8 5 年；オイ (O i) ら、B i o / T e c h n i q u e s 、第 4 卷、p . 2 1 4 、1 9 8 6 年；米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号明細書；ジョーンズ (J o n e s) ら、ネイチャー (N a t u r e) 、第 3 2 1 卷、p . 5 5 2 ~ 5 2 5 、1 9 8 6 年；ヴェルホイヤン (V e r h o e y a n) ら、サイエンス (S c i e n c e) 、第 2 3 9 卷、p . 1 5 3 4 、1 9 8 8 年；およびベидラー (B e i d l e r) ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J . I m m u n o l . ) 、第 1 4 1 卷、p . 4 0 5 3 ~ 4 0 6 0 、1 9 8 8 年；に記述されている方法を使用して、生成することができる。

## 【0035】

試験試料中の V e n t X ポリペプチドレベルまたは核酸レベルは、試験試料を試験対象から得るとともに、V e n t X ポリペプチドまたは核酸を検出することができる化合物または作用剤（たとえば、m R N A プローブまたはゲノム D N A プローブ）と試験試料を接触させることによって評価することができる。「試験試料」は、対象から単離される組織、細胞および体液、ならびに対象内に存在する組織、細胞および液体を含む。V e n t X 遺伝子の発現レベルは、V e n t X 遺伝子によりコードされる m R N A を測定すること；V e n t X 遺伝子によりコードされるポリペプチドの量を測定すること；またはV e n t X 遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性を測定することを含む、幾つかの方法で測定することができる。

## 【0036】

細胞中の V e n t X 遺伝子に対応する m R N A レベルは、インサイチュ方式でもインビトロ方式でも決定することができる。試験試料から単離される m R N A は、サザンまたはノーザン解析、P C R 解析、およびプローブアレイを含む、ハイブリダイゼーションアッセイまたは增幅アッセイで使用することができる。m R N A レベルの検出に好ましい診断方法は、V e n t X 遺伝子によりコードされる m R N A にハイブリダイズできる核酸プローブと、単離された m R N A とを接触させることを含む。プローブは全長 V e n t X 核酸、たとえば配列番号 4 の核酸等であってよく、またはその一部、たとえば長さが少なくとも 1 0 ヌクレオチドで、ストリングエントな条件で V e n t X m R N A またはゲノム D N A に特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチド等であってよい。

## 【0037】

10

20

30

40

50

一方では、mRNA（またはそれから調製されるcDNA）を表面上に固定するとともにプローブと接触させる。これはたとえば、単離されたmRNAをアガロースゲルで流すとともに、mRNAをゲルからニトロセルロース等の膜に移動させることによる。別的方式では、プローブを表面上に固定するとともに、mRNA（またはcDNA）を、たとえば、遺伝子チップアレイにおいて、プローブと接触させる。当業者は、既知のmRNA検出方法を、Vent X遺伝子によりコードされるmRNAのレベルの検出に使用するために、改変することができる。

## 【0038】

Vent X遺伝子によりコードされる試料中のmRNA（またはそれから調製されるcDNA）のレベルは、たとえば、標準PCR（米国特許第4,683,202号明細書）、RT-PCR（バスチン（Bustin）S.ジャーナル・オブ・モレキュラー・エンドクリノロジー（J Mol Endocrinol.）、第25巻、p.169～93、2000年）、定量的PCR（オング（Ong）Y.ら、ヘマトロジー（Hematology）、第7巻、p.59～67、2002年）、リアルタイムPCR（Ginzinger D.エクスペリメンタル・ヘマトロジー（Exp Hematol.）、第30巻、p.503～12、2002年）、およびインサイチュPCR（サッカー（Thakker）V.、メソッズ・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Methods Mol Biol.）、第115巻、p.379～402、1999年）、または幾つかの他の核酸增幅方法による、核酸増幅を用い、続いて、増幅された分子を当技術分野で知られている技術を使用して検出することにより、評価することができる。本明細書で使用されるとき、増幅プライマーは、遺伝子の5'領域または3'領域にアニーリングすることができる一対の核酸分子であり（それぞれ、プラス鎖およびマイナス鎖、または逆も同様）、間に短い領域を含むと定義される。適当な条件下、適当な試薬を用いれば、そのようなプライマーは、プライマーで挟まれたヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

## 【0039】

インサイチュ方法では、細胞試料または組織試料を調製して、スライドグラス等の支持体上に固定し、次いでVent Xポリペプチドをコードする染色体上のゲノムDNAまたはmRNAにハイブリダイズすることができるプローブと接触させることができる。

## 【0040】

種々の方法を使用して、Vent Xポリペプチドのレベルを決定することができる。概して、これらの方法は、試料中のポリペプチドのレベルを評価するために、ポリペプチドに選択的に結合する作用剤、たとえば抗体等を接触させることを含む。抗体はポリクローナルであってもよく、より好ましくは、モノクローナルであってもよい。完全な抗体、またはそのフラグメント（たとえば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>）も使用することができる。好ましい実施態様で、抗体は検出可能な標識を持つ。用語「標識された」は、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をプローブまたは抗体に物理的に連結することによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに検出可能な物質との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を含むことを意図する。たとえば、ウサギFc領域を含む抗体は、ウサギFc領域に対する第二抗体を使用して間接的に標識することができ、ここで第二抗体は、検出可能な物質に結合される。検出可能な物質の例を本明細書に提供する。適当な検出可能な物質または標識としては、放射性同位体（たとえば、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H、または<sup>32</sup>P）、酵素（たとえば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、または-Gラクトシダーゼ）、蛍光部分または蛍光蛋白質（たとえば、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、GFP、またはBFP）、または発光部分（たとえば、クオンタム・ドット社（Quantum Dot Corporation）、パロ・アルト、カリフォルニアにより供給されるQdot（商標）ナノ粒子）などがある。

## 【0041】

本検出方法を使用して、インビトロならびにインビボで、生体試料中のVent Xポリ

10

20

30

40

50

ペプチドを検出することができる。Vent X ポリペプチド検出のためのインビトロ技術としては、ELISA、免疫沈降、免疫蛍光、EIA、RIA、およびウェスタンプロットティング解析などがある。Vent X ポリペプチド検出のためのインビオ技術は、標識された抗 Vent X 抗体を対象に導入することを含む。たとえば、抗体を、上述の検出可能な物質で標識することができる。対象における検出可能な物質の存在および位置は、標準的な画像法で検出することができる。

#### 【0042】

「対象」は、ヒトおよび非ヒト動物を指す。上記HSCを得ることができる非ヒトの例としては、霊長類、イヌ、齧歯類、モルモット、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、およびブタなどがあるが、その限りではない。実際には、愛玩動物、家畜、実験動物、および疾患モデル動物が全て意図される。好ましい実施態様で、対象はヒトである。別の実施態様で、対象は実験動物または疾患モデル動物である。

#### 【0043】

本発明はさらに、造血幹細胞または前駆細胞における異常な高レベルのVent X ポリペプチドと関連した状態を、上述の方法で調製された増殖された造血幹細胞または前駆細胞の有効量で、またはVent X ポリペプチドの発現または活性を阻害する作用剤の有効量で、治療する方法を特色とする。こうした状態としては、一次性または二次性BMSF、貧血症（たとえば、難治性貧血）、脊髄形成異常症候群（たとえば、低細胞性骨髄異形成症候群）、造血系の悪性腫瘍（たとえば、白血病およびリンパ腫）、および生物学的に（たとえば、ウイルスによる）、物理学的に（たとえば放射線による）、化学的に（たとえば、毒素および抗癌化学療法剤による）、または環境的に（たとえば、汚染による）引き起こされた骨髄損傷などがある。

#### 【0044】

「治療すること」または「治療」は、障害、障害の症状、障害に続発する疾病状態、または障害傾向を、治癒、軽減、緩和、治療、発症遅延、改善する目的で、（Vent X の発現または活性を阻害する）作用剤を含有する組成物、またはそうした作用剤で前処理した造血幹細胞または前駆細胞を含有する組成物の、状態（たとえば、貧血症および脊髄形成異常症候群）を有する対象への投与を指す。

#### 【0045】

「有効量」は、治療した対象において、たとえば、上述の、医学的に望ましい結果をもたらすことができる組成物の量を指す。治療方法は、インビオまたはエクスピオで、単独で、または他剤もしくは他の治療方法と併せて、実行され得る。薬の実際の有効量は、利用する具体的な薬またはその組合せ、配合される特定の組成物、投与方法、および患者の年齢、体重、状態、および治療する症状または状態の重症度によって異なり得る。特定の患者の適用量は、従来の考慮すべき要件を使用して、（たとえば、適当な、従来の薬理学的プロトコールを用いて）、当業者により決定されることがある。

#### 【0046】

上記組成物の1つまたは複数を動物（たとえば、ヒト）に投与して、Vent X またはその相同体の発現または活性を調整することができる。医師は、たとえば、最初は比較的低用量を処方し、その後適当な応答が得られるまで用量を増やすことが可能である。加えて、特定の対象のための具体的な用量は、使用される具体的な作用剤の活性、対象の年齢、体重、全体的健康、性別、および食事、投与時期、投与経路、排泄速度、複合薬、および調整される発現または活性の程度を含む、種々の要因に依存することが理解される。

#### 【0047】

治療効果は、標的遺伝子mRNAの量を測定する（たとえばリアルタイムPCRを使用する）か、または標的遺伝子mRNAによりコードされるポリペプチドの量を測定する（ウェスタンプロット解析）かのいずれによっても監視することができる。当技術分野で周知の通り、患者への適用量は、上述のような様々な要因に依存する。適用量は異なるであろうが、ポリヌクレオチド投与の好ましい適用量は、約 $10^{-6}$  ~  $10^{-12}$  コピーのポリヌクレオチド分子である。この用量を必要に応じて繰り返し投与することができる。

10

20

30

40

50

## 【0048】

ポリヌクレオチドは、薬学的にインビボ投与に適した組成物を提供するために、水性の担体、媒体、または溶液で調製することができる。水溶液を調製する方法は、当業者に周知である。好ましくは、水溶液は、水、塩類を含有する生理学的に容認できる水溶液および／またはバッファー、たとえばリン酸緩衝生理食塩水（P B S : phosphate buffered saline）等、または動物またはヒトへの投与に容認できる他の水溶液／界面活性剤である。そのような溶液は、当業者に周知であり、蒸留水、脱イオン水、純水または超純水、生理食塩水、P B S、および核酸と相性が良い通常のバッファーを含有する溶液等が挙げられるが、その限りではない。組成物はまた、溶液を等張にするために塩化ナトリウムおよびグルコースまたはマンニトールも含有してもよい。本組成物は、適当な助剤成分、たとえばp H調整剤、モル浸透圧濃度調整剤、および張度調整剤等を含有してもよい。

10

## 【0049】

ポリヌクレオチドは、当技術分野で知られている高分子の、生分解性微小粒子、またはマイクロカプセル送達デバイスを使用して、送達することができる。ポリヌクレオチドの取り込みを達成する別の方法は、標準方法で調製されるリポソームを使用することである。ポリヌクレオチドは、単独でこれらの送達媒体に組み込まれたり、組織特異的固体と一緒に共に組み込まれたりすることができる。さらに、当技術分野で知られている組織特異的転写制御エレメント使用によって、組織特異的ターゲティングを達成することができる。

20

## 【0050】

ポリヌクレオチドは、非経口的に投与できる。用語「非経口的」は、本明細書で使用されるとき、注射、たとえば静脈内注射、動脈内注射、髄内注射、骨内注射、および髄腔内注射、ならびに任意の適当な注入技術を指す。

## 【0051】

増殖した造血幹細胞または前駆細胞は、たとえば、細胞を分離し（たとえば、機械的分離による）、細胞を薬学的に許容できる担体（たとえば、リン酸緩衝生理食塩溶液）と完全に混合することによって、患者への投与のために配合することが可能である。それらは、注射または注入によって各個体に投与することができる。

## 【0052】

30

異種および自家両方の造血幹細胞または前駆細胞を使用することができる。前者の場合、宿主反応を回避するか最小限に抑えるために、H L A - 適合を実施すべきである。後者の場合、対象から自家細胞を濃縮して精製し、後で使用するために保存する。細胞は、宿主細胞またはグラフトT細胞の存在下、エクスピボで培養して、宿主に再導入することができる。これには、本細胞を自己として認識し、T細胞活性の低下をよりよく提供する宿主の利点があるかもしれない。

## 【0053】

本発明は、作用剤（V e n t X の発現または活性を阻害する）を含有する医薬組成物あるいは本作用剤で前処理した造血幹細胞または前駆細胞を含有する組成物を提供する。医薬組成物は、治療有効量の活性作用剤または造血幹／前駆細胞および任意選択的に他の活性作用剤を、薬学的に許容できる担体と混合することにより調製できる。担体は、投与経路に応じて、種々の形をとることができる。

40

## 【0054】

上記医薬組成物は、従来の医薬品賦形剤および調製方法を使用することによって調製することができる。すべての賦形剤を崩壊剤、溶媒、造粒剤、保湿剤、およびバインダーと混合することができる。

## 【0055】

成句「薬学的に許容できる」は、ヒトに投与されるとき、生理学的に耐容でき、望まれない反応を一般に招来しない、分子実体およびそのような組成物の他成分を指す。好ましくは、用語「薬学的に許容できる」は、哺乳動物、より詳細にはヒト使用のために、連邦

50

政府または州政府の監督官庁により承認された、あるいは米国薬局方または一般に認められた薬局方に収載されたこと、を意味する。薬学的に許容できる塩類、エステル類、アミド類、およびプロドラッグ類は、妥当な医学的判断の範囲内であり、不当な毒性、刺激、アレルギー反応等無く患者の組織と接觸した使用に適しており、合理的な利益 / リスク比に相応し、かつそれらの所期の使用に有効な、塩類（たとえば、カルボン酸塩、アミノ酸付加塩類）、エステル類、アミド類、およびプロドラッグ類を指す。

#### 【0056】

上述の医薬組成物に適用される担体は、化合物と共に投与される希釈剤、賦形剤、または媒体を指す。そのような医薬担体は、無菌液体、たとえば水および油等であってよい。水または水溶液、生理食塩水、およびデキストロース水溶液およびグリセロール水溶液は、好ましくは、特に注射液用の、担体として使用される。適当な医薬担体は E . W . マーチン (Martin) による、「レミントンの薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第 18 版に記述されている。10

#### 【0057】

用量および投与頻度は、当業者に知られている急性期の臨床徵候の少なくとも 1 つまたは複数、好ましくは複数が、減少するかまたは存在しない、寛解期の持続を確証する臨床徵候に依存するであろう。より一般的には、用量および頻度は、上記組成物による治療のために意図される、病態または障害の病理学的徵候および臨床症状ならびに不顕性症状の後退にある程度依存するであろう。適用量および投与計画は、当業者に認識されている通り、投与される年齢、性別、体調、ならびに複合体の利益および治療される患者または哺乳動物対象における副作用、および医師の判断によって、調節することができる。20

#### 【0058】

最後に、本発明は、遺伝子療法によって免疫疾患または代謝疾患を治療するための遺伝子を送達する方法を特色とする。本明細書に記載の造血幹細胞または前駆細胞を使用して、外因性の、組換えポリペプチドを発現させることができる。したがって、組換え核酸を含有するそのような造血幹細胞または前駆細胞は、本発明の範囲内である。組換え核酸は、ポリペプチドをコードすることができ、また造血幹細胞または前駆細胞は、ポリペプチドをコードする m R N A を含むことができる。

#### 【0059】

したがって、本発明は、異種核酸を対象に導入する方法を特色とする。本方法は、造血幹細胞または前駆細胞を増殖および遺伝子導入をする工程（ここで造血幹細胞または前駆細胞の少なくとも 1 つは異種核酸を含む）、およびその細胞を、必要としている対象に投与する工程を含む。異種核酸は、目的のポリペプチドをコードする。30

#### 【0060】

用語「異種」は相対語であり、核酸の部分に関して使用されるとき、その核酸が、自然には互いに同じ関係で存在しない 2 つ以上の部分配列を含むことを示す。たとえば、組換えで生成される核酸は一般に、新しい機能的核酸を作るために合成的に配置された無関係の遺伝子に由来する 2 つ以上の配列、たとえば、1 つのソースに由来するプロモータと別のソースに由来するコード領域とを有する。したがって 2 つの核酸は、ここでの意味合いにおいて互いに異種である。細胞に添加するとき、組換え核酸は、細胞の内在遺伝子とも異種になるであろう。したがって、染色体において、異種な核酸は、染色体に組み込まれている非ネイティブの（天然に存在しない）核酸、または非ネイティブの（天然に存在しない）染色体外核酸を含むであろう。これに対し、染色体の自然に転座した部分は、突然変異細胞特有の内在核酸配列を含むため、この特許出願の意味合いにおいて異種とはみなされない。同様に、異種蛋白質は、その蛋白質が、自然には互いに同じ関係で存在しない 2 つ以上の部分配列を含むことを示す（たとえば、1 つの核酸配列によって 2 つの部分配列がコードされる、「融合蛋白質」）。そのような蛋白質は、組換え技術で生成することができる。40

#### 【0061】

用語「組換え」は、たとえば細胞、核酸、蛋白質、またはベクターと関連して使用され50

るとき、細胞、核酸、蛋白質、またはベクターが、異種核酸または蛋白質の導入あるいはネイティブの核酸または蛋白質の変化によって修飾されていること、あるいは細胞がそのように修飾された細胞に由来することを示す。したがって、たとえば、組換え細胞は、細胞のネイティブ（天然に存在する）形態内では見出されない遺伝子を発現するか、あるいは、別の状況では正常にまたは異常に発現されるか、低発現であるか、または全く発現されないネイティブ遺伝子の第2のコピーを発現する。

#### 【0062】

上記造血幹細胞または前駆細胞および方法は、当技術分野で知られる様々な遺伝子治療方法で使用することができる。遺伝子療法は、エクスピボ技術もインビボ技術も含む。具体的には、上述の造血幹細胞または前駆細胞は、オリゴヌクレオチド調節因子またはその調節因子をコードする核酸分子を用いてエクスピボで遺伝子操作され、操作された細胞はその後、治療を受ける患者に提供される。細胞培養は、たとえば、細胞を分離し（たとえば、機械的分離による）、細胞を薬学的に許容できる担体（たとえば、リン酸緩衝食塩溶液）と完全に混合することにより、患者に投与するために配合することができる。異種間拒絶またはアロタイプ拒絶を回避するために、操作される細胞は一般に自家である。そのようなエクスピボ方法は当技術分野で周知である。10

#### 【0063】

細胞は、上述の技術を使用したポリヌクレオチドの投与によって操作されることができる。

さらなる詳述なく、当業者は、上述に基づいて本発明を最大限に利用できると考えられる。したがって、以下の具体的な実施態様は、単に実例にすぎず、どのような形であれ、残りの開示内容を制限するものではないと解釈されるべきである。20

#### 【0064】

本明細書に引用されている全ての刊行物を参照により援用する。

##### （実施例）

実施例1：V e n t X 発現は、造血中および赤血球生成中に制御される

骨髄（B W : B o n e m a r r o w ）試料を、施設のI R B 承認を得て、ブリガム・アンド・ウイメンズ病院（B r i g h a m a n d W o m e n ' s H o s p i t a l ）から、人工股関節置換術後に廃棄された大腿骨骨頭組織から入手した。単核細胞のフィコール分離後、磁気活性化細胞選別C D 3 4 + 前駆細胞キット（M il t e n y i B i o t e c ）を使用してC D 3 4 + 細胞を濃縮した。B W C D 3 4 + 細胞の純度は、リゾ（R i z o ）ら、2 0 0 8 年に記述されているフローサイトメトリーで評価したとき、9 5 %以上であった。30

#### 【0065】

全R N Aを、トリゾール（T R I z o l ）法で単離し、製造業者のプロトコールに従つて、スーパースクリプト第1鎖合成システム（S uperS cript F irst - S t rand S y n t h e s i s S y s t e m ）（インビトロジェン（I nv it ro g e n ））を用いた第1鎖c D N A合成に同量のR N Aを使用した。その後、V e n t X m R N Aレベルを測定するために、c D N Aを、下記のプライマーとともにV e n t X のリアルタイムP C Rのために使用した：40

5 ' - C C G T C A G C A T C A A G G A G G - 3 ' （配列番号1 9 ）および  
5 ' - C T G G A C C T C T G A G A G C T G C - 3 ' （配列番号2 0 ）。リアルタイムP C Rはまた、L i g h t C y c l e r（登録商標）4 8 0システム（4 8 0 リアルタイムP C Rシステム（R e a l - T i m e P C R S y s t e m ）；ロシュ（R o c h e ））でS Y B R グリーン（G re e n ）を用いて実施された。

#### 【0066】

結果は、V e n t X 発現が、赤血球の成熟中に上昇したことを示している。より具体的には、V e n t X 発現は、C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞では無視でき、C D 3 4 + C D 3 8 + 細胞では有意にアップレギュレートされ、骨髄系列の前駆細胞、たとえば、巨核球赤血球前駆細胞（M E P : m e g a k a r y o c y t e - e r y t h r o i d p r o g e n

itors)、顆粒球-マクロファージ前駆細胞(GMs: granulocyte-macrophage progenitors)、および骨髄球系共通前駆細胞(CMP: common myeloid progenitors)ではさらに上昇した。赤血球生成中のVent Xの発現上昇パターンは、リンパ球生成中などの他の造血プロセス中のものと同じであった。上記3つの異なるサブグループの骨髄細胞系列、すなわち、MEP、GM、およびCMPの間では、Vent X発現の有意差は無かった。

#### 【0067】

実施例2: Vent XはエクスピボでヒトCD34+細胞の増殖を制御するヒトBWC D 3 4 +細胞を、実施例1に記載の通りに入手した。これらの細胞におけるVent X発現を、レンチウイルスベースのshRNA手法でノックダウンさせた。10

#### 【0068】

簡単に記載すると、Vent XをターゲットにするshRNA(pHAGE-shVent X)を発現するレンチウイルスベクターpHAGE-CMV-eGFPWを、骨髄CD34+細胞の形質導入のために使用した。このレンチウイルスベクターは、形質導入率を監視するためまたは細胞選別のための、GFPの同時発現を可能にする内部リボソーム侵入部位(IRES: internal ribosome entry site)を含む。Vent X shRNAの対応するDNA配列は、配列番号12または14である。

#### 【0069】

GFPをターゲットにする無効配列(pHAGE-shGFP)を、コントロールとして使用した。レンチウイルスパッケージングを、ダナファーバ(Dana-Farber)/ハーバードがんセンターべクターコア施設(Harvard Cancer Center Vector Core Facility)で実施し、ウイルス上澄を使用までアリコートで-70度保存した。CD34+細胞を、先ず、10%FBS、幹細胞因子(SCF: stem cell factor, 100ng/mL)、Flt3リガンド(100ng/mL)、トロンボポイエチン(TPO, 100ng/mL)、インターロイキン-3(IL-3, 10ng/mL)、およびIL-6(10ng/mL)(ペプロテック(PeproTech))を含有するIMDM培地で2日間培養し、次いで4μg/mlポリブレンの存在下、感染多重度(MOI: Multiplicity of Infection)5で形質導入した。GFP陽性細胞を、形質導入後24時間に、FACSaria高速ソーター(BDバイオサイエンス(BDBioscience))で選別した(ダナ・ファーバセンター研究所フローサイトメトリコア施設(Dana-Farber Cancer Institute Flow Cytometry Core Facility))。

20
30
30

#### 【0070】

選別されたGFP陽性CD34+細胞(皿当たり $1 \times 10^4$ 個)を、組換えヒトサイトカイン類(SCF、IL-3、GM-CSF、およびエリスロポイエチン)の混合物を含有する完全メチルセルロース培地(メソカルト(Methocult)GF、H4434;ステムセル・テクノロジーズ(Stem Cell Technologies))に、三重にプレーティングすることによって、インビトロコロニー形成細胞(CFC: colony-forming cells)のアッセイを実施した。37度14日間インキュベートした後、コロニーを計数し、標準基準に従って分類した。40

#### 【0071】

長期培養開始細胞(LTC-IC)アッセイ用に、96ウェルプレートでウェル当たり30~900細胞の限界希釈でM2-10B4ネズミ線維芽細胞を用いて、形質導入されたGFP陽性細胞を選別した。週1回、培養に新たな培地を供給した。5週間培養した後、ウェルから、全細胞を、35mmペトリ皿の、上述した完全メチルセルロース培地に移した。さらに2週間培養した後、ウェルを陽性または陰性として採点して、LTC-IC頻度を得た。

#### 【0072】

結果は、pHAGE-shVENTXおよびpHAGE-shGFPの形質導入率が約20%であったことを示している。定量的PCR手法を使用して、pHAGE-shVENTX-形質導入CD34+細胞におけるVENTXノックダウンの効率が約30%であると決定された。陽性形質導入細胞を、サイトカイン添加ストローマ・フリー液体培地にプレーティングし、細胞数を週1回、4週まで計数した。半減培養(demi-depopulated culture)の週1回の細胞計数のプロットは、CD34+細胞におけるVENTX発現のノックダウンが、細胞を4週間培養した後の独立した3実験のコントロール細胞と比較して、全細胞数で約5倍の増加を招いたことを示している。

#### 【0073】

コロニー形成細胞(CFC)アッセイで決定されるように、VENTXのノックダウンは、BFU-E/CFU-E、CFU-GMおよびCFU-G/CFU-Mコロニー形成において約2倍の増加をもたらした。子孫細胞総数は、CFCアッセイに基づき約3倍増加した。このノックダウンは、全系列の造血細胞の増殖、特に赤血球系列コロニー形成を促進した。一貫して、LTC-IC頻度は、shVENTX形質導入CD34+細胞において約3倍増加した。加えて、このノックダウンは、エクスピボ液体培養におけるCD34+細胞のパーセンテージが30%増加するという結果をもたらした。

#### 【0074】

時間経過FACS解析は、VENTXのノックダウンがCD34+細胞集団を4週まで維持するのに役立つことを示した。VENTXのノックダウンはまた、最も原始的なCD34+CD38-細胞集団も増加させた。要するに、VENTXノックダウンは、CD34+細胞プールの維持およびCD34+細胞増殖の促進を助けた。

#### 【0075】

実施例3：低分子干渉RNA(siRNA)によるVENTXの一時的ノックダウンは、CD34+細胞の増殖を促進する

ヒトBWC D34+細胞を、実施例1に記載の通り入手した。これらの細胞におけるVENTX発現を、siRNA手法を使用してノックダウンした。より具体的には、製造業者の取扱説明書に従って、ヒトCD34+細胞ヌクレオフェクターキット(Nucleofector Kit)(ロンザ(Lonza))を使用したエレクトロポレーションにより、VENTXをターゲットにする低分子オリゴヌクレオチド、siVENTXを、上記BWC D34+細胞にトランスフェクトした。

#### 【0076】

簡単に記載すると、 $1 \times 10^6$ 個のCD34+細胞を、VENTX siRNA(配列番号5)または無効GFP siRNAの何れか0.5nmolを含むヌクレオフェクター溶液100μlに分散させた。これらの細胞のエレクトロポレーションを、ヌクレオフェクターIIデバイス(nucleofector II Device)(ロンザ(Lonza))を使用して実施した。エレクトロポレーションされた細胞を、10%FBSおよび上記サイトカイン類を含有する予め加温したIMDM培地1mlと共に、一晩インキュベートした。

#### 【0077】

結果は、定量的RT-PCRに基づいて、CD34+細胞におけるVENTXの約70%がsiRNAトランスフェクションによってノックダウンされたことを示している。上記レンチウイルス-仲介手法のものと一致して、CD34+細胞におけるVENTXの一時的ノックダウンはまた、2週間培養中に、siGFP-トランスフェクト細胞と比較して、約2倍のHSC増殖を招いた。同様に、siVENTX-トランスフェクト細胞は、CD34+細胞のパーセンテージの増加を示した。CFCアッセイはまた、VENTXの一時的ノックダウンが、BFU-E/CFU-EコロニーおよびCFU-GMコロニーの形成および子孫細胞総数で約2倍の増加という結果をもたらしたことも示す。要するに、このsiRNA手法は、上記レンチウイルスベースのshRNA手法と同程度有効であった。

#### 【0078】

10

20

20

30

40

50

実施例4：V e n t X の過剰発現は、C D 3 4 + 細胞増殖をブロックする。

ヒトB W C D 3 4 + 細胞を、実施例1に記載の通りに入手した。上述のヒトC D 3 4 + 細胞スクレオフェクターキット（N u c l e o f e c t o r K i t）（ロンザ（L o n z a））を使用して、これらの細胞をp C S 2 - G F P またはp C S 2 - G F P V e n t X プラスミドでトランスフェクトした。24時間トランスフェクトした後、G F P - 陽性細胞をF A C S A r i a 高速ソーターで選別した。

#### 【0079】

結果は、V e n t X の強制的な発現によってC D 3 4 + 細胞のコロニー形成が大幅に抑制されたことを示している。さらに、V e n t X の過剰発現によって、ヒトC D 3 4 + 細胞のS t e m R e g e n i n 1 ( S R 1 ) - 仲介増殖がブロックされる。

10

#### 【0080】

S t e m R e g e n i n 1 ( S R 1 ) はアリール炭化水素受容体アンタゴニストであることに留意されたい。結果は、S R 1 がC D 3 4 + 細胞におけるV e n t X の発現を阻害し、これらのC D 3 4 + 細胞の増殖を高めたことも示している。このように、C D 3 4 + 細胞の増殖にはV e n t X のダウンレギュレーションが必要である。

#### 【0081】

実施例5：V e n t X はインビボでC D 3 4 + 細胞の増殖を制御する。

V e n t X がインビボでC D 3 4 + 細胞の増殖を促進するかどうかを決定するために、8週齢のN O D . C g - P r k d c s c i d I l 2 r g t m 1 w j 1 / S z J マウス（N O D s c i d ガンマ；N S G として一般に知られている）をジャクソン・ラボラトリー（J a c k s o n L a b o r a t o r y ）から購入し、特定病原体除去条件で維持した。移植前に、マウスに100ラド（R a d ）を亜致死的に照射した。約 $1 \times 10^6$ 個のC D 3 4 + 細胞を、V e n t X またはG F P s h R N A レンチウイルスで形質導入した。形質導入後24時間に、全細胞（ $1 \times 10^6$ 個、約20%がG F P 陽性細胞）または陽性に形質導入された細胞（ $2 \times 10^4$ 個、全てG F P 陽性）をレシピエントマウスに注射した。ヒトC D 4 5 + 細胞を、レシピエントマウスの骨髄からF A C S で解析した。二次移植では、ヒト細胞をさらに精製せずに、キメラ一次レシピエントマウスの骨髄を二次レシピエントN S G マウスに注射した。

20

#### 【0082】

結果は、s h G F P 形質導入C D 3 4 + 細胞と比較して、s h V e n t X 形質導入C D 3 4 + 細胞では、ヒト細胞生着率が約1.5～2倍上昇したことを示している。明らかに、V e n t X のノックダウンは全系列の造血細胞の発生を可能にした。骨髄細胞系列（C D 1 4 + 細胞）の発生は他の系列と比較して僅かに損なわれているようであった。

30

#### 【0083】

C D 3 4 + 細胞のレンチウイルス形質導入率が僅か約20%であったことから、H S C の増殖に対するV e n t X ノックダウンの効果をさらに調査するために、陽性に形質導入されたC D 3 4 + 細胞を精製し、次いでN S G マウスに移植した。移植の13週後に、ヒトC D 4 5 + 細胞のパーセンテージをF A C S 解析で決定した。驚くほどに、s h V e n t X 形質導入C D 3 4 + 細胞では、ヒトC D 4 5 + 細胞のパーセンテージが、s h G F P 形質導入C D 3 4 + 細胞と比較して20倍まで増加した。

40

#### 【0084】

ヒトC D 3 4 + 細胞の長期生着に対するV e n t X の効果を試験するために、二次移植実験を実施した。コントロールs h G F P 形質導入C D 3 4 + 細胞を有するマウスはどれも検出可能な二次生着を示さなかったが、s h V e n t X 形質導入C D 3 4 + 細胞を有するマウス2匹は、陽性のヒト細胞生着を示した（それぞれ、0.25%および0.28%）。

#### 【0085】

抗V e n t X モルホリノオリゴスクレオチド、すなわち、5' - T A C T C A A C C C T G A C A T A G A G G G T A A - 3' ( V e n t X M O ; 配列番号68) または

50

5' - GAGCCCGGTTTGCATACACGGCTAA - 3' (Vent X MO - 2 ; 配列番号 69)、および

コントロールモルホリノオリゴヌクレオチドが、上述の通りにヒト臍帯血 CD34+ 細胞にエレクトロポレーションされた。次いで、やはり上述の通りに、細胞を NSG マウスに注射した。注射後 8 週にマウスを屠殺し、上述の通りに、ヒト CD45+ 細胞のパーセンテージを FACS で解析した。驚いたことには、抗 Vent X モルホリノオリゴヌクレオチドは、コントロールオリゴヌクレオチドと比較して、ヒト CD45+ 細胞のパーセンテージを 50 % 増加するという結果をもたらした。

#### 【0086】

実施例 6 : Vent X は、CD34+ 細胞における細胞周期調節因子をターゲットにする

Vent X は、Wnt シグナル経路および細胞周期機構の幾つかの成分、たとえば Cyclin D1, p21 および p16<sup>ink4a</sup> 等の、調節因子である。p21, p16<sup>ink4</sup>, C-myc、および Cyclin D1 のレベルを、下記のプライマーとともに定量的 PCR を使用して決定した：

p21 : 5' - AAACCTTGAGTCCTCTCAC - 3' (配列番号 21) および

5' - AAAGGCTCAACACTGAGACG - 3' (配列番号 22)；

p16 : 5' - CTTCCTCCACTACCGTAGAAT - 3' (配列番号 23) および

5' - TGCTCCTCCAGAAAACTCC - 3' (配列番号 24)；

C-myc : 5' - CAGCTGCTTAGACGCTGGATT - 3' (配列番号 25) および

5' - GTAGAAATACGGCTGCACCGA - 3' ; (配列番号 26) および Cyclin D1 : 5' - GTTCTGGCCTCTAAGATG - 3' (配列番号 27) および 5' - TTGTTCACCAAGGAGCAGC - 3' (配列番号 28)。

#### 【0087】

結果は、Vent X の過剰発現は、CD34+ 細胞において、p21 および p16<sup>ink4a</sup> の発現を増加させたが、Cyclin D1 および C-myc の発現をダウンレギュレートしたことを見ている。Vent X のノックダウンは p21 発現を減少させたが、Cyclin D1 および C-myc の発現を増加させた、結果を機能喪失手法でさらに確認した。やはり FACS 解析に基づき、Vent X のノックダウンは、Cyclin D1 蛋白質のレベルを上昇させた。

#### 【0088】

##### 他の実施態様

この明細書に開示されている特徴は全て、任意の組合せで組み合わせることが可能である。この明細書に開示されている各特徴は、同一の、同等の、または類似した、目的にかなう代わりの特徴に置き換えられてもよい。したがって、明示的に別段の定めをした場合を除き、開示されている各特徴は、一般的な一連の同等または類似した特徴の例にすぎない。

#### 【0089】

上述から、当業者は本発明の本質的な特性を容易に確認することができ、その精神および範囲から離れることなく、本発明を様々な使用および条件に適合させるために、様々な変更および修正を行うことができる。したがって、他の実施態様もまたクレームの範囲内である。

##### (付記)

好ましい実施形態として、上記実施形態から把握できる技術的思想について、以下に記載する。

##### [項目 1]

造血幹細胞または前駆細胞を増殖させる方法であって、

10

20

30

40

50

造血幹細胞または前駆細胞を対象から単離する工程、および  
前記造血幹細胞を、V e n t X ポリペプチドの発現を阻害するモルホリノオリゴヌクレオチドと接触させ、それによって前記造血幹細胞または前駆細胞の増殖を高める工程、  
を含む、方法。

[項目 2]

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 5 ~ 18 および配列番号 29 ~ 69 からなる群か  
ら選択される配列を有する、項目 1 に記載の方法。

[項目 3]

前記造血幹細胞または前駆細胞を、前記対象の骨髓、末梢血、または臍帯血から得るこ  
とによって前記単離工程が実行される、項目 1 に記載の方法。

10

[項目 4]

対象における一次性または二次性骨髓不全症候群を治療する方法であって、  
造血幹細胞または前駆細胞を、一次性または二次性骨髓不全症候群を有する対象から単  
離する工程、

前記造血幹細胞または前駆細胞を、V e n t X ポリペプチドの発現を阻害するモルホリ  
ノオリゴヌクレオチドと接触させ、それによって前記造血幹細胞または前駆細胞の増殖を  
高める工程、および

前記対象に、増殖を経た前記造血幹細胞または前駆細胞の有効量を投与する工程、  
を含む、方法。

[項目 5]

20

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 5 ~ 18 および配列番号 29 ~ 69 からなる群か  
ら選択される配列を有する、項目 4 に記載の方法。

[項目 6]

前記造血幹細胞または前駆細胞を、前記対象の骨髓、末梢血、または臍帯血から得るこ  
とによって前記単離工程が実行される、項目 4 に記載の方法。

[項目 7]

一次性または二次性骨髓不全症候群が、貧血症、脊髄形成異常症候群、または、化学療  
法もしくは放射線療法の合併症である、項目 4 に記載の方法。

[項目 8]

一次性または二次性骨髓不全症候群が貧血症である、項目 7 に記載の方法。

30

[項目 9]

一次性または二次性骨髓不全症候群が脊髄形成異常症候群である、項目 7 に記載の方法

。

[項目 10]

一次性または二次性骨髓不全症候群が化学療法の合併症である、項目 7 に記載の方法。

[項目 11]

対象における造血幹細胞または前駆細胞を増殖させる方法であって、  
V e n t X ポリペプチドの発現を阻害するモルホリノオリゴヌクレオチドを、必要とし  
ている対象に投与し、それによって前記対象における前記造血幹細胞または前駆細胞の增  
殖を高めること、

40

を含む、方法。

[項目 12]

対象における一次性または二次性骨髓不全症候群を治療する方法であって、  
V e n t X ポリペプチドの発現を阻害するモルホリノオリゴヌクレオチドを、必要とし  
ている前記対象に投与し、それによって前記対象における造血幹細胞または前駆細胞の增  
殖を高めること、を含む、方法。

【配列表】

0006532653000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 12 N 15/113 (2010.01) C 12 N 15/113 Z N A Z

(74)代理人 100068755  
弁理士 恩田 博宣  
(74)代理人 100142907  
弁理士 本田 淳  
(72)発明者 ホン ガオ  
アメリカ合衆国 02459 マサチューセッツ州 ニュートン メイプルウッド アベニュー  
48  
(72)発明者 ジェンルン ジュー  
アメリカ合衆国 02459 マサチューセッツ州 ニュートン メイプルウッド アベニュー  
48

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第2012/071513 (WO, A1)  
国際公開第2013/036974 (WO, A1)  
特表2003-527096 (JP, A)  
特表2006-521813 (JP, A)  
特表2009-530408 (JP, A)  
特表2016-520563 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 5 / 00  
C 12 N 15 / 00  
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)  
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)  
WPI DS / WPI X (STN)