

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6924487号
(P6924487)

(45) 発行日 令和3年8月25日(2021.8.25)

(24) 登録日 令和3年8月4日(2021.8.4)

(51) Int.Cl.	F I		
C 1 2 N 15/86	(2006.01)	C 1 2 N	15/86
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14
A 6 1 P 25/32	(2006.01)	A 6 1 P	25/32
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00

請求項の数 24 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-564550 (P2017-564550)	(73) 特許権者	517428713
(86) (22) 出願日	平成28年6月8日(2016.6.8)		アメリカン ジーン テクノロジーズ インターナショナル インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-521643 (P2018-521643A)		アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, キー ウェスト アベニュー 9713, フィフス フロア
(43) 公表日	平成30年8月9日(2018.8.9)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/036519		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02016/200997	(74) 代理人	100113413
(87) 国際公開日	平成28年12月15日(2016.12.15)		弁理士 森下 夏樹
審査請求日	令和1年6月6日(2019.6.6)	(74) 代理人	100181674
(31) 優先権主張番号	62/173,784		弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成27年6月10日(2015.6.10)	(74) 代理人	100181641
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 石川 大輔
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非組み込みウイルス送達システムおよびその使用の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するウイルス担体、
 - (b) パピローマウイルスに由来する、異種ウイルスエピソーム複製起点、
 - (c) 異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列であって、前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、配列、および
 - (d) 目的の少なくとも1つの遺伝子、s h R N A、s i R N A、m i R N A、または他の遺伝子サイレンシング R N A
- を含むウイルス送達系。

【請求項 2】

前記ウイルス担体がレンチウイルスである、請求項 1 に記載のウイルス送達系。

【請求項 3】

前記異種ウイルスエピソーム複製起点がウシパピローマウイルスに由来する、請求項 1 に記載のウイルス送達系。

【請求項 4】

前記異種ウイルスエピソーム複製起点がヒトパピローマウイルスに由来する、請求項 1 に記載のウイルス送達系。

【請求項 5】

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質がE1である、請求項1に記載のウイルス送達系。

【請求項6】

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質がE2である、請求項1に記載のウイルス送達系。

【請求項7】

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な2つのイニシエータータンパク質を含む、請求項1に記載のウイルス送達系。

【請求項8】

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な前記2つのイニシエータータンパク質がE1およびE2である、請求項7に記載のウイルス送達系。

10

【請求項9】

請求項1に記載の前記ウイルス送達系および少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項10】

疾患を処置または予防するためのウイルス送達系であって、

(i) 欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するウイルス担体、

(ii) パピローマウイルスに由来する、異種ウイルスエピソーム複製起点、

(iii) 異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列であって、前記少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、配列、および

20

(iv) 目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNA

を含み、該疾患の処置または予防を必要とする対象に投与されることを特徴とする、ウイルス送達系。

【請求項11】

前記疾患が感染性疾患である、請求項10に記載のウイルス送達系。

【請求項12】

前記感染性疾患がエボラウイルスまたはラッサ熱ウイルスである、請求項11に記載のウイルス送達系。

30

【請求項13】

前記目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAが、エボラウイルスまたはラッサ熱ウイルスに特異的な抗体をコードする、請求項12に記載のウイルス送達系。

【請求項14】

前記疾患が遺伝子疾患または障害である、請求項10に記載のウイルス送達系。

【請求項15】

前記遺伝子疾患がアルコール乱用である、請求項10に記載のウイルス送達系。

【請求項16】

前記目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAが、脳由来の増殖因子をコードする、請求項10に記載のウイルス送達系。

40

【請求項17】

神経損傷を処置するためのウイルス送達系であって、

(i) 欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するウイルス担体、

(ii) パピローマウイルスに由来する、異種ウイルスエピソーム複製起点、

(iii) 異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列であって、前記少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、配列、および

(iv) 目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNA

50

を含み、神経損傷を有する対象に投与されることを特徴とする、ウイルス送達系。

【請求項 18】

前記目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAが神経成長因子である、請求項17に記載のウイルス送達系。

【請求項 19】

創傷治癒を増強するためのウイルス送達系であって、

(i) 欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するウイルス担体、

(ii) パピローマウイルスに由来する、異種ウイルスエピソーム複製起点、

(iii) 異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列であって、前記少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、配列、および

(iv) 少なくとも1つの目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNA

を含み、創傷を有する対象に投与されることを特徴とする、ウイルス送達系。

【請求項 20】

前記目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAが血小板由来増殖因子または血管内皮増殖因子である、請求項19に記載のウイルス送達系。

【請求項 21】

前記創傷が事故または損傷によるものである、請求項19に記載のウイルス送達系。

【請求項 22】

前記創傷が外科手術によるものである、請求項19に記載のウイルス送達系。

【請求項 23】

前記創傷が火傷である、請求項19に記載のウイルス送達系。

【請求項 24】

前記創傷が骨の癒合不全である、請求項19に記載のウイルス送達系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権および参照による援用

本出願は、2015年6月10日に出願され、Non-Integrating Viral Delivery System and Methods of Use Thereofと題する米国仮出願番号第62/173,748号に基づく優先権を主張しており、この仮出願は、その全体が参考として援用される。

【0002】

分野

本発明は概して、ウイルスベクター、および遺伝子送達のための系、および他の治療、診断、または調査使用のための分野に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

ウイルスベクターは、特異的なウイルスエンベロープ-宿主細胞受容体の相互作用および遺伝子発現のためのウイルスメカニズムのために、遺伝子を標的細胞に形質導入するために使用され得る。その結果、ウイルスベクターは、全胚、受精卵、単離された組織試料、in situでの組織標的、および培養された細胞株を含む、多くの異なる細胞型への遺伝子の移入のための媒体として使用されている。外来遺伝子を細胞内に導入し、発現させる能力は、遺伝子発現の研究、ならびに細胞システムの解明、ならびに、遺伝子療法、誘導された多能性幹細胞の体細胞リプログラミング、および様々なタイプの免疫療法などの治療的介入の可能性の提供に有用である。

【0004】

10

20

30

40

50

遺伝子療法に利用可能な多種多様な可能性のある遺伝子を考慮して、これらの遺伝子を送達する効率的な手段が望まれている。マウスレトロウイルス、アデノウイルス、およびパルボウイルス（アデノ随伴ウイルス）を含むいくつかのウイルス系が、治療用遺伝子移入ベクターとして開発されている。発現の安定性および制御、ゲノムパッケージング能力、ならびに構築物依存性のベクター安定性を含む多くの因子が、ウイルスベクターを開発する際に考慮されなければならない。さらに、ウイルスベクターの *in vivo* での適用は、ウイルス構造タンパク質および/または形質導入された遺伝子産物に対する宿主の免疫応答によって制限されることが多い。

【0005】

組換えポリペプチド、または小型RNAを含む遺伝子調節分子の生産のためのアプローチは、安定な発現系の使用である。これらの系は、形質導入されたレトロウイルスゲノム（または少なくともその一部）の、宿主細胞ゲノムへの染色体組み込み、短期間のプラスミドトランスフェクション、または半減期も限定された非組み込みウイルスベクターに基づく。遺伝子組み込みの部位は一般的にランダムであり、任意の特定の部位で組み込まれる遺伝子の数および比率は予測不可能であることが多い。同様に、非組み込みプラスミドまたはウイルスベクターは核DNAも生成するが、これらの種は通常、DNAの複製および連続的な維持に必要な配列を欠いている。したがって、染色体組み込みに依存するベクターは、治療間隔を超え得る組換え遺伝子の永続的な維持をもたらす、そしてプラスミドまたは他の非複製DNAの制御は不十分であり、所望の治療期間が完了する前に崩壊し得る。

【0006】

遺伝子発現のための安定な発現系の代替は、一過性発現系である。一過性遺伝子発現系の発現は非組み込み型プラスミドに基づくものであり、したがって、典型的には細胞が分割するにつれ発現が失われたり、またはプラスミドベクターが内因性ヌクレアーゼによって破壊されたりする。したがって、一過性遺伝子発現系は、典型的には時間がたつにつれて発現が不十分になることから従来通り反復処置を要することとなり、これは一般的に望ましくない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

要旨

一実施形態では、本発明は、新規な非組み込みウイルス送達系およびその使用方法に関する。

【0008】

一態様では、本発明は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子調節RNAを含むウイルス送達系であって、ウイルス担体が欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、ウイルス送達系に関する。

【0009】

一部の実施形態では、ウイルス担体はレンチウイルスであるが、他のウイルス担体もまた適切であり得る。一部の実施形態では、異種ウイルスエピソーム複製起点は、ウシパピローマウイルスまたはヒトパピローマウイルスなどのパピローマウイルスに由来し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質は、パピローマウイルスE1および/またはE2である。ある特定の実施形態では、E1およびE2の両方が、本明細書において記載される系に存在する。

【0010】

あるいは、一部の実施形態では、異種ウイルスエピソーム複製起点は、エプスタイン・

10

20

30

40

50

パーウイルスまたは関連する哺乳動物ヘルペスウイルスのいずれかに由来し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質は、EBNA-1またはそれぞれ個々のヘルペスウイルスにおいて見られる特異的なイニシエータータンパク質である。

【0011】

別の態様では、開示される発明は、開示されるウイルス送達系および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【0012】

別の態様では、開示される発明は、疾患の処置または予防を必要とする対象を識別するステップ、および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、疾患を処置または予防する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するか、または組み込みはウイルスインテグラーゼタンパク質の医薬阻害剤によってサイレンシングされ、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。

【0013】

一部の実施形態では、疾患は、エボラウイルス、ラッサ熱ウイルス、または特異的抗体によって保護され得るあらゆるウイルス性因子などの感染性疾患であり得、また、これらの実施形態では、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、エボラウイルスまたはラッサ熱ウイルスまたはあらゆる他の特異的ウイルス標的に特異的な抗体をコードし得る。

【0014】

一部の実施形態では、疾患は、Staphylococcus aureusもしくはEscherichia coli、または他の細菌病原体、真菌病原体、もしくは原生動物病原体などの感染性疾患であり得、ここで、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、病原体の複製を低減させるかまたは外因性の病原体が生産する毒素の活性をブロックすることを標的にする抗体をコードする。

【0015】

一部の実施形態では、開示される方法を使用して処置または予防される疾患は、遺伝子疾患または障害である。一部の実施形態では、遺伝子疾患はアルコール乱用であり、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、脳由来の増殖因子をコードする。

【0016】

別の態様では、開示される発明は、神経損傷を有する対象を識別するステップ、および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、神経損傷を処置する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。一部の実施形態では、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、神経成長因子である。

【0017】

さらに別の実施形態では、開示される発明は、創傷を有する対象を識別するステップ、

10

20

30

40

50

および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、創傷治癒を増強する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。創傷は、例えば、事故、損傷、または外科手術によるものであり得る。一部の実施形態では、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、血小板由来増殖因子または血管内皮増殖因子である。

10

【0018】

別の実施形態では、開示される発明は、外傷性熱傷を有する対象を識別するステップ、および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、外傷性皮膚熱傷からの回復を増強する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み得、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。皮膚外傷は、化学的または物理的（熱または紫外線または放射線照射）損傷によるものであり得る。一部の実施形態では、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、表皮もしくはケラチン生成細胞増殖因子または表皮細胞の成長および分化の他のプロモーターをコードする。

20

【0019】

別の実施形態では、開示される発明は、がんまたは新生物疾患を有する対象を識別するステップ、および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、がんまたは新生物疾患を処置する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み得、ここで、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、腫瘍抗原を標的とする抗体、または、免疫療法、外科手術、放射線照射、もしくは化学療法に対する腫瘍の感受性を改変することを意図したポリペプチドおよび/もしくは調節RNAをコードする。

30

【0020】

別の実施形態では、開示される発明は、遺伝子の欠失、改変、または再シーケンシングのための系を含む、タンパク質および/または核酸を送達するための系である。染色体遺伝子を改変するための現在の技術は、オフターゲット効果を予防するための適切な安全因子を欠く。提案される発明では、本発明のDNA改変系をコードする遺伝子は、所要の治療期間後に確実に枯渇される。

40

【0021】

別の実施形態では、開示される発明は、創傷を有する対象を識別するステップ、および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、骨の治癒を増強する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起

50

点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。骨折は、例えば、事故、損傷、外傷、または外科手術によるものであり得、また、骨の癒合不全または急性骨折または所要の脊椎固定術であり得る。一部の実施形態では、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、骨形成タンパク質1~4またはシクロオキシゲナーゼ-2または血管内皮増殖因子をコードする。

【0022】

先の一般的記載および以下の詳細な説明は、例示的で説明的なものであり、特許請求の範囲に記載の本発明をさらに説明することを意図したものである。他の目的、利点、および新規な特長は、以下の図面の簡単な説明および本発明の詳細な説明から当業者に容易に明らかである。

10

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、本発明の実施形態に従ったウイルスベクター内の例示的なウイルスを示す図である。

【図2】図2は、E1イニシエータータンパク質も含有する例示的なベクター・イン・ベクター(VIV)の実施形態(ベクター1)を示す図である。

【図3】図3は、ベクター1を使用する293T細胞における形質導入の結果を示す図である。

【図4】図4は、E1およびE2イニシエータータンパク質の両方をまた含有する例示的なベクター・イン・ベクターの実施形態を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0024】

詳細な説明

本明細書において開示されるのは、非組み込み性の、エピソーム複製するウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)およびその使用方法である。本発明のようなエピソームで複製するベクターは、ウイルス様Papovaviridae(例えば、ウシパピローマウイルスまたはBPV)またはHerpesviridae(例えば、エプスタイン・バーウイルスまたはEBV)またはHepadnaviridae(例えば、B型肝炎ウイルスまたはHBV)のウイルス成分を含有し得る。これらのウイルスに由来するエピソームで複製するベクターは、複製起点および少なくとも1つのウイルストランス作用因子、例えば、BPVポリメラーゼのためのE1およびEBVもしくはHBVポリメラーゼのためのEBNA-1などのイニシエータータンパク質、またはアデノウイルスの末端結合タンパク質を含有し得る。エピソーム複製のプロセスは、典型的には、宿主細胞の複製機構およびウイルストランス作用因子の両方を組み入れる。

30

【0025】

異種ウイルスの複製起点を使用することによって、新規なベクターは、複製起点を認識するために必要なウイルスタンパク質の発現の「オフ」スイッチで操作され得る。ベクターのDNA複製のスイッチオフは、形質導入された遺伝子のさらなる発現を防ぎ、ウイルスベクターは時間とともに消えて、その結果、形質導入された遺伝子はもはや宿主細胞内に存在しなくなる。開示される系および方法は、形質導入された遺伝子の過剰発現または発現の延長から生じるあらゆる毒性効果を予防する能力を含む、先行技術に対する多くの改善を提供する。一旦DNA複製が停止した遺伝子を排除することで、その後の望ましくない遺伝子発現またはロックダウンが予防される。同様に、エピソーム複製の有益な点を異種ウイルス系に組み合わせることによって、目的の遺伝子を様々な細胞型に安全かつ効率的に形質導入し得るプラットフォームが提供される。

40

【0026】

パピローマウイルス

パピローマウイルスは、哺乳動物細胞において主にエピソームとして複製する。DNAヘリカーゼとして機能するウイルスE1タンパク質の、ウイルス複製起点(ori)に対

50

する作用が、感染した上皮細胞の分化状態に応じて細胞当たり数百から数千のコピーの生産を駆動する。この特性を認識して、いくつかの研究所は、「シャトルプラスミド」として公知になったものを使用する、パピローマウイルスに基づく遺伝子送達系の開発を試みた。E・coliにおけるDNAの生産を可能にするための細菌複製起点および哺乳動物細胞におけるエピソーム複製を可能にするパピローマウイルスoriを用いて、多くの研究が遺伝子発現の安全性および耐久性を実証するために行われた。ほとんどのケースにおいて、oriはウシパピローマウイルスに由来するものであった。

【0027】

パピローマウイルスは、表皮細胞および上皮細胞に感染するように進化している。感染細胞が基底面から管腔表面に分化するにつれ、パピローマウイルスはDNA複製を増大させ、コピー数は、大量のウイルスが内腔表面で放出されるまで非常に増える。これによって、ヒトパピローマウイルスから明らかであるように、パピローマウイルスは非常に伝染性となる。コピー数の急増は、主に宿主因子に起因する。しかし、パピローマウイルスのこの特長は、一時的な遺伝子療法が表皮表面および上皮表面を標的にするために利用することができる。

10

【0028】

したがって、パピローマウイルスのある特定の特長は、エピソームベクターの発現および複製を駆動するため、ならびにベクターの発現が特定の細胞型を標的にするために使用することができる。

【0029】

エプスタイン・バーウイルス (EBV)

ヒトヘルペスウイルス4としても公知であるエプスタイン・バーウイルス (EBV) は、ヘルペスウイルスファミリーのメンバーである。これは最も一般的なヒトウイルスの1つであり、ほとんどの人は人生で何度かEBVに感染する。

20

【0030】

EBVは、およそ85の遺伝子を含み、B細胞および上皮細胞に感染することが公知である、二本鎖DNAウイルスである。EBVは、溶解性複製および潜伏複製の両方が可能であり、潜伏複製によって、環状化型のEBVゲノムの宿主細胞核への転座が生じ、核において、EBVは宿主細胞DNAポリメラーゼによって複製され得る。

【0031】

EBVは、少なくとも3つの異なる経路を介して潜伏複製し得るが、各経路は、エピソーム複製起点を結合し宿主細胞の分割の間のエピソームの区分化を媒介するタンパク質である、エプスタイン・バーウイルス核抗原1 (EBNA-1) の発現を伴う。EBNA-1は、EBV遺伝子の調節、複製、およびエピソームの維持における不可欠な役割を有する。

30

【0032】

染色体外で複製するその天然の向性および能力に起因して、EBVは、ウイルスベクターとして興味深い。このようなベクターは、EBVのウイルス発がん遺伝子および/または極めて重要な溶解性遺伝子が欠失するように突然変異することが多い。しかし、ウイルスベクターとしてのEBVの利用性は、これまでのところ、*ex vivo*および調査目的にかなり限定されている。

40

【0033】

B型肝炎ウイルス (HBV)

B型肝炎ウイルス (HBV) は、ヘパドナウイルスファミリーのメンバーである。これは、進行性肝臓線維症、肝炎、および肝細胞癌に関連する、一般的なヒトウイルスである。

【0034】

HBVは、RNA中間体を介しウイルスポリメラーゼに依存して複製する、二本鎖DNAウイルスである。肝細胞におけるHBVの安定な維持は、根絶が困難な、共有結合により閉環したウイルスDNA環状形態の存在に起因する。

50

【 0 0 3 5 】

染色体外で複製するその天然の向性および能力に起因して、ベクターとしてのHBVは、肝細胞の標的化および治療遺伝子の送達のための重要な可能性のある利点を提供する。HBVの固有のライフサイクルは、RNA中間体をウイルスDNAに変換するために必要なウイルスポリメラーゼの制御された発現を介してエピソームDNAレベルを調節するための固有の方法を提供する。

【 0 0 3 6 】

レトロウイルス

レトロウイルスは、RNA鋳型からDNAコピーを生成することが可能な逆転写酵素をコードすること、および宿主細胞染色体へのプロウイルスの組み込みを特徴とするウイルスファミリーである。レンチウイルスは、顕著な量のウイルス核酸を宿主細胞内に送達し得るレトロウイルスの属である。レンチウイルスは、分裂していない細胞に感染する/形質導入する固有の能力を有することを特徴とし、形質導入の後、レンチウイルスは自らの核酸を宿主細胞の染色体に組み込む。

10

【 0 0 3 7 】

感染性レンチウイルスは、病原性タンパク質gag、pol、およびenvをコードする3つの主要な遺伝子、ならびにtatおよびrevを含む2つの調節遺伝子を有する。特異的な血清型およびウイルスに応じて、ウイルス核酸の調節、合成、および/またはプロセッシング、ならびに他の複製機能に関与するタンパク質をコードするさらなるアクセサリ遺伝子が存在し得る。

20

【 0 0 3 8 】

さらに、レンチウイルスは、およそ600nt長であり得る長い末端反復(LTR)領域を含有する。LTRは、U3、R、およびU5領域にセグメント化され得る。LTRは、インテグラーゼの作用を介して宿主染色体へのレトロウイルスDNAの組み込みを媒介し得る。あるいは、インテグラーゼを機能化せずに、LTRは、ウイルス核酸を環状化するために使用され得る。

【 0 0 3 9 】

レンチウイルス複製の初期段階に関与するウイルスタンパク質には、逆転写酵素およびインテグラーゼが含まれる。逆転写酵素は、ウイルスによってコードされる、RNA依存性のDNAポリメラーゼである。この酵素は、ウイルスRNAゲノムを相補的DNAコピーの合成のための鋳型として使用する。逆転写酵素はまた、RNA鋳型の破壊のためのRNaseH活性を有する。インテグラーゼは、逆転写酵素によって生成されるウイルスcDNAおよび宿主DNAの両方を結合する。インテグラーゼは、ウイルスゲノムを宿主DNA内に挿入する前にLTRをプロセッシングする。tatは、転写の間にトランス活性化因子として作用して、ウイルスDNAから作製されるRNAコピーの開始および伸長を増強する。rev応答性エレメントは転写後に作用し、mRNAのスプライシングおよび細胞質への輸送を調節する。

30

【 0 0 4 0 】

ベクター・イン・ベクター技術

本明細書において開示されるのは、様々なウイルス種の所望の特長を組み合わせることによって遺伝子の送達および発現を正確に調節し得る、新規なベクター・イン・ベクター(VIV)系である。レンチウイルス(LV)プラットフォームを含む多くのウイルスベクターが、当技術分野において公知である。LVは、製造の容易性および柔軟な標的化特徴という有益な点を有するが、レンチウイルスの形質導入は、安定な形質導入のほとんどの他の形態と同様に、LVペイロードの染色体組み込みを生じさせる。染色体組み込みの特性は、ウイルスインテグラーゼ遺伝子を不活化する突然変異を介して無効にされ得る。

40

【 0 0 4 1 】

染色体組み込みを避けることによって、in vivoでの遺伝子送達に対する障壁が低減する。組み込みに欠陥のあるLVでさえ、組み込みのバックグラウンド頻度を有し、いかなるDNA分子も宿主配列と再び組み合わさるための相同性をわずかに有し得る。し

50

かし、これらの組み込み率は非常にわずかであり、通常は臨床的に有意ではない。

【0042】

例として、パピローマウイルスoriプラスE1タンパク質、またはEBV oriプラスEBNA-1、またはヘパドナウイルス末端プラスウイルスポリメラーゼが、通常はエピソームで維持され得ない異種ウイルスの遺伝子カーゴの一部として付加され得る。この異種ウイルス複製機構をレンチウイルスベクターに組み入れることで、目的の治療遺伝子を収容し得るおよそ5kbのさらなるカーゴ空間が残る。

【0043】

さらに、他の制御エレメントを、開示されるVIV系内に組み入れることができる。例えば、E1またはEBNA-1またはHBVポリメラーゼの発現は、誘導性プロモーターによって駆動され得る。多くのタイプの誘導性プロモーターが当技術分野において公知であり、本発明の目的では、誘導性プロモーターには、限定はしないが、抗生物質（すなわち、テトラサイクリン、アミノグリコシド、ペニシリン、セファロスポリン、ポリミキシンなど）もしくは他の薬物、銅および他の金属、アルコール、ステロイド、光、酸素、熱、冷氣、または他の物理的もしくは化学的刺激に応答するプロモーターが含まれ得る。例えば、開示されるウイルス系を使用する方法は、カーゴ遺伝子の発現のための薬物のコンスタントな供給に依存するテトラサイクリン誘導性の遺伝子発現を採用し得る。誘導性プロモーターを誘導するために使用される化合物は、エピソーム複製の期間および所望のカーゴ送達のタイミングに応じて1回または繰り返して添加され得る。DNA複製およびエピソームの維持は、E1および場合によってはE2またはEBNA-1の誘導に依存し、次いで、この誘導は、遺伝子発現の誘導因子（すなわち、テトラサイクリン）に依存する。VIV系の例示的な図解を図1に示す。VIV系の別の例示的な図解を図2に示す。図2に示すように、E1イニシエータータンパク質が存在し、カーゴはEF1-HTLVプロモーター下のGFPである。VIV系の別の例示的な図解を図4に示し、この図において、遺伝子カーゴはCMV/GFP発現カセットとして表される。カーゴ遺伝子配列は、カーゴ遺伝子の5'末端に同一である合成オリゴヌクレオチドプライマー、およびカーゴ遺伝子の3'末端に相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅され得る。5'プライマーは、エンドヌクレアーゼのための認識部位を有するその5'末端から伸長され得る。3'プライマーもまた、エンドヌクレアーゼ認識のための相補体を有するその3'末端で伸長され得る。得られた増幅されたカーゴ遺伝子配列は、レンチウイルスベクターなどの適切なベクターにアニーリングされ得る。遺伝子カーゴの非限定的な例には、CMV/VEGF、CMV/抗上皮増殖因子受容体（EGFR）、またはmiRNA抑制性C-Cケモカイン受容体5型（CCR5）が含まれる。

【0044】

カーゴの適切な発現は、適切なアッセイによって判定され得る。例えば、DNAのコピー数は、定量PCRによって測定され得る。ベクター1またはベクター19（本明細書において記載される）のいずれかから翻訳されたタンパク質産物は、例えば分析用フローサイトメトリーによって測定され得る。ELISAアッセイは、VEGFなどの分泌型タンパク質などのある特定のカーゴの存在を検出するために使用され得る。ウェスタンブロット技術もまた、抗EGFRなどの抗体などのある特定のカーゴを検出するために使用され得る。さらに、CCR5などのケモカイン受容体などのカーゴタンパク質の細胞表面発現の低減のモニタリングもまた採用され得る。

【0045】

図1に示すように、開示されるVIVは、目的の少なくとも1つの遺伝子または配列を含み得る。VIVに組み入れられる遺伝子または配列は、VIVの目的に依存する。図1を参照すると、レンチウイルスがインテグラーゼ欠陥系でパッケージングされるか、または形質導入が、インテグラーゼ活性をブロックするために使用される臨床的薬物（例えば、ドルテグラビルまたはラルテグラビル）の存在下で行われる。組み込みが失敗すると、直鎖状の二本鎖ベクターDNAは一般的に、宿主の酵素機構を使用して環状化する。薬物

10

20

30

40

50

誘導性プロモーターは、必要に応じてE 1 および/またはE 2 タンパク質を発現させるように活性化され得、これによって次いでDNA複製を駆動する。治療カーゴはカセットから発現される。様々な実施形態では、誘導性プロモーターを誘導する化合物(本明細書では「誘導因子」とも呼ばれる)は、中止されるかまたは停止される。誘導因子の停止は、E 1 および/またはE 2 の合成を下方調節する。さらなる実施形態では、E 1 および/またはE 2 の生産は効果的に停止する。いずれの事象においても、これによってエピソームDNAのレベルが低下し、最終的にベクター構築物が排除される。図1および2は、E 1 を含有するV I V系を示す。図4は、単一のウイルスベクター上にE 1 およびE 2 の両方を含有するV I V系を示す。好ましい実施形態では、同一のmRNAからE 1 およびE 2 の両方を発現するために、内部リボソーム侵入部位(IRES)を付加して、タンパク質翻訳の再開を可能にする。

10

【0046】

例えば、血小板由来増殖因子(PDGF)をコードする遺伝子が、目的のshRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAと共に、遺伝子として、創傷治癒を促進するために使用されるV I Vに組み入れられ得る。開示されるV I V系は、発現され得る遺伝子または配列のタイプに限定されない。したがって、開示されるV I Vは、多くの治療的または予防的遺伝子または配列、例えば、感染性疾患またはがんに関連する抗原(複製している病原体上の抗原、および外因性毒素である抗原、および腫瘍細胞上の抗原を含む)に対する抗体、血小板由来増殖因子、血管内皮増殖因子、脳由来の増殖因子、神経成長因子、ヒト増殖因子、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、嚢胞性線維症の膜貫通コンダクタンス調節因子(CFTR)、ジストロフィンまたはジストロフィン関連複合体、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、リポタンパク質リパーゼ、および/または - サラセミア、因子V I I I、骨形成タンパク質1~4、シクロオキシゲナーゼ2、血管内皮増殖因子、ケモカイン受容体CCR5、ケモカイン受容体CXCR4、ケモカイン受容体CXCR5、大腸炎、炎症性腸疾患、またはクローン病に關与する自己免疫抗原に対するアンチセンスDNAまたはRNA、アヘン剤またはアルコールに対する神経衰弱を調節するmiRNAを含む常用癆に關与する低分子干渉RNA、腫瘍サプレッサー遺伝子、プロアポトーシスまたは抗アポトーシス遺伝子およびプロ自食作用または抗自食作用遺伝子を含む細胞生存を調節する遺伝子、放射線照射耐性因子をコードする遺伝子、腫瘍細胞の転移または他の細胞輸送現象の追跡に使用される発光タンパク質をコードする遺伝子、あるいは、放射線照射、外科手術、もしくは化学療法最大の効果を得るために身体を調整して、または放射線照射、外科手術、もしくは化学療法から組織を保護して、器官の移植を改善するかまたは特に気道における過剰反応性を抑制するべく宿主組織またはグラフト組織を改変するために使用され得る様々な他の治療上有用な配列をコードする配列を組み入れ得る。

20

30

【0047】

V I V系において遺伝子をエピソーム形態に維持することによって、安全性スイッチが組み込まれる。遺伝子産物が毒性であれば、誘導因子分子の中止によってDNA複製が停止し、エピソーム数はその後減少し、遺伝子およびベクターは消失する。従来の調節型遺伝子発現と異なり、安全性スイッチとして開示される発現構築物は内因性ヌクレアーゼによって分解され、それが効果的に消失するまで細胞分裂によって希釈され、これによって、あらゆる短期または長期のブレイクスルー発現が予防される。

40

【0048】

目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAをエピソーム形態に維持することによって、広範囲にわたり、かつ従来のレンチウイルス形質導入によって達成されるよりもはるかに高いレベルでコピー数を調節することも可能になる。

【0049】

開示されるV I V系は、多くの有益な点を示す。例えば、エピソームDNAは、染色体改変に対する感受性が低く、これによって、従来の形質導入ベクターの遺伝子サイレンシ

50

ングが生じ得る。同様に、V I V エピソーム D N A ベクターは、少なくとも、約 1 から約 4 ヶ月、および場合によってはそれ以上の短期間から中期間にわたって、活性な遺伝子送達をサポートする。本発明の他の実施形態では、エピソーム D N A ベクターは、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、または約 12 週間の期間にわたって、活性な遺伝子送達をサポートする。他の実施形態では、エピソーム D N A ベクターは、約 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月、6 ヶ月、7 ヶ月、8 ヶ月、9 ヶ月、10 ヶ月、11 ヶ月、12 ヶ月、またはそれ以上の期間にわたって、活性な遺伝子送達をサポートする。これらの期間のあらゆる組合せ、例えば、1 ヶ月および 1 週間、または 3 ヶ月および 2 週間もまた、本発明の方法において使用することができる。

【 0 0 5 0 】

開示される V I V 系の組み込みのためのレンチウイルス担体の使用に特異的に関連する有益な点があるが、開示される系は、単一のタイプのウイルスベクターに限定されない。限定はしないが、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス (A A V)、アデノウイルス、ワクシニア、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、ヘパドナウイルス、パルボウイルス、およびマウスウイルスを含む、あらゆる D N A ウイルスまたは D N A 中間体を使用するウイルスを、V I V 複製戦略を組み入れるための担体として使用することができる。

【 0 0 5 1 】

方法

一部の実施形態では、本発明は、それを必要とする患者に V I V ベクターを投与方法であって、V I V ベクターが少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、または少なくとも 5 つの目的の遺伝子をコードする方法に関する。多用途性および治療可能性および開示される V I V 系を考慮すると、本発明の V I V 系は、限定はしないが、感染性疾患または感染性病原体によって生産される毒素に関連する抗原に対する抗体、血小板由来増殖因子、血管内皮増殖因子、脳由来の増殖因子、神経成長因子、ヒト増殖因子、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、嚢胞性線維症の膜貫通コンダクタンズ調節因子 (C F T R)、ジストロフィンまたはジストロフィン関連複合体、リポタンパク質リパーゼ、 - および / または - サラセミア、因子 V I I I、骨形成タンパク質 1 ~ 4、シクロオキシゲナーゼ 2、血管内皮増殖因子、ケモカイン受容体 C C R 5、ケモカイン受容体 C X C R 4、ケモカイン受容体 C X C R 5、大腸炎、炎症性腸疾患、またはクローン病に關与する自己免疫抗原に対するアンチセンス D N A または R N A、アヘン剤またはアルコールに対する神経衰弱を調節する m i R N A を含む常用癆に關与する低分子干渉 R N A、腫瘍サプレッサー遺伝子、プロアポトーシスまたは抗アポトーシス遺伝子およびプロ自食作用または抗自食作用遺伝子を含む細胞生存を調節する遺伝子、放射線照射耐性因子をコードする遺伝子、腫瘍細胞の転移または他の細胞輸送現象の追跡に使用される発光タンパク質をコードする遺伝子、あるいは、放射線照射、外科手術、もしくは化学療法の最大効果を得るために身体を調整して、または放射線照射、外科手術、もしくは化学療法から組織を保護して、器官の移植を改善するかまたは特に気道における過剰反応性を抑制するべく宿主組織またはグラフト組織を改変するために使用され得る様々な他の治療上
有用な配列を含む遺伝子または核酸配列をコードし得る。

【 0 0 5 2 】

感染性疾患

開示される組成物および方法は、特に、高リスク地域に一時的に居住している個体に対する、疾患からの保護を提供し得る。遺伝子療法のための鍵となる標的は、遺伝子産物が慢性的に発現している場合に、大きなリスクを伴う。1 つの例示的な適用は、風土病地域内を移動する個体 (例えば、エボラ感染地域に入る衛生兵および救援隊員) を保護するために必要な、致命的なウイルス性因子に対する防御抗体を含むモノクローナル抗体の予防的送達である。ワクチンは、エボラもしくはラッサ熱ウイルス、またはデング熱、またはチクングニヤウイルス、またはマラリアの原因である P l a s m o d i u m s p p . などの疾患についてはほとんど試験されておらず、組み込みベクターの使用を介する予防的抗体遺伝子の慢性的発現は、未知の健康上のリスクを有する。したがって、高いが一過性

10

20

30

40

50

でなくてはならない効果的な抗体発現が医学的に非常に要求されている。開示されるVIV系ならびに高いコピー数の目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを限られた期間にわたり送達する方法は、この医学的要求を満たす。

【0053】

一実施形態では、本発明は、感染性疾患に関連する状態、症候、または副作用を処置、予防、または最小になる方法に関する。一部の実施形態では、感染性疾患は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトT細胞白血病ウイルス、エボラウイルス、ラッサ熱ウイルス、デング熱、ジカウイルス、マラリア、結核、狂犬病、ワクシニアウイルス、または他の感染性疾患であり得る。一部の実施形態では、VIVベクターは、予防的にまたは感染性疾患に感染した後に投与され得る。

10

【0054】

創傷治癒

別の実施形態では、本発明は、創傷治癒に関連する状態、症候、または副作用を処置、予防、または最小にする方法に関する。開示される組成物は、全身に、または事故、損傷、もしくは外科手術後の創傷に直接投与され得る。外科手術のケースでは、VIVベクターは、治癒を促進するために予防的に投与され得る。事故、損傷、または外科手術による創傷のケースでは、VIVベクターは、創傷形成のある程度後に投与され得る。例えば、VIVベクターは、創傷形成の約1、約2、約3、約4、約5、約10、約12、約24、約36、約48、約60、約72、約84、約96、約108、約120、または約168時間以内に投与され得る。

20

【0055】

本発明の方法および組成物の別の適用は、創傷治癒を加速させる血小板増殖因子を発現し得るVIV構築物の一時的送達である。高用量の血小板由来増殖因子(PDGF)は、非常に迅速であるが一時的である必要がある。開示される系および方法は、このタイプの適用に理想的である。

【0056】

さらなる短期間の適用には、アルコール乱用の断続的処置のための脳由来の増殖因子の発現、脊髄再生のための神経成長因子、および皮膚状態のための局部適用が含まれる。

【0057】

骨の疾患または損傷

一実施形態では、開示される発明は、骨損傷を有する対象を識別するステップ、および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、骨の治癒を増強する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。骨損傷は、事故、損傷、または外科手術によるものであり得、骨の癒合不全または急性骨折または所要の脊椎固定術であり得る。一部の実施形態では、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、骨形成タンパク質1~4またはシクロオキシゲナーゼ-2または血管内皮増殖因子をコードする。

30

40

【0058】

一実施形態では、開示される発明は、骨疾患を有する対象を識別するステップ、および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、骨の治癒を増強する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA

50

A、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。骨疾患は、例えば、事故、損傷、または外科手術によるものであり得、骨の癒合不全または急性骨折または所要の脊椎固定術であり得る。さらに、骨疾患は、低い骨密度、骨への低い血流量、加齢、遺伝性の状態などであり得る。一部の実施形態では、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、骨形成タンパク質1~4またはシクロオキシゲナーゼ-2または血管内皮増殖因子をコードする。

遺伝性遺伝子疾患

10

【表1】

表1		
障害	突然変異	染色体
22q11.2 欠失症候群	D	22q
アルファ-1-抗トリプシン障害 14q32 アンジェルマン症候群	P	14q32
カナバン病		17p
シャルコー・マリー・トゥース病		
色覚異常	P	X
猫鳴き症候群	D	5
嚢胞性線維症	P	7q
ダウン症	C	21
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	D	Xp
ヘモクロマトーシス	P	6
血友病	P	X
クラインフェルター症候群	C	X
神経線維腫症		17q/22q/?
フェニルケトン尿症	P	12q
多発性嚢胞腎	P	16 (PKD1) または 4 (PKD2)
プラダー・ウィリー症候群	DC	15
鎌状赤血球症	P	11p
テイ・サックス病	P	15
ターナー症候群	C	X

20

30

【0059】

40

別の実施形態では、本発明は、遺伝性遺伝子疾患に関連する状態、症候、または副作用を処置、予防、または最小にする方法に関する。このような遺伝性遺伝子疾患のいくつかの例を、以下の命名を用いて、突然変異の原因型および関与する染色体と共に、表1に示す。

P - 点突然変異、または全体が1つの遺伝子内にあるあらゆる挿入/欠失

D - 1つまたは複数の遺伝子の欠失

C - 全染色体の過剰、喪失、またはその両方(染色体異常を参照されたい)

T - トリヌクレオチド反復障害: 遺伝子はその長さを伸長している

【0060】

現在の遺伝子療法には、遺伝子の欠失、置換、または再シーケンシングを介してゲノム

50

DNAを編集する試みが含まれる。当技術分野において公知の様々な遺伝子療法系には、レンチウイルス形質導入による遺伝物質の送達に依存する、Talen、CRISPR-Cas9、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼなどが含まれる。しかし、開示される発明とは異なり、これらの系は、活性な染色体改変系が予想外の部位を改変し得るので、延長された期間の間細胞内で活性であり続け、がんを含む新たな遺伝子疾患に至る予想外の結果を有し得る。宿主DNAの改変に真に実用的な系には、本明細書において開示されている方法などの方法を介する、一過性で良く調節された発現が必要である。

【0061】

したがって、一実施形態では、開示される発明は、遺伝性遺伝子疾患を有する対象を識別するステップ、および治療有効量の本発明に従ったウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、遺伝性遺伝子疾患を処置する方法に関する。ウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質をコードする配列、ならびに少目的のなくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAを含み、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。遺伝性遺伝子疾患は、例えば、表1に列挙する疾患であり得、一部の実施形態では、目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNAは、表1に列挙する遺伝子の非突然変異型をコードする。

【0062】

ガイドRNA標的配列を開示されるVIVベクターに組み入れることも可能である。ガイドRNAは、変異したか、または他の方法で修正を要する宿主ゲノム内の特定部位に遺伝子編集機構を向けるために使用される配列である。VIVベクターのカーゴ内にガイドRNAを含めることによって、修正を要する染色体セクションの改変が可能になり、同一の改変がVIV内で生じて、宿主による分解および/または希釈が加速する。したがって、本発明のある特定の実施形態では、開示されるウイルス送達系は、ウイルス担体、異種ウイルスエピソーム複製起点、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質をコードする配列、目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、および/または他の遺伝子サイレンシングRNA、ならびに少なくとも1つのガイドRNAを含み、ここで、ウイルス担体は欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有し、異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質をコードする配列の発現は、誘導性プロモーターの制御下にある。

【0063】

細胞または組織のex vivoでの改変

別の実施形態では、VIVベクターは、疾患の治療に使用される細胞または組織を改変するために使用され得る。細胞には、限定はしないが、リンパ球、幹細胞、上皮細胞、神経細胞などの一次細胞が含まれ得る。例えば、VIVベクターは、がん、感染性疾患、または自己免疫を含む特定疾患に再び向けられるリンパ球を改変するために、かつ遺伝子改変された細胞の長期的存在が健康上のリスクを有する場合に、使用され得る。例えば、VIVベクターは、高レベルの転写産物因子を要する多能性幹細胞を規定された間隔にわたりプログラムするために、そして組み込まれたウイルスベクターの長期的存在が望ましくない場合に、使用され得る。合成皮膚または他の適用に使用され得る上皮細胞は、処置後の正常組織の機能に有害となりVIVベクターによって最良に送達される栄養因子または増殖因子の、最初の処置の間の発現を要し得る。

【0064】

用量および剤形

開示されるVIVベクターは、目的の遺伝子または配列の短期、中期、または長期の発現、および開示されるベクターのエピソームでの維持を可能にする。したがって、投薬レジメンは、処置される状態および投与方法に基づいて変化し得る。

【0065】

一実施形態では、V I Vは、必要とする対象に様々な用量で投与され得る。具体的には、対象は、 10^6 感染用量（1標的細胞を形質導入するために平均して1用量が必要とされる）で投与され得る。さらに具体的には、対象は、 10^7 、 10^8 、 10^9 、または 10^{10} 感染用量で投与され得る。V I V投薬の上限は疾患適応症ごとに決定され、個々の製品または製品ロットについての毒性/安全性プロファイルに基づく。

【0066】

さらに、本発明のV I Vは、1日に1回または2回投与され得る。あるいは、V I Vは、必要とする対象に1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、1ヶ月おき、3ヶ月おき、6ヶ月おき、9ヶ月おき、1年に1回、18ヶ月おき、2年おき、3

10

【0067】

一実施形態では、V I Vは医薬組成物として投与される。一実施形態では、V I Vを含む医薬組成物は、臨床適用のために、広範な、経鼻、肺、経口、局所的、または非経口形で製剤化され得る。剤形のそれぞれは、様々な崩壊剤、界面活性剤、充填剤、増粘剤、結合剤、湿潤剤などの希釈剤、または他の薬学的に許容される賦形剤を含有し得る。V I Vを含む医薬組成物はまた、注射のために処方され得る。

【0068】

V I V組成物は、鼻腔内投与、バツカル投与、舌下投与、経口投与、直腸投与、眼投与、非経口（静脈内、皮内、筋肉内、皮下、大槽内、腹腔内）投与、肺投与、膈内投与、局

20

【0069】

さらに、V I V組成物は、固体剤形、錠剤、丸剤、トローチ剤、カプセル剤、液体分散剤、ゲル剤、エアロゾル剤、肺エアロゾル剤、鼻エアロゾル剤、軟膏剤、クリーム剤、半固体剤形、および懸濁剤などの、あらゆる薬学的に許容される剤形に製剤化され得る。さらに、組成物は、制御放出製剤、持続放出製剤、即時放出製剤、またはそのあらゆる組合せであり得る。さらに、組成物は経皮送達系であり得る。

【0070】

別の実施形態では、V I Vを含む医薬組成物は、経口投与のための固体剤形に製剤化され得、固体剤形は、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、またはピル剤であり得る。さらに別の実施形態では、固体剤形は、炭酸カルシウム、デンプン、ショ糖、乳糖、微晶質セルロース、またはゼラチンなどの1つまたは複数の賦形剤を含み得る。さらに、固体剤形は、賦形剤に加えて、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤を含み得る。一部の実施形態では、経口剤形は、即時放出または改変された放出形態であり得る。改変された放出剤形には、制御または延長放出、腸溶性放出などが含まれる。改変された放出剤形で使用される賦形剤は、当業者に一般に公知である。

30

【0071】

さらなる実施形態では、V I Vを含む医薬組成物は、舌下またはバツカル剤形として製

40

【0072】

なおさらなる実施形態では、V I Vを含む医薬組成物は、経鼻剤形として製剤化され得る。本発明のこのような剤形は、鼻送達のための溶液剤、懸濁剤、およびゲル組成物を含む。

【0073】

一実施形態では、医薬組成物は、経口投与のための液体剤形、例えば、懸濁剤、エマルジョン剤、またはシロップ剤に製剤化され得る。他の実施形態では、液体剤形は、水および液体パラフィンなどの一般に使用される単純な希釈剤に加えて、湿潤剤、甘味料、香料

50

、または防腐剤などの様々な賦形剤を含み得る。特定の実施形態では、V I Vを含む組成物またはその薬学的に許容される塩は、小児患者への投与に適するように製剤化され得る。

【 0 0 7 4 】

一実施形態では、医薬組成物は、無菌水溶液剤、懸濁剤、エマルジョン剤、非水性溶液剤、または坐剤などの、非経口投与のための剤形に製剤化され得る。他の実施形態では、非水性溶液剤または懸濁剤には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリブオイルなどの植物油、またはオレイン酸エチルなどの注射可能なエステルが含まれ得る。坐剤の基材として、ウイテプゾール、マクロゴール、t w e e n 6 1、カカオ油、ラウリン油、またはグリセリン化されたゼラチンを使用することができる。

10

【 0 0 7 5 】

医薬組成物の投薬は、患者の体重、年齢、性別、投与の時間および態様、排出速度、ならびに疾患の重症度に応じて変化し得る。

【 0 0 7 6 】

定義

本明細書で具体的に定義されない語は、当業者によって理解される意味と同じ意味を有すると理解される。

【 0 0 7 7 】

本明細書において使用する場合、用語「約」は当業者によって理解され、それが使用される文脈に応じてある程度変化する。その用語が使用される文脈を考慮しても当業者に自明でない用語が使用される場合には、「約」は、具体的な用語のプラスまたはマイナス10%までを意味する。

20

【 0 0 7 8 】

「処置」は、病状を標的化しそれと戦う、すなわち病状を改善または予防することを意味する。特定の処置はこうして、標的化される病状、ならびに薬物療法および治療的アプローチの現在または将来の状態に応じる。処置は毒性を伴い得る。

【 0 0 7 9 】

活性物質「の投与」または活性物質「を投与する」という用語は、本発明の活性物質を、治療上有用な形態および治療有効量で個体の体内に導入し得る形態で、処置を必要とする対象に提供することを意味する。

30

【 0 0 8 0 】

用語「治療有効量」は、および所与の病気、損傷、疾患、または状態を患っている患者において見られる合併症の症候、進行、または発病を処置または予防するために適切な組成物内の、かつ適切な剤形の、十分な量の本発明の活性物質を差す。治療有効量は、患者の状態またはその重症度、および処置される対象の年齢、体重などに応じて変化する。治療有効量は、例えば、投与経路、対象の状態、および当業者によって理解されている他の因子を含む、多くの因子のいずれかに応じて変化し得る。

【 0 0 8 1 】

用語「処置」または「処置すること」は、概して、処置されている対象の自然経過を改変するための試みへの介入を指し、予防のためまたは臨床病理学の経過の間に行われ得る。所望の効果には、限定はしないが、疾患の発生または再発を予防すること、症候を軽減すること、疾患のあらゆる直接的なまたは間接的な病理学的結果を抑制すること、弱めること、または阻害すること、病状を改善または緩和すること、および寛解または予後の改善を生じさせることが含まれる。

40

【 0 0 8 2 】

用語「個体」、「宿主」、「対象」、および「患者」は、本明細書では区別せずに使用される。

【 0 0 8 3 】

本明細書において使用する場合、「発現」、「発現した」、または「コードする」は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス、および/または転写されたmRNA

50

がその後、ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。発現には、真核細胞における mRNA のスプライシング、または他の形態の転写後改変もしくは翻訳後改変が含まれ得る。

【 0 0 8 4 】

以下の実施例は、本発明を説明するために提供される。しかし、本発明はこれらの実施例において記載されている具体的な条件または詳細に限定されない。本明細書で参照される全ての発行された刊行物は、参照によって具体的に組み入れられる。

【実施例】

【 0 0 8 5 】

(実施例 1)

感染性疾患の処置における V I V の使用

この実施例は、図 1 に例示される非限定的な例によって実証されるように、エボラウイルスまたは他の感染性疾患の処置における開示される V I V の使用を実証する。この実施例において、図 1 に示す「カーゴ」領域の少なくとも 1 つは、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする。

【 0 0 8 6 】

エボラを有する疑いがあるかまたはエボラを有すると診断された対象に、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする治療有効量の V I V を、単独で、またはエボラを処置もしくは予防するための 1 つもしくは複数のさらなる作用物質と組み合わせて投与する。エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする V I V および / またはさらなる作用物質を、当技術分野において公知のまたは本明細書において記載される方法に従って、経口により、鼻腔内に、髄腔内に、眼内に、皮内に、経粘膜的に、イオン泳動的に、局所的に、全身に、静脈内に、皮下に、腹腔内に、または筋肉内に投与する。対象を、限定はしないが、例えば、発熱、疲労、倦怠感、衰弱、目の赤み、関節および筋肉痛、頭痛、吐き気、嘔吐、出血、ならびに死亡を含むエボラに関連する徴候および症候の存在および / または重症度について毎日評価する。処置は、エボラの 1 つまたは複数の徴候または症候が改善または排除されるような時間まで維持する。

【 0 0 8 7 】

エボラを有する疑いがあるかまたはエボラを有すると診断され、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする治療有効量の V I V を投与されている対象が、重症度の低減またはエボラに関連する 1 つもしくは複数の症候の排除を示すことは、合理的に予測される。さらに、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする V I V を 1 つまたは複数のさらなる作用物質と組み合わせて投与することが付加的または相乗的な効果を有することが予想される。

【 0 0 8 8 】

これらの結果は、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする V I V がエボラまたは他の感染性疾患の処置において有用であることを示す。したがって、感染性抗原を特異的に標的とする抗体をコードする V I V は、感染性疾患の処置のためにそれを必要とする対象に V I V を投与することを含む方法において有用である。

【 0 0 8 9 】

(実施例 2)

感染性疾患の予防における V I V の使用

この実施例は、図 1 に例示される非限定的な例によって実証されるように、エボラウイルスまたは他の感染性疾患の予防における開示される V I V の使用を実証する。この実施例において、図 1 に示す「カーゴ」領域の少なくとも 1 つは、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする。

【 0 0 9 0 】

エボラに罹患するリスクが増大している疑いがある対象に、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする予防有効量の V I V を、単独で、またはエボラを処置もしくは予防するための 1 つもしくは複数のさらなる作用物質と組み合わせて、エボラに罹患す

10

20

30

40

50

るリスクが増大している区域に入る前に投与する。エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードするV I Vおよび/またはさらなる作用物質を、当技術分野において公知のまたは本明細書において記載される方法に従って、経口的に、鼻腔内に、髄腔内に、眼内に、皮内に、経粘膜的に、イオン泳動的に、局所的に、全身に、静脈内に、皮下に、腹腔内に、または筋肉内に投与する。対象を、限定はしないが、例えば、発熱、疲労、倦怠感、衰弱、目の赤み、関節および筋肉痛、頭痛、吐き気、嘔吐、出血、ならびに死亡を含むエボラに関連する徴候および症候の存在および/または重症度について毎日評価する。処置は、エボラの1つまたは複数の徴候または症候が予防されるような時間まで維持する。

【0091】

エボラを有する疑いがあるかまたはエボラを有すると診断され、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードする予防有効量のV I Vを投与されている対象の、エボラに罹患するリスクが低減することは、合理的に予測される。さらに、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードするV I Vを1つまたは複数のさらなる作用物質と組み合わせることで投与することがこの点に関して付加的または相乗的な効果を有することが予想される。

10

【0092】

これらの結果は、エボラウイルスを特異的に標的とする抗体をコードするV I Vがエボラまたは他の感染性疾患の予防において有用であることを示す。したがって、感染性抗原を特異的に標的とする抗体をコードするV I Vは、感染性疾患の予防のためにそれを必要とする対象にV I Vを投与することを含む方法において有用である。

20

【0093】

(実施例3)

創傷治癒の増強のためのV I Vの使用

この実施例は、図1に例示される非限定的な例によって実証されるように、創傷治癒の増強のための開示されるV I Vの使用を実証する。この実施例において、図1に示す「カーゴ」領域の少なくとも1つは、血小板由来増殖因子(P D G F)をコードする。

【0094】

創傷(例えば、事故、損傷、または外科手術による)を有する対象に、血小板由来増殖因子(P D G F)をコードする治療有効量のV I Vを、単独で、または創傷を処置もしくは滅菌するための1つもしくは複数のさらなる作用物質と組み合わせることで投与する。V I V P D G Fおよび/またはさらなる作用物質を、当技術分野において公知のまたは本明細書において記載される方法に従って、経口的に、鼻腔内に、髄腔内に、眼内に、皮内に、経粘膜的に、イオン泳動的に、局所的に、全身に、静脈内に、皮下に、腹腔内に、または筋肉内に投与する。対象を、創傷の状態を判定するために毎日評価する。処置は、創傷が治癒し、瘢痕化が最小になるような時間まで維持する。

30

【0095】

創傷を有し、治療有効量のV I V P D G Fを投与されている対象が、創傷治癒の増強を示すことは、合理的に予測される。さらに、P D G FをコードするV I Vを1つまたは複数のさらなる作用物質と組み合わせることで投与することが付加的または相乗的な効果を有することが予想される。

40

【0096】

これらの結果は、P D G FをコードするV I Vが創傷治癒の増強に有用であることを示す。したがって、P D G FをコードするV I Vまたは類似の遺伝子は、創傷の処置のためにそれを必要とする対象にV I Vを投与することを含む方法において有用である。

【0097】

(実施例4)

骨損傷の処置におけるV I Vの使用

この実施例は、図1に例示される非限定的な例によって実証されるように、骨損傷の処置における開示されるV I Vの使用を実証する。この実施例において、図1に示す「カーゴ」領域の少なくとも1つは、血管内皮増殖因子(V E G F)をコードする。

50

【 0 0 9 8 】

骨損傷を有する疑いがあるかまたは骨損傷を有すると診断された対象に、血管内皮増殖因子（VEGF）をコードする治療有効量のVIVを、単独で、または骨損傷を処置するための1つもしくは複数のさらなる作用物質と組み合わせて投与する。VEGFをコードするVIVおよび/またはさらなる作用物質を、当技術分野において公知のまたは本明細書において記載される方法に従って、経口的に、鼻腔内に、髄腔内に、眼内に、皮内に、経粘膜的に、イオン泳動的に、局所的に、全身に、静脈内に、皮下に、腹腔内に、または筋肉内に投与する。対象を、骨損傷に関連する徴候および症候の存在および/または重症度について毎週評価して、治癒の速度および強さを判定する。処置は、骨が治癒するような時間まで維持する。

10

【 0 0 9 9 】

骨損傷を有する疑いがあるかまたは骨損傷を有すると診断され、VEGFをコードする治療有効量のVIVを投与されている対象が、損傷の重症度の低減および治癒の増強を示すことは、合理的に予測される。さらに、VEGFをコードするVIVを1つまたは複数のさらなる作用物質と組み合わせて投与することが付加的または相乗的な効果を有することが予想される。

【 0 1 0 0 】

これらの結果は、VEGFをコードするVIVが骨の損傷または疾患の処置において有用であることを示す。したがって、VEGFをコードするVIVまたは類似の遺伝子は、骨の損傷または疾患の処置のためにそれを必要とする対象にVIVを投与することを含む方法において有用である。

20

【 0 1 0 1 】

（実施例5）

遺伝性疾患の処置におけるVIVの使用

この実施例は、図1に例示される非限定的な例によって実証されるように、嚢胞性線維症（CF）または他の遺伝性遺伝子疾患の処置における開示されるVIVの使用を実証する。この実施例において、図1に示す「カーゴ」領域の少なくとも1つは、嚢胞性線維症の膜貫通コンダクタンス調節因子（CFTR）をコードする。

【 0 1 0 2 】

（CF）を有する疑いがあるかまたは（CF）を有すると診断された対象に、嚢胞性線維症の膜貫通コンダクタンス調節因子（CFTR）をコードする治療有効量のVIVを、単独で、またはCFを処置するための1つもしくは複数のさらなる作用物質と組み合わせて投与する。CFTRをコードするVIVおよび/またはさらなる作用物質を、当技術分野において公知のまたは本明細書において記載される方法に従って、経口的に、鼻腔内に、髄腔内に、眼内に、皮内に、経粘膜的に、イオン泳動的に、局所的に、全身に、静脈内に、皮下に、腹腔内に、または筋肉内に投与する。対象を、限定はしないが、例えば、成長不良、持続性の咳、濃い喀痰および粘液、喘鳴、息切れ、運動能力の低下、肺感染の回復、鼻孔の炎症、油っぽい便、腸閉塞、ならびに体重増加不良を含むCFに関連する徴候および症候の存在および/または重症度について毎週評価する。処置は、CFの1つまたは複数の徴候または症候が改善または排除されるような時間まで維持する。

30

40

【 0 1 0 3 】

CFを有する疑いがあるかまたはCFを有すると診断され、CFTRをコードする治療有効量のVIVを投与されている対象が、重症度の低減またはCFに関連する1つもしくは複数の症候の排除を示すことは、合理的に予測される。さらに、CFTRをコードするVIVを1つまたは複数のさらなる作用物質と組み合わせて投与することが付加的または相乗的な効果を有することが予想される。

【 0 1 0 4 】

これらの結果は、CFTRをコードするVIVがCFまたは他の遺伝性遺伝子疾患の処置において有用であることを示す。したがって、遺伝子疾患に関連する突然変異したまたは他の方法で欠陥のある遺伝子をコードするVIVは、遺伝子疾患の処置のためにそれを

50

必要とする対象にV I Vを投与することを含む方法において有用である。

【0105】

(実施例6)

カーゴを発現させるためのE1を含有するV I Vの使用

緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)をカーゴとして含有する図2に従ったベクターを作製した。ヒトパピローマウイルス16型(NCBI受託番号U89348)の完全な遺伝子座制御領域およびE1タンパク質を含有するDNAを化学的に合成した。個々のセグメントおよび/またはコード配列を最初に合成した。これらを、緑色蛍光タンパク質遺伝子の5'末端に同一である合成オリゴヌクレオチドプライマー、そして緑色蛍光タンパク質の3'末端に相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅した。5'プライマーは、BamHIまたはEcoRIエンドヌクレアーゼのための認識部位を有するその5'末端から伸長した。3'プライマーは、BamHIまたはEcoRIエンドヌクレアーゼ認識部位の相補体を有するその3'末端で伸長した。次いで、得られた増幅された緑色蛍光タンパク質遺伝子配列をBamHIおよびEcoRI制限エンドヌクレアーゼで消化した。

10

【0106】

レンチウイルスベクターは、System Biosciences, Incから入手した。プラスミドをBamHIおよびEcoRI酵素で切断し、過剰に増幅した緑色蛍光タンパク質遺伝子配列と、インサート対ベクターが1:3の比率で混合した。

【0107】

次いで、酵素活性を摂氏70度で20分の熱不活化によって停止させた。上記の混合物を室温まで冷却し、アニーリングを可能にした。

20

【0108】

アニーリング反応は、バクテリオファージT4 DNAリガーゼを用いて、30分、室温で行った。2.5マイクロリットルの得られたライゲーション混合物を、25マイクロリットルのSTBL3コンピテント細菌細胞に添加した。

【0109】

次いで、トランスフェクションを摂氏42度での簡単な(1分)熱ショックによって行った。

【0110】

細菌細胞を、アンピシリンを含有する寒天プレート上にストリークして、細菌培養物を得た。これらの培養物をLuria培養液内で増殖させた。

30

【0111】

増幅した緑色蛍光タンパク質遺伝子配列の、レンチウイルスベクターパッケージングプラスミド内への挿入を確認するために、DNAを上記の細菌培養物から抽出し、標準的な方法によって精製した。精製したDNAを、構築物を作製するために使用した同一のエンドヌクレアーゼで消化した。断片の長さをアガロースゲル電気泳動によって分析し、増幅した緑色蛍光タンパク質遺伝子配列を、Eurofins MWG Operon LLCから入手した特異的プライマーを使用してDNAシーケシングによって検証した。

【0112】

レンチウイルスベクターストックを以下のように作製した。少なくとも2つのレンチウイルスパッケージングプラスミドプラスカーゴプラスミドを、ウイルス遺伝子およびゲノムRNAを発現させるHEK細胞にコトランスフェクトし、インテグラーゼ欠損レンチウイルス粒子内にアSEMBルし、そして培養培地内に放出させた。無細胞上清を、トランスフェクション後3~10日の間隔をあけて生成および回収した。レンチウイルス粒子を、遠心分離、一時的なフロー濾過、サイズ排除クロマトグラフィー、サイズ排除濾過、またはイオン交換クロマトグラフィーを含み得る方法の組合せを含む標準的手順によって精製した。各ストックについての濃度および生物学的活性(ml当たりの形質導入単位数)を判定した。

40

【0113】

50

293T細胞を含む哺乳動物細胞を、レンチウイルス由来エピソームの形成、コピー数、および発現を試験するために使用した。293T細胞に、インテグラーゼ欠損レンチウイルス粒子を、ポリプレンの存在下で、1から10の範囲の感染多重度で形質導入した。吸収されなかったウイルスを、適用の3時間後に細胞を洗浄することによって除去し、細胞を3日間培養した。細胞を蛍光顕微鏡で観察し、GFPを発現している細胞を計数する。形質導入されなかった293T細胞を陰性対照として使用した。データを、培養物中の生存細胞100個当たりのGFP陽性細胞として報告した。最少300個の細胞を顕微鏡視野当たりで計数し、5～10の視野を各複製実験で計数する。1つの陰性対照および3つの複製実験を含む4つの独立した形質導入実験を行って、形質導入された細胞の頻度を判定した。データは図3に示され、3つの複製実験にわたるGFPの発現を示す。

10

【0114】

(実施例7)

カーゴを発現するためのE1およびE2を含有するVIVの使用

図4に示すように、ベクター19を、E1およびE2イニシエータータンパク質の両方を含有するように構築する。この実施例において、遺伝子カーゴはCMV/GFP発現カセットによって表され、適切な誘導性プロモーターをまた、誘導性プロモーターを誘導し得る化合物を外部から添加できるように選択する。

【0115】

293T細胞に、ベクター19を、細胞当たり1から20の間の範囲の形質導入単位の感染多重度で形質導入する。3時間後、細胞を、吸着されなかったピリオンを除去するために培地で洗浄し、培養物に戻す。形質導入の12～24時間後、細胞を、誘導性プロモーターを誘導し得る少なくとも1投薬量の化合物で処理する。誘導性プロモーターを誘導し得る化合物を添加すると、E1およびE2のmRNAがエピソームから転写され、遺伝子座制御領域断片2(LCR/F2)に組み合わされ、そしてアセンブリされて、DNA複製が引き起こされる。レンチウイルス由来のエピソームは、プロモーター誘導の停止のおよそ24～36時間後に崩壊し始める。ベクター19内のカーゴからのタンパク質生成物を、分析用フローサイトメトリーによって測定する。

20

【0116】

本発明のある特定の好ましい実施形態を本明細書において記載し、具体的に例示してきたが、本発明がこのような実施形態に限定されることを意図してはいない。これに対する様々な修正が、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく行われ得る。

30

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

(a) 欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するウイルス担体、

(b) 異種ウイルスエピソーム複製起点、

(c) 異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列であって、前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、配列、および

(d) 目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAを含むウイルス送達系。

40

(項目2)

前記ウイルス担体がレンチウイルスである、項目1に記載のウイルス送達系。

(項目3)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点がパピローマウイルスに由来する、項目1に記載のウイルス送達系。

(項目4)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点がウシパピローマウイルスに由来する、項目3に記載のウイルス送達系。

50

(項目5)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点がヒトパピローマウイルスに由来する、項目3に記載のウイルス送達系。

(項目6)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質がE1である、項目1に記載のウイルス送達系。

(項目7)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質がE2である、項目1に記載のウイルス送達系。

(項目8)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な2つのイニシエータータンパク質を含む、項目1に記載のウイルス送達系。

10

(項目9)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な前記2つのイニシエータータンパク質がE1およびE2である、項目8に記載のウイルス送達系。

(項目10)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点がエプスタイン・バーウイルスに由来する、項目1に記載のウイルス送達系。

(項目11)

前記異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的なイニシエータータンパク質がEBNA-1である、項目10に記載のウイルス送達系。

20

(項目12)

項目1に記載の前記ウイルス送達系および少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

(項目13)

(a) 疾患の処置または予防を必要とする対象を識別するステップ、および

(b) 治療有効量のウイルス送達系を対象に投与するステップ

を含む、疾患を処置または予防する方法であって、前記ウイルス送達系が、

(i) 欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するウイルス担体、

(ii) 異種ウイルスエピソーム複製起点、

30

(iii) 異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列であって、前記少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、配列、および

(iv) 目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNA

を含む、方法。

(項目14)

前記疾患が感染性疾患である、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記感染性疾患がエボラウイルスまたはラッサ熱ウイルスである、項目14に記載の方法。

40

(項目16)

前記目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAが、エボラウイルスまたはラッサ熱ウイルスに特異的な抗体をコードする、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記疾患が遺伝子疾患または障害である、項目13に記載の方法。

(項目18)

前記遺伝子疾患がアルコール乱用である、項目13に記載の方法。

(項目19)

50

前記目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAが、脳由来の増殖因子をコードする、項目13に記載の方法。

(項目20)

(a) 神経損傷を有する対象を識別するステップ、および

(b) 治療有効量のウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、神経損傷を処置する方法であって、前記ウイルス送達系が、

(i) 欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するウイルス担体、

(ii) 異種ウイルスエピソーム複製起点、

(iii) 異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列であって、前記少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、配列、および

(iv) 目的の少なくとも1つの遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNA

を含む、方法。

(項目21)

前記目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAが神経成長因子である、項目20に記載の方法。

(項目22)

(a) 創傷を有する対象を識別するステップ、および

(b) 治療有効量のウイルス送達系を対象に投与するステップを含む、創傷治癒を増強する方法であって、前記ウイルス送達系が、

(i) 欠陥のあるインテグラーゼ遺伝子を有するウイルス担体、

(ii) 異種ウイルスエピソーム複製起点、

(iii) 異種ウイルスエピソーム複製起点に特異的な少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列であって、前記少なくとも1つのイニシエータータンパク質をコードする配列の発現が誘導性プロモーターの制御下にある、配列、および

(iv) 少なくとも1つの目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNA

を含む、方法。

(項目23)

前記目的の遺伝子、shRNA、siRNA、miRNA、または他の遺伝子サイレンシングRNAが血小板由来増殖因子または血管内皮増殖因子である、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記創傷が事故または損傷によるものである、項目22に記載の方法。

(項目25)

前記創傷が外科手術によるものである、項目22に記載の方法。

(項目26)

前記創傷が火傷である、項目22に記載の方法。

(項目27)

前記創傷が骨の癒合不全である、項目22に記載の方法。

10

20

30

40

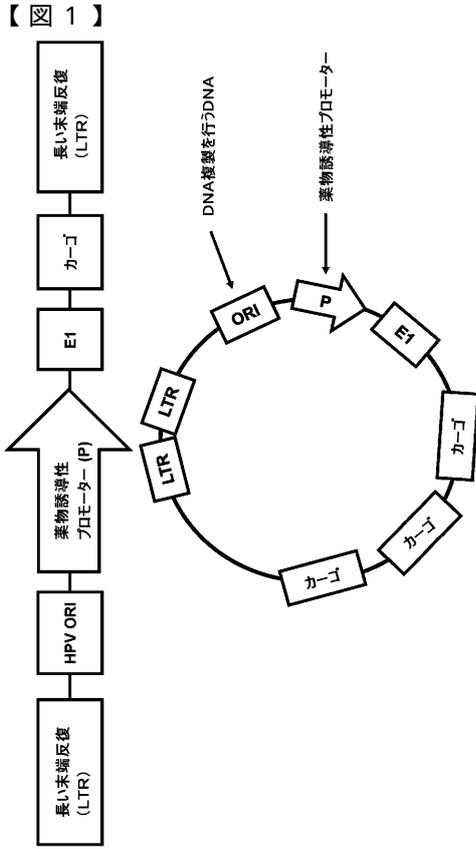


FIG 1

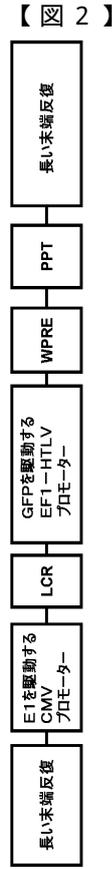


FIG 2

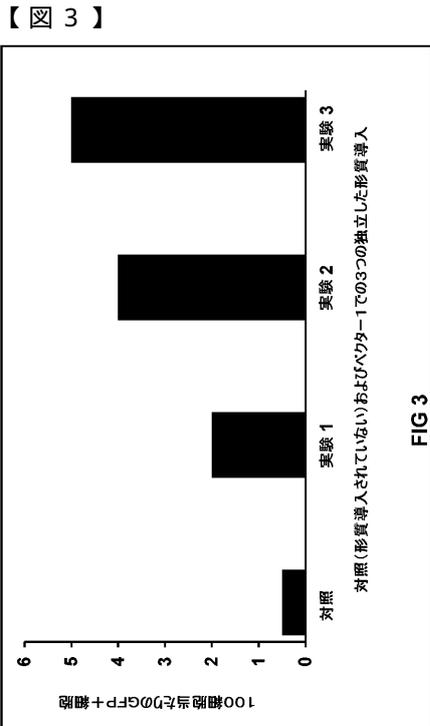


FIG 3

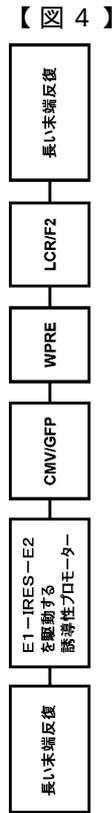


FIG 4

ベクター 19

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 P	25/00 1 0 1
		A 6 1 K	35/76

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 パウザ, チャールズ デイビッド

アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ
9640

(72)発明者 ローゼン, テイラー

アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ
9640

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 特表2008-518591(JP,A)
 特表2012-508591(JP,A)
 特表2002-506652(JP,A)
 J. Virology, 2004年, Vol.78, No.2, p.658-668
 Gene Therapy, 1999年, Vol.6, p.1317-1321
 Eur. J. Biochem., 2000年, Vol.267, p.5665-5678
 Antiviral Research, 2008年, Vol.80, p.288-294
 Human Gene Therapy, 2004年, Vol.15, p.361-372

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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

A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8

A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5

A 6 1 K 3 1 / 7 1 3

A 6 1 K 3 5 / 7 6

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 1 7 / 0 2

A 6 1 P 1 9 / 0 0

A 6 1 P 2 5 / 0 0

A 6 1 P 2 5 / 3 2

A 6 1 P 3 1 / 0 0

A 6 1 P 3 1 / 1 4

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

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