

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6643311号
(P6643311)

(45) 発行日 令和2年2月12日(2020.2.12)

(24) 登録日 令和2年1月8日(2020.1.8)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/245

請求項の数 16 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-502253 (P2017-502253)	(73) 特許権者 514194370 オスベダーレ サン ラファエレ エス. アール. エル イタリア国 20132 ミラノ, ヴィア オルゲッティナ 60
(86) (22) 出願日 平成27年7月13日 (2015.7.13)	(73) 特許権者 511262290 フォンダツィオーネ テレトン イタリア国 00185 ローマ, ヴィア ヴァレーゼ 16/ビ
(65) 公表番号 特表2017-525344 (P2017-525344A)	(74) 代理人 100114188 弁理士 小野 誠
(43) 公表日 平成29年9月7日 (2017.9.7)	(74) 代理人 100119253 弁理士 金山 賢教
(86) 国際出願番号 PCT/IB2015/055286	(74) 代理人 100124855 弁理士 坪倉 道明
(87) 国際公開番号 W02016/009326	
(87) 国際公開日 平成28年1月21日 (2016.1.21)	
審査請求日 平成30年6月29日 (2018.6.29)	
(31) 優先権主張番号 1412494.5	
(32) 優先日 平成26年7月14日 (2014.7.14)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ベクター生産

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞表面上の M H C - I の発現を減少させるように、2 - ミクログロブリンをコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊を含み、1 以上のウイルス粒子構造タンパク質をコードする1 以上の核酸配列を含む、エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞。

【請求項 2】

ウイルスカプシドタンパク質及び/又はウイルスエンベロープタンパク質をコードする1 以上の核酸配列を含む、請求項 1 のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞。

【請求項 3】

ウイルス粒子がレトロウイルス粒子であり、細胞が G a g、P o l 及び E n v からなる群から選択される1 以上のタンパク質をコードする1 以上の核酸配列を含む、請求項 1 または 2 のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞。

【請求項 4】

H E K - 2 9 3 細胞またはその派生体である、請求項 1 ~ 3 のいずれかのエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞。

【請求項 5】

H E K - 2 9 3 T 細胞または H E K - 2 9 3 T - R E x 細胞である、請求項 4 のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞。

【請求項 6】

エンベロープウイルス粒子が、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルスもしくはワクシニアウイルス、ヘパドナウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、アレナウイルス、コロナウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、ブニヤウイルス、ボルナウイルス、ラウドウイルス、フィロウイルスである、またはそれらに由来する、請求項 1、2、4 又は 5 のいずれかのエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞。

【請求項 7】

エンベロープウイルス粒子が、レトロウイルスまたは単純ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルスに由来する、請求項 1、2、4、5 又は 6 のいずれかのエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞。

10

【請求項 8】

エンベロープウイルス粒子がレンチウイルスに由来する、請求項 1 ~ 6 のいずれかのエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞。

【請求項 9】

エンベロープウイルス粒子の生産のための、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞の使用。

【請求項 10】

エンベロープウイルス粒子が表面に露出した MHC - I 分子を実質的に欠く、請求項 9 の使用。

20

【請求項 11】

a) 請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞を準備するステップ; および

b) エンベロープウイルス粒子の生産に適した条件下で細胞を培養するステップを含む、エンベロープウイルス粒子を生産する方法。

【請求項 12】

表面に露出した MHC - I 分子を実質的に欠いた、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ヘパドナウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、アレナウイルス、コロナウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、ブニヤウイルス、ボルナウイルス、ラウドウイルスまたはフィロウイルスに由来するエンベロープウイルス粒子。

30

【請求項 13】

請求項 12 のエンベロープウイルス粒子が形質導入された細胞。

【請求項 14】

請求項 12 のエンベロープウイルス粒子または請求項 13 の細胞、および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 12 のエンベロープウイルス粒子をエキスピボで細胞と接触させることを含む、細胞に形質導入する方法。

【請求項 16】

請求項 12 のエンベロープウイルス粒子を含む、ワクチン。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、表面に露出した抗原のレベル減少を示す細胞に関する。より詳細には、本発明は、細胞表面上の主要組織適合複合体クラス I (MHC - I) の発現を減少させるための細胞の遺伝子操作に関する。とりわけ、本発明は、エンベロープウイルス粒子の生産におけるかかる細胞の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

50

遺伝子治療は、疾患を処置または予防するため、細胞内への遺伝材料の取り込みを伴う。遺伝材料は、欠損遺伝子をそれらの遺伝子の機能的コピーで補い、不適切に機能する遺伝子を不活性化し、または新たな治療的遺伝子を細胞に導入し得る。

【0003】

細胞への遺伝材料の送達は、核酸の移行を容易にするベクターの使用を通じて達成され得る。ウイルスは、目的ヌクレオチド(NOI)を標的細胞に送達するように操作されるものであり、遺伝子治療においてベクターとして通例的に使用される。今までに遺伝子治療において用いられたウイルスとしては、レトロウイルス、アデノウイルス(AdV)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)およびワクシニアウイルスが挙げられる。

10

【0004】

レトロウイルス、例えば - レトロウイルス、 - レトロウイルス、レンチウイルスおよびスプーマウイルスは、標的細胞内への修正的遺伝材料の安定的な組み込みを可能にすることから、遺伝子治療のためにとりわけ有用である。アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全症(Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency, ADA-SCID; Aiuti, A. et al. (2009) N. Engl. J. Med. 360:447-58)、X連鎖重症複合免疫不全症(SCID-X1; Hacein-Bey-Abina, S. et al. (2010) N. Engl. J. Med. 363:355-64)およびウィスコット・アルドリッチ症候群(WAS; Boztug, K. et al. (2010) N. Engl. J. Med. 363:1918-27)に対する - レトロウイルス由来ベクターに基づいた臨床試験において、治療的利点は既に達成されている。加えて、レンチウイルスベクターは、X連鎖副腎白質ジストロフィー(ALD; Cartier, N. et al. (2009) Science 326:818-23)の処置において、ならびにごく最近では異染性白質ジストロフィー(MLD; Biffi, A. et al. (2013) Science 341:1233-158)およびWAS(Aiuti, A. et al. (2013) Science 341:1233-151)のための処置において送達媒体として使用されている。前臨床研究において、レンチウイルスベクターはまた、マウスおよびイヌの疾患モデルにおける血友病の肝臓指向性遺伝子治療のために静脈内投与されている(Cantore A. et al., Blood 2012; Matsui H. et al., Mol Ther 2011; Cantore A. et al. Science Translational Medicine 2015 7:277ra28)。

20

30

【0005】

しかしながら、遺伝子治療におけるウイルスベクターの使用に関連した重大な問題は、標的生物の免疫系によるそれらの認識である。エンベロープウイルスベクター粒子(例としてレトロウイルスベクター粒子)の場合、ウイルスのエンベロープ表面上に提示された膜結合タンパク質は認識され得るものであって、ウイルス粒子自体が中和され得る。さらに、標的細胞に感染すると、ウイルスのエンベロープは細胞膜と融合するようになり、結果としてウイルスのエンベロープタンパク質は細胞表面上に提示されるようになり得るか、または細胞表面と密接して留まり得る。したがって、免疫系もまたウイルスベクター粒子が感染した細胞を標的とし得る。両効果は、ウイルスベクターにより送達される NOI の有効性の低減をもたらし得る。

40

【0006】

ウイルス粒子エンベロープは、典型的に、プロデューサー細胞の膜において生じる。したがって、ウイルス粒子が出芽する細胞膜上に発現している膜タンパク質は、ウイルスエンベロープ内に取り込まれ得る。主要組織適合複合体クラス I(MHC - I)は、1つのかかる細胞膜タンパク質であって、これは天然において高度に多型であるため、さらには、生体の免疫応答の主要な標的である(McDevitt H.O. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18:1-17)。

50

【0007】

レトロウイルスベクター生産細胞の細胞膜上に露出したMHC-I分子は、ベクター出芽のプロセスの間にウイルス粒子エンベロープ内に取り込まれる。プロデューサー細胞に由来しウイルス粒子内に取り込まれたこれらのMHC-I分子は、次に形質導入細胞の細胞膜に移行されることができる。あるいは、MHC-I分子は、標的細胞膜に吸着して結合したまま留まるウイルス粒子の傾向の結果として、形質導入細胞の膜と密接して留まり得る。

【0008】

形質導入細胞の細胞膜上の、またはこれに近接した外因性MHC-I分子の存在は、ヒトおよび実験動物モデルにおいてアロ反応性の免疫応答を誘導し得る。このことは、エクスピボ遺伝子移行およびその後の対象への形質導入細胞の投与の際に、またはウイルス粒子の直接的なインピボ投与の際に、免疫を介した形質導入細胞の殺傷またはファゴサイトーシスをもたらし得る。さらに、MHC-Iを保持したウイルス粒子の血流へのインピボ投与の場合、ウイルス粒子は、それらの標的細胞に到達する前に、予め存在するMHC-I特異的抗体により中和され得る。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】 Aiuti, A. et al. (2009) N. Engl. J. Med. 360: 447-58

【非特許文献2】 Hacein-Bey-Abina, S. et al. (2010) N. Engl. J. Med. 363: 355-64

【非特許文献3】 Boztug, K. et al. (2010) N. Engl. J. Med. 363: 1918-27

【非特許文献4】 Cartier, N. et al. (2009) Science 326: 818-23

【非特許文献5】 Biffi, A. et al. (2013) Science 341: 1233-158

【非特許文献6】 Aiuti, A. et al. (2013) Science 341: 1233-151

【非特許文献7】 Cantore A. et al., Blood 2012

【非特許文献8】 Matsui H. et al., Mol Ther 2011

【非特許文献9】 Cantore A. et al. Science Translational Medicine 2015 7: 277ra28

【非特許文献10】 McDevitt H.O. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18: 1-17

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、表面に露出したMHC-I分子を実質的に欠いたエンベロープウイルス粒子(例としてレトロウイルスベクター粒子)の生産のために用いられ得る遺伝子操作された細胞を作成した。驚くべきことに、本発明者らは、表面に露出したMHC-I分子の欠如はエンベロープウイルス粒子を生産するこれらの細胞の能力に著しく影響しないことを示した。とりわけ、本発明者らは、意外なことに、エンベロープウイルス粒子は表面に露出したMHC-Iを提示するプロデューサー細胞と比べて同等の力価および収率で生産され、感染力の衰えを呈さないことを示した。これらの細胞を使用して生産されたエンベロープウイルス粒子は、遺伝子治療の際に望まれない免疫応答をほとんど誘導せず、より優れた有効性および安全性を提供する。

【0011】

1の態様において、本発明は、細胞表面上のMHC-Iの発現を減少させるように遺伝

10

20

30

40

50

子操作された、エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞を提供する。

【0012】

別の態様において、本発明は、細胞表面上のMHC-Iの発現を減少させるように遺伝子操作された、エンベロープウイルス粒子パッケージング細胞を提供する。

【0013】

1の実施形態において、エンベロープウイルス粒子パッケージング細胞またはプロデューサー細胞は、2-ミクログロブリン(2M)をコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊を含む。別の実施形態において、細胞は、MHC-I鎖をコードする1または複数の遺伝子の遺伝子工学的破壊を含む。細胞は、2-ミクログロブリンをコードする遺伝子の全てのコピーにおける遺伝子工学的破壊を含み得る。細胞は、MHC-I鎖をコードする遺伝子の全てのコピーにおける遺伝子工学的破壊を含み得る。細胞は、2-ミクログロブリンをコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊およびMHC-I鎖をコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊の両方を含み得る。

10

【0014】

細胞表面上のMHC-Iの発現は、細胞が表面に露出したMHC-I分子を実質的に欠くように減少され得る。

【0015】

用語ウイルス粒子「プロデューサー細胞」は、ウイルス粒子を生産するために必要な全ての要素の一過性トランスフェクション、安定的トランスフェクションもしくはベクター形質導入の後にウイルス粒子を生産する細胞、またはウイルス粒子を生産するために必要な要素を安定的に含むように操作された任意の細胞を包含する。

20

【0016】

用語「パッケージング細胞」は、感染性の組換えウイルスをパッケージングするために必要な要素のうちいくつかまたは全てを含有する細胞を包含する。パッケージング細胞は、組換えウイルスベクターを欠いたものであり得る。典型的に、かかるパッケージング細胞は、ウイルスの構造タンパク質を発現する能力がある1または複数のベクターを含有する。エンベロープウイルス粒子の生産のために必要とされる要素のうちいくつかのみを含む細胞は、その後続く各々の付加的な必要とされる要素の一過性トランスフェクション、形質導入または安定的組み込みのステップを通じたウイルス粒子プロデューサー細胞株の作成における中間体試薬として有用である。これらの中間体試薬は、用語「パッケージング細胞」に包含される。エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞株またはパッケージング細胞株の作成のためにその後続いて用いられることになる、細胞表面上のMHC-Iの発現が減少した親細胞もまた本発明に包含される。

30

【0017】

本明細書中で言及されるウイルス粒子は、複製能のあるウイルスまたは複製欠損性のウイルス、それらに由来するウイルスベクターを包含するものであって、これらは目的ヌクレオチド(nucleotide or interest)を含んでも含まなくてもよい。

【0018】

1の実施形態において、エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞は、HEK-293細胞に由来する。

40

【0019】

1の実施形態において、エンベロープウイルスベクター粒子は、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ヘパドナウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、アレナウイルス、コロナウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、ブニヤウイルス、ボルナウイルス、ラブドウイルスまたはフィロウイルスに由来する。

【0020】

1の実施形態において、エンベロープウイルスベクター粒子は、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルスに由来する。

【0021】

50

1の実施形態において、エンベロープウイルス粒子は、HIVに由来する。

【0022】

別の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞の集団を提供する。

【0023】

1の実施形態において、集団中の細胞の少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%が、本発明によって遺伝子操作されている。

【0024】

別の態様において、本発明は、エンベロープウイルス粒子の生産のための、本発明のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞の使用を提供する。好ましくは、エンベロープウイルス粒子は、表面に露出したMHC-I分子を実質的に欠く。

10

【0025】

別の態様において、本発明は、

a) 本発明によるエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞を準備するステップ；および

b) エンベロープウイルスベクター粒子の生産に適した条件下で細胞を培養するステップ

を含む、エンベロープウイルス粒子を生産する方法を提供する。

20

【0026】

別の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子生産方法により生産されるエンベロープウイルス粒子を提供する。

【0027】

別の態様において、本発明は、含まれる表面に露出したMHC-I分子の数が減少したエンベロープウイルス粒子を提供する。表面に露出したMHC-I分子の数は、MHC-Iへの免疫応答が治療的に適切な程度まで減少するように、減少され得る。

【0028】

好ましくは、エンベロープウイルスベクター粒子は、表面に露出したMHC-I分子を実質的に欠く。

30

【0029】

本発明のエンベロープウイルス粒子は、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ヘパドナウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、アレナウイルス、コロナウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、プニヤウイルス、ボルナウイルス、ラブドウイルスまたはフィロウイルスに由来するものであり得る。

【0030】

エンベロープウイルスベクター粒子は、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルスに由来するものであり得る。

【0031】

エンベロープウイルスベクター粒子は、HIVに由来するものであり得る。

40

【0032】

好ましくは、本発明のエンベロープウイルス粒子は、タンパク質移行のために用いられる(Bobis-Wozowicz S. et al., Sci Rep. 2014; Voelkel C. et al., Proc Natl Acad Sci US A. 2010; Maetzig T. et al., Curr Gene Ther. 2012)。

【0033】

好ましくは、エンベロープウイルス粒子は、目的ヌクレオチド(NOI)を含む。好ましくは、エンベロープウイルス粒子は、弱毒化ウイルス、例えば複製欠損性ウイルスである。

50

【 0 0 3 4 】

別の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子の集団を提供する。

【 0 0 3 5 】

1の実施形態において、集団中の粒子の少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%が、本発明のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞から生じる。1の実施形態において、集団中の粒子の100%が、本発明のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞から生じる。1の実施形態において、集団中の粒子は、表面に露出したMHC-Iを実質的に含まない。

【 0 0 3 6 】

別の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子が形質導入された細胞を提供する。細胞は、哺乳動物細胞、例えば霊長類細胞またはヒト細胞であり得る。

【 0 0 3 7 】

別の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子または本発明の形質導入細胞、および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 3 8 】

別の態様において、本発明は、治療における使用のための本発明のエンベロープウイルス粒子を提供する。本発明のエンベロープウイルス粒子は、遺伝子治療において用いられ得る。

【 0 0 3 9 】

別の態様において、本発明は、治療における使用のための本発明の形質導入細胞を提供する。本発明の形質導入細胞は、遺伝子治療において用いられ得る。

【 0 0 4 0 】

別の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子を細胞に形質導入することを含む、遺伝子治療の方法を提供する。

【 0 0 4 1 】

1の実施形態において、形質導入はエクスピボで実施される。

【 0 0 4 2 】

別の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子または本発明の形質導入細胞をその必要がある対象に投与することを含む、遺伝子治療の方法を提供する。

【 0 0 4 3 】

別の態様において、本発明は、ワクチンとしての使用のための本発明のエンベロープウイルス粒子を提供する。

【 0 0 4 4 】

別の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子をその必要がある対象に投与することを含む、ワクチン接種の方法を提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 5 】

【 図 1 】 F A C S ソーティングの1月後に行った、示されるように未処理の、C R I S P R / C a s 9 処理の、2 M + または 2 M - でソートしたレンチウイルスベクター (L V) パッケージング細胞株 (A ~ D) または H E K - 2 9 3 T 細胞 (E ~ H) のフローサイトメトリー解析 (外れ値を伴う等高線プロット) 。 細胞は、P E コンジュゲート抗ヒト 2 M および A P C コンジュゲート汎抗ヒト M H C - I で染色した。

【 図 2 】 F A C S ソーティングの1月後に行った、示されるように未処理の (U N T) 、 C R I S P R / C a s 9 処理の、2 M + または 2 M - でソートしたレンチウイルスベクター (L V) パッケージング細胞 (A) または H E K - 2 9 3 T 細胞 (B) における、ミスマッチ選択的エンドヌクレアーゼアッセイ (C e l 1 1 アッセイ) により決定された非相同性末端結合 (N H E J) を有する 2 M アレルのパーセンテージ。

【 図 3 】 一過性トランスフェクションによる、示されるように 2 M + または 2 M - の

10

20

30

40

50

HEK-293T細胞において生産されたレンチウイルスベクター(LV)の力価(A)、粒子(B)および感染力(C)(n=3、力価についてp=0.1000、粒子についてp=0.3758、感染力についてp=0.1157)。1μg/mLのドキサイクリンを導入して3日後の2M+または2M-のパッケージング細胞により生産されたLVの粒子(D)(n=4、p=0.1010)。

【図4】2M+(+)または2M-(-)のプロデューサー細胞により生産されたレンチウイルスベクター(LV)バッチからのタンパク質抽出物に対するウエスタンブロット解析。

【図5】カウント/分(CPM)として定量された、トリチウム標識チミジンの取り込みに基づく増殖アッセイ(A)。データは平均値およびSEM(n=3)である。実験条件(2M+(+)または2M-(-)の細胞により生産されたレンチウイルスベクター(LV)を形質導入した樹状細胞(DC)と共にインキュベートしたCD4⁺T細胞)および対照条件(未形質導入のDCと共にインキュベートしたCD4⁺T細胞)のCPM間の比として計算された刺激指数(B)。

【発明を実施するための形態】

【0046】

本発明の様々な好ましい態様および実施形態が、限定されない例としてここに記載される。

【0047】

本発明の実施は、特に指示がない限り、化学、生化学、分子生物学、微生物学および免疫学の慣用的な技術を使用するものであり、これらは当業者の能力の範囲内である。かかる技術は文献中に説明されている。例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., および Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995および定期増刊) *Current Protocols in Molecular Biology*, Ch. 9, 13および16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J., および Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; Polak, J. M., および McGee, J. O'D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M. J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; ならびに Lilley, D. M., および Dahlberg, J. E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Pressを参照されたい。これらの一般的教科書の各々は、参照により本明細書中に組み入れられる。

【0048】

1の態様において、本発明は、細胞表面上のMHC-Iの発現を減少させるように遺伝子操作された、エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞を提供する。

【0049】

別の態様において、本発明は、細胞表面上のMHC-Iの発現を減少させるように遺伝子操作された、エンベロープウイルス粒子パッケージング細胞を提供する。

【0050】

細胞表面上のMHC-Iの発現減少とは、遺伝子操作を行わないがその他の点は実質的に同一の条件下にある細胞の表面上に発現しているMHC-I分子の数と比べた、遺伝子操作された細胞の表面上に発現しているMHC-I分子の数の減少をいう。

【0051】

10

20

30

40

50

細胞表面上のMHC-Iの発現は、表面に露出したMHC-I分子の数が、例えば、遺伝子操作の非存在下で提示される表面に露出したMHC-I分子の数の約50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満であるように減少され得る。1の実施形態において、細胞表面上のMHC-Iの発現は、表面に露出したMHC-I分子の数が、遺伝子操作の非存在下で提示される表面に露出したMHC-I分子の数の0%であるように減少される。

【0052】

細胞表面上のMHC-Iの発現は、好ましくは、細胞が表面に露出したMHC-I分子を実質的に欠くように減少される。

【0053】

「実質的に欠く」によると、細胞により生産されるエンベロープウイルス粒子上のMHC-Iへの免疫応答が治療的に有用な程度まで減少するように、遺伝子操作された細胞の表面上に発現しているMHC-I分子の数が遺伝子操作を行わない細胞の表面上に発現しているMHC-I分子の数と比べて実質的に減少していることが理解されるものである。

【0054】

別の態様において、本発明は、2-ミクログロブリンをコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊を含むエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞を提供する。

【0055】

別の態様において、本発明は、MHC-I鎖をコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊を含むエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞を提供する。

【0056】

1の態様において、本発明は、本発明のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞の集団を提供する。

【0057】

好ましくは、集団中の細胞のうちの少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%が、表面に露出したMHC-Iを含まない。

【0058】

細胞集団において細胞表面に露出したタンパク質のタンパク質発現を定量する方法は、当該技術分野で公知である。好適な方法としては、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取(FACS)および蛍光顕微鏡検査が挙げられる。

【0059】

例えば、細胞集団を、MHC-Iに特異的な抗体と接触させ得る。抗体は、その検出を可能にするように標識され得る。抗体は、レポーター部(例として蛍光標識)と直接的にコンジュゲートされ得る。あるいは、レポーター部とコンジュゲートした、一次抗体に特異的な二次抗体を、細胞集団と接触させ得る。好適なレポーター部は当該技術分野で公知であり、これらとしては、例えば、Alexa FluorおよびBODIPYベースの蛍光標識が挙げられる。細胞集団が抗体と接触したら、集団は、個々の細胞上のタンパク質発現を定量化するのに適した技術、例えばフローサイトメトリーなどを用いて解析され得る。解析は、細胞を溶解せずに実施される。

【0060】

細胞表面に露出したタンパク質のタンパク質発現を定量する方法はまた、特定の特性が濃縮された細胞集団を生産するための(例として表面に露出したMHC-Iを含まない細胞が濃縮された細胞集団を生産するための)細胞集団のソーティングを可能にし得る。例えば、蛍光活性化細胞分取(FACS)は、かかる濃縮を行うことを可能にする。

【0061】

同様の方法が、単一細胞上にある細胞表面に露出したタンパク質のタンパク質発現を定量するために適用され得る。例えば、方法は、マイクロ流体アプローチを使用し得る。

10

20

30

40

50

【0062】

主要組織適合複合体クラスI

主要組織適合複合体クラスI (MHC - I) は、細胞膜の外葉上に提示されるヘテロダイマー膜タンパク質である (Penn, D. J. (2002) Major Histocompatibility Complex (MHC) eLS, John Wiley & Sons, <http://www.els.net/> [DOI: 10.1038/npg.els.0000919])。MHC - I は、タンパク質のペプチド断片に結合して、それらを、それらがCD8⁺細胞傷害性T細胞により認識され得る細胞外環境に提示するように機能する。正常な細胞タンパク質から作成されるペプチド断片は、中枢および末梢の寛容メカニズムのために細胞傷害性T細胞を活性化しない。一方、外来ペプチド (例としてウイルスのタンパク質から生じるもの) は、その細胞を壊すために免疫応答の活性化を引き起こす。

10

【0063】

同種のMHC - Iタンパク質それ自体は免疫系により認識され得る。例えば、抗体は、MHC - Iエピトープに直接的に結合し得る。結果として、同種の供給源から生じるMHC - Iタンパク質を含む細胞およびエンベロープウイルスは、免疫系により標的とされ、中和され得る。

【0064】

ヒトMHC - Iはヒト白血球抗原クラスI (HLA - I) と呼ばれ、ほぼ全ての有核細胞上で発現している。HLA - Iは、2つのポリペプチド鎖、HLA - I重鎖 (鎖) および 2ミクログロブリン (2M) からなる。HLA - I 鎖および 2Mは、非共有結合的に連結されている。

20

【0065】

HLA - I 鎖は多型である。6つのHLA - I 鎖が今までに同定されており、これらとしては3つの古典的な高度に多型の鎖 (HLA - A、HLA - BおよびHLA - C) ならびに3つの非古典的な多型の少ない鎖 (HLA - E、HLA - FおよびHLA - G) が挙げられる。当業者は、HLA - I 鎖の核酸配列を容易に決定することができる。例えば、HLA - I 鎖は、染色体の主要組織適合複合体領域内のそれらの位置を用いて、ゲノム配列中で同定され得る (Penn, D. J. (2002) Major Histocompatibility Complex (MHC) eLS, John Wiley & Sons, <http://www.els.net/> [DOI: 10.1038/npg.els.0000919])。

30

【0066】

2Mをコードする核酸配列は、当該技術分野で公知である。例えば、ヒト 2Mの核酸配列はGenBank Accession No. NM_004048として寄託されている。

【0067】

当業者は、本発明はMHC - I配列の変異体、例えばこれらの配列 (例としてHLA - I 鎖配列および 2M配列) の多型などに適用可能であると理解する。例えば、MHC - I配列の変異体としては、一塩基多型 (SNP) または複数のSNPが挙げられ得る。

40

【0068】

MHC - Iの遺伝子操作

本発明のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞は、細胞表面上のMHC - Iの発現を減少させるように遺伝子操作されている。

【0069】

タンパク質発現を減少させるように遺伝子操作する方法は、当該技術分野で公知である。例えば、これは、標的遺伝子ノックアウトにより達成され得る。タンパク質発現を減少させるため、タンパク質をコードする遺伝子自体またはその調節性配列 (例としてそのプロモーター) がノックアウトされ得る。ノックアウトは、コーディング核酸配列の断片の

50

欠失により達成され得るものであり、これは、発現もしくは安定性に不可欠なタンパク質の断片を欠失し得る、またはコーディング配列のリーディングフレームを変え得るものである。標的遺伝子ノックアウトに適した方法としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) および CRISPR/Cas ベースの RNA ガイドヌクレアーゼの使用が挙げられる (Gaj, T. et al. (2013) Trends Biotechnol. 31:397-405)。

【0070】

例えば、CRISPR/Cas9 RNA ガイドヌクレアーゼは、ゲノム中の特定の位置に結合するように設計された適当な RNA ガイドが提供された場合に、その位置における二本鎖切断を触媒するために用いられ得る。Cas9 およびガイド RNA は、タンパク質および RNA をコードするベクターのトランスフェクションにより標的細胞に送達され得る。細胞は、非相同性末端結合 (NHEJ) 経路を用いて、それらの DNA 中の任意の二本鎖切断の修復を試みる。これは、ランダムなヌクレオチドを挿入するエラーを生じがちなメカニズムであり、標的遺伝子のリーディングフレームをしばしば破壊する。

10

【0071】

あるいは、タンパク質発現を減少させるための遺伝的操作は、標的遺伝子の発現を抑制するための RNAi 技術、またはマイクロ RNA もしくはアンチセンス RNA を用いて達せられ得る。

【0072】

標的遺伝子のノックアウトまたは発現抑制のアプローチが実施されたら、結果として得られる細胞集団は、目的の表現型、例えば表面に露出した MHC-I の発現減少を呈する細胞を選抜し、濃縮するためにスクリーニングされ得る。スクリーニングおよび濃縮に適した技術は当該技術分野で公知であり、これらとしてはフローサイトメトリーおよび蛍光活性化細胞分取 (FACS) が挙げられる。

20

【0073】

1 の実施形態において、エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞は、2 - ミクログロブリンをコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊を含む。

2 - ミクログロブリンは MHC-I を安定化し、それゆえに 2 - ミクログロブリンを欠損した細胞は細胞表面上の MHC-I の発現減少を呈する。細胞は、2 - ミクログロブリンをコードする遺伝子の全てのコピーにおける遺伝子工学的破壊を含み得る。

30

【0074】

別の実施形態において、細胞は、MHC-I 鎖をコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊を含む。細胞は、MHC-I 鎖をコードする遺伝子の全てのコピーにおける遺伝子工学的破壊を含み得る。

【0075】

細胞は、2 - ミクログロブリンをコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊および MHC-I 鎖をコードする遺伝子の遺伝子工学的破壊の両方を含み得る。

【0076】

ベクター

ベクターは、1 の環境から別の環境へと物を移行できるようにする、またはこれを容易にするツールである。本発明のウイルス粒子は、ベクターであり得る。

40

【0077】

本発明のウイルスベクター粒子は、エンベロープウイルス粒子である。

【0078】

エンベロープウイルス粒子は、外側脂質二重膜を含む。多数のエンベロープウイルスが当該技術分野で公知であり、これらとしてはレトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ヘパドナウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、アレナウイルス、コロナウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、ブニヤウイルス、ボルナウイルス、ラブドウイルスおよびフィロウイルスが挙げられる。

50

【0079】

レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクター

レトロウイルスベクターは、任意の好適なレトロウイルスに由来するもの、または由来することができるものであり得る。数多くの異なるレトロウイルスが同定されている。例としては、マウス白血病ウイルス (MLV)、ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV)、マウス乳房腫瘍ウイルス (MMTV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、フジナミ肉腫ウイルス (FuSV)、モロニーマウス白血病ウイルス (Mo-MLV)、FBRマウス骨肉腫ウイルス (FBR-MSV)、モロニーマウス肉腫ウイルス (Mo-MSV)、エーベルソンマウス白血病ウイルス (A-MLV)、トリ骨髄球しゅ症ウイルス-29 (MC29) およびトリ赤芽球症ウイルス (AEV) が挙げられる。レトロウイルスの詳細なリストは、Coffin, J. M. et al. (1997) *Retroviruses*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 758-63 中に見出され得る。

10

【0080】

レトロウイルスは、広くは「単純型」と「複雑型」の2つのカテゴリーに分けられ得る。レトロウイルスは、なおさらに7つのグループに分けられ得る。これらのグループのうち5つは、発がん性の潜在能力を有するレトロウイルスに相当する。残りの2つのグループは、レンチウイルスおよびスプーマウイルスである。これらのレトロウイルスの総説は、Coffin, J. M. et al. (1997) *Retroviruses*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 758-63 中に示されている。

20

【0081】

レトロウイルスおよびレンチウイルスのゲノムの基本構造は、共通の特徴、例えば5'長鎖末端反復配列 (Long Term Repeat, LTR) および3'LTRなどを共有する。これらの間または中に、ゲノムがパッケージされるのを可能にするパッケージングシグナル、プライマー結合部位、宿主細胞ゲノム内への組み込みを可能にする組み込み部位、ならびにパッケージング構成成分をコードするgag遺伝子、pol遺伝子およびenv遺伝子 - これらはウイルス粒子のアセンブリのために必要とされるポリペプチドである - が位置する。レンチウイルスは、付加的特徴、例えばHIVにおけるrev配列およびRRE配列などを持ち、これらは、組み込まれたプロウイルスのRNA転写産物を感染した標的細胞の核から細胞質へと効率的に運び出すことを可能にする。

30

【0082】

プロウイルスの中で、これらの遺伝子は、両末端がLTRと呼ばれる領域に隣接している。LTRは、プロウイルスの組み込みおよび転写に関与する。LTRはまたエンハンサー - プロモーター配列としても働き、ウイルス遺伝子の発現を制御することができる。

【0083】

LTR自体は、3つのエレメント: U3、RおよびU5に分けることができる同一の配列である。U3は、RNAの3'末端に固有の配列に由来する。Rは、RNAの両末端において繰り返される配列に由来する。U5は、RNAの5'末端に固有の配列に由来する。これら3つのエレメントのサイズは、異なるレトロウイルス間で相当に変わることがある。

40

【0084】

欠損レトロウイルスベクターゲノム中で、gag、polおよびenvは、存在しなくてもよく、または機能しなくてもよい。

【0085】

典型的なレトロウイルスベクターにおいて、複製に不可欠な1または複数のタンパク質コーディング領域の少なくとも一部がウイルスから除去され得る。このことは、ウイルスベクターを複製欠損にする。ウイルスゲノムの一部分はまた、標的宿主細胞への形質導入の能力および/または宿主ゲノム内へのそのゲノムの組み込みの能力がある候補の改変部を含むベクターを作成するために、ベクターゲノム中で調節性の制御領域およびレポータ

50

一部に作動可能に連結された候補の改変部をコードするライブラリーにより置き換えられる。

【0086】

レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターのより大きなグループの一部である。レンチウイルスの詳細なリストは、Coffin, J. M. et al. (1997) *Retroviruses*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 758-63 中に見出され得る。簡潔には、レンチウイルスは霊長類および非霊長類のグループに分けることができる。霊長類レンチウイルスの例としては、限定されるものではないが、ヒト獲得免疫不全症候群 (AIDS) の原因物質であるヒト免疫不全ウイルス (HIV) ; およびサル免疫不全ウイルス (SIV) が挙げられる。非霊長類レンチウイルスの例としては、原型の「スローウイルス」であるビスナ/マエディウイルス (VMV)、同様に近縁のヤギ関節炎・脳炎ウイルス (CAEV)、ウマ感染性貧血ウイルス (EIAV)、およびより近年に記述されたネコ免疫不全ウイルス (FIV) およびウシ免疫不全ウイルス (BIV) が挙げられる。

10

【0087】

レンチウイルスファミリーは、レンチウイルスは分裂細胞および非分裂細胞の両方に感染する能力を持つ点でレトロウイルスと異なる (Lewis, P. et al. (1992) *EMBO J.* 11:3053-8; Lewis, P. F. et al. (1994) *J. Virol.* 68:510-6)。対照的に、他のレトロウイルス、例えば MLV などは、非分裂細胞または分裂が遅い細胞、例えば筋肉、脳、肺および肝臓組織を構成する細胞などに感染することができない。

20

【0088】

本明細書中で用いられるレンチウイルスベクターは、レンチウイルスに由来することができる少なくとも1の構成部分を含むベクターである。好ましくは、その構成部分は、ベクターが細胞に感染し、遺伝子を発現するまたは複製する生物学的メカニズムに参与する。

【0089】

レンチウイルスベクターは、「霊長類」ベクターであり得る。レンチウイルスベクターは、「非霊長類」ベクター (すなわち霊長類、特にヒトに本来感染しないウイルスに由来するもの) であり得る。非霊長類レンチウイルスの例は、天然で霊長類に感染しないレンチウイルス科 (Lentiviridae) の任意のメンバーであり得る。

30

【0090】

レンチウイルスをベースとしたベクター、HIV-1 および HIV-2 をベースとしたベクターの例が下に記載される。

【0091】

HIV-1 ベクターは、単純型レトロウイルスにおいても見出されるシス作用性エレメントを含有する。gag オープンリーディングフレーム内に伸長した配列は、HIV-1 のパッケージングのために重要であることが示されている。したがって、HIV-1 ベクターは、翻訳開始コドンが変異した gag の関連部分をしばしば含有する。加えて、大半の HIV-1 ベクターはまた、RRE を包含する env 遺伝子の一部分を含有する。Rev は RRE に結合し、これは、核から細胞質への完全長または単スプライス (singly spliced) の mRNA の輸送を可能にする。Rev および/または RRE の非存在下で、完全長 HIV-1 RNA は核内に集積する。あるいは、ある種の単純型レトロウイルス、例えばマソン・ファイザーサルウイルスなどからの構成的輸送エレメントを、Rev および RRE の要求性を軽減するために用いることができる。HIV-1 LTR プロモーターからの効率的な転写には、ウイルスタンパク質 Tat が必要とされる。

40

【0092】

大半の HIV-2 をベースとしたベクターは、HIV-1 ベクターと構造的に非常に類似している。HIV-1 をベースとしたベクターと同様に、HIV-2 ベクターもまた、完全長または単スプライスのウイルス RNA の効率的な輸送のために RRE を必要とす

50

る。

【0093】

1つの系において、ベクターおよびヘルパーコンストラクトは、2つの異なるウイルスからのものであり、ヌクレオチド相同性の低減は組換えの確率を減少させ得る。霊長類レンチウイルスをベースとしたベクターに加えて、FIVをベースとしたベクターもまた、病原性HIV-1ゲノムに由来するベクターの代替として開発されている。これらのベクターの構造もまたHIV-1をベースとしたベクターに類似している。

【0094】

好ましくは、本発明において用いられるウイルスベクターは、最小のウイルスゲノムを持つ。

10

【0095】

「最小のウイルスゲノム」によると、標的宿主細胞への感染、形質導入および目的ヌクレオチド配列の送達のために必要とされる機能を提供するために、必須でないエレメントを除去し、必須のエレメントを保持するようにウイルスベクターが操作されていることが理解されるものである。この戦略のさらなる詳細は、WO1998/017815中に見出すことができる。

【0096】

好ましくは、宿主細胞/パッケージング細胞内でウイルスゲノムを生産するために用いられるプラスミドベクターは、標的細胞に感染する能力はあるが最終標的細胞内で独立的に複製して感染性ウイルス粒子を生産する能力がないウイルス粒子内に、パッケージング構成成分の存在下、RNAゲノムをパッケージングできるようにするのに十分なレンチウイルスの遺伝情報を持つ。好ましくは、ベクターには、機能的なgag-polおよび/またはenv遺伝子および/または複製に不可欠な他の遺伝子がない。

20

【0097】

一方、宿主細胞/パッケージング細胞内でウイルスゲノムを生産するために用いられるプラスミドベクターはまた、宿主細胞/パッケージング細胞内でのゲノムの転写を指示するための、レンチウイルスゲノムに作動可能に連結された転写調節性制御配列を包含する。これらの調節性配列は、転写されるウイルス配列に付随する天然の配列(すなわち5' U3領域)であってもよく、またはそれらは異種プロモーター、例えば別のウイルスプロモーター(例としてCMVプロモーター)などであってもよい。

30

【0098】

ベクターは、ウイルスのエンハンサー配列およびプロモーター配列が欠失した自己不活性化(SIN)ベクターであり得る。SINベクターは、野生型ベクターのそれと同様の有効性を伴って作成され、インピボで非分裂細胞に形質導入されることが可能である。SINプロウイルス中の長鎖末端反復配列(LTR)の転写不活性化は、複製能のあるウイルスによる動員を防ぐものである。これはまた、LTRの何らかのシス作用性効果を除くことにより、内部プロモーターからの遺伝子の発現調節を可能にするものである。

【0099】

ベクターは、組み込み欠損であり得る。組み込み欠損レンチウイルスベクター(IDLV)は、例えば、ベクターに触媒的に不活性のインテグラーゼ(例えば触媒部位内にD64V変異を保有するHIVインテグラーゼなど; Naldini, L. et al. (1996) Science 272: 263-7; Naldini, L. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11382-8; Leavitt, A. D. et al. (1996) J. Virol. 70: 721-8)をパッケージングすることにより、またはベクターLTRから必須のatt配列を改変または欠失させることにより(Nightingale, S. J. et al. (2006) Mol. Ther. 13: 1121-32)、または上記の組み合わせにより、生産することができる。

40

【0100】

HIV由来ベクター

50

本発明における使用のためのHIV由来ベクターは、HIV株に関してとりわけ限定されるものではない。HIV株の配列の多数の例は、HIV Sequence Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)において見出され得る。

【0101】

単純ヘルペスウイルス(HSV)由来ベクター

単純ヘルペスウイルス(HSV)は、天然で神経細胞に感染するエンベロープ二本鎖DNAウイルスである。HSVは外来DNAの大きな断片を収容することができ、このことはHSVをベクター系として魅力的なものとしており、HSVは神経細胞への遺伝子送達のためのベクターとして使用されている。

10

【0102】

治療手法におけるHSVの使用は、溶菌サイクルを確立できないように株を弱毒化することを必要とする。とりわけ、HSVベクターがヒトにおける遺伝子治療のために用いられることになる場合、NOIは、好ましくは必須遺伝子内に挿入される。このことは、ベクターウイルスが野生型ウイルスに遭遇した場合、野生型ウイルスへの異種遺伝子の移行が組換えにより起こることがあるため、必要である。しかしながら、NOIが必須遺伝子内に挿入されているかぎり、組換え移行はレシピエント側ウイルス中の必須遺伝子も欠失させ、複製能のある野生型ウイルス集団内への異種遺伝子の「エスケープ」を防ぐ。

【0103】

ワクシニアウイルス由来ベクター

20

ワクシニアウイルスは、約190kbの直鎖状の二本鎖DNAゲノムを持つ大きなエンベロープウイルスである。ワクシニアウイルスは最大で約25kbの外来DNAを収容することができ、このこともまたワクシニアウイルスを大きな遺伝子の送達に有用なものとしている。

【0104】

遺伝子治療用途に適した多数の弱毒化ワクシニアウイルス株、例えばMVA株およびNYVAC株が当該技術分野で公知である。

【0105】

ウイルス粒子生産

1の態様において、本発明は、エンベロープウイルス粒子の生産のための、本発明のエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞の使用を提供する。

30

【0106】

1の実施形態において、エンベロープウイルスベクター粒子は、遺伝子操作の非存在下でエンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞により生産された粒子上に提示される、表面に露出したMHC-I分子の数のうちの約50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満を含む。別の実施形態において、エンベロープウイルス粒子は、表面に露出したMHC-I分子を実質的に欠いている。

【0107】

エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞は、ウイルスのゲノムを含み得る。

40

【0108】

ウイルスゲノムは、ウイルス粒子内に取り込まれた核酸配列である。ウイルスゲノムは、目的ヌクレオチド(NOI)を含むように操作され得る。

【0109】

したがって、ウイルス粒子の生産における使用のため、エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞はウイルスゲノムを含み、その後が続いてエンベロープウイルス粒子の生産に適した条件下で培養され得る。

【0110】

「エンベロープウイルス粒子パッケージング細胞」は、例えば、ウイルス粒子のアセンブリのために必要とされるいくつかまたは全ての構造タンパク質をコードする核酸配列を

50

含み得る。

【0111】

エンベロープウイルス粒子の生産のために必要とされる要素のうちのいくつかのみを含む細胞は、その後続く各々の付加的な必要とされる要素の一過性トランスフェクション、形質導入または安定的組み込みのステップを通じたウイルス粒子プロデューサー細胞株の作成における中間体試薬として有用である。これらの中間体試薬は、本発明のパッケージング細胞に包含される。エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞株またはパッケージング細胞株の作成のためにその後続いて用いられることになる、細胞表面上のMHC-Iの発現が減少した親細胞は、本発明の別の実施形態を表す。

【0112】

感染性エンベロープウイルス粒子の生産のために必要とされる構成成分をコードする核酸配列は、パッケージング細胞またはプロデューサー細胞内に一過性にトランスフェクトされてもよく、または形質導入されてもよく、または安定的に維持されてもよい(例として細胞ゲノム内に安定的に組み込まれてもよく、またはエピソーム的に維持されてもよい)。あるいは、一過性トランスフェクションまたは形質導入および安定的維持の組み合わせは、細胞内に核酸配列を導入するために用いられ得る。

【0113】

したがって、本発明の細胞は、ウイルスゲノムを含むエンベロープウイルス粒子の生産を可能にするため、ウイルスゲノムを含む核酸をトランスフェクトされてもよく、または形質導入されてもよく、または標的化組み込みにより安定的に組み込まれてもよい。

【0114】

感染性エンベロープウイルス粒子の生産のために必要とされる別々の構成成分をコードする核酸配列は、別々の発現カセットとして細胞に提供され得る。

【0115】

1の実施形態において、本発明のパッケージング細胞は、Gagタンパク質、Gag/Polタンパク質および/もしくはEnvタンパク質、またはそれらの機能的代替物をコードする核酸配列を含む。細胞は、レトロウイルスベクター粒子のアセンブリのために必要とされ得る付加的なタンパク質、例えばRevタンパク質をコードする核酸配列を含んでもよい。

【0116】

エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞またはパッケージング細胞は、エンベロープウイルス粒子を生産するまたはパッケージングする能力のある任意の好適な細胞型であることができる。細胞は、好ましくは哺乳動物細胞、とりわけヒト細胞である。例えば、エンベロープウイルス粒子プロデューサー細胞は、親のHEK-293細胞に由来し得る。

【0117】

目的ヌクレオチド

本発明のベクター、例としてウイルス粒子は、目的ヌクレオチド(NOI)を含み得る。

【0118】

好ましくは、目的ヌクレオチドは、治療効果を向上させる。

【0119】

好適なNOIとしては、限定されるものではないが、酵素、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、抗酸化分子、遺伝子操作された免疫グロブリン様分子、一本鎖抗体、融合タンパク質、免疫共刺激分子、免疫調節分子、アンチセンスRNA、マイクロRNA、shRNA、siRNA、リボザイム、miRNA標的配列、標的タンパク質のトランスドメイン陰性変異体、毒素、条件毒素(conditional toxin)、抗原、腫瘍抑制タンパク質、増殖因子、転写因子、膜タンパク質、表面受容体、抗がん分子、血管作動性タンパク質およびペプチド、抗ウイルスタンパク質およびリボザイム、ならびにそれらの誘導体(例えば付随するレポーター基を有する誘導体など)をコードする配列

10

20

30

40

50

が挙げられる。NOIはまた、プロドラッグ活性化酵素をコードし得る。

【0120】

NOIの例は、血友病の遺伝子治療のために用いられ得る第VII凝固因子もしくは第IX凝固因子もしくはそれらの遺伝子操作された誘導体であり、またはサラセミア/鎌状赤血球症の遺伝子治療のために用いられ得るベータ-グロビン鎖である。

【0121】

ウイルスベクタータンパク質移行により移行させることができる好適なタンパク質としては、限定されるものではないが、ヌクレアーゼ、インテグラーゼ、トランスポサーゼ、酵素、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、抗酸化分子、遺伝子操作された免疫グロブリン様分子、一本鎖抗体、融合タンパク質、免疫共刺激分子、免疫調節分子、標的タンパク質のトランスドメイン陰性変異体、毒素、条件毒素、抗原、腫瘍抑制タンパク質、増殖因子、転写因子、膜タンパク質、表面受容体、抗がん分子、血管作動性タンパク質およびペプチド、抗ウイルスタンパク質およびリボザイム、ならびにそれらの誘導体（例えば付随するレポーター基を有する誘導体など）が挙げられる。

10

【0122】

医薬組成物

本発明のエンベロープウイルス粒子または形質導入細胞は、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と共に、対象への投与のために製剤化され得る。好適な担体および希釈剤としては、等張食塩水溶液、例えばリン酸緩衝生理食塩水が挙げられ、潜在的にヒト血清アルブミンを含有する。

20

【0123】

細胞治療製品の取り扱い、好ましくは、細胞治療のためのFACT-JACIE International Standardsを順守して行われる。

【0124】

遺伝子治療

1の態様において、本発明は、治療における使用のための、例えば遺伝子治療における使用のためのエンベロープウイルス粒子および形質導入細胞を提供する。エンベロープウイルス粒子は、エンベロープウイルスベクター粒子と呼ばれることがある。

【0125】

「形質導入細胞」または「エンベロープウイルスベクター粒子により形質導入された」細胞によると、エンベロープウイルスベクター粒子により運ばれる核酸（例としてNOIを含むもの）が細胞に移行されていることが理解されるものである。形質導入される対象の細胞は、好ましくは標的細胞である。

30

【0126】

本発明のエンベロープウイルスベクター粒子は、対象に直接的に投与され得る。ウイルスベクター粒子は、対象中の特定の細胞への感染を標的とするように遺伝子操作され得る。ウイルスベクター粒子はまた、対象中の特定の細胞に対するNOIの発現を標的とするように遺伝子操作され得る。これは、特定の細胞におけるNOI発現の抑制を容易にする組織特異的なプロモーターまたは核酸配列を用いて達成され得る。

【0127】

エンベロープウイルスベクター粒子はまた、エクスピボ遺伝子治療アプローチの一部として対象の身体から取り出された細胞を形質導入するために用いられ得る。

40

【0128】

形質導入細胞は、自己細胞移植手法の一部として投与されてもよく、または同種細胞移植手法の一部として投与されてもよい。

【0129】

「自己細胞移植手法」によると、初発の細胞集団（本発明のエンベロープウイルスベクター粒子が次いで形質導入されるもの）は形質導入細胞集団が投与されるのと同じ対象から得られることが理解されるものである。自己移植手法は、免疫学的不適合に関連した問題を回避し、遺伝的にマッチしたドナーの可用性にかかわらず対象に対して利用すること

50

ができることから、有利である。

【0130】

「同種細胞移植手法」によると、初発の細胞集団（本発明のエンベロープウイルスベクター粒子が次いで形質導入されるもの）は形質導入細胞集団が投与されるのとは異なる対象から得られることが理解されるものである。好ましくは、ドナーは、免疫学的不適合のリスクを最小限にするため、細胞が投与される対象に対して遺伝的にマッチされる。

【0131】

エンベロープウイルスベクター粒子または形質導入細胞の好適な用量は、例えば治療的および/または予防的に有効となるものなどである。投与される用量は、処置される対象および症状に依存し得るものであり、当業者により容易に決定され得る。

10

【0132】

例えば、使用は、造血幹細胞および/または前駆細胞移植手法の一部としてのものであり得る。

【0133】

造血幹細胞移植（HSC T）は、骨髄（この場合骨髄移植として知られる）または血液に由来する血液幹細胞の移植である。幹細胞移植は、血液学および腫瘍学の分野における医学的手法であり、血液もしくは骨髄の疾患またはある種のがんを有する人に対して最も多く行われる。

【0134】

多くのHSC Tレシピエントは、化学療法での長期処置による利益が得られない、または既に化学療法に耐性の多発性骨髄腫または白血病の患者である。HSC Tの候補としては、患者が先天的欠陥、例えば欠陥のある幹細胞を有する重症複合免疫不全症または先天性好中球減少症などを持つ小児症例、およびまた誕生後に幹細胞を失った再生不良性貧血を有する子供または大人が挙げられる。幹細胞移植で処置される他の症状としては、鎌状赤血球症、骨髄異形成症候群、神経芽細胞腫、リンパ腫、ユーイング肉腫、線維形成性小円形細胞腫瘍およびホジキン病が挙げられる。より近年は、非骨髄破壊的な、つまりいわゆる「ミニ移植」が開発されており、これは必要とされる予備的な化学療法および放射線療法の用量がより少ない手法である。これは、年配の患者およびその他の点で従来の処置レジメンに耐えるには弱すぎると考えられる他の患者においてHSC Tを実行できるようにした。

20

30

【0135】

本発明のエンベロープウイルスベクター粒子または形質導入細胞は、遺伝的疾患、例えば血漿タンパク質欠乏、代謝障害、リソソーム貯蔵障害、ムコ多糖症、免疫不全症、血液障害、限定されるものではないが血友病といったもの、アデノシンデアミナーゼ重症複合免疫不全症、ウイスコット・アルドリッチ症候群、異染性白質ジストロフィー、グロボイド白質ジストロフィー（globoid leukodystrophy）、サラセミア、慢性肉芽腫性疾患などの処置において有用であり得る。

【0136】

本発明のエンベロープウイルスベクター粒子または形質導入細胞は、WO 1998 / 005635中に記載されている障害の処置において有用であり得る。参照を容易にするため、そのリストの一部をここに提供する：がん、炎症または炎症性疾患、皮膚障害、発熱、心血管系作用、出血、凝固および急性期応答、悪液質、食欲不振症、急性感染症、HIV感染症、ショック状態、移植片対宿主反応、自己免疫性疾患、再灌流傷害、髄膜炎、偏頭痛およびアスピリン依存性抗血栓症；腫瘍の増殖、浸潤および拡大、血管新生、転移、悪性、腹水および悪性胸水；大脳虚血、虚血性心疾患、骨関節炎、関節リウマチ、骨粗鬆症、喘息、多発性硬化症、神経変性、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、血管炎、クローン病および潰瘍性大腸炎；歯周炎、歯肉炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性潰瘍、表皮水疱症；角膜潰瘍形成、網膜症および外科的創傷治癒；鼻炎、アレルギー性結膜炎、湿疹、アナフィラキシー；再狭窄、うっ血性心不全、子宮内膜症、アテローム性動脈硬化症または内部硬化症（endosclerosis）。

40

50

【 0 1 3 7 】

加えて、または代わりに、本発明のエンベロープウイルスベクター粒子または形質導入細胞は、WO 1 9 9 8 / 0 0 7 8 5 9 中に記載されている障害の処置において有用であり得る。参照を容易にするため、そのリストの一部をここに提供する：サイトカインおよび細胞の増殖 / 分化活性；免疫抑制活性または免疫賦活活性（例としてヒト免疫不全ウイルスでの感染症といった免疫不全の処置；リンパ球増殖の調節；がんおよび多くの自己免疫疾患の処置のためのもの、ならびに移植拒絶を予防し、または腫瘍免疫を誘導するためのもの）；造血の調節、例として骨髄性またはリンパ性の疾患の処置；骨、軟骨、腱、靭帯および神経組織の増殖促進、例として創傷の治癒、熱傷、潰瘍および歯周病ならびに神経変性の処置のためのもの；卵胞刺激ホルモンの阻害または活性化（生殖能力の調節）；走化性 / ケモキネシス活性（例として特定の細胞種を傷害または感染部位に動員するためのもの）；止血活性および血栓溶解活性（例として血友病および脳卒中を処置するためのもの）；抗炎症活性（例として敗血症性ショックまたはクローン病を処置するためのもの）；抗微生物剤としてのもの；例として代謝または行動のモジュレーター；鎮痛剤としてのもの；特定の欠乏性障害の処置；ヒトまたは獣医学における、例として乾癬の処置におけるもの。

10

【 0 1 3 8 】

加えて、または代わりに、本発明のエンベロープウイルスベクター粒子または形質導入細胞は、WO 1 9 9 8 / 0 0 9 9 8 5 中に記載されている障害の処置において有用であり得る。参照を容易にするため、そのリストの一部をここに提供する：マクロファージ阻害活性および / または T 細胞阻害活性、ならびにそれゆえに抗炎症活性；抗免疫活性、すなわち炎症に関連しない応答といった細胞性および / または液性免疫応答に対する阻害効果；細胞外マトリックス成分およびフィブロネクチンに接着するマクロファージおよび T 細胞の能力を阻害すること、同様に T 細胞における f a s 受容体発現のアップレギュレート；関節リウマチといった関節炎、過敏症に関連した炎症、アレルギー反応、喘息、全身性エリテマトーデス、コラーゲン病および他の自己免疫性疾患、アテローム性動脈硬化症に関連した炎症、動脈硬化症、アテローム性心疾患、再灌流傷害、心停止、心筋梗塞、血管炎症性障害、呼吸窮迫症候群もしくは他の心肺疾患、消化性潰瘍に関連した炎症、潰瘍性大腸炎および他の胃腸疾患、肝線維症、肝硬変もしくは他の肝疾患、甲状腺炎もしくは他の腺疾患、糸球体腎炎もしくは他の腎および泌尿器疾患、耳炎もしくは他の耳鼻咽喉疾患、皮膚炎もしくは他の皮膚疾患、歯周病もしくは他の歯牙疾患、睾丸炎もしくは睾丸副丸炎、不妊症、睾丸外傷もしくは他の免疫に関係した精巣疾患、胎盤機能障害、胎盤機能不全、習慣性流産、子癇、子癇前症ならびに他の免疫および / もしくは炎症に関係した婦人科疾患、後部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、結膜炎、脈絡網膜炎、網膜ブドウ膜炎、視神経炎、眼内炎、例として網膜炎もしくは嚢胞様黄斑浮腫、交感神経性眼炎、強膜炎、網膜色素変性症、変性眼底疾患 (d e g e n e r a t i v e f o n d u s d i s e a s e) の免疫性および炎症性成分、眼球外傷の炎症性成分、感染症により引き起こされる眼球炎、増殖性硝子体網膜炎、急性虚血性視神経障害、過剰瘢痕、例として緑内障手術後のもの、眼球移植に対する免疫および / もしくは炎症反応ならびに他の免疫および炎症に関係した眼疾患、中枢神経系 (C N S) もしくは任意の他の器官の両方における免疫および / もしくは炎症の抑制が有益な自己免疫性の疾患もしくは症状もしくは障害に関連した炎症、パーキンソン病、パーキンソン病の処置による合併症および / もしくは副作用、A I D S 関連認知症候群、H I V 関連脳症、デビック病、シデナム舞踏病、アルツハイマー病および他の C N S の変性疾患、症状もしくは障害、ストークス (s t o k e s) の炎症性成分、ポリオ後症候群、精神障害の免疫性および炎症性成分、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性汎脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、ギランバレー症候群、シデナム舞踏病 (S y d e n h a m c h o r a) 、重症筋無力症、偽脳腫瘍、ダウン症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、C N S 圧迫もしくは C N S 外傷もしくは C N S の感染症の炎症性成分、筋萎縮および筋ジストロフィーの炎症性成分、ならびに中枢神経系および末梢神経系の炎症および免疫に関係した疾患

20

30

40

50

、症状もしくは障害、外傷後炎症、敗血症性ショック、感染症、外科手術の炎症性合併症もしくは副作用、骨髄移植もしくは他の移植の合併症および/もしくは副作用、遺伝子治療の炎症性および/もしくは免疫性の合併症および副作用、例としてウイルスキャリアの感染によるもの、またはAIDSに関連した炎症といった望まれない免疫反応および炎症を阻害すること、液性および/または細胞性の免疫応答を抑制または阻害すること、単球またはリンパ球の量を低減させることにより単球または白血球の増殖性疾患、例として白血病を処置または寛解させること、例えば角膜、骨髄、器官、水晶体、ペースメーカー、天然または人工の皮膚組織などの天然または人工の細胞、組織および器官の移植の症例における移植片拒絶の予防および/または処置のためのもの。

【0139】

10

処置方法

本発明との関連における予防への言及はより通例的には予防的処置に関連するものであるが、本明細書中の全ての処置への言及は、治療的、緩和的および予防的な処置を包含すると理解されるものである。哺乳類、とりわけヒトの処置が好ましい。ヒトの処置および動物の処置の両方が本発明の範囲内にある。

【0140】

ワクチン

1の態様において、本発明は、ワクチンとしての使用のための本発明のエンベロープウイルス粒子を提供する。好ましくは、エンベロープウイルス粒子は感染性でなく、例えば細胞に感染する能力がない。

20

【0141】

弱毒化ウイルスは、天然の毒性型ウイルスによる感染に対する免疫を提供するワクチンとして当該技術分野で通例的に用いられる。

【0142】

ワクチンとしての使用のための弱毒化ウイルスは、上記の本発明のプロデューサー細胞を用いて生産され得るものであり、好ましくはNOIが省略され得る。本発明のプロデューサー細胞は、ワクチンとしての使用のための、表面に露出したMHC-I分子の数の減少を呈するエンベロープウイルス粒子の生産を可能にする。ワクチンとしての使用のためのエンベロープウイルスベクター粒子は、表面に露出したMHC-I分子を実質的に欠いたものであり得る。

30

【0143】

表面に露出したMHC-I分子の数の減少または欠如は、ワクチンとしての使用のためのウイルスにおいて有利であるが、それはウイルスがMHC-Iに結合する抗体により中和される可能性が低いためである。

【0144】

加えて、免疫応答はウイルス抗原に対してよりも同種のMHC-Iに対して反応し得るものであり、したがって同種のMHC-I分子を実質的に欠いたウイルス粒子は、保護的な免疫をより効果的に誘導することにより、より有効なワクチンであり得る。

【0145】

ワクチンとしての使用のためのウイルスは、それらの表面上、または感染した細胞内で付加的なタンパク質を発現するようにさらに遺伝子操作され得る。かかるタンパク質は、生体の免疫防御をさらに向上させ得る抗体の作成または細胞免疫のための抗原として作用し得る。

40

【実施例】

【0146】

実施例1

材料と方法

2M遺伝子破壊

Cas9をコードする真核生物発現プラスミドを作成するため、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)Cas9配列のヒトコード

50

ン最適化バージョンを、XbaIおよびPmeIを用いてhCas9プラスミド(Addgene、プラスミドno. 41815)から切り取った。この断片を次いで、予めXbaIおよびEcoRVで消化したpCDNA3.1プラスミド(Invitrogen)にクローニングした。

【0147】

2M RNAガイドをコードするプラスミドを作成するため、DNA合成を用いてヒトU6プロモーターの配列およびその後ろにトランス活性化RNAの配列(GeneWix)を含有するプラスミドを作った。このプラスミドを次いで、CRISPR RNA(crRNA)が認識する2Mのエクソン1に対応する以下のアニールしたオリゴヌクレオチド: 5' - ACCGAGTAGCGCGAGCACAGCTA - 3'; 5' - AAACTAGCTGTGCTCGCGCTACT - 3' のための互換性DNA末端を作るためにBsaIで消化した。

【0148】

プラスミド(250ngのCas9発現プラスミド+50または100ngのガイドRNA発現プラスミド)をリン酸カルシウムDNAトランスフェクションにより細胞内に送達した。

【0149】

フローサイトメトリー

全細胞懸濁液を、FcR Blocking Reagent(Miltenyi)と共に、PEコンジュゲート抗ヒト2M(BioLegend、クローン2M2)およびAPCコンジュゲート汎抗ヒトMHC-I(Santa Cruz Biotechnology)を伴って、リン酸緩衝生理食塩水、0.5%ウシ血清アルブミン、エチレンジアミン四酢酸(2mM)(染色溶液)中で、4で20分間インキュベートした。抗体染色後、細胞を洗浄し、染色溶液中に再懸濁し、フローサイトメトリー(FACSCanto、BD Biosciences)により解析した。

【0150】

ミスマッチ選択的エンドヌクレアーゼアッセイ

ミスマッチ選択的エンドヌクレアーゼアッセイを用いて、Cas9標的部位における非同源性末端結合(NHEJ)の結果として生じる変異の程度を測定した。簡潔には、2M遺伝子内のcrRNA部位に隣接するプライマー(Fw: 5' - TACAGACAGCAAACCTCACCCAGTC - 3'; Rv: 5' - AGAACTTGGAGAAGGGAAGTCAACG - 3')を用いてPCRを行った。PCR産物を変性させ、再アニーリングさせて、Surveyorヌクレアーゼアッセイ(Transgenomic)を使用して消化した。この酵素は2本鎖の歪みの部位においてDNAを切るため、野生型と変異アレル(ヌクレアーゼ活性の結果として生じる変異または欠失を保有するもの)との間の再アニーリングの生成物が特異的に消化される。反応生成物をSpreadex EL1200 Wide Miniゲル(Elchrom Scientific)上で分離し、エチジウムブロミドにより染色し、バンドの強度をImageQuant TLソフトウェアにより定量した。2つの移動度の低い切断産物に対する未切断の親断片の比を、式 $(1 - (\text{親画分})^{1/2}) \times 100$ を用いて算出した(Lombardo, A. et al. (2011) Nat. Methods 8: 861-9)。

【0151】

レンチウイルスベクター(LV)生産

第三世代レンチウイルスベクター(LV)は、pCCLsin.cPPT.PGK.GFP.preトランスファクター、パッケージングプラスミドpMDLg/p.RRE、pCMV.REV、VSV-GエンベローププラスミドpMD2.Gを使用した293T細胞のリン酸カルシウム一過性トランスフェクションにより、先に記載されているように生産した(Follenz, A. et al. (2002) Methods Mol. Med. 69: 259-74)。293T細胞は、トランスフェクションの24時間前に15cmディッシュ内に播種した。トランスフェクションの2時間前、培養培

10

20

30

40

50

地を新しい培地で置き換えた。各ディッシュについて、LVゲノムプラスミド、パッケージングプラスミド pMDLg / pRRE および pCMV.REV、ならびに pMD2.G の混合物を含有する溶液を、それぞれ 35 μ g、12.5 μ g、6.25 μ g および 9 μ g のプラスミド DNA を用いて調製した。0.1 \times TE 溶液 (dH₂O 中 10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) および水 (1:2) を DNA 混合物に加えて 1250 μ L の最終液量とした。溶液をスピニングホイール (spinning wheel) 上に 20 ~ 30 分間置き、次いで 125 μ L の 2.5 M CaCl₂ を加えた。トランスフェクションの直前に、溶液をポルテックス上で攪拌し続けながら、1250 μ L の 2 \times HBS (281 mM NaCl、100 mM HEPES、1.5 mM Na₂HPO₄、pH 7.12) を加えることにより沈殿を形成させた。沈殿をすぐに培養培地に加えて細胞上に 14 ~ 16 時間置き、続いて培養培地を交換した。培地交換から 30 時間後に上清を回収し、0.22 μ m フィルター (Millipore) を通してろ過した。

10

【0152】

293-T-REx (Invitrogen) から開始して、テトラサイクリン調節性の転写リプレッサーを安定的に発現させ、CMVプロモーターと連結した Tet オペレーターの制御下で HIV-1 Rev、Gag/Pol および VSV-G を発現するプラスミドを安定的にトランスフェクトすることで、パッケージング細胞を事前に作成した。培養培地へのドキシサイクリン (1 μ g/mL) の添加により LV 粒子の生産を誘導し、72 時間後に上清を回収し、0.22 μ m フィルター (Millipore) を通してろ過した。

20

【0153】

LV 滴定

10 万個の 293 T 細胞に、ポリブレン (8 μ g/mL) の存在下で連続的なベクター希釈物を形質導入した。GFP 陽性 (GFP+) 細胞のパーセンテージは、フローサイトメトリーにより、形質導入の 7 日後に測定した。力価は形質導入単位_{293T} (TU) / mL として表し、以下の式を用いて算出した：

$$TU/mL = [(\% GFP+ \text{細胞} / 100) \times 10^5 \times 1 / \text{希釈係数}]$$

ベクター粒子は、製造業者のプロトコール (NEN Life Science Products) に従って、HIV-1 Gag p24 抗原の免疫捕獲により測定した。ベクターの感染力は、力価と粒子との間の比 (TU/ng p24) として算出した。

30

【0154】

統計解析

統計解析は、 $p < 0.05$ の有意レベルで、マン・ホイットニー検定を用いて行った。

【0155】

結果

表面に露出した MHC-I 分子を欠いたレンチウイルスベクター (LV) の生産のための表面に露出した MHC-I 分子を欠いた細胞株を作成するため、本発明者らは、ベータ-2-ミクログロブリン (2M) をコードする遺伝子を恒久的に破壊することに着手した。2M は細胞膜上での MHC-I の発現のために必要とされる MHC-I の普遍的構成成分であるため、本発明者らは、2M 遺伝子を遺伝的に不活性化することにより、MHC-I を構成する遺伝子の各々を個別に破壊する必要なく、高度に多型である全ての MHC-I 分子の表面発現を減じることを目的とした (Shina, T. et al. (2009) J. Hum. Genet. 54: 15-39; Adams, E. J. et al. (2013) Annu. Rev. Immunol. 31: 529-6)。この目的のため、本発明者らは CRISPR/Cas9 システム (Hsu, P. D. (2014) Cell 157: 1262-78) を用いた。Cas9 は、所望の位置に結合するように設計された適当な RNA ガイドが提供された場合にゲノム中の予め決められた位置において DNA 二本鎖切断 (DSB) を行うことができる RNA ガイドヌクレアーゼである。結果として、DSB が起こる細胞は、ランダムなヌクレオチドを挿入するエ

40

50

ラーを生じがちなメカニズムである非相同性末端結合 (NHEJ) 経路により DNA を修復し、標的遺伝子のリーディングフレームをしばしば破壊する (Lombardo, A. et al. (2011) Nat. Methods 8: 861-9)。本発明者らは、Cas9ヌクレアーゼをコードする1のプラスミドと2M遺伝子の第一エクソン中の配列と塩基対となるように設計されたガイドRNAを発現する他のプラスミドの2つのプラスミドを、一過性トランスフェクションにより、LV粒子を生産するように予め遺伝子操作されたHEK-293ベースの誘導性細胞株とLVパッケージングコンストラクトおよびゲノムコンストラクトを使用した一過性トランスフェクションによりLVを生産するために通例的に用いられるHEK-293T細胞の両方に送達した。本発明者らは、フローサイトメトリー解析により、未処理の細胞は2MおよびMHC-Iについて100%陽性である一方(図1Aおよび1E)、Cas9および適当なガイドRNAで処理した細胞のうち最大で44%までが2Mの発現を、結果として、それらの膜上のMHC-Iの発現を失う(図1Bおよび1F)ことを示した。本発明者らは次いで、蛍光活性化細胞分取(FACS)により、2M陰性(2M-)細胞をほぼ完全に純粋(95%)になるまで濃縮した。本発明者らは、これらの細胞は培養中に安定であり、2MおよびMHC-Iのいずれについても陰性のままであることを示した(図1Dおよび1H)。HEK-293T細胞における2M破壊効率は最初はより低かったが(6%、図1F)、本発明者らはFACSソーティングにより2M-のHEK-293T細胞を容易に濃縮することができた(図1Gおよび1H)。

【0156】

これらの結果を遺伝子レベルで確認するため、本発明者らは、ミスマッチ選択的エンドヌクレアーゼアッセイ(Cell1アッセイ; Lombardo, A. et al. (2011) Nat. Methods 8: 861-9)により2M遺伝子におけるNHEJイベントを解析した。本発明者らは、CRISPR/Cas9処理細胞中で最大35%までの2Mアレルが破壊され、これは293T細胞およびLVパッケージング細胞株のいずれにおいても2M-にソートされた細胞中で増加したことを示した(図2)。

【0157】

本発明者らは次いで、2M-細胞はLVを生産するそれらの能力を保持しているかを評価した。この目的のため、本発明者らは、標準的な一過性トランスフェクション手法に基づいて、2M陽性(2M+)および2M-の293T細胞中で生産されたLVの感染力価、粒子産出量および感染力を比較した。本発明者らのデータは、2M-293T細胞中で生産されたLVは、2M+293T細胞中で生産されたものと比べて有意に異なっていないことを示す(図3A、3Bおよび3C)。本発明者らはまた2M+および2M-のパッケージング細胞中でのLVの生産を誘導し、2つのパッケージング細胞株から回収したLVの粒子産出量は同様であることを示した(図3D)。

【0158】

全体的に、これらの結果は、CRISPR/Cas9で処理した細胞における2Mアレルの効率的な破壊、および2M-細胞の細胞膜からのMHC-I分子のほぼ完全な消失を示す。さらには、本発明者らは、これらの2M-細胞に由来するLVの感染力は損なわれていないことを示した。

【0159】

実施例2

材料と方法

地域倫理委員会の承認(プロトコールTIGET03)およびヘルシンキ宣言に従って、インフォームドコンセントに基づいて、健常ドナーからヒト末梢血を得た。Lymphoprep(Fresenius Kabi)に対する密度勾配遠心により末梢血単核細胞(PBMC)を分離した。

【0160】

T細胞精製および樹状細胞(DC)分化

製造業者の説明書に従ったPan T cell IsolationキットII(M

10

20

30

40

50

iltenyi Biotech)を用いたネガティブセレクションによってPBMCからCD3⁺T細胞を精製し、凍らせた。製造業者の説明書に従ったCD14 MicroBeads (Miltenyi Biotech)を用いたポジティブセレクションによって、同じドナーからのPBMCよりCD14⁺単球を単離した。細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)(Euroclone)、100U/mLペニシリン/ストレプトマイシン(Lonza)、2mM L-グルタミン(Lonza)を補充したRPMI1640(Corning)中で、37℃において、10ng/mL rhIL-4(R&D Systems)および100ng/mL rhGM-CSF(Genzyme)の存在下で7日間培養することでDCを分化させた。2日目の細胞に、2M⁺細胞または2M⁻細胞により生産された1μg p24/mLのレンチウイルスベクター(LV)を形質導入した。6日目の細胞を1μg/mLのLPS(Sigma)を使用してさらに1日間成熟させることで成熟DCを作成した。7日目にDCを回収し、T細胞を刺激するために用いた。

10

【0161】

T細胞の増殖

CD3⁺T細胞を解凍し、10% FBS(Euroclone)、100U/mLペニシリン/ストレプトマイシン(Lonza)、2mM L-グルタミン(Lonza)および20U/mL rhIL-2(Chiron)を補充したRPMI1640(Corning)中で一晩培養した。T細胞を次いで、10% FBS(Euroclone)、100U/mLペニシリン/ストレプトマイシン(Lonza)、2mM L-グルタミン(Lonza)を補充した最終液量200μLのIMDM(Sigma)中で3日間、未形質導入のDCまたは2M⁺細胞もしくは2M⁻細胞により生産されたLVを形質導入したDC(10:1および5:1のT細胞:DC比)で刺激し、次いで1μCi/ウェル 3H-チミジンで16時間パルスした。

20

【0162】

ウエスタンブロット

LVバッチ中の全タンパク質は、PIC(Protease Inhibitor Cocktail; Roche)を補充した膜タンパク質溶解バッファー(150mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM EDTA、1%デオキシコレート、0.1% SDS、1% Triton-X100)で抽出した。試料を溶解液中に再懸濁し、4℃で10分間インキュベートした。溶解物のタンパク質濃度をBradfordアッセイ(BioRad)を用いてアッセイした。20μgのタンパク質を還元条件下でSDS-PAGEにより解析した。イムノブロッティングのため、iBlot Gel Transferスタック(Novex)を用いてポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜にタンパク質を転写し、特異抗体、その後ペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体(ECL MouseまたはRabbit IgG; GE Healthcare)と共にインキュベートし、化学発光試薬(ECL; GE Healthcare)を用いて検出し、オートラジオグラフィフィルムに露光した。以下の抗体を用いた:ウサギモノクローナル抗ヒトMHC-I(OriGene Technologies、TBS、Tween-20 0.1%、スキムミルク粉末5%中で1:1000)、マウスモノクローナル抗Gag p24(NIH AIDS試薬プログラム#3537、TBS、Tween-20 0.1%、スキムミルク粉末5%中で1:1000)。

30

40

【0163】

結果

LVプロデューサー細胞の細胞膜からのレンチウイルスベクター(LV)粒子中へのMHC-Iの取り込みを検出するため、本発明者らは、2M⁺または2M⁻のプロデューサー細胞の培養上清から超遠心により回収したLVから抽出したタンパク質に対してウエスタンブロット解析を行った。

【0164】

本発明者らは、2M⁺細胞により生産されたLV中にMHC-Iの分子量に対応する

50

明確なバンドを検出したが、 $2M^-$ 細胞により生産されたものの中では検出しなかった。両試料は、予想通り、カプシドGagp24タンパク質について同様に陽性であった(図4)。

【0165】

本発明者らは次いで、 $2M^+$ 細胞または $2M^-$ 細胞により生産されたLV粒子に曝露された自己樹状細胞に应答した免疫細胞の活性化を測定することに着手した。

【0166】

本発明者らは、健常ドナーの末梢血単核細胞から $CD3^+$ Tリンパ球および $CD14^+$ 単球を精製し、続いて $CD14^+$ 細胞を $2M^+$ 細胞または $2M^-$ 細胞により生産された同量のLV粒子に曝露した。本発明者らは次いで、形質導入された単球を樹状細胞(DC)に分化させ、それらを同じドナーからの $CD3^+$ リンパ球と共培養した。本発明者らはトリチウム標識されたチミジンの取り込みによりTリンパ球増殖を測定し、 $2M^-$ 細胞により生産されたLVに曝露されたDCに应答したTリンパ球の増殖は、 $2M^+$ 細胞により生産されたLVに曝露されたDCに应答したTリンパ球の増殖よりも実質的に弱いことを観察した(図5)。

【0167】

全体的に、これらのデータは、親の $2M^+$ 細胞により生産されたLV粒子におけるMHC-Iの存在、および $2M^-$ 細胞によるMHCを持たないLVの有効な作成を確認している。さらには、これらのデータは、MHCを持たないLV粒子および形質導入細胞はアロ特異的免疫応答を誘導する可能性が低く、これにより標的とされる可能性が低いことを指し示している。

【0168】

上の明細書中で言及されている全ての刊行物は、参照により本明細書中に組み入れられる。本発明の上記細胞、ウイルスベクター粒子、使用および方法の様々な改変およびバリエーションは、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく当業者に明白である。本発明は特定の好ましい実施形態に関連して記載されているが、特許請求の範囲に記載された発明はかかる特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際に、本発明を実施するための上記様式の様々な改変は、生化学およびバイオテクノロジーまたは関連分野における当業者に明らかであって、添付の特許請求の範囲内にあることが意図される。

10

20

30

【 図 1 】

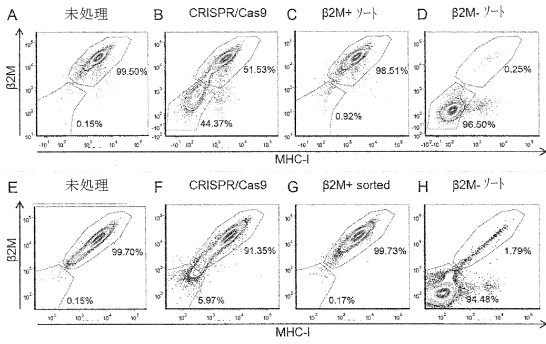


Figure 1

【 図 2 】

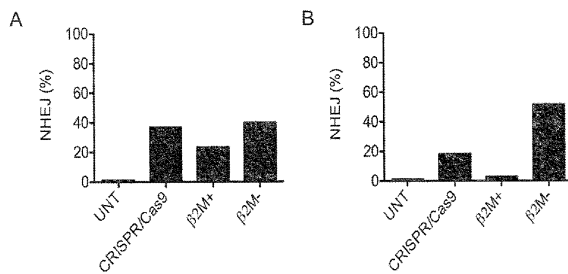


Figure 2

【 図 5 】

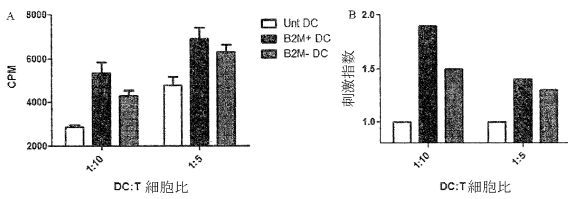


Figure 5

【 図 3 】

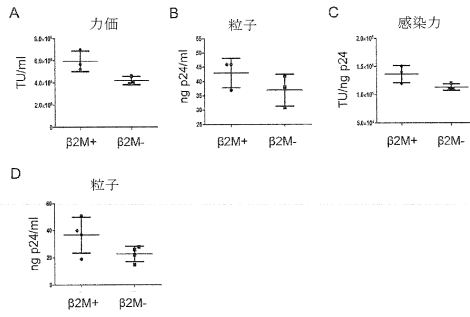


Figure 3

【 図 4 】

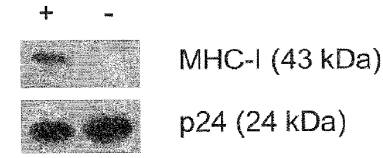


Figure 4

【配列表】

0006643311000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 K 39/275 (2006.01)		A 6 1 K 39/275			
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/09		Z	

(74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文

(72)発明者 カントーレ, アレッシオ
イタリア国、イ - 2 0 1 3 2 ・ ミラノ、ヴィア・オルジェッティナ・5 8、サン・ラファエレ・テ
レトン・インスティテュート・フォー・ジーン・セラピー

(72)発明者 ロンバルド, アンジェロ・レオーネ
イタリア国、イ - 2 0 1 3 2 ・ ミラノ、ヴィア・オルジェッティナ・5 8、サン・ラファエレ・テ
レトン・インスティテュート・フォー・ジーン・セラピー

(72)発明者 ナルディーニ, ルイージ
イタリア国、イ - 2 0 1 3 2 ・ ミラノ、ヴィア・オルジェッティナ・5 8、サン・ラファエレ・テ
レトン・インスティテュート・フォー・ジーン・セラピー

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 特表2014-513948(JP,A)
特表2013-538562(JP,A)
Retrovirology, 2008年, vol. 5, no. 68, p. 1-15
Journal of Virology, 2008年, vol. 82, no. 3, p. 1107-1117
Journal of Virology, 1995年, vol. 69, no. 5, p. 3117-3124
SCIENCE, 1992年, vol. 258, p. 1935-1938

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

PubMed