

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-536484

(P2019-536484A)

(43) 公表日 令和1年12月19日 (2019. 12. 19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/56 (2006.01)	C 1 2 N 15/56	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z N A Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	4 C 0 8 7
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	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-551256 (P2019-551256)	(71) 出願人	513167522
(86) (22) 出願日	平成29年12月6日 (2017. 12. 6)		ブルーバード バイオ, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月3日 (2019. 7. 3)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/064913		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02018/106807		1 4 2, ケンブリッジ, ビニー スト
(87) 国際公開日	平成30年6月14日 (2018. 6. 14)		リート 6 O
(31) 優先権主張番号	62/430, 795	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成28年12月6日 (2016. 12. 6)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

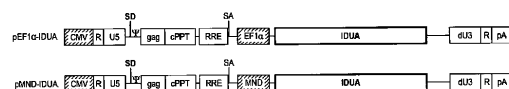
(54) 【発明の名称】 ムコ多糖症 I 型のための遺伝子治療

(57) 【要約】

本発明は、MPS I を治療するための組成物および方法を提供する。(a) 左側の (5') レンチウイルスLTRと、(b) プシー (Ψ) パッケージングシグナルと、(c) レトロウイルスの移出エレメントと、(d) センtralポリプリントラクト/DNAフラップ (c P P T / F L A P) と、(e) α-Lイズロニダーゼ (I D U A) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターと、(f) 右側の (3') レンチウイルスLTRと、を含む、ポリヌクレオチド。

【選択図】 図 1

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 左側の (5') レンチウイルスLTRと、
 (b) プシー (Ψ) パッケージングシグナルと、
 (c) レトロウイルスの移出エレメントと、
 (d) セントラルポリプリントラクト/DNAフラップ (cPPT/FLAP) と、
 (e) α-リゾロニダーゼ (IDUA) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターと、
 (f) 右側の (3') レンチウイルスLTRと、を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記レンチウイルスが、HIV (ヒト免疫不全ウイルス; HIV 1型およびHIV 2型を含む)、ビスナ・マエディ (visna-maedi) ウイルス (VMV) ウイルス、ヤギ関節炎-脳炎ウイルス (CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、ならびにサル免疫不全ウイルス (SIV) からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記レンチウイルスがHIV-1またはHIV-2である、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記レンチウイルスがHIV-1である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記 5' LTRのプロモーターが、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、およびシミアンウイルス 40 (SV40) プロモーターからなる群から選択される異種プロモーターで置換されている、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記 3' LTRが、1つ以上の修飾を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

前記 3' LTRが、1ラウンドのウイルス複製を超えたウイルス転写を防止する1つ以上の欠失を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記 3' LTRが、前記 3' LTRのU3領域におけるTATAボックス、ならびにSp1およびNF-κB転写因子結合部位の欠失を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

前記 3' LTRが、自己不活性化 (SIN) LTRである、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記 IDUA ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターが、インテグリンサブユニットアルファM (ITGAM、CD11b) プロモーター、CD68プロモーター、C-X3-Cモチーフケモカイン受容体1 (CX3CR1) プロモーター、イオン化カルシウム結合アダプター分子1 (IBA1) プロモーター、膜貫通タンパク質119 (TMEM119) プロモーター、spalt様転写因子1 (SALL1) プロモーター、接着Gタンパク質結合受容体E1 (F4/80) プロモーター、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失、dl587revプライマー結合部位置換 (MND) プロモーター、およびそれらの転写活性断片からなる群から選択される、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記 I D U A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターが、伸長因子 1 α (E F 1 α) プロモーターまたはその転写活性断片を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 2】

前記 I D U A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターが、短い E F 1 α プロモーターである、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 3】

前記 I D U A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターが、長い E F 1 α プロモーターである、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 1 4】

前記 I D U A ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、c D N A である、請求項 1～1 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 5】

前記 I D U A ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、発現のために最適化されたコドンである、請求項 1～1 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 6】

(a) 左側の (5') H I V-1 L T R と、
 (b) プシー (Ψ) パッケージングシグナルと、
 (c) R R E レトロウイルスの移出エレメントと、
 (d) c P P T / F L A P と、
 (e) I D U A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された M N D プロモーターまたは E F 1 α プロモーターと、
 (f) 右側の (3') H I V-1 L T R と、を含む、ポリヌクレオチド。

20

【請求項 1 7】

(a) 左側の (5') C M V プロモーター / H I V-1 キメラ L T R と、
 (b) プシー (Ψ) パッケージングシグナルと、
 (c) R R E レトロウイルスの移出エレメントと、
 (d) c P P T / F L A P と、
 (e) I D U A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された M N D プロモーターまたは E F 1 α プロモーターと、
 (f) 右側の (3') S I N H I V-1 L T R と、を含む、ポリヌクレオチド。

30

【請求項 1 8】

ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルまたはウサギ β-グロビンポリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項 1～1 7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 9】

請求項 1～1 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクターで形質導入された、哺乳動物細胞。

【請求項 2 0】

前記細胞が造血細胞である、請求項 1 9 に記載の哺乳動物細胞。

40

【請求項 2 1】

前記細胞が C D 3 4⁺ 細胞である、請求項 1 9 または 2 0 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 2 2】

前記細胞が、幹細胞または前駆細胞である、請求項 1 9～2 1 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 2 3】

g a g をコードする第 1 のポリヌクレオチドと、p o l をコードする第 2 のポリヌクレオチドと、e n v をコードする第 3 のポリヌクレオチドと、請求項 1～1 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドと、を含む、産生細胞。

50

【請求項 24】

請求項 23 に記載の産生細胞によって産生された、レンチウイルスベクター。

【請求項 25】

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 19 ～ 22 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞を含むレンチウイルスベクターを含む、組成物。

【請求項 26】

薬学的に許容される担体と、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 19 ～ 22 のいずれか一項に記載の哺乳類細胞を含むレンチウイルスベクターと、を含む、薬学的組成物。

【請求項 27】

MPS I を治療する方法であって、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクター、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクターで形質導入された細胞、または請求項 19 ～ 22 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞を、対象に投与することを含む、方法。

【請求項 28】

MPS I を治療する方法であって、請求項 26 に記載の薬学的組成物を対象に投与することを含む、方法。

【請求項 29】

対象における MPS I に関連する少なくとも 1 つの症状を軽減させる方法であって、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクター、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクターで形質導入された細胞、または請求項 19 ～ 22 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞を、対象に投与することを含む、方法。

【請求項 30】

対象における MPS I に関連する少なくとも 1 つの症状を軽減させる方法であって、請求項 26 に記載の薬学的組成物を対象に投与することを含む、方法。

【請求項 31】

前記 MPS I が、ハーラー症候群 (MPS I-H)、ハーラー・シャイエ症候群 (MPS I-H/S)、またはシャイエ症候群 (MPS I-S) である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記 MPS I が、重症の MPS I または軽症の MPS I である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記少なくとも 1 つの症状が、GAG の蓄積、失明、聴力消失、学習および言語発達の遅滞、呼吸器疾患、心疾患、骨格異形症、ならびに認知機能低下からなる群から選択される、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【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、米国特許法第 119 条 (e) の下で、2016 年 12 月 6 日出願の米国仮特許出願第 62/430,795 号の優先権を主張するものであり、これはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表に関する記載

本出願に関連する配列表は、ハードコピーの代わりにテキスト形式で提供され、ここに参照することによって本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は、BLBD_081_01WO_ST25.txt である。このテキストファイルは 24 KB であり、2017 年 12 月 6 日に作成され、本明細書の出願と同時に EFS-Web

10

20

30

40

50

を介して電子的に提出される。

【背景技術】

【0003】

本発明は、遺伝子治療に関する。より具体的には、本発明は、ムコ多糖症Ⅰ型（MPSⅠ）を治療するための遺伝子治療組成物およびその使用方法に関する。

【0004】

関連技術の説明

ムコ多糖症（MPS）は、リソソーム蓄積症として知られる重大な遺伝性障害の分類である。MPSは、連続的に特定のムコ多糖を分解し、再利用する身体的能力に干渉する。

【0005】

ムコ多糖症Ⅰ型（MPSⅠ）は、身体多くの部分に影響を及ぼす病態である。この障害は、一時、ハーラー症候群（MPSⅠ-H）、ハーラー・シャイエ症候群（MPSⅠ-H/S）、およびシャイエ症候群（MPSⅠ-S）（最も重症のものから最も軽症の順に列挙されている）の3つの別個の症候群に分けられていた。これらの3つの症候群の各々の間には非常に多くの重複があるため、MPSⅠは現在、重症および軽症の種類に分けられている。重症のMPSⅠは、約100,000人に1人の新生児において生じる。軽症のMPSⅠはより稀であり、約500,000人に1人の新生児において生じる。

【0006】

MPSⅠを有する人は、酵素α-Lイズロニダーゼ（IDUA）をコードするα-Lイズロニダーゼ遺伝子（IDUA）の不完全なコピーを有する。IDUAは、ヘパラン硫酸およびデルマタン硫酸と呼ばれる2つのGAG中に存在する非硫酸化α-Lイズロン酸を加水分解することによって、グリコサミノグリカン（GAG）またはムコ多糖として知られる大きな糖分子の分解を担う。IDUA機能の喪失により、未消化のデルマタン硫酸およびヘパラン硫酸ならびに他の有害な物質が身体中の細胞に蓄積される。

【0007】

両方の形態のMPSⅠが多くの異なる器官および組織に影響を及ぼし得るが、重症のMPSⅠを有する人は、失明、聴力消失、学習および言語発達の遅滞、呼吸器および心臓の問題をはじめとする神経機能の進行性の低下を経験する。発達遅延は通常1歳までに現れ、重度に冒された個体は、最終的に基本的な機能的スキルを喪失する（発達の退行する）。この形態の障害を有する子供は、通常、寿命が短く、場合によっては小児期後期までしか生存することができない。軽症のMPSⅠは、角膜混濁、心臓弁の欠陥、および骨格異形症を特徴とし、この形態の疾患を有する個体は典型的には成人まで生存し、寿命が短い場合も短くない場合もある。軽症の種類を有する人の一部は学習障害も有するが、他の人は知能的な障害を有さない。心臓病および気道閉塞が両方の種類のMPSⅠを有する人における主な死因である。

【0008】

処置によりMPSⅠを有する個体の寿命および生活の質は改善され得るが、治療法は存在しない。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、概して、部分的には、ムコ多糖症Ⅰ型（MPSⅠ）の少なくとも1つの症状の治療、予防、または改善のための遺伝子治療組成物および方法に関する。特定の実施形態では、MPSⅠは、ハーラー症候群（MPSⅠ-H）、ハーラー・シャイエ症候群（MPSⅠ-H/S）、またはシャイエ症候群（MPSⅠ-S）である。特定の実施形態では、MPSは、重症のMPSⅠまたは軽症のMPSⅠである。

【0010】

様々な実施形態では、左側の（5'）レンチウイルスLTRと、プシー（ψ）パッケージングシグナルと、レトロウイルスの移出エレメントと、セントラルポリプリントラクト/DNAフラップ（cPPT/FLAP）と、α-Lイズロニダーゼ（IDUA）ポリペ

10

20

30

40

50

プチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターと、右側の（3'）レンチウイルスLTRと、を含むポリヌクレオチドが提供される。

【0011】

特定の実施形態では、レンチウイルスは、HIV（HIV 1型およびHIV 2型を含めたヒト免疫不全ウイルス）、ビスナ・マエディ（visna-maedi）ウイルス（VMV）ウイルス、ヤギ関節炎-脳炎ウイルス（CAEV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、ならびにサル免疫不全ウイルス（SIV）からなる群から選択される。

【0012】

ある特定の実施形態では、レンチウイルスはHIV-1またはHIV-2である。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスはHIV-1である。

【0014】

さらなる実施形態では、5'LTRのプロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、およびシミアンウイルス40（SV40）プロモーターからなる群から選択される異種プロモーターで置換されている。

【0015】

さらなる実施形態では、3'LTRは、1つ以上の修飾を含む。

【0016】

20

いくつかの実施形態では、3'LTRは、1回目のウイルス複製を超えたウイルス転写を防止する1つ以上の欠失を含む。

【0017】

特定の実施形態では、3'LTRは、3'LTRのU3領域におけるTATAボックス、ならびにSp1およびNF-κB転写因子結合部位の欠失を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、3'LTRは自己不活性化（SIN）LTRである。

【0019】

ある特定の実施形態では、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターは、インテグリンサブユニットアルファM（ITGAM、CD11b）プロモーター、CD68プロモーター、CX3Cモチーフケモカイン受容体1（CX3CR1）プロモーター、イオン化カルシウム結合アダプター分子1（IBAM1）プロモーター、膜貫通タンパク質119（TMEM119）プロモーター、spalt様転写因子1（SALL1）プロモーター、接着Gタンパク質結合受容体E1（F4/80）プロモーター、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失、d1587revプライマー結合部位置換（MND）プロモーター、およびそれらの転写活性断片からなる群から選択される。

30

【0020】

ある特定の実施形態では、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターは、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失、d1587revプライマー結合部位置換（MND）プロモーターまたはその転写活性断片を含む。

40

【0021】

さらなる実施形態では、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターは、伸長因子1α（EF1α）プロモーターまたはその転写活性断片を含む。

【0022】

特定の実施形態では、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターは、短いEF1αプロモーターである。

【0023】

50

いくつかの実施形態では、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターは、長いEF1 α プロモーターである。

【0024】

さらなる実施形態では、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはcDNAである。

【0025】

特定の実施形態では、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、発現のために最適化されたコドンである。

【0026】

特定の実施形態では、左側の(5') HIV-1 LTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、RREレトロウイルスの移出エレメントと、cPPT/FLAPと、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたMNDプロモーターまたはEF1 α プロモーターと、右側の(3') HIV-1 LTRと、を含むポリヌクレオチドが提供される。

10

【0027】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドであって、左側の(5') CMVプロモーター/HIV-1キメラLTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、RREレトロウイルスの移出エレメントと、cPPT/FLAPと、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたMNDプロモーターまたはEF1 α プロモーターと、右側の(3') SIN HIV-1 LTRと、を含むポリヌクレオチドが提供される。

20

【0028】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルまたはウサギ β -グロビンポリアデニル化シグナルをさらに含む。

【0029】

様々な実施形態では、本明細書で企図されるポリヌクレオチドを含む、レンチウイルスベクターで形質導入された哺乳動物細胞が提供される。

【0030】

いくつかの実施形態では、細胞は造血細胞である。

【0031】

ある特定の実施形態では、細胞はCD34+細胞である。

30

【0032】

特定の実施形態では、細胞は幹細胞または前駆細胞である。

【0033】

様々な実施形態では、産生細胞は、gagをコードする第1のポリヌクレオチドと、polをコードする第2のポリヌクレオチドと、envをコードする第3のポリヌクレオチドと、本明細書で企図されるポリヌクレオチドと、を含む。

【0034】

様々な特定の実施形態では、本明細書で企図される産生細胞によって産生されるレンチウイルスベクターが提供される。

40

【0035】

様々なある特定の実施形態では、本明細書で企図されるポリヌクレオチドまたは哺乳動物細胞を含むレンチウイルスベクターを含む組成物が提供される。

【0036】

様々なさらなる実施形態では、薬学的に許容される担体と、本明細書で企図されるポリヌクレオチドまたは哺乳動物細胞を含むレンチウイルスベクターとを含む薬学的組成物が提供される。

【0037】

様々なさらなる実施形態では、MPS Iを治療する方法であって、本明細書で企図される、ポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクター、ポリヌクレオチドを含むレンチ

50

ウイルスベクターで形質導入された細胞、または哺乳動物細胞を、対象に投与することを
含む、方法が提供される。

【0038】

様々ないくつかの実施形態では、MPS Iを治療する方法であって、本明細書で企図
される薬学的組成物を対象に投与することを含む、方法が提供される。

【0039】

様々な特定の実施形態では、対象におけるMPS Iに関連する少なくとも1つの症状
を軽減させる方法であって、本明細書で企図される、ポリヌクレオチドを含むレンチウ
イルスベクター、ポリヌクレオチドを含むレンチウイルスベクターで形質導入された細胞、
または哺乳動物細胞を、対象に投与することを含む、方法が提供される。

10

【0040】

様々な実施形態では、対象におけるMPS Iに関連する少なくとも1つの症状を軽減
させる方法であって、本明細書で企図される薬学的組成物を対象に投与することを含む、
方法が提供される。

【0041】

特定の実施形態では、MPS Iは、ハーラー症候群(MPS I-H)である。

【0042】

特定の実施形態では、MPS Iは、ハーラー・シャイエ症候群(MPS I-H/S
)である。

【0043】

特定の実施形態では、MPS Iは、シャイエ症候群(MPS I-S)である。

20

【0044】

特定の実施形態では、MPS Iは、重症のMPS Iである。

【0045】

特定の実施形態では、MPS Iは、軽症のMPS Iである。

【0046】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの症状は、GAGの蓄積、失明、聴力消失、
学習および言語発達の遅滞、呼吸器疾患、心疾患、骨格異形症、ならびに認知機能低下か
らなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

30

【0047】

【図1】IDUAをコードするレンチウイルスベクターの例示的なアーキテクチャを示す
。

【図2A】野生型対照細胞、IDUA^{-/-}細胞、およびIDUAをコードするレンチウ
イルスベクター(pMND-IDUAおよびpEF1α-IDUA)で形質導入されたIDUA^{-/-}細胞におけるIDUA酵素活性をアッセイする代表的な実験からのデータを示す。

【図2B】野生型細胞および非形質導入IDUA^{-/-}線維芽細胞でアッセイしたバック
グラウンドレベルと比較して、IDUA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IDUA^{-/-}線維芽細胞が細胞培養上清中に約10倍高い活性IDUAを分泌す
ることを示す。

40

【図3】野生型対照細胞、IDUA^{-/-}細胞(GM0798およびGM06214)、
ならびにIDUA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IDUA^{-/-}
細胞(MND、IDUAおよびEF1α(EFS)、IDUA)からの細胞溶解液中のIDUAおよびアクチン発現のウェスタンブロットを示す。

【図4】IDUAをコードするポリヌクレオチドに連結されたMNDまたはEF1αプロ
モーターを含むLVVで形質導入されたヒトCD34⁺細胞が、擬似形質導入細胞と比較
して同様の増殖速度論を呈したことを示す。

【図5】IDUAをコードするポリヌクレオチドに連結されたMNDまたはEF1αを含
むLVVで形質導入され、サイトカインで7日間培養されたヒトCD34⁺細胞のVCN

50

を示す。

【図6】メチルセルロース培養中、12日目の、IDUAをコードするポリヌクレオチドに連結されたMNDまたはEF1 α プロモーターを含むLVVで形質導入されたヒトCD34⁺細胞の個々のコロニーVCNを示す。

【図7】IDUAをコードするポリヌクレオチドに連結されたMNDまたはEF1 α を含むLVVで形質導入され、サイトカインで7日間培養されたヒトCD34⁺細胞からの細胞ペレットおよび上清におけるIDUA活性を示す。

【図8】メチルセルロース培養中、12日目の、IDUAをコードするポリヌクレオチドに連結されたMNDまたはEF1 α プロモーターを含むLVVで形質導入されたヒトCD34⁺細胞からの細胞ペレットにおけるIDUA活性を示す。

【図9】IDUAをコードするポリヌクレオチドに連結されたMNDまたはEF1 α を含むLVVで形質導入され、サイトカインで7日間培養された3つのヒトCD34⁺ドナー細胞のVCNを示す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

配列識別子の簡単な説明

配列番号1は、 α -Lイズロニダーゼ(IDUA)ポリペプチドをコードする例示的なレンチウイルスベクターの配列を示す。

配列番号2は、IDUAをコードする例示的なレンチウイルスベクターの配列を示す。

配列番号3～13は、様々なリンカーのアミノ酸配列を示す。

配列番号14～16は、プロテアーゼ切断部位および自己切断性ポリペプチド切断部位のアミノ酸配列を示す。

【0049】

(発明を実施するための形態)

A. 概要

本発明は、概して、部分的に、ハーラー症候群(MPS I-H)、ハーラー・シャイエ症候群(MPS I-H/S)、シャイエ症候群(MPS I-S)、重症のMPS I、および軽症のMPS Iを含む、MPS Iの少なくとも1つの症状を治療、予防、または改善するための改良された遺伝子治療組成物および方法に関する。

【0050】

MPS Iを有する子供は、生まれたときにはMPS Iの兆候または症状を有さない場合があるが、一部は、臍の周り(臍ヘルニア)または下腹部(鼠径ヘルニア)に柔らかい膨出を有する。重症のMPS Iを有する個体は、一般的に、1歳までに障害の他の兆候および症状を示し始めるが、軽症のMPS Iを有するものは、小児期の後期にかけてより軽度の特徴を発症する。

【0051】

MPS Iは、大頭症、水頭症、心臓弁異常、特有の顔面特徴、肝腫大、脾腫大、および巨舌症と関連付けられ得る。声帯が大きくなることもあり、太い嗄声をもたらす。MPS Iを有する一部の人においては気道が狭くなり、頻繁な上気道感染症、および睡眠中の一時的な呼吸停止(睡眠時無呼吸)を引き起こす場合がある。MPS Iを有する個体はまた、目の透明なカバー(角膜)の混濁を発症する場合もあり、これは顕著な視力の喪失を引き起こし得る。冒された個体はまた、聴力消失および繰り返し起こる耳感染症を有し得る。MPS Iを有する個体の一部は、伸長が低く、動きやすさに影響する関節変形(拘縮)を有する。重度のMPS Iを有するほとんどの個体はまた、多発性骨形性不全症、手根管症候群、および脊髄を圧迫し損傷し得る頸椎脊椎管狭窄症を有する。

【0052】

両方の形態のMPS Iが多くの異なる器官および組織に影響を及ぼし得るが、重症のMPS Iを有する人は、1～4歳の間に症状を経験し、失明、聴力消失、学習および言語発達の遅滞、呼吸器および心臓の問題をはじめとする神経機能を進行的に喪失する。軽症のMPS Iを有する個体は通常、短い寿命を有さず、角膜混濁、心臓弁欠陥、および

10

20

30

40

50

骨格異形症によって呈する。

【0053】

様々な実施形態では、 α -Lイズロニダーゼ (IDUA) ポリペプチドをコードする遺伝子治療ベクターが企図される。遺伝子治療は、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを優先的に含む。遺伝子治療ベクターは、ガンマレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、アデノウイルスベクター、またはヘルペスウイルスベクターを含むが、これらに限定されないウイルスベクターであり得る。

【0054】

本明細書で企図される遺伝子治療ベクターで形質導入された細胞も様々な態様で提供される。いくつかの好ましい実施形態では、形質導入された細胞は、CD34⁺細胞を含むが、これに限定されない造血細胞である。

【0055】

様々な他の実施形態では、本明細書で企図される遺伝子治療組成物は、好ましくは、MPS Iと診断されたか、またはそれを有する対象を有する対象に投与される。

【0056】

様々な他の実施形態では、本明細書で企図される遺伝子治療組成物は、好ましくは、IDUA遺伝子において1つ以上の変異を有する対象を有する対象に投与される。

【0057】

特定の実施形態の実践は、特に矛盾を示さない限り、当該技術分野の範囲内である化学、生化学、有機化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、遺伝学、免疫学、および細胞生物学の従来の方法を用い、それらの多くは、例示のために以下に記載されている。このような技法は文献に十分に説明されている。例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001)、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989)、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008)、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience、Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985)、Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992)、Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984)、Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)、Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991)、Annual Review of Immunology、ならびにAdvances in Immunologyなどの学術誌における研究論文を参照されたい。

【0058】

B. 定義

10

20

30

40

50

別段に定義のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。特定の実施形態の実施または試験において、本明細書に記載されているものと類似または等価な任意の方法および材料を使用することができるが、組成物、方法および材料の好ましい実施形態が本明細書に記載される。本開示の目的のために、次の用語を以下に定義する。

【0059】

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

10

【0060】

選択肢（例えば、or「または」）の使用は、選択肢のいずれか一方、その両方、またはそれらの任意の組み合わせを意味すると理解されるべきである。

【0061】

「および／または」という用語は、選択肢のいずれか一方、または両方を意味すると理解されるべきである。

【0062】

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

20

【0063】

一実施形態では、範囲、例えば1～5、約1～5、または約1～約5は、範囲によって包含される各数値を指す。例えば、1つの非限定かつ単なる例示的な実施形態では、範囲「1～5」は、1、2、3、4、5の、または1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5もしくは5.0の、または1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、もしくは5.0の表現と同等である。

30

【0064】

本明細書で使用される場合、用語「実質的に」は、基準となる含量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量または長さと比較して80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の、含量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量または長さを指す。一実施形態では、「実質的に同じ」とは、基準となる含量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量または長さとはほぼ同等の、例えば生理学的効果などの効果を生じる、含量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量または長さを指す。

40

【0065】

「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、および「含む（comprising）」という単語は、本明細書全体を通して、文脈上異なる解釈を要する場合を除き、明記されているステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を包含するが、任意の他のステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を排除す

50

るものではないことを示唆すると理解されたい。「からなる」とは、「からなる」という句に続くものを含み、かつそれに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という句は、列挙された要素が必要または必須であり、他の一切の要素が存在すべきでないことを示す。「から本質的になる (consisting essentially of)」とは、この句の後に列挙されている任意の要素を包含し、列挙された要素に関する本開示に明記されている活性または作用に干渉または寄与しない他の要素に限定されるものとする。したがって、「から本質的になる (consisting essentially of)」という句は、列挙された要素が必要または必須であるが、記載された要素の活性または作用に実質的に影響する他の要素は存在しないことを示す。

【0066】

10

本明細書を通して、「一実施形態 (one embodiment)」、「1つの実施形態 (an embodiment)」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「ある特定の実施形態」、「追加の実施形態」、または「さらなる実施形態」、またはそれらの組み合わせの言及は、実施形態に関連して説明した特定の特徴、構造または特性が少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書の様々な箇所における前述の句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を指しているとは限らない。さらに、特定の特徴、構造、または特性は、1つ以上の実施形態において任意の好適な方法で組み合わせることができる。一実施形態における特徴の明確な記載は、特定の実施形態における特徴を除外するための根拠として役立つことも理解される。

【0067】

20

「増強する (enhance)」または「促進する (promote)」または「増加させる (increase)」または「増大させる (expand)」とは、一般に、ビヒクルまたは対照分子／組成物と比較して、より高い生理学的応答を誘発するか、引き起こすか、または生み出す、本明細書で企図される組成物および／または方法の能力を指す。「増加した (increased)」または「増強された (enhanced)」量とは、典型的に、「統計的に有意な」量であり、対照の量の1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍以上（例えば、500倍、1000倍）（1を超える全ての整数およびその間の小数点、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8倍などを含む）である増加を含み得る。

【0068】

30

「減少する (decrease)」または「低減する (lower)」または「減る (lessen)」または「低下する (reduce)」または「弱める (abate)」とは、一般的に、ビヒクルまたは対照組成物または方法の応答と比較して、減少した生理学的応答をもたらす組成物または方法を指す。形質導入された細胞の「減少した (decreased)」または「低下した (reduced)」量とは、典型的に、「統計的に有意な」量であり、対照の量の1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍以上（例えば、500倍、1000倍）（1を超える全ての整数およびその間の小数点、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8倍などを含む）である減少を含み得る。

【0069】

40

「維持する (maintain)」または「保存する (preserve)」または「維持 (maintenance)」または「変化なし (no change)」または「実質的な変化なし (no substantial change)」または「実質的に減少なし (no substantial decrease)」とは、一般に、ビヒクル、対照分子／組成物のいずれか、または特定の細胞における応答によって引き起こされる応答に匹敵する生理学的応答を指す。匹敵する応答は、参照応答と有意差がないか、または測定可能に違いがない応答である。

【0070】

「MPS I」とは、ムコ多糖症I型 (MPS I) を指し、特定の実施形態では、MPS Iは、IDUAの機能、活性、および／または発現を減少させるα-Lイブロンダ

50

ーゼ遺伝子（IDUA）における1つ以上の変異を特徴とする。特定の実施形態では、MPS I は、ハーラー症候群（MPS I-H）を指す。特定の実施形態では、MPS I は、ハーラー・シャイエ症候群（MPS I-H/S）を指す。特定の実施形態では、MPS I は、シャイエ症候群（MPS I-S）である。特定の実施形態では、MPS I は、重症のMPS I を指す。特定の実施形態では、MPS I は、軽症のMPS I を指す。

【0071】

以下の説明において、ある特定の詳細は、本明細書で意図される本発明の種々の例示的な実施形態の徹底的な理解を提供するために記載されている。しかし、当業者には、これらの詳細なしで特定の例示的な実施形態を実施することができることが理解されよう。さらに、本明細書に記載の構造および置換基の種々の組み合わせから誘導された個々のベクター、またはベクターの群が、各ベクターまたはベクターの群が個別に記載されているのと同じ程度に本出願により開示されていることが理解されるべきである。したがって、特定のベクター構造または特定の置換基の選択は本開示の範囲内である。

【0072】

C. ポリペプチド

「ポリペプチド」、「ポリペプチド断片」、「ペプチド」および「タンパク質」は、反対のことが示されない限り、従来の意味、すなわちアミノ酸の配列として互換的に用いられる。一実施形態では、「ポリペプチド」には、融合ポリペプチドおよび他のバリエーションが含まれる。ポリペプチドは、種々の周知の組換えおよび／または合成技術のいずれかを用いて調製することができる。ポリペプチドは特定の長さ限定されず、例えば全長タンパク質配列、完全長タンパク質の断片、または融合タンパク質を含むことができ、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに天然に存在するおよび天然に存在しない、当該技術分野で既知の他の修飾が含まれる。

【0073】

種々の実施形態では、IDUAポリペプチドを含むがこれに限定されないポリペプチドが本明細書で企図される。

【0074】

本明細書で使用する「単離されたペプチド」または「単離されたポリペプチド」などは、細胞環境からの、ならびに、細胞の他の成分関連するものからの、ペプチドまたはポリペプチド分子のインビトロ単離および／または精製を指し、すなわち、それはインビボ物質と有意に関連していない。

【0075】

ポリペプチドには、「ポリペプチドバリエーション」が含まれる。ポリペプチドバリエーションは、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入において、天然に存在するポリペプチドと異なってもよい。このようなバリエーションは、天然に存在し得るものであり、または例えば上記ポリペプチド配列の1つ以上のアミノ酸を修飾することによって合成的に生成されてもよい。例えば、特定の実施形態では、ポリペプチドに1つ以上の置換、欠失、付加および／または挿入を導入することによって、ポリペプチドの生物学的特性を調節することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、ポリペプチドは、本明細書で企図される任意の参照配列と少なくとも約65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドバリエーションを含み、典型的にはバリエーションはその参照配列の少なくとも1つの生物学的活性を維持する。

【0076】

ポリペプチドバリエーションは、生物学的に活性な「ポリペプチド断片」を含む。本明細書で 사용되는場合、用語「生物学的に活性な断片」または「最小限の生物学的に活性な断片」とは、天然に存在するポリペプチド活性の少なくとも100%、少なくとも90%、

少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも40%、少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも10%、または少なくとも5%を保持するポリペプチド断片を指す。ポリペプチド断片は、天然に存在するまたは組換え生産された1つ以上のアミノ酸の、アミノ末端欠失、カルボキシル末端欠失、および／または内部欠失もしくは置換を有する単量体または多量体であり得るポリペプチドを指す。ある特定の実施形態では、ポリペプチド断片は、少なくとも5～約1700アミノ酸長のアミノ酸鎖を含むことができる。ある特定の実施形態では、断片は少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700アミノ酸長、またはそれ以上のアミノ酸長であることが理解されよう。

10

【0077】

ポリペプチド断片の実例は、触媒ドメインなどを含む。

【0078】

上記のように、ポリペプチドは、アミノ酸置換、欠失、切断および挿入を含む様々な方法で変更することができる。そのような操作のための方法は、当該技術分野において一般的に知られている。例えば、参照ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションは、DNAの突然変異によって調製することができる。突然変異誘発およびヌクレオチド配列変更のための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:488-492)、Kunkel et al., (1987, Methods in Enzymol, 154:367-382)、米国特許第4,873,192号、Watson, J. D. et al., (Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987)、およびそれらの中に引用される参考文献を参照されたい。目的のタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸置換に関する手引きは、Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.) のモデルにおいて見出すことができる。

20

30

【0079】

ある特定の実施形態では、バリエーションは、1つ以上の保存的置換を含む。「保存的置換」とは、ペプチド化学の分野の当業者がポリペプチドの二次構造および疎水性を実質的に変化させないように、アミノ酸を類似の特性を有する別のアミノ酸で置換したものである。特定の実施形態において企図されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造において修飾を行うことができ、ポリペプチドには、少なくともおおよそ、およびなおも得る、所望の特性を有するバリエーションまたは誘導体ポリペプチドをコードする機能性分子を有するポリペプチドが含まれる。ポリペプチドのアミノ酸配列を変更して同等の、または改良されたバリエーションポリペプチドを作製することが望まれる場合、当業者は、例えば、コードするDNA配列の1つ以上のコドンを変化させることができる。

40

【0080】

どのアミノ酸残基が生物活性を失うことなく置換、挿入または欠失され得るかを決定するための指針は、DNASTAR、DNA Strider、Geneious、Mac VectorまたはVector NTIソフトウェアのような当該分野で周知のコンピュータプログラムを用いて見出すことができる。好ましくは、本明細書に開示されるタンパク質バリエーションにおけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に荷電したまたは荷電していないアミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化は、側鎖に関連

50

するアミノ酸ファミリーの1つの置換を含む。天然アミノ酸は、一般に、酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）および非荷電極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン）アミノ酸の4つのファミリーに分類される。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、芳香族アミノ酸として一緒に分類されることがある。ペプチドまたはタンパク質において、アミノ酸の好適な保存的置換は当業者に既知であり、一般に、得られる分子の生物学的活性を変えずに作製することができる。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換は、生物活性を実質的に変化させないことを認識する（例えば、Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224を参照されたい。）。

10

【0081】

このような変更を行う際には、アミノ酸のヒドロパシーインデックスを考慮することができる。タンパク質に対する相互作用の生物学的機能を付与する際のヒドロパシーアミノ酸インデックスの重要性は、当該技術分野で一般に理解されている（Kyte and Doolittle, 1982、参照により本明細書に組み込まれる）。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいてヒドロパシーインデックスが割り当てられている（Kyte and Doolittle, 1982）。これらの値は：イソロイシン（+4.5）、バリン（+4.2）、ロイシン（+3.8）、フェニルアラニン（+2.8）、システイン／システイン（+2.5）、メチオニン（+1.9）、アラニン（+1.8）、グリシン（0.4）、トレオニン（0.7）、セリン（0.8）、トリプトファン（0.9）、チロシン（1.3）、プロリン（1.6）、ヒスチジン（3.2）、グルタミン酸（3.5）、グルタミン（3.5）、アスパラギン酸（3.5）、アスパラギン（3.5）、リジン（3.9）およびアルギニン（4.5）である。

20

【0082】

ある種のアミノ酸は、類似のヒドロパシーインデックスまたはスコアを有する別のアミノ酸に置換でき、類似の生物学的活性を有するタンパク質がなおも得られる、すなわち生物学的機能的に同等のタンパク質をなおも得ることができることは、当該技術分野において既知である。このような変更を行う際には、ヒドロパシーインデックスが±2以内のアミノ酸の置換が好ましく、±1以内の置換が特に好ましく、±0.5以内の置換がさらにより特別に好ましい。類似のアミノ酸の置換は、親水性に基づいて効果的に行うことができることも当該技術分野で理解されている。

30

【0083】

米国特許第4,554,101号に詳述されているように、以下の親水性値（hydrophilicity value）がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）、リジン（+3.0）、アスパラギン酸（+3.0±1）、グルタミン酸（+3.0±1）、セリン（+0.3）、アスパラギン（+0.2）、グルタミン（+0.2）、グリシン（0）、トレオニン（-0.4）、プロリン（-0.5±1）、アラニン（-0.5）、ヒスチジン（-0.5）、システイン（-1.0）、メチオニン（-1.3）、バリン（-1.5）、ロイシン（-1.8）、イソロイシン（-1.8）、チロシン（-2.3）、フェニルアラニン（-2.5）、トリプトファン（-3.4）。アミノ酸は、類似の親水性値を有する別のものに置換することができ、生物学的に同等の、特に免疫学的に同等のタンパク質をなおも得ることができることが理解される。このような変更では、親水性値が±2以内のアミノ酸の置換が好ましく、±1以内のものが特に好ましく、±0.5以内のものがさらにより特別に好ましい。

40

【0084】

上に概説したように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づくことができる。

50

【0085】

ポリペプチドバリエーションは、グリコシル化形態、他の分子との凝集性コンジュゲート、および無関係な化学的部分（例えば、ペグ化分子）との共有結合性コンジュゲートをさらに含む。共有結合性バリエーションは、当該技術分野で知られているように、アミノ酸鎖またはN末端残基またはC末端残基に見出される基に官能基を連結することによって調製することができる。バリエーションはまた、対立遺伝子バリエーション、種バリエーション（*species variant*）および突然変異タンパク質も含む。タンパク質の機能的活性に影響を及ぼさない領域の切断または欠失もまた変異である。

【0086】

特定の実施形態で企図されるポリペプチドには、融合ポリペプチドが含まれる。特定の実施形態では、融合ポリペプチドおよび融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。融合ポリペプチドおよび融合タンパク質は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10個のポリペプチドセグメントを有するポリペプチドを指す。

【0087】

別の実施形態では、2つ以上のポリペプチドは、本明細書の他の箇所に開示されるような1つ以上の自己切断性ポリペプチド配列を含む融合タンパク質として発現され得る。

【0088】

融合ポリペプチドは、シグナルペプチド、細胞透過性ペプチドドメイン（CPP）、DNA結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン、クロマチン再構成ドメイン、ヒストン修飾ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、細胞外ドメイン、細胞外リガンド結合ドメイン、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、多量体化ドメイン、エピトープタグ（例えば、マルトース結合タンパク質（「MBP」）、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、HIS6、MYC、FLAG、V5、VSV-G、およびHA）ポリペプチドリンカー、およびポリペプチド切断シグナルを含むが、これらに限定されない1つ以上のポリペプチドドメインまたはセグメントを含むことができる。融合ポリペプチドは、典型的にはC末端からN末端に連結されるが、C末端からC末端、N末端からN末端、またはN末端からC末端にも連結することができる。特定の実施形態では、融合タンパク質のポリペプチドは任意の順序であり得る。融合ポリペプチドまたは融合タンパク質はまた、融合ポリペプチドの所望の活性が保存される限り、保存的に修飾されたバリエーション、多型バリエーション、対立遺伝子、突然変異体、部分配列（*subsequence*）および種間相同体を含むことができる。融合ポリペプチドは、化学合成法または2つの部分間の化学結合によって生成されてもよく、または一般に他の標準技術を用いて調製されてもよい。融合ポリペプチドを含む連結DNA配列は、本明細書の他の箇所に開示されているような好適な転写または翻訳制御エレメントに作動可能に連結される。

【0089】

融合ポリペプチドは、ポリペプチド内の1つ以上のポリペプチドまたはドメインを連結するために使用され得るリンカーを任意に含み得る。ペプチドリンカー配列は、ポリペプチドドメインがそれらの所望の機能を発揮できるように、各ポリペプチドがその適切な二次および三次構造にフォールディングするのに十分な距離だけ任意の2つ以上のポリペプチド成分を分離するために使用され得る。

【0090】

例示的なリンカーとしては、以下のアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない：グリシンポリマー（G）_n、グリシン-セリンポリマー（G1-5S1-5）_n（*n*は少なくとも1、2、3、4または5の整数である）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、GGG（配列番号3）、DGGGS（配列番号4）、TGEKP（配列番号5）（例えば、Liu et al., PNAS 5525-5530（1997）を参照されたい）、GGRR（配列番号6）（Pomerantz et al., 1995、上記参照）、（GGGGS）_n（*n*=1、2、3、4または5）（配列番号7）（Kim et al., PNAS 93, 1156-1160（1996.））、EGKSSGSGSESKVD（配列番号8）（Chaudhary et al., 19

10

20

30

40

50

90, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:1066-1070)、KESGSVSSEQLAQFRSLD (配列番号9) (Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426)、GGRRGGS (配列番号10)、LRQRDGERP (配列番号11)、LRQKDGGGSERP (配列番号12)、LRQKD (GGGS)₂ERP (配列番号13)。あるいは、可動性リンカーは、DNA結合部位およびペプチド自体の両方をモデリングすることができるコンピュータプログラムを使用して (Desjarlais & Berg, *PNAS* 90:2256-2260 (1993))、またはファージディスプレイ法によって合理的に設計することができる。

【0091】

融合ポリペプチドは、本明細書に記載のポリペプチドドメインのそれぞれの間に、または内在性オープンリーディングフレームとドナー修復テンプレートによってコードされるポリペプチドとの間にポリペプチド切断シグナルをさらに含み得る。さらに、ポリペプチド切断部位を任意のリンカーペプチド配列に入れることができる。例示的なポリペプチド切断シグナルには、プロテアーゼ切断部位、ヌクレアーゼ切断部位 (例えば、レア制限酵素認識部位、自己切断性リボザイム認識部位)、および自己切断性ウイルスオリゴペプチドなどのポリペプチド切断認識部位が含まれる (deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5 (8); 616-26を参照されたい)。

【0092】

好適なプロテアーゼ切断部位および自己切断性ペプチドは、当業者には既知である (例えば、Ryan et al., 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722、Scymczak et al. (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594を参照されたい)。例示的なプロテアーゼ切断部位には、ポティウイルスN1aプロテアーゼ (例えば、タバコエッチ病ウイルスプロテアーゼ)、ポティウイルスHCプロテアーゼ、ポティウイルスP1 (P35) プロテアーゼ、ビオウイルス (byovirus) N1aプロテアーゼ、ビオウイルスRNA-2によりコードされるプロテアーゼ、アフトウイルスLプロテアーゼ、エンテロウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス2Aプロテアーゼ、ピコルナ3Cプロテアーゼ、コモウイルス24Kプロテアーゼ、ネポウイルス24Kプロテアーゼ、RTSV (イネツングロ球状ウイルス) 3C様プロテアーゼ、PYVF (パースニップイエローフレックウイルス (Parsnip yellow fleck virus)) 3C様プロテアーゼ、ヘパリン、トロンビン、第Xa因子およびエンテロキナーゼ、の切断部位を含むが、これらに限定されない。その高い切断ストリンジェンシーのため、TEV (タバコエッチ病ウイルス) プロテアーゼ切断部位、例えばEXXYXQ (G/S) (配列番号14)、例えばENLYFQG (配列番号15) およびENLYFQS (配列番号16) (Xは任意のアミノ酸を表す (TEVによる切断はQとGまたはQとSとの間に生じる)) が一実施形態では好ましい。

【0093】

ある特定の実施形態では、自己切断性ポリペプチド部位は、2Aまたは2A様部位、配列またはドメインを含む (Donnelly et al., 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041)。特定の実施形態では、ウイルス2Aペプチドは、アフトウイルス2Aペプチド、ポティウイルス2Aペプチド、またはカルジオウイルス2Aペプチドである。

【0094】

様々な実施形態では、本明細書で企図されるポリペプチドまたは融合ポリペプチドの発現または安定性は、1つ以上のタンパク質不安定化配列またはタンパク質分解配列 (デグロン) によって調節される。それらの迅速なプロテアソームの代謝回転を実施するためにタンパク質を不安定化するためのいくつかの戦略が、本明細書において企図される。

【0095】

タンパク質不安定化配列の実例としては、不安定化ボックス (Dボックス) (細胞周期内の周期を達成するために、急速かつ完全なユビキチン媒介性タンパク質分解を経る必要

10

20

30

40

50

がある細胞周期依存性タンパク質中に9個のアミノ酸が存在する（例えば、Yamano et al. 1998. *Embo J* 17:5670-8を参照されたい）、KENボックス（Cdh1によって標的化されるAPC認識シグナル（例えば、Pfleger et al. 2000. *Genes Dev* 14:655-65を参照されたい）、Oボックス（Fzr/Cdh1によって活性化された後期促進複合体（APC）によって、M相の終わりに、およびG1のほとんどにわたって分解される、複製開始点認識複合体タンパク質1（ORC1）中に存在するモチーフ（例えば、Araki et al. 2005. *Genes Dev* 19(20):2458-2465を参照されたい）、Aボックス（Cdh1による後期促進複合体中に分解されるAurora-A中に存在するモチーフ（例えば、Littlepape et al. 2002. *Genes Dev* 16:2274-2285を参照されたい）、PESTドメイン（プロリン（P）、グルタミン酸（E）、セリン（S）、およびトレオニン（T）残基に富み、急速なプロテアーゼ破壊のためにタンパク質を標的とするモチーフ（Rechsteiner et al. 1996. *Trends Biochem Sci.* 21(7):267-271を参照されたい）、プロテアーゼ破壊のために急速に処理されるN末端ルールモチーフ、N-デグロンモチーフ、およびユビキチン融合分解（UFD）モチーフ（例えば、Dantuma et al. 2000. *Nat Biotechnol* 18:538-4を参照されたい））が挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

特定の実施形態での使用に好適なデグロンのさらなる事例には、リガンド制御可能なデグロンおよび温度調節可能なデグロンが含まれるが、これらに限定されない。リガンド制御可能なデグロンの非限定的な例には、シールド1によって安定化されるもの（例えば、Bonger et al. 2011. *Nat Chem Biol.* 7(8):531-537を参照されたい）、オーキシンによって不安定化されるもの（例えば、Nishimura et al. 2009. *Nat Methods* 6(12):917-922を参照されたい）、およびトリメトプリムによって安定化されるもの（例えば、Iwamoto et al., 2010. *Chem Biol.* 17(9):981-8を参照されたい）が含まれる。

【0097】

温度調節可能なデグロンの非限定的な例には、DHFRTSデグロン（例えば、Dohmen et al., 1994. *Science* 263(5151):1273-1276を参照されたい）が含まれるが、これに限定されない。

【0098】

特定の実施形態では、本明細書で企図されるポリペプチドは、Dボックス、Oボックス、Aボックス、KENモチーフ、PESTモチーフ、サイクリンAおよびUFDドメイン／基質、リガンド制御可能なデグロン、ならびに温度調節可能なデグロンからなる群から選択される1つ以上の分解配列を含む。

【0099】

D. ポリヌクレオチド

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）およびDNA／RNAハイブリッドを指す。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってもよく、組換え、合成または単離されたものであってもよい。ポリヌクレオチドには、プレメッセンジャーRNA（pre-mRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、RNA、短鎖干渉RNA（siRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、合成RNA、ゲノムRNA（gRNA）、プラス鎖RNA（RNA（+））、マイナス鎖RNA（RNA（-））、tracrRNA、crRNA、シングルガイドRNA（sgRNA）、合成RNA、ゲノムDNA（gDNA）、PCR増幅DNA、相補DNA（cDNA）、合成DNA、または組換えDNAが含まれるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドは、長さが少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも

20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個、少なくとも500個、少なくとも1000個、少なくとも5000個、少なくとも10000個、または少なくとも15000個の、またはそれ以上のヌクレオチドの多量体形態、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれか、またはいずれかのタイプのヌクレオチドの修飾形態、ならびに全ての中間の長さを指す。「中間の長さ」とは、この文脈において、引用された値の間の任意の長さ、例えば、6、7、8、9など、101、102、103など、151、152、153など、201、202、203などを意味することが容易に理解されよう。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたはバリアントは、参照配列に対して、少なくともまたは約50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、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%の配列同一性を有する。

【0100】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはコドン最適化されていてもよい。本明細書で使用される場合、用語「コドン最適化」は、ポリペプチドの発現、安定性および／または活性を増加させるために、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにコドンを置換することを指す。コドン最適化に影響を与える要因としては、(i) 2つ以上の生物または遺伝子または合成的に構築されたバイアステーブル間のコドンバイアスの変動、(ii) 生物、遺伝子、または遺伝子のセット内のコドンバイアスの程度の変動、(iii) 状況を含むコドンの系統的変動、(iv) それらのデコードtRNAによるコドンの変動、(v) トリプレットの全体的または1つの位置のいずれかで、GC%に従ったコドンの変動、(vi) 例えば天然に存在する配列のような参照配列との類似度の変動、(vii) コドン頻度カットオフの変動、(viii) DNA配列から転写されたmRNAの構造的性質、(ix) コドン置換セットの設計に基づくDNA配列の機能に関する事前知識、および／または(x) 各アミノ酸のコドンセットの系統的変動、のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。

【0101】

ポリヌクレオチドの実例としては、配列番号1～2に記載のポリヌクレオチド配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【0102】

様々な例示的な実施形態では、本明細書で企図されるポリヌクレオチドには、発現ベクター、ウイルスベクター、トランスファープラスミド、発現カセット、および α -Lイズロニダーゼ(IDUA)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0103】

α -Lイズロニダーゼ(IDUA)遺伝子は、タンパク質のスルファターゼファミリーのメンバーであるIDUA(MPS IおよびIDAとも称される)をコードする。典型的には、ヒトIDUAタンパク質は、前駆体形態として産生される。ヒトIDUAは、653個のアミノ酸であり、シグナルペプチド(1～26)と、(β/α)₈ TIMバレルドメイン(42～396)と、短いヘリックスループヘリックスドメイン(482～508)を含む β サンドウィッチドメイン(27～42および397～545)と、Ig様ドメイン(546～642)とを含む。IDUAは、デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸の2つのグリコサミノグリカンの末端 α -Lイズロン酸残基を加水分解する。この加水分解は、これらのグリコサミノグリカンのリソソーム分解のために必要とされる。酵素の欠乏を生じるこの遺伝子における変異は、常染色体劣性遺伝疾患であるムコ多糖症I型(MPS I)をもたらす。この遺伝子における変異は、常染色体劣性遺伝リソソーム蓄積症であるムコ多糖症I型と関連付けられている。

【0104】

本明細書で使用される場合、用語「ポリヌクレオチドバリエーション」および「バリエーション」などは、参照ポリヌクレオチド配列との実質的な配列同一性を示すポリヌクレオチド、またはストリンジェントな条件下で参照配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。これらの用語はまた、少なくとも1つのヌクレオチドの付加、欠失、置換または修飾によって参照ポリヌクレオチドと区別されるポリヌクレオチドを包含する。したがって、用語「ポリヌクレオチドバリエーション」および「バリエーション」には、1つ以上のヌクレオチドが付加または欠失または修飾されているか、または異なるヌクレオチドで置換されているポリヌクレオチドが含まれる。これに関して、修飾されたポリヌクレオチドが参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保持するような、突然変異、付加、欠失および置換を含む特定の変更を参照ポリヌクレオチドに対して行うことができることは、当該技術分野において十分に理解されている。

10

【0105】

本明細書で使用される「配列同一性」または例えば「に対して50%同一の配列」を含む記述は、配列が比較のウィンドウにわたってヌクレオチドごとに同一またはアミノ酸ごとに同一である程度を指す。したがって、「配列同一性の割合」は、比較のウィンドウにわたって2つの最適にアライメントされた配列を比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、およびMet）が両方の配列で生じる位置数を決定して整合した位置数を得、整合した位置数を比較のウィンドウ内の位置の総数（すなわち、ウィンドウのサイズ）で除し、その結果に100を乗じて配列同一性の割合を得ることによって計算され得る。典型的にはポリペプチドバリエーションが参照ポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を維持する場合、本明細書に記載される参照配列のいずれかに対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するヌクレオチドおよびポリペプチドが含まれる。

20

【0106】

本明細書で使用される場合、「単離されたポリヌクレオチド」は、天然起源の状態にそれに隣接する配列から精製されたポリヌクレオチド、例えば、断片に通常隣接する配列から取り除かれたDNA断片を指す。特定の実施形態では、「単離されたポリヌクレオチド」は、相補DNA（cDNA）、組換えポリヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、または、自然界に存在せず、人の手によって作製された他のポリヌクレオチドも指す。

30

【0107】

ポリヌクレオチドの配向を説明する用語としては、5'（通常、遊離リン酸基を有するポリヌクレオチドの末端）および3'（通常、遊離ヒドロキシル（OH）基を有するポリヌクレオチドの末端）が挙げられる。ポリヌクレオチド配列は、5'から3'の方向に、または3'から5'の方向にアノテートすることができる。DNAおよびmRNAに関して、5'から3'への鎖は、その配列がプレメッセンジャー（プレmRNA）の配列と同一であるので「DNAではチミン（T）であるが、RNAではその代わりにウラシル（U）であること以外」、「センス」、「プラス」または「コード」鎖と称される。DNAおよびmRNAに関して、RNAポリメラーゼによって転写された鎖である、相補的な3'から5'への鎖は、「鋳型」、「アンチセンス」、「マイナス」または「非コード」鎖と称される。本明細書で使用される場合、「逆方向」という用語は、3'から5'の方向に記載された5'から3'までの配列、または5'から3'の方向に記載された3'から5'までの配列を指す。

40

【0108】

用語「相補的」および「相補性」は、塩基対合の規則によって関連付けられるポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を指す。例えば、DNA配列5'AGTCATG3'の相補鎖は、3'TCAGTAC5'である。後者の配列は、多くの場合、5'末端を左側にし、3'末端を右側にして逆相補物、5'CATGACT3'として記載さ

50

れる。その逆相補物と同等である配列は、パリンδροーム配列であると言える。相補性は、塩基対合の規則に従って核酸の塩基の一部のみがマッチする、「部分的な」ものであってよい。あるいは、核酸間に「完全な」または「全」相補性が存在してもよい。

【0109】

本明細書で使用される用語「核酸カセット」または「発現カセット」は、RNAおよびその後ポリペプチドを発現し得るベクター内の遺伝子配列を指す。一実施形態では、核酸カセットは、目的の遺伝子（複数可）、例えば、目的のポリヌクレオチド（複数可）を含む。別の実施形態では、核酸カセットは、1つ以上の発現制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ（A）配列、および目的の遺伝子（複数可）、例えば、目的のポリヌクレオチド（複数可）を含む。ベクターは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれより多くの核酸カセットを含み得る。核酸カセットは、カセット中の核酸がRNAに転写され、必要な場合にはタンパク質またはポリペプチドに翻訳され、形質転換細胞内での活性に必要な適切な翻訳後修飾を受け、かつ適切な細胞内区画を標的とすることまたは細胞外区画への分泌によって、生物学的活性のために適切な区画に転座され得るように、位置的および配列的にベクター内で方向付けられる。好ましくは、カセットは、ベクターへの即座の挿入に適合させたその3'末端および5'末端を有し、例えば、それは各末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を有する。好ましい実施形態では、核酸カセットは、遺伝的障害を治療、予防、または改善するために使用される治療遺伝子の配列を含む。カセットは、単一の単位としてプラスミドまたはウイルスベクターから取り出すことおよびそれに挿入することができる。

10

20

【0110】

本明細書で使用される場合、用語「目的のポリヌクレオチド（複数可）」は、発現されることが望ましい発現ベクターに挿入された1つ以上のポリヌクレオチド、例えばポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（すなわち、目的のポリペプチド）をいう。好ましい実施形態では、本発明のベクターおよび／またはプラスミドは、1つ以上の目的のポリヌクレオチド、例えばIDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、目的のポリヌクレオチドは、例えば、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのように、神経セロイドリポフスチン症の治療、予防、または改善において治療効果を提供するポリペプチドをコードし、これは、「治療用ポリペプチド」と呼ぶことができる。

30

【0111】

ある特定の実施形態では、目的のポリヌクレオチドは、crRNA、tracrRNA、単一のガイドRNA（sgRNA）、siRNA、miRNA、shRNA、リボザイム、または別の阻害性RNAを含むがこれらに限定されない阻害性ポリヌクレオチドを含む。

【0112】

本発明のポリヌクレオチドは、それ自体のコード配列の長さにかかわらず、本明細書の他の箇所が開示されているまたは当該技術分野で既知のプロモーターおよび／またはエンハンサー、非翻訳領域（UTR）、コザック配列、ポリアデニル化シグナル、追加的な制限酵素部位、多重クローニング部位、配列内リボソーム進入部位（IRES）、リコンビナーゼ認識部位（例えば、LoxP、FRT、およびAtt位点）、終止コドン、転写終結シグナル、転写後応答エレメント、および自己切断性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、エピトープタグなどの他のDNA配列と組み合わせることができ、したがって、それらの全体の長さは相当に変動し得る。したがって、ほぼどんな長さのポリヌクレオチド断片でも使用することができ、全長は調製の容易さおよび意図された組換えDNAプロトコールでの使用により限定されることが好ましいことが意図されている。

40

【0113】

ポリヌクレオチドは、当該技術分野で既知であり入手可能な種々の十分に確立された技術の任意のものを用いて調製、操作、発現および／または送達することができる。所望のポリペプチドを発現させるために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を適切なベ

50

クターに挿入することができる。

【0114】

ベクターの実例は、プラスミド、自己複製配列、および転位因子、例えばSleeping Beauty、PiggyBacを含むが、これらに限定されない。

【0115】

ベクターのさらなる実例としては、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、またはP1由来人工染色体(PAC)などの人工染色体、ラムダファージまたはM13ファージなどのバクテリオファージ、および動物ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0116】

ベクターとして有用なウイルスの実例としては、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス(例えば、単純ヘルペスウイルス)、バキュロウイルス、パピローマウイルスおよびパポバウイルス(例えばSV40)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0117】

発現ベクターの実例には、哺乳動物細胞における発現のためのpCleoベクター(Promega)、哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介遺伝子導入および発現のためのpLenti4/V5-DEST(商標)、pLenti6/V5-DEST(商標)、およびpLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書中に開示されるポリペプチドのコード配列は、哺乳動物細胞におけるポリペプチドの発現のためのそのような発現ベクターに連結され得る。

【0118】

特定の実施形態では、ベクターは、エピソーム性ベクターまたは染色体外で維持されるベクターである。本明細書で使用される場合、用語「エピソーム性」は、宿主の染色体DNAへの組み込みなくおよび分裂宿主細胞から徐々に喪失することなく複製することができるベクターを指し、前記ベクターが染色体外またはエピソームに複製することも意味する。

【0119】

発現ベクター内に存在する「発現制御配列」、「制御エレメント」または「調節配列」は、宿主細胞のタンパク質と相互作用して転写および翻訳を行うベクターの非翻訳(non-translated)領域-複製開始点、選択カセット、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル(シャイン・ダルガーノ配列またはコザック配列)イントロン、転写後調節エレメント、ポリアデニル化配列、5'および3'非翻訳(unttranslated)領域である。そのようなエレメントは、それらの強度および特異性が変動し得る。利用するベクター系および宿主に応じて、遍在性プロモーターおよび誘導性プロモーターを含めた、多くの好適な転写および翻訳エレメントを使用することができる。

【0120】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、発現ベクターおよびウイルスベクターを含むが、これらに限定されないベクターであり、プロモーターおよび/またはエンハンサーなどの外因性、内在性または異種性制御配列を含む。「内在性」制御配列とは、ゲノム内で所与の遺伝子に天然に連結したものである。「外因性」制御配列とは、遺伝子操作(すなわち、分子生物学的技法)によって遺伝子の近位に配置されたものであり、したがって、その遺伝子の転写が連結したエンハンサー/プロモーターによって導かれる。「異種性」制御配列とは、遺伝子操作される細胞とは異なる種に由来する外因性配列である。「合成」制御配列は、1つ以上の内在性および/または外因性配列のエレメント、および/または特定の遺伝子治療のために最適なプロモーターおよび/またはエンハンサー活性を提供する、インビトロまたはインシリコで決定される配列を含み得る。

【0121】

用語「プロモーター」は、本明細書で使用される場合、RNAポリメラーゼが結合する

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）の認識部位を指す。RNAポリメラーゼは、プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドを開始させおよび転写する。特定の実施形態では、哺乳動物細胞において作動可能なプロモーターは、転写が開始される部位からおおよそ25～30塩基上流に位置するATリッチ領域および／または転写開始から70～80塩基上流に見出される別の配列、CNCAAT領域（Nは任意のヌクレオチドであってよい）を含む。

【0122】

用語「エンハンサー」は、転写の増強をもたらすことが可能な配列を含み、一部の場合には、別の制御配列に対する方向とは独立して機能し得るDNAのセグメントを指す。エンハンサーは、プロモーターおよび／または他のエンハンサーエレメントと協同的にまたは相加的に機能し得る。用語「プロモーター／エンハンサー」は、プロモーター機能とエンハンサー機能の両方をもたらすことが可能な配列を含有するDNAのセグメントを指す。

10

【0123】

用語「作動可能に連結した」は、記載されている構成成分が、それらの意図された様式で機能することが可能になる関係にある近位を指す。一実施形態では、この用語は、核酸発現制御配列（プロモーターおよび／またはエンハンサーなど）と第2のポリヌクレオチド配列、例えば、目的のポリヌクレオチドの機能的な連結を指し、ここで、発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を導く。

【0124】

本明細書で使用される場合、用語「構成的発現制御配列」は、作動可能に連結した配列の転写を絶え間なくまたは連続的に可能にするプロモーター、エンハンサー、またはプロモーター／エンハンサーを指す。構成的発現制御配列は、多種多様な細胞および組織型における発現を可能にする「遍在」プロモーター、エンハンサー、またはプロモーター／エンハンサーであってもよく、またはそれぞれ制限された種類の細胞および組織型における発現を可能にする「細胞特異的」、「細胞型特異的」、「細胞系統特異的」または「組織特異的」プロモーター、エンハンサー、またはプロモーター／エンハンサーであってもよい。

20

【0125】

特定の実施形態において使用するのに好適な例示的な遍在発現制御配列としては、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター、ウイルスシミアンウイルス40（SV40）（例えば、初期または後期）、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）LTRプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTR、単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）プロモーター、ワクシニアウイルス由来のH5、P7.5、およびP11プロモーター、短い伸長因子1- α （EF1a-short）プロモーター、長い伸長因子1- α （EF1a-long）プロモーター、初期増殖応答1（EGR1）、フェリチンH（FerH）、フェリチンL（FerL）、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、真核生物翻訳開始因子4A1（EIF4A1）、熱ショック70kDaタンパク質5（HSPA5）、熱ショックタンパク質90kDaベータ、メンバー1（HSP90B1）、熱ショックタンパク質70kDa（HSP70）、 β -キネシン（ β -KIN）、ヒトROSA26遺伝子座（Irions et al., Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007)）、ユビキチンCプロモーター（UBC）、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1（PGK）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリ β -アクチン（CAG）プロモーター、 β -アクチンプロモーター、および骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失、dl587revプライマー結合性部位置換（MND）プロモーター（Challita et al., J Virol. 69 (2): 748-55 (1995)）が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0126】

特定の実施形態では、所望のポリヌクレオチド配列の細胞型特異的、系統特異的または

50

組織特異的発現を達成するために（例えば、細胞型、細胞系統または組織のサブセットのみにいて、または特定の発生段階の間に、ポリペプチドをコードする特定の核酸を発現するために）、細胞、細胞型、細胞系統または組織特異的発現制御配列を使用することが望ましい場合がある。

【0127】

組織特異的な発現制御配列の実例としては、B29プロモーター（B細胞での発現）、*run t* 転写因子（CBFa2）プロモーター（幹細胞での特異的発現）、CD14プロモーター（単核球細胞での発現）、CD43プロモーター（白血球および血小板での発現）、CD45プロモーター（造血細胞での発現）、CD68プロモーター（マクロファージでの発現）、CYP450 3A4プロモーター（肝細胞での発現）、デスミンプロモーター（筋肉での発現）、エラスターゼ1プロモーター（膵腺房細胞での発現、エンドグリンプロモーター（内皮細胞での発現）、線維芽細胞特異的タンパク質1プロモーター（FSP1）プロモーター（線維芽細胞での発現）、フィブロネクチンプロモーター（線維芽細胞での発現）、*fms* 関連チロシンキナーゼ1（FLT1）プロモーター（内皮細胞での発現）、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター（星状細胞での発現）、インスリンプロモーター（膵臓β細胞での発現）、インテグリン、アルファ2b（ITGA2B）プロモーター（巨核球）、細胞内接着分子2（ICAM-2）プロモーター（内皮細胞）、インターフェロンベータ（IFN-β）プロモーター（造血細胞）、ケラチン5プロモーター（ケラチノサイトでの発現）、ミオグロビン（MB）プロモーター（筋肉での発現）、筋原性分化1（MYOD1）プロモーター（筋肉での発現）、ネフリン
20
プロモーター（足細胞での発現）、骨ガンマカルボキシグルタメートタンパク質2（OG-2）プロモーター（骨芽細胞での発現）、3-オキシ酸CoAトランスフェラーゼ2B（Oxct2B）プロモーター、（ハプロイド-精子細胞での発現）、界面活性タンパク質B（SP-B）プロモーター（肺での発現）、シナプシンプロモーター（ニューロンでの発現）、Wiskott-Aldrich症候群タンパク質（WASP）プロモーター（造血細胞での発現）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0128】

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

【0129】

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

【0130】

条件的発現は、部位特異的DNAリコンビナーゼを使用することによって達成することもできる。ある特定の実施形態によると、ポリヌクレオチドは、部位特異的リコンビナーゼによって媒介される組換えのための少なくとも1つの（典型的には2つの）部位を含む。本明細書で使用される場合、用語「リコンビナーゼ」または「部位特異的リコンビナーゼ」は、野生型タンパク質であってよい、1つ以上の組換え部位（例えば、2箇所、3箇所

10

20

30

40

50

所、4箇所、5箇所、6箇所、7箇所、8箇所、9箇所、10箇所、またはそれ以上）が関与する組換え反応に関与する切除的または統合的なタンパク質、酵素、補因子または関連するタンパク質（Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993)を参照されたい）、またはその突然変異体、誘導体（例えば、組換えタンパク質配列またはその断片を含有する融合タンパク質）、断片、およびバリエーションを包含する。特定の実施形態における使用に好適なリコンビナーゼの実例としては、Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、ΦC31、Cin、Tn3リゾルバーゼ、TnD X、XerC、XerD、Tnp X、Hjc、Gin、SpCCCE1、およびParAが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0131】

ポリヌクレオチドは、多種多様な部位特異的リコンビナーゼのいずれかのための1つ以上の組換え部位を含み得る。部位特異的リコンビナーゼの標的部位は、ベクター、例えばレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの組み込みに必要な任意の部位（複数可）に加えたものであることが理解されるべきである。本明細書で使用する、用語「組換え配列」、「組換え部位」または「部位特異的組換え部位」は、リコンビナーゼが認識して結合する特定の核酸配列を指す。

【0132】

例えば、Creリコンビナーゼのための1つの組換え部位は、8塩基対のコア配列と隣接している13塩基対の逆方向反復（リコンビナーゼ結合部位としての機能を果たす）を2つ含む34塩基対の配列であるloxPである（Sauer, B., Current Opinion in Biotechnology 5:521-527 (1994)の図1を参照されたい）。他の例示的なloxP部位としては、lox511（Hoes et al., 1996; Bethke and Sauer, 1997）、lox5171（Lee and Saito, 1998）、lox2272（Lee and Saito, 1998）、m2（Langer et al., 2002）、lox71（Albert et al., 1995）、およびlox66（Albert et al., 1995）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0133】

FLPリコンビナーゼのための好適な認識部位としては、FRT（McLeod, et al., 1996）、F1、F2、F3（Schlake and Bode, 1994）、F4、F5（Schlake and Bode, 1994）、FRT（LE）（Senecoff et al., 1988）、FRT（RE）（Senecoff et al., 1988）が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0134】

認識配列の他の例は、attB配列、attP配列、attL配列、およびattR配列であり、これらはリコンビナーゼ酵素λインテグラーゼ、例えばフィーC31によって認識される。φC31 SSRは、ヘテロタイプ部位attB（34bp長）とattP（39bp長）との間のみで組換えを媒介する（Groth et al., 2000）。それぞれ細菌およびファージゲノム上のファージインテグラーゼのための結合部位の名をとるattBおよびattPはいずれも、φC31ホモダイマーによって結合されているであろう不完全な逆方向反復を含有する（Groth et al., 2000）。産物の部位であるattLおよびattRは、さらなるφC31媒介性組換えに対して有効に不活性であり（Belteki et al., 2003）、反応を不可逆的にする。挿入を触媒するために、ゲノムのattP部位へのattBを有するDNAの挿入が、ゲノムのattB部位へのattP部位の挿入よりも容易であることが見出されている（Thyagarajan et al., 2001、Belteki et al., 2003）。したがって、典型的な戦略では、相同組換えによってattPを有する「ドッキング部位」を定義済みの遺伝子座に位置づけ、次いでそれを挿入のために、attBを有する入ってくる配列とパートナーにする。

40

50

【0135】

特定の実施形態では、複数のポリペプチドのそれぞれの効率的な翻訳を達成するために、ポリヌクレオチド配列を、1つ以上のIRES配列または自己切断性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列によって分離することができる。

【0136】

本明細書で使用される場合、「内部リボソーム侵入部位」または「IRES」とは、ATGなどの開始コドンへのシストロン（タンパク質をコードする領域）の直接内部リボソーム侵入を促進し、それにより、遺伝子のキャップ非依存性翻訳を導くエレメントを指す。例えば、Jackson et al., 1990. Trends Biochem Sci 15(12):477-83) および Jackson and Kaminski, 1995. RNA 1(10):985-1000を参照されたい。当業者によって一般的に用いられるIRESの例としては、米国特許第6,692,736号に記載されるものが挙げられる。当該技術分野で既知の「IRES」のさらなる例としては、ピコルナウイルスから得ることができるIRES (Jackson et al., 1990) およびウイルスまたは細胞mRNA源から得ることができるIRES、例えば、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質(BiP)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF) (Huez et al., 1998. Mol. Cell. Biol. 18(11):6178-6190)、線維芽細胞増殖因子2(FGF-2)、およびインスリン様増殖因子(IGFII)、翻訳開始因子eIF4Gならびに酵母転写因子TFIIDおよびHAP4、Nova genから市販されている脳心筋炎ウイルス(EMCV) (Duke et al., 1992. J. Virol 66(3):1602-9)、ならびにVEGF IRES (Huez et al., 1998. Mol Cell Biol 18(11):6178-90)が挙げられるが、これらに限定されない。IRESは、ピコルナウイルス科(Picornaviridae)、ジシストロウイルス科(Dicistroviridae)およびフラビウイルス科(Flaviviridae)種のウイルスゲノムおよびHCV、フレンドマウス白血病ウイルス(FrMLV)およびモロニーマウス白血病ウイルス(MoMLV)においても報告されている。

【0137】

一実施形態では、本明細書で企図されるポリヌクレオチドに使用されるIRESは、EMCV IRESである。

【0138】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、コンセンサスコザック配列を有し、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用される場合、「コザック配列」という用語は、mRNAのリボソームの小サブユニットへの最初の結合を著しく容易にし、翻訳を増大させる短いヌクレオチド配列を指す。コンセンサスコザック配列は、(GCC)RCCATGG (配列番号17)であり、Rは、プリン(AまたはG)である(Kozak, 1986. Cell. 44(2):283-92およびKozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15(20):8125-48)。

【0139】

異種核酸転写物の効率的な終結およびポリアデニル化を指示するエレメントは、異種遺伝子発現を増加させる。転写終結シグナルは、一般に、ポリアデニル化シグナルの下流に見出される。特定の実施形態では、ベクターは、発現させるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの3'ポリアデニル化配列を含む。用語「ポリA部位」または「ポリA配列」は、本明細書で使用される場合、RNAポリメラーゼIIによる新生RNA転写物の終結およびポリアデニル化の両方を導くDNA配列を指す。ポリアデニル化配列は、コード配列の3'末端にポリA尾部を付加することによりmRNAの安定性を促進することができ、したがって、翻訳効率の増大に寄与する。ポリA尾部を欠く転写物は不安定であり、急速に分解されるので、組換え転写物の効率的なポリアデニル化が望ましい。ベクターにおいて使用することができるポリAシグナルの実例としては、理想的なポリA配列(例えば、AATAAA、ATTAAA、AGTAAA)、ウシ成長ホルモンポリA配列(B

10

20

30

40

50

G H p A)、ウサギ β -グロビンポリ A 配列 (r β g p A)、または当該技術分野で既知の別の好適な異種性または内在性のポリ A 配列が挙げられる。

【0140】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを有する細胞は、直接毒性および／または制御されない増殖のリスクを低減するための誘導性自殺遺伝子を含む自殺遺伝子を利用する。特定の実施形態では、自殺遺伝子は、ポリヌクレオチドまたは細胞を保有する宿主に対して免疫原性ではない。使用され得る自殺遺伝子の特定の例は、カスパーゼ-9またはカスパーゼ-8またはシトシンデアミナーゼである。カスパーゼ-9は、二量化の特異的化学誘導剤 (C I D) を使用して活性化することができる。

【0141】

10

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書で企図される遺伝子修飾された細胞をインビボでネガティブ選択に感受性にさせる遺伝子セグメントを含む。「ネガティブ選択」は、個体のインビボ状態の変化の結果として排除され得る注入された細胞を指す。ネガティブ選択可能な表現型は、投与された薬剤、例えば化合物に感受性を与える遺伝子の挿入から生じ得る。ネガティブ選択遺伝子は当該分野で既知であり、ガンシクロビル感受性を与える単純ヘルペスウイルス I 型チミジンキナーゼ (H S V-1 T K) 遺伝子、細胞性ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (h y p o x a n t h i n e p h o s p h r i b o s y l t r a n s f e r a s e) (H P R T) 遺伝子、細胞性アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (A P R T) 遺伝子、および細菌性シトシンデアミナーゼを含むが、これらに限定されない。

20

【0142】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾細胞は、インビトロでネガティブ選択可能表現型の細胞の選択を可能にするポジティブマーカーをさらに含むポリヌクレオチドを含む。ポジティブ選択マーカーは、宿主細胞に導入されると、遺伝子を有する細胞のポジティブ選択を可能にする優性表現型を発現する遺伝子であり得る。このタイプの遺伝子は、当該分野で既知であり、ハイグロマイシン B に対する耐性を付与するハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p h)、抗生物質 G 4 1 8 に対する耐性をコードする T n 5 由来のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (n e o または a p h)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) 遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子 (A D A)、および多剤耐性 (M D R) 遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0143】

一実施形態では、ポジティブ選択マーカーおよびネガティブ選択可能エレメントは、ネガティブ選択可能エレメントの喪失が必然的にポジティブ選択マーカーの喪失を伴うように連結される。特定の実施形態では、ポジティブおよびネガティブ選択マーカーが融合され、一方の喪失が必然的に他方の喪失につながる。上記の所望のポジティブおよびネガティブ選択特性の両方を付与するポリペプチドを発現産物として産生する融合ポリヌクレオチドの例は、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼチミジンキナーゼ融合遺伝子 (H y T K) である。この遺伝子の発現は、インビトロでのポジティブ選択のためのハイグロマイシン B 耐性およびインビボにおけるネガティブ選択のためのガンシクロビル感受性を与えるポリペプチドを生じる。優位なポジティブ選択マーカーとネガティブ選択マーカーとの融合に由来する二機能性選択融合遺伝子の使用を記載している S. D. L u p t o n による P C T / U S 9 1 / 0 8 4 4 2 および P C T / U S 9 4 / 0 5 6 0 1 の刊行物も参照されたい。

40

【0144】

好ましいポジティブ選択マーカーは、h p h、n c o および g p t からなる群より選択される遺伝子に由来し、好ましいネガティブ選択マーカーは、シトシンデアミナーゼ、H S V-1 T K、V Z V T K、H P R T、A P R T および g p t からなる群より選択される遺伝子に由来する。特定の実施形態において企図される例示的な二機能性選択融合遺伝子には、ポジティブ選択マーカーが h p h または n e o に由来し、ネガティブ選択マーカーがシトシンデアミナーゼまたは T K 遺伝子または選択マーカーに由来する遺伝子が含

50

まれるが、これに限定されない。

【0145】

「ベクター」という用語は、本明細書では、別の核酸分子を移行または運搬することができる核酸分子を指すために使用される。移行される核酸は、一般に、ベクター核酸分子と連結している、例えば、それに挿入されている。ベクターは、細胞における自律複製を指示する配列を含んでもよく、宿主細胞のDNAへの組み込みを可能にするために十分な配列を含んでもよい。ベクターの実例は、プラスミド（例えば、DNAプラスミドまたはRNAプラスミド）、トランスポゾン、コスミド、細菌性人工染色体、およびウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。

【0146】

特定の実施形態において企図されるポリヌクレオチドを送達するための例示的な方法としては、エレクトロポレーション、ソノポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ナノ粒子、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、DEAE-デキストラン媒介性トランスファー、遺伝子銃、および熱ショックが挙げられるが、これらに限定されない。

【0147】

特定の実施形態において企図される特定の実施形態における使用に好適なポリヌクレオチド送達系の実例は、Amaya Biosystems、Maxcyte、Inc.、BTX Molecular Delivery Systems、およびCopernicus Therapeutics Inc.によって提供されるものが含まれるが、これらに限定されない。リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Transfectam（商標）およびLipofectin（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適なカチオン性および中性の脂質は、文献に記載されている。例えば、Liu et al.（2003）Gene Therapy. 10：180-187、およびBalazs et al.（2011）Journal of Drug Delivery. 2011：1-12を参照されたい。抗体標的化、細菌由来、非生存ナノセルに基づく送達も、特定の実施形態において企図される。

【0148】

好ましい実施形態では、1つ以上の治療用ポリペプチドまたは融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをウイルス法によって標的細胞に導入することができる。

【0149】

E. ウイルスベクター

1つ以上の治療用ポリペプチドまたは融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、非ウイルスまたはウイルス法によって標的細胞に導入することができる。特定の実施形態では、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ベクター、好ましくはウイルスベクター、より好ましくはレトロウイルスベクター、さらにより好ましくはレンチウイルスベクターを用いて標的細胞に導入される。

【0150】

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

【0151】

特定の実施形態において企図される特定の実施形態での使用に好適なウイルスベクター系の実例としては、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、遺伝子導入用ワクシニアウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0152】

10

20

30

40

50

レトロウイルスは遺伝子を送達するための一般的なツールである (Miller, 2000, Nature. 357: 455-460)。本明細書で使用される場合、「レトロウイルス」という用語は、そのゲノムRNAを直鎖状の二本鎖DNAコピーに逆転写し、その後、そのゲノムDNAを宿主ゲノムに共有結合により組み込むRNAウイルスを指す。いったん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の鋳型としての機能を果たし、新しいウイルス粒子を産生するために必要な構造タンパク質および酵素をコードするRNA分子の発現を導く。

【0153】

特定の実施形態における使用に好適な例証的なレトロウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス (MMuLV)、モロニー Maus 肉腫ウイルス (MoMSV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳腺癌ウイルス (MuMTV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、ネコ白血病ウイルス (FLV)、スプーマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、およびラウス肉腫ウイルス (RSV)、およびレンチウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0154】

本明細書で使用される場合、用語「レンチウイルス」は、複合レトロウイルスの群（または属）を指す。例証的なレンチウイルスとしては、HIV（ヒト免疫不全ウイルス；HIV 1型およびHIV 2型を含む）、ビスナ・マエディ (visna-maedi) ウイルス (VMV) ウイルス、ヤギ関節炎-脳炎ウイルス (CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、ならびにサル免疫不全ウイルス (SIV) が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、HIVに基づくベクターの骨格（すなわち、HIVシス作用性配列エレメント）が好ましい。特定の実施形態では、レンチウイルスは、IDUAポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に送達するために使用される。

【0155】

用語ウイルスベクターは、核酸を細胞内に移行することができるウイルスもしくはウイルス粒子、または移行された核酸自体のいずれかを指す場合がある。ウイルスベクターおよび移行プラスミドは、主にウイルスに由来する構造的遺伝エレメントおよび／または機能的遺伝エレメントを含有する。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遺伝エレメントおよび機能的遺伝エレメントまたはそれらの部分を含有するウイルスベクターまたはプラスミドを指す。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を含めた構造的遺伝エレメントおよび機能的遺伝エレメントまたはそれらの部分を含有するウイルスベクターまたはプラスミドを指す。用語「ハイブリッドベクター」は、レトロウイルス、例えば、レンチウイルスの配列と非レンチウイルスのウイルス配列の両方を含有するベクター、LTRまたは他の核酸を指す。一実施形態では、ハイブリッドベクターとは、逆転写、複製、組み込みおよび／またはパッケージングのためのレトロウイルス、例えば、レンチウイルスの配列を含むベクターまたは移行プラスミドを指す。

【0156】

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

【0157】

様々な実施形態では、本明細書で企図されるレンチウイルスベクターは、本明細書の他の箇所で議論されるように、1つ以上のLTR、ならびに以下のアクセサリーエレメント

：c P P T / F L A P、プシー（Ψ）パッケージングシグナル、移出エレメント、I D U Aポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結されたプロモーター、ポリ（A）配列を含み、および任意にW P R EまたはH P R E、インシュレーターエレメント、選択マーカー、および細胞自殺遺伝子のうちの1つ以上または全てを含むことができる。

【0158】

特定の実施形態では、本明細書で企図されるレンチウイルスベクターは、組み込み型または非組み込み型または組み込み欠陥レンチウイルスであり得る。本明細書で使用される場合、用語「組み込み欠陥レンチウイルス」または「ウイルスゲノムを宿主細胞のゲノムに組み込む能力を欠いているインテグラーゼを有するレンチウイルスを指す。組み込み不能ウイルスベクターは、特許出願第W O 2 0 0 6 / 0 1 0 8 3 4号に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0159】

インテグラーゼ活性を低減させるのに好適なH I V - 1 p o l 遺伝子における例証的な変異としては、H 1 2 N、H 1 2 C、H 1 6 C、H 1 6 V、S 8 1 R、D 4 1 A、K 4 2 A、H 5 1 A、Q 5 3 C、D 5 5 V、D 6 4 E、D 6 4 V、E 6 9 A、K 7 1 A、E 8 5 A、E 8 7 A、D 1 1 6 N、D 1 1 6 1、D 1 1 6 A、N 1 2 0 G、N 1 2 0 1、N 1 2 0 E、E 1 5 2 G、E 1 5 2 A、D 3 5 E、K 1 5 6 E、K 1 5 6 A、E 1 5 7 A、K 1 5 9 E、K 1 5 9 A、K 1 6 0 A、R 1 6 6 A、D 1 6 7 A、E 1 7 0 A、H 1 7 1 A、K 1 7 3 A、K 1 8 6 Q、K 1 8 6 T、K 1 8 8 T、E 1 9 8 A、R 1 9 9 c、R 1 9 9 T、R 1 9 9 A、D 2 0 2 A、K 2 1 1 A、Q 2 1 4 L、Q 2 1 6 L、Q 2 2 1 L、W 2 3 5 F、W 2 3 5 E、K 2 3 6 S、K 2 3 6 A、K 2 4 6 A、G 2 4 7 W、D 2 5 3 A、R 2 6 2 A、R 2 6 3 A、およびK 2 6 4 Hが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0160】

用語「長い末端反復（L T R）」は、それらの天然の配列の状況では、直接反復であり、U 3 領域、R 領域およびU 5 領域を含有する、レトロウイルスのD N Aの末端に位置する塩基対のドメインを指す。L T Rは、転写制御エレメント、ポリアデニル化シグナルおよびウイルスのゲノムの複製および組み込みのために必要な配列を含めた多数の調節シグナルを含有する。5' L T Rに、ゲノムの逆転写のために必要な配列（t R N Aプライマー結合部位）および粒子へのウイルスR N Aの効率的なパッケージングのために必要な配列（プシー部位）が近接している。

30

【0161】

本明細書で使用される場合、用語「パッケージングシグナル」または「パッケージング配列」、「プシー」、および符号「Ψ」は、ウイルス粒子形成の間のレトロウイルスのR N A鎖のキャプシド形成に必要とされるレトロウイルスゲノム内に位置する非コード配列を指しており、例えば、C l e v e r e t a l . , 1 9 9 5 . J . o f V i r o l o g y , V o l . 6 9 , N o . 4 ; p p . 2 1 0 1 - 2 1 0 9を参照されたい。

【0162】

レンチウイルスベクターは、好ましくは、L T Rを改変した結果としていくつかの安全性強化を含む。「自己不活性化」（S I N）ベクターとは、1回目のウイルス複製を越えてウイルスが転写されることを防ぐために、U 3 領域として既知の右側の（3'）L T Rのエンハンサープロモーター領域が改変された（例えば、欠失または置換によって）複製欠損性ベクターを指す。さらなる実施形態では、3' L T Rは、U 5 領域が、例えば、理想的なポリ（A）配列に置き換わるように改変されている。5' L T RのU 3 領域を、ウイルス粒子の産生の間にウイルスのゲノムの転写を駆動するための異種プロモーターで置き換えることによって、さらなる安全性の増強がもたらされる。使用することができる異種プロモーターの例としては、例えば、ウイルス性シミアンウイルス40（S V 40）プロモーター（例えば、初期または後期）、サイトメガロウイルス（C M V）プロモーター（例えば、最初期）、モロニーマウス白血病ウイルス（M o M L V）プロモーター、ラ

40

50

ウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、および単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）プロモーターが挙げられる。典型的なプロモーターは、Tatに依存しない様式で高レベルの転写を駆動することができる。この置き換えにより、ウイルス産生系に完全なU3配列が存在しないので、複製コンピテントウイルスが生成される組換えの可能性が低下する。LTRに対する改変、例えば、3'LTR、5'LTR、または3'LTRと5'LTRの両方に対する改変なども、本発明に包含されることに留意すべきである。

【0163】

本明細書で使用される場合、用語「FLAPエレメント」または「cPPT/FLAP」は、その配列がレトロウイルス、例えば、HIV-1またはHIV-2のセントラルポリプリントラクトおよび中心終結配列（cPPTおよびCTS）を含む核酸を指す。好適なFLAPエレメントは、米国特許第6,682,907号およびZenou, et al., 2000, Cell, 101:173に記載されている。HIV-1の逆転写の間、セントラルポリプリントラクト（cPPT）にあるプラス鎖DNAの中心開始点および中心終結配列（CTS）にある中心終結点により、3本鎖DNA構造：HIV-1中心DNAフラップの形成が導かれる。いかなる理論にも縛られることを望むものではないが、DNAフラップは、レンチウイルスのゲノム核内移行のシス活性決定因子として働く可能性があり、かつ／またはウイルスの力価を増大させる可能性がある。特定の実施形態では、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの骨格は、ベクター内での目的の異種遺伝子の上流または下流に1つ以上のFLAPエレメントを含む。例えば、特定の実施形態では、移行プラスミドはFLAPエレメントを含む。一実施形態では、ベクターは、HIV-1から単離されたFLAPエレメントを含む。別の実施形態では、レンチウイルスベクターは、cPPTおよび／またはCTSエレメントに1つ以上の変異を有するFLAPエレメントを含む。さらに別の実施形態では、レンチウイルスベクターは、cPPTまたはCTSエレメントのいずれかを含む。さらに別の実施形態では、レンチウイルスベクターは、cPPTまたはCTSエレメントを含まない。

【0164】

「移出エレメント」という用語は、核から細胞の細胞質へのRNA転写物の移出を調節するシス作用性転写後調節エレメントを指す。RNA移出エレメントの例としては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）rev応答エレメント（RRE）（例えば、Cullen et al., 1991, J. Virol., 65:1053、およびCullen et al., 1991, Cell 58:423）、ならびにB型肝炎転写後調節エレメント（HPRE）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0165】

特定の実施形態では、ウイルスベクターにおける異種配列の発現は、転写後調節エレメント、効率的なポリアダニル化部位、および必要に応じて、転写終結シグナルをベクターに組み込むことによって増大する。種々の転写後調節エレメント、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE；Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886）、B型肝炎ウイルスに存在する転写後調節エレメント（HPRE）（Huang et al., Mol. Cell. Biol., 15:3864）、および同様のもの（Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766）が、タンパク質における異種核酸の発現を増大させることができる。特定の実施形態では、ベクターは、WPREまたはHPREのような転写後調節エレメントを含む。特定の実施形態では、ベクターは、WPREまたはHPREのような転写後調節エレメントを欠くか、または含まない。

【0166】

異種核酸転写物の効率的な終結およびポリアダニル化を指示するエレメントは、異種遺伝子発現を増加させる。ベクターにおいて使用することができるポリAシグナルの実例としては、理想的なポリA配列（例えば、AATAAA、ATTAAA、AGTAAA）、ウシ成長ホルモンポリA配列（BGHpA）、ウサギβ-グロビンポリA配列（rβgp

A)、または当該技術分野で既知の別の好適な異種性もしくは内在性ポリ A 配列が挙げられる。

【0167】

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

10

【0168】

特定の実施形態では、レトロウイルスベクターは、左側の(5')レンチウイルスLTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、レトロウイルスの移出エレメントと、cPPT/FLAPと、α-ライズロニダーゼ(IDUA)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターと、右側の(3')レンチウイルスLTRと、を含む。ある特定の実施形態では、レトロウイルスベクターは、好ましくはレンチウイルスベクター、より好ましくはHIVレンチウイルスベクター、さらに好ましくはHIV-1レンチウイルスベクターである。

20

【0169】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、LTRのプロモーター領域が異種プロモーターで置換された左側の(5')レンチウイルスLTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、レトロウイルスの移出エレメントと、cPPT/FLAPと、α-ライズロニダーゼ(IDUA)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターと、右側の(3')レンチウイルスLTRと、を含む。ある特定の実施形態では、異種プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、またはシミアンウイルス40(SV40)プロモーターである。

30

【0170】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、左側の(5')レンチウイルスLTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、レトロウイルスの移出エレメントと、cPPT/FLAPと、α-ライズロニダーゼ(IDUA)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターと、改変されていないLTRと比較して1つ以上の改変を含む右側の(3')レンチウイルスLTRと、を含む。ある特定の実施形態では、3'LTRは、好ましくは、1ラウンドのウイルス複製を超えたウイルス転写を防止する1つ以上の欠失を含み、より好ましくは、3'LTRのU3領域のTATAボックスおよびSp1およびNF-κB転写因子結合部位の欠失を含み、さらにより好ましくは自己不活性化(SIN)LTRである。

40

【0171】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、LTRのプロモーター領域が異種プロモーターで置換された左側の(5')レンチウイルスLTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、レトロウイルスの移出エレメントと、cPPT/FLAPと、α-ライズロニダーゼ(IDUA)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターと、右側の(3')レンチウイルス性SIN LTRと、を含む。

【0172】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、LTRのプロモーター領域が異種プロモーターで置換された左側の(5')レンチウイルスLTRと、プシー(Ψ)パッケージングシグナルと、レトロウイルスの移出エレメントと、cPPT/FLAPと、ヒトα

50

ーLイズロニダーゼ（IDUA）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失、d l 5 8 7 r e vプライマー結合部位置換（MND）プロモーターまたはその転写活性断片と、右側の（3'）レンチウイルス性SINLTRと、を含む。

【0173】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、LTRのプロモーター領域が異種プロモーターで置換された左側の（5'）レンチウイルスLTRと、プシー（Ψ）パッケージングシグナルと、レトロウイルスの移出エレメントと、cPPT／FLAPと、ヒトαーLイズロニダーゼ（IDUA）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された伸長因子1α（EF1α）プロモーターまたはその転写活性断片と、右側の（3'）レンチウイルス性SINLTRと、を含む。好ましい実施形態では、EF1αプロモーターは、ヒトEF1α遺伝子の最初のイントロンを欠いており、「EF1α短プロモーター」と呼ばれる。他の実施形態では、EF1αプロモーターは、ヒトEF1α遺伝子の最初のイントロンを含み、「EF1α長プロモーター」と呼ばれる。

【0174】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、左側の（5'）CMVプロモーター／HIV-1キメラLTRと、プシー（Ψ）パッケージングシグナルと、RREレトロウイルスの移出エレメントと、cPPT／FLAPと、ヒトαーLイズロニダーゼ（IDUA）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたMNDプロモーターまたはEF1α短プロモーターと、右側の（3'）レンチウイルス性SINLTRと、を含む。

【0175】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、左側の（5'）CMVプロモーター／HIV-1キメラLTRと、プシー（Ψ）パッケージングシグナルと、RREレトロウイルスの移出エレメントと、cPPT／FLAPと、ヒトαーLイズロニダーゼ（IDUA）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたMNDプロモーターまたはEF1α短プロモーターと、右側の（3'）レンチウイルス性SINLTRと、異種ポリアデニル化シグナルと、を含む。特定の実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、人工ポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルまたはウサギβーグロビンポリアデニル化シグナルである。

【0176】

妥当なウイルス力価を達成するためには、多くの場合、大規模なウイルス粒子産生が必要である。ウイルス粒子は、移行ベクターをウイルスの構造遺伝子および／またはアクセサリー遺伝子、例えば、gag遺伝子、pol遺伝子、env遺伝子、tat遺伝子、rev遺伝子、vif遺伝子、vpr遺伝子、vpu遺伝子、vpx遺伝子、またはnef遺伝子または他のレトロウイルスの遺伝子を含むパッケージング細胞系にトランスフェクトすることによって産生される。

【0177】

本明細書で使用される場合、「パッケージングベクター」という用語は、パッケージングシグナルを欠き、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれより多くのウイルスの構造遺伝子および／またはアクセサリー遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターまたはウイルスベクターを指す。一般には、パッケージングベクターはパッケージング細胞に含まれ、トランスフェクション、形質導入または感染によって細胞に導入される。トランスフェクション、形質導入または感染のための方法は当業者に周知である。レトロウイルス／レンチウイルス移行ベクターを、トランスフェクション、形質導入または感染によってパッケージング細胞系に導入して、産生細胞または産生細胞系を生成することができる。本発明のパッケージングベクターは、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクションまたはエレクトロポレーションを含めた標準の方法によってヒト細胞または細胞系に導入することができる。いくつかの実施形態では、パッケージングベクターを、優性選択マーカー、例えば、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシ

10

20

30

40

50

ン、ブラストサイジン、ゼオシン、チミジンキナーゼ、DHFR、Gln合成酵素またはADAなどと一緒に細胞に導入し、その後、適切な薬物の存在下でクローンを選択し、単離することができる。選択マーカー遺伝子は、コード遺伝子に、パッケージングベクターによって、例えば、IRESまたは自己切断性ウイルスペプチドによって物理的に連結させることができる。

【0178】

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

【0179】

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

【0180】

他の実施形態では、ウイルスをシュードタイピングするためのエンベロープタンパク質としては、A型インフルエンザ、例えば、H1N1、H1N2、H3N2およびH5N1（トリインフルエンザ）など、B型インフルエンザ、C型インフルエンザウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス群の任意のウイルス、腸内アデノウイルス、パルボウイルス、デング熱ウイルス、サル痘、モノネガウイルス目、リッサウイルス、例えば、狂犬病ウイルス、ラゴスコウモリウイルス、モコラウイルス、ドゥベンヘイジウイルス、ヨーロッパコウモリウイルス (European bat virus) 1および2ならびにオーストラリアコウモリウイルス (Australian bat virus) など、エフェメロウイルス、ベシクロウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、ヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス1型および2型、水痘帯状疱疹、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス (EBV)、ヒトヘルペスウイルス (HHV)、ヒトヘルペスウイルス6型および8型など、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、パピローマウイルス、マウスガンマヘルペスウイルス、アレナウイルス、例えば、アルゼンチン出血熱ウイルス、ボリビア出血熱ウイルス、サビア関連出血熱ウイルス (Sabia-associated hemorrhagic fever virus)、ベネズエラ出血熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、マチュボウイルス、リンパ球脈絡髄膜炎ウ

イルス（LCMV）など、Bunyaviridae科、例えば、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ハンタウイルス、腎症候群を伴う出血熱を引き起こすウイルス、リフトバレー熱ウイルスなど、エボラ出血熱およびマールブルグ出血熱を含むFiloviridae科（フィロウイルス）、キャサヌール森林病（Kaysanur Forest disease）ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎を引き起こすウイルスを含むFlaviviridae科ならびにParamyxoviridae科、例えば、ヘンドラウイルスおよびニパーウイルスなど、大痘瘡および小痘瘡（天然痘）、アルファウイルス、例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、SARS関連コロナウイルス（SARS-CoV）、西ナイルウイルス、任意の脳炎（encephalitis）を引き起こすウイルスなどのいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0181】

一実施形態では、組換えレトロウイルス、例えばVSV-G糖タンパク質でシュードタイプ化されたレンチウイルスを産生するパッケージング細胞が提供される。

【0182】

「シュードタイプ」または「シュードタイプ化」という用語は、本明細書で使用される場合、ウイルスエンベロープタンパク質が、好ましい特性を保有する別のウイルスのウイルスエンベロープタンパク質で置換されたウイルスを指す。例えば、HIVは、水疱性口内炎ウイルスGタンパク質（VSV-G）エンベロープタンパク質を用いてシュードタイプ化することができ、これにより、HIVエンベロープタンパク質（env遺伝子によりコードされる）は通常ウイルスをCD4+提示細胞にターゲティングするので、HIVがより広い範囲の細胞に感染することが可能になる。好ましい実施形態では、レンチウイルスエンベロープタンパク質は、VSV-Gを用いてシュードタイプ化される。一実施形態では、組換えレトロウイルス、例えば、VSV-Gエンベロープ糖タンパク質を用いてシュードタイプ化されたレンチウイルスを産生するパッケージング細胞を提供する。

20

【0183】

本明細書で使用される場合、「パッケージング細胞系」という用語は、パッケージングシグナルを含有しないが、ウイルス粒子の正しいパッケージングに必要であるウイルスの構造タンパク質および複製酵素（例えば、gag、polおよびenv）を安定にまたは一過性に発現する細胞系への言及において使用される。パッケージング細胞を調製するために、任意の好適な細胞系を使用することができる。一般に、細胞は哺乳動物細胞である。特定の実施形態では、パッケージング細胞系を作製するために使用される細胞はヒト細胞である。使用することができる好適な細胞系としては、例えば、CHO細胞、BHK細胞、MDCK細胞、C3H 10T1/2細胞、FLY細胞、Psi-2細胞、BOSC 23細胞、PA317細胞、WEHI細胞、COS細胞、BSC1細胞、BSC40細胞、BMT10細胞、VERO細胞、W138細胞、MRC5細胞、A549細胞、HT1080細胞、293細胞、293T細胞、B-50細胞、3T3細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、Saos-2細胞、HuH7細胞、HeLa細胞、W163細胞、211細胞、および211A細胞が挙げられる。好ましい実施形態では、パッケージング細胞は、293細胞、293T細胞、またはA549細胞である。別の好ましい実施形態では、細胞はA549細胞である。

30

40

【0184】

本明細書で使用される場合、用語「産生細胞系」は、パッケージング細胞系およびパッケージングシグナルを含む移行ベクター構築物を含む、組換えレトロウイルス粒子を産生することができる細胞系を指す。感染性のウイルス粒子およびウイルスストック溶液の作製は、従来の技法を用いて行うことができる。ウイルスストック溶液を調製する方法は当該技術分野で既知であり、例えば、Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633、およびN. R. Landau et al. (1992) J. Virol. 66:5110-5113によって例示されてい

50

る。感染性ウイルス粒子はパッケージング細胞から従来の技法を用いて収集することができる。例えば、感染性粒子は、当該技術分野で既知のとおり、細胞溶解、または細胞培養物の上清を収集することによって収集することができる。必要に応じて、収集されたウイルス粒子は、所望であれば精製することができる。好適な精製技法は当業者に周知である。

【0185】

特定の実施形態では、ハーラー症候群の少なくとも1つの症状を治療および／または予防および／または改善するために対象に投与される遺伝子改変細胞を生成するために、1つ以上のポリペプチドを発現するウイルスベクターで形質導入された宿主細胞。ある特定の実施形態に従って利用され得る、遺伝子治療におけるウイルスベクターの使用に関連する他の方法は、例えば、Kay, M. A. (1997) Chest 111 (6 Supp.) : 138S-142S、Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1975-81、Shiratory, Y. et al. (1999) Liver 19:265-74、Oka, K. et al. (2000) Curr. Opin. Lipidol. 11:179-86、Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) Gene Ther. 7:1744-52、Yang, N. S. (1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:335-56、Alt, M. (1995) J. Hepatol. 23:746-58、Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) Ann. N. Y. Acad. Sci. 716:90-101、Strayer, D. S. (1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8:2159-2172、Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) Curr. Cardiol. Rep. 3:43-49、およびLee, H. C. et al. (2000) Nature 408:483-8に見出すことができる。

【0186】

「宿主細胞」は、インビボ、エクスピボ、またはインビトロにおいて、本明細書中に企図される組換えベクターまたはポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトする、感染させる、または形質導入する細胞を包含する。宿主細胞は、パッケージング細胞、産生細胞、およびウイルスベクターを感染させた細胞を含んでよい。特定の実施形態では、本発明のウイルスベクターを感染させた宿主細胞を、治療を必要とする対象に投与する。ある特定の実施形態では、用語「標的細胞」は、宿主細胞と互換的に使用され、トランスフェクトする、感染させる、または形質導入する、所望の細胞型の細胞を指す。好ましい実施形態では、標的細胞は、幹細胞または前駆細胞である。ある好ましい実施形態では、標的細胞は体細胞、例えば成体幹細胞、前駆細胞または分化細胞である。特に好ましい実施形態では、標的細胞は、造血細胞、例えば、造血幹細胞または前駆細胞、またはCD34⁺細胞である。さらなる治療標的細胞が本明細書で議論される。

【0187】

F. 遺伝子改変細胞

様々な実施形態では、細胞は、IDUAポリペプチドを発現するように遺伝子改変され、遺伝的に改変された細胞は、神経セロイドリポフスチン症を治療するために使用される。細胞は、エクスピボ、インビトロ、またはエクスピボで遺伝子改変することができる。本明細書で使用される場合、「遺伝子操作された」または「遺伝子改変された」という用語は、DNAまたはRNAの形態の余分な遺伝物質を細胞内の全遺伝物質に加えることを指す。用語「遺伝子改変細胞」、「改変細胞」および「遺伝子操作された細胞」は互換的に使用される。本明細書で使用される場合、「遺伝子治療」という用語は、遺伝子の発現を回復、修正または改変する、または治療用ポリペプチド、例えばIDUAを発現させる目的で、細胞中の全遺伝物質へのDNAまたはRNAの形態の外部の遺伝物質の導入を指す。

【0188】

細胞は、自己由来／自源性 (autogeneic) (「自己」) であっても非自己由

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

【0189】

特定の実施形態では、IDUAをコードするベクターは、1つ以上の動物細胞、好ましくは哺乳動物、例えば非ヒト霊長類またはヒト、より好ましくはヒトに導入される。

【0190】

特定の実施形態では、細胞の集団は、本明細書で企図されるベクターで形質導入される。本明細書で使用される場合、用語「細胞集団」は、本明細書の他の場所に記載されているように、任意の数および／または組み合わせの同種または異種細胞型で構成され得る複数の細胞を指す。例えば、造血幹細胞または前駆細胞の形質導入のために、細胞の集団は、臍帯血、胎盤血液、骨髓または末梢血から単離または取得され得る。細胞の集団は、形質導入される標的細胞型の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%または約100%を含み得る。ある特定の実施形態では、造血幹細胞または前駆細胞は、当該分野で既知の方法を用いて、異種細胞の集団から単離または精製され得る。

【0191】

特定の実施形態では、細胞は初代細胞である。本明細書で使用される用語「初代細胞」は、組織から単離され、インビトロまたはエキスピボでの増殖のために確立されている細胞を指すことが当該技術分野において知られている。対応する細胞は、たとえあったとしてもごく少数の集団倍増を受けており、したがって、連続細胞系と比較して、それらが由来する組織の主な機能的構成要素の代表であり、インビボ状態に対するより代表的なモデルを表す。初代細胞系を樹立するための様々な組織および方法から試料を得る方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Jones and Wise, Methods Mol Biol. 1997を参照されたい）。本発明の方法における使用のための初代細胞は、例えば、血液、リンパ腫および上皮腫瘍に由来する。一実施形態では、初代細胞は、造血幹細胞または前駆細胞である。

【0192】

用語「幹細胞」は、（1）長期にわたって自己再生できること、または元の細胞と同一のコピーを少なくとも1つ生成することができること、（2）単一細胞レベルで、多数の、またいくつかの例ではただ1つの特殊化した細胞型に分化することができること、および（3）インビボで組織の機能的再生をすること、ができる未分化細胞である細胞を指す。幹細胞は、それらの発生上の能力に従って、全能性、多能性、多分化能（multipotent）および少能性（oligopotent）／単能性に細分類される。「自己再生」とは、変更されていない娘細胞を産生する独特の能力および特殊化した細胞型を生成する独特の能力（潜在力）を有する細胞を指す。自己再生は、2つのやり方で実現することができる。非対称細胞分裂により、親の細胞と同一である娘細胞が1つと、親の細胞とは異なり、前駆細胞または分化細胞である娘細胞が1つ産生される。対称細胞分裂により、同一の娘細胞が2つ産生される。細胞の「増殖」または「拡大」とは、対称的に分裂する細胞を指す。

【0193】

本明細書で使用される場合、用語「前駆体」または「前駆細胞」は、自己再生する能力、およびより成熟した細胞に分化する能力を有する細胞を指す。多くの前駆細胞は単一の系列に沿って分化するが、かなり広範囲の増殖能力も有し得る。

【0194】

造血幹細胞（HSC）は、生物体の生存期間にわたって成熟血液細胞のレパトリー全体を生成することができる拘束された造血前駆細胞（HPC）を生じさせる。用語「造血

10

20

30

40

50

幹細胞」または「HSC」は、骨髄系列（例えば、単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞）、およびリンパ系列（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞）、および当該技術分野で既知のその他の系列を含めた、生物体の血液細胞の種類の全てを生じさせる多分化能性幹細胞を指す（Fei, R., et al., 米国特許第5,635,387号、McGlave, et al., 米国特許第5,460,964号、Simmons, P., et al., 米国特許第5,677,136号、Tsukamoto, et al., 米国特許第5,750,397号、Schwartz, et al., 米国特許第5,759,793号、DiGiusto, et al., 米国特許第5,681,599号、Tsukamoto, et al., 米国特許第5,716,827号を参照されたい）。一実施形態では、HSCはCD34⁺細胞である。致死的に放射線照射した動物またはヒトに移植すると、造血幹細胞および前駆細胞は赤血球、好中球－マクロファージ、巨核球およびリンパ系の造血細胞プールを再配置させることができる。

【0195】

本明細書で企図される組成物および方法で形質導入される好ましい標的細胞型には、造血細胞、好ましくはヒト造血細胞、より好ましくはヒト造血幹細胞および前駆細胞、さらにより好ましくはCD34⁺ヒト造血幹細胞が含まれる。

【0196】

本明細書で企図される方法および組成物で形質導入された造血細胞を得るための例示的な供給源としては、臍帯血、骨髄または動員末梢血が挙げられるが、これらに限定されない。

【0197】

特定の実施形態では、本明細書で企図されるIDUAをコードするウイルスベクターで形質導入された造血細胞には、CD34⁺細胞が含まれる。本明細書で使用される場合、用語「CD34⁺細胞」は、その細胞表面上にCD34タンパク質を発現する細胞を指す。本明細書で使用する「CD34」は、しばしば細胞－細胞接着因子として作用する細胞表面糖タンパク質（例えば、シアロムチンタンパク質）を指す。CD34⁺は、造血幹細胞および前駆細胞の両方の細胞表面マーカーである。

【0198】

本明細書で企図される方法および組成物による形質導入に好適な造血幹細胞または前駆細胞のさらなる実例としては、CD34⁺CD38^LCD90⁺CD45^{RA}である造血細胞、CD34⁺、CD59⁺、Thy1／CD90⁺、CD38^L／⁻、C-kit／CD117⁺、およびLin⁽⁻⁾である造血細胞、ならびにCD133⁺である造血細胞が挙げられる。

【0199】

一実施形態では、本明細書で企図されるIDUAをコードするウイルスベクターで形質導入された造血細胞には、CD34⁺CD133⁺細胞が含まれる。

【0200】

造血階層を特徴付けるための様々な方法が存在する。特徴付けの1つの方法は、SLAMコードである。SLAM（シグナル伝達リンパ球活性化分子）ファミリーは、遺伝子が、第1染色体（マウス）上の単一の遺伝子座に大部分がタンデムに位置し、全てが免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのサブセットに属し、最初はT細胞刺激に関与すると考えられていた>10分子の群である。このファミリーは、CD48、CD150、CD244などを含み、CD150は創始メンバー（founding member）であり、したがって、slamF1、すなわち、SLAMファミリーメンバー1とも称される。造血階層についてのサインSLAMコードは、造血幹細胞（HSC）－CD150⁺CD48⁻CD244⁻；多能性前駆細胞（MPP）－CD150⁻CD48⁻CD244⁺；系列制限前駆細胞（LRP）－CD150⁻CD48⁺CD244⁺；一般的な骨髄系前駆体（CMP）－lin⁻SCA-1⁻c-kit⁺CD34⁺CD16／32^{mid}；顆粒球－マクロファージ前駆体（GMP）－lin⁻SCA-1⁻c-kit⁺CD

10

20

30

40

50

$34^{+}CD16/32^{hi}$; および巨核球-赤血球前駆体 (MEP) - $lin^{-}SCA-1^{-}ckit^{+}CD34^{-}CD16/32^{low}$ である。

【0201】

一実施形態では、本明細書で企図される IDUA をコードするウイルスベクターで形質導入された造血細胞には、 $CD150^{+}CD48^{-}CD244^{-}$ 細胞が含まれる。

【0202】

様々な実施形態では、本明細書で企図される IDUA をコードするウイルスベクターで形質導入された造血幹細胞および前駆細胞 (HSPC) を含む造血細胞の集団が提供される。好ましい実施形態では、HSPC は $CD34^{+}$ 造血細胞である。

【0203】

G. 組成物および製剤

本明細書で企図される組成物および製剤は、本明細書で企図される任意の数の形質導入または非形質導入細胞またはその組み合わせ、ウイルスベクター、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの組み合わせを含み得る。組成物には、薬学的組成物が含まれるが、これに限定されない。「薬学的組成物」は、単独で、または1つ以上の他の療法の様式と組み合わせ、細胞または動物に投与するための薬学的に許容される担体と共に製剤化された組成物を指す。所望であれば、組成物は、例えば、サイトカイン、成長因子、ホルモン、小分子、プロドラッグ、薬物、抗体、または他の種々の薬学的に活性な薬剤などの他の薬剤と組み合わせ、投与することもできることも理解されよう。特定の実施形態では、追加の薬剤が意図された治療を送達する組成物の能力に悪影響を与えない限り、組成物に含まれ得る他の成分に実質的に制限はない。

【0204】

本明細書で企図される特定のエキスピボおよびインピボ製剤および組成物は特に、単独で、または1つ以上の他の治療様式と組み合わせ、投与する細胞、組織、器官、または動物に投与するための薬学的に許容される担体と共に製剤化された、形質導入または非形質導入細胞またはそれらの組み合わせと、ウイルスベクターとの組み合わせを含むことができる。

【0205】

本明細書で企図される特定のインピボ製剤および組成物は、細胞、組織、器官、または動物への投与のための薬学的に許容される担体と共に製剤化されたウイルスベクターの組み合わせを、単独で、または1つ以上の他の療法様式と組み合わせ、含む。

【0206】

ある特定の実施形態では、本明細書で企図される組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体と共に製剤化された、治療有効量の形質導入細胞、例えば造血細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞、 $CD34^{+}$ 細胞、 $CD133^{+}$ 細胞などを含む細胞の集団を含む。

【0207】

特定の他の実施形態では、本発明は、レトロウイルスベクター、例えば、1つ以上の薬学的に許容される担体で製剤化されたレンチウイルスベクターを含む組成物を提供する。

【0208】

本明細書で企図される薬学的組成物は、本明細書で企図される IDUA をコードするベクターまたはプロウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む形質導入細胞を含む。

【0209】

本明細書で使用する、「薬学的に許容される」という句は、健全な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題または合併症なしに、合理的な利益／リスク比に見合った、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに好適な化合物、材料、組成物および／または剤形を指す。

【0210】

「薬学的に許容される担体」という用語は、治療用細胞がそれらと投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。薬学的担体の実例は、細胞培養培地、水および油（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの石油、動物、植物また

10

20

30

40

50

は合成起源のものを含む)などの滅菌液体であり得る。生理食塩水およびデキストロースおよびグリセロール水溶液も、特に注射液のための液体担体として使用することができる。特定の実施形態における好適な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。任意の従来の媒体または薬剤が活性成分と適合しない場合を除いて、治療組成物におけるその使用が意図される。補助的な活性成分も組成物に組み込むことができる。

【0211】

一実施形態では、薬学的に許容される担体を含む組成物は、対象への投与に好適である。特定の実施形態では、担体を含む組成物は、非経口投与、例えば、血管内（静脈内または動脈内）、腹腔内または筋肉内投与に好適である。特定の実施形態では、薬学的に許容される担体を含む組成物は、脳室内、脊髄内または髄腔内投与に好適である。薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液、細胞培養培地、または分散液が含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。任意の従来の培地または薬剤が形質導入された細胞と適合しない場合を除いて、薬学的組成物におけるそれらの使用が企図される。

【0212】

特定の実施形態では、本明細書で企図される組成物は、遺伝子改変された造血幹細胞および／または前駆細胞および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で企図される細胞に基づく組成物を含む組成物は、腸内または非経口投与方法によって、または所望の治療目標を達成するために他の好適な化合物と組み合わせて別個に投与することができる

【0213】

薬学的に許容される担体は、治療されるヒト対象への投与に好適なものにするために、十分に高い純度および十分に低い毒性を有していなければならない。さらに組成物の安定性を維持または増加させるべきである。薬学的に許容される担体は、液体または固体であり得、組成物の他の成分と組み合わせた場合に、所望のバルク、コンシステンシーなどを提供するために計画された投与方法を念頭に置いて選択される。例えば、薬学的に許容される担体は、これらに限定することなく、結合剤（例えばアルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）、充填剤（例えば、ラクトースおよび他の糖類、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、リン酸水素カルシウムなど）、滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、ステアリン酸金属、水素化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）、崩壊剤（例えば、デンプン、グリコール酸デンプンナトリウムなど）、または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）などである。本明細書で企図される組成物のための他の好適な薬学的に許容される担体には、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0214】

このような担体溶液はまた、緩衝剤、希釈剤および他の好適な添加剤を含み得る。本明細書で使用される、用語「緩衝液」は、その化学的な構成が、pHの有意な変化なしに酸または塩基を中和する溶液または液体を指す。本明細書で企図される緩衝液の例には、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、リンゲル液、5%デキストロース水（D5W）、通常／生理食塩水（0.9%NaCl）が含まれるが、これらに限定されない。

【0215】

薬学的に許容される担体は、約7の組成物のpHを維持するのに十分な量で存在してもよい。あるいは、組成物は、約6.8～約7.4の範囲、例えば、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、および7.4のpHを有する。さらに別の実施形態では、

組成物は約 7.4 の pH を有する。

【0216】

本明細書で企図される組成物は、無毒性の薬学的に許容される媒体を含み得る。組成物は懸濁液であってもよい。本明細書で使用される、用語「懸濁液」は、細胞が固体支持体に付着していない非接着性の状態を指す。例えば、懸濁液として維持された細胞は、攪拌 (stirred) または攪拌 (agitated) され、培養皿のような支持体に接着されない。

【0217】

特定の実施形態では、本明細書で企図される組成物は、造血幹細胞および／または前駆細胞が許容される液体培地または液体 (例えば、生理食塩水または無血清培地、静脈内 (IV) バッグなど) 中で分散される懸濁液中で製剤化される。許容される希釈剤には、水、PlasmaLyte、リンガー溶液、等張性塩化ナトリウム (生理食塩水) 溶液、無血清細胞培養培地、および CryoStor (登録商標) 培地などの極低温保存に好適な培地が含まれるが、これらに限定されない。

【0218】

ある特定の実施形態では、薬学的に許容される担体は、ヒトまたは動物由来の天然タンパク質を実質的に含まず、造血幹細胞および前駆細胞などの細胞集団を含む組成物を保存するのに好適である。治療用組成物は、ヒト患者に投与されることを意図されており、したがって、ウシ血清アルブミン、ウマ血清およびウシ胎仔血清などの細胞培養成分を実質的に含まない。

【0219】

いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される細胞培養培地中で製剤化される。そのような組成物は、ヒト対象への投与に好適である。特定の実施形態では、薬学的に許容される細胞培養培地は無血清培地である。

【0220】

血清を含まない培地は、血清含有培地に対していくつかの利点を有し、簡略化されたより良好な組成物、汚染の程度の減少、感染因子の潜在的供給源の排除、および低コストを含む。種々の実施形態では、無血清培地は動物を含まず、任意にはタンパク質を含まない培地であってもよい。培地は、任意に、生物薬学的に許容される組換えタンパク質を含み得る。「動物を含まない」培地は、その成分が非動物源に由来する培地を指す。組換えタンパク質は、動物を含まない培地中で天然の動物タンパク質を置換し、栄養素は、合成、植物または微生物源から得られる。対照的に、「タンパク質を含まない」培地は実質的にタンパク質を含まないと定義される。

【0221】

特定の組成物に使用される無血清培地の事例は、QBSF-60 (Quality Biological, Inc.)、StemPro-34 (Life Technologies) および X-VIVO 10 を含むが、これらに限定されない。

【0222】

好ましい実施形態では、造血幹細胞および／または前駆細胞を含む組成物は、PlasmaLyte で製剤化される。

【0223】

様々な実施形態では、造血幹細胞および／または前駆細胞を含む組成物は、凍結保存培地中に製剤化される。例えば、凍結保存剤を含む凍結保存培地を用いて解凍後の高い細胞生存率結果を維持することができる。特定の組成物に使用される凍結保存培地の事例は、CryoStor CS10、CryoStor CS5、および CryoStor CS2 を含むが、これらに限定されない。

【0224】

一実施形態では、組成物は、50:50 の PlasmaLyte A 対 CryoStor CS10 を含む溶液中に製剤化される。

【0225】

特定の実施形態では、組成物は、マイコプラズマ、エンドトキシン、および微生物汚染を実質的に含まない。エンドトキシンに関して「実質的に含まない」とは、生物学的製剤についてFDAにより許容される1日あたり5 EU/kg体重の総エンドトキシンであり、平均的な70 kgの人に対して、細胞の総投与量あたり350 EUであるよりも少ない細胞の1用量あたりのエンドトキシンであることを意味する。特定の実施形態では、本明細書で企図されるレトロウイルスベクターで形質導入された造血幹細胞または前駆細胞を含む組成物は、約0.5 EU/mL～約5.0 EU/mL、または約0.5 EU/mL、1.0 EU/mL、1.5 EU/mL、2.0 EU/mL、2.5 EU/mL、3.0 EU/mL、3.5 EU/mL、4.0 EU/mL、4.5 EU/mL、または5.0 EU/mLを含む。

10

【0226】

ある特定の実施形態では、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）ベクターを含むが、これに限定されない、ウイルスベクター系の送達（すなわちウイルス媒介形質導入）に好適な組成物および製剤が企図される。

【0227】

エキソピボ送達のための例示的な製剤には、リン酸カルシウム、エレクトロポレーション、熱ショック、および様々なリポソーム製剤（すなわち、脂質媒介トランスフェクション）のような当該分野で既知の様々なトランスフェクション剤の使用も含まれ得る。リポソームは、以下により詳細に記載されるように、水性流体の一部を閉じ込める脂質二重層である。DNAはカチオン性リポソームの外表面に自発的に会合し（これらの電荷によって）、これらのリポソームは細胞膜と相互作用する。

20

【0228】

特定の実施形態では、薬学的に許容される担体溶液の製剤化は、例えば経腸および非経口、例えば、血管内、静脈内、動脈内、骨内、脳室内、脳内、頭蓋内、髄腔内、くも膜下腔内、および髄腔内投与および製剤化のような、様々な治療レジメンにおいて本明細書に記載の特定の組成物を使用するための好適な投薬レジメンおよび治療レジメンの開発と同様に、当業者に周知である。当業者であれば、本明細書で企図される特定の実施形態は、薬学分野において周知であり、かつ例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2005に記載されているものなどの他の製剤を含むことができることを理解するであろう。

30

【0229】

H. 遺伝子治療法

本明細書中に企図される遺伝子改変された細胞は、MPS Iの予防、治療、および改善における使用のため、またはMPS I、もしくはIDUA発現および／もしくは活性を減少または消失させるIDUA遺伝子に変異を有する対象に関連する少なくとも1つの症状を予防、治療、または改善するための、改良された医薬品を提供する。一実施形態では、MPS Iは、ハーラー症候群（MPS I-H）である。一実施形態では、MPS Iは、ハーラー・シャイエ症候群（MPS I-H/S）である。一実施形態では、MPS Iは、シャイエ症候群（MPS I-S）である。一実施形態では、MPS Iは、重症のMPS Iである。一実施形態では、MPS Iは、軽症のMPS Iである。

40

【0230】

本明細書で使用される場合、用語「医薬品」は、本明細書で企図される組成物および方法を使用して生成される遺伝子改変細胞を指す。特定の実施形態では、医薬品は、遺伝子改変された造血幹細胞または前駆細胞、例えば、CD34⁺細胞を含む。特定の理論に拘束されることを望まないが、医薬品中の治療用遺伝子の量を増加させることにより、インピボでの対応する遺伝子の発現がないかまたは最小である対象の治療が可能となり、これにより遺伝子治療が以前に実行可能な治療選択肢ではなかった被験者に遺伝子治療をもたらす機会を著しく拡大した。

50

【0231】

本明細書で企図される形質導入された細胞および対応するレトロウイルスベクターは、遺伝子療法の改良された方法を提供する。本明細書で使用される場合、用語「遺伝子治療」は、細胞のゲノムへの遺伝子の導入を指す。様々な実施形態では、本発明のウイルスベクターは、MPS Iを有すると診断されたかもしくは疑われる対象、またはIDUA発現および／もしくは活性を減少させる1つ以上の変異を含むIDUA遺伝子を有する対象に、治癒的、予防的、または改善的利益を提供するポリペプチドをコードする治療用導入遺伝子を発現する発現制御配列を含む。

【0232】

種々の実施形態では、レトロウイルスベクターは、インビボでの遺伝子治療を必要とする対象の細胞、組織、または臓器への直接注射によって投与される。様々な他の実施形態では、細胞は、本明細書で企図されるベクターでインビトロまたはエクスピボで形質導入され、場合によってはエクスピボで拡大される。次いで、形質導入された細胞は、遺伝子治療を必要とする対象に投与される。

10

【0233】

本明細書で企図される遺伝子治療法における形質導入および投与に好適な細胞には、幹細胞、前駆細胞、および本明細書の他の場所に記載の分化細胞が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、形質導入された細胞は、本明細書の他の場所に記載される造血幹細胞または前駆細胞である。

【0234】

本明細書で企図される遺伝子治療組成物および方法において使用するのに好ましい細胞には、自己由来／自源性（「自己」）細胞が含まれる。

20

【0235】

本明細書で使用される場合、用語「個体」および「対象」は、しばしば互換的に使用され、遺伝子治療ベクター、細胞に基づく治療剤および本明細書の他の箇所で企図される方法で治療することができる疾患、障害または状態の症状を示す任意の動物をいう。好ましい実施形態では、対象は、遺伝子治療ベクター、細胞に基づく治療剤、および本明細書の他の箇所で企図される方法で治療することができる神経セロイドリポフスチン症の症状を示す任意の動物を含む。好適な対象（例えば、患者）には、実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはモルモット）、家畜、ならびに飼育動物またはペット（例えば、ネコまたはイヌ）が含まれる。非ヒト霊長類および好ましくはヒト患者が含まれる。典型的な対象には、MPS Iを有するか、MPS Iと診断されたか、またはリスクがあるかもしくはMPS Iを有しているヒト患者が含まれる。

30

【0236】

本明細書で使用される場合、用語「患者」は、遺伝子治療ベクター、細胞に基づく治療剤、および本明細書の他の箇所で開示される方法で治療できる特定の疾患、障害または状態と診断された対象を指す。

【0237】

本明細書で使用される場合、「治療（treatment）」または「治療する（treating）」は、疾患または病理学的状態の症状または病状に対する有益または望ましい効果を含み、処置される疾患または状態の1つ以上の測定可能なマーカーにおける最小限の低減を含むことができる。治療は、任意で、疾患または状態の軽減、または疾患もしくは状態の進行の遅延のいずれかを含むことができる。「治療」は、疾患または状態、またはそれに付随する症状の完全な根絶または治癒を必ずしも示さない。

40

【0238】

本明細書で使用される場合、「予防する（prevent）」および「予防される（prevented）」、「予防する（preventing）」などの類似の用語は、疾患または状態の発生または再発の可能性を予防、抑制または低減するためのアプローチを示す。それはまた、疾患または状態の発症または再発を遅らせること、または疾患もしくは状態の症状の発生または再発を遅らせることを指す。本明細書で使用される場合、「予

50

防 (p r e v e n t i o n) 」 および同様の言葉は、疾患または状態の発症または再発の前に疾患または状態の強度、効果、症状および／または負担を軽減することも含む。

【 0 2 3 9 】

本明細書で使用される場合、「少なくとも1つの症状を改善する」という語句は、対象が治療されている疾患または状態の1つ以上の症状を減少させることを指す。特定の実施形態では、治療される疾患または状態は、M P S I であり、少なくとも1つの症状は、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの症状は、G A G の蓄積、失明、聴力消失、学習および言語発達の遅滞、呼吸器疾患、心疾患、骨格異形症、ならびに認知機能低下からなる群から選択される。

【 0 2 4 0 】

特定の実施形態では、対象には、ハーラー症候群の少なくとも1つの症状を治療、予防、または改善するのに十分な量の遺伝子改変された細胞または遺伝子治療ベクターが投与される。

【 0 2 4 1 】

特定の実施形態では、対象には、ハーラー・シャイエ症候群 (M P S I - H / S) の少なくとも1つの症状を治療、予防、または改善するのに十分な量の遺伝子改変された細胞または遺伝子治療ベクターが投与される。

【 0 2 4 2 】

特定の実施形態では、対象には、シャイエ症候群 (M P S I - S) の少なくとも1つの症状を治療、予防、または改善するのに十分な量の遺伝子改変された細胞または遺伝子治療ベクターが投与される。

【 0 2 4 3 】

特定の実施形態では、対象には、重症の M P S I の少なくとも1つの症状を治療、予防、または改善するのに十分な量の遺伝子改変された細胞または遺伝子治療ベクターが投与される。

【 0 2 4 4 】

特定の実施形態では、対象には、軽症の M P S I の少なくとも1つの症状を治療、予防、または改善するのに十分な量の遺伝子改変された細胞または遺伝子治療ベクターが投与される。

【 0 2 4 5 】

本明細書で使用される場合、用語「量」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の予防的または治療的結果を達成するための、ウイルスまたは形質導入された治療用細胞の「有効量 (a n a m o u n t e f f e c t i v e) 」または「有効量 (a n e f f e c t i v e a m o u n t) 」をいう。

【 0 2 4 6 】

「予防有効量」は、所望の予防結果を達成するのに有効なウイルスまたは形質導入された治療用細胞の量を指す。典型的には、ただし必ずしも必要ではないが、予防投与量が疾患の前または初期の対象において使用されるので、予防有効量は治療有効量未満の量である。

【 0 2 4 7 】

ウイルスまたは形質導入された治療用細胞の「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重、ならびに個体の幹細胞および前駆細胞の所望の応答を誘発する能力により変化できる。治療有効量はまた、ウイルスまたは形質導入された治療細胞の毒性または有害な効果が、治療上有益な効果よりも凌駕される量である。「治療有効量」という用語は、対象 (例えば、患者) を「治療する」ために有効な量を含む。

【 0 2 4 8 】

特定の理論に拘束されることを望まないが、本発明のベクター、組成物および方法によって提供される重要な利点は、既存の方法と比較して、形質導入された細胞の割合が高い細胞の集団を投与することによって達成することができる遺伝子治療の高い有効性である。

10

20

30

40

50

【0249】

形質導入された細胞は、骨髄切除治療を受けている、または受けていない個体において、骨髄または臍帯血移植の一部として投与され得る。一実施形態では、本発明の形質導入細胞は、化学療法または放射性骨髄療法を受けた個体に骨髄移植で投与される。

【0250】

一実施形態では、形質導入された細胞の用量は、対象に対し静脈内に送達される。好ましい態様において、形質導入された造血幹細胞は対象に静脈内投与される。

【0251】

例示的な一実施形態では、対象に提供される形質導入細胞の有効量は、少なくとも 2×10^6 個の細胞/kg、少なくとも 3×10^6 個の細胞/kg、少なくとも 4×10^6 個の細胞/kg、少なくとも 5×10^6 個の細胞/kg、少なくとも 6×10^6 個の細胞/kg、少なくとも 7×10^6 個の細胞/kg、少なくとも 8×10^6 個の細胞/kg、少なくとも 9×10^6 個の細胞/kg、もしくは少なくとも 10×10^6 個の細胞/kg、またはそれを超える数の細胞/kgであり、全ての介在する細胞の用量を含む。

10

【0252】

別の例示的な実施形態では、対象に提供される形質導入細胞の有効量は、約 2×10^6 個の細胞/kg、約 3×10^6 個の細胞/kg、約 4×10^6 個の細胞/kg、約 5×10^6 個の細胞/kg、約 6×10^6 個の細胞/kg、約 7×10^6 個の細胞/kg、約 8×10^6 個の細胞/kg、約 9×10^6 個の細胞/kg、もしくは約 10×10^6 個の細胞/kg、またはそれを超える数の細胞/kgであり、全ての介在する細胞の用量を含む。

20

【0253】

別の例示的な実施形態では、対象に提供される形質導入細胞の有効量は、約 2×10^6 個の細胞/kg～約 10×10^6 個の細胞/kg、約 3×10^6 個の細胞/kg～約 10×10^6 個の細胞/kg、約 4×10^6 個の細胞/kg～約 10×10^6 個の細胞/kg、約 5×10^6 個の細胞/kg～約 10×10^6 個の細胞/kg、 2×10^6 個の細胞/kg～約 6×10^6 個の細胞/kg、 2×10^6 個の細胞/kg～約 7×10^6 個の細胞/kg、 2×10^6 個の細胞/kg～約 8×10^6 個の細胞/kg、 3×10^6 個の細胞/kg～約 6×10^6 個の細胞/kg、 3×10^6 個の細胞/kg～約 7×10^6 個の細胞/kg、 3×10^6 個の細胞/kg～約 8×10^6 個の細胞/kg、 4×10^6 個の細胞/kg～約 6×10^6 個の細胞/kg、 4×10^6 個の細胞/kg～約 7×10^6 個の細胞/kg、 4×10^6 個の細胞/kg～約 8×10^6 個の細胞/kg、 5×10^6 個の細胞/kg～約 6×10^6 個の細胞/kg、 5×10^6 個の細胞/kg～約 7×10^6 個の細胞/kg、 5×10^6 個の細胞/kg～約 8×10^6 個の細胞/kg、または 6×10^6 個の細胞/kg～約 8×10^6 個の細胞/kgであり、全ての介在する細胞の用量を含む。

30

【0254】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子改変細胞を含む医薬組成物は、 $10^2 \sim 10^{10}$ 個の細胞/kg体重、好ましくは、 1×10^6 個の細胞/mL、 2×10^6 個の細胞/mL、 3×10^6 個の細胞/mL、 4×10^6 個の細胞/mL、 5×10^6 個の細胞/mL、 6×10^6 個の細胞/mL、 7×10^6 個の細胞/mL、 8×10^6 個の細胞/mL、 9×10^6 個の細胞/mL、 10×10^6 個の細胞/mL、およびこれらの範囲内の全ての整数値を含むがこれらに限定されない $10^5 \sim 10^7$ 個の細胞/kg体重の投与量で投与され得ると一般的に述べることができる。細胞の数は、その中に含まれる細胞のタイプと同様に、組成物が意図される最終的な使用に依存する。いくつかの実施形態で提供される使用の場合、細胞は一般に1リットル以下の容量であり、500mL以下、さらには250mLまたは100mL以下であってもよい。したがって、特定の実施形態における所望の細胞の密度は、典型的には、 10^6 個超の細胞/mL、 10^7 個超の細胞/mL、または 10^8 個超の細胞/mLである。臨床的に関連する細胞数は、累積的に 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、または 10^{12} 個以上

40

50

の細胞である複数の注入に分配することができる。細胞に基づく組成物は、これらの範囲内の用量で複数回投与することができる。細胞は、治療を受けている患者に対して、同種、同系、異種、または自己由来であってもよい。

【0255】

投薬量のいくらかの変動は、治療される対象の状態に依存して必然的に生じるであろう。いずれにせよ、投与を担当する者は、個々の対象のための適切な用量を決定するであろう。

【0256】

当業者は、本明細書で企図される形質導入細胞または遺伝子治療ベクターを含む組成物の適切な投与経路および有効量の正確な投与量を決定するために日常的な方法を使用することができるであろう。

10

【0257】

ある特定の実施形態では、本明細書で企図される薬学的組成物の複数回の投与が、治療を行うために必要とされ得る。特定の実施形態では、医薬品は1回投与される。特定の実施形態では、医薬品は、1年、2年、5年、10年、またはそれを超える年のスパンにわたって1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10回またはそれを超える回数投与される。

【0258】

個々の刊行物、特許出願、または発行された各特許が、参照により組み込まれることを具体的かつ個別に指示されているかのように、本明細書中に引用される全ての刊行物、特許出願、および発行された特許は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0259】

前述の実施形態は、理解を明確にするために、例示および実施例によってある程度詳細に記載されているが、本明細書で企図される教示に照らして、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく、それらに特定の変更および改変を行うことが可能であることは当業者には容易に明らかになるであろう。以下の実施例は、例示のために提供されたものであって、本発明を限定するものではない。当業者は、本質的に類似の結果を生じるように変更または改変することができる様々な重要でないパラメータを容易に認識するであろう。

【実施例】

30

【0260】

実施例1

IDUAベクターの構築

キメラ5'LTRと、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、負の制御領域欠失、d1587revプライマー結合部位置換(MND)プロモーターまたは短い伸長因子1 α (EF1 α)プロモーターと、 α -Lイズロニダーゼ(IDUA)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、自己不活性化(SIN)3'LTRと、を含有する第3世代のレンチウイルスベクターを構築した。例えば、図1ならびに配列番号1および2を参照されたい。表1および2は、IDUAをコードする例示的なレンチウイルスベクターの様々なヌクレオチドセグメントの識別特性、GenBank参照、供給源の名称、および引用文献を示す。

40

【表 1 - 1】

表 1 : pMND-IDUA-LVV

ヌクレオチド	識別特性	GenBank 参照	供給源の名称	引用文献
1～185	pUC19 プラスミド骨格	受託 # L09137. 2 nt 1～185	pUC19	New England Biolabs (Attachment 1)
185～222	リンカー	該当なし	合成	該当なし ¹
223～800	CMV	該当なし	pHCMV	(1994) PNAS 91 : 9564～68
801～1136	R、U5、PBS、 およびパッケージング配列	受託 # M19921. 2 nt 454～789	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732～43
1137～1139	終止コドン (TAG) に変化させた Gag 開始コドン (ATG)	該当なし ¹	合成	該当なし
1140～1240	HIV-1 gag 配列	受託 # M19921. 2 nt 793～893	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732～43
1241～1243	第 2 の終止コード	該当なし	合成	該当なし

10

20

【表 1 - 2】

	ンに変化させた HIV-1 gag 配列			
1244～1595	HIV-1 gag 配 列	受託 # M19921. 2 nt 897～1248	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732— 43
1596～1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	受託 # M19921. 2 nt 4745～5125	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732— 43
1993～2517	HIV-1、分離株 HXB3 env 領域 (RRE)	受託 # M14100. 1 nt 1875～2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335 : 181—183
2518～2693	HIV-1 env 配 列 S/A	受託 # M19921. 2 nt 8290～8470	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732— 43
2694～2708	リンカー	該当なし	合成	該当なし ¹
2709～3096	MND	該当なし	pccl-c— MNDU3c-x2	Challita et al. (1995) J. Virol. 69 : 748—755
3097～3124	リンカー	該当なし	合成	該当なし
3125～5092	IDUA、ヒト	該当なし	合成	該当なし
5093～5200	HIV-1 ppt お よび U3 の部分	受託 # M19921. 2 nt 9005～9110	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732— 43
5201～5317	HIV-1 U3 の 部分 (399bp 欠 失) および R	受託 # M19921. 2 nt 9511～9627	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732— 43
5318～5341	合成ポリ A	該当なし	合成	Levitt, N. Genes&Dev (1989) 3 : 1019 —1025
5342～5360	リンカー	該当なし	合成	該当なし
5361～7833	pUC19 骨格	受託 #L09137. 2 nt 2636～2686	pUC19	New England Biolabs (Attachment 1)

10

20

30

40

【表 2 - 1】

表 2 : pEF1 α -IDUA-LVV

ヌクレオチド	識別特性	GenBank 参照	供給源の名称	引用
1~185	pUC19 プラスミド骨格	受託 # L09137. 2 nt 1-185	pUC19	New England Biolabs (Attachment 1)
185~222	リンカー	該当なし	合成	該当なし
223~800	CMV	該当なし	pHCMV	(1994) PNAS 91 : 9564-68
801~1136	R、U5、PBS、およびパッケージング配列	受託 # M19921. 2 nt 454~789	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732-43
1137~1139	終止コドン (TAG) に変化させた Gag 開始コドン (ATG)	該当なし	合成	該当なし
1140~1240	HIV-1 gag 配列	受託 # M19921. 2 nt 793~893	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732-43
1241~1243	第 2 の終止コドンに変化させた HIV-1 gag 配列	該当なし	合成	該当なし
1244~1595	HIV-1 gag 配列	受託 # M19921. 2 nt 897~1248	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732-43
1596~1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	受託 # M19921. 2 nt 4745~5125	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732-43
1993~2517	HIV-1、分離株 HXB3 env 領域 (RRE)	受託 # M14100. 1 nt 1875~2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335 : 181-183
2518~2693	HIV-1 env 配列 S/A	受託 # M19921. 2 nt 8290~8470	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732-43
2694~2698	リンカー	該当なし	合成	該当なし
2699~3242	EF1 アルファ / HTLV プロモーター	該当なし	合成	Takebe et al. (1988)

10

20

30

40

【表 2 - 2】

	ター			MCB : 8 (1) : 466-472 Kim DW et al. (1990) , Gene : 91 (2) : 217- 223
3243~3258	リンカー	該当なし	合成	該当なし
3259~5226	IDUA、ヒト	該当なし	合成	該当なし
5227~5333	HIV-1 pptお よび U3 の部分	受託 # M19921. 2 nt 9005~9110	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732- 43
5334~5451	HIV-1 U3 の 部分 (399bp 欠 失) および R	受託 # M19921. 2 nt 9511~9627	pNL4-3	Maldarelli, et. al. (1991) J Virol : 65 (11) : 5732- 43
5452~5475	合成ポリ A	該当なし	合成	Levitt, N. Genes&Dev (1989) 3 : 1019-1025
5476~5494	リンカー	該当なし	合成	該当なし
5495~7967	pUC19 骨格	受託 #L09137. 2 nt 2636~2686	pUC19	New England Biolabs (Attachment 1)

10

20

【0261】

実施例 2

IDUA 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線維芽細胞

IDUA 遺伝子 (IDUA^{-/-}細胞) のホモ接合突然変異のために IDUA 活性が欠損したヒト線維芽細胞を、Coriell Institute Cell Repository から入手し (細胞株 GM6214 (W402X/W402X)、GM798 (W402X/W402X))、形質導入前に 24 時間、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) + 10% ウシ胎仔血清 (FBS) 中で培養した。培養した IDUA^{-/-}細胞を、5.0E4 個の細胞/mL の DMEM + 10% FBS に再懸濁し、6 ウェル組織培養プレートにこの細胞懸濁液を 1 ウェル当たり 2 mL プレーティングし、37℃ に置いた。細胞播種の 24 時間後、いずれかの未精製のレンチウイルスベクター 1 mL で細胞を形質導入した。1 mL の DMEM + 10% FBS を対照ウェルに添加し、細胞を 37℃ インキュベーターに入れ替える。形質導入 24 時間後、完全な培地交換を行った。形質導入の 48 時間後、各ウェルからの 250 μL の上清を滅菌エッペンドルフチューブに移し、-80℃ で凍結させた。1 mL のリン酸緩衝液で細胞を洗浄し、0.5 mL の 1X TrypLE Express Enzyme (Thermo Fisher) を使用して持ち上げた。細胞を 1 試料当たり 2 つの滅菌エッペンドルフチューブに移し、1500 rpm で 5 分間ペレット化した。上清を吸引し、細胞ペレットを -80℃ で凍結させた。

30

40

【0262】

実施例 3

IDUA 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細胞におけるタンパク質発現

50

野生型対照細胞、IDUA^{-/-}細胞（GM0798およびGM06214）、ならびにIDUA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IDUA^{-/-}細胞（MND、IDUAおよびEF1α（EFS）、IDUA）からの凍結した細胞ペレットをウェスタンブロッティングのために氷上で解凍した。300 μLの哺乳動物タンパク質抽出試薬および3 μLの100X HALTプロテアーゼ阻害剤カクテル（ThermoFisher）を各細胞ペレットに添加した。ペレットを穏やかに上下にピペット操作して再懸濁させ、細胞をプレートロッカー上で、室温で10分間インキュベートした。細胞を4℃、14,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を滅菌エッペンドルフチューブに移した。ローディング色素は、25 μLのβ-メルカプトエタノールを475 μLの4X Laemmli試料緩衝液（Bio-Rad）に添加することによって調製した。試料を、30 μLの調製したローディング色素および90 μLの試料の3:1の試料対ローディング色素の比で混合した。各試料20 μLおよびPrecision Plus Protein Kaleidoscopeラダー8 μLをNuPage 4-12 Bis-Trisタンパク質ゲルのウェルにロードした。ゲルを1X MES SDSランニング緩衝液中200 Vで40分間泳動させる。

【0263】

iBlot 7分移送システムにおけるiBlot移送スタックを使用してゲルを移送した。膜を室温で5分間、1Xトリス緩衝生理食塩水ですすいだ。膜をOdysseyブロッッキング緩衝液+マウス抗IDUA抗体（MAB4119（R&D Systems））の1:500希釈液およびマウス抗β-アクチン抗体（Abcam ab3280）の1:1000希釈液中、4℃でインキュベートした。翌朝、膜を室温で5分間トリス緩衝生理食塩水中で3回すすいだ。Odysseyブロッッキング緩衝液中、800 RDロバ抗マウスIgG（Licor 926-32212）の1:1000希釈液を含有する二次抗体カクテル。膜を二次抗体カクテル中、室温で1時間インキュベートし、そして室温で5分間トリス緩衝食塩水で3回すすいだ。プロットはLicor Odyssey CLXイメージングシステムで画像化した。

【0264】

図3は、野生型対照細胞、IDUA^{-/-}細胞（GM0798およびGM06214）、ならびにIDUA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IDUA^{-/-}細胞（MND、IDUAおよびEF1α（EFS）、IDUA）からの細胞溶解液中のIDUAおよびアクチン発現のウェスタンブロットを示す。

【0265】

実施例4

IDUA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IDUA^{-/-}細胞におけるIDUA活性の回復

野生型対照細胞、IDUA^{-/-}細胞、およびIDUAをコードするレンチウイルスベクター（pMND-IDUAおよびpEF1α-IDUA）で形質導入されたIDUA^{-/-}細胞からの細胞ペレットを150 μLの酢酸緩衝液（0.1 M酢酸ナトリウム（NaAc）、0.15 M塩化ナトリウム（NaCl）（pH4.0）、各10 μMのペプスタチンAおよびトランス-エポキシスクシニル-L-ロイシルアミド（4-グアニジノ）ブタン（E64））に再懸濁した。IDUA活性の蛍光測定は、Ouet al., 2014. Mol Gen Met. 111:113-5に記載される方法に基づいて、4-MU-α-L-イズロニド基質の切断に基づいて計算する。細胞溶解物または細胞上清の全タンパク質の15~25 μgを、150 μLの酢酸緩衝液中、最終濃度62.5 μMの4-MU-α-L-イズロニドと共に37℃で20時間インキュベートした。100 μlの0.5 M EDTA（pH12.0）の添加によってアッセイを停止した。Molecular Devices SpectraMax M2分光蛍光光度計（実施例355、Em. 460）を使用して蛍光を測定した。

【0266】

図2Aは、野生型対照細胞、IDUA^{-/-}細胞、およびIDUAをコードするレンチ

ウイルスベクター（pMND-IDUAおよびpEF1 α -IDUA）で形質導入されたIDUA^{-/-}細胞におけるIDUA酵素活性をアッセイする代表的な実験からのデータを示す。形質導入された細胞におけるIDUAの過剰発現はまた、細胞培養上清中の酵素的に活性なIDUAの分泌を導いた。患者および野生型線維芽細胞の両方におけるIDUA活性は、バックグラウンドレベルで維持されたが、形質導入されたIDUA^{-/-}線維芽細胞におけるIDUAの過剰発現は、上清中のIDUA活性を10～20倍増加させた。図2B。したがって、IDUA遺伝子治療は、形質導入された細胞を矯正するだけでなく、隣接する細胞におけるIDUA欠損を矯正する可能性も有する。

【0267】

実施例5

IDUAをコードするLVVで形質導入されたhCD34⁺細胞における活性酵素発現
ヒトCD34⁺細胞を、IDUAをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたMNDまたはEF1 α プロモーターを含むレンチウイルスベクター（LVV）で形質導入された（MPS-I）。細胞をサイトカイン含有培地中で48時間予備刺激し、200 μ g/mLのポロキサマー338および10 μ MのPGE₂を使用してMOI5、15、または30で24時間形質導入した。形質導入後、細胞をメチルセルロースにプレーティングし、造血前駆体コロニー形成させるために12日間培養したか、またはサイトカイン含有培地で7日間培養した。ペレットおよび上清中の細胞成長、VCN、個々のコロニーのVCNおよびLVV+細胞%、ならびにIDUA活性について試料を分析した。

【0268】

培養物中の細胞は、擬似物と比較して同様の成長速度論を停止、これは、いずれのLVVも毒性をもたらさなかったことを示す。図4。

【0269】

サイトカインで7日間培養した形質導入細胞でVCNを測定した。各ベクターでの形質導入は、全てのMOIにわたって高いVCNをもたらした。MND含有ベクターは、EF1 α 含有ベクターよりも高いVCNに達した。図5。

【0270】

MOI5試料からの個々のコロニーを12日目のメチルセルロース培養物から摘出し、VCNおよびLVV+細胞%についてqPCRにより分析した。両方のベクターは、3を超える平均VCNおよび高いLVV+%をもたらした。MNDベクターは、わずかにより効率的に細胞を形質導入した。図6。

【0271】

形質導入された細胞をサイトカイン中で7日間培養した後、細胞ペレットおよび上清をIDUA活性についてアッセイした。IDUA活性は、両方のベクターについて、MOIにわたって細胞ペレット中で同等であった。図7、左パネル。MNDベクターは、EF1 α ベクターよりも高い上清中のIDUA活性レベルを有した。図7、右パネル。

【0272】

12日目のメチルセルロースからのプールした全コロニーにおいてもIDUA活性を測定した。形質導入した細胞は、MOIおよびベクターにわたって同等のIDUA活性を呈した。図8。

【0273】

実施例6

IDUAをコードするLVVで形質導入されたhCD34⁺細胞およびマウスLin⁻細胞

3人のドナーからのヒトCD34⁺細胞およびマウスLin⁻細胞を、IDUAをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたMNDまたはEF1 α プロモーターを含むレンチウイルスベクター（LVV）で形質導入した。細胞をサイトカイン含有培地中で48時間予備刺激し、200 μ g/mLのポロキサマー338および10 μ MのPGE₂を使用して、2～60の範囲のMOIで24時間形質導入した。形質導入後、サイトカイン含有培地中で細胞を7日間培養した。

【0274】

サイトカインで7日間培養した形質導入細胞でVCNを測定した。全てのドナーにわたって、MOIの増加と共にVCNが上昇する傾向がある。図9。

【0275】

実施例7

インビボIDUA遺伝子治療モデル

IDUA変異を有するマウスに、IDUA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HSCを投与し、表現型的に特徴付けする。IDUA変異マウスに、2週齢以下で、骨髄造血幹細胞を切除するための治療を受けさせ、IDUA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HSCを投与する。

10

【0276】

初回治療後1日目から臨床評価が行われ、約4週齢で、振戦の観察、全身状態、体重増加（約4週齢で開始、毎週）、握力（約8週齢で開始、隔週）、ロータロッド（約13週齢、18週齢時）、および歩行分析（約16および約24週齢時）を含む臨床評価がマウスに行われる。

【0277】

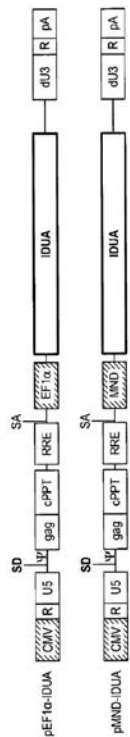
行動アッセイに加えて、造血幹細胞治療後の一般的な健康状態および免疫系再構成を評価するために、移植後にマウスを他のパラメータについて試験するが、これには、貯蔵物質、神経細胞およびグリア細胞の数、および（各切片の複数の脳領域を捕捉するための）矢状切片における形態（例えば、軸索変性）、IDUA欠損の影響を受けた組織における交差矯正（発現）の証拠、血液／脳／組織溶解物中のIDUA酵素活性、骨髄形態、全実験終了時のマウス骨髄中のベクターコピー数の測定、生着細胞の同定、を評価するための、完全臨床血液化学パネル、CNSグロス形態学および組織学的解析が含まれる。

20

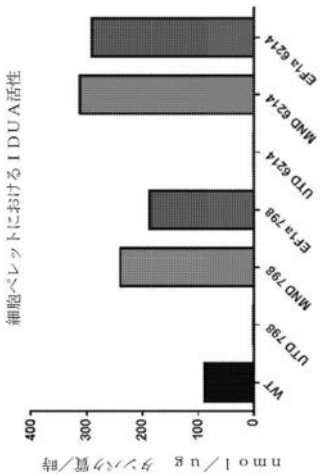
【0278】

一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、本明細書および特許請求の範囲に開示される特定の実施形態に特許請求の範囲を限定するものと解釈されるべきではなく、可能性のある全ての実施形態を、かかる特許請求の範囲が権利を有するものと均等な全範囲と共に含むものと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は開示内容により限定されない。

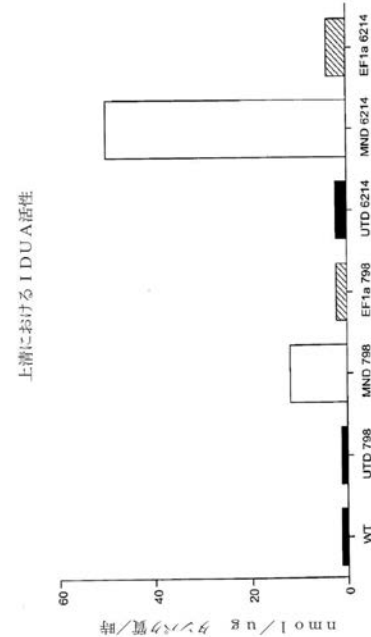
【図 1】



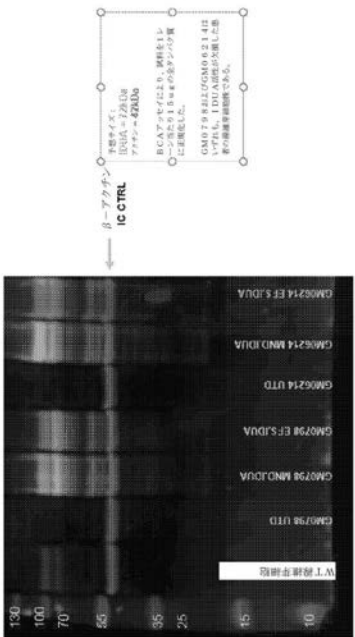
【図 2 A】



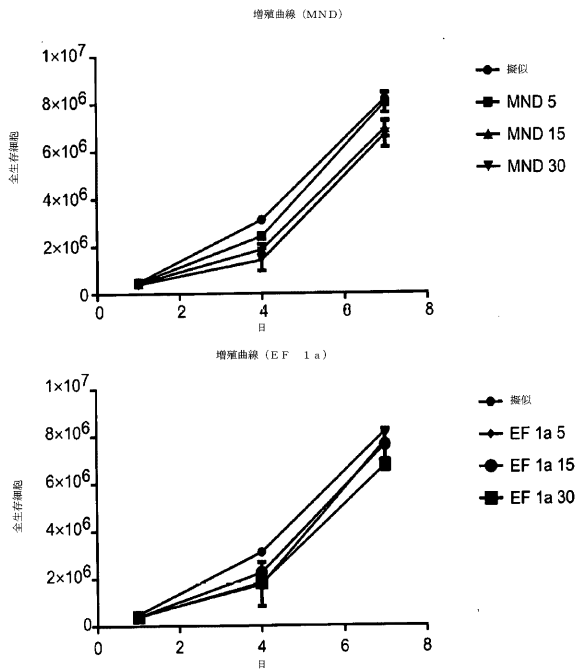
【図 2 B】



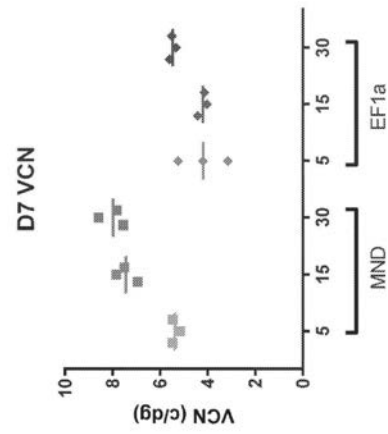
【図 3】



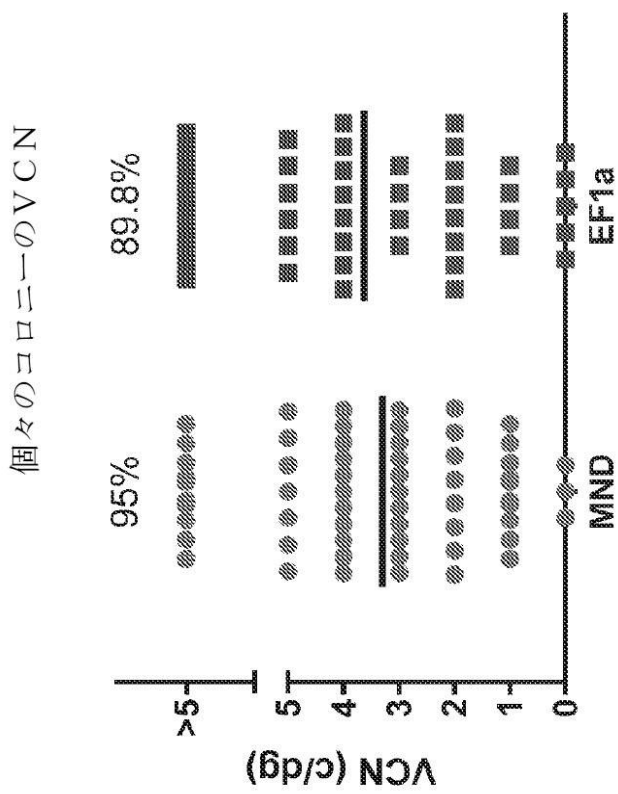
【図 4】



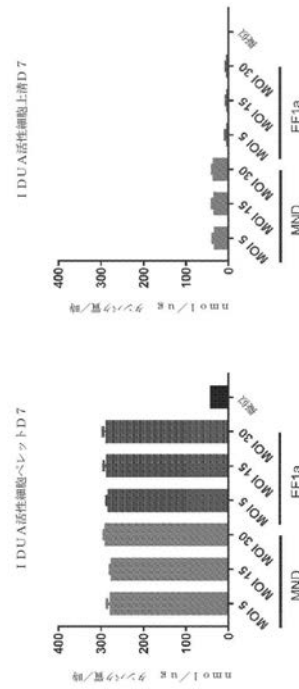
【図 5】



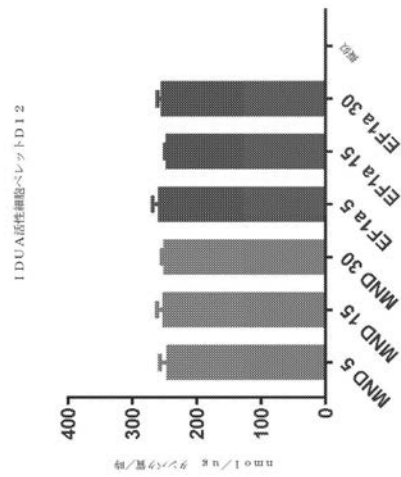
【図 6】



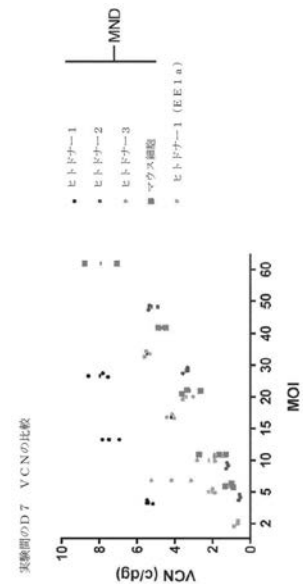
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2019536484000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/64913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 7/00, A61K 35/76, A61K 38/43, C12N 15/86 (2018.01)

CPC - C12N 7/00, A61K 35/76, A61K 38/46, C12N 15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2018/0122727 A1 (Shira Human Genetics Therapies, Inc.) 05 May 2016 (05.05.2016) para [0059], [0091], [0081], [0146], [0148], Fig. 3, Table 1	1-3 — 16, 17
Y	US 2008/0089863 A1 (Mallet et al.) 17 April 2008 (17.04.2008) para [0025], [0045]	16, 17
Y	US 2015/0159171 A1 (Commissariat a l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives) 11 June 2015 (11.06.2015) abstract, para [0059]-[0060]	17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 February 2018

Date of mailing of the international search report

08 MAR 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/64913

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-15, 18-33
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	27/16
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ゴス, ケンドリック エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02420, レキシントン, ウィンター ストリート 75

(72)発明者 パーソンズ, ジェフリー ビー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02130, ジャマイカ プレイン, キャッスルトン ストリート 17

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA97X AB01 AC14 BA02 CA31 CA44

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA17 MA66 NA14 ZA15 ZA33
ZA34 ZA36 ZA59 ZA96 ZC02 ZC21

4C087 AA01 AA02 BB63 BB64 CA12 MA17 MA66 NA14 ZA15 ZA33
ZA34 ZA36 ZA59 ZA96 ZC02 ZC21