

(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2018-510160

(P2018-510160A)

(43) 公表日 平成30年4月12日 (2018.4.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 7 6
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-549215 (P2017-549215)	(71) 出願人	513167522
(86) (22) 出願日	平成28年3月18日 (2016.3.18)		ブルーバード バイオ, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月30日 (2017.10.30)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/023271		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(87) 国際公開番号	W02016/154055		142, ケンブリッジ, ビニー スト
(87) 国際公開日	平成28年9月29日 (2016.9.29)		リート 60
(31) 優先権主張番号	62/136,309	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成27年3月20日 (2015.3.20)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	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】 ベクター製剤

(57) 【要約】

本発明は、ウイルスベクターを保存するための組成物および製剤、ならびにこれらの組成物および製剤の使用を提供する。特に、具体的な実施形態は、ウイルスベクターの長期保存ならびにインビトロおよびインビボの両方の用途に適した保護剤としての、トレハロースまたはその誘導体の組成物および製剤に関する。したがって、特定の実施形態において、(a) ウイルスベクターと、(b) 約3重量%~約15重量%のトレハロースまたはその誘導体と、(c) 薬学的に許容される希釈剤と、を含む水性組成物が提供される。一実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。別の実施形態において、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターである。さらに別の実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。

【選択図】 図2

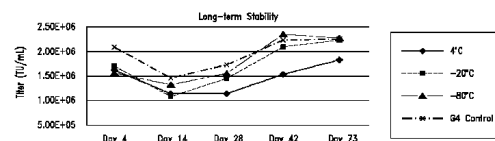


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) ウイルスベクターと、
- (b) 約 3 重量%～約 15 重量%のトレハロースまたはその誘導体と、
- (c) 薬学的に許容される希釈剤と、

を含む、水性組成物。

【請求項 2】

前記ベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ビスナ・マエディウイルス (VMV)、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)、およびサル免疫不全ウイルス (SIV) から本質的になる群から選択される、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記レンチウイルスベクターは、HIV-1 である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記レンチウイルスベクターは、HIV-2 である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記ウイルスベクターは、トリ白血病ウイルス (ALV)、FIV、HIV、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、ヤーグジークテヒツジレトロウイルス (JSRV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1)、ビスナ・マエディウイルス (VMV)、SARS-CoV、チャンディブラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、ネコ内在性レトロウイルス (RD114)、エボラウイルス、狂犬病ウイルス、ロスリバーウイルス (RRV)、呼吸器多核体ウイルス (RSV)、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型、C 型肝炎ウイルス (HCV)、センドライウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス (SFV)、家禽ペストウイルス (FPV)、インフルエンザウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、およびラゴスコウモリウイルスからなる群から選択されるウイルスのエンベロープポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記ウイルスベクターは、VSV または RD114 由来のエンベロープポリペプチドを含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記ウイルスベクターは、キメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチド、改変 T 細胞受容体ポリペプチド、または二重特異性 T 細胞エンゲージャーポリペプチド、をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 CAR は、

- a) 葉酸受容体 α 、5T4、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFR ファミリー、例えば、ErbB2 (HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、E

10

20

30

40

50

p h A 2、E p C A M、F A P、胎児 A c h R、F R α、G D 2、G D 3、グリピカン-3 (G P C 3)、H L A-A 1+M A G E 1、H L A-A 2+M A G E 1、H L A-A 3+M A G E 1、H L A-A 1+N Y-E S O-1、H L A-A 2+N Y-E S O-1、H L A-A 3+N Y-E S O-1、I L-1 1 R α、I L-1 3 R α 2、ラムダ、L e w i s -Y、カップ、メソセリン、M u c 1、M u c 1 6、N C A M、N K G 2 D リガンド、N Y-E S O-1、P R A M E、P S C A、P S M A、R O R 1、S S X、サバイビン、T A G 7 2、T E M、V E G F R 2、および W T-1 からなる群から選択される抗原に結合する細胞外ドメイン、

b) C D 8 α、C D 4、C D 2 8、C D 4 5、P D 1、C T L A-4、および C D 1 5 2 からなる群から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン、

c) T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 1 0、C A R D 1 1、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5 4 (I C A M)、C D 8 3、C D 1 3 4 (O X 4 0)、C D 1 3 7 (4-1 B B)、C D 2 7 8 (I C O S)、D A P 1 0、L A T、N K D 2 C、S L P 7 6、T R I M、および Z A P 7 0 からなる群から選択される1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびに

d) C D 3 ζ 一次シグナル伝達ドメイン、を含む、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記細胞外ドメインは、前記抗原に結合する抗体または抗原結合断片を含む、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記 B C M A ポリペプチドに結合する前記抗体または抗原結合断片は、C a m e l I g、I g N A R、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b) ' ₂ 断片、F (a b) ' ₃ 断片、F v、一本鎖 F v 抗体 (「s c F v」)、b i s-s c F v、(s c F v) ₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化 F v タンパク質 (「d s F v」)、および単一ドメイン抗体 (s d A b、ナノボディ) からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記 B C M A ポリペプチドに結合する前記抗体または抗原結合断片は、s c F v である、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記抗体は、ヒト抗体、マウス抗体、またはヒト化抗体である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記膜貫通ドメインは、C D 8 α に由来する、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記 1 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 2 8、C D 1 3 4、および C D 1 3 7 からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記 C A R は、C D 2 8、C D 1 3 4、および C D 1 3 7 からなる群から選択される 2 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含む、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記 1 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 2 8 である、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記 1 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 1 3 4 である、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記 1 つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 1 3 7 である、請求項 1 1 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 22】

ヒンジ領域ポリペプチドをさらに含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記ヒンジ領域ポリペプチドは、CD8 α のヒンジ領域を含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

スパーサー領域ポリペプチドをさらに含む、請求項 11 ～ 23 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記スパーサー領域ポリペプチドは、IgG1 のCH2 およびCH3 領域を含む、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

シグナルペプチドをさらに含む、請求項 11 ～ 25 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

前記シグナルペプチドは、IgG1 重鎖シグナルポリペプチドまたはCD8 α シグナルポリペプチドを含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記ウイルスベクターは、ホーミングエンドヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、II 型クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) 関連 (Cas9) ヌクレアーゼ、または、megaTALEN ヌクレアーゼ、をコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記ウイルスベクターは、 β グロビンポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記ウイルスベクターは、ABCD1 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記組成物は、約 3 重量% のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記組成物は、約 4 重量% のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 33】

前記組成物は、約 5 重量% のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記組成物は、約 6 重量% のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記組成物は、約 7 重量% のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 36】

前記組成物は、約 8 重量% のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記組成物は、約 9 重量% のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 38】

10

20

30

40

50

前記組成物は、約 10 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記組成物は、約 11 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 40】

前記組成物は、約 12 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記組成物は、約 13 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 42】

前記組成物は、約 14 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 43】

前記組成物は、約 15 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 44】

前記組成物は、約 5 重量%～約 15 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 45】

前記組成物は、約 4 重量%～約 12 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記組成物は、約 5 重量%～約 10 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 47】

前記組成物は、約 5 重量%～約 9 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 48】

30

前記組成物は、約 5 重量%～約 8 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 49】

前記組成物は、約 5 重量%～約 7 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 50】

前記組成物は、約 4 重量%～約 6 重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 51】

前記薬学的に許容される希釈剤は、生理学的に許容される緩衝液を含む、請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 52】

前記生理学的に許容される緩衝液は、ハンクス緩衝塩類溶液 (HBS)、リンゲル液、ダルベッコリン酸緩衝食塩水 (PBS)、5%ブドウ糖液 (D5W)、および生理食塩水 (0.9%NaCl) からなる群から選択される、請求項 51 に記載の組成物。

【請求項 53】

前記薬学的に許容される希釈剤は、生理学的に許容される細胞培養培地を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 54】

前記薬学的に許容される細胞培養培地は、StemSpan-ACF、StemSpa

50

n-H3000、StemSpan-SFEM、Stemline II、StemPro 34、StemXVivo、イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、ロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI) 1640 培地、マッコイ 5A 培地、最小必須培地 α 培地 (α -MEM)、基本培地イーグル (BME)、フィッシャー培地、199 培地、F-12K 栄養培地 (Kaighn 改変培地、F-12K)、および X-vivo 20 からなる群から選択される、請求項 53 に記載の組成物。

【請求項 55】

前記組成物が約 20℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 ヶ月超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 56】

前記組成物が約 20℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、6 ヶ月超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 57】

前記組成物が約 20℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 58】

前記組成物が約 10℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 ヶ月超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 59】

前記組成物が約 10℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、6 ヶ月超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 60】

前記組成物が約 10℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 61】

前記組成物が約 4℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 ヶ月超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 62】

前記組成物が約 4℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、6 ヶ月超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 63】

前記組成物が約 4℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 64】

前記組成物が約 0℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 65】

前記組成物が約 -20℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 66】

前記組成物が約 -60℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 67】

前記組成物が約 -70℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 68】

前記組成物が約 -80℃ で保存された場合、前記ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 69】

50

前記ウイルスベクターの前記力価は、1回以上の凍結融解サイクルの間安定である、請求項1～68のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項70】

前記ウイルスベクターの前記力価は、2回以上の凍結融解サイクルの間安定である、請求項1～68のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項71】

前記ウイルスベクターの前記力価は、3回以上の凍結融解サイクルの間安定である、請求項1～68のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項72】

前記組成物は、直接インビボ注射に適している、請求項1～71のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項73】

前記組成物は、直接インビボ使用に適している、請求項1～71のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項74】

前記組成物は、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも10倍希釈される、請求項72または請求項73に記載の組成物。

【請求項75】

前記組成物は、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも50倍希釈される、請求項72または請求項73に記載の組成物。 20

【請求項76】

前記組成物は、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも100倍希釈される、請求項72または請求項73に記載の組成物。

【請求項77】

前記組成物は、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも200倍希釈される、請求項72または請求項73に記載の組成物。

【請求項78】

前記組成物は、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも250倍希釈される、請求項72または請求項73に記載の組成物。

【請求項79】

治療を必要とする対象における疾患を治療する方法であって、前記対象に請求項1に記載の組成物で形質導入された細胞集団を投与することを含む、方法。 30

【請求項80】

請求項1～79のいずれか一項に記載の組成物を細胞集団に導入することを含む、請求項1に記載の組成物で細胞を形質導入する方法。

【請求項81】

前記細胞は、哺乳動物細胞である、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

前記細胞は、ヒト細胞である、請求項80に記載の方法。

【請求項83】

前記細胞は、幹細胞または前駆細胞である、請求項80に記載の方法。 40

【請求項84】

前記細胞は、造血細胞である、請求項80に記載の方法。

【請求項85】

前記造血細胞は、造血幹細胞もしくは前駆細胞、またはCD34を発現する細胞である、請求項84に記載の方法。

【請求項86】

前記造血細胞は、リンパ球である、請求項84に記載の方法。

【請求項87】

前記リンパ球は、Tリンパ球である、請求項86に記載の方法。 50

【請求項 88】

(a) トレハロースまたはその誘導体を含む組成物を調製することと、
(b) 前記組成物にウイルスベクターを加えることと、を含む、
ウイルスベクターを安定化するための方法。

【請求項 89】

前記ウイルスベクターは、約 -80°C ～約 25°C の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する、請求項81に記載の方法。

【請求項 90】

前記ウイルスベクターは、約 -20°C ～約 18°C の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する、請求項81に記載の方法。

10

【請求項 91】

前記ウイルスベクターは、約 -20°C ～約 4°C の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する、請求項81に記載の方法。

【請求項 92】

前記ウイルスベクターは、約 4°C ～約 25°C の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する、請求項81に記載の方法。

【請求項 93】

前記ウイルスベクターは、約 4°C ～約 18°C の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する、請求項81に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、35 U. S. C. § 119 (e) の下で、2015年3月20日に出願された米国仮特許出願62/136,309号の利益を主張するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願に関連する配列表は、ペーパーコピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組み入れられる。配列表を含むテキストファイルの名前は、BLBD_025_01WO_ST25.txtである。テキストファイルは3KBであり、2016年3月18日に作成され、本明細書の出願と同時にEFS-Webを介して電子形式で提出される。

30

背景

【0003】

本発明は、概して、ウイルスベクターを安定化するための組成物および製剤に関する。特に、本発明は、長期保存における使用、ならびにインビトロおよびインビボの両方の用途向けのウイルスベクターの安定化のための、トレハロースまたはその誘導体を含む組成物に関する。

【背景技術】

【0004】

40

近頃、多数の疾患と闘うための遺伝子治療が成功を収めている。宿主細胞ゲノム中に安定して組み込むことができるレトロウイルスの能力に起因して、哺乳動物細胞に遺伝子を送達するためのレトロウイルスの使用が広まっている。ガンマレトロウイルスおよびレンチウイルスを含む多数のレトロウイルスベクターが、遺伝子治療に使用されてきた。

【0005】

レンチウイルスは、複雑なレトロウイルスであり、それらのより高度な複雑性に基づいて、潜伏感染中等に、非増殖性細胞のゲノムに組み込んでそれらの生活環を調節することができる。これらのウイルスは、中でも、HIV-1、HIV-2、およびSIVを含む。他のレトロウイルスと同様に、レンチウイルスは、2つの長末端反復(LTR)配列によって隣接されたgag、pol、およびenv遺伝子を有する。これらの遺伝子の各々

50

は、最初は1つの前駆体ポリタンパク質として発現される複数のタンパク質をコードする。これらのタンパク質は、ウイルスの構造およびそのRNAゲノムの複製にとって重要である。5'および3'LTRは、ビリオンRNAの転写およびポリアダニル化を促進する役割を果たす。

形質導入の可能性およびレンチウイルスの効力は、ベクターの産生および保存中の増殖培地および血清成分における温度、pH、凍結融解頻度、およびインキュベーション条件によって影響を受ける。レンチウイルスの力価は、凍結融解サイクルの増加およびより高い温度での保存に伴って、二相性に低下することが観察されている (Kigashikawa and Chang 2001, Virology 280, 124-131)。遺伝子治療が最も効果的であるためには、効力を維持するレトロウイルスベクターを有することが望ましい。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Kigashikawa and Chang 2001, Virology 280, 124-131

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

当該技術分野には、広範囲の温度にわたって種々の期間保存されたときに感染力価および／または異種配列の発現を維持し、インビトロまたはインビボ用途に一層適した、レンチウイルスベクター等のウイルスベクターを含む安定な水性組成物の必要性が存在する。

20

【0008】

本発明は、概して、ウイルスベクターの保存のための組成物および製剤を提供する。実施形態は、ウイルスベクターの長期保存に適した保護剤として、トレハロースまたはその誘導体の水性組成物を提供する。特定の濃度のトレハロースを含有する溶液中に保存されたウイルスベクターは、トレハロースまたはその誘導体中に保存されていないウイルスベクターと比較すると、複数の凍結融解サイクルを通して、また幅広い期間にわたって、約-80℃～約20℃の広い温度範囲で感染力価および／または異種配列の発現を維持する。

30

【0009】

したがって、特定の実施形態において、(a)ウイルスベクターと、(b)約3重量%～約15重量%のトレハロースまたはその誘導体と、(c)薬学的に許容される希釈剤と、を含む水性組成物が提供される。一実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。別の実施形態において、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターである。さらに別の実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。

【0010】

一実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。別の実施形態において、レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ビスナ・マエディウイルス(VMV)、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)、およびサル免疫不全ウイルス(SIV)から本質的になる群から選択される。一実施形態において、レンチウイルスベクターは、HIV-1である。別の実施形態において、レンチウイルスベクターは、HIV-2である。

40

【0011】

一実施形態において、ウイルスベクターは、トリ白血病ウイルス(ALV)、FIV、HIV、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、ヤーグジークテヒツジレトロウイルス(JSRV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ヒトT細胞白血病ウイルス1型

50

(HTLV-1)、ビスナ・マエディウイルス (VMV)、SARS-CoV、チャンディプラウイルス、マールブルグウイルス、モコラウイルス、ネコ内在性レトロウイルス (RD114)、エボラウイルス、狂犬病ウイルス、ロスリバーウイルス (RRV)、呼吸器多核体ウイルス (RSV)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型、C型肝炎ウイルス (HCV)、センダイウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス (SFV)、家禽ペストウイルス (FPV)、インフルエンザウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、およびラゴスコウモリウイルスからなる群から選択されるウイルスのエンベロープポリペプチドを含む。具体的な実施形態において、ウイルスベクターは、VSVまたはRD114由来のエンベロープポリペプチドを含む。

【0012】

一実施形態において、ウイルスベクターは、キメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチド、改変T細胞受容体ポリペプチド、または二重特異性T細胞エンゲージャーポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0013】

一実施形態において、CARは、a) 葉酸受容体 α 、5T4、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRファミリー、例えば、Erbb2 (HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、胎児AchR、FR α 、GD2、GD3、グリピカン-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R $\alpha 2$ 、ラムダ、Lewis-Y、カップ、メソセリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、サバイビン、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1からなる群から選択される抗原に結合する細胞外ドメイン、b) CD8 α 、CD4、CD28、CD45、PD1、CTLA-4、およびCD152からなる群から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン、c) TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、およびZAP70からなる群から選択される1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびにd) CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0014】

一実施形態において、CARの細胞外ドメインは、抗原に結合する抗体または抗原結合断片を含む。別の実施形態において、BCMAポリペプチドに結合する抗体または抗原結合断片は、Camel Ig、Ig NAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fv抗体 (「scFv」)、bis-scFv、(scFv)₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質 (「dsFv」)、および単一ドメイン抗体 (sdAb、ナノボディ) からなる群から選択される。別の実施形態において、抗体は、ヒト抗体、マウス抗体、またはヒト化抗体である。

【0015】

一実施形態において、CARの膜貫通ドメインは、CD8 α に由来する。

【0016】

一実施形態において、CARの1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、CD134、およびCD137からなる群から選択される。別の実施形態において、CARは、CD28、CD134、およびCD137からなる群から選択される2つ以

10

20

30

40

50

上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含む。具体的な実施形態において、C A Rの1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 2 8である。具体的な実施形態において、C A Rの1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 1 3 4である。具体的な実施形態において、C A Rの1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインは、C D 1 3 7である。

【0017】

一実施形態において、C A Rは、ヒンジ領域ポリペプチドをさらに含む。別の実施形態において、ヒンジ領域ポリペプチドは、C D 8 α のヒンジ領域を含む。

【0018】

一実施形態において、C A Rは、スパーサー領域ポリペプチドをさらに含む。別の実施形態において、スパーサー領域ポリペプチドは、I g G 1のC H 2およびC H 3領域を含む。

【0019】

一実施形態において、C A Rは、シグナルペプチドをさらに含む。別の実施形態において、シグナルペプチドは、I g G 1重鎖シグナルポリペプチドまたはC D 8 α シグナルポリペプチドを含む。

【0020】

一実施形態において、ウイルスベクターは、ホーミングエンドヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、I I型クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) 関連 (C a s 9)ヌクレアーゼ、または、m e g a T A Lヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0021】

一実施形態において、ウイルスベクターは、 β グロビンポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0022】

一実施形態において、ウイルスベクターは、A B C D 1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0023】

別の実施形態において、水性組成物は、約3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、11重量%、12重量%、13重量%、14%、または15重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約3重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約4重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約5重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約6重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約7重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約8重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約9重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約10重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約11重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約12重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約13重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約14重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、水性組成物は、約15重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。一実施形態において、組成物は、約5%~約15重量%のトレハロースまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、組成物は、約4%~約12%のトレハロースまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、組成物は、約5%~約10%のトレハロースまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、組成物は、約5%~約9%のトレハロースまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、組成物は、約5%

10

20

30

40

50

～約 8 % のトレハロースまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、組成物は、約 5 % ～約 7 % のトレハロースまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、組成物は、約 4 % ～約 6 % のトレハロースまたはその誘導体を含む。

【0024】

一実施形態において、薬学的に許容される希釈剤は、生理学的に許容される緩衝液を含む。別の実施形態において、生理学的に許容される緩衝液は、ハンス緩衝塩類溶液 (HBS)、リンゲル液、ダルベッコリン酸緩衝食塩水 (PBS)、5 % ブドウ糖液 (D5W)、および生理食塩水 (0.9 % NaCl) からなる群から選択される。一実施形態において、薬学的に許容される希釈剤は、生理学的に許容される細胞培養培地を含む。別の実施形態において、薬学的に許容される細胞培養培地は、StemSpan-ACF、StemSpan-H3000、StemSpan-SFEM、Stemline I1、StemPro 34、StemXVivo、イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、ロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI) 1640 培地、マッコイ 5A 培地、最小必須培地 α 培地 (α -MEM)、基本培地イーグル (BME)、フィッシャー培地、199 培地、F-12K 栄養培地 (Kaign 改変培地、F-12K)、および X-vivo 20 からなる群から選択される。

10

【0025】

別の実施形態において、組成物が約 20 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 ヶ月超の間、安定した力価を有する。一実施形態において、組成物が約 20 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、6 ヶ月超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 20 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する。

20

【0026】

一実施形態において、組成物が約 10 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 ヶ月超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 10 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、6 ヶ月超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 10 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する。

【0027】

一実施形態において、組成物が約 4 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 ヶ月超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 4 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、6 ヶ月超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 4 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する。

30

【0028】

一実施形態において、組成物が約 0 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 -20 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 -60 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 -70 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する。別の実施形態において、組成物が約 -80 °C で保存された場合、ウイルスベクターは、1 年超の間、安定した力価を有する。

40

【0029】

別の実施形態において、ウイルスベクターの力価は、1 回以上の凍結融解サイクルの間安定である。別の実施形態において、ウイルスベクターの力価は、2 回以上の凍結融解サイクルの間安定である。別の実施形態において、ウイルスベクターの力価は、3 回以上の凍結融解サイクルの間安定である。

【0030】

一実施形態において、組成物は、直接インビボ注射に適している。別の実施形態において、組成物は、直接インビボ使用に適している。

50

【0031】

一実施形態において、組成物は、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも10倍希釈される。別の実施形態において、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも50倍希釈される。別の実施形態において、組成物は、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも100倍希釈される。別の実施形態において、組成物は、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも200倍希釈される。別の実施形態において、直接インビボ注射または直接インビボ使用の前に少なくとも250倍希釈される。

【0032】

種々の実施形態において、治療を必要とする対象における疾患を治療する方法であって、前記対象に本明細書に記載される水性組成物を形質導入された細胞集団を投与することを含む方法が企図される。

10

【0033】

一実施形態において、水性組成物を細胞集団に導入することを含む、本明細書に記載される水性組成物を細胞に形質導入する方法が企図される。一実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞である。別の実施形態において、細胞は、ヒト細胞である。別の実施形態において、細胞は、幹細胞または前駆細胞である。さらなる実施形態において、細胞は、造血細胞である。

【0034】

一実施形態において、造血細胞は、造血幹細胞もしくは前駆細胞、またはCD34を発現する細胞である。別の実施形態において、造血細胞は、リンパ球である。さらに別の実施形態において、リンパ球は、Tリンパ球ある。

20

【0035】

別の実施形態において、(a)トレハロースまたはその誘導体を含む組成物を調製することと、(b)組成物にウイルスベクターを加えることと、を含む、ウイルスベクターを安定化するための方法が企図される。一実施形態において、ウイルスベクターは、約-80℃~約25℃の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する。別の実施形態において、ウイルスベクターは、約-20℃~約18℃の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する。別の実施形態において、ウイルスベクターは、約-20℃~約4℃の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する。さらなる実施形態において、ウイルスベクターは、約4℃~約25℃の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する。さらに別の実施形態において、ウイルスベクターは、約4℃~約18℃の温度範囲で少なくとも1年間保存された場合に安定した力価を有する。

30

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】4℃で24時間保存した、および-80℃で24時間保存して1度融解した後の、未希釈のレンチウイルスベクター組成物中で調べたレンチウイルスベクターの力価に融解が与える影響を示す。図1は、4℃で保存した未希釈のレンチウイルスベクターと比較して、-80℃で保存した未希釈のレンチウイルスベクター組成物において平均力価(TU/mL)が減少したことを示す。

40

【図2】長期保存期間の間に種々の温度にわたって調べた、PBS中に未希釈で保存した、または5%トレハロース/PBS中に希釈して保存したレンチウイルスベクターの長期安定性を示す。4、14、28、42、および73日間、4℃で保存した、ならびに-20℃および-80℃で保存して1度融解した後のレンチウイルスベクターについて力価を測定した。図2は、5%トレハロースに配合されたレンチウイルスベクターが、少なくとも73日間、試験温度にわたって安定なレンチウイルス力価を示すことを示している。

【図3】種々の濃度のトレハロースに配合された1.0E+08TU/mLで形質導入した細胞において、フローサイトメトリーによって調べたレンチウイルスベクターの発現(RFP発現)を示す。トレハロース/PBS中に、4℃で24時間保存した場合、および

50

−80℃で24時間保存して1度融解した後、PBS中に未希釈で保存したレンチウイルスベクターを含有する細胞と比較して、レンチウイルスベクターを含有するより多くの割合の細胞がRFPを発現した。

【図4】4℃で保存した場合と比較して、より低い温度である−80℃で保存した場合に、どの保存条件がレンチウイルスベクターに最も保護を提供したかを決定するために調べた図3の細胞試料の平均力価(TU/mL)における変化を示す。PBS中に未希釈で保存したレンチウイルスベクターを含有する細胞が大きな負のΔTU/mL値を有していたことから、レンチウイルスベクターは、一旦、−80℃で24時間保存し、その後融解した場合、4℃での保存と比較して安定性を保持しなかったことが示唆される。約15%のトレハロース/PBS中に保存したレンチウイルスベクターを含有する細胞が最大の正のΔTU/mL値を示したことから、−80℃で24時間保存し、その後融解した場合、4℃での保存と比較して、レンチウイルスベクターの平均力価が実際に増加したことが示唆される。

【図5】保存組成物のトレハロース濃度(重量%、X軸)に対してプロットしたレンチウイルスベクターの力価(Y軸)を示す。4℃および−80℃の両方で最も低い希釈率でレンチウイルスベクターの最も高い保存率をもたらしたトレハロースの割合は、約15%であった。

【図6】種々の濃度のトレハロース/PBS中に−80℃で保存した試料について調べたレンチウイルスベクターの力価を示す。PBS中の未希釈の濃縮生成物も1:2で希釈した濃縮生成物も、試験したより低いトレハロース濃度でのトレハロースの保存効果は線形であった。

【発明を実施するための形態】

【0037】

A. 概要

遺伝子治療は、典型的にはウイルスベクターを使用して、標的細胞集団に対象とする修正遺伝子を導入することに関与する。レンチウイルス等のウイルスベクターは、4℃での長期間の保存、または−80℃等のより低い温度で保存した後に複数の凍結融解サイクルを経る等の保存条件によって有害な影響を受ける。レンチウイルスの力価は、凍結融解サイクルの増加および温度の上昇に伴って低下することが観察されている。本発明者は、これらの水性組成物中に保存されていないウイルスベクターと比較して、種々の温度下および期間でウイルスベクターの効力を維持する水性組成物を同定した。

【0038】

具体的な実施形態の実施は、そうではないと明示的に指示されない限り、当該技術分野の技術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後述される。そのような技術は、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 Ge*

nomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); および Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1998) を参照されたい。

【0039】

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

【0040】

B. 定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての科学的用語および技術的用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料はいずれも、具体的な実施形態の実施または試験において使用され得るが、好ましい組成物、方法、および材料の実施形態が、本明細書に記載される。本開示の目的のために、以下の用語を下記に定義する。

【0041】

冠詞「a」、「an」、および「the」は、その冠詞の文法上の対象となる1つのまたは1つより多くの（すなわち、少なくとも1つ）ものを指すために本明細書で使用される。例として「an element」は、1つの要素または1つより多くの要素を意味する。

【0042】

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、基準となる量、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30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%だけことなる量、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。具体的な実施形態において、「約」または「およそ」という用語が数値の前に記載される場合、その値±15%、10%、5%、または1%の範囲を示唆する。

【0043】

「実質的に」または「本質的に」は、基準となる量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、長さ、もしくは力価、または他の測定値と比較して、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%、またはそれ以上高い量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、長さ、もしくは力価、または他の測定値を指す。

【0044】

本明細書全体を通して、文脈上他の意味に解釈すべき場合を除いて、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、および「含む (comprising)」という語は、記載され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の包含を暗示するが、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の除外を暗示するものではないことを理解されたい。「～からなる」は、「～からなる」という句に続くあらゆるものを含み、それに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という句は、列挙される要素が必要または必須であり、他の要素はしなくてもよいことを示す。「～から本質的になる」は、この句の後に列挙される任意の要素を含み、列挙される要素に関して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ことを意味する。したがって、「～から本質的になる」という句は、列挙される要素は必要または必須であるが、他の要素は任意選択的ではなく、それらが列挙される活性または作用に影響を及ぼすかどうかに応じて存在してもまたはしなくてもよいことを示す。

【0045】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「ある実施形態」、「別の実施形態」、「具体的な実施形態」、「関連する実施形態」、「特定の実施形態」、「追加の実施形態」、もしくは「さらなる実施形態」、またはそれらの組み合わせへの言及は、実施形態に関連して記載されている特定の特徵、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、本明細書全体を通して種々の箇所に出現する上記の句は、必ずしも全てが同じ実施形態について言及しているわけではない。さらに、特定の特徵、構造、または特性が、1つ以上の実施形態において任意の適切な様式で組み合わせられてもよい。

【0046】

本明細書で使用される場合、「薬剤」または「化合物」という用語は、それらの全ての類似体および誘導体を制限なく含む、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ならびに他の有機および無機の化学物質を包含する。

【0047】

有機化学物質等の化学物質に関連して、「類似体」または「誘導体」は、構造および機能において別の化学物質に類似しており、しばしば単一の元素または基が構造的に異なるが、それが親化学物質と同じ機能を保持する場合、1つより多くの基（例えば2、3、または4つの基）の修飾によって異なり得る化学分子に関する。そのような修飾は、当業者にはルーチン的であり、例えば、追加のまたは置換された化学部分、例えば、酸のエステルまたはアミド、アルコールまたはチオールのベンジル基等の保護基、およびアミンのtert-ブトキシカルボニル基を含む。また、アルキル側鎖に対する修飾、例えばアルキル置換（例えば、メチル、ジメチル、エチル等）、側鎖の飽和または不飽和のレベルに対する修飾、ならびに置換フェニルおよびフェノキシ等の修飾基の付加も含まれる。誘導体はまた、コンジュゲート、例えば、ビオチンまたはアビジン部分、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素も含み、放射標識部分、生物発光部分、化学発光部分、または蛍光部分も含まれる。さらに、本明細書に記載される薬剤に、それらの薬物動態特性を変化させるため、例えば、望ましい特性の中でもとりわけ、インビボもしくはエクスピボでの半減期を増加させるため、またはそれらの細胞浸透特性を高めるための部分が付加されてもよい。また、医薬品の数多くの望ましい品質（例えば、可溶性、生物学的利用能、製造等）を向上させることが分かっているプロドラッグも含まれる（例えば、例示的なEPアゴニストプロドラッグに関しては、WO/2006/047476（参照によりそのようなアゴニストの開示について本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

【0048】

「保存する」は、生物学的物質の生物活性または完全性を本質的に維持するために組成物または製剤に含まれ得る「保護剤」または化合物の使用を指す。例えば、ウイルスベクターの感染力価および／またはウイルスベクターにおける異種配列の発現は、トレハロースによって保護され得る。生物学的物質を保護するための化合物の例として、トレハロース、トレハロースの誘導体、グリセロール、ジメチルスルホキシド、エチレングリコール、グルコース、スクロース、およびマルトースが挙げられる。同様に、「維持する」または「保存する」または「維持」または「変化なし」または「実質的な変化なし」または「実質的な減少なし」は、ビヒクル、対照分子／組成物のいずれかによって引き起こされる応答、または特定の細胞系列における応答と同等の生理学的応答を指す。同等の応答は、基準応答と有意に異ならないまたは測定可能なほど異ならない応答である。具体的な実施形態において、ウイルスベクターは、その力価がある温度で一定期間維持される場合、または力価が、約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、約5%未満、約10%未満、約12%未満、約15%未満、約18%未満、約20%未満、約22%未満、もしくは約25%未満、または任意の中間値だけ減少する場合に、その温度で保存される。

【0049】

「安定な」組成物は、その中のウイルスベクターが、ある温度で一定期間保存された場合に、その感染力価、ベクター粒子対感染性比、および／または異種配列の発現を実質的に保持する組成物である。ウイルスベクターの安定性を測定するための技術は、実施例に

記載されており、また当該技術分野で既知である。安定性は、選択された期間の間、選択された温度で測定することができる。また安定性は、乖離度に加えて測定され得、具体的な実施形態において、約20%、約25%、約30%、または約35%である。好ましくは、組成物は、所与の期間、約20℃、約10℃、約4℃、約0℃、約-5℃、約-10℃、約-20℃、約-30℃、約-40℃、約-50℃、約-60℃、約-70℃、約-80℃で、またはその間の任意の温度で安定である。好ましくは、組成物は、所与の温度で、少なくとも約24時間、少なくとも約1ヶ月、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約1年、少なくとも約2年、またはその間の任意の期間安定である。

【0050】

具体的な実施形態において、ウイルスベクターは、その感染力価がある温度で一定期間（例えば、時間、日、週、月、年）維持される場合、または力価が、最初に測定された力価と比較して約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、約5%未満、約10%未満、約12%未満、約13%未満、約14%、約15%未満、約16%未満、約17%未満、約18%未満、約19%、約20%未満、約21%未満、約22%未満、約23%未満、約24%未満、約25%未満、約26%未満、約27%未満、約28%未満、約29%未満、約30%未満、約31%未満、約32%未満、約33%未満、約34%未満、もしくは約35%未満、または任意の中間値だけ減少する場合に、その温度で安定である。一実施形態において、ウイルスベクターは、その感染力価が、最初に測定された力価と比較して約15%未満～約25%未満、または任意の中間値だけ減少した場合に安定である。

【0051】

具体的な実施形態において、ウイルスベクターは、ある温度で一定期間（例えば、時間、日、週、月、年）測定したときに、感染力価が最初の力価の約95%、約94%、約93%、約92%、約92%、約90%、約89%、約88%、約87%、約86%、約85%、約84%、約83%、約82%、約81%、約80%、約79%、約78%、約77%、約76%、約75%、約74%、約73%、約72%、約71%、約70%、約69%、約68%、約67%、約66%、または約65%である場合に、その温度で安定である。一実施形態において、ウイルスベクターの力価は、ある温度で一定期間測定したときに、感染力価が最初の力価の約85%～約75%、または任意の中間値である場合に、その温度で安定である。

【0052】

具体的な実施形態において、ウイルスベクターは、ウイルスのベクター粒子対感染性（P：I）比が、最初のまたは最初に測定されたウイルスの（P：I）の約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または任意の中間値以内であるとき、ある温度で安定である。一実施形態において、ウイルスベクターは、ウイルスのベクター粒子対感染性（P：I）比が、最初のまたは最初に測定されたウイルスの（P：I）の約50%以内またはそれ以上である場合に、ある温度で安定である。

【0053】

当業者は、組成物の安定性を測定する場合、列挙される温度を上回るおよび下回る温度、ならびに列挙される期間より短いおよび長い期間が適用され得ることを理解するであろう。さらに、組成物は、好ましくは、例えば、1、2、3、4、5回、またはそれ以上の凍結融解サイクルの間、組成物の凍結（例えば、-80℃まで）および融解後に安定である。

【0054】

C. トレハロースおよび誘導体

種々の実施形態において、本明細書において企図される組成物および製剤は、ウイルスベクターおよびトレハロースまたはその誘導体を含む。

【0055】

トレハロース（ α ， α -トレハロース、 α -D-グルコピラシノール α -D-グルコピ

10

20

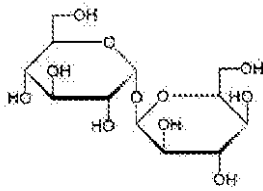
30

40

50

ラノシド、マッシュルーム糖、ミコースとしても知られる)は、 α ， $\alpha-1$ ， 1 結合した2つのD-グルコース単位を含有する、天然に存在する二糖である。

【化1】



10

【0056】

トレハロースは、植物、藻、真菌、酵母、細菌、昆虫、および他の無脊椎動物に見出すことができる。トレハロースは、トレハロースを含有する生物に複数の形態で見られる高度に特異的な酵素であるトレハラーゼによって切断される。トレハロースは、酸によって容易に加水分解されず、グリコシド結合は、 α -グルコシダーゼによって切断されない。この非還元性の糖は、その高度な旋光性および溶解挙動によって特徴付けられる。これは、非常に安定な二糖であると見なされる。トレハロースの異性体は、 α ， β （ネオトレハロース）および β ， β （イソトレハロース）を含むが、これらの異性体が天然で見られることは稀である。

【0057】

20

トレハロースを含有する現代の食料源は、ハチミツ、味醂、シェリー酒、酵母を使用して作製される多くの商品、商業用に栽培されるキノコ、およびロブスター、カニ、およびエビ等の無脊椎動物を含む。トレハロースは、ヒマワリ等の種子植物から単離することができる。

【0058】

トレハロースは、発達中のエネルギー源として、構造成分として、または代謝中間体としての役割を果たすことを含む、自然界において多くの役割を有し得る。昆虫において、トレハロースは、飛翔のエネルギー源を提供すると考えられる。

【0059】

「トレハロース誘導体」または「トレハロースの誘導体」は、化学的または物理的プロセスによってトレハロースから抽出した化合物を含み、前記化合物は、グリコシド結合に関与するアルデヒド基またはケトン基に由来するカルボニル炭素である遊離カルボニル炭素またはアノマー炭素を含有しない。トレハロースの誘導体のいくつかの例は、2，3，2'，3'-テトラ-O-ベンジル-6，6'-ジ-O-デカノイル-4，4'-ビス-O（ジフェニルホスフォノ）- α ， α トレハロース、6，6'-ジ-O-デカノイル-4，4'-ジ-O-ホスフォノ α ， α トレハロース、2，3，2'，3'-テトラ-O-ベンジル-4，4'-ビス-O（ジフェニルホスフォノ） α ， α トレハロース6，6'、脂肪酸エステルである。

30

【0060】

D. 組成物および製剤

40

本明細書において企図される組成物は、トレハロースまたはその誘導体および本明細書において企図されるウイルスベクターを含み得る。具体的な実施形態において、ウイルスベクターを保存および／または安定化するための組成物は、以下のように調製することができる：生理学的に許容される緩衝液に適量の無水トレハロースを溶解させ、トレハロースのストック溶液、例えば、約1M～約2Mのトレハロースのストック溶液を得ることによりトレハロースまたはその誘導体のストック溶液を作製する；次いで、トレハロースのストック溶液を用いて種々の比率に希釈することにより、同じかまたは異なる生理学的に許容される緩衝液中にウイルスベクターを配合し、組成物、例えば、特定のトレハロースの最終重量パーセントでウイルスベクターを含む水溶液を得ることができる。

【0061】

50

組成物は、限定されないが、薬学的組成物を含む。「薬学的組成物」は、単独でまたは1つ以上の外の治療様式と組み合わせて細胞または動物に投与するために、薬学的に許容されるまたは生理学的に許容される溶液または緩衝液中に配合された組成物を指す。また、所望の場合、組成物は、例えば、サイトカイン、増殖因子、小分子、化学療法剤、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物質と組み合わせて投与され得ることも理解されたい。追加の物質が、意図される治療を送達する組成物の能力に有害な影響を与えない限り、組成物中に含まれ得る他の成分に対する制限は実質的に存在しない。

【0062】

「薬学的に許容される」という句は、妥当な利益／危険比に見合った、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を呈することなく、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに適した、化合物、材料、組成物、および／または剤形を指すために本明細書において用いられる。

【0063】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤」は、限定されないが、ヒトまたは飼育動物における使用が許可されるものとして United States Food and Drug Administrationによって承認されている、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤、甘味剤、希釈剤、保存剤、色素／着色剤、香味強化剤、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、安定剤、等張剤、溶媒、界面活性剤、または乳化剤を含む。例示的な薬学的に許容される担体として、限定されないが、糖類、例えば、ラクトース、グルコース、およびスクロース；デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン；セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロース；トラガント；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバター、ワックス、動物性および植物性脂肪、パラフィン、ケイ素、ベントナイト、ケイ酸、酸化亜鉛；油類、例えば、落花生油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、および大豆油；グリコール類、例えば、プロピレングリコール；ポリオール類、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール；エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；寒天；緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；アルギン酸；パイロジェン不含有水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；ならびに薬学的製剤に使用される任意の他の適合性物質が挙げられる。

【0064】

「生理学的に許容される溶液」または「生理学的に許容される緩衝液」は、ヒトまたは飼育動物における使用が許可される水溶液を指す。例示的な生理学的に許容される緩衝液として、限定されないが、パイロジェン不含有水、等張食塩水（0.9% NaCl）、ハンクス緩衝塩類溶液（HBSS）、リンゲル液、5%ブドウ糖液（D5W）、および生理的緩衝塩、例えば、ダルベッコリン酸緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。

【0065】

具体的な実施形態において、本明細書において企図される組成物は、培地のpHをウイルスベクターに最適な値に維持するための緩衝液を含む。例えば、緩衝液は、リン酸緩衝液、または約7の生理的pHを可能にする別の緩衝液であってもよい。具体的な実施形態において、組成物は、約7、約7.1、約7.2、約7.3、または約7.4のpHを有する。一実施形態において、組成物は、約7.4のpHを有する。

【0066】

具体的な実施形態において、ウイルスベクターを保存および／または安定化するための水性組成物は、以下のように調製することができる：リン酸緩衝食塩水（PBS、pH 7.4）に適量の無水トレハロースを溶解させ、例えば、約1M～約2Mのトレハロース／PBSのストック溶液を得ることによりトレハロースまたはその誘導体のストック溶液を作製する；次いで、トレハロース／PBSのストック溶液を用いて種々の比率に希釈され

10

20

30

40

50

たPBS中にウイルスベクターを配合し、特定のトレハロースの最終重量パーセントでウイルスベクターを含む水性組成物を得ることができる。

【0067】

一実施形態において、ウイルスベクターは、約3%トレハロース、約4%トレハロース、約5%トレハロース、約6%トレハロース、約7%トレハロース、約8%トレハロース、約9%トレハロース、約10%トレハロース、約11%トレハロース、約12%トレハロース、約13%トレハロース、約14%トレハロース、約15%トレハロース、約16%トレハロース、約17%トレハロース、約1%トレハロース、約19%トレハロース、もしくは約20%トレハロース、または任意の中間濃度のトレハロースを含む水性組成物に配合される。具体的な実施形態において、当業者は、所望の総体積に応じて、ウイルスベクター、トレハロースストック、および生理学的に許容される緩衝液の体積を調整することができる。

10

【0068】

本明細書において企図される組成物は、長期間、幅広い温度でウイルスベクターを安定化する。具体的な実施形態において、組成物は、ウイルスベクターと、約20℃で、約10℃で、約4℃で、約0℃で、約-5℃で、約-10℃で、約-20℃で、約-30℃で、約-40℃で、約-50℃で、約-60℃で、約-70℃で、約-80℃、またはその間の任意の温度で長期間ウイルスベクターを安定化するのに有効な量のトレハロースとを含む。特定の実施形態において、ウイルスベクターは、少なくとも約24時間、少なくとも約48時間、少なくとも約72時間、少なくとも約96時間、少なくとも約1週間、少なくとも約2週間、少なくとも約3週間、少なくとも約1ヶ月、少なくとも約2ヶ月、少なくとも約3ヶ月、少なくとも約4ヶ月、少なくとも約5ヶ月、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約1年、少なくとも約2年、またはそれ以上の任意の期間、安定である。当業者は、具体的な実施形態において組成物の安定性を測定する場合、列挙される温度を上回るおよび下回る温度、ならびに列挙される期間より短いおよび長い期間が、適用され得ることを理解するであろう。

20

【0069】

本明細書において企図される組成物は、ベクターを凍結および融解した後にウイルスベクターを安定化する。一実施形態において、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれ以上の凍結融解サイクルの間、本明細書に開示される種々の温度、例えば、-20℃、-60℃、-70℃、-80℃等で、ウイルスベクターを安定化する。別の実施形態において、組成物は、11回を超える凍結融解サイクルの間ウイルスベクターを安定化する。別の実施形態において、組成物は、20回を超える凍結融解サイクルの間ウイルスベクターを安定化する。

30

【0070】

種々の実施形態において、組成物は、チオ硫酸ナトリウム、アスコルビン酸、クエン酸、およびクエン酸ナトリウム等の1つ以上の抗酸化剤を含む。抗酸化剤が使用される場合、それは、当該技術分野で有用であることが分かっている量で存在し得る。

【0071】

いくつかの実施形態において、組成物は、乾燥剤および／または浸透圧保護剤として作用し得る他の成分、例えば、メタノール、エタノール、グリセロール、およびDMSO等を含む。これらの成分は、保存されたウイルスベクター組成物において残留水分を低減するかまたは浸透圧ストレスの平衡を保つ傾向があり、場合によっては、より良好な保存能力をもたらす。特定の実施形態において、組成物は、ヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミン等のタンパク質を含む。

40

【0072】

具体的な実施形態において、組成物は、ウイルスベクターを安定化するのに有効な量のトレハロースを含む。本明細書で使用される場合、「量」という用語は、ある結果を達成するための、トレハロースまたはその誘導体の「有効な量」または「有効量」を指す。

【0073】

50

特定の実施形態において、薬学的組成物は、緩衝液、例えば、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水等；炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはアミノ酸、例えば、グリシン；抗酸化剤；キレート剤、例えば、EDTAまたはグルタチオン；アジュバント、例えば、水酸化アルミニウム；および保存剤を含んでもよい。本明細書において企図される組成物はまた、非経口投与、例えば、血管内（静脈内もしくは動脈内）、腹腔内、または筋肉内投与のために配合されてもよい。注射用の薬学的組成物は、好ましくは無菌である。

【0074】

ウイルスベクターを含む水性組成物は、インビボでの遺伝子治療を必要とする対象の細胞、組織、または器官への直接注射によって投与することができる。種々の他の実施形態において、細胞は、安定なウイルスベクターを含む本明細書において企図される組成物をインビトロまたはエクスビボで形質導入され、任意選択的にエクスビボで増殖される。形質導入された多細胞は、次いで、遺伝子治療を必要とする対象に投与される。

【0075】

E. ウイルスベクター

種々の実施形態において、本明細書において企図される組成物は、ウイルスベクターを保存または安定化するのに有効な量のトレハロースまたはその誘導体を含む。本明細書において企図される組成物によって安定化され得るベクターの例示的な種類として、限定されないが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス等が挙げられる。

【0076】

1. アデノウイルス

「アデノウイルスベクター」は、(a) 構築物のパッケージングを支持し、(b) その中にクロニングされたポリヌクレオチドを発現するのに十分なアデノウイルス配列をセンスまたはアンチセンス配向で含有する構築物を指す。組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルスの遺伝子組操作された形態を含む。36 k Bの線状2本鎖DNAウイルスであるアデノウイルスの遺伝的構成の知識は、アデノウイルスDNAの大きな欠片を最大7 k Bまでの外来配列で置換することを可能にする (Grunhaus & Horwitz, 1992)。レトロウイルスとは対照的に、アデノウイルスDNAは、潜在的な遺伝毒性を示すことなくエピソーム様式で複製し得るため、宿主細胞のアデノウイルス感染は染色体組み込みを引き起こさない。また、アデノウイルスは、構造的に安定であり、大規模な増幅後にゲノム再編成は検出されていない。アデノウイルスは、それらの細胞周期の段階にかかわらず実質的に全ての上皮細胞に感染し得る。これまでのところ、アデノウイルス感染は、例えば、ヒトにおける急性呼吸疾患等の軽度の疾患にのみ関連すると考えられている。

【0077】

アデノウイルスは、そのゲノムが中程度のサイズであること、操作し易さ、高い力価、広い標的細胞範囲、および高い感染力のために、遺伝子導入ベクターとしての使用に特に適している。ウイルスゲノムの両端は、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに必要なシスエレメントである100～200塩基対の逆方向反復 (ITR) を含有する。ゲノムの初期 (E) および後期 (L) 領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分割される異なる転写ユニットを含有する。E1領域 (E1AおよびE1B) は、ウイルスゲノムおよび少数の細胞遺伝子の転写の調節に関与するタンパク質をコードする。E2領域 (E2AおよびE2B) の発現は、ウイルスDNA複製のためのタンパク質の合成をもたらす。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子発現、および宿主細胞シャットオフに関与する (Renan, 1990)。ウイルスカプシドタンパク質の大部分を含む後期遺伝子の産物は、主要後期プロモーター (MLP) によって生じる単一の初期転写物の相当なプロセッシング後にのみ発現される。MLP (地図単位16.8に位置する) は、感染の後期段階の間に特に効率がよく、このプロモーターから生じる全てのmRNAは、それらを翻訳にとって好ましいmRNAにする5'トリパータイプライダー (TPL) 配列を有する。

10

20

30

40

50

【0078】

現在のシステムにおいて、組換えアデノウイルスは、シャトルベクターとプロウイルスベクターとの間の相同的組換えから作製される。2つのプロウイルスベクター間の可能な組換えに起因して、このプロセスから野生型アデノウイルスが生成され得る。したがって、個々のプラークからウイルスの単一クローンを単離し、そのゲノム構造を調べることが非常に重要である。

【0079】

複製欠損性である本発明のアデノウイルスベクターの作製および増殖は、Ad5 DNA断片によってヒト胚腎細胞から形質転換され、構成的にE1タンパク質を発現する、293と称される特有のヘルパー細胞系に依存する（Graham et al., 1977）。E3領域は、アデノウイルスゲノムには重要でないため（Jones & Shenk, 1978）、本発明のアデノウイルスベクターは、293細胞の助けによって、E1領域、D3領域、またはその両方の領域のいずれかに外来DNAを担持する（Graham & Prevec, 1991）。天然において、アデノウイルスは、野生型ゲノムの約105%をパッケージすることができ（Ghosh-Choudhury et al., 1987）、約2kBの余分なDNAの容量を提供する。E1領域およびE3領域で置き換え可能な約5.5kBのDNAと組み合わせて、本発明のアデノウイルスベクターの最大容量は、7.5kB未満であるか、またはベクターの全長の約15%である。アデノウイルスゲノムの80%超が、ベクター骨格に残り、ベクター媒介性細胞毒性の源となる。また、E1欠失ウイルスの複製欠損性は不完全である。例えば、高い感染多重度（MOI）で現在使用可能なベクターにウイルス遺伝子発現の漏れが観察されている（Mulligan, 1993）。

【0080】

ヘルパー細胞系は、ヒト胚腎細胞、筋細胞、造血細胞、または他のヒト胚間葉細胞もしくは上皮細胞等のヒト細胞に由来してもよい。代替として、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスを許容する他の哺乳動物種の細胞に由来してもよい。そのような細胞として、例えば、Verob細胞、または他のサル胚間葉細胞または上皮細胞が挙げられる。上述のように、本明細書において好ましいヘルパー細胞系は293である。

【0081】

最近、Racher et al., (1995)は、293細胞を培養してアデノウイルスを増殖させるための改善された方法を開示した。ある形式では、100~200mLの培地を含有するシリコン処理した1リットルのスピナーフラスコ（Technique, Cambridge, UK）中に個々の細胞を接種することによって、天然の細胞凝集体を成長させる。40rpmで攪拌した後、トリパンプルーを用いて細胞生存率を予測する。別の形式では、Fibra-Celマイクロ担体（Bibby Sterlin, Stone, UK）（5g/l）が以下の通りに用いられる。5mLの培地（5ml）に再懸濁した細胞接種材料を、250mLエーレンマイヤーフラスコ中の担体（50mL）に加え、時折攪拌しながら1~4時間静置する。次いで、培地を50mLの新しい培地と交換し、振盪を開始する。ウイルスの産生のために、細胞を約80%コンフルエンスまで増殖させ、その後、培地を交換し（最終容積25%まで）、0.05のMOIでアデノウイルスを加える。培養を一晩静置し、体積が100%に増加した後、さらに72時間振盪を開始した。

【0082】

アデノウイルスベクターが複製欠損性であるか、または少なくとも条件付きで欠損性であるという要件以外は、具体的な実施形態を成功裡に実施する上で、アデノウイルスベクターの性質が極めて重要であるとは考えられない。アデノウイルスは、既知の42の異なるセロタイプまたはサブグループA~Fのいずれかであり得る。アデノウイルス5型は、多くの生化学的情報および遺伝情報が分かっているヒトアデノウイルスであり、歴史的にも、アデノウイルスをベクターとして用いるほとんどの構築物に使用されてきているため、具体的な実施形態において使用される条件付きの複製欠損性アデノウイルスベクターを

得るためには、サブグループCのアデノウイルス5型が好ましい出発材料である。

【0083】

上述のように、典型的なベクターは、複製欠損性であり、アデノウイルスE1領域を有しない。したがって、E1をコードする配列が除去された位置に、対象とする遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入することが最も都合がよいであろう。しかしながら、アデノウイルス配列内の構築物の挿入位置は重要ではない。対象とする遺伝子をコードするポリヌクレオチドは、Karlssoon et al., (1986)によって記載されるように、E3置換ベクターの欠失するE3領域の代わりに挿入されてもよい、または、ヘルパー細胞系もしくはヘルパーウイルスがE4の欠損を補完するE4領域に挿入されてもよい。

10

【0084】

アデノウイルスは、増殖および操作が容易であり、インビトロおよびインビボで広範な宿主範囲を示す。このグループのウイルスは、高い力価、例えば、1mL当たり10⁹～10¹¹のプラーク形成単位で得ることができ、それらは高度に感染性である。アデノウイルスの生活環は、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。アデノウイルスベクターによって送達される外来遺伝子はエピソードであり、したがって、宿主細胞に対して低い遺伝毒性を有する。野生型アデノウイルスを用いたワクチン接種の試験において副作用は報告されておらず(Couch et al., 1963; Top et al., 1971)、インビボでの遺伝子導入ベクターとしてのそれらの安全性および治療可能性が実証されている。

20

【0085】

アデノウイルスベクターは、真核生物の遺伝子発現において使用されてきた(Levero et al., 1991; Gomez-Foix et al., 1992)およびワクチン開発(Grunhaus&Horwitz, 1992; Graham&Prevec, 1992)。最近、動物試験によって、組換えアデノウイルスが遺伝子治療に使用され得ることが示唆された(Stratford-Perricaudet & Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Rich et al., 1993)。組換えアデノウイルスを異なる組織に投与する試験は、気管点滴注入(Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992)、筋肉注射(Ragot et al., 1993)、末梢静脈内注射(Herz & Gerard, 1993)、および脳内への定位接種(Le Gal La Salle et al., 1993)を含む。

30

【0086】

2. アデノ随伴ウイルス

AAV(Ridgeway, 1988; Hermonat & Muzyczka, 1984)は、アデノウイルスストックの汚染物質として発見されたパルボウイルスである。これは、いずれの疾患とも関連付けられていない遍在性ウイルスである(米国のヒト集団の85%に抗体が存在する)。これはまた、その複製がアデノウイルス等のヘルパーウイルスの存在に依存するため、ディペンドウイルスとしても分類される。種々のセロタイプが単離されているが、その中でもAAV-2が最もよく特徴付けられている。AAVは、直径20～24nmの正二十面体のビリオンを形成するようにカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3内に封入された一本鎖線状DNAを有する(Muzyczka & McLaughlin, 1988)。

40

【0087】

AAVのDNAは、約4.7キロベース長である。それは、2つのオープンリーディングフレームを含有し、2つのITRによって隣接される。AAVゲノムには2つの主要な遺伝子であるrepおよびcapが存在する。rep遺伝子は、ウイルスの複製に関与するタンパク質をコードするのに対し、capは、カプシドタンパク質VP1～3をコードする。各ITRは、T型のヘアピン構造を形成する。これらの末端反復は、染色体組み込みに不可欠な唯一のAAVのcis成分である。したがって、AAVは、全てのウイルス

50

コード配列が除去され、かつ送達用遺伝子のカセットによって置き換えられたベクターとして使用することができる。3つのウイルスプロモーターが同定され、それらの地図位置に従って p 5、p 19、および p 40 と命名された。p 5 および p 19 からの転写によって r e p タンパク質の産生がもたらされ、p 40 からの転写がカプシドタンパク質の産生がもたらされる (H e r m o n a t & M u z y c z k a, 1984)。

【0088】

r A A V を発現ベクターとして使用する可能性を研究するよう研究者に促した要因がいくつか存在する。1つは、宿主染色体に組み込むための遺伝子の送達に関する要件が驚くほど少ないということである。A A V ゲノムのわずか 6 % である 145bp の I T R を有することが必要である。これは、ベクター内に 4.5kb の D N A 挿入を構成する余地を残す。この担持能力は、A A V が大きな遺伝子を送達するのを妨げ得るが、アンチセンス構築物の送達には十分に適している。

【0089】

A A V はまた、その安全性、すなわち、遺伝子操作（組換え）が宿主ゲノム内に組み込まれていないことに起因して、送達ビヒクルの良好な選択肢でもある。比較的複雑なレスキュー機構が存在する：r A A V を起動させるためには、野生型アデノウイルスだけではなく、A A V 遺伝子も必要である。同様に、A A V は、病原性ではなく、いかなる疾患にも関連していない。ウイルスコード配列の除去によって、ウイルス遺伝子発現に対する免疫反応が最小限に抑えられ、したがって r A A V は炎症反応を誘発しない。

【0090】

オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列を宿主細胞に送達するための発現構築物として、他のウイルスベクターが用いられてもよい。ワクシニアウイルス (R i d g e w a y, 1988; C o u p a r e t a l., 1988)、ポリオウイルス、およびヘルペスウイルス等のウイルスに由来するベクターが用いられてもよい。それらは、種々の哺乳動物細胞にいくつかの魅力的な特徴を提供する (F r i e d m a n n, 1989; R i d g e w a y, 1988; C o u p a r e t a l., 1988; H o r w i c h e t a l., 1990)。

【0091】

欠損 B 型肝炎ウイルスが認識されたことにより、異なるウイルス配列の構造と機能との関係に新たな知見が得られた。インビトロ試験により、ウイルスが、そのゲノムの最大 80 % の欠失にもかかわらず、ヘルパー依存性のパッケージングおよび逆転写のための能力を保持できることが示された (H o r w i c h e t a l., 1990)。このことは、ゲノムの大部分を、外来遺伝物質で置き換えることができることを示唆するものであった。肝臓指向性および残存性（組み込み）は、肝臓特異的な遺伝子導入にとって特に魅力的な特性であった。C h a n g e t a l., (1991) は、ポリメラーゼ、表面および前表面コード配列の代わりに、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) 遺伝子をアヒル B 型肝炎ウイルスゲノムに導入した。それは、野生型ウイルスとともにトリヘパトーマ細胞株にコトランスフェクトされた。初代子ガモ肝細胞を感染させるために、高力価の組換えウイルスを含有する培養培地が使用された。トランスフェクション後の少なくとも 24 日間は、安定な C A T 遺伝子発現が検出された (C h a n g e t a l., 1991)。

【0092】

3. レトロウイルス

レトロウイルスは、遺伝子送達のための一般的なツールである (M i l l e r, 2000, N a t u r e. 357: 455-460)。具体的な実施形態において、レトロウイルスは、細胞にキメラ抗原受容体 (C A R) をコードするポリヌクレオチドを送達するために使用される。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 R N A を直鎖状の二本鎖 D N A コピーに逆転写し、続いてそのゲノム D N A を共有結合により宿主ゲノム内に組み込む R N A ウイルスを指す。一旦、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」と称される。プロウイルスは、R N A ポリメラ

ーゼ I I の鋳型としての役割を果たし、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 分子の発現を誘導する。

【0093】

具体的な実施形態において使用されるのに適した例示的なレトロウイルスとして、限定されないが、モロニーマウス白血病ウイルス (M-MuLV)、モロニーマウス肉腫ウイルス (MoMSV)、ハーベイマウス肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳癌ウイルス (MuMTV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、ネコ白血病ウイルス (FLV)、スプーマウイルス、フレンドマウス白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、およびラウス肉腫ウイルス (RSV))、ならびにレンチウイルスが挙げられる。

10

【0094】

本明細書で使用される場合、「レンチウイルス」という用語は、複合レトロウイルスの群 (または属) を指す。例示的なレトロウイルスとして、限定されないが、HIV (HIV 1 型、および HIV 2 型を含むヒト免疫不全ウイルス)、ビスナ・マエディウイルス (VMV) ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV)、ウマ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)、サル免疫不全ウイルス (SIV) が挙げられる。一実施形態において、HIV に基づくベクター骨格 (すなわち、HIV シス作用性配列エレメント) が好ましい。具体的な実施形態において、レンチウイルスは、MND プロモーターを含み、かつ細胞に CAR をコードするポリヌクレオチドを送達するために使用される。

20

【0095】

レトロウイルスベクター、より具体的にはレンチウイルスベクターが、具体的な実施形態の実施において使用され得る。したがって、「レトロウイルス」または「レトロウイルスベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、それぞれ「レンチウイルス」および「レンチウイルスベクター」を含むことが意図される。

【0096】

「ベクター」という用語は、別の核酸分子を導入または輸送することができる核酸分子を指すために本明細書で使用される。導入される核酸は、一般に、ベクター核酸分子と連結しており、例えば、その中に挿入されている。ベクターは、細胞における自律複製を誘導する配列を含んでもよい、または宿主細胞 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。有用なベクターとして、例えば、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が挙げられる。有用なウイルスベクターとして、例えば、複製欠損性のレトロウイルスおよびレンチウイルスが挙げられる。

30

【0097】

当業者には明らかであるように、「ウイルスベクター」という用語は、典型的には、核酸分子の導入もしく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、導入プラスミド)、または核酸の導入を媒介するウイルス粒子のいずれかを指して広く使用されている。ウイルス粒子は、典型的には、種々のウイルス成分を含み、時には核酸 (複数可) に加えて宿主細胞成分も含む。

40

【0098】

ウイルスベクターという用語は、核酸を細胞内に導入することができるウイルスもしくはウイルス粒子、または導入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導入プラスミドは、主としてウイルスに由来する構造的および／または機能的遺伝エレメントを含有する。「レトロウイルスベクター」という用語は、主としてレトロウイルスに由来する構造的および機能的遺伝エレメントを含有するウイルスベクターまたはプラスミドを指す。「レンチウイルスベクター」という用語は、主としてレンチウイルスに由来する LTR を含む、構造的および機能的遺伝エレメントまたはその一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。「ハイブリッドベクター」という用語は、レトロウイルス、例えば、レンチウイルスの配列と非レンチウイルスのウイルス配列の

50

両方を含有する、ベクター、LTR、または他の核酸を指す。一実施形態において、ハイブリッドベクターは、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導入プラスミドを指す。

【0099】

具体的な実施形態において、「レンチウイルスベクター」、「レンチウイルス発現ベクター」という用語は、レンチウイルス導入プラスミドおよび／または感染性レンチウイルス粒子を指すために使用され得る。本明細書において、クローニング部位、プロモーター、調節エレメント、異種核酸などのエレメントに言及がなされる場合、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を理解されたい。

10

【0100】

プロウイルスの各末端は、「長末端反復」または「LTR」と称される構造である。「長末端反復（LTR）」という用語は、それらの天然の配列の状況において、直接反復であり、U3領域、R領域、およびU5領域を含有する、レトロウイルスDNAの末端に位置する塩基対のドメインを指す。LTRは、一般に、レトロウイルス遺伝子の発現（例えば、遺伝子転写物の促進、開始、およびポリアダニル化）およびウイルス複製の基盤となる機能を提供する。LTRは、転写制御エレメント、ポリアダニル化シグナル、ならびにウイルスゲノムの複製および組み込みのために必要な配列を含む、多数の調節シグナルを含有する。ウイルスLTRは、U3、R、およびU5と称される3つの領域に分割される。U3領域は、エンハンサーエレメントおよびプロモーターエレメントを含有する。U5領域は、プライマー結合部位とR領域との間の配列であり、ポリアダニル化配列を含有する。R（反復）領域は、U3領域およびU5領域によって隣接されている。LTRは、U3、R、およびU5領域で構成され、ウイルスのゲノムの5'末端および3'末端の両方に出現する。5'LTRには、ゲノムの逆転写に必要な配列（tRNAプライマー結合部位）、および粒子へのウイルスRNAの効率的なパッケージングに必要な配列（プサイ部位）が隣接している。

20

【0101】

本明細書で使用される場合、「パッケージングシグナル」または「パッケージング配列」という用語は、ウイルスカプシドまたは粒子内へのウイルスRNAの挿入のために必要なレトロウイルスゲノム内に位置する配列を指す。例えば、Clever et al., 1995. J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109を参照されたい。いくつかのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのカプシド形成に必要な最小のパッケージングシグナル（プサイ[Ψ]配列とも称される）を使用する。したがって、本明細書で使用される場合、「パッケージング配列」、「パッケージングシグナル」、「プサイ」という用語、および「Ψ」という記号は、ウイルス粒子形成の間のレトロウイルスRNA鎖のカプシド形成のために必要な非コード配列への言及において使用される。

30

【0102】

種々の実施形態において、ベクターは、修飾された5'LTRおよび／または3'LTRを含む。LTRのいずれかまたは両方が、限定されないが、1つ以上の欠失、挿入、または置換を含む、1つ以上の修飾を含んでもよい。3'LTRの修飾は、ウイルスを複製欠損性にすることによってレンチウイルス系またはレトロウイルス系の安全性を向上するために行われることが多い。本明細書で使用される場合、「複製欠損性」という用語は、有効な複製を終了することができず、そのため、感染性ビリオンが産生されないウイルス（例えば、複製欠損性レンチウイルス後代）を指す。「複製コンピテント」という用語は、複製することができ、そのためウイルスのウイルス複製により感染性ビリオン（例えば、複製コンピテントなレンチウイルス後代）を産生することができる、野生型ウイルスまたは変異体ウイルスを指す。

40

【0103】

50

「自己不活性化」(SIN)ベクターは、1回目のウイルス複製を越えるウイルス転写を防ぐために、U3領域として知られる右側の(3')LTRのエンハンサープロモーター領域が修飾された(例えば、欠失または置換によって)複製欠損性ベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを指す。これは、ウイルス複製の間に右側の(3')LTRのU3領域が左側の(5')LTRのU3領域の鋳型として使用され、したがって、ウイルスの転写物がU3エンハンサープロモーターなしでは形成されないためである。さらなる実施形態において、3'LTRは、U5領域が、例えば、理想的なポリ(A)配列で置き換えられるように修飾される。LTRに対する修飾、例えば、3'LTR、5'LTR、または3'LTRおよび5'LTRの両方に対する修飾も、具体的な実施形態に含まれることに留意されたい。

10

【0104】

ウイルス粒子の産生の間にウイルスゲノムの転写を駆動するために、5'LTRのU3領域を異種プロモーターで置き換えることによって、さらなる安全性の強化がもたらされる。使用され得る異種プロモーターの例として、例えば、ウイルス性のシミアンウイルス40(SV40)(例えば、初期または後期)、サイトメガロウイルス(CMV)(例えば、最初期)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、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非依存性様式で高レベルの転写を駆動することができる。ウイルス産生系に完全なU3配列が存在しないため、この置き換えは、複製コンピテントウイルスを形成する組換えの可能性を低下させる。特定の実施形態において、異種プロモーターは、ウイルスゲノムが転写される様式を制御する上でさらなる利点を有する。例えば、異種プロモーターは、誘導因子が存在する場合にのみ、全てまたは一部のウイルスゲノムの転写が起こるように、誘導性であり得る。誘導因子は、限定されないが、1つ以上の化合物または宿主細胞が培養される温度もしくはpH等の生理学的条件を含む。

20

【0105】

いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、TARエレメントを含む。「TAR」という用語は、レンチウイルス(例えば、HIV)のLTRのR領域に位置する「トランス活性化反応」遺伝エレメントを指す。このエレメントは、レンチウイルスのトランス活性化因子(tat)遺伝子エレメントと相互作用してウイルス複製を増強する。しかしながら、5'LTRのU3領域が異種プロモーターによって置き換えられた実施形態では、このエレメントは必要ない。

30

【0106】

「R領域」は、キャッピング基の開始点(すなわち、転写の開始点)で始まり、ポリ(A)トラクトの開始点の直前で終わる、レトロウイルスLTR内の領域を指す。R領域はまた、U3およびU5領域によって隣接されているとも定義される。R領域は、逆転写の間に、ゲノムの一方の末端から他方の末端まで新生DNAの導入を可能にすることにおいて役割を果たす。

【0107】

本明細書で使用される場合、「FLAPエレメント」という用語は、その配列が、レトロウイルス、例えば、HIV-1またはHIV-2のセントラルポリプリン配列およびセントラルターミネーション配列(cPPTおよびCTS)を含む核酸を指す。適切な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配列(cPPT)におけるプラス鎖DNAの中心開始点、およびセントラルターミネーション配列(CTS)における中心終結点、三本鎖DNA構造であるHIV-1中心DNAフラップの形成をもたらす。いずれかの理論に束縛されることを望むものではないが、DNAフラップは、レンチウイルスゲノムの核内移行のシス作用決定基として作用することができ、かつ/または、ウイルスの力価を高めることができる。具体的な実施形態において、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

40

50

は、ベクター内の対象とする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、具体的な実施形態において、導入プラスミドは、FLAPエレメントを含む。一実施形態において、ベクターは、HIV-1から単離されたFLAPエレメントを含む。

【0108】

一実施形態において、レトロウイルスまたはレンチウイルス導入ベクターは、1つ以上の輸送エレメントを含む。「輸送エレメント」という用語は、核から細胞の細胞質へのRNA転写物の輸送を調節するシス作用性転写後調節エレメントを指す。RNA輸送エレメントの例として、限定されないが、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 を参照のこと) およびB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント(HPRE) が挙げられる。一般に、RNA輸送エレメントは、遺伝子の3' UTR内に配置され、1つまたは複数のコピーとして挿入され得る。

【0109】

具体的な実施形態において、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、効率的なポリアデニル化部位、および任意選択的に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加する。様々な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., 5 : 3864) 等 (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9 : 1766) 等 (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9 : 1766) により、タンパク質における異種核酸の発現を増加させることができる。具体的な実施形態において、ベクターは、WPREまたはHPRE等の転写後調節エレメントを含む。

【0110】

具体的な実施形態において、場合によっては、WPREまたはHPRE等の転写後調節エレメントが、細胞の形質転換のリスクを高めるため、かつ／あるいは、mRNA転写物の量を実質的にもしくは有意に増加させないか、またはmRNAの安定性を高めないため、ベクターは、これらのエレメントを欠くかまたは含まない。したがって、いくつかの実施形態において、ベクターは、さらなる安全対策としてWPREまたはHPREを欠くかまたは含まない。

【0111】

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誘導するエレメントは、異種性の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られる。具体的な実施形態において、ベクターは、発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのポリアデニル化配列3'を含む。「ポリ(A)部位」または「ポリ(A)配列」という用語は、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誘導するDNA配列を意味する。ポリアデニル化配列は、コード配列の3'末端にポリ(A)尾部を加えることにより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、急速に分解されるため、組換え転写物の効率的なポリアデニル化が望ましい。ベクターに使用することができるポリ(A)シグナルの実例として、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(rβgpA)、または当該技術分野で既知の別の適切な異種性または内在性のポリ(A)配列が挙げられる。

【0112】

特定の実施形態において、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターは、1つ以上のインスレーターエレメントをさらに含む。インスレーターエレメントは、レンチウイル

スを発現させた配列、例えば、治療用ポリペプチドを、ゲノムDNAに存在するシス作用性エレメントによって媒介され得、導入した配列の調節解除された発現をもたらし得る組み込み部位の影響から保護することに貢献し得る（すなわち、位置効果、例えば、Burgess-Beusse et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433; およびZhan et al., 2001, Hum. Genet., 109:471を参照のこと）。いくつかの実施形態において、導入ベクターは、3'LTRに1つ以上のインスレーターエレメントを含み、プロウイルスが宿主ゲノムに組み込まれると、プロウイルスは、3'LTRを複製することにより、5'LTRおよび3'LTRの両方に1つ以上のインスレーターを含む。具体的な実施形態において使用するのに適したインスレーターは、限定されないが、ニワトリβグロビンインスレーターを含む（参照により本明細書に組み込まれるChung et al., 1993, Cell 74:505、Chung et al., 1997, PNAS 94:575; およびBell et al., 1999, Cell 98:387を参照のこと）。インスレーターエレメントの例として、限定されないが、ニワトリHS4等のβグロビン遺伝子座に由来するインスレーターが挙げられる。

10

【0113】

ある特定の実施形態によれば、ウイルスベクター骨格配列のほとんどまたは全部が、レンチウイルス、例えば、HIV-1に由来する。しかしながら、多くの異なる源のレトロウイルスおよび／またはレンチウイルス配列が、使用されてもよいかまたは組み合わせられてもよく、特定のレンチウイルス配列における多数の置換および変更が、導入ベクターが本明細書に記載される機能を実行する能力を損なうことなく受け入れられることを理解されたい。さらに、様々なレンチウイルスベクターが当該技術分野で既知であり（Naldini et al., (1996a、1996b、および1998)、Zufferey et al., (1997)、Dull et al., 1998、米国特許第6,013,516号、および5,994,136を参照のこと）、これらの多くは、ウイルスベクターまたは導入プラスミドを産生するように適合させることができる。

20

【0114】

一実施形態において、ベクターは、例えば、グロビンポリペプチドをコードする、対象とするポリヌクレオチドに作動可能に連結された少なくとも1つの修飾または未修飾レトロウイルスLTR、例えば、レンチウイルスLTR、βグロビンプロモーター、およびβグロビン遺伝子座制御領域（LCR）を含む。LTRの適切な修飾は、限定されないが、5'LTRの、異種プロモーター、例えば、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、チミジンキナーゼプロモーター、またはサルウイルス40（SV40）プロモーターによる置き換え、ならびに本明細書の他の箇所でも論じられているような3'LTRの1つ以上の修飾、付加、および／または欠失を含む。

30

【0115】

具体的な実施形態において、ポリヌクレオチドの赤血球特異的な発現は、ヒトβグロビンプロモーター、ヒトβグロビンLCR由来のDNAase I高感受性部位2、3、および4のうちの1つ以上を含むβグロビンLCR、ならびに／またはヒトβグロビン3'エンハンサーエレメントを使用して達成される。

40

【0116】

種々の実施形態において、ベクターは、本明細書の他の箇所でも論じられているように、プサイパッケージング配列（Ψ⁺）、セントラルポリプリン配列／DNAフラップ（cPPT／FLAP）、レトロウイルス輸送エレメント、転写後調節エレメント、1つ以上のインスレーターエレメント、ポリアデニル化配列、選択可能マーカー、および細胞自殺遺伝子からなる群から選択される1つ以上のエレメントを含む。

【0117】

種々の実施形態において、ベクターは、異常ヘモグロビン症の遺伝子治療を提供するポリペプチドをコードする遺伝子に作動可能に連結された造血細胞中に作動可能にプロモ-

50

ターを含む。ベクターは、1つ以上のLTRを有してもよく、いずれかのLTRが、1つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失等の1つ以上の修飾を含む。ベクターは、形質導入の効率を高めるための1つ以上のアクセサリエレメント（例えば、cPPT/FLAP）、ウイルスパッケージング（例えば、プサイ（Ψ）パッケージングシグナル、RRE）、および／または治療遺伝子の発現を増加させる他のエレメント（例えば、ポリ（A）配列）をさらに含んでもよい。

【0118】

一実施形態において、ベクターは、左側の（5'）レトロウイルスLTR、プサイパッケージング配列（Ψ⁺）、セントラルポリプリン配列／DNAフラップ（cPPT/FLAP）、レトロウイルス輸送エレメント、βグロビンプロモーター、βグロビン遺伝子座制御領域（LCR）、および任意選択的に、対象とするポリヌクレオチドに作動可能に連結した3'βグロビンエンハンサー、ならびに1つ以上のインスレーターエレメントまたはポリアデニル化配列を含む右側の（3'）レトロウイルスLTRを含む。

10

【0119】

具体的な実施形態において、ベクターは、左側の（5'）HIV-1 LTR、プサイパッケージング配列（Ψ⁺）、HIV-1セントラルポリプリン配列／DNAフラップ（cPPT/FLAP）、rev応答エレメント（RRE）、βグロビンプロモーター、βグロビン遺伝子座制御領域（LCR）、および任意選択的に、対象とするポリヌクレオチドに作動可能に連結した3'βグロビンエンハンサー、ならびに1つ以上のインスレーターエレメント、およびウサギβグロビンポリ（A）配列（rβgpA）を含む右側の（3'）レトロウイルスLTRを含むレンチウイルスベクターである。

20

【0120】

種々の実施形態において、ベクターは、副腎白質ジストロフィーおよび／または副腎脊髄神経障害の治療を提供するポリペプチドをコードする遺伝子に作動可能に連結した小膠細胞において作動可能なプロモーターを含む。ベクターは、1つ以上のLTRを有してもよく、いずれかのLTRが、1つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失等の1つ以上の修飾を含む。ベクターは、形質導入の効率を高めるための1つ以上のアクセサリエレメント（例えば、cPPT/FLAP）、ウイルスパッケージング（例えば、プサイ（Ψ）パッケージングシグナル、RRE）、および／または治療遺伝子の発現を増加させる他のエレメント（例えば、ポリ（A）配列）をさらに含んでもよい。

30

【0121】

具体的な実施形態において、ベクターは、左側の（5'）レトロウイルスLTR；セントラルポリプリン配列／DNAフラップ（cPPT/FLAP）；レトロウイルス輸送エレメント；ATP結合カセット、サブファミリーD、メンバー1（ABCD1）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した小膠細胞において活性なプロモーター；および右側の（3'）レトロウイルスLTRを含む。

【0122】

特定の実施形態において、ベクターは、左側の（5'）HIV-1 LTR；プサイ（Ψ）パッケージングシグナル；cPPT/FLAP；RRE；ヒトABCD1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したMNDプロモーター；右側の（3'）自己不活化（SIN）HIV-1 LTR；およびウサギβグロビンポリアデニル化配列を含むレンチウイルスベクターである。

40

【0123】

種々の実施形態において、ベクターは、CARポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターを含む。ベクターは、1つ以上のLTRを有してもよく、いずれかのLTRが、1つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失等の1つ以上の修飾を含む。ベクターは、形質導入の効率を高めるための1つ以上のアクセサリエレメント（例えば、cPPT/FLAP）、ウイルスパッケージング（例えば、プサイ（Ψ）パッケージングシグナル、RRE）、および／または治療遺伝子の発現を増加させる他のエレメント（例えば、ポリ（A）配列）をさらに含んでもよく、任意選択的に、W

50

P R EまたはH P R Eを含んでもよい。

【0124】

具体的な実施形態において、導入ベクターは、左側の（5'）レトロウイルスL T R；セントラルポリプリン配列／DNAフラップ（c P P T／F L A P）；レトロウイルス輸送エレメント；本明細書において企図されるC A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したM N Dプロモーター；および右側の（3'）レトロウイルスL T R；ならびに任意選択的に、W P R EまたはH P R Eを含む。

【0125】

具体的な実施形態において、導入ベクターは、左側の（5'）レトロウイルスL T R；レトロウイルス輸送エレメント；本明細書において企図されるC A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したM N Dプロモーター；右側の（3'）レトロウイルスL T R；およびポリ（A）配列；ならびに、任意選択的にW P R EまたはH P R Eを含む。別の具体的な実施形態において、レンチウイルスベクターは、左側の（5'）L T R；c P P T／F L A P；R R E；本明細書において企図されるC A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したM N Dプロモーター；右側の（3'）L T R；およびポリアデニル化配列；ならびに任意選択的に、W P R EまたはH P R Eを含む。

【0126】

特定の実施形態において、レンチウイルスベクターは、左側の（5'）H I V－1 L T R；プサイ（Ψ）パッケージングシグナル；c P P T／F L A P；R R E；本明細書において企図されるC A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したM N Dプロモーター；右側の（3'）自己不活化（S I N）H I V－1 L T R；およびウサギβグロビンポリアデニル化配列；ならびに任意選択的に、W P R EまたはH P R Eを含む。

【0127】

別の実施形態において、ベクターは、少なくとも1つのL T R；セントラルポリプリン配列／DNAフラップ（c P P T／F L A P）；レトロウイルス輸送エレメント；および本明細書において企図されるC A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したM N Dプロモーター；ならびに任意選択的に、W P R EまたはH P R Eを含む。

【0128】

具体的な実施形態において、ベクターは、少なくとも1つのL T R；c P P T／F L A P；R R E；本明細書において企図されるC A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したM N Dプロモーター；およびポリアデニル化配列；ならびに任意選択的に、W P R EまたはH P R Eを含む。

【0129】

特定の実施形態において、ベクターは、少なくとも1つのS I N H I V－1 L T R；プサイ（Ψ）パッケージングシグナル；c P P T／F L A P；R R E；本明細書において企図されるC A Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したM N Dプロモーター；およびウサギβグロビンポリアデニル化配列；ならびに任意選択的に、W P R EまたはH P R Eを含む。

【0130】

具体的な実施形態において、ベクターは、ホーミングエンドヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、I I型クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）関連（C a s 9）ヌクレアーゼ、またはm e g a T A Lヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0131】

当業者は、既存の実施形態から他の多くの異なる実施形態を作り出すことができることを認識するであろう。

10

20

30

40

50

【0132】

数百万の1ミリリットル当たりの形質導入単位（TU/mL）の力価を有する組換えウイルスは、当該技術分野で既知の技術によって作製することができる。超遠心分離後に約 10^8 TU/mL、 10^9 TU/mL、 10^{10} TU/mL、 10^{11} TU/mL、 10^{12} TU/mL、または約 10^{13} TU/mLに濃縮されたストック溶液を得ることができる。

【0133】

ウイルスは、当該技術分野で既知の技術を使用して、インビボ、エクスピボ、またはインビトロで細胞を感染させるために用いられ得る。例えば、細胞、例えば、CD34⁺細胞、樹状細胞、末梢血細胞、または幹細胞が、エクスピボで形質導入される場合、ベクター粒子は、 10^5 細胞当たり $1 \times 10^5 \sim 50 \times 10^5$ のウイルスベクターの形質導入単位にも相当する、一般にほぼ1～50の感染多重度（MOI）の用量を用いて、その細胞とともにインキュベートされてもよい。当然のことながら、これは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、および50 MOIに相当するベクターの量を含む。

【0134】

ウイルスはまた、治療を必要とする細胞、組織、または器官への直接注射によって、インビボで対象に挿入されてもよい。直接注射は、 10^5 細胞当たり $1 \times 10^5 \sim 50 \times 10^5$ のウイルスベクターの形質導入単位にも相当する約1～50の感染多重度（MOI）を必要とする。

【0135】

ウイルスはまた、ウイルス力価（TU/mL）に応じて送達されてもよく、力価は、例えば、p24ウイルスコートタンパク質に対するELISAである市販のp24力価アッセイを使用することによって測定することができる。以下の式を使用してp24のpg/mLを算出することができる：レンチウイルスの物理的粒子（PP）当たり約2000分子のp24が存在する： $(2 \times 10^3) \times (PP \text{ 当たり } 24 \times 10^3 \text{ Da の p24})$ 、 $48 \times 10^6 / \text{アボガドロ} = (48 \times 10^6) / (6 \times 10^{23}) = PP \text{ 当たり } 8 \times 10^{-17} \text{ g の p24}$ 、 $1 \times 10^{-16} \text{ g の p24 当たり約 1 PP}$ 、 $1 \text{ pg の p24 当たり } 1 \times 10^4 \text{ PP}$ 。合理的に良好にパッケージされたVSV-Gシュードタイプ化レンチウイルスベクターは、1000物理的粒子（PP）当たり1TU～100PP当たり1TU（またはそれより少ない）の範囲の感染指数を有する。したがって、範囲は、約10～100 TU/pgのp24である。この変換によってTU/mLが得られる。

【0136】

以前の経験に基づいて、直接注射されるウイルスの量は、合計TUによって決定され、その部位に都合よく注射できる体積、および注射される組織の種類の両方によって異なり得る。例えば、脳の注射部位には、微量のウイルスしか注射できないため、高力価調製物が好ましく、注射当たり約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 、約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ 、約 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 、もしくは約 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ 、またはそれ以上のTUを用いることができる。しかしながら、全身送達は、はるかに高いTUに対応することができ、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、または 1×10^{15} の負荷を送達することができる。

【0137】

F. 改変T細胞受容体

種々の実施形態において、本明細書において企図される組成物は、遺伝子改変TCRをコードするウイルスベクターを保存または安定化するのに有効な量のトレハロースまたはその誘導体を含む。

【0138】

天然に存在するT細胞受容体は、 α -サブユニットおよび β -サブユニットの2つのサブユニットを含み、それらの各々が、各T細胞のゲノムにおける組換え事象によって産生

される特有のタンパク質である。TCRのライブラリーを、特定の標的抗原に対するそれらの選択性についてスクリーニングすることができる。このようにして、標的抗原に対して高い結合活性および反応性を有する天然のTCRを選択し、クローニングし、続いて養子免疫療法のために用いられるT細胞の集団に導入することができる。

【0139】

改変TCRをコードする核酸は、好ましくは、T細胞の（天然に存在する）染色体におけるそれらの天然の状況から単離され、本明細書の他の箇所に記載される適切なベクターに込み込むことができる。核酸、およびそれらを含むベクターは、両方とも有用に細胞に導入することができ、その細胞は好ましくはT細胞である。改変TCRの本質的な実施形態は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）または同様の免疫学的成分によって提示される腫瘍抗原に対して高い結合活性を有することである。改変TCRとは対照的に、CARは、標的抗原にMHC非依存的に結合するように改変される。

10

【0140】

本発明の核酸によってコードされるタンパク質は、TCRの α 鎖または β 鎖のアミノ末端部分またはカルボキシル末端部分に付着した追加のポリペプチドとともに発現させることができるが、但し、付着した追加のポリペプチドが、 α 鎖または β 鎖が機能的なT細胞受容体を形成する能力、およびMHC依存性抗原認識に干渉しないものとする。

【0141】

本明細書において企図される改変TCRによって認識される抗原は、限定されないが、血液癌および固形腫瘍の両方に対する抗原を含む癌抗原を含む。例示的な抗原としては、限定されないが、葉酸受容体 α 、5T4、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRファミリー、例えば、Erbb2（HER2）、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎児AchR、FR α 、GD2、GD3、グリピカン-3（GPC3）、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R $\alpha 2$ 、ラムダ、Lewis-Y、カップ、メソセリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、サバイビン、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1が挙げられる。

20

30

【0142】

G. キメラ抗原受容体

種々の実施形態において、本明細書において企図される組成物は、キメラ抗原受容体（CAR）をコードするウイルスベクターを保存または安定化するのに有効な量のトレハロースまたはその誘導体を含む。CARは、標的抗原（例えば、腫瘍抗原）に対する抗体に基づく特異性と、T細胞受容体活性化細胞内ドメインとを組み合わせ、特異的な抗腫瘍細胞免疫活性を示すキメラタンパク質を産生する分子である。本明細書で使用される場合、「キメラ」という用語は、異なる起源に由来する異なるタンパク質またはDNAの部分からなっていることを説明している。

40

【0143】

本明細書において企図されるベクターは、プロモーターと、CARをコードするポリヌクレオチドとを含む。本明細書において企図されるCARは、特異的な標的抗原に結合する細胞外ドメイン（結合性ドメインまたは抗原特異的結合性ドメインとも称される）、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。CARの抗原結合ドメインと、標的細胞の表面上にあるその標的抗原との結合は、CARのクラスター形成をもたらし、CAR含有細胞に対して活性化刺激を送達する。CARの主な特性は、免疫エフェクター細胞特異性を再誘導し、それによって、増殖、サイトカイン産生、食作用、またはモノクローナル抗体、可溶性リガンド、もしくは細胞特異的共受容体の細胞特異的標的化能力

50

を活用して、標的抗原発現細胞の細胞死を主要組織適合遺伝子複合体（MHC）に非依存的に媒介することができる分子の産生を誘発する能力である。

【0144】

具体的な実施形態において、CARは、限定されないが、抗体またはその抗原結合断片、テザーリガンド、または、葉酸受容体 α 、5T4、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRファミリー、例えば、Erbb2（HER2）、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、胎児Achr、FR α 、GD2、GD3、グリピカン-3（GPC3）、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R $\alpha 2$ 、ラムダ、Lewis-Y、カップ、メソセリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、サバイピン、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1からなる群から選択される標的抗原に特異的に結合する共受容体の細胞外ドメインを含む細胞外結合ドメイン：1つ以上のヒンジドメインまたはスパーサードメイン；膜貫通ドメイン、例えば、限定されないが、T細胞受容体の α 鎖または β 鎖、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、およびPD-1由来の膜貫通ドメイン；1つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、限定されないが、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54（ICAM）、CD83、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD278（ICOS）、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、およびZAP70由来の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3 ζ またはFcR γ 由来の一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0145】

例示的な結合ドメインとして、限定されないが、標的抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。「抗体」は、免疫細胞によって認識されるもの等の抗原決定基を含有する、ペプチド、脂質、多糖類、または核酸等の抗原のエピトープを特異的に認識して結合する少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドである結合剤を指す。抗体は、その抗原結合断片、例えば、Camel Ig、IgNAR、Fab断片、Fab'断片、F(ab)'₂断片、F(ab)'₃断片、Fv、一本鎖Fvタンパク質（「scFv」）、bis-scFv、（scFv）₂、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）、および単一ドメイン抗体（sdAb、ナノボディ）、ならびに抗原結合に参与する全長抗体の一部を含む。この用語はまた、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（二重特異性抗体等）、およびその抗原結合断片等の遺伝子操作された形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995（Pierce Chemical Co.、Rockford, IL）；Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

【0146】

「標的抗原」または「対象とする対象と」は、本明細書において企図されるCARの結合ドメインが結合するように設計された抗原である。具体的な実施形態において、標的抗原は、結合ドメインが特異的に結合するペプチド、脂質、多糖類、または核酸のエピトープである。好ましい実施形態において、抗原は、葉酸受容体 α 、5T4、 $\alpha v \beta 6$ インテ

グリーン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRファミリー、例えば、Erbb2 (HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EPCAM、FAP、胎児AchR、FRα、GD2、GD3、グリピカン-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11Ra、IL-13Ra2、ラムダ、Lewis-Y、カップ、メソセリン、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、サバイビン、TAG72、TEM、VEGFR2、およびWT-1ポリペプチドのエピトープである。

【0147】

特定の好ましい実施形態において、抗体または断片は、腫瘍細胞上の表面タンパク質に特異的に結合するヒト化抗体（ヒト化モノクローナル抗体等）である。「ヒト化」抗体は、ヒトフレームワーク領域を含む免疫グロブリンおよび非ヒト（例えば、マウス、ラット、または合成の）免疫グロブリン由来の1つ以上のCDRである。

【0148】

特定の実施形態において、本明細書において企図されるCARは、種々のドメインの間に、例えば、V_HドメインとV_Lドメインとの間に、適切な空間および分子立体構造のために追加されるリンカー残基を含んでもよい。本明細書において企図されるCARは、1、2、3、4、もしくは5つ、またはそれより多くのリンカーを含んでもよい。具体的な実施形態において、リンカーの長さは、約1～約25アミノ酸、約5～約20アミノ酸、もしくは約10～約20アミノ酸、またはそれらの中間のアミノ酸の長さである。いくつかの実施形態において、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはそれ以上のアミノ酸長である。

【0149】

リンカーの実例として、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（式中、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；および当該技術分野で既知の他の可撓性リンカーが挙げられる。グリシンポリマーおよびグリシン-セリンポリマーは、比較的構造化されていないため、本明細書に記載されるCAR等の融合タンパク質のドメイン間の中性テザーとして機能できる可能性がある。グリシンは、アラニンよりも有意にファイブサイ空間に接近し、より長い側鎖を有する残基よりも制限されない (Schera et al., Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992) を参照のこと)。当業者は、具体的な実施形態におけるCARの設計は、リンカーが、可撓性リンカーだけでなく、所望のCAR構造に提供されるより低い可撓性の構造を付与する1つ以上の部分を含むことができるように、全体的にまたは部分的に可撓性のリンカーを含むことができることを認識するだろう。

【0150】

他の例示的なリンカーとして、限定されないが、以下のアミノ酸配列が挙げられる：GGG；DGGGS（配列番号1）；TGEKP（配列番号2）（例えば、Liu et al., PNAS 5525-5530 (1997) を参照のこと）；GRRR（配列番号3）（Pomerantz et al. 1995、上記を参照）；(GGGS)_n（=1、2、3、4、または5（配列番号4）（Kim et al., PNAS 93, 1156-1160 (1996.)）；EGKSSGSGSESKVD（配列番号5）（Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:1066-1070）；KESGVSSEQLAQFRSLD（配列番号6）（Bird et al., 1988, Science 242:423-

10

20

30

40

50

426)、GGRRGGGS (配列番号7); LRQRDGERP (配列番号8); LRQKDGGSERP (配列番号9); LRQKd (GGGS)₂ERP (配列番号10)。代替として、可撓性リンカーは、DNA結合部位およびペプチド自体の両方をモデル化することが可能なコンピュータプログラム (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993)、PNAS 91:11099-11103 (1994)) を使用して、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。

【0151】

具体的な実施形態において、CARは、可変領域連結配列をさらに含むscFVを含む。「可変領域連結配列」は、重鎖可変領域を軽鎖可変領域に接続するアミノ酸配列であり、結果として得られるポリペプチドが、同じ軽鎖および重鎖可変領域を含む抗体と同じ標的分子に対して特異的な結合親和性を保持するように、2つのサブ結合ドメインの相互作用に適合するスペーサー機能を提供する。一実施形態において、可変領域連結配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはそれ以上のアミノ酸長である。具体的な実施形態において、可変領域連結配列は、グリシン-セリンポリマー (G₁₋₅S₁₋₅)_n を含み、式中、nは、少なくとも1、2、3、4、または5の整数である。別の実施形態において、可変領域連結配列は、(G₄S)₃ アミノ酸リンカーを含む。

【0152】

具体的な実施形態において、CARの結合ドメインの後に1つ以上の「スペーサードメイン」が続くが、これは、適切な細胞間接着、抗原の結合および活性化を可能にするように、抗原結合ドメインをエフェクター細胞表面から離して移動させる領域を指す (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6:412-419)。スペーサードメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。特定の実施形態において、スペーサードメインは、限定されないが、1つ以上の重鎖定常領域、例えば、CH2およびCH3を含む、免疫グロブリンの一部である。スペーサードメインは、天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域または変更された免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含むことができる。

【0153】

一実施形態において、スペーサードメインは、IgG1のCH2およびCH3を含む。

【0154】

CARの結合ドメインの後には、通常、1つ以上の「ヒンジドメイン」が続くが、これは、適切な細胞間接着、抗原の結合および活性化を可能にするように、抗原結合ドメインをエフェクター細胞表面から離して位置付ける際に役割を果たす領域を指す。CARは、通常、結合ドメインと膜貫通ドメイン (TM) との間に1つ以上のヒンジドメインを含む。ヒンジドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。ヒンジドメインは、天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域または変更された免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列を含むことができる。

【0155】

「変更されたヒンジ領域」は、(a) 最大30%のアミノ酸変化 (例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換または欠失) を有する天然に存在するヒンジ領域、(b) 最大30%のアミノ酸変化 (例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換または欠失) を有する少なくとも10アミノ酸長 (例えば、少なくとも12、13、14、または15アミノ酸) の天然に存在するヒンジ領域の一部、または(c) コアヒンジ領域 (4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸長であり得る) を含む天然に存在するヒンジ領域の一部を指す。特定の実施形態において、天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域の1つ以上のシステイン残基が、1つ以上の他のアミノ酸残基 (例えば、1つ以上のセ

リン残基)で置換されてもよい。変更された免疫グロブリンヒンジ領域は、代替としてまたはそれに加えて、別のアミノ酸残基(例えば、セリン残基)によって置換された野生型免疫グロブリンヒンジ領域のプロリン残基を有してもよい。

【0156】

本明細書に記載されるCARにおける使用に適した他の例示的なヒンジドメインは、1型膜タンパク質、例えば、CD8 α 、CD4、CD28、およびCD7の細胞外領域に由来するヒンジ領域を含み、これは、それらの分子からの野生型ヒンジ領域であってもよいが、または変更されてもよい。別の実施形態において、ヒンジドメインは、CD8 α ヒンジ領域を含む。

【0157】

「膜貫通ドメイン」は、細胞外結合部分および細胞内シグナル伝達ドメインを融合し、免疫エフェクター細胞の細胞膜にCARを繫留する、CARの一部である。TMドメインは、天然、合成、半合成、または組換え源のいずれかに由来し得る。TMドメインは、T細胞受容体の α 鎖または β 鎖、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、およびPD-1に由来し得る、すなわち、少なくともそれらの膜貫通領域(複数化)を含み得る。ある具体的な実施形態において、TMドメインは、合成であり、主としてロイシンおよびバリン等の疎水性残基を含む。

【0158】

一実施形態において、本明細書において企図されるCARは、CD8 α に由来するTMドメインを含む。別の実施形態において、本明細書において企図されるCARは、CD8 α に由来するTMドメインと、CARのTMドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する、好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸長の短いオリゴまたはポリペプチドリンカーを含む。グリシン-セリンリンカーは、特に適切なリンカーを提供する。

【0159】

具体的な実施形態において、本明細書において企図されるCARは、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、エフェクター細胞機能、例えば、活性化、サイトカイン産生、増殖、およびCARが結合した標的細胞への細胞傷害性因子の放出を含む細胞傷害活性、または細胞外CARドメインへの抗原結合によって誘発される他の細胞応答を引き起こすために、標的抗原への有効なCAR結合のメッセージを免疫エフェクター細胞の内部に伝達することに関与するCARの部分指す。

【0160】

「エフェクター機能」という用語は、細胞の特殊な機能を指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含む活性の補助であり得る。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、特殊な機能を遂行するように細胞を誘導するタンパク質の一部分を指す。通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができる一方で、多くの場合、ドメイン全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮された部分が使用される程度については、該短縮部分がエフェクター機能シグナルを伝達する限り、ドメイン全体の代わりにそのような短縮部分が使用され得る。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルの伝達に十分な、胞内シグナル伝達ドメインの任意の短縮部分を含むことを意味する。

【0161】

TCR単独によって生成されるシグナルは、T細胞の完全な活性化には不十分であること、および二次または共刺激シグナルも必要であることが分かっている。したがって、T細胞の活性化は、2つの異なるクラスの細胞内シグナル伝達ドメインである、TCR(例えば、TCR/CD3複合体)によって抗原依存性の一次活性化を開始する一次シグナル伝達ドメインと、二次または共刺激シグナルを提供するように抗原非依存性に作用する共

10

20

30

40

50

刺激シグナル伝達ドメインとによって媒介されるということが出来る。好ましい実施形態において、本明細書において企図されるCARは、1つ以上の「共刺激シグナル伝達ドメイン」および「一次シグナル伝達ドメイン」を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0162】

一次シグナル伝達ドメインは、刺激様式または阻害様式のいずれかでTCR複合体の一次活性化を調節する。刺激様式で作用する一次シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含有し得る。

【0163】

具体的な実施形態において具体的に使用される一次シグナル伝達ドメインを含有するITAMの実例として、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものが挙げられる。特定の好ましい実施形態において、CARは、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインおよび1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。細胞内一次シグナル伝達ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインは、膜貫通ドメインのカルボキシル末端に任意の順序でタンデムに連結され得る。

【0164】

本明細書において企図されるCARは、CAR受容体を発現するT細胞の有効性および増殖を高めるために、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。本明細書で 사용되는場合、「共刺激シグナル伝達ドメイン」または「共刺激ドメイン」という用語は、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインを指す。共刺激分子は、抗原に結合したときにTリンパ球の効率的な活性化および機能に必要とされる第2のシグナルを提供する、抗原受容体またはFc受容体以外の細胞表面分子である。そのような共刺激ドメインの実例として、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、およびZAP70から単離されたものが挙げられる。一実施形態において、CARは、CD28、CD137、およびCD134からなる群から選択される1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0165】

別の実施形態において、CARは、CD28およびCD137共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0166】

さらに別の実施形態において、CARは、CD28およびCD134共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0167】

一実施形態において、CARは、CD137およびCD134共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0168】

別の実施形態において、CARは、CD28共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0169】

さらに別の実施形態において、CARは、CD134共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

【0170】

一実施形態において、CARは、CD137共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3 ζ 一次シグナル伝達ドメインとを含む。

G. 使用方法

【0171】

トレハロースおよび本明細書において企図される安定化したウイルスベクターを含む組

10

20

30

40

50

成物は、遺伝子治療を提供するために使用され得る。本明細書で使用される場合、「遺伝子治療」という用語は、細胞のゲノム内への遺伝子の導入を指す。種々の実施形態において、安定なウイルスベクターを含む組成物は、真核細胞内への異種DNA（例えば、治療用導入遺伝子）の導入（および効率的な組み込み）のために使用することができる。すなわち、本明細書において企図される組成物を含有するトレハロース中で安定化した組換えウイルスベクターは、培養中またはインビボでレシピエントを感染させるためのウイルスストックとして使用することができる。分泌タンパク質または造血細胞において発現されるタンパク質の場合、ELISAまたはウェスタンブロット等の感受性アッセイを使用して遺伝子導入効率を評価することができる。

【0172】

10

具体的には、トレハロースで安定化したウイルスベクターを含む組成物は、様々な分裂細胞の種類だけでなく、非分裂細胞の種類も形質転換するために安全に使用することができる。遺伝子治療によって治療可能な疾患の範囲を増大させる。

【0173】

特定の実施形態において、「標的細胞」という用語は、宿主細胞と交換可能に使用され、トランスフェクトされる、感染させられる、または形質導入される、所望の細胞の種類を指す。

【0174】

具体的な実施形態における使用に適した出発細胞集団は、本質的に任意の適切な源に由来してもよく、細胞の種類に関して異種または同種であってもよい。「自家性」は、本明細書で使用される場合、同じ対象からの細胞を指す。「同種異系」は、本明細書で使用される場合、比較される細胞とは遺伝的に異なる同種の細胞を指す。「同系」は、本明細書で使用される場合、比較される細胞と遺伝的に同一である異なる対象の細胞を指す。「異種間」は、本明細書で使用される場合、比較される細胞と異なる種の細胞を指す。好ましい実施形態において、細胞は、同種異系または自家性である。適切な細胞は、胎児細胞および成人細胞を含む。さらに、適切な細胞は、哺乳動物起源であってもよく、例えば、げっ歯類、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシ、または霊長類に由来してもよい。一実施形態において、細胞は、ヒト細胞である。

20

【0175】

例示的な宿主細胞または標的細胞として、限定されないが、幹細胞、前駆細胞、および分化細胞が挙げられる。他の適切な細胞として、限定されないが、幹細胞、前駆細胞、および分化細胞が挙げられる。特定の実施形態において、形質導入される細胞は、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、骨髄幹細胞、臍帯幹細胞、胎盤幹細胞、間葉幹細胞、神経幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、膵臓内胚葉、心臓幹細胞、腎幹細胞、および造血幹細胞である。

30

【0176】

他の例示的な宿主細胞または標的細胞として、限定されないが、膵島細胞、CNS細胞、PNS細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、造血細胞、骨細胞、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、肺細胞、軟骨細胞、皮膚細胞、瀰胞細胞、血管細胞、上皮細胞、免疫細胞、内皮細胞等からなる群から選択される、異種または同種集団が挙げられる。

【0177】

具体的な実施形態において、細胞は、造血細胞であり、例えば、限定されないが、造血幹細胞、CD34発現細胞、造血前駆細胞、骨髄系細胞、リンパ球系細胞、BおよびTリンパ球等である。

40

【0178】

本明細書において企図されるウイルスベクターは、異常ヘモグロビン症の治療を含む遺伝子治療に使用することができる。具体的な実施形態において、例えば、赤血球特異的疾患を治療するために、上記ベクターを使用して赤血球における安定した高レベルの遺伝子発現を達成するための方法が提供される。具体的な実施形態において、遺伝子治療ベクターは、例えば、鎌状赤血球症（SCD）を含む異常ヘモグロビン症を治療するために使用される。別の好ましい実施形態において、遺伝子治療ベクターは、限定されないが、βサ

50

ラセミアを含むサラセミアを処置するために使用される。

【0179】

別の実施形態において、副腎白質ジストロフィーおよび／または副腎脊髄神経障害の治療のために、A B C D 1 遺伝子を含む本明細書において企図されるベクターを造血幹細胞に形質導入する。

【0180】

他の実施形態において、本明細書において企図されるウイルスベクターは、限定されないが、ウィルムス腫瘍、ユーイング肉腫、神経内分泌腫瘍、膠芽腫、神経芽細胞腫、メラノーマ、皮膚癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、前立腺癌、肝臓癌、腎癌、膵癌、肺癌、胆管癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、甲状腺髄様癌、卵巣癌、神経膠腫、リンパ腫、白血病、骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、および膀胱癌を含む癌の治療にも有用である。

10

【0181】

種々の実施形態において、安定なウイルスベクターを含む水性組成物は、インビボの遺伝子治療を必要とする細胞、組織、または器官への直接注射、例えば、遺伝子改変H S Cの骨内投与によって投与される。種々の他の実施形態において、細胞は、安定なウイルスベクターを含む組成物でインビトロまたはエクスピボで形質導入され、任意選択的に、エクスピボで増殖させられる。形質導入された細胞は、次いで、遺伝子治療を必要とする対象に投与される。

20

【0182】

さらに、安定なウイルスベクターを含む水性組成物は、対象とするD N Aまたは遺伝子を、ヒト細胞等の哺乳動物細胞に導入するためにも使用することができ、細胞はその後、体の局所的な領域に投与される（例えば、体の局所的な領域にタンパク質を送達するための自己白血球のエクスピボ感染、例えば、米国特許第5, 399, 346号を参照のこと）。

【0183】

本明細書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、個々の刊行物、特許出願、または発行された特許が、あたかも具体的にかつ個別に参照によって組み込まれることが示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0184】

上記の実施形態は、理解を明確にする目的で、例示および実施例によってある程度詳細に記載されてきたが、本明細書において企図される教示に照らして、当業者は、添付の特許請求の範囲の主旨または範囲から逸脱することなく、特定の変更および修正が行われ得ることを容易に理解するであろう。以下の実施例は、例として提供されるに過ぎず、制限のために提供されるものではない。当業者は、本質的に同様の結果を得るために変更または修正され得る重要性の低い様々なパラメータを容易に認識するであろう。

【実施例】

【0185】

以下の実施例は、トレハロースおよびその誘導体がウイルスベクターに適した保存剤であることを示す。特定濃度のトレハロースまたはトレハロースの誘導体を含有する溶液中に保存されたウイルスベクターは、トレハロースまたはトレハロースの誘導体に保存されなかったウイルスベクターと比較して、広範囲の温度で複数の凍結融解サイクルを通して感染力価を維持する。

40

実施例1

材料および方法

材料および設備

- ・ヒト骨肉腫（H O S）細胞（A T C C、カタログ番号C R L-1543）
- ・D M E M 高グルコース（G I B C O、カタログ番号11995）
- ・熱失活F B S（G I B C O、カタログ番号26140-079）

50

- ・ G l u t a m a x (G I B C O、カタログ番号 3 5 0 5 0)
- ・ 6 ウェル細胞培養プレート
- ・ ポリスチレン製丸底試験管 (5 m L、1 2 m m × 7 5 m m) (B e c t o n D i c k i n s o n、カタログ番号 3 5 2 0 0 5)
- ・ フローサイトメトリー用ハンクス平衡塩溶液。2 0 m L の 1 0 倍ハンクス平衡塩溶液を 4 m L の F B S および 1 7 6 m L の蒸留水と混合する。この溶液は、4 °C で少なくとも 2 か月保存することができる。
- ・ 組織培養フード
- ・ 組織培養インキュベーター
- ・ F A C S 機

10

【0186】

方法

形質導入の1日前に、6ウェルプレートにウェル当たり 5×10^4 細胞の密度で H O S 細胞をプレーティングした。

【0187】

播種から 2 4 時間後、ヘマサイトメータを使用してウェルのうち 2 つの細胞数をカウントした。他のウェルの培地を除去し、8 m g / m L のポリブレンを含有する 0. 5 m L の新しい培地と交換した。細胞培養培地で 1 0 0 倍に希釈した濃縮ベクターストックの 0. 5、5、および 5 0 m L アリコートを加えることによって細胞に形質導入した（すなわち、1 μ L の濃縮ベクターストックをウェル当たり 9 9 μ L の培地とそれぞれ混合した）。希釈したベクター懸濁液の 0. 5、5、および 5 0 m L アリコートをウェル当たりそれぞれ加えることによって H O S 細胞に形質導入した。

20

【0188】

形質導入の開始から 2 0 時間後、培地を 2 m L の新しい培地と交換し、細胞をインキュベートし続けた。

【0189】

2 日後、培地を除去し、1 m L の P B S で細胞を洗浄した。ウェル当たり 0. 5 m L のトリプシン-E D T A を加え、3 7 °C で 2 分間インキュベートした。

【0190】

1 m L の培地を各ウェルに加え、内容物を混合した。各ウェルからの細胞懸濁液を 5 m L 丸底試験管に移し、1, 5 0 0 r p m (5 0 0 g) で 5 分間 2 0 °C で遠心分離して細胞をペレット化した。

30

【0191】

吸引により培地を除去し、2 m L のハンクス平衡塩溶液に細胞ペレットを再懸濁し、1, 5 0 0 r p m (5 0 0 g) で 5 分間 2 0 °C で遠心分離して細胞をペレット化した。

【0192】

吸引によりハンクス平衡塩溶液を除去し、3 0 0 m L のハンクス平衡塩溶液に細胞ペレットを再懸濁した。

【0193】

次いで、F A C S により細胞を分析した。

40

【0194】

以下の式に従って力価（形質導入単位 (T U) / m L) を算出した： $T U / m L = (F \times N \times D \times 1, 0 0 0) / V$ 、式中、F = 蛍光細胞の割合 (E G F P)、N = 形質導入時の細胞数（ウェル当たり約 $1 E + 0 5$ H O S 細胞に相当する）、D = 形質導入に使用したベクター試料の希釈倍数、および V = 形質導入のために各ウェルに加えた希釈ベクター試料の体積 (m L)。異なる量のベクターを用いて形質導入した H O S 細胞から得られたベクター力価を合計し、平均力価を算出した。正確な力価決定のために、使用されるベクターの量は、E G F P 陽性細胞の割合と加えられるベクターの量との間に線形関係が存在する範囲内に属するべきである。蛍光細胞の割合が 4 0 % を超過した場合、さらなるベクター希釈液を使用して滴定を繰り返す。

50

【0195】

実施例 2

トレハロース中に保存されたウイルスベクターの長期安定性

レンチウイルスベクターを生成し、標準的な方法を用いて精製した。最終ベクター生成物をサイズ排除クロマトグラフィーにより生成し、リン酸緩衝食塩水 pH 7.4 (PBS) 中に未希釈で保存するか、または 5% トレハロース / PBS (Sigma-Aldrich カタログ番号 90210) 中に希釈して保存した。

【0196】

4℃で24時間保存した、および−80℃で24時間保存して1度融解した後の、未希釈のレンチウイルスベクター組成物中で調べたレンチウイルスベクターの力価に融解が与える影響を調べた。図1は、4℃で保存した未希釈のレンチウイルスベクターと比較して、−80℃で保存した未希釈のレンチウイルスベクター組成物において平均力価 (TU/mL) が減少したことを示す。

10

【0197】

次に、PBS中に未希釈で保存した、または5%トレハロース / PBS中に希釈して保存したレンチウイルスベクターの長期安定性を、長期保存期間の間に種々の温度にわたって調べた。4、14、28、42、および73日間、4℃で保存した、ならびに−20℃および−80℃で保存して1度融解した後のレンチウイルスベクターについて力価を測定した。図2は、5%トレハロースに配合されたレンチウイルスベクターが、少なくとも73日間、試験温度にわたって安定なレンチウイルス力価を示すことを示している。

20

【0198】

実施例 3

トレハロース中におけるウイルスベクターの安定化

赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現するレンチウイルスベクターを生成し、標準的な方法を用いて精製した。最終ベクター生成物をサイズ排除クロマトグラフィーにより生成し、PBS中に未希釈で保存するか、または約7.5%トレハロース / PBS、約15%トレハロース / PBS、約18.75%トレハロース / PBS、および約22.7%トレハロース / PBS中に希釈して保存した。

【0199】

レンチウイルスベクターの発現 (RFP発現) を、種々の濃度のトレハロースに配合された 1×10^8 TU/mL で形質導入した細胞中でフローサイトメトリーにより調べた。図3は、トレハロース / PBS中に、4℃で24時間保存した場合、および−80℃で24時間保存して1度融解した後、PBS中に未希釈で保存したレンチウイルスベクターを含有する細胞と比較して、レンチウイルスベクターを含有するより多くの割合の細胞が RFP を発現したことを示す。RFP を発現する細胞の最も高い割合は、細胞を約15%トレハロース / PBS中に保存したときに見られ、4℃および−80℃の両方で RFP を発現する細胞が約98%~約99%に達した。

30

【0200】

4℃で保存した場合と比較して、より低い温度である−80℃で保存した場合に、どの保存条件がレンチウイルスベクターに最も保護を提供したかを決定するために、これらの同じ細胞試料の平均力価 (TU/mL) における変化を調べた。図4に見られるように、PBS中に未希釈で保存したレンチウイルスベクターを含有する細胞が大きな負の Δ TU/mL 値を有していたことから、レンチウイルスベクターは、一旦、−80℃で24時間保存し、その後融解した場合、4℃での保存と比較して安定性を保持しなかったことが示唆される。フローサイトメトリーのデータと一致して、約15%のトレハロース / PBS中に保存したレンチウイルスベクターを含有する細胞が最大の正の Δ TU/mL 値を示したことから、−80℃で24時間保存し、その後融解した場合、4℃での保存と比較して、レンチウイルスベクターの平均力価が実際に増加したことが示される。

40

【0201】

レンチウイルスベクターの力価を保存組成物のトレハロース濃度 (重量%) に対してプ

50

ロットした場合（図5）、4℃および−80℃の両方で最も低い希釈率でレンチウイルスベクターの最も高い保存率をもたらしたトレハロースの割合は、約15%であり、この場合も同様に、フローサイトメトリー実験および4℃〜−80℃で保存した $\Delta TU/mL$ 値の算出においてベクターについて得られた結果と一致していた。

【0202】

実施例4

少量のトレハロース中におけるウイルスベクターの安定化

緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するレンチウイルスベクターを生成し、標準的な方法を用いて精製した。最終ベクター生成物をサイズ排除クロマトグラフィーにより生成し、PBS中に未希釈で保存するか、dPBS中に50%希釈して保存するか、または約5.67%トレハロース/PBS、約6.615%トレハロース/PBS、および約7.56%トレハロース/PBS中に希釈して保存した。

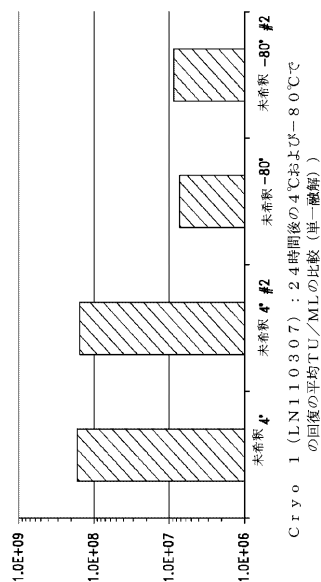
【0203】

種々の濃度のトレハロース/PBS中に−80℃で保存した試料について、レンチウイルスベクターの力価を調べた。dPBSの未希釈の濃縮生成物も1:2で希釈した濃縮生成物も、試験したより低いトレハロース濃度でのトレハロースの保存効果は線形であった（図6）。このことは、トレハロースが、たとえ少量であっても、線形の保存効果を示す可能性を示唆するものである。

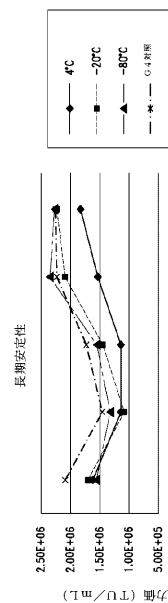
【0204】

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、請求項を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制限すると解釈されるべきではなく、そのような請求項が権利を有する均等物の全範囲とともに全ての可能な実施形態を含むと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって制限されない。

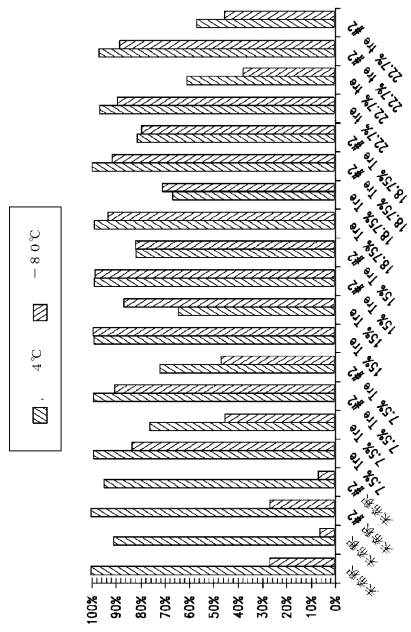
【図1】



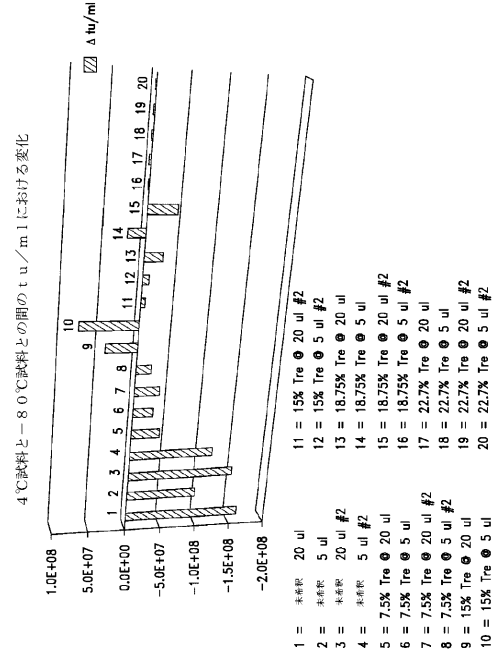
【図2】



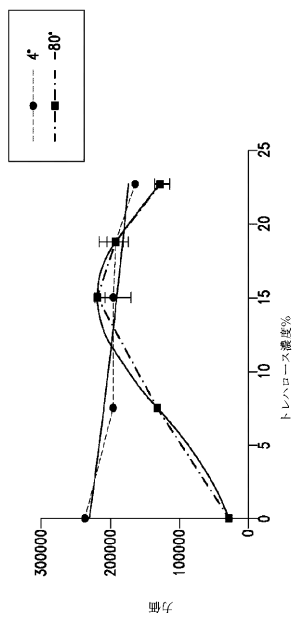
【図 3】



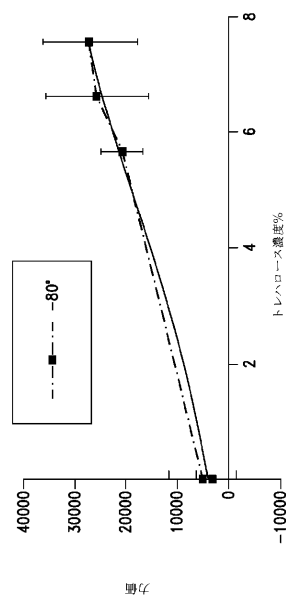
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

20185101600000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/23271

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/12, A61K 39/21 (2016.01) CPC - C07K 14/005 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/12, A61K 39/21 (2016.01) CPC - C07K 14/005 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/199.1, 424/204.1, 424/207.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) pubWEST; PatBase; Google Scholar search terms - Trehalose, sugar, virus, viral, vector, lentivir, retrovir, stabil, stabilize, stability, hanks, pbs, beta, globin, ABCD, ABCD1, atp, zinc, finger, talen, crispr, cas9, zinc finger nuclease, homing endonuclease, transcription activator-like effector nuclease, extracell\$,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/140645 A1 (ARECOR LTD) 18 September 2014 (18.09.2014) abstract; p. 2, ln 24-28; p. 3, ln 5; p. 10, ln 33 - p. 11, ln 13; p. 14, ln 24; p. 17, ln 7-8.	1, 2, 31-54
Y		3-23, 28-30
Y	US 2012/0135034 A1 (DROPULIC) 31 May 2012 (31.05.2012) para [0005]; [0008]; [0013], [0015]; [0043]; [0048].	3-9
Y	US 2015/0051266 A1 (The USA, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services) 19 February 2015 (19.02.2015) para [0030]-[0034]; [0047]; [0085]; [0092]; [0094].	10-23
Y	US 2012/0149060 A1 (BERGER) 14 June 2012 (14.06.2012) abstract.	28
Y	US 2008/0102523 A1 (KIM et al.) 01 May 2008 (01.05.2008) abstract, para [0035].	29
Y	US 2013/0004471 A1 (DENARO et al.) 03 January 2013 (03.01.2013) abstract and claim 21.	30
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 05 July 2016		Date of mailing of the international search report 11 AUG 2016
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 16/23271

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

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

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/23271

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.: 24-27, 55-78, 80-87
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-23 and 28-54, directed to an aqueous composition.

Group II, claim 79, directed to a method of treating a disease in a subject in need of treatment.

Group III, claim 88-93, directed to a method for stabilizing viral vectors.

The inventions listed as Groups I, II and III do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

--continued on first extra sheet attached hereto--

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.:
1-23, 28-54

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/23271

--continuation of Box No III--

Special technical features

Group I has the special technical feature of an aqueous composition comprising a viral vector, a specific amount of trehalose, and a pharmaceutically acceptable diluent, that is not required by Groups II or III.

Group II has the special technical feature of a method of treating a disease comprising administering to a subject a population of cells, that is not required by Groups I or III.

Group III has the special technical feature of a method for stabilizing viral vectors, that is not required by Groups I or II.

Common technical features:

Groups I-III share the common technical feature of a composition comprising a viral vector and trehalose. Groups I and II share the composition of claim 1.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is anticipated by WO 2014/140645 A1 to ARECOR LTD, (hereinafter *Arecor*).

Arecor teaches an aqueous composition (p. 14, in 25) comprising:

(a) a viral vector (p. 3, in 5 'the formulation comprises an adenovirus vector');

(b) about 3% to about 15% trehalose or derivatives thereof by weight (p. 2, in 24-28 'the formulation further comprises a tonicity modifier selected from the group consisting of 1,2-propanediol, glycerol, mannitol, sorbitol, sucrose, lactose, maltose, and trehalose. Preferably, the tonicity modifier is sucrose. In some embodiments, the tonicity modifier is at a concentration sufficient to provide osmolality between about 100 mOsm/l and about 1000 mOsm/l, preferably between about 200 mOsm/l and about 500 mOsm/l'); and

(c) a pharmaceutically acceptable diluent (p. 10, in 33-37 'the formulation is a pharmaceutical formulation. For example, the adenovirus vectors can be combined with one or more pharmaceutically acceptable carriers for an injectable pharmaceutical formulation...Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13.

NOTE, continuation of number 4 above: claims 24-27, 55-78, 80-87 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

NOTE, Claims 89-93 depending from claim 81, as drafted, are objected to, because claim 81 lacks antecedent method for stabilizing viral vectors required in claims 89-93. For this International Search and Opinion, claims 89-93 is reconstructed as dependent claims of claim 88.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K	35/28
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17 Z
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A

(81)指定国 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 カトナー, ロバート エイチ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ハーズストーン サークル 3

(72)発明者 ゴーマン, ウェスリー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02141, ケンブリッジ, ゴア ストリート 170, アpartment ナンバー 502

(72)発明者 ピアーシー, フランシス ジェイ. ジュニア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02127, ボストン, ウェスト 7ティールエイチ ストリート 95, アpartment ナンバー 4

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AA95Y AA97Y AB01 BA02 CA44

4C076 AA12 BB11 CC07 DD23 DD26Z DD67Q FF63

4C084 AA13 MA66 NA03 ZB091 ZB092

4C087 AA01 AA02 BB37 BB44 BB65 BC83 CA12 NA03 ZB09