

【公報種別】特許公報の訂正

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和6年11月26日(2024.11.26)

【特許番号】特許第7577291号(P7577291)

【登録日】令和6年10月25日(2024.10.25)

【特許公報発行日】令和6年11月5日(2024.11.5)

【年通号数】登録公報(特許)2024-206

【出願番号】特願2019-520377(P2019-520377)

【訂正要旨】特許権者の住所の誤載により、下記のとおり全文を訂正する。

【国際特許分類】

C 07 K 14/015(2006.01)

A 01 K 67/0275(2024.01)

A 61 K 31/7105(2006.01)

A 61 K 35/76(2015.01)

A 61 K 48/00(2006.01)

A 61 P 1/00(2006.01)

A 61 P 1/16(2006.01)

A 61 P 1/18(2006.01)

A 61 P 3/06(2006.01)

A 61 P 3/10(2006.01)

A 61 P 7/02(2006.01)

A 61 P 9/00(2006.01)

A 61 P 9/04(2006.01)

A 61 P 9/10(2006.01)

A 61 P 11/00(2006.01)

A 61 P 13/02(2006.01)

A 61 P 13/12(2006.01)

A 61 P 15/00(2006.01)

A 61 P 19/06(2006.01)

A 61 P 21/04(2006.01)

A 61 P 25/00(2006.01)

A 61 P 25/16(2006.01)

A 61 P 27/02(2006.01)

A 61 P 35/00(2006.01)

A 61 P 37/02(2006.01)

A 61 P 43/00(2006.01)

C 12 N 1/15(2006.01)

C 12 N 1/19(2006.01)

C 12 N 1/21(2006.01)

C 12 N 5/10(2006.01)

C 12 N 7/01(2006.01)

C 12 N 15/113(2010.01)

C 12 N 15/63(2006.01)

C 12 N 15/864(2006.01)

【F I】

C 07 K 14/015 Z N A

A 01 K 67/0275

A 61 K 31/7105

A 61 K 35/76

10

20

30

40

50

| | | |
|---------|--------|---------|
| A 6 1 K | 48/00 | |
| A 6 1 P | 1/00 | |
| A 6 1 P | 1/16 | |
| A 6 1 P | 1/18 | |
| A 6 1 P | 3/06 | |
| A 6 1 P | 3/10 | |
| A 6 1 P | 7/02 | |
| A 6 1 P | 9/00 | |
| A 6 1 P | 9/04 | |
| A 6 1 P | 9/10 | 10 |
| A 6 1 P | 9/10 | 1 0 1 |
| A 6 1 P | 11/00 | |
| A 6 1 P | 13/02 | |
| A 6 1 P | 13/12 | |
| A 6 1 P | 15/00 | |
| A 6 1 P | 19/06 | |
| A 6 1 P | 21/04 | |
| A 6 1 P | 25/00 | |
| A 6 1 P | 25/16 | |
| A 6 1 P | 27/02 | 20 |
| A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 37/02 | |
| A 6 1 P | 43/00 | 1 0 5 |
| C 1 2 N | 1/15 | |
| C 1 2 N | 1/19 | |
| C 1 2 N | 1/21 | |
| C 1 2 N | 5/10 | |
| C 1 2 N | 7/01 | |
| C 1 2 N | 15/113 | Z |
| C 1 2 N | 15/63 | Z |
| C 1 2 N | 15/864 | 1 0 0 Z |

【記】別紙のとおり

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7577291号
(P7577291)

(45)発行日 令和6年11月5日(2024.11.5)

(24)登録日 令和6年10月25日(2024.10.25)

(51)国際特許分類

| | | | |
|---------|------------------|---------|---------|
| C 0 7 K | 14/015 (2006.01) | C 0 7 K | 14/015 |
| A 0 1 K | 67/0275(2024.01) | A 0 1 K | 67/0275 |
| A 6 1 K | 31/7105(2006.01) | A 6 1 K | 31/7105 |
| A 6 1 K | 35/76 (2015.01) | A 6 1 K | 35/76 |
| A 6 1 K | 48/00 (2006.01) | A 6 1 K | 48/00 |

F I

請求項の数 8 (全56頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-520377(P2019-520377)
 (86)(22)出願日 平成29年10月13日(2017.10.13)
 (65)公表番号 特表2019-530463(P2019-530463)
 A)
 (43)公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/056614
 (87)国際公開番号 WO2018/071831
 (87)国際公開日 平成30年4月19日(2018.4.19)
 審査請求日 令和2年10月13日(2020.10.13)
 審判番号 不服2023-1956(P2023-1956/J1)
 審判請求日 令和5年2月6日(2023.2.6)
 (31)優先権主張番号 62/417,756
 (32)優先日 平成28年11月4日(2016.11.4)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

最終頁に続く

(73)特許権者 507088266
 ユニバーシティ オブ マサチューセッツ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
 1581、ウェストボロー、ワシントン
 ストリート 50
 50 Washington Street, Westborough, MA 0
 1581, U.S.A.
 (74)代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72)発明者 ガオ, グワンピン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
 1581、ウェストボロウ、エドワード
 ダン ウェー 4
 (72)発明者 シュウ, グワンチャオ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 AA V カプシド設計

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1～24、106～117、199～210もしくは232～321からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたAA V カプシドタンパク質であって、前立腺組織に対する指向性を有する、前記単離されたAA V カプシドタンパク質。

【請求項 2】

請求項1に記載の単離されたAA V カプシドタンパク質を含む、組み換えAA V (r AA V)。

【請求項 3】

配列番号1～24、106～117、199～210もしくは232～321からなる群から選択されるポリペプチドのコード配列を含む核酸を含有する、宿主細胞であって、前記コード配列がプロモーターへ作動可能に連結されており、前記ポリペプチドのコード配列が前立腺組織に対する指向性を有する、前記宿主細胞。

【請求項 4】

r AA V を対象へ投与することを含む処置方法における使用のための請求項2に記載のr AA V であって、ここでr AA V が、少なくとも1つの導入遺伝子を含み、およびここでr AA V が、対象の標的組織の細胞に感染し、および、導入遺伝子を送達し、任意に、対象が、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、靈長目の非ヒト動物から選択される、前記r AA V。

【請求項 5】

請求項2に記載の組み換えrAAVを非ヒト動物へ投与することを含む、体細胞遺伝子導入動物モデルを生成するための方法であって、ここでrAAVが、少なくとも1つの導入遺伝子を含み、およびここでrAAVが、非ヒト動物の標的組織の細胞に感染し、任意に、導入遺伝子が、miRNAに対して少なくとも1つの結合部位を含む転写産物を発現し、miRNAが、標的組織以外の組織において、結合部位へハイブリダイズすることによって導入遺伝子の活性を阻害する、前記方法。

【請求項6】

少なくとも1つの導入遺伝子が、タンパク質コード遺伝子であるか、または、低分子干渉核酸をコードし、任意に、低分子干渉核酸が、miRNA、あるいは、対象または動物において少なくとも1つのmiRNAの活性を阻害するmiRNAスponジまたはTudRNAである、請求項4に記載の使用のためのrAAV。

10

【請求項7】

rAAVが、静脈内に、経皮的に、眼内に、髄腔内に、経口で、筋肉内に、皮下に、鼻腔内に、または吸入によって、投与される、請求項4に記載の使用のためのrAAV。

【請求項8】

請求項1に記載の単離されたAAVカプシドタンパク質を有する組み換えAAVを収容する容器を含む、キットであって、

任意に、容器が、シリングである、前記キット。

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願**

本出願は、2017年4月18日に出願された表題「AAVカプシド設計」の米国仮出願第62/486,642号、2016年11月4日に出願された表題「AAVカプシド設計」の第62/417,756号、および2016年10月13日に出願された表題「AAVカプシド設計」の第62/408,022号の出願日の35 U.S.C. § 119(e)の下での利益を主張する。これら各出願の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

10

本開示の分野

本開示は、いくつかの側面において、細胞中のアデノ随伴ウイルスを同定するのに有用な、単離された核酸、組成物、およびキットに関する。いくつかの側面において、本開示は、新規 AAV およびそれらの使用の方法ならびに関連のキットを提供する。

【背景技術】**【0003】****背景**

組み換え AAV アデノ随伴ウイルス (rAAV) は、顕著な毒性および宿主免疫原性がない、標的組織中の安定かつ持続した導入遺伝子発現を推進することができる。よって、rAAV は、長期治療的遺伝子発現にとって前途有望な送達ビヒクルである。しかしながら、目下入手可能な rAAV ベクターによる低い形質導入(transduction)効率および制限された組織指向性(tissue tropisms)は、実行可能かつ効き目のある治療としてのそれらの適用を限定し得る。加えて、非ヒト組織由来の優れた治療的 AAV 血清型の信頼できる臨床解釈(faithful clinical translation)が、懸案事項である。結果的に、遺伝子送達のための新しい AAV ベクターに対するニーズが依然としてある。

20

【発明の概要】**【0004】****概要**

本開示は、いくつかの側面において、遺伝子治療用途のための新規 AAV に関する。いくつかの態様において、本明細書に記載の AAV は、新しいかまたは強化された組織指向性の特性を与える 1 以上のカプシドタンパク質中にアミノ酸のバリエーションを含む。いくつかの態様に従うと、有用な組織標的特性を保有する AAV2、AAV2/3 (例として、AAV2/3 ハイブリッド)、および AAV8 のバリエントは、同定されており、かつ本明細書に開示されている。例えば、ヒト肝細胞 (例として、肝臓組織中に存在する)、中枢神経系細胞 (CNS 細胞) 等などの細胞を形質導入するのに有用な AAV8 のバリエントが提供される。いくつかの態様において、眼の組織 (例として、目)、胃腸管、呼吸系、乳房組織、脾臓組織、尿路組織、子宮組織、あるがんに関連する組織 (例として、乳房がん、前立腺がん等々)、および他の組織の細胞を標的にするのに有用な AAV2、AAV2/3 (例として、AAV2/3 ハイブリッド)、および AAV8 のバリエントが提供される。いくつかの態様において、本明細書に記載のバリエント AAV は、それらの対応する野生型 AAV によって標的にされる組織以外の組織を標的にする。

30

【0005】

本開示は、いくつかの側面において、配列番号 1 ~ 409、435 ~ 868 および 1726 ~ 1988 からなる群から選択されるポリペプチドをコードする配列を含む単離された核酸を提供するが、これは AAV カプシドタンパク質をコードする。いくつかの態様において、単離された核酸のフラグメントが提供される。ある態様において、単離された核酸のフラグメントは、配列番号 869、870 または 871 のうちいずれか 1 つの配列と同一のペプチドはコードしない。

【0006】

いくつかの側面において、本開示は、配列番号 410 ~ 434、876 ~ 1718 および 1989 ~

40

50

2251からなる群から選択される配列を含む核酸を提供する。いくつかの態様において、核酸は、AAVカプシドタンパク質もしくはそのバリアント、および／またはAAV集合活性化タンパク質(assembly-activating protein)(AAP)もしくはそのバリアントをコードする。いくつかの態様において、AAPは、AAVカプシドタンパク質とは異なる核酸のオープンリーディングフレームにある。いくつかの態様において、AAPは、AAV2 AAP(AAP-2)、またはそのバリアントである。

【0007】

本開示は、いくつかの側面において、配列番号1～409、435～868および1726～1988からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたAAVカプシドタンパク質を提供する。いくつかの態様において、単離されたAAVカプシドタンパク質は、配列番号1～409、837～852または1726～1814から選択される配列を含むが、ここでその配列のアミノ酸であって、配列番号869として表される配列の対応するアミノ酸とは同一ではない前記アミノ酸が、保存的置換で置き換えられている。10

【0008】

いくつかの側面において、本開示は、AAV2/3ハイブリッドカプシドタンパク質を提供する。いくつかの態様において、単離されたAAVカプシドタンパク質は、配列番号435～628および1815～1988から選択される配列を含むが、ここでその配列のアミノ酸であって、配列番号869または870として表される配列の対応するアミノ酸とは同一ではない前記アミノ酸が、保存的置換で置き換えられている。

【0009】

いくつかの態様において、単離されたAAVカプシドタンパク質は、配列番号629～836または853～868から選択される配列を含むが、ここでその配列のアミノ酸であって、配列番号871として表される配列の対応するアミノ酸とは同一ではない前記アミノ酸が、保存的置換で置き換えられている。20

【0010】

本開示のある側面において、上述の単離されたAAVカプシドタンパク質のいずれかを含む組成物が提供される。いくつかの態様において、組成物はさらに、薬学的に許容し得る担体を含む。いくつかの態様において、本開示の1以上の単離されたAAVカプシドタンパク質および生理学的に適合性のある担体の組成物が提供される。

【0011】

本開示のある側面において、上述の単離されたAAVカプシドタンパク質のいずれかを含む組み換えAAV(rAAV)が提供される。いくつかの態様において、rAAVを含む組成物が提供される。ある態様において、rAAVを含む組成物はさらに、薬学的に許容し得る担体を含む。本開示の1以上の単離されたAAVカプシドタンパク質を包含する組み換えAAVもまた、提供される。30

【0012】

本開示のいくつかの側面において、プロモーターへ作動可能に(operably)連結された、配列番号410～434、876～1718および1989～2251からなる群から選択されるコード配列を含む核酸を含有する宿主細胞が提供される。いくつかの態様において、宿主細胞および滅菌細胞培養培地を含む組成物が提供される。いくつかの態様において、宿主細胞および凍結保存剤(a cryopreservative)を含む組成物が提供される。40

【0013】

本開示のいくつかの側面に従うと、導入遺伝子を対象へ送達するための方法が提供される。いくつかの態様において、方法は、上述のrAAVを対象へ投与することを含み、ここでrAAVが、少なくとも1つの導入遺伝子を含み、およびここでrAAVが、対象の標的組織の細胞に感染する。いくつかの態様において、対象は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、および靈長目の非ヒト動物から選択される。一態様において、対象は、ヒトである。

【0014】

いくつかの態様において、少なくとも1つの導入遺伝子は、タンパク質をコードする遺

10

20

30

40

50

伝子である。ある態様において、少なくとも1つの導入遺伝子は、低分子干渉核酸をコードする。ある態様において、低分子干渉核酸は、m i R N Aである。ある態様において、低分子干渉核酸は、対象において少なくとも1つのm i R N Aの活性を阻害するm i R N AスponジまたはT u D R N Aである。ある態様において、m i R N Aは、標的組織の細胞中で発現される。ある態様において、標的組織は、肝臓、中枢神経系(C N S)、眼、胃腸、呼吸、乳房、臍臓、尿路、または子宮の組織である。

【0015】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、m i R N Aに対して少なくとも1つの結合部位を含む転写産物を発現し、前記m i R N Aは、標的組織以外の組織において、結合部位ヘハイブリダイズすることによって導入遺伝子の活性を阻害する。10

ある態様において、r A A Vは、静脈内に、経皮的に、眼内に、髄腔内に、脳内に、経口で、筋肉内に、皮下に、鼻腔内に、または吸入によって、対象へ投与される。

【0016】

本開示のいくつかの側面に従うと、体細胞遺伝子導入(somatic transgene)動物モデルを生成するための方法が提供される。いくつかの態様において、方法は、上述のr A A Vのいずれかを非ヒト動物へ投与することを含み、ここでr A A Vが、少なくとも1つの導入遺伝子を含み、およびここでrAAVが、非ヒト動物の標的組織の細胞に感染する。

【0017】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子である。ある態様において、導入遺伝子は、少なくとも1つの低分子干渉核酸をコードする。いくつかの態様において、導入遺伝子は、少なくとも1つのレポーター分子をコードする。ある態様において、低分子干渉核酸は、m i R N Aである。ある態様において、低分子干渉核酸は、動物において少なくとも1つのm i R N Aの活性を阻害するm i R N AスponジまたはT u D R N Aである。ある態様において、m i R N Aは、標的組織の細胞中で発現される。ある態様において、標的組織は、肝臓、中枢神経系(C N S)、眼、胃腸、呼吸、乳房、臍臓、尿路、または子宮の組織である。20

【0018】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、m i R N Aに対して少なくとも1つの結合部位を含む転写産物を発現し、前記m i R N Aは、標的組織以外の組織において、結合部位ヘハイブリダイズすることによって導入遺伝子の活性を阻害する。30

【0019】

本開示のいくつかの側面に従うと、上述のr A A Vのいずれかを非ヒト動物へ投与することを含む、体細胞遺伝子導入動物モデルを生成するための方法が提供されるが、ここでr A A Vは、少なくとも1つの導入遺伝子を含み、ここで導入遺伝子は、m i R N Aに対して少なくとも1つの結合部位を含む転写産物を発現し、ここでm i R N Aは、標的組織以外の組織において、転写産物の結合部位ヘハイブリダイズすることによって導入遺伝子の活性を阻害する。

【0020】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、組織特異的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含む。ある態様において、組織特異的プロモーターは、肝臓特異的サイロキシン結合グロブリン(T B G)プロモーター、インスリンプロモーター、グルカゴンプロモーター、ソマトスタチンプロモーター、ムチン-2プロモーター、臍臓ポリペプチド(P P Y)プロモーター、シナプシン-1(S y n)プロモーター、レチノスキシンプロモーター、K 1 2プロモーター、C C 1 0プロモーター、サーファクタントタンパク質C(S P - C)プロモーター、P R C 1プロモーター、R R M 2プロモーター、ウロプラキン2(U P I I)プロモーター、またはラクトフェリンプロモーターである。40

【0021】

ある態様において、r A A Vは、静脈内に、経皮的に、眼内に、髄腔内に、経口で、筋肉内に、皮下に、鼻腔内に、または吸入によって、動物へ投与される。本開示のいくつかの側面に従うと、上述の方法のいずれかによって生産される体細胞遺伝子導入動物モデル

10

20

30

40

50

が提供される。

【 0 0 2 2 】

本開示の他の側面において、r A A Vを生産するためのキットが提供される。いくつかの態様において、キットは、配列番号410～434、876～1718および1989～2251のうちいずれか1つの配列を有する単離された核酸を収容する容器を含む。いくつかの態様において、キットは、配列番号1～409、435～868または1726～1988のうちいずれか1つの配列を有するポリペプチドをコードする単離された核酸を収容する容器を含む。いくつかの態様において、キットはさらに、r A A Vを生産するための指示を含む。いくつかの態様において、キットは、組み換えA A Vベクターを収容する少なくとも1つの容器をさらに含むが、ここで組み換えA A Vベクターは、導入遺伝子を含む。

10

【 0 0 2 3 】

本開示の他の側面において、上述の単離されたA A Vカプシドタンパク質のいずれかを有する組み換えA A Vを収容する容器を含むキットが提供される。いくつかの態様において、キットの容器は、シリングである。

他の側面において、本開示は、遺伝子の送達、治療目的、予防目的、および研究目的、ならびに体細胞遺伝子導入動物モデルの開発のためのビヒクルとしてA A Vベースのベクターの使用に関する。

【 0 0 2 4 】

いくつかの側面において、本開示は、別々の組織／細胞型指向性を実証しており、および毒性学に関するベクター(vector related toxicology)の非存在下、動物組織における安定した体細胞遺伝子移入を、アデノウイルスベクターと同様のレベル(例として、標的組織およびベクター用量に応じて最大100%までのin vivo組織形質転換)にて、達成し得るA A V血清型に関する。他の側面において、本開示は、肝臓、中枢神経系(C N S)、眼、胃腸、呼吸、乳房、脾臓、尿路、または子宮の組織の標的能(-targeting capabilities)を有するA A V血清型に関する。これらの組織は、神経学的、代謝性、糖尿病性、眼の、呼吸の、胃腸の、尿路の、および生殖の疾患およびあるがんを包含する広範囲のヒト疾患に関連する。

20

【 0 0 2 5 】

いくつかの態様において、r A A Vは、少なくとも1つの導入遺伝子を包含する。導入遺伝子は、病理学的状態を引き起こすものであってもよい。いくつかの態様において、タンパク質をコードする導入遺伝子は、病理学的状態を処置する。

30

別の側面において、本開示の新規A A Vは、導入遺伝子を対象へ送達するための方法において使用されてもよい。方法は、本開示のr A A Vを対象へ投与することによって実施されるが、ここでr A A Vは、少なくとも1つの導入遺伝子を含む。いくつかの態様において、r A A Vは、対象の既定の組織を標的にする。

【 0 0 2 6 】

別の側面において、本開示のA A Vは、体細胞遺伝子導入動物モデルを生成するための方法において使用されてもよい。方法は、本開示のr A A Vを動物へ投与することによって実施されるが、ここでr A A Vは、少なくとも1つの導入遺伝子を含み、ここで導入遺伝子は、病理学的状態を引き起こし、およびここでr A A Vは、動物の既定の組織を標的にする。

40

【 0 0 2 7 】

導入遺伝子は、がん関連遺伝子、アポトーシス促進遺伝子およびアポトーシス関連遺伝子を包含する数多の遺伝子を発現してもよい。いくつかの態様において、導入遺伝子は、がん関連遺伝子の発現を阻害することができる低分子干渉核酸を発現する。他の態様において、導入遺伝子は、アポトーシス関連遺伝子の発現を阻害することができる低分子干渉核酸を発現する。低分子干渉核酸は、他の態様において、m i R N Aまたはs h R N Aである。他の態様に従うと、導入遺伝子は、毒素を発現するが、任意にここで毒素は、D T Aである。他の態様において、導入遺伝子は、レポーター遺伝子を発現するが、これは任意に、ベータ-ガラクトシダーゼなどのレポーター酵素、またはG F Pもしくはルシフェ

50

ラーゼなどの蛍光タンパク質である。

【 0 0 2 8 】

導入遺伝子は、m i R N A を発現してもよい。他の態様において、導入遺伝子は、m i R N A スポンジを発現するが、ここでm i R N A スポンジは、動物において1以上のm i R N A の活性を阻害する。いくつかの態様において、m i R N A は、内在性m i R N A であってもよく、またはこれは、肝臓、中枢神経系（C N S）、眼、胃腸、呼吸、乳房、臍臓、尿路、または子宮の組織の細胞中で発現されていてもよい。

【 0 0 2 9 】

r A A V は、ニューロン、扁平上皮細胞、腎近位または遠位曲尿細管細胞、粘液腺細胞、血管内皮細胞、子宮内膜細胞、網膜細胞、またはあるがん細胞（例として、乳房がん細胞、前立腺がん細胞等々）などの、多くの種々のタイプの組織に形質導入してもよい。

10

【 0 0 3 0 】

いくつかの態様において、r A A V は、対象あたり 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、または 10^{15} ゲノムコピーの用量にて投与される。いくつかの態様において、r A A V は、kgあたり 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、または 10^{14} ゲノムコピーの用量にて投与される。r A A V は、いずれのルートによって投与されてもよい。実例として、これは、いくつかの態様において、静脈内に（例として、門脈注射によって）投与されてもよい。

【 0 0 3 1 】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、肝臓特異的サイロキシン結合グロブリン（T B G）プロモーター、インスリンプロモーター、グルカゴンプロモーター、ソマトスタチンプロモーター、ムチン-2プロモーター、臍臓ポリペプチド（P P Y）プロモーター、シナプシン-1（S y n）プロモーター、レチノスキシンプロモーター、K 1 2 プロモーター、C C 1 0 プロモーター、サーファクタントタンパク質C（S P - C）プロモーター、P R C 1 プロモーター、R R M 2 プロモーター、ウロプラキン2（U P I I）プロモーター、またはラクトフェリンプロモーターなどの組織特異的プロモーターを包含する。

20

【 0 0 3 2 】

体細胞遺伝子導入動物モデルは、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、靈長目の非ヒト動物などの哺乳動物であってもよい。

いくつかの態様において、推定治療剤(a putative therapeutic agent)が体細胞遺伝子導入動物モデルへ投与されることで、動物における病理学的状態に対する推定治療剤の効果を決定してもよい。

30

別の側面において、本開示は、本明細書に記載の方法によって生産された体細胞遺伝子導入動物である。

【 0 0 3 3 】

既定の組織における病理学的状態を有する体細胞遺伝子導入動物を生成するr A A V を生産するためのキットが、本開示の別の側面に従って提供される。キットは、組み換えA A V ベクターを収容する少なくとも1つの容器、r A A V パッケージング構成成分を収容する少なくとも1つの容器、および組み換えA A V を構築しパッケージングするための指示を包含する。

40

【 0 0 3 4 】

r A A V パッケージング構成成分は、少なくとも1つのr e p 遺伝子および/または少なくとも1つのc a p 遺伝子を発現する宿主細胞を包含していてもよい。いくつかの態様において、宿主細胞は、2 9 3 細胞である。他の態様において、宿主細胞は、組み換えA A V ベクターを含有するr A A V の生産に影響を及ぼす少なくとも1つのヘルパーウイルス遺伝子産物を発現する。少なくとも1つのc a p 遺伝子は、既定の組織を標的にするA A V 血清型からのカプシドタンパク質をコードしていてもよい。

【 0 0 3 5 】

他の態様において、r A A V パッケージング構成成分は、ヘルパーウイルスを包含するが、任意にここでヘルパーウイルスは、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスである。

50

r A A V ベクターおよびその構成成分は、本明細書に記載の要素のいずれかを包含してもよい。実例として、いくつかの態様において、r A A V ベクターは、本明細書に記載の導入遺伝子のいずれかなどの、導入遺伝子を含む。いくつかの態様において、導入遺伝子は、m i R N A インヒビター（例として、m i R N A スポンジまたはT u D R N A）を発現するが、ここでm i R N A インヒビターは、体細胞遺伝子導入動物において1以上のm i R N A の活性を阻害する。

【0036】

本開示の限定の各々は、本開示の様々な態様を網羅し得る。したがって、いずれか1つの要素または要素の組み合わせを伴う本開示の限定の各々が、本開示の各側面に包含され得ることは予測されることである。本開示は、構成の詳細および以下の記載に表されるかまたは図面に説明される構成成分の配置に対するその適用に限定されない。本開示は他の態様もあり得、様々な形で実践されることができ、または実行されることができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0037】

図面の簡単な記載

【図1A - 1B】図1A～1Bは、A A V バリアント同定についてのワークフロー概略図を示す。図1Aは、選択されたヒト組織における新規A A V バリアントのハイスループット検出を描く。プロウイルスカプシド配列が、高サイクル(high-cycle) P C R を、続いて低サイクル(low-cycle) P C R を使用して増幅されることで、単一分子リアルタイム(S M R T)多重化配列決定のためのアンプリコンライブラリをバーコード化する。図1Bは、配列決定データのバイオインフォマティクス分析(bioinformatics analysis)のためのパイプラインの概要を示す。

20

【0038】

【図2A - 2D】図2A～2Dは、選択されたA A V 8 バリアントの種々の投与を用いたF F L u c 導入遺伝子活性のin vivo検出に関するデータを示す。図2Aは、種々のA A V 8 バリアントのルシフェラーゼ活性が、I V(静脈内)、I M(筋肉内)、またはI N(鼻腔内)注射後第6週にて評価されたことを示す。図2B～2Dデータは、A A V 8 と比較した、各バリアント、B 2(図2B)、B 3(図2C)、およびB 6 1(図2D)についてのF F L u c 活性の評価に関する(平均±S D、n = 3、t検定)。

30

【0039】

【図3A - 3B】図3A～3Bは、A A V 8 バリアントB 6 1によって送達されたF F L u c 導入遺伝子活性の、A A V 9と比較した新生仔(neonatal)注射後第21日の評価に関するデータを示す。脳(図3A)および脊髄(図3B)のルシフェラーゼ活性およびゲノムコピーが検出された(平均±S D、n = 5、t検定)。

【0040】

【図4A - 4B】図4A～4Bは、A A V 8 と比較されたA A V 8 バリアントB 4 4 の右後肢筋肉内(I M)注射後のF F L u c 導入遺伝子活性のin vivo検出に関するデータを示す。図4Aは、バリアントB 4 4 の動物全身ルシフェラーゼ発現がI M注射後第6週にて評価されたことを示す。図4Bは、筋肉(R T A、右前脛骨筋；L T A、左前脛骨筋)、肝臓、および心臓の評価を示す。A A V 8 と比較したB 4 4 のルシフェラーゼ活性(左棒グラフ)および相対比率(右棒グラフ)(平均±S D、n = 3)。

40

【0041】

【図5】図5は、A A V 8 バリアント(B 2、B 3、B 6 1)と他のA A V 血清型との系統発生学的比較を示す。

【図6A - 6B】図6Aは、ハイスループット指向性スクリーニングによる新規A A V バリアントのin vivo特徴付けのためのワークフローの概略図描写を示す。図6Bは、ハイスループット指向性スクリーニングによる新規A A V バリアントのN H P 特徴付けのためのワークフローの概略図描写を示す。

【0042】

【図7】図7は、1以上の单アミノ酸バリアントを持つ別々のA A V 2 カプシドバリア

50

ント（総数 409）および AAV2 / 3 バリアント（総数 194）の分布を表示する散布プロットを示す。

【図 8】図 8 は、発見されたカプシドバリアントの多重化スクリーニングにおいて使用されたベクターコンストラクトの図解を示す。固有の 6 bp バーコードが、導入遺伝子中へクローニングされて、候補カプシドバリアント中へパッケージングされた。

【0043】

【図 9】図 9 は、カプシドバリアント指向性プロファイリングを査定するための指標付導入遺伝子およびハイスループット配列決定ライプラリ設計の概略図を示す。6 bp バーコード（1° バーコード）および BstEII 制限部位を含有する指標付かつアダプターのカセットが、隣接する BsrGI 部位および SacI 部位を使用してベクターコンストラクト中へクローニングされ得る。宿主ゲノムとベクターゲノムとの両方を含有する rAAV で処置された組織からの粗製全 DNA が、BstEII 酵素で切られた。その結果得られた 5' - オーバーハングが、第 2 バーコード（さらなる多重化配列決定および合理化を可能にする）と 5' - ビオチン改変（磁性ビーズ富化を使用してアダプター含有フラグメントを選択するために使用され得る）とを含有するアダプターへ特異的にライゲートするために使用された。次いで、富化された材料が、アダプターおよび導入遺伝子配列に特異的なプライマーを使用して PCR 増幅されることで、ハイスループット配列決定のためのライプラリが生産され得る。配列番号 1719 ~ 1725 が上から下へ示される。

10

【発明を実施するための形態】

【0044】

20

詳細な記載

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、小さい (~ 26 nm) 複製欠損の、エンベロープがないウイルスであって、一般に、細胞中のその成長のため、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスなどの二次ウイルス (a second virus) の存在に依存する。AAV は、疾患を引き起こすことは知られておらず、極めて弱い免疫応答を誘導する。AAV は、分裂細胞および非分裂細胞の両方に感染し得、そのゲノムを宿主細胞のゲノム中へ組み込むことがある。これらの特色によって、AAV は、遺伝子治療のためのウイルスベクターを創作するための極めて魅力的な候補になる。血清型 2 に基づくプロトタイプ AAV ベクターは、ネズミ科のおよび大型の動物モデルにおける非毒性かつ安定した遺伝子移入のための既念実証を提供したが、多くの主要標的組織において乏しい遺伝子移入効率しか呈さなかった。本開示は、いくつかの側面において、遺伝子治療および研究用途 (research applications) のために、別々の組織標的能を有する新規 AAV を提供することによって、この短所を克服しようと努めるものである。

30

【0045】

本開示のいくつかの側面において、別々の組織標的能を有する新しい AAV カプシドタンパク質が提供される。いくつかの態様において、AAV カプシドタンパク質は、カプシドタンパク質を含む AAV が標的にする組織から単離されたものである。いくつかの側面において、対象の標的組織へ導入遺伝子を送達するための方法が提供される。導入遺伝子送達方法は、遺伝子治療（例として、疾患を処置するための）または研究（例として、体細胞遺伝子導入動物モデルを創作するための）用途のために使用されてもよい。

40

【0046】

AAV を発見するための方法

AAV の生物学のほとんどが、そのカプシドに影響される。その結果として、新規 AAV を発見する方法は、主に、AAV カプシドの DNA 配列を単離することに焦点を合てていた。アデノ随伴ウイルス (AAV) 潜伏生活環の中心的な特色は、宿主細胞の組み込まれた (integrated) ゲノムおよび / またはエピソームゲノムの形態で存続することである。新規 AAV を単離するために使用される方法は、潜伏 AAV DNA ゲノムの PCR ベースの分子的レスキュー (molecular rescue)、アデノウイルスのヘルパー機能 (helper function) の存在下 *in vitro* での組織 DNA からの潜伏プロウイルスゲノムの感染性ウイルスレスキュー、および定温ファージ Phi-29 ポリメラーゼによって媒介されるローリングサーク

50

ル線形(rolling-circle-linear)増幅による組織DNAからの環状プロウイルスゲノムのレスキューを包含する。これらの単離方法のすべてが、AAVプロウイルスDNAゲノムの潜伏を巧みに利用し、存続するウイルスのゲノムDNAをレスキューすることに焦点を合わせている。

【0047】

いくつかの側面において、本開示は、所望の組織指向性をもつ新規AAVバリエントが対象のin vivo組織から同定され得るという発見に関する。いずれの具体的な理論によっても拘束されることは望まないが、in vivo組織の使用は、対象の正常組織および腫瘍組織の両方から単離されたウイルスゲノム配列間で観察されたゲノム多様性という自然の宝庫(the natural reservoir)を活用する。よって、いくつかの態様において、in vivo組織は、選択圧および/または免疫回避を通じたウイルスの（例として、ウイルスカプシドタンパク質の）多様性のための自然のインキュベーターとして作用する。10

【0048】

いくつかの側面において、本開示は、AAV DNA（例として、宿主細胞または対象のin vivo組織から単離されたかまたは抽出されたAAV DNA）の増幅をもたらすPCR産物が新規カプシドタンパク質バリエントを同定するためのハイスループット単一分子リアルタイム(SMRT)配列決定に供され得るという発見に関する。本明細書に使用されるとき、「単一分子リアルタイム(SMRT)配列決定」は、例えばRoberts et al. (2013) *Genome Biology* 14:405, doi:10.1186/gb-2013-14-7-405によって記載されたり、並列化単一分配列決定方法を指す。いずれの具体的な理論によっても拘束されることは望まないが、SMRT配列決定の使用は、他の従来のハイスループットゲノム配列決定方法論から得られた、アライメントされた(aligned)短い読み取り(short-read)フラグメントからの、ウイルスのゲノム再構築およびキメラの予測を実施するニーズを取り除く。20

【0049】

内在性潜伏AAVゲノムは、哺乳動物細胞（例として、肝臓、脾臓およびリンパ節などの靈長目の非ヒト動物組織の細胞）において転写活性がある。理論によって拘束されることは望まないが、宿主中のAAV存続を維持するため、AAV遺伝子からの低レベルの転写が、要求され得ること、およびその結果得られたcapping RNAが、ベクター開発のための機能的capping配列を検索するためのより好適かつ豊富な基質として働き得ることという仮説が立つ。repackおよびcappingの両方の遺伝子転写産物は、RNA検出方法（例として、RT-PCR）によって可変の存在量で検出される。capping遺伝子転写産物の存在および逆転写(RT)を通じたcapping RNAのcDNA生成能は、in vitroで有意に、組織からの新規capping配列のPCRベースのレスキューのための錆型の存在量を増大させ、新規AAV発見の感度を強化させる。30

【0050】

新規capping配列はまた、プロウイルスAAVゲノムを極めて低い存在量にて持つ組織から単離された細胞総DNAをもつ細胞にトランスフェクトすることによっても同定されてもよい。細胞はさらに、トランスフェクトされた細胞中のAAV遺伝子転写を誘発および/または上昇させるためのヘルパーウイルス機能（例として、アデノウイルス）を提供する遺伝子でトランスフェクトされてもよい。いくつかの態様において、本開示の新規capping配列は、トランスフェクトされた細胞からcapping mRNAを単離すること、mRNAからcDNAを創作すること（例として、RT-PCRによって）、およびcDNAを配列決定することによって同定されてもよい。40

【0051】

単離されたカプシドタンパク質および同タンパク質をコードする核酸

哺乳動物、具体的に靈長目の非ヒト動物から単離されたAAVは、臨床開発およびヒト遺伝子治療用途のための遺伝子移入ベクターを創作するのに有用である。本開示は、いくつかの側面において、本明細書に開示の方法を使用して、様々なin vivo組織（例として、肝臓の、脳の、胃部の、呼吸の、乳房の、脾臓の、直腸の、前立腺の、泌尿器科の、および子宮頸部の組織）から発見された新規AAVを提供する。いくつかの態様において、新50

規 AAV バリアントが発見された組織（単数または複数）は、がん性の組織（例として、腫瘍またはがん細胞）である。いくつかの態様において、これらの新規 AAV のカプシドタンパク質をコードする核酸は、ヒト組織から単離されたウイルスゲノム DNA から発見された。新規 AAV カプシドタンパク質が発見された組織の例は、表 1 に記載される。AAV に関する核酸およびタンパク質の配列ならびに他の情報は、表 3 ~ 5 および 8 、および配列表に表される。

【 0 0 5 2 】

AAV カプシドタンパク質をコードする本開示の単離された核酸は、配列番号 410 ~ 435 、 876 ~ 1718 または 1989 ~ 2251 のいずれか 1 つに表されるとおりの配列を有するいずれの核酸、ならびにそれと実質的な相同性をもつ配列を有するいずれの核酸をも包含する。いくつかの態様において、本開示の単離された核酸は、配列番号 1 ~ 409 、 435 ~ 868 および 1726 ~ 1988 のいずれか 1 つに表されるとおりの配列を有するポリペプチドをコードする配列を有するいずれの核酸をも包含する。いくつかの態様において、本開示は、配列番号 410 ~ 435 、 876 ~ 1718 および 1989 ~ 2251 のいずれか 1 つに表されるとおりの配列を有する核酸と実質的な相同性を有するが、配列番号 869 、 870 または 871 に表されるとおりのアミノ酸配列を有するタンパク質はコードしない、単離された核酸を提供する。

10

【 0 0 5 3 】

いくつかの態様において、本開示の単離された AAV カプシドタンパク質は、配列番号 1 ~ 409 、 837 ~ 852 または 1726 ~ 1814 のいずれか 1 つに表されるとおりのアミノ酸配列を有するいずれのタンパク質、ならびにそれと実質的な相同性を有するいずれのタンパク質をも包含する。いくつかの態様において、本開示は、配列番号 1 ~ 409 、 837 ~ 852 または 1726 ~ 1814 のいずれか 1 つに表されるとおりの配列を有するタンパク質と実質的な相同性を有するが、配列番号 869 に表されるとおりのアミノ酸配列は有しない、単離されたカプシドタンパク質を提供する。

20

【 0 0 5 4 】

いくつかの態様において、本開示の単離された AAV カプシドタンパク質は、配列番号 435 ~ 628 または 1815 ~ 1988 のいずれか 1 つに表されるとおりのアミノ酸配列を有するいずれのタンパク質、ならびにそれと実質的な相同性を有するいずれのタンパク質をも包含する。いくつかの態様において、本開示は、配列番号 435 ~ 628 または 1815 ~ 1988 のいずれか 1 つに表されるとおりの配列を有するタンパク質と実質的な相同性を有するが、配列番号 869 または 870 に表されるとおりのアミノ酸配列は有さない、単離されたカプシドタンパク質を提供する。

30

【 0 0 5 5 】

いくつかの態様において、本開示の単離された AAV カプシドタンパク質は、配列番号 629 ~ 836 または 853 ~ 868 のいずれか 1 つに表されるとおりのアミノ酸配列を有するいずれのタンパク質、ならびにそれと実質的な相同性を有するいずれのタンパク質をも包含する。いくつかの態様において、本開示は、配列番号 629 ~ 836 または 853 ~ 868 のいずれか 1 つに表されるとおりの配列を有するタンパク質と実質的な相同性を有するが、配列番号 871 に表されるとおりのアミノ酸配列は有さない、単離されたカプシドタンパク質を提供する。

40

【 0 0 5 6 】

「相同性」は、 2 種のポリヌクレオチドまたは 2 種のポリペプチド部分間のパーセント同一性を指す。用語「実質的な相同性」は、核酸またはこれらのフラグメントを指すとき、適切なヌクレオチド挿入または欠失で別の核酸（またはその相補鎖）と最適にアライメントされたとき、アライメントされた配列の約 90 ~ 100 % においてヌクレオチド配列同一性があることを指し示す。ポリペプチドまたはこれらのフラグメントを指すとき、用語「実質的な相同性」は、適切なギャップ、挿入または欠失で別のポリペプチドと最適にアライメントされたとき、アライメントされた配列の約 90 ~ 100 % においてヌクレオチド配列同一性があることを指し示す。用語「高度に保存された」は、少なくとも 80 %

50

同一性、好ましくは少なくとも 90% 同一性、およびより好ましくは 97% 超の同一性を意味する。いくつかのケースにおいて、高度に保存されたは、100% 同一性を指してもよい。同一性は、例えば、当業者に知られているアルゴリズムおよびコンピュータープログラムの使用によって、当業者によって容易に決定される。

【0057】

本明細書に記載のとおり、核酸またはポリペプチドの配列間のアライメントは、インターネット上のウェブサーバーを通してアクセス可能な「Clustal W」などの、公的に入手可能なまたは市販の様々な多重配列アライメントプログラムのいずれかを使用して実施される。代替的に、Vector NTIユーティリティ(utilities)もまた、使用されてもよい。又クレオチド配列同一性を測定するために使用され得る、当該技術分野において知られている数多のアルゴリズム（上記プログラムに含有されるものも包含する）もまた存在する。別の例として、ポリヌクレオチド配列は、BLASTNを使用して比較され得るが、これは、クエリ配列とサーチ配列(the query and search sequences)との間の最良の重複領域のアライメントおよびパーセント配列同一性を提供するものである。同様のプログラム（例として、「Clustal X」プログラム、BLASTP）も、アミノ酸の比較に利用可能である。

10

【0058】

典型的には、これらのプログラムのいずれも、デフォルトの設定にて使用されるが、当業者は隨時、これらの設定を変更し得る。代替的に、当業者は、参照のアルゴリズムおよびプログラムによって提供されるとおりの同一性またはアライメントのレベルを少なくとも提供する別のアルゴリズムまたはコンピュータープログラムを利用し得る。アライメントは、2種のタンパク質またはペプチド間の対応するアミノ酸を同定するために使用されてもよい。「対応するアミノ酸」は、タンパク質またはペプチド配列のアミノ酸であって、別のタンパク質またはペプチド配列のアミノ酸とアライメントされた前記アミノ酸である。対応するアミノ酸は、同一であっても、非同一であってもよい。非同一のアミノ酸である対応するアミノ酸は、バリアントアミノ酸と称されてもよい。表6は、バリアントアミノ酸の例を提供する。

20

【0059】

代替的に、核酸にとって、相同性は、相同領域間で安定な二重鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続いて、一本鎖特異的ヌクレアーゼ（単数または複数）での消化、および消化されたフラグメントのサイズ決定によって決定され得る。実質的に相同的 DNA 配列は、その具体的な系に定義されるとおりであるが、例えばストリンジェントな条件(stringent conditions)下でのサザンハイブリダイゼーション実験において同定され得る。適切なハイブリダイゼーション条件を定義することは、当該技術分野のスキルの範囲内である。

30

【0060】

「核酸」配列は、DNA 配列またはRNA 配列を指す。いくつかの態様において、用語核酸は、これらに限定されないが、4 - アセチルシトシン、8 - ヒドロキシ - N6 - メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュード(pseudo)イソシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシル - メチル)ウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - カルボキシメチル - アミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチル偽(pseudo-)ウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチル - グアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチル - シトシン、5 - メチルシトシン、N6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシ - アミノ - メチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルキューオシン、5' - メトキシカルボニルメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシブトキソシン(oxybutoxosine)、偽ウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、- ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチル

40

50

エステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、偽ウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリンなどの、DNAおよびRNAの知られている塩基類似体のいずれかを包含する配列をとらえる。

【0061】

いくつかの態様において、本開示のタンパク質および核酸は、単離されている。本明細書に使用されるとき、用語「単離された(isolated)」は、人工的に得られたか、または生産されたことを意味する。核酸に関し本明細書に使用されるとき、用語「単離された」は、一般に以下を意味する：(i) 例えればポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、*in vitro*で増幅された；(ii) クローニングによって、組み換えて生産された；(iii) たとえば切断およびゲル分離によって(as by cleavage and gel separation)、精製された；または(iv) 例えれば化学合成によって、合成された。単離された核酸は、当該技術分野において周知の組み換えDNA技法による容易な取扱が可能なものである。10

【0062】

よって、ベクター（その5'および3'の制限部位が知られているか、またはそのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマー配列が開示されている）に含有されるヌクレオチド配列は、単離されているとみなされるが、その自然宿主中その天然状態で存在する核酸配列は、そうではない。単離された核酸は、実質的に精製されていてもよいが、そうである必要はない。例えれば、クローニングベクターまたは発現ベクター内に単離された核酸は、これが存在している細胞中の材料をごくわずかなパーセンテージで含み得るという点で、純粋ではない。しかしながら、かかる核酸は、その用語が本明細書に使用されるとき、単離されている。なぜなら、それは、当業者に知られている標準的な技法による容易な操作が可能であるからである。タンパク質またはペプチドに関し本明細書に使用されるとき、用語「単離された」は、一般に、人工的に（例として、化学合成によって、組み換えDNA技術によって、等々）得られたか、または生産された、タンパク質またはペプチドを指す。20

【0063】

保存的アミノ酸置換が、カプシドタンパク質の機能的に等価なバリアントまたはホモログを提供するようになされることは、解されるはずである。いくつかの側面において、本開示は、保存的アミノ酸置換をもたらす配列変異(sequence alterations)を含む(embraces)。本明細書に使用されるとき、保存的アミノ酸置換は、アミノ酸置換がなされるタンパク質の電荷またはサイズの相対的な特徴を変更しないアミノ酸置換を指す。バリアントは、当業者に知られているポリペプチド配列を改変するための方法（かかる方法をまとめた参考文献、例として、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989、またはCurrent Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkから見出されるものなど）に従って調製され得る。アミノ酸の保存的置換は、以下の群内のアミノ酸の間でなされる置換を包含する：(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；および(g) E、D。したがって、本明細書に開示のタンパク質およびポリペプチドのアミノ酸配列に対し、保存的アミノ酸置換を生じさせ得る。30

【0064】

AAVカプシドタンパク質を含むポリペプチドをコードする単離された核酸の例は、配列番号410～434、876～1718および1989～2251からなる群から選択される配列を有する核酸である。AAVカプシド配列をコードする単離された核酸のフラグメントは、所望のカプシド配列をコードする核酸を構築するのに有用であってもよい。フラグメントは、いずれか適切な長さであってもよい。いくつかの態様において、AAVカプシド配列をコードする単離された核酸のフラグメント（部分）は、所望のカプシド配列をコードする核酸を構築するのに有用であってもよい。フラグメントは、いずれか適切な長さ（例として、少なくとも6、少なくとも9、少なくとも18、少なくとも36、少なくとも72、40

少なくとも 144、少なくとも 288、少なくとも 576、少なくとも 1152 ヌクレオチド長以上)であってもよい。

【0065】

例えば、第 1 AAV カプシドタンパク質のポリペプチドをコードする核酸配列のフラグメントは、AAV カプシドの特性を変更するため第 2 AAV カプシド配列をコードする核酸配列を構築するために使用されてもよく、または、前記核酸配列内に組み込まれてもよい。いくつかの態様において、複数 AAV 血清型からのカプシド配列フラグメントを含む AAV カプシドタンパク質は、キメラ AAV カプシドと称される。フラグメントは、配列番号 869、870 または 871 のうちいずれか 1 つの配列と同一のペプチドはコードしないフラグメントであってもよい。例えば、バリアントアミノ酸をコードする核酸配列のフラグメント(知られている AAV 血清型と比較して)は、AAV カプシドの特性を変更するため AAV カプシド配列をコードする核酸配列を構築するために使用されてもよく、または、前記核酸配列内に組み込まれてもよい。

10

【0066】

いくつかの態様において、AAV バリアントをコードする核酸配列は、知られている AAV 血清型(例として、AAV 血清型 2、AAV 2 / 3(例として、AAV 2 / 3 ハイブリッド)または AAV 8)と比較して、約 1 ~ 約 100 アミノ酸バリエントを含んでいてもよい。いくつかの態様において、AAV バリアントをコードする核酸配列は、知られている AAV 血清型(例として、AAV 血清型 2、AAV 2 / 3(例として、AAV 2 / 3 ハイブリッド)または AAV 8)と比較して、約 5 ~ 約 50 アミノ酸バリエントを含んでいてもよい。いくつかの態様において、AAV バリアントをコードする核酸配列は、知られている AAV 血清型(例として、AAV 血清型 2、AAV 2 / 3(例として、AAV 2 / 3 ハイブリッド)または AAV 8)と比較して、約 10 ~ 約 30 アミノ酸バリエントを含んでいてもよい。いくつかの態様において、AAV バリアントをコードする核酸配列は、知られている AAV 血清型(例として、AAV 血清型 2、AAV 2 / 3(例として、AAV 2 / 3 ハイブリッド)または AAV 8)と比較して、1、または 2、または 3、または 4、5、または 6、または 7、または 8、または 9、または 10、または 11、または 12、または 13、または 14、または 15、または 16、または 17、または 18、または 19、または 20 アミノ酸バリエントを含んでいてもよい。

20

【0067】

30

例えば、AAV バリアント(例として、配列番号 861)をコードする核酸配列は、知られている AAV 血清型(例として、AAV 8)と比較して 3 種のアミノ酸バリエントを含んでいてもよい。3 種のアミノ酸バリエントのうち 1 種以上を有する組み換え c a p 配列は、バリエントのアミノ酸をコードする領域を含む核酸配列のフラグメントを、知られている AAV 血清型をコードする核酸の配列中へ組み込むことによって、構築されてもよい。フラグメントは、部位特異的変異誘発(site directed mutagenesis)を使用することを包含する、いずれの適切な方法によっても組み込まれてもよい。よって、新しい特性を有する新しい AAV バリアントが、創作されてもよい。

【0068】

40

いくつかの側面において、本開示は、AAV 集合活性化タンパク質(AAP)またはそれらのバリエントをコードする単離された核酸を提供する。本明細書に使用されるとき、「集合活性化タンパク質」または「AAP」は、細胞の核小体への新たに合成されたカプシドタンパク質(例として、AAVVP1、VP2、および VP3 などの VP タンパク質)を標的にし、それによってウイルスゲノムのカプシド形成を促進する働きをするタンパク質シャペロンである。一般に、AAP は、アデノ随伴ウイルスの c a p 遺伝子にコードされている。例えば、AAP-2 は、AAV2 の c a p 遺伝子にコードされている。AAP の他の例は、例えば Sonntag et al. J. Virol. 2011 Dec. 85(23): 12686-12697 によって記載されるとおり、AAP-1、AAP-3、AAP-4、AAP-5、AAP-8、AAP-9、AAP-11 および AAP-12 に限定されないがこれらを包含する。いくつかの態様において、AAP は、カプシドタンパク質(例として、VP1、VP2、VP3)とは異なる c a p 遺伝子の

50

オープンリーディングフレーム(ORF)から翻訳される。例えば、いくつかの態様において、カプシドタンパク質(例として、AAV2 VP1、VP2、VP3)は、cap遺伝子のORF1から翻訳され、AAP(例として、AAP-2)は、cap遺伝子のORF2から翻訳される。いくつかの態様において、AAPをコードする単離された核酸は、配列番号410～434および876～1718から選択される配列を含むか、または前記配列からなる。

【0069】

組み換えAAV

いくつかの側面において、本開示は、単離されたAAVを提供する。AAVに関し本明細書に使用されるとき、用語「単離された」は、人工的に得られたかまたは生産されたAAVを指す。単離されたAAVは、組み換え方法を使用して生産されてもよい。かかるAAVは、本明細書中「組み換えAAV」と称される。組み換えAAV(rAAV)は、好みしくは、rAAVの導入遺伝子が1以上の既定の組織(单数または複数)へ特異的に送達されるように、組織特異的な標的能を有する。AAVカプシドは、これらの組織特異的な標的能を決定することにおける重要な要素である。よって、標的にされている組織に適切なカプシドを有するrAAVが選択され得る。いくつかの態様において、rAAVは、配列番号1～409、435～852、859～874または1726～1988のいずれか1つに表されるとおりのアミノ酸配列を有するカプシドタンパク質、またはこれと実質的な相同性を有するタンパク質を含む。

10

【0070】

所望のカプシドタンパク質を有する組み換えAAVを得るための方法は、当該技術分野において周知である。(例えば、US 2003/0138772を参照。その内容は、その全体の参考により本明細書に組み込まれる)。典型的には、方法は、宿主細胞を培養することを伴うが、前記細胞は、AAVカプシドタンパク質(例として、配列番号1～409、435～868または1726～1988のいずれか1つに表されるとおりの配列を有するポリペプチドをコードする核酸)またはこれらのフラグメントをコードする核酸配列；機能的rep遺伝子；AAV逆方向末端配列(inverted terminal repeat)(ITR)および導入遺伝子から構成される組み換えAAVベクター；および組み換えAAVベクターをAAVカプシドタンパク質中へパッケージングすることを可能にするのに充分なヘルパー機能を含有する。いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、AAVのcap遺伝子によってコードされる構造タンパク質である。いくつかの態様において、AAVは、3種のカプシドタンパク質、ビリオンタンパク質1～3(VP1、VP2およびVP3という名称の)を含むが、これらのすべてが、單一cap遺伝子から発現されてもよい。

20

【0071】

結果的に、いくつかの態様において、VP1、VP2およびVP3タンパク質は、共通するコア配列を共有する。いくつかの態様において、VP1、VP2およびVP3の分子量は夫々、約87kDa、約72kDaおよび約62kDaである。いくつかの態様において、翻訳する際、カプシドタンパク質は、ウイルスゲノムの周囲に球状の60マー(60-mer)タンパク質シェルを形成する。いくつかの態様において、タンパク質シェルは主に、VP3カプシドタンパク質から構成される。いくつかの態様において、カプシドタンパク質の機能は、ウイルスゲノムを保護すること、ゲノムを送達すること、および宿主と相互作用することである。いくつかの側面において、カプシドタンパク質は、組織特異的なやり方で、宿主へウイルスゲノムを送達する。いくつかの態様において、VP1および/またはVP2カプシドタンパク質は、パッケージングされたAAVの組織指向性に寄与してもよい。いくつかの態様において、パッケージングされたAAVの組織指向性は、VP3カプシドタンパク質によって決定される。いくつかの態様において、AAVの組織指向性は、カプシドタンパク質に生じる変異によって強化または変化される。

30

【0072】

いくつかの側面において、本開示は、野生型AAV血清型のバリエントを記載する。いくつかの態様において、バリエントは、組織指向性を変更した。いくつかの態様において

40

50

、本明細書に記載の AAV バリアントは、cap 遺伝子内にアミノ酸バリエーション（例として、置換、欠失、挿入）を含む。上に検討されたとおり、3 種すべてのカプシドタンパク質は、単一 cap 遺伝子から転写される。結果的に、いくつかの態様において、cap 遺伝子内のアミノ酸バリエーションは、該 cap 遺伝子によってコードされる 3 種すべてのカプシドタンパク質に存在する。代替的に、いくつかの態様において、アミノ酸バリエーションは、3 種すべてのカプシドタンパク質には存在しないこともある。いくつかの態様において、アミノ酸バリエーションは、VP1 カプシドタンパク質のみに生じる。いくつかの態様において、アミノ酸バリエーションは、VP2 カプシドタンパク質のみに生じる。いくつかの態様において、アミノ酸バリエーションは、VP3 カプシドタンパク質のみに生じる。いくつかの態様において、AAV バリアントは、cap 遺伝子中に 1 より多くのバリエーションを含む。いくつかの態様において、1 より多くのバリエーションは、同じカプシドタンパク質内（例として、VP3 内）に生じる。いくつかの態様において、1 より多くのバリエーションは、種々のカプシドタンパク質内に生じる（例として、VP2 中少なくとも 1 つのバリエーションおよび VP3 中少なくとも 1 つのバリエーション）。

【0073】

いくつかの態様において、本明細書に記載の AAV バリアントは、AAV2、AAV2 / 3（例として、AAV2 / 3 ハイブリッド）または AAV8 のバリアントである。AAV2 は、ヒト中枢神経系（CNS）組織、腎臓組織、眼組織（例として、光受容体細胞および網膜色素上皮（RPE））、および他の組織を効率的に形質導入することが知られている。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載の AAV3 バリアントは、CNS 組織、腎臓組織、または眼組織へ遺伝子治療を送達する（delivering gene therapy）のに有用であることがある。AAV3 は、がん性ヒト肝細胞を効率的に形質導入することもまた知られている。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載の AAV3 バリアントは、がん性のおよび正常なヒト肝細胞へ遺伝子治療を送達するのに有用であることがある。AAV8 は、肝臓組織、呼吸組織、および目の組織を標的にすることが知られている。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載の AAV8 バリアントは、肝臓組織、呼吸組織または目へ遺伝子治療を送達するのに有用であることがある。

【0074】

AAV2、AAV2 / 3（例として、AAV2 / 3 ハイブリッド）および本明細書に記載の AAV8 バリアントは、対応する野生型 AAV と比較して、cap 遺伝子内に 1 以上のバリエーションを含んでいてもよいことは解されるはずである。したがって、いくつかの態様において、AAV2、AAV2 / 3（例として、AAV2 / 3 ハイブリッド）および本明細書に記載の AAV8 バリアントは、野生型 AAV2、AAV2 / 3（例として、AAV2 / 3 ハイブリッド）または AAV8 によって標的にはされない追加の組織型へ遺伝子治療を送達するのに有用な組織指向性を有していてもよい。例えば、いくつかの態様において、本明細書に記載の AAV8 バリアント（例として、B61；配列番号 865）は、中枢神経系（CNS）へ遺伝子治療を送達するのに有用であってもよい。いくつかの態様において、AV2、AAV2 / 3（例として、AAV2 / 3 ハイブリッド）、または本明細書に記載の AAV8 バリアントは、腎臓の細胞または肝臓の細胞を標的にするのに有用であってもよい。いくつかの態様において、AAV2、AAV2 / 3（例として、AAV2 / 3 ハイブリッド）、または本明細書に記載の AAV8 バリアントは、肝臓、脾臓、心臓または脳に対する遺伝子治療を標的にするのに有用であってもよい。

【0075】

いくつかの側面において、本明細書に記載の AAV バリアントは、CNS 関連障害の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「CNS 関連障害」は、中枢神経系の疾患または疾病(condition)である。CNS 関連障害は、脊髄（例として、脊髄症）、脳（例として、脳症）または脳および脊髄を囲む組織に影響を及ぼすことがある。CNS 関連障害は、体細胞変異を通じた遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因为あり得る。CNS 関連障害は、精神病または精神障害(a psychological condition or disorder)

10

20

30

40

50

r)、例として、注意欠陥多動性障害、自閉症スペクトラム障害、気分障害、統合失調症、うつ病、レット症候群、等々であり得る。CNS関連障害は、自己免疫障害であってもよい。CNS関連障害はまた、CNSのがん、例として脳がんであってもよい。がんであるCNS関連障害は、CNSの原発がん、例として、星状細胞腫、膠芽腫等々であってもよく、またはCNS組織へ転移したがん、例として、脳へ転移した肺がんであってもよい。CNS関連障害のさらなる非限定例は、パーキンソン病、リソソーム蓄積症、虚血、神経障害性疼痛、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多発性硬化症(MS)、およびカナバン病(CD)を包含する。

【0076】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、心細胞(例として、心臓組織)へ遺伝子治療を送達するのに有用であってもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、心血管障害の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「心血管障害」は、心血管系の疾患または疾病である。心血管疾患は、心臓、循環系、動脈、静脈、血管および/または毛細血管に影響を及ぼすことがある。心血管障害は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。心血管障害の非限定例は、リウマチ性心疾患、心臓弁膜症、高血圧性心疾患、動脈瘤、アテローム性動脈硬化、高血圧症(例として、高血圧)、末梢動脈疾患(PAD)、虚血性心疾患、アンギーナ、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、心筋梗塞、脳血管疾患、一過性脳虚血発作、炎症性の心疾患、心筋症、心膜疾患、先天性心疾患、心不全、脳卒中、およびシャーガス病に起因する心筋炎を包含する。

10

【0077】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、肺(the lung)および/または肺系統(the pulmonary system)の組織(例として、呼吸系(respiratory system))を標的にしてもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、肺疾患(pulmonary disease)の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「肺疾患」は、肺系統の疾患または疾病である。肺疾患は、肺または呼吸(breathing)に関する筋肉に影響を及ぼすことがある。肺疾患は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。肺疾患は、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、および肺カルチノイド腫瘍を包含するがこれらに限定されない、肺のがんであってもよい。肺疾患のさらなる非限定例は、急性気管支炎、急性呼吸窮迫症候群(ARD S)、石綿症、喘息、気管支拡張症、細気管支炎、閉塞性細気管支炎性器質化肺炎(BOOP)、気管支肺異形成症、綿肺、慢性気管支炎、コクシジオイデス症(Coccidi)、慢性閉塞性肺障害(COPD)、特発性器質化肺炎(COP)、囊胞性線維症、気腫、ハンタウイルス肺症候群、ヒストプラスマ症、ヒトメタニューモウイルス、過敏性肺炎、インフルエンザ、リンパ管種症、中皮腫、中東呼吸器症候群、非結核性抗酸菌、百日咳、塵肺(炭塵肺)、肺炎、原発性線毛機能不全、原発性肺高血圧症、肺動脈性高血圧症、肺線維症、肺血管疾患、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、サルコイドーシス、重症急性呼吸器症候群(SARS)、珪肺症、睡眠時無呼吸、乳児突然死症候群(SIDS)、および結核を包含する。

20

30

【0078】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、肝臓組織を標的にしてもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、肝疾患の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「肝疾患」は、肝臓の疾患または疾病である。肝疾患は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。肝疾患は、肝細胞癌(HCC)、線維層板(fibrolamellar)癌、胆管癌、血管肉腫および肝芽腫を包含するがこれらに限定されない肝臓のがんであってもよい。肺疾患のさらなる非限定例は、アラジール症候群、アルファ1抗トリプシン欠乏、自己免疫肝炎、胆道閉鎖、硬変、肝臓の囊胞性疾患、脂肪性肝疾患、ガラクトース血症、胆石、ジルベール症候群、ヘモクロマトーシス、妊娠中の肝臓疾患、新生児肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、ポルフィリン症、ライ症候群、サルコイドーシス、

40

50

中毒性肝炎、1型糖原病、チロシン血症、ウイルス性肝炎A、B、C、ウィルソン病、および住血吸虫症を包含する。

【0079】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、腎臓組織を標的にしてもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、腎臓疾患の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「腎臓疾患」は、肝臓の疾患または疾病である。腎臓疾患は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。腎臓疾患は、腎細胞がん、明細胞がん、乳頭がん1型、乳頭がん2型、色素�性がん、膨大細胞がん、集合管がん、腎孟の移行上皮がんおよびウィルムス腫瘍を包含するがこれらに限定されない腎臓のがんであってもよい。腎臓疾患のさらなる非限定例は、アブデルハルデン・コフマン・リグナック(Adderhalden-Kaufmann-Lignac)症候群(腎性シスチン症(Nephropathic Cystinosis))、急性腎不全/急性腎臓損傷、急性腎小葉性腎炎(Acute Lobar Nephronia)、急性リン酸腎症(Acute Phosphate Nephropathy)、急性尿細管壞死、アデニンホスホリボシルトランスクレーベン症、アデノウイルス腎炎、アルポート症候群、アミロイドーシス、血管筋脂肪腫、鎮痛薬腎症、アンジオテンシン抗体および巣状分節性糸球体硬化症(Angiotensin Antibodies and Focal Segmental Glomerulosclerosis)、抗リン脂質症候群、抗TNF-α治療関連糸球体腎炎、APOL1変異、見かけの鉛質コルチコイド過剰症候群、アリストロキア酸腎症、

10

【0080】

バルカン地方病性腎症(Balkan Endemic Nephropathy)、バーター症候群、ビート尿、 - サラセミア腎疾患、胆汁キャスト腎症(Bile Cast Nephropathy)、B Kポリオーマ、C1q腎症、心腎症候群、CFHR5腎症、コレステロール塞栓、チャーゲ・ストラウス症候群、乳び尿、糸球体虚脱症(Collapsing Glomerulopathy)、CMVに関連する糸球体虚脱症、先天性ネフローゼ症候群、腎錐体(Conorenal)症候群(メインザー(Mainzer)・サルディノ(Saldino)症候群またはサルディノ・メインザー病)、造影剤腎症、硫酸銅中毒(Copper Sulfate Intoxication)、皮質壞死(Cortical Necrosis)、クリオグロブリン血症、結晶誘発性の急性腎臓損傷、囊胞性腎疾患、後天性のシスチン尿症、デヌスデポジット病(MPGN2型)、デント病(X染色体連鎖劣性腎結石症)、透析不均衡症候群、糖尿病性腎臓疾患、尿崩症、EAST症候群、異所性尿管、浮腫、エルドハイム・チエスター病、ファブリー病、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症、ファンコニー症候群、フレイザー症候群、フィブロネクチン糸球体症(Fibronectin Glomerulopathy)、原線維性糸球体腎炎およびイムノタクトイド糸球体症、フレーリー症候群、糸球体硬化症、巣状硬化症、巣状糸球体硬化症、

20

【0081】

ギャロウェイモワト症候群、ギテルマン症候群、糸球体疾患、糸球体の管状逆流(Tubular Reflux)、糖尿、グッドパスチャー症候群、溶血性尿毒症症候群(HUS)、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、血球貪食症候群、出血性膀胱炎、発作性夜間ヘモグロビン尿および溶血性貧血に関連するヘモジデリン沈着症、肝静脈閉塞性疾患、類洞閉塞症候群、C型肝炎関連腎疾患、肝腎症候群、HIV関連腎症(HIVAN)、馬蹄鉄腎(腎融合)、ハナー潰瘍、高アルドステロン症、高カルシウム血症、高カリウム血症、高マグネシウム血症、高ナトリウム血症、高ショウ酸尿症、高リン酸血症、低カルシウム血症、低カリウム血症、低カリウム血症誘発性の腎機能障害、低マグネシウム血症、低ナトリウム血症、低リン酸血症、IgA腎症、IgG4腎症、間質性膀胱炎、膀胱痛症候群、間質性腎炎、アイブマーク症候群、腎臓結石(Kidney Stones)、腎結石(Nephrolithiasis)、レプトスピラ症(Leptospirosis)の腎疾患、軽鎖沈着症(Light Chain Deposition Disease)、单クローナル性免疫グロブリン沈着症(Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease)、リドル症候群、ライトウッド・アルブライト症候群、リポタンパク糸球体症、リチウム腎毒性、LMX1B変異が原因の遺伝性のFGS、腰痛血尿、ループス、全身性エリテマトーデス、ループス腎臓疾患、ループス腎炎、ライム病関連糸球体腎炎、

30

40

50

【0082】

マラリア腎症、悪性高血圧症、マラコプラキア、外尿道口狭窄、髓質囊胞性腎疾患、髓質海綿腎、巨大尿管、メラミン毒性(Melamine Toxicity)および腎臓、膜性増殖性糸球体腎炎、膜性腎症、メソアメリカ人腎症、代謝性アシドーシス、代謝性アルカローシス、顕微鏡的多発血管炎、ミルク・アルカリ症候群、微小変化群、多囊胞性異形性腎、多発性骨髄腫、骨髄増殖性の新生物および糸球体症、爪膝蓋骨症候群、腎石灰化症、腎性全身性線維症、腎下垂(Nephroptosis)（遊走腎、腎下垂(Renal Ptosis)）、ネフローゼ症候群、神経因性膀胱、結節性糸球体硬化症、非淋菌性、ナツクラッカー症候群、口顔面指症候群、起立性低血圧症、起立性タンパク尿、浸透圧利尿、ページ腎、乳頭壊死、乳頭腎(Papillorenal)症候群（腎コロボーマ症候群、単離された腎低形成）、腹膜腎症候群(The Peritoneal-Renal Syndrome)、後部尿道弁、感染後の糸球体腎炎、連鎖球菌感染後の糸球体腎炎、結節性多発動脈炎、多囊胞性腎疾患、後部尿道弁、子癇前症、単クローニ性 Ig G沈着を伴う増殖性糸球体腎炎(Nasr病)、タンパク尿(尿中のタンパク質)、偽性高アルドステロン症、偽性副甲状腺機能低下症、肺腎症候群、腎孟腎炎(腎臓感染)、膿腎症、

10

【0083】

放射線(Radiation)腎症、再栄養症候群、逆流腎症、急速進行性糸球体腎炎、腎膿瘍、腎周囲腫瘍(Abscess)、腎無発生、腎動脈瘤、腎動脈狭窄、腎細胞がん、腎囊胞、運動誘発性の急性腎不全を伴う腎性低尿酸血症、腎梗塞、腎性骨ジストロフィー、腎尿細管性アシドーシス、リセットオスモстат(Reset Osmostat)、大静脈後尿管、後腹膜線維症、横紋筋融解症、肥満外科手術に関する横紋筋融解症、リューマチ性関節炎関連の腎疾患、サルコイドーシス腎疾患、塩喪失性の、腎および脳の、シムケ免疫性骨形成不全、強皮症腎クリーゼ、へび状腓骨(Serpentine Fibula)・多囊胞性腎症候群、エクスナー(Exner)症候群、鎌状赤血球性腎症、シリカ暴露および慢性腎臓疾患、造血細胞移植に続く腎臓疾患、幹細胞移植に関する腎臓疾患、菲薄基底膜病、良性家族性血尿、三角部炎、結節性硬化症、尿細管発育障害、腫瘍溶解症候群、尿毒症、尿毒性の視神経症、尿管瘤、尿道カルンクル、尿道狭窄、尿失禁、尿路感染、尿路閉塞、膀胱腸瘻、膀胱尿管逆流、フォンヒッペル・リンダウ病、ワーファリン関連腎症、ウェゲナー肉芽腫症、多発血管炎性肉芽腫症、ならびにウンダーリッヒ(Wunderlich)症候群を包含する。

20

【0084】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、眼組織（例として、目の組織または細胞）へ遺伝子治療を送達するのに有用であってもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、眼障害の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「眼障害」は、目の疾患または疾病である。眼疾患は、目、強膜、角膜、前眼房、後眼房、虹彩、瞳孔、水晶体、ガラス体液、網膜、または視神経に影響を及ぼすことがある。眼障害は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。眼疾患および障害の非限定例は、以下：加齢性黄斑変性症、網膜症、糖尿病性網膜症、黄斑浮腫、緑内障、網膜色素変性症および目のがんを包含するが、これらに限定されない。

30

【0085】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、胃腸組織（例として、胃腸管の組織）へ遺伝子治療を送達するのに有用であってもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、胃腸管障害の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「胃腸管障害」は、胃腸管の疾患または疾病である。胃腸疾患は、粘膜（例として、上皮、粘膜固有層、粘膜筋板等々）、粘膜下層（例として、粘膜下神経叢、腸管神経叢等々）、胃腸管の筋層、漿膜および/または外膜、口腔、食道、幽門、胃、十二指腸、小腸、盲腸、虫垂、結腸、肛門管、または直腸に影響を及ぼすことがある。胃腸管障害は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。胃腸管疾患および障害の非限定例は、以下：炎症性腸疾患(IBD)、クロール病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、セリック病、胃食道逆流症(GERD)、アカラシア、憩室炎、下痢、およびあるがん（例として、腸がん、胃がん、結腸が

40

50

ん、直腸がん等々)を包含するが、これらに限定されない。

【0086】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、乳房組織(例として、乳房の組織)へ遺伝子治療を送達するのに有用であってもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、乳房障害の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「乳房障害」は、乳房の疾患または疾病である。乳房疾患は、乳房の線維組織、脂肪組織、小葉、または導管に影響を及ぼすことがある。乳房障害は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。乳房の疾患および障害の非限定例は、以下：乳腺炎、乳房石灰沈着、脂肪壊死、線維腺腫、線維症および単純囊胞、乳汁漏出、過形成および乳房がんを包含するが、これらに限定されない。

10

【0087】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、脾臓組織(例として、脾臓の組織)へ遺伝子治療を送達するのに有用であってもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、脾臓障害の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「脾臓障害」は、脾臓の疾患または疾病である。脾臓疾患は、脾頭、脾頸、脾体、脾尾、脾島(例として、ランゲルハンス島)、腺房、または円柱上皮に影響を及ぼすことがある。脾臓障害は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。脾臓の疾患および障害の非限定例は、以下：糖尿病(diabetes)(例として、糖尿病(diabetes mellitus)1型および糖尿病2型)、脾炎(例として、急性脾炎、慢性脾炎)、および脾臓がんを包含するが、これらに限定されない。

20

【0088】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、尿路組織(例として、膀胱組織などの尿路の組織)へ遺伝子治療を送達するのに有用であってもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、尿路障害の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「尿路障害」は、尿路の疾患または疾病である。尿路疾患は、膀胱、尿管、尿道、または前立腺に影響を及ぼすことがある。尿路障害は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。尿路の疾患および障害の非限定例は、以下：尿路感染、腎臓結石、膀胱の制御問題(例として、尿閉、尿失禁等々)、膀胱炎、および膀胱がんを包含するが、これらに限定されない。

30

【0089】

いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、子宮組織(uterine tissue)(例として、子宮の組織(tissue of the uterus))へ遺伝子治療を送達するのに有用であってもよい。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のAAVバリアントは、子宮障害の処置に有用であってもよい。本明細書に使用されるとき、「子宮障害」は、子宮の疾患または疾病である。子宮疾患は、子宮頸、子宮頸管、子宮体(子宮底(fundus))、子宮内膜、子宮筋層、または子宮外膜に影響を及ぼすことがある。子宮障害は、体細胞変異を通した遺伝性または後天性のいずれかの遺伝的原因であり得る。子宮の疾患および障害の非限定例は、以下：腺筋症、子宮内膜症、子宮内膜過形成、アッシャーマン症候群、および子宮内膜がんを包含するが、これらに限定されない。

40

【0090】

AAVカプシド中にrAAVベクターをパッケージングするための宿主細胞において培養されるべき構成成分が、宿主細胞へin transで提供されてもよい。代替的に、要求される構成成分(例として、組み換えAAVベクター、rep配列、cap配列、および/またはヘルパー機能)のいずれか1以上が、要求される構成成分のうち1以上を含有するよう当業者に知られている方法を使用して操作された安定な宿主細胞によって提供されてもよい。最も好適には、かかる安定な宿主細胞は、誘導性プロモーターの制御下で、要求される構成成分(単数または複数)を含有するであろう。しかしながら、要求される構成成分(単数または複数)は、構成的プロモーターの制御下であってもよい。好適な誘導性お

50

および構成的プロモーターの例は、導入遺伝子との使用に好適な調節要素の検討において、本明細書に提供される。なおも別の選択肢において、選択された安定な宿主細胞は、構成的プロモーターの制御下で、選択された構成成分（単数または複数）と、1以上の誘導性プロモーターの制御下で、選択された他の構成成分（単数または複数）とを含有していてもよい。例えば、293細胞（構成的プロモーターの制御下でE1ヘルパー機能を含有する）に由来する安定な宿主細胞が生成されてもよいが、前記細胞は、誘導性プロモーターの制御下でrepおよび/capタンパク質を含有する。なおも他の安定な宿主細胞は、当業者によって生成されてもよい。

【0091】

本開示のrAAVを生産するのに要求される組み換えAAVベクター、rep配列、cap配列、およびヘルパー機能は、いずれの適切な遺伝要素（ベクター）を使用して、パッケージングする宿主細胞へ送達されてもよい。いくつかの態様において、3種すべてのカプシドタンパク質（例として、VP1、VP2およびVP3）をコードする単一の核酸は、単一のベクターにおいて、中へ送達される。いくつかの態様において、カプシドタンパク質をコードする核酸は、2種のカプシドタンパク質（例として、VP1およびVP2）をコードする第1核酸を含む第1ベクターと単一のカプシドタンパク質（例として、VP3）をコードする第2核酸を含む第2ベクターとの2つのベクターによって、パッケージングする宿主細胞中へ送達される。

【0092】

いくつかの態様において、3つのベクターは、各々が異なるカプシドタンパク質をコードする核酸を含むものであるが、パッケージングする宿主細胞へ送達される。選択された遺伝要素は、本明細書に記載の方法を包含するいずれの好適な方法によって送達されてもよい。いずれの本開示の態様を構築するのに使用される方法は、核酸取扱(nucleic acid manipulation)の技能をもつ者に知られており、遺伝子操作(genetic engineering)、組み換え操作、および合成の技法を包含する。例として、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照。同様に、rAAVビリオンを生成する方法も周知であり、好適な方法を選択することは、本開示に限定されない。例として、K. Fisher et al, J. Virol., 70:520-532 (1993)および米国特許第5,478,745号を参照。

【0093】

いくつかの態様において、組み換えAAVは、3重トランスフェクション方法(the triple transfection method)(米国特許第6,001,650号に詳細に記載される)を使用して生産されてもよい。典型的には、組み換えAAVは、宿主細胞を、AAV粒子中へパッケージングされることになっている組み換えAAVベクター（導入遺伝子を含む）、AAVヘルパー機能ベクター、および補助機能ベクターでトランスフェクトすることによって、生産される。AAVヘルパー機能ベクターは、生産的なAAV複製およびカプシド形成にとってトランス(in trans)機能する「AAVヘルパー機能」配列（例として、repおよびcap）をコードする。好ましくは、AAVヘルパー機能ベクターは、検出可能な野生型AAVビリオン（例として、機能的なrepおよびcap遺伝子を含有するAAVビリオン）をいずれも生成せずに、効率的なAAVベクター生産を支持する。

【0094】

本開示による使用に好適なベクターの非限定例は、pHLP19（米国特許第6,001,650に記載される）およびpRep6cap6ベクター（米国特許第6,156,303に記載される）を包含するが、両文献の全体は参照により本明細書に組み込まれる。補助機能ベクターは、非AAV由来ウイルス機能および/または細胞機能（例として「補助機能」）（AAVが、複製するのにこれらに依存している）のためのヌクレオチド配列をコードする。補助機能は、AAV複製に要求されるそれら機能(those functions)を包含するが、限定せずに、AAV遺伝子の転写活性化、時期特異的な(stage specific)AAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、cap発現産物の合成、およびAAVカプシド集合に関与するそれらの部分(those moieties)も包含する。ウイルスベースの補助機能は、アデノウイルス、

10

20

30

40

50

ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス1型以外の)、およびワクシニアウイルスなどの、知られているヘルパーウィルスのいずれかに由来し得る。

【0095】

いくつかの側面において、本開示は、トランスフェクトされた宿主細胞を提供する。用語「トランスフェクション」は、細胞による外来(foreign)DNAの取り込みを指すために使用され、細胞は、外来性(exogenous)DNAが細胞内部へ(例として、細胞膜を越えて)導入されたとき、「トランスフェクトされ」としている。数多のトランスフェクション技法が、一般に、当該技術分野において知られている。例として、Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York、Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier、およびChu et al. (1981) *Gene* 13:197を参照。かかる技法は、好適な宿主細胞中へ、1以上の外来性核酸(ヌクレオチド組込み型(integration)ベクターおよび他の核酸分子などの)を導入するために使用され得る。10

【0096】

「宿主細胞」は、着目した物質を持つか、または持つことが可能ないいずれの細胞をも指す。しばしば、宿主細胞は、哺乳動物の細胞である。宿主細胞は、AAVヘルパー・コンストラクト、AAVミニ遺伝子プラスミド、補助機能ベクター、または組み換えAAVの生産に関連する他の移入DNAのレシピエントとして使用されてもよい。前記用語は、トランスフェクトされた起源細胞の子孫を包含する。よって、「宿主細胞」は、本明細書に使用されるとき、外来性DNA配列でトランスフェクトされた細胞を指してもよい。単一親細胞の子孫は、自然変異、偶発的な変異、または意図的な変異に起因して、形態学的にも、ゲノムDNAまたは総DNA相補体においても、起源親細胞と必ずしも完全同一でなくともよいことは理解される。20

【0097】

本明細書に使用されるとき、用語「細胞株」は、*in vitro*での持続的成長または長期成長および分裂が可能な細胞の集団を指す。しばしば、細胞株は、単一の前駆細胞に由来するクローン集団である。自発的または誘発性の変化が、かかるクローン集団の保管または移入の間、核型に生じ得ることも、当該技術分野においてさらに知られている。したがって、言及された細胞株に由来する細胞は、祖先細胞または培養物と正確に同一でなくともよく、言及された細胞株は、かかるバリアントを包含する。30

【0098】

本明細書に使用されるとき、用語「組み換え細胞」は、生物学的に活性なポリペプチドの転写または生物学的に活性な核酸(RNAなどの)の生産に繋がるDNAセグメントなどの外来性DNAセグメントが導入された細胞を指す。

【0099】

細胞はまた、AAVへヘルパー機能を提供するベクター(例として、ヘルパー・ベクター)でトランスフェクトされていてもよい。ヘルパー機能を提供するベクターは、例としてE1a、E1b、E2a、およびE4ORF6を包含する、アデノウイルス機能を提供してもよい。これらの機能を提供するアデノウイルス遺伝子の配列は、血清型2、3、4、7、12および40などの、いずれの知られているアデノウイルス血清型(当該技術分野において知られている、現在同定されているヒト型のいずれをもさらに包含する)からも得られてもよく、よって、いくつかの態様において、方法は、AAV複製、AAV遺伝子転写、および/またはAAVパッケージングに要される1以上の遺伝子を発現するベクターで細胞にトランスフェクトすることを伴う。40

【0100】

本明細書に使用されるとき、用語「ベクター」は、適した制御要素に結び付けられているとき複製することが可能であり、かつ細胞間で遺伝子配列を移入し得る、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスマド、染色体、人工染色体、ウイルス、ビリオン等々などのいずれの遺伝要素をも包含する。よって、前記用語は、クローニングビヒクルおよび発現ビヒクル、ならびにウイルスベクターを包含する。いくつかの態様において、有用な

10

20

30

40

50

ベクターは、転写されるはずの核酸セグメント（例として、核酸配列）がプロモーターの転写制御下に位置付けられているそれらベクターであると企図される。「プロモーター」は、細胞の合成装置(the synthetic machinery)または導入された合成装置によって認識されるDNA配列であって、遺伝子の特異的な転写を開始するのに要求される前記配列を指す。

【0101】

句「作動可能に(operatively)位置付けられている」、「制御下」または「転写制御下」は、プロモーターが、RNAポリメラーゼの開始および遺伝子の発現を制御する核酸に関して正しい場所および方向にあることを意味する。用語「発現ベクターまたはコンストラクト」は、核酸コード配列の一部または全部が転写されることが可能である核酸を含有する遺伝子コンストラクトのいずれのタイプをも意味する。いくつかの態様において、発現は、例えば、転写された遺伝子から、生物学的に活性なポリペプチド産物または阻害性RNA（例として、shRNA、miRNA、miRNAインヒビター）を生成するための、核酸の転写を包含する。

10

【0102】

いくつかのケースにおいて、単離されたカプシド遺伝子は、当該技術分野において周知の方法を使用して組み換えAAVを構築およびパッケージングし、前記遺伝子によってコードされたカプシドタンパク質に関連する機能的特徴を決定するために使用され得る。例えば、単離されたカプシド遺伝子は、レポーター遺伝子（例として、B-ガラクトシダーゼ、GFP、ルシフェラーゼ等々）を含む組み換えAAV(rAAV)を構築およびパッケージングするために使用され得る。次いでrAAVは、動物（例として、マウス）へ送達され得、および単離された新規カプシド遺伝子の組織標的特性は、動物の様々な組織（例として、心臓、肝臓、腎臓）中のレポーター遺伝子の発現を検査することによって決定され得る。単離された新規カプシド遺伝子を特徴付けするための他の方法は本明細書に開示されており、更なる他の方法も当該技術分野において周知である。

20

【0103】

本開示のrAAVを生産するための所望のAAVカプシド中に組み換えベクターをパッケージングするための上述の方法は、限定されることとは意図しておらず、他の好適な方法も当業者には明らかであろう。

30

【0104】

組み換えAAVベクター

本開示の「組み換えAAV(rAAV)ベクター」は典型的には、最低限、導入遺伝子およびその調節配列、および5'および3'AAV逆方向末端配列(ITT R)から構成される。それは、カプシドタンパク質中へパッケージングされ、および選択された標的細胞へ送達される、本組み換えAAVベクターである。いくつかの態様において、導入遺伝子は、着目したポリペプチド、タンパク質、機能的RNA分子（例として、miRNA、miRNAインヒビター）または他の遺伝子産物をコードするベクター配列とは異種の、核酸配列である。核酸コード配列は、標的組織の細胞中、導入遺伝子の転写、翻訳、および/または発現を可能にするやり方で、調節構成成分に作動可能に連結されている。

40

【0105】

ベクターのAAV配列は、典型的には、シス作用5'および3'逆方向末端配列を含む（例として、B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990)を参照）。ITT R配列は、約145bp長である。好ましくは、実質的に、ITT Rをコードする配列全体が分子に使用されるが、これらの配列のある程度の小さな改変は許容される。これらITT R配列の改変能は、当該技術分野における知識の範囲内にある。（例として、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); およびK. Fisher et al., J Virol., 70:520-532 (1996)などのテキストを参照）。本開示に採用されるかかる分子の例は、選択された導入遺伝子配列および結び付けられた調節要素が、5'および3'のAAV ITT R配列に隣接して導入遺伝子を含有する「シス作用(cis-acting)」プラ

50

スミドである。AAVITR配列は、現在同定されている哺乳動物AAV型を包含する、知られているいずれのAAVからも得られてもよい。

【0106】

いくつかの態様において、本開示は、自己相補的なAAVベクターを提供する。本明細書に使用されるとき、用語「自己相補的なAAVベクター」(scAAV)は、AAVのITRの一方からの末端分離部位(terminal resolution site)(TR)の欠如によって生成される二本鎖ベクターゲノムを含有するベクターを指す。TRの欠如は、TRが存在しないベクター末端にて複製開始を防止する。一般に、scAAVベクターは、各終端に野生型(wt)AAV TRを、中央に変異TR(mTR)をもつ、一本鎖の逆方向配列ゲノムを生成する。

10

【0107】

いくつかの態様において、本開示のrAAVは、偽型(pseudotyped)rAAVである。シュードタイピング(Pseudotyping)は、外来ウイルスのエンベロープタンパク質と組み合わせてウイルスまたはウイルスベクターを生産するプロセスである。その結果が、偽型ウイルス粒子である。この方法とともに、外来ウイルスのエンベロープタンパク質は、宿主指向性またはウイルス粒子の増大／減少した安定性を変更するためにも使用され得る。いくつかの側面において、偽型rAAVは、2以上の異なるAAVからの核酸を含むが、ここで一方のAAVからの核酸は、カプシドタンパク質をコードし、少なくとも1つの他方のAAVからの核酸は、他のウイルスのタンパク質および／またはウイルスのゲノムをコードする。いくつかの態様において、偽型rAAVは、あるAAV血清型の逆方向末端配列(ITR)と別のAAV血清型のカプシドタンパク質とを含むAAVを指す。例えば、Yのタンパク質でカプセル化された血清型XのITRを含有する偽型AAVベクターは、AAV X/Y(例として、AAV 2/1は、AAV 2のITRおよびAAV 1のカプシドを有する)と指定されるであろう。いくつかの態様において、偽型rAAVは、あるAAV血清型からのカプシドタンパク質の組織特異的標的能を、別のAAV血清型からのウイルスDNAと組み合わせることによって、導入遺伝子の標的組織への標的送達を可能するのに有用であり得る。

20

【0108】

組み換えAAVベクターについて上に同定された主要な要素に加えて、ベクターはまた、導入遺伝子の要素へ作動可能に(operably)連結されることが必須の従来制御要素も包含するが、前記連結は、プラスミドベクターでトランスフェクトされた細胞中、または本発明によって生産されたウイルスに感染した細胞中、その転写、翻訳および／または発現を許容する形で、なされている。本明細書に使用されるとき、「作動可能に連結された」配列は、着目した遺伝子を制御するための、着目した遺伝子に近接する発現制御配列と、トランスに(in trans)作用するかまたは少し離れたところから(at a distance)作用する発現制御配列との両方を包含する。

30

【0109】

発現制御配列は、適切な転写開始配列、終止配列、プロモーター配列およびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化(ポリA)シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定させる配列；翻訳効率を向上させる配列(例として、Kozakコンセンサス配列)；タンパク質安定性を向上させる配列；および、望ましいときには、コードされた産物の分泌を向上させる配列を包含する。天然、構成的、誘導性および／または組織特異的プロモーターを包含する数多の発現制御配列が当該技術分野において知られており、利用されることもある。

40

【0110】

本明細書で使用されるとき、核酸配列(例として、コード配列)と調節配列とが、「作動可能に」連結されたと言われるのは、核酸配列の発現または転写が、調節配列の影響下または制御下に置かれるように、それらが共有結合的に連結されたときである。核酸配列が翻訳されて機能的なタンパク質になることが所望される場合、2つのDNA配列が作動可能に連結されたと言われるには、5'調節配列におけるプロモーターの誘導が、コード配

50

列の転写をもたらす場合であって、かつ2つのDNA配列間の連結の性質が、(1)フレームシフト変異の導入をもたらさず、(2)プロモーター領域の、コード配列の転写に向かわせる能力と干渉せず、(3)対応するRNA転写産物の、翻訳されてタンパク質になる能力と干渉しない場合である。

【0111】

よって、もしプロモーター領域が核酸配列の転写を行うことができたら、プロモーター領域は、そのDNA配列へ作動可能に(その結果得られた転写産物が翻訳されて所望のタンパク質またはポリペプチドになるように)連結されていたといえる。同様に、2以上のコード領域は、共通のプロモーターからのそれらの転写が、インフレームで翻訳された2以上のタンパク質の発現をもたらすように連結されるとき、作動可能に連結される。いくつかの態様において、作動可能に連結されたコード配列は、融合タンパク質を産み出す。いくつかの態様において、作動可能に連結されたコード配列は、機能的なRNA(例として、shRNA、miRNA、miRNAインヒビター)を産み出す。

10

【0112】

タンパク質をコードする核酸において、ポリアデニル化配列は、一般に、導入遺伝子配列の後であってかつ3' AAVITR配列の前に挿入される。本開示において有用なrAAVコンストラクトはまた、望ましくはプロモーター/エンハンサー配列と導入遺伝子との間に位置するイントロンも含有していてもよい。1つの考え得るイントロン配列は、SV-40に由来し、SV-40 Tイントロン配列と言及される。使用されてもよい別のベクター要素は、内部リボソーム侵入部位(IRES)である。IRES配列は、単一の遺伝子転写物から1つよりも多くのポリペプチドを生産するのに使用される。IRES配列は、1つよりも多くのポリペプチド鎖を含有するタンパク質を生産するのに使用されるであろう。これらのおよび他の一般的なベクター要素の選択は従来続けられており、数多くのかかる配列が入手可能である[例として、Sambrook et al.,およびこれに引用される参考文献、例えば頁3.18 3.26および16.17 16.27、ならびにAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 新しいYork, 1989を参照]。

20

【0113】

いくつかの態様において、口蹄疫ウイルス2A配列が、ポリタンパク質に包含される；これは、ポリタンパク質の切断を媒介することが示された小ペプチド(およそ18アミノ酸長)である(Ryan, M D et al., EMBO, 1994 ; 4: 928-933 ; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996 ; p. 8124-8127 ; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001 ; 8: 864-873 ; およびHalpin, C et al., The Plant Journal, 1999 ; 4: 453-459)。2A配列の切断活性は、プラスミドおよび遺伝子治療ベクター(AAVおよびレトロウイルス)を包含する人工的な系において先に実証された(Ryan, M D et al., EMBO, 1994 ; 4: 928-933 ; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996 ; p. 8124-8127 ; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001 ; 8: 864-873 ; およびHalpin, C et al., The Plant Journal, 1999 ; 4: 453-459 ; de Felipe, P et al., Gene Therapy, 1999 ; 6: 198-208 ; de Felipe, P et al., Human Gene Therapy, 2000 ; 11: 1921-1931. ; およびKlump, H et al., Gene Therapy, 2001 ; 8: 811-817)。

30

【0114】

宿主細胞中の遺伝子発現に必要な調節配列の正確な性質は、種間、組織間または細胞型間で変動してもよいが、一般に、必要に応じて、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列、エンハンサー要素等などの転写および翻訳夫々の開始に関与する5'非転写配列および5'非翻訳配列を包含するであろう。とくに、かかる5'非転写調節配列は、作動可能に(operably)接合された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を包含するプロモーター領域を包含するであろう。調節配列はまた、所望されるとおりの、エンハンサー配列または上流活性化配列をも包含していてもよい。本開示のベクターは、任意に、5'リーダー配列またはシグナル配列を包含していてもよい。適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および裁量の範囲内である。

40

【0115】

50

構成的プロモーターの例は、限定せずに、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス(R S V) L T R プロモーター(任意に、 R S V エンハンサーとともに)、サイトメガロウイルス(C M V) プロモーター(任意に、 C M V エンハンサーとともに)[例として、Boshart et al., Cell, 41:521~530 (1985)を参照]、 S V 4 0 プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 - アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(P G K) プロモーター、および E F 1 プロモーター[Invitrogen]を包含する。

【 0 1 1 6 】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外から供給された化合物、温度などの環境因子、または特定の生理学的状態(例として、急性期、細胞の具体的な分化状態)の有無(the presence)によって、あるいは細胞を複製する際のみ、調節され得る。誘導性プロモーターおよび誘導系は、限定せずに、Invitrogen、ClontechおよびAriadを包含する、様々な商業的供給源から入手可能である。数多くの他の系も記載されており、当業者によって容易に選択され得る。外から供給されたプロモーターによって調節される誘導性プロモーターの例は、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン(M T) プロモーター、デキサメタゾン(D e x) 誘導性マウス乳がんウイルス(M M T V) プロモーター、 T 7 ポリメラーゼプロモーター系(WO 98/10088) ; エクジソン昆虫プロモーター(No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996))、テトラサイクリン抑制系(Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992))、テトラサイクリン誘導系(Gossen et al., Science, 268:1766-1769 (1995)、Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)もまた参照)、 R U 4 8 6 誘導系(Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)およびWang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)) およびラバマイシン誘導系(Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997))を包含する。この文脈において有用であり得るさらに他の誘導性プロモーターのタイプは、特定の生理学的状態、例として、温度、急性期、細胞の具体的な分化状態によって、あるいは細胞を複製する際のみ、調節されるものである。

【 0 1 1 7 】

別の態様において、導入遺伝子のために天然プロモーターが使用されるであろう。天然プロモーターは、導入遺伝子の発現が天然の発現を模倣することが所望されるとき、好ましいこともある。天然プロモーターは、導入遺伝子の発現が、時間的にもしくは発生的に(developmentally)、または組織特異的なやり方で、または特異的な転写刺激に応答して、調節されなければならないときに、使用されてもよい。さらなる態様において、エンハンサー要素、ポリアデニル化部位またはKozakコンセンサス配列などの、他の天然発現制御要素もまた、天然の発現を模倣するのにも使用されてもよい。

【 0 1 1 8 】

いくつかの態様において、調節配列は、組織特異的な遺伝子発現能(capabilities)を付与する。いくつかのケースにおいて、組織特異的な調節配列は、組織特異的なやり方で転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。かかる組織特異的な調節配列(例として、プロモーター、エンハンサー等々)は、当該技術分野において周知である。例示の組織特異的な調節配列は、以下の組織特異的なプロモーター：肝臓特異的サイロキシン結合グロブリン(T B G) プロモーター、インスリンプロモーター、グルカゴンプロモーター、スマトスタチンプロモーター、膵臓ポリペプチド(P P Y) プロモーター、シナブシン-1(S y n) プロモーター、クレアチンキナーゼ(M C K) プロモーター、哺乳動物のデスミン(D E S) プロモーター、 - ミオシン重鎖(a - M H C) プロモーター、胃腸特異的ムチン-2プロモーター、目に特異的なレチノスキンプロモーター、目に特異的な K 1 2 プロモーター、呼吸組織に特異的な C C 1 0 プロモーター、呼吸組織に特異的なサーファクタントタンパク質C(S P - C) プロモーター、乳房組織に特異的な P R C 1 プロモーター、乳房組織に特異的な R R M 2 プロモーター、尿路組織に特異的なウロプラキン2(U P I I) プロモーター、子宮組織に特異的なラクトフェリンプロモーター、または心筋トロポニンT(c T n T) プロモーターに限定されないが、これらを包含する。

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

50

他の例示のプロモーターは、ベータ - アクチンプロモーター、B型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996) ; アルファ - フェトプロテイン (AFP) プロモーター (Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)) 、骨オステオカルシンプロモーター (Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)) ; 骨シアロタンパク質プロモーター (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)) 、 CD 2 プロモーター (Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998)) ; 免疫グロブリン重鎖プロモーター ; T 細胞受容体 - 鎮プロモーター、ニューロンのたとえば、ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) プロモーター (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)) 、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)) 、およびニューロン特異的 v g f 遺伝子プロモーター (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)) 、当業者には明らかであろうものなどを包含する。

【 0120 】

いくつかの態様において、 m i R N A の 1 以上のための 1 以上の結合部位は、 r A A V ベクターの導入遺伝子に組み込まれることで、導入遺伝子を持つ対象の 1 以上の組織において、導入遺伝子の発現を阻害する。当業者は、結合部位が、組織特異的なやり方で導入遺伝子の発現を制御するために選択されてもよいことが解されるであろう。例えば、肝臓特異的 miR-122 のための結合部位は、導入遺伝子中へ組み込まれることで、肝臓におけるその導入遺伝子の発現を阻害し得る。 m R N A 中の標的部位は、 5' UTR 中、 3' UTR 中またはコード領域中にあり得る。典型的には、標的部位は、 m R N A の 3' UTR 中にある。さらによく、導入遺伝子は、複数の m i R N A が、同じ部位または複数の部位を認識することによって m R N A を調節するように、設計されてもよい。複数の m i R N A 結合部位の存在は、複数の R I S C の共同作用をもたらし、および発現の高度に効率的な阻害を提供してもよい。標的部位配列は、合計 5 ~ 100 、 10 ~ 60 、またはそれ以上のヌクレオチドを含んでいてもよい。標的部位配列は、標的遺伝子結合部位の配列のうち少なくとも 5 ヌクレオチドを含んでいてもよい。

【 0121 】

組み換え A A V ベクター : 導入遺伝子コード配列

r A A V ベクターの導入遺伝子配列の組成は、その結果得られるベクターが用いられるであろう用途に依存するであろう。例えば、導入遺伝子配列の 1 タイプは、発現の際、検出可能なシグナルを生産するレポーター配列を包含する。別の例において、導入遺伝子は、治療用タンパク質または治療用機能的 R N A をコードする。別の例において、導入遺伝子は、例として、導入遺伝子を持つ体細胞遺伝子導入動物モデルを創作するため、例として、導入遺伝子産物の機能を研究するため、研究目的で使用されるのが意図されているタンパク質または機能的 R N A をコードする。別の例において、導入遺伝子は、疾患の動物モデルを創作するために使用されるのが意図されているタンパク質または機能的 R N A をコードする。適切な導入遺伝子コード配列は、当業者にとっては明らかであろう。

【 0122 】

導入遺伝子中に提供されてもよいレポーター配列は、限定せずに、 - ラクタマーゼ、 - ガラクトシダーゼ (L a c Z) 、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質 (G F P) 、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) 、ルシフェラーゼ、および当該技術分野において周知のその他をコードする D N A 配列を包含する。それらの発現を推進する調節要素に結び付けられたとき、レポーター配列は、酵素、放射線、比色、蛍光または他の分光学的なアッセイ、蛍光活性化細胞分取アッセイおよび免疫学的アッセイ (酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 、放射免疫アッセイ (R I A) および免疫組織化学を包含する) を包含する従来の手段によって検出可能なシグナルを提供する。例えば、マーカー配列が、 L a c Z 遺伝子である場合、シグナルを伝えるベクターの存在は、 - ガラクトシダーゼ活性についてのアッセイによって検出される。導入遺伝子が、緑色蛍光タンパク質またはルシフェラーゼである場合、シグナルを伝えるベクターは、ルミノメーターにおける色または光の產生によって視覚的に測定され

10

20

30

40

50

得る。かかるレポーターは、例えば、r A A Vの組織特異的な標的能および組織特異的なプロモーター調節活性を検証するのに有用であり得る。

【 0 1 2 3 】

いくつかの側面において、本開示は、例えば、哺乳動物におけるポリペプチド欠乏またはポリペプチド過剰などの、哺乳動物における1以上の遺伝的な欠乏または機能障害を予防または処置する方法における使用のための、および具体的に、細胞および組織におけるかかるポリペプチドの欠乏に繋がる障害の1以上を現すヒトにおいて、欠乏の重症度または程度を処置または低減するための、r A A Vベクターを提供する。方法は、欠乏または障害を患う対象におけるかかる障害を処置するのに充分な量でのおよび期間の、薬学的に容認し得る担体中、1以上の治療用のペプチド、ポリペプチド、s i R N A、マイクロR N A、アンチセンスヌクレオチド等々をコードするr A A Vベクターの対象への投与を伴う。
10

【 0 1 2 4 】

よって、本開示は、哺乳動物対象における病状(disease states)の処置または予防に有用な、1以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードするr A A Vベクターの送達を含む(embraces)。例示の治療用タンパク質は、成長因子、インターロイキン、インターフェロン、抗アポトーシス因子、サイトカイン、抗糖尿病因子、抗アポトーシス剤、凝固因子、抗腫瘍因子からなる群から選択される1以上のポリペプチドを包含する。治療用タンパク質の他の非限定例は、BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-SGF、GM-CS F、ゴナドトロピン、IFN、IFG-1、M-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、TGF-B 2、TNF、プロラクチン、ソマトトロピン、XIAP1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-10(187A)、ウイルスのIL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16 IL-17、およびIL-18を包含する。
20

【 0 1 2 5 】

r A A Vベクターは、遺伝子の低減された発現、その発現の欠如またはその機能障害に関連する疾患を処置するために対象へ移入されるべき遺伝子を含んでいてもよい。例示の遺伝子および関連する病状は、これらに限定されないが、以下を包含する：グルコース - 6 - ホスファターゼ、糖原病(glycogen storage deficiency)1 A型に関連する；ホスホエノールピルビン酸 - カルボキシキナーゼ、P e p c k 欠乏症に関連する；ガラクトース - 1リン酸ウリジルトランスフェラーゼ、ガラクトース血症に関連する；フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、フェニルケトン尿症に関連する；分枝鎖アルファ - ケト酸デヒドロゲナーゼ、メープルシロップ尿症に関連する；フマリルアセト酢酸ヒドロゲナーゼ、チロシン血症1型に関連する；メチルマロニル - C o A ムターゼ、メチルマロン酸血症に関連する；中鎖アシルC o A デヒドロゲナーゼ、中鎖アセチルC o A 欠乏症に関連する；オルニチントランスカルバミラーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ欠乏症に関連する；アルギニノコハク酸シンセターゼ、シトルリン血症に関連する；低密度リポタンパク質受容体タンパク質、家族性高コレステロール血症に関連する；U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ、クリグラー・ナジャー病に関連する；アデノシンデアミナーゼ、重症複合免疫不全症に関連する；ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、痛風およびレッシュ・ナイハン症候群に関連する；ビオチニダーゼ、ビオチニダーゼ欠乏症に関連する；ベータ - グルコセレブロシダーゼ、ゴーシュ病に関連する；ベータ - グルクロニダーゼ、スライ症候群に関連する；ペルオキシソーム膜タンパク質70 k D a、ツェルウェガー症候群に関連する；
30

【 0 1 2 6 】

ポルホビリノーゲンデアミナーゼ、急性間欠性ポルフィリン症に関連する；アルファ - 1 アンチトリプシン欠乏症(気腫)の処置のためのアルファ - 1 アンチトリプシン；サラセミアまたは腎不全に起因する貧血症の処置のためのエリスロポエチン；虚血性疾患の処置のための血管内皮成長因子、アンジオポエチン - 1、および線維芽細胞成長因子；例えば、アテローム性動脈硬化、血栓症、または塞栓症に見られるとおりの閉塞された血管の処置のためのトロンボモジュリンおよび組織因子経路インヒビター；パーキンソン病の処置のための芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ(A A D C)、およびチロシンヒドロキシラ
40

ーゼ(TH)；うっ血性心不全の処置のための、ベータアドレナリン受容体、ホスホランパンに対するアンチセンス、またはホスホランパンの変異形態、筋(小)胞体(the sarco(endo)plasmic reticulum)アデノシントリホスファターゼ-2(SERCA2)、および心臓型(cardiac)アデニリルシクラーゼ；様々ながんの処置のためのp53などの腫瘍抑制遺伝子；炎症性および免疫性障害およびがんの処置のための様々なインターロイキンのうち1種などのサイトカイン；筋ジストロフィーの処置のためのジストロフィンまたはミニジストロフィンおよびユートロフィンまたはミニユートロフィン；ならびに、糖尿病の処置のためのインスリン。

【0127】

いくつかの態様において、本開示は、中枢神経系(CNS)に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、CNS疾患に関連する遺伝子の非限定的なリストである：アルツハイマー病に関連する、DRD2、GRIA1、GRIA2、GRIN1、SLC1A1、SYP、SYT1、CHRNA7、3Rtau/4rTUS、APP、BAX、BCL-2、GRIK1、GFAP、IL-1、AGER；パーキンソン病に関連する、UCH-L1、SKP1、EGLN1、Nurr-1、BDNF、TrkB、gstm1、S106；ハンチントン病に関連する、IT15、PRNP、JPH3、TBP、ATXN1、ATXN2、ATXN3、アトロフィン1、FTL、TITF-1；フリートライヒ運動失調症に関連する、FXN；カナバン病に関連する、ASPA；筋ジストロフィーに関連する、DMD；および脊髄性筋萎縮症に関連する、SMN1、UBE1、DYNC1H1。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

10

【0128】

いくつかの態様において、本開示は、心血管系に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸に関する。以下は、心血管疾患に関連する遺伝子の非限定的なリストである：VEGF、FGF、SDF-1、コネキシン40、コネキシン43、SCN4a、HIF1、SERCa2a、ADCY1、およびADCY6。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

20

【0129】

いくつかの態様において、本開示は、肺系統に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、肺疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：TNF、TGF-1、SFTPA1、SFTP A2、SFTPB、SFTPC、HPS1、HPS3、HPS4、ADTB3A、IL1A、IL1B、LTA、IL6、CXCR1、およびCXCR2。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

30

【0130】

いくつかの態様において、本開示は、肝臓に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、肝臓疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：1-AT、HFE、ATP7B、フマリルアセト酢酸ヒドラーーゼ(FAH)、グルコース-6-ホスファターゼ、NCAN、GCKR、LYPLAL1、およびPNPLA3。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

40

【0131】

いくつかの態様において、本開示は、腎臓に関連する疾病、疾患または障害の処置に有

50

用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、腎臓疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：PKD1、PKD2、PKHD1、NPHS1、NPHS2、PLCE1、CD2AP、LAMB2、TRPC6、WT1、LMX1B、SMARCAL1、COQ2、PDSS2、SCARB3、FN1、COL4A5、COL4A6、COL4A3、COL4A4、FOX1C、RET、UPK3A、BMP4、SIX2、CDC5L、USF2、ROBO2、SLIT2、EYA1、MYOG、SIX1、SIX5、FRAS1、FREM2、GATA3、KAL1、PAX2、TCF2、およびSALL1。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

10

【0132】

いくつかの態様において、本開示は、目に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、眼疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：CFH、C3、MT-ND2、ARMS2、TIMP3、CAMK4、FMN1、RHO、USH2A、RPGR、RP2、TMCO、SIX1、SIX6、LRP12、ZFP112、TBK1、GALC、ミオシリン、CYP1B1、CAV1、CAV2、オプチニューリンおよびCDKN2B。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

20

【0133】

いくつかの態様において、本開示は、乳房に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、乳房疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：BRCA1、BRCA2、Tp53、PTEN、HER2、BRAF、およびPARP1。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

20

【0134】

いくつかの態様において、本開示は、胃腸管に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、胃腸疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：CYP2C19、CCL26、APC、IL12、IL10、およびIL-18。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

30

【0135】

いくつかの態様において、本開示は、膵臓に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、膵臓疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：PRSS1、SPINK1、STK11、MLH1、KRAS2、p16、p53、およびBRAF。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

40

【0136】

いくつかの態様において、本開示は、尿路に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、尿路疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：HSPA1B、CXCR1 & 2、TLR2、TLR4、TGF-1、FGFR3、RB1、HRAS、TP53、およびTSC1。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み

50

換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

【0137】

いくつかの態様において、本開示は、子宮に関連する疾病、疾患または障害の処置に有用なタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含むAAVに関する。以下は、眼疾患に関連する遺伝子の非現実的なリストである：DN-ER、MLH1、MSH2、MSH6、PMS1、およびPMS2。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子またはそれらのフラグメントの1以上を発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。いくつかの態様において、本開示は、上述の遺伝子の1以上の発現を阻害する1以上の機能的RNAを発現する核酸を含む組み換えAAVに関する。

10

【0138】

本開示のrAAVは、対象において発現が低減されたか、サイレンシングされたか、またはそうでなければ機能障害である遺伝子（例として、がんを有する対象においてサイレンシングされた腫瘍サプレッサー）の発現を回復させるために使用され得る。本開示のrAAVはまた、対象において異常に発現した遺伝子（例として、がんを有する対象において発現されたがん遺伝子）の発現をノックダウンするためにも使用され得る。いくつかの態様において、がんに関連する遺伝子産物（例として、腫瘍サプレッサー）をコードする核酸を含むrAAVベクターは、がんを有する対象へrAAVベクターを持つrAAVを投与することによって、がんを処置するために使用されてもよい。いくつかの態様において、がんに関連する遺伝子産物（例として、がん遺伝子）の発現を阻害する低分子干渉核酸（例として、shRNA、miRNA）をコードする核酸を含むrAAVベクターは、がんを有する対象へrAAVベクターを持つrAAVを投与することによって、がんを処置するために使用されてもよい。いくつかの態様において、がんに関連する遺伝子産物（またはがんに関連する遺伝子の発現を阻害する機能的RNA）をコードする核酸を含むrAAVベクターは、例として、がんを研究するために、またはがんを処置する治療薬(therapeutics)を同定するために、研究目的で使用されてもよい。

20

【0139】

以下は、がんの発症に関連することが知られている例示の遺伝子（例として、がん遺伝子および腫瘍サプレッサー）の非現実的なリストである：AARS、ABCB1、ABCC4、ABI2、ABL1、ABL2、ACK1、ACP2、ACY1、ADSL、AK1、AKR1C2、AKT1、ALB、ANPEP、ANXA5、ANXA7、AP2M1、APC、ARHGAP5、ARHGEF5、ARID4A、ASNS、ATF4、ATM、ATP5B、ATP5O、AXL、BARD1、BAX、BCL2、BHLHB2、BLMH、BRAF、BRCA1、BRCA2、BTK、CANX、CAP1、CAPN1、CAPNS1、CAV1、CBFB、CBLB、CCL2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CCT5、CCYR61、CD24、CD44、CD59、CDC20、CDC25、CDC25A、CDC25B、CDC2L5、CDK10、CDK4、CDK5、CDK9、CDKL1、CDKN1A、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2D、CEBPG、CENPC1、CGRRF1、CHAF1A、CIB1、CKMT1、CLK1、CLK2、CLK3、CLNS1A、CLTC、COL1A1、COL6A3、COX6C、COX7A2、CRAT、CRHR1、CSF1R、CSK、CSNK1G2、CTNNA1、CTNNB1、CTPS、CTSC、CTSD、CUL1、CYR61、DCC、DCN、DDX10、DEK、DHCR7、DHRS2、DHX8、DLG3、DVL1、DVL3、E2F1、E2F3、E2F5、EGFR、EGR1、EIF5、EPHA2、ERBB2、ERBB3、ERBB4、ERCC3、ETV1、ETV3、ETV6、F2R、FASTK、FBN1、FBN2、FES、FGFR1、FGR、FKBP8、FN1、FOS、FOSL1、FOSL2、FOXG1A、FOXO1A、FRAP1、FRZB、FTL、FZD2、FZD5、FZD9、G22P1、GAS6、GCN5L2、GDF15、GNA13、GNAS、GNB2、GNB2L1、GPR39、GRB2、GSK3A、GSPT1、GTF2I、HDAC1、HDGF、HMMR、HPRT1、HRB、HSPA4、HSPA5、HSPA8、HSPB1、HSPH1、HYAL1、HYOU1、ICAM1、ID1、ID2、IDUA、IER3、IFITM1、IGF1R、IGF2R、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5、IL1B、ILK、ING1、IRF3、ITGA3、ITGA6、ITGB4、JAK1、JAK1A、JUN、JUNB、JUND、K-アルファ-1、KIT、KITLG、KLK10、KPNA2、KRAS2、KRT18、KRT2A、KRT9、LAMB1、LAMP2、LCK、LCN2、LEP、LITAF、LRPAP1、LTF、LYN、LZTR1、MADH1、MAP2K2

30

40

50

、MAP3K8、MAPK12、MAPK13、MAPKAPK3、MAPRE1、MARS、MAS1、MCC、MCM2、MCM4、MDM2、MDM4、MET、MGST1、MICB、MLLT3、MME、MMP1、MMP14、MMP17、MMP2、MMDA、MSH2、MSH6、MT3、MYB、MYBL1、MYBL2、MYC、MYCL1、MYCN、MYD88、MYL9、MYLK、NEO1、NF1、NF2、NFKB1、NFKB2、NFSF7、NID、NINJ1、NMBR、NME1、NME2、NME3、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH4、NPM1、NQO1、NR1D1、NR2F1、NR2F6、NRAS、NRG1、NSEP1、OSM、PA2G4、PABPC1、PCNA、PCTK1、PCTK2、PCTK3、PDGFA、PDGFB、PDGFR A、PDPK1、PEA15、PFDN4、PFDN5、PGAM1、PHB、PIK3CA、PIK3CB、PIK3CG、PIM1、PKM2、PKMYT1、PLK2、PPARD、PPARG、PPIH、PPP1CA、PPP2R5A、PRDX2、PRDX4、PRKAR1A、PRKCBP1、PRNP、PRSS15、PSMA1、PTCH、PTEN、PTGS1、PTMA、PTN、PTPRN、RAB5A、RAC1、RAD50、RAF1、RALBP1、RAP1A、RARA、RAR_B、RASGRF1、RB1、RBBP4、RBL2、REA、REL、RELA、REL_B、RET、RFC2、RGS19、RHOA、RHOB、RHOC、RHOD、RIPK1、RPN2、RPS6KB1、RRM1、SARS、SELENBP1、SEMA3C、SEMA4D、SEPP1、SERPINH1、SFN、SFPQ、SFRS7、SHB、SHH、SIAH2、SIVA、SIVA TP53、SKI、SKIL、SLC16A1、SLC1A4、SLC20A1、SMO、SMPD1、SNAI2、SND1、SNRPB2、SOCS1、SOCS3、SOD1、SORT1、SPINT2、SPRY2、SRC、SRPX、STAT1、STAT2、STAT3、STAT5B、STC1、TAF1、TBL3、TBRG4、TCF1、TCF7L2、TFAP2C、TFDP1、TFDP2、TGFA、TGFB1、TGFB1I、TGFB2、TGFB3、THBS1、TIE、TIMP1、TIMP3、TJP1、TK1、TLE1、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF6、TNFSF7、TNK1、TOB1、TP53、TP53BP2、TP53I3、TP73、TPBG、TPT1、TRADD、TRAM1、TRRAP、TSG101、TUFM、TXNRD1、TYRO3、UBC、UBE2L6、UCHL1、USP7、VDAC1、VEGF、VHL、VIL2、WEE1、WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WT1、XRCC1、YES1、YWHAB、YWHAZ、ZAP70、およびZNF9。

【0140】

rAAVベクターは、導入遺伝子として、アポトーシスをモジュレートするタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含んでいてもよい。以下は、アポトーシスに関連する遺伝子およびこれらの遺伝子産物およびそれらのホモログをコードする核酸および本開示のある態様において導入遺伝子として有用なこれらの遺伝子およびそれらのホモログの発現を阻害する低分子干渉核酸（例として、shRNA、miRNA）をコードする核酸の非現実的なリストである：RPS27A、ABL1、AKT1、APAF1、BAD、BAG1、BAG3、BAG4、BAK1、BAX、BCL10、BCL2、BCL2A1、BCL2L1、BCL2L10、BCL2L11、BCL2L12、BCL2L13、BCL2L2、BCLAF1、BFAR、BID、BIK、NAIP、BIRC2、BIRC3、XIAP、BIRC5、BIRC6、BIRC7、BIRC8、BNIP1、BNIP2、BNIP3、BNIP3L、BOK、BRAF、CARD10、CARD11、NLRC4、CARD14、NOD2、NOD1、CARD6、CARD8、CARD9、CASP1、CASP10、CASP14、CASP2、CASP3、CASP4、CASP5、CASP6、CASP7、CASP8、CASP9、CFLAR、CIDEA、CIDE�、CRADD、DAPK1、DAPK2、DFFA、DFFB、FADD、GADD45A、GDNF、HRK、IGF1R、LTA、LTBR、MCL1、NOL3、PYCARD、RIPK1、RIPK2、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF10C、TNFRSF10D、TNFRSF11B、TNFRSF12A、TNFRSF14、TNFRSF19、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF25、CD40、FAS、TNFRSF6B、CD27、TNFRSF9、TNFSF10、TNFSF14、TNFSF18、CD40LG、FASLG、CD70、TNFSF8、TNFSF9、TP53、TP53BP2、TP73、TP63、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5 DRD2、GRIA1、GRIA2、GRIN1、SLC1A1、SYP、SYT1、CHRNA7、3Rtau/4rTUS、APP、BAX、BCL-2、GRIK1、GFAP、IL-1、AGER、UCH-L1、SKP1、EGLN1、Nurr-1、BDNF、TrkB、gstm1、S106、IT15、PRNP、JPH3、TBP、ATXN1、ATXN2、ATXN3、アトロフィン1、FTL、TITF-1、FXN、ASPA、DMD、およびSMN1、UBE1、DYNC1H1。

【0141】

当業者はまた、タンパク質またはポリペプチドをコードする導入遺伝子のケースにおいて

10

20

30

40

50

て、保存的アミノ酸置換をもたらす変異が、導入遺伝子になされることで、タンパク質またはポリペプチドの機能的に等価なバリエントまたはホモログを提供し得ることも認識するであろう。いくつかの側面において、本開示は、導入遺伝子の保存的アミノ酸置換をもたらす配列変異(sequence alterations)を含む(embraces)。いくつかの態様において、導入遺伝子は、ドミナントネガティブ変異を有する遺伝子を含む。例えば、導入遺伝子は、野生型タンパク質と同じ要素と相互作用する変異タンパク質を発現し、それによって、野生型タンパク質の機能の同じ側面をブロックし得る。

【0142】

有用な導入遺伝子産物はまた、m i R N Aをも包含する。m i R N Aおよび他の低分子干渉核酸は、標的R N A転写産物の切断／分解または標的メッセンジャーR N A(m R N A)の翻訳抑制を介して、遺伝子発現を調節する。m i R N Aは、典型的には、最終的に19～25の非翻訳R N A産物として、天然に発現される。m i R N Aは、標的m R N Aの3'非翻訳領域(UTR)との配列特異的相互作用を通して、それらの活性を呈する。内在的に発現されるこれらのm i R N Aは、ヘアピン前駆体を形成し、続いてプロセシングされてm i R N A二重鎖になり、さらに「成熟」一本鎖m i R N A分子になる。この成熟m i R N Aは、標的m R N Aの(例として、3'UTR領域における)標的部位を、成熟m i R N Aに対するそれらの相補性に基づき同定する多タンパク質複合体m i R I S Cをガイドする。

【0143】

m i R N A遺伝子およびそれらのホモログの以下の非制限的なリストは、本方法のある態様において導入遺伝子によってコードされる低分子干渉核酸(例として、m i R N Aスポンジ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、T u D R N A)に、導入遺伝子としてまたは標的として有用である: hsa-let-7a、hsa-let-7a*、hsa-let-7b、hsa-let-7b*、hsa-let-7c、hsa-let-7c*、hsa-let-7d、hsa-let-7d*、hsa-let-7e、hsa-let-7e*、hsa-let-7f、hsa-let-7f-1*、hsa-let-7f-2*、hsa-let-7g、hsa-let-7g*、hsa-let-7i、hsa-let-7i*、hsa-miR-1、hsa-miR-100、hsa-miR-100*、hsa-miR-101、hsa-miR-101*、hsa-miR-103、hsa-miR-105、hsa-miR-105*、hsa-miR-106a、hsa-miR-106a*、hsa-miR-106b、

【0144】

hsa-miR-106b*、hsa-miR-107、hsa-miR-10a、hsa-miR-10a*、hsa-miR-10b、hsa-miR-10b*、hsa-miR-1178、hsa-miR-1179、hsa-miR-1180、hsa-miR-1181、hsa-miR-1182、hsa-miR-1183、hsa-miR-1184、hsa-miR-1185、hsa-miR-1197、hsa-miR-1200、hsa-miR-1201、hsa-miR-1202、hsa-miR-1203、hsa-miR-1204、hsa-miR-1205、hsa-miR-1206、hsa-miR-1207-3p、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1208、hsa-miR-122、hsa-miR-122*、hsa-miR-1224-3p、hsa-miR-1224-5p、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-1226、hsa-miR-1226*、hsa-miR-1227、hsa-miR-1228、hsa-miR-1228*、hsa-miR-1229、hsa-miR-1231、hsa-miR-1233、hsa-miR-1234、hsa-miR-1236、hsa-miR-1237、hsa-miR-1238、hsa-miR-124、hsa-miR-124*、hsa-miR-1243、hsa-miR-1244、hsa-miR-1245、hsa-miR-1246、hsa-miR-1247、hsa-miR-1248、hsa-miR-1249、hsa-miR-1250、hsa-miR-1251、hsa-miR-1252、hsa-miR-1253、hsa-miR-1254、hsa-miR-1255a、hsa-miR-1255b、hsa-miR-1256、hsa-miR-1257、hsa-miR-1258、hsa-miR-1259、hsa-miR-125a-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-125b、hsa-miR-125b-1*、hsa-miR-125b-2*、hsa-miR-126、hsa-miR-126*、hsa-miR-1260、hsa-miR-1261、hsa-miR-1262、hsa-miR-1263、hsa-miR-1264、hsa-miR-1265、hsa-miR-1266、hsa-miR-1267、hsa-miR-1268、hsa-miR-1269、hsa-miR-1270、hsa-miR-1271、hsa-miR-1272、hsa-miR-1273、hsa-miR-127-3p、hsa-miR-1274a、hsa-miR-1274b、hsa-miR-1275、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-1276、hsa-miR-1277、hsa-miR-1278、hsa-miR-1279、hsa-miR-128、hsa-miR-1280、hsa-miR-1281、hsa-miR-1282、hsa-miR-1283、hsa-miR-1284、hsa-miR-1285、hsa-miR-1286、hsa-m

10

20

30

40

50

iR-1287、hsa-miR-1288、hsa-miR-1289、hsa-miR-129*、hsa-miR-1290、hsa-miR-1291、hsa-miR-1292、hsa-miR-1293、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-1294、hsa-miR-1295、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-1296、hsa-miR-1297、hsa-miR-1298、hsa-miR-1299、hsa-miR-1300、hsa-miR-1301、hsa-miR-1302、hsa-miR-1303、hsa-miR-1304、hsa-miR-1305、hsa-miR-1306、hsa-miR-1307、hsa-miR-1308、hsa-miR-130a、hsa-miR-130a*、hsa-miR-130b、hsa-miR-130b*、hsa-miR-132、hsa-miR-132*、hsa-miR-1321、hsa-miR-1322、hsa-miR-1323、hsa-miR-1324、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-134、hsa-miR-135a、hsa-miR-135a*、hsa-miR-135b、hsa-miR-135b*、hsa-miR-136、hsa-miR-136*、hsa-miR-137、hsa-miR-138、hsa-miR-138-1*、hsa-miR-138-2*、hsa-miR-139-3p、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-141、hsa-miR-141*、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-143、hsa-miR-143*、hsa-miR-144、hsa-miR-144*、hsa-miR-145、hsa-miR-145*、hsa-miR-146a、hsa-miR-146a*、hsa-miR-146b-3p、hsa-miR-146b-5p、hsa-miR-147、hsa-miR-147b、hsa-miR-148a、hsa-miR-148a*、hsa-miR-148b、hsa-miR-148b*、hsa-miR-149、hsa-miR-149*、hsa-miR-150、hsa-miR-150*、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-151-5p、hsa-miR-152、hsa-miR-153、hsa-miR-154、hsa-miR-154*、hsa-miR-155、hsa-miR-155*、

【 0 1 4 5 】

hsa-miR-15a、hsa-miR-15a*、hsa-miR-15b、hsa-miR-15b*、hsa-miR-16、hsa-miR-16-1*、hsa-miR-16-2*、hsa-miR-17、hsa-miR-17*、hsa-miR-181a、hsa-miR-181a*、hsa-miR-181a-2*、hsa-miR-181b、hsa-miR-181c、hsa-miR-181c*、hsa-miR-181d、hsa-miR-182、hsa-miR-182*、hsa-miR-1825、hsa-miR-1826、hsa-miR-1827、hsa-miR-183、hsa-miR-183*、hsa-miR-184、hsa-miR-185、hsa-miR-185*、hsa-miR-186、hsa-miR-186*、hsa-miR-187、hsa-miR-187*、hsa-miR-188-3p、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-18a、hsa-miR-18a*、hsa-miR-18b、hsa-miR-18b*、hsa-miR-190、hsa-miR-190b、hsa-miR-191、hsa-miR-191*、hsa-miR-192、hsa-miR-192*、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b、hsa-miR-193b*、hsa-miR-194、hsa-miR-194*、hsa-miR-195、hsa-miR-195*、hsa-miR-196a、hsa-miR-196a*、hsa-miR-196b、hsa-miR-197、hsa-miR-198、hsa-miR-199a-3p、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-199b-5p、hsa-miR-19a、hsa-miR-19a*、hsa-miR-19b、hsa-miR-19b-1*、hsa-miR-19b-2*、hsa-miR-200a、hsa-miR-200a*、hsa-miR-200b、hsa-miR-200b*、hsa-miR-200c、hsa-miR-200c*、hsa-miR-202、hsa-miR-202*、hsa-miR-203、hsa-miR-204、hsa-miR-205、hsa-miR-206、hsa-miR-208a、hsa-miR-208b、hsa-miR-20a、hsa-miR-20a*、hsa-miR-20b、hsa-miR-20b*、hsa-miR-21、hsa-miR-21*、hsa-miR-210、hsa-miR-211、hsa-miR-212、hsa-miR-214、hsa-miR-214*、hsa-miR-215、hsa-miR-216a、hsa-miR-216b、hsa-miR-217、hsa-miR-218、hsa-miR-218-1*、hsa-miR-218-2*、hsa-miR-219-1-3p、hsa-miR-219-2-3p、hsa-miR-219-5p、hsa-miR-22、hsa-miR-22*、hsa-miR-220a、hsa-miR-220b、hsa-miR-220c、hsa-miR-221、hsa-miR-221*、hsa-miR-222、hsa-miR-222*、hsa-miR-223、hsa-miR-223*、hsa-miR-224、hsa-miR-23a、hsa-miR-23a*、hsa-miR-23b、hsa-miR-23b*、hsa-miR-24、hsa-miR-24-1*、hsa-miR-24-2*、hsa-miR-25、hsa-miR-25*、hsa-miR-26a、hsa-miR-26a-1*、hsa-miR-26a-2*、hsa-miR-26b、hsa-miR-26b*、hsa-miR-27a、hsa-miR-27a*、hsa-miR-27b、hsa-miR-27b*、hsa-miR-28-3p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-296-3p、hsa-miR-296-5p、hsa-miR-297、hsa-miR-298、hsa-miR-299-3p、hsa-miR-299-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-29a*、hsa-miR-29b、hsa-miR-29b-1*、hsa-miR-29b-2*、hsa-miR-29c、hsa-miR-29c*、hsa-miR-300、hsa-miR-301a、hsa-miR-301b、hsa-miR-302a、hsa-miR-302a*、hsa-miR-302b、hsa-miR-302b*、hsa-miR-302c、hsa-miR-302c*、hsa-miR-302d、hsa-miR-302d*、hsa-miR-302e

10

20

30

40

50

、hsa-miR-302f、hsa-miR-30a、hsa-miR-30a*、hsa-miR-30b、hsa-miR-30b*、hsa-miR-30c、hsa-miR-30c-1*、hsa-miR-30c-2*、hsa-miR-30d、hsa-miR-30d*、hsa-miR-30e、hsa-miR-30e*、hsa-miR-31、hsa-miR-31*、hsa-miR-32、hsa-miR-32*、hsa-miR-320a、hsa-miR-320b、hsa-miR-320c、hsa-miR-320d、hsa-miR-323-3p、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-325、hsa-miR-326、hsa-miR-328、hsa-miR-329、hsa-miR-330-3p、

【 0 1 4 6 】

hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335*, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33a*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b*, hsa-miR-340, hsa-miR-340*, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b*, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c, hsa-miR-377, hsa-miR-377*, hsa-miR-378, hsa-miR-378*, hsa-miR-379, hsa-miR-379*, hsa-miR-380, hsa-miR-380*, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411*, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424*, hsa-miR-425, hsa-miR-425*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431*, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-miR-488*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-497, hsa-miR-497*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500*, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-505*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518e*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f*, hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522,

【 0 1 4 7 】

hsa-miR-523、hsa-miR-524-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-525-3p、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-526b、hsa-miR-526b*、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hs

a-miR-539、hsa-miR-541、hsa-miR-541*、hsa-miR-542-3p、hsa-miR-542-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-544、hsa-miR-545、hsa-miR-545*、hsa-miR-548a-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-548b-3p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-548e、hsa-miR-548f、hsa-miR-548g、hsa-miR-548h、hsa-miR-548i、hsa-miR-548j、hsa-miR-548k、hsa-miR-548l、hsa-miR-548m、hsa-miR-548n、hsa-miR-548o、hsa-miR-548p、hsa-miR-549、hsa-miR-550、hsa-miR-550*、hsa-miR-551a、hsa-miR-551b、hsa-miR-551b*、hsa-miR-552、hsa-miR-553、hsa-miR-554、hsa-miR-555、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-556-5p、hsa-miR-557、hsa-miR-558、hsa-miR-559、hsa-miR-561、hsa-miR-562、hsa-miR-563、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-567、hsa-miR-568、hsa-miR-569、hsa-miR-570、hsa-miR-571、hsa-miR-572、hsa-miR-573、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-574-5p、hsa-miR-575、hsa-miR-576-3p、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-577、hsa-miR-578、hsa-miR-579、hsa-miR-580、hsa-miR-581、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-584、hsa-miR-585、hsa-miR-586、hsa-miR-587、hsa-miR-588、hsa-miR-589、hsa-miR-589*、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-591、hsa-miR-592、hsa-miR-593、hsa-miR-593*、hsa-miR-595、hsa-miR-596、hsa-miR-597、hsa-miR-598、hsa-miR-599、hsa-miR-600、hsa-miR-601、hsa-miR-602、hsa-miR-603、hsa-miR-604、hsa-miR-605、hsa-miR-606、hsa-miR-607、hsa-miR-608、hsa-miR-609、hsa-miR-610、hsa-miR-611、hsa-miR-612、hsa-miR-613、hsa-miR-614、hsa-miR-615-3p、hsa-miR-615-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-616*、hsa-miR-617、hsa-miR-618、hsa-miR-619、hsa-miR-620、hsa-miR-621、hsa-miR-622、hsa-miR-623、hsa-miR-624、hsa-miR-624*、hsa-miR-625、hsa-miR-625*、hsa-miR-626、hsa-miR-627、hsa-miR-628-3p、hsa-miR-628-5p、hsa-miR-629、hsa-miR-629*、hsa-miR-630、hsa-miR-631、hsa-miR-632、hsa-miR-633、hsa-miR-634、hsa-miR-635、hsa-miR-636、hsa-miR-637、hsa-miR-638、hsa-miR-639、hsa-miR-640、hsa-miR-641、hsa-miR-642、hsa-miR-643、hsa-miR-644、hsa-miR-645、hsa-miR-646、hsa-miR-647、hsa-miR-648、hsa-miR-649、hsa-miR-650、hsa-miR-651、hsa-miR-652、hsa-miR-653、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-654-5p、hsa-miR-655、hsa-miR-656、hsa-miR-657、hsa-miR-658、hsa-miR-659、hsa-miR-660、hsa-miR-661、hsa-miR-662、hsa-miR-663、hsa-miR-663b、hsa-miR-664、hsa-miR-664*、hsa-miR-665、hsa-miR-668、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-675、hsa-miR-7、hsa-miR-708、hsa-miR-708*、hsa-miR-7-1*、hsa-miR-7-2*、hsa-miR-720、hsa-miR-744、hsa-miR-744*、hsa-miR-758、hsa-miR-760、hsa-miR-765、hsa-miR-766、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-767-5p、hsa-miR-768-3p、hsa-miR-768-5p、

【0148】

hsa-miR-769-3p、hsa-miR-769-5p、hsa-miR-770-5p、hsa-miR-802、hsa-miR-873、hsa-miR-874、hsa-miR-875-3p、hsa-miR-875-5p、hsa-miR-876-3p、hsa-miR-876-5p、hsa-miR-877、hsa-miR-877*、hsa-miR-885-3p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-886-3p、hsa-miR-886-5p、hsa-miR-887、hsa-miR-888、hsa-miR-888*、hsa-miR-889、hsa-miR-890、hsa-miR-891a、hsa-miR-891b、hsa-miR-892a、hsa-miR-892b、hsa-miR-9、hsa-miR-9*、hsa-miR-920、hsa-miR-921、hsa-miR-922、hsa-miR-923、hsa-miR-924、hsa-miR-92a、hsa-miR-92a-1*、hsa-miR-92a-2*、hsa-miR-92b、hsa-miR-92b*、hsa-miR-93、hsa-miR-93*、hsa-miR-933、hsa-miR-934、hsa-miR-935、hsa-miR-936、hsa-miR-937、hsa-miR-938、hsa-miR-939、hsa-miR-940、hsa-miR-941、hsa-miR-942、hsa-miR-943、hsa-miR-944、hsa-miR-95、hsa-miR-96、hsa-miR-96*、hsa-miR-98、hsa-miR-99a、hsa-miR-99a*、hsa-miR-99b、およびhsa-miR-99b*。

【0149】

10

20

30

40

50

m i R N A は、これが標的にする m R N A の機能を阻害し、結果として、m R N A によってコードされるポリペプチドの発現を阻害する。よって、m i R N A の活性を（部分的にまたは全体的に）ブロックすること（例として、m i R N A をサイレンシングすること）は、その発現が阻害されるポリペプチドの発現を効率的に誘発または回復し得る（ポリペプチドを抑制解除する）。一態様において、m i R N A の m R N A 標的によってコードされるポリペプチドの抑制解除は、様々な方法のいずれか 1 つを通して細胞中の m i R N A 活性を阻害することによって達成される。

【 0 1 5 0 】

例えば、m i R N A の活性をブロックすることは、m i R N A と相補的または実質的に相補的な低分子干渉核酸（例として、アンチセンスオリゴヌクレオチド、m i R N A スポンジ、T u D R N A ）とのハイブリダイゼーションによって達成され、これによって、m i R N A とその標的 m R N A との相互作用がブロックされ得る。本明細書に使用されるとき、m i R N A と実質的に相補的な低分子干渉核酸は、m i R N A とハイブリダイズして m i R N A の活性をブロックすることが可能であるものである。いくつかの態様において、m i R N A と実質的に相補的な低分子干渉核酸は、m i R N A と、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または 18 塩基を除く全塩基にて相補的である低分子干渉核酸である。いくつかの態様において、m i R N A と実質的に相補的な低分子干渉核酸は、つまり、少なくとも 1 塩基で m i R N A と相補的である低分子干渉核酸配列である。

【 0 1 5 1 】

「m i R N A インヒビター」は、m i R N A 機能、発現および / またはプロセシングをブロックする剤である。実例として、これらの分子は、これらに限定されないが、マイクロ R N A 特異的アンチセンス、マイクロ R N A スポンジ、タフデコイ(tough decoy) R N A (T u D R N A)、およびドローシャ複合体との m i R N A 相互作用を阻害するマイクロ R N A オリゴヌクレオチド（二本鎖、ヘアピン、短いオリゴヌクレオチド）を包含する。マイクロ R N A インヒビターは、上に論じられたとおり、r A A V ベクターの導入遺伝子から細胞中に発現され得る。マイクロ R N A スポンジは、相補的な 7 マーの(heptameric)シード(seed)配列を通して m i R N A を特異的に阻害する (Ebert, M.S. Nature Methods, Epub August, 12, 2007)。いくつかの態様において、m i R N A のファミリー全員が、単一のスponジ配列を使用してサイレンシングされ得る。T u D R N A は、哺乳動物細胞において特異的な m i R N A の効率的かつ長期抑制を達成する（例として、Takeshi Haraguchi, et al., Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 6 e43 を参照。T u D R N A に関するこの内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。細胞中の m i R N A 機能をサイレンシング (m i R N A 標的の抑制解除) するための他の方法も、当業者にとっては明らかであろう。

【 0 1 5 2 】

いくつかの態様において、組み換え R N A ベクターのクローニング収容能力(the cloning capacity)は、所望のコード配列を限定することがあり、ウイルスの 4 . 8 キロベースゲノムの完全置換(the complete replacement)を要求することがある。したがって、大きな遺伝子は、いくつかのケースにおいて、標準的な組み換え A A V ベクターにおける使用に好適ではないこともある。当業者は、限定されたコード収容能力を克服するための選択肢は当該技術分野において利用可能であることを解するであろう。例えば、2つのゲノムの A A V I T R は、アニールすることでヘッドトゥーテール(head to tail)のコンカテマーを形成し得、ベクターの収容能力をほぼ 2 倍にする。スプライシング部位の挿入は、転写産物からの I T R の除去を可能にする。限定されたクローニング収容能力を克服するための他の選択肢も、当業者にとっては明らかであろう。

【 0 1 5 3 】

r A A V ベースの遺伝子移入を使用して生産された体細胞遺伝子導入動物モデル

本開示はまた、組み換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ベースの方法を使用する疾患の体細胞遺伝子導入動物モデルの生産にも関する。方法は、A A V 血清型およびそれらの

10

20

30

40

50

バリエントが、成体動物において組織特異的なやり方で効率的かつ安定的な遺伝子移入を媒介するという所見に、少なくとも一部は、基づく。rAAV要素（カプシド、プロモーター、導入遺伝子産物）は、安定な導入遺伝子を適時かつ組織特異的なやり方で(*in a timely and tissue specific manner*)発現する体細胞遺伝子導入動物モデルを獲得するために、組み合わせられる。本開示の方法によって生産される体細胞遺伝子導入動物は、ヒト疾患、病理学的状態の有用なモデルとして役立ち得るか、および／またはその機能（例として、組織特異的な、疾患の役割(*tissue specific, disease role*)）が知られていないかまたは完全には理解されていない遺伝子の影響(*the effects*)を特徴付けするのに役立ち得る。

【0154】

10

例えば、動物（例として、マウス）は、別々の発達段階(*a developmental stage*)（例として、年齢(*age*)）にて、特異的な組織の標的能力（例として、肝臓、心臓、脾臓）を有するカプシドと、疾患に関する遺伝子の発現を推進する組織特異的プロモーターを有する導入遺伝子とを含むrAAVで感染され得る。感染に際し、rAAVは、標的組織の別々の細胞に感染して、導入遺伝子の産物を生産する。

【0155】

20

いくつかの態様において、導入遺伝子のコード領域の配列は改変されている。改変は、導入遺伝子によってコードされる産物の機能を変更してもよい。次いで改変の効果は、本明細書に開示の方法を使用して体細胞遺伝子導入動物モデルを生成することによって*in vivo*で研究され得る。いくつかの態様において、コード領域の配列の改変は、フラグメント（例として、トランケート型(*a truncated version*)）をもたらすナンセンス変異である。他のケースにおいて、改変は、アミノ酸置換をもたらすミスセンス変異である。他の改変もあり得、当業者にとっては明らかであろう。

【0156】

30

いくつかの態様において、導入遺伝子は、病理学的状態を引き起こす。病理学的状態を引き起こす導入遺伝子は、その産物が、疾患または障害に関する（例として、疾患または障害を引き起こす、動物に疾患または障害を起こしやすくさせる）遺伝子か、および／または動物に疾患または障害を誘発することがある遺伝子である。次いで動物は、疾患のいくつかの側面（例として、進行、処置に対する応答等々）を評価するために観察され得る。これらの例は、限定することを意図しておらず、他の側面および例は、本明細書に開示され、より詳細には下に記載される。

【0157】

40

本開示は、いくつかの側面において、特定の細胞型の標的破壊(*the targeted destruction*)を通して体細胞遺伝子導入動物モデルを生産するための方法を提供する。例えば、1型糖尿病のモデルは、胰島ベータ(*pancreatic Beta-islets*)の標的破壊によって生産され得る。他の例において、特定の細胞型の標的破壊は、ヒト疾患に対する特定の細胞型の役割を評価するために使用され得る。この点に関し、細胞毒素(*cellular toxins*)（例として、ジフテリア毒素A（DTA））またはアボトーシス促進遺伝子（NTR、Box等々）をコードする導入遺伝子は、導入遺伝子として、特定の細胞型の機能的な除去(*functional ablation*)に有用であり得る。その産物が細胞を殺傷する他の例示の導入遺伝子は、本明細書に開示の方法によって含まれ(embraced)、当業者にとっては明らかであろう。

【0158】

本開示は、いくつかの側面において、遺伝子の過剰発現またはノックダウンの長期効果を研究するための体細胞遺伝子導入動物モデルを生産するための方法を提供する。特定の標的組織における（例として、shRNA、miRNA、miRNAインヒビター等々による）遺伝子の長期過剰発現またはノックダウンは、正常な代謝のバランスを乱して病理学的状態を確立させ得、これによって、例えばがんなどの疾患の動物モデルを生産させ得る。本開示は、いくつかの側面において、標的組織における腫瘍発生および遺伝子機能を研究するための潜在的ながん遺伝子および他の遺伝子の、遺伝子の過剰発現またはノックダウンの長期効果を研究するための、体細胞遺伝子導入動物モデルを生産するための方法

50

を提供する。有用な導入遺伝子産物は、がんに関連することが知られているタンパク質およびかかるタンパク質の発現を阻害する低分子干渉核酸を包含する。

【 0 1 5 9 】

他の好適な導入遺伝子は、当業者によって容易に選択され得るが、ただしそれらは、組織特異的な病理学的状態および／または疾患の動物モデルを創作するのに有用である。

【 0 1 6 0 】

組み換え A A V 投与方法

r A A V は、組成物中、当該技術分野において知られているいづれの適切な方法にも従って、対象へ送達されてもよい。r A A V は、好ましくは、生理学的に適合性のある担体中に（例として、組成物中に）懸濁されており、対象、例として、ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、モルモット、ハムスター、ニワトリ、シチメンチョウ、または靈長目の非ヒト動物（例として、マカク）などの宿主動物へ投与されてもよい。いくつかの態様において、宿主動物は、ヒトを包含しない。

10

【 0 1 6 1 】

哺乳動物対象への r A A V の送達は、例えば、筋肉内注射によつてもよく、または哺乳動物対象の血流中への投与によつてもよい。血流中への投与は、静脈、動脈、またはいづれか他の血管(vascular conduit)中への注射によつてもよい。いくつかの態様において、r A A V は、外科術(the surgical arts)において周知の技法である分離式肢灌流(isolate d limb perfusion)（r A A V ピリオンの投与に先立ち、熟練者(the artisan)に、体循環から肢を分離することが本質的にできるようにする方法）を経て、血流中へ投与される。米国特許第6,177,403号に記載の分離式肢灌流技法の変法(A variant)もまた、筋肉細胞または組織中への形質導入を潜在的に強化するよう分離された肢の血管系中へピリオンを投与するために当業者によって採用され得る。

20

【 0 1 6 2 】

その上、ある実例において、対象の C N S ヘビリオンを送達することが望ましいこともある。「C N S」とは、脊椎動物の脳および脊髄のすべての細胞および組織を意味する。よつて、用語は、これらに限定されないが、ニューロン(ニューロンal細胞)、グリア細胞、星状細胞、脳脊髄液(C S F)、間質腔、骨、軟骨等を包含する。組み換え A A V は、当該技術分野において知られている脳神経外科の技法を使用して、針、カテーテルまたは関連デバイスとともに、例として、脳室領域中への注射ならびに線条体（例として、線条体の尾状核または被殻）、脊髄および神経筋接合部または小脳の小葉(cerebellar lobule)への注射によつて（定位的注入(stereotactic injection)によつて、など）C N S または脳へ直接送達されてもよい（例として、Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; およびAlisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000を参照）。

30

【 0 1 6 3 】

本開示の組成物は、r A A V を単独で、または1種以上の他のウイルス（例として、1以上の異なる導入遺伝子を有するコードする第2 r A A V）と組み合わせて、含んでいてもよい。いくつかの態様において、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なるr A A V（各々が、1種以上の異なる導入遺伝子を有する）を含む。

40

【 0 1 6 4 】

好適な担体は、r A A V が向けられる適応を考慮し当業者によって容易に選択されてもよい。例えば、1つの好適な担体は、様々な緩衝溶液（例として、リン酸緩衝生理食塩水）とともに製剤化されてもよい生理食塩水を包含する。他の例示の担体は、滅菌生理食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナツ油、ゴマ油、および水を包含する。担体の選択は、本開示の限定ではない。

【 0 1 6 5 】

任意に、本開示の組成物は、r A A V および担体（単数または複数）に加えて、保存剤

50

または化学安定剤などの他の従来の医薬成分を含有していてもよい。好適な例示の保存剤は、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、およびパラクロロフェノールを包含する。好適な化学安定剤は、ゼラチンおよびアルブミンを包含する。

【0166】

r A A V は、所望の組織の細胞にトランスフェクトするのに、ならびに不当な逆効果なく、充分なレベルの遺伝子の導入および発現を提供するのに、充分な量で投与される。従来のおよび薬学的に許容し得る投与ルートは、これらに限定されないが、選択された臓器への直接送達（例として、肝臓への門脈内送達）、経口、吸入（経鼻および気管内送達を包含する）、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腫瘍内、および他の非経口投与ルートを包含する。投与ルートは、所望に応じて組み合わされてもよい。

10

【0167】

具体的な「治療効果」を達成するのに要求される r A A V ピリオンの用量、例として、ゲノムコピー / キログラム体重あたり (G C / k g) での用量の単位は、以下を包含するがこれらに限定されない複数の因子に基づき変動するであろう： r A A V ピリオンの投与ルート、治療効果を達成するのに要求される遺伝子または R N A の発現レベル、処置される特定の疾患または障害、および遺伝子または R N A の産物安定性。当業者は、具体的な疾患または障害を有する患者を処置するための r A A V ピリオン用量範囲を、前述の因子ならびに当該技術分野において周知の他の因子に基づき容易に決定し得る。

【0168】

r A A V の有効量は、動物を標的感染させ、所望の組織を標的にするのに充分な量である。いくつかの態様において、r A A V の有効量は、安定した体細胞遺伝子導入動物モデルを生産するのに充分な量である。有効量は、対象の種、年齢(age)、重量、健康状態、および標的にされるべき組織などの因子に主に依存し、よって動物間および組織間で変動し得る。例えば、r A A V の有効量は、一般に、約 $10^9 \sim 10^{16}$ ゲノムコピーを含有する溶液の約 1 m l から約 1 0 0 m l までの範囲にある。いくつかの態様において、r A A V は、対象あたり $10^{10} \sim 10^{14}$ ゲノムコピーの用量にて投与される。いくつかの態様において、r A A V は、k gあたり $10^{10} \sim 10^{14}$ ゲノムコピーの用量にて投与される。いくつかのケースにおいて、約 $10^{11} \sim 10^{12}$ r A A V ゲノムコピーの間の投薬量が適切である。ある態様において、 10^{12} r A A V ゲノムコピーが、心臓、肝臓、および臍臓の組織を標的にするのに有効である。いくつかのケースにおいて、安定した遺伝子導入動物は、r A A V の複数回用量によって生産される。

20

【0169】

いくつかの態様において、r A A V 組成物は、その組成物において、具体的には r A A V が高濃度（例として、~ 10^{13} G C / m l 以上）で存在する組成物において、A A V 粒子の凝集を低減させるように製剤化される。r A A V の凝集を低減させるための方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、界面活性剤の添加、p H 調整、塩濃度調整等々を包含する。（例として、Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 1 71-178 を参照、その内容の全体が参考により本明細書に組み込まれる。）

30

【0170】

薬学的に許容し得る賦形剤および担体溶液の製剤化は、様々な処置レジメンにおいて本明細書に記載の具体的な組成物を使用するための好適な投薬および処置レジメンの開発がそうであるように、当業者に周知である。

40

【0171】

典型的には、これらの製剤は、活性化合物の少なくとも約 0 . 1 % 以上を含有してもよいが、活性成分（单数または複数）のパーセンテージはもちろん変動してもよく、便宜的に、総製剤の重量または体積の約 1 または 2 % と約 7 0 % または 8 0 % 以上の間であつてもよい。当然のことながら、治療的に有用な各組成物中の活性化合物の量は、好適な投薬量が化合物のいかなる単位用量でも得られるように、調製されてもよい。可溶性、バイ

50

オアベイラビリティ、生物学的半減期、投与ルート、製品有効期間、ならびに他の薬理学的な検討事項などの因子が、かかる医薬製剤を調製する当業者によって企図されるであろう。これを踏まえて、様々な投薬量および処置レジメンが所望され得る。

【0172】

ある状況においては、好適に製剤化された本明細書に開示の医薬組成物中の r A A V をベースとする治療用コンストラクトを、皮下に、臍内に、鼻腔内に、非経口で、静脈内に、筋肉内に、髄腔内に、または経口で、腹腔内に、または吸入によって、送達することが所望されるであろう。いくつかの態様において、米国特許第5,543,158号；第5,641,515号および第5,399,363号（各々は、その全体が参照により本明細書に具体的に組み込まれる）に記載のとおりの投与手法(the administration modalities)が、r A A V を送達するのに使用されてもよい。いくつかの態様において、好ましい投与モードは、門脈注射による。

10

【0173】

注射可能な使用に好適な医薬形態は、滅菌された注射可能な溶液または分散液の即時調製のための、滅菌された水性溶液または分散液および滅菌された粉末を包含する。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中でも、ならびに油中でも、調製されてもよい。保管および使用の通常の条件下、これらの調製物は、微生物の成長を防止するための保存剤を含有する。数多くのケースにおいて、その形態は滅菌されており、注射針が楽に通過する程度に(to the extent that easy syringability exists)流動性がある。それは、製造および保管の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に抗して保存されなければならない。

20

【0174】

担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例として、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、これら的好適な混合物、および/または植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。適した流動性は、例えは、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散液のケースにおいては要求される粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持されてもよい。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えはパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサール等によってもたらされ得る。数多くのケースにおいて、等張剤、例えは、糖類または塩化ナトリウムを包含することが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期的な吸収は、吸収を遅延させる剤、例えはモノアステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの、組成物における使用によってもたらされ得る。

30

【0175】

注射可能な水性溶液の投与のために、例えは、溶液は、必要ならば、好適に緩衝化されてもよく、液体の希釈剤は、充分な生理食塩水またはグルコースで最初に等張にされる。これらの具体的な水性溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内の投与にとくに好適である。これに関連して、採用され得る滅菌水性媒体は、当業者に知られているであろう。例えは、1投薬量が、1 ml の等張NaCl溶液に溶解されて、1000 ml の皮下注入用流体へ加えられるかまたは提案の注入部位にて注射されるかのいずれかであってもよい（例えは、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035～1038および1570～1580頁を参照）。投薬量のある程度の変動は、宿主の状態に応じて、必然的に生じるであろう。投与に対して責任を持つ者は、いずれにしても、個々の宿主にとって適切な用量を決定するであろう。

40

【0176】

滅菌された注射可能な溶液は、要求される量の活性 r A A V を、本明細書に列挙された他の様々な成分とともに（そう要求されるとき）、適切な溶媒に組み込むこと、その後に濾過滅菌が続くことによって調製される。一般に、分散液は、基礎分散媒および上に列挙されたものからの要求される他の成分を含有する滅菌ビヒクル中へ、様々な滅菌活性成分を組み込むことによって調製される。滅菌された注射可能な溶液の調製のための滅菌された粉末のケースにおいて、好ましい調製の方法は、真空乾燥技法および凍結乾燥技法であ

50

るが、これらは、先に滅菌濾過されたその溶液から、活性成分の粉末を、いずれか所望の追加成分を加えて産み出す。

【0177】

本明細書に開示のrAAV組成物はまた、中性または塩の形態で製剤化されてもよい。薬学的に許容し得る塩は、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基とともに形成された）、ならびに、例えば塩酸またはリン酸などの無機酸あるいは酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等などの有機酸とともに形成された酸付加塩を包含する。遊離カルボキシル基とともに形成された塩はまた、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基にも由来し得る。製剤化されると、溶液は、投薬製剤に適合可能なやり方で、かつ治療的に有効であるような量で、投与されるであろう。製剤は、注射可能な溶液、薬物放出カプセル等などの様々な剤形(dosage forms)で楽に投与される。

【0178】

本明細書に使用されるとき、「担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング剤、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁液、コロイド等を包含する。薬学的に活性な物質のためのかかる媒体および剤の使用は、当該技術分野において周知である。補助的な活性成分もまた、組成物中へ組み込まれ得る。句「薬学的に許容し得る」は、宿主へ投与されたとき、アレルギーまたは同様の有害反応を生み出さない分子実体(molecular entities)および組成物を指す。

【0179】

リポソーム、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、ベシクル等などの送達ビヒクルは、好適な宿主細胞中への本開示の組成物の導入のために使用されてもよい。とりわけ、rAAVベクターによって送達される導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、ベシクル、ナノスフェア、もしくはナノ粒子、または同種のもののいずれかにカプセル化されて送達するために製剤化されてもよい。

【0180】

かかる製剤は、本明細書に開示の核酸またはrAAVコンストラクトの薬学的に許容し得る製剤の導入のために、好ましいこともある。リポソームの形成および使用は一般に、当業者に知られている。近年、改善された血清安定性および循環半減時間をもつリポソームが開発された（米国特許第5,741,516号）。さらに、潜在的な薬物担体としてのリポソームおよびリポソーム様調製物の様々な方法が記載されている（米国特許第5,567,434号；第5,552,157号；第5,565,213号；第5,738,868号および第5,795,587号）。

【0181】

リポソームは、普通は他の手順によるトランスフェクションに抵抗性である数々の細胞型とともに、首尾よく使用されている。加えて、リポソームは、ウイルスベースの送達系に典型的なDNA長に制約がない。リポソームは、遺伝子、薬物、放射線治療剤、ウイルス、転写因子およびアロステリックエフェクターを様々な培養細胞株および動物中へ導入するのに効果的に使用されている。加えて、リポソーム媒介薬物送達の有効性を検査する数件の成功した臨床試験が完了している。

【0182】

リポソームは、水性媒体に分散されたリン脂質から形成され、自然に多重膜同心二層ベシクル（また多重膜ベシクル（MLV）とも呼ばれる）を形成する。MLVは一般に、25nmから4μmまでの直径を有する。MLVの超音波処理は、コア中に水性溶液を含有する、200～500.ANG.の範囲の直径をもつ小さな一枚膜ベシクル（SUV）の形成をもたらす。

【0183】

代替的に、rAAVのナノカプセル製剤が使用されてもよい。ナノカプセルは一般に、物質を安定かつ再現性のあるように封入し得る。細胞内ポリマー過負荷(intracellular polymeric overloading)に起因する副作用を避けるために、かかる超微細粒子（およそ0

10

20

30

40

50

. 1 μmのサイズである)が、in vivoで分解され得るポリマーを使用して設計されるべきである。これらの要求を満たす生分解性ポリアルキル-シアノアクリラートナノ粒子が、使用を企図される。

【0184】

上記の送達の方法に加えて、以下の技法もまた、宿主へ r A A V 組成物を送達するための代替方法として企図される。ソノフォレーシス(Sonophoresis)(すなわち、超音波)が使用されており、循環系中へのおよび循環系を通した薬物透過の速度および効率を強化するためのデバイスとして米国特許第5,656,016号に記載されている。企図される他の薬物送達の代替は、骨内注射(米国特許第5,779,708号)、マイクロチップデバイス(米国特許第5,797,898号)、眼科製剤(Bourlais et al., 1998)、経皮マトリックス(trans dermal matrices)(米国特許第5,770,219号および第5,783,208号)およびフィードバック制御送達(米国特許第5,697,899号)である。10

【0185】

キットおよび関連する組成物

本明細書に記載の剤は、いくつかの態様において、治療の、診断のまたは調査の用途におけるそれらの使用を容易にするための、医薬または診断または調査キットにまとめられてもよい。キットは、本開示の構成成分および使用のための指示を収容する1以上の容器を包含していてもよい。つまり、かかるキットは、本明細書に記載の1以上の剤を、これらの剤の意図する適用および適した使用を記載する指示と一緒に包含していてもよい。ある態様において、キットにおける剤は、具体的な適用におよび剤の投与の方法に好適な医薬製剤および投薬量であってもよい。調査目的のためのキットは、様々な実験を実行するのに適切な濃度または分量で構成成分を含有していてもよい。20

【0186】

キットは、研究者らによって本明細書に記載の方法の使用を容易にするように設計されてもよく、多数の形態を取り得る。キットの組成物の各々は、適用可能な場合、液体形態で(例として、溶液で)、または固体形態(例として、乾燥粉末)で提供されてもよい。あるケースにおいて、組成物のいくつかは、例えば、キットとともに提供されてもされなくともよい好適な溶媒または他の種(例えば、水または細胞培養培地)の添加によって、構成可能(constitutable)または別様に処理可能(例として、活性型へと)であってもよい。本明細書に使用されるとき、「指示」は、指示および/または販売促進の構成成分を定義し得、典型的には、本開示のパッケージ上にまたはこれと結び付けられた書面での指示を伴う。指示はまた、その指示がキットに関連すべきものであることをユーザーが明確に認識するであろういずれのやり方でも提供される、いずれの口頭または電子的指示、例えば、オーディオビジュアル(例として、ビデオテープ、DVD等々)、インターネット、および/またはウェブに基づく通信等々をも包含し得る。書面での指示は、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関によって定められた形態であってもよく、これらの指示はまた、動物投与のための製造、使用または販売の当局による承認をも反映し得る。30

【0187】

キットは、本明細書に記載の構成成分のいずれか1以上を、1以上の容器中に含有していてもよい。例として、一態様において、キットは、キットの1以上の構成成分を混合するための、および/または試料を単離および混合して対象へ適用するための、指示を包含していてもよい。キットは、本明細書に記載の剤を収容する容器を包含していてもよい。剤は、液体、ゲルまたは固体(粉末)の形態であってもよい。剤は、無菌的に調製され、シリンジ中にパッケージングされて冷蔵で出荷されてもよい。代替的に、それは、保管のためにバイアルまたは他の容器中に収容されていてもよい。第2容器は、無菌的に調製された他の剤を有していてもよい。代替的に、キットは、予め混合されて、シリンジ、バイアル、チューブ、または他の容器中にて出荷される活性薬剤を包含していてもよい。キットは、具体的には特定の体細胞動物モデルを生産するためのキットのケースにおいて、シリンジ、局所適用デバイス、または i v 用針管類(iv needle tubing)および袋などの、剤40

10

20

30

40

50

を動物へ投与するのに要求される構成成分の 1 以上またはすべてを有していてもよい。

【 0 1 8 8 】

キットは、パウチ、1以上のチューブ、容器、箱または袋の中にゆるく充填された付属品とともに、ブリスター・パウチ(a blister pouch)、シーリング包装されたパウチ(a shrink wrapped pouch)、真空密パウチ(a vacuum sealable pouch)、シール可能な熱形成トレイ(a sealable thermoformed tray)、または同様のパウチ形態もしくはトレイ形態など、様々な形態を有していてもよい。キットは、付属品が加えられた後に滅菌されてもよく、これによって、容器中の個々の付属品を他のやり方で開封することができる。キットは、放射線滅菌、加熱滅菌、または当該技術分野において知られている他の滅菌方法など、いずれの適切な滅菌技法を使用しても滅菌され得る。キットはまた、特定の用途次第で他の構成成分、例えば、容器、細胞培地、塩、緩衝剤、試薬、シリンジ、針、消毒剤(a disinfecting agent)を適用または除去するための布(ガーゼなど)、使い捨て手袋、投与に先立つ剤のための支柱(a support)等々も包含していてもよい。

10

【 0 1 8 9 】

キット内に含まれる指示は、細胞から潜伏 AAV を検出するための方法を伴っていてもよい。加えて、本開示のキットは、指示、陰性対照および / または陽性対照、容器、希釈剤および試料のための緩衝剤、試料調製チューブ、および配列比較のための参照 AAV 配列の印刷された表または電子表示された表(a printed or electronic table)を包含していてもよい。

【 0 1 9 0 】

20

例

例 1：所望の組織指向性および特性をもつ転写活性のある新規 AAV カプシド配列のヒト組織からの単離。

本例は、以下のステップ：1) 正常および罹患ヒト組織に存在する wtAAV ゲノムの PCR 増幅；2) PCR アンプリコンライブラリのハイスループット単一分子リアルタイム(SMRT)配列決定；3) 生物情報分析(bioinformatic analyses)によるバリアントの同定 / プロファイリング；および 4) 翻訳されて完全長カプシドタンパク質になり得る高信頼(high-confidence)ORF の選択、によって単離された新規 AAV カプシド配列を記載する。本例において使用されたワークフローの概略図描写が図 1A ~ 1B に示される。

【 0 1 9 1 】

30

このアプローチは、正常組織および腫瘍組織の両方から単離されたウイルスゲノム間で観察されたゲノム多様性の自然のプール(the natural pool)を活用する。概念上は、*in vivo*組織は、選択圧および / または免疫回避を通してウイルスのゲノム多様性のための自然のインキュベーターとして作用する。よって、AAV バリアントの全容(the full spectrum)をプロファイルすることができる方法からの、組織間および組織内の変動ならびに患者間の多様性の利益の発見が、ヒト起源の組織間および臓器間に見出された。

【 0 1 9 2 】

ヒト組織からの AAV ゲノムの PCR 増幅

固有の指向性をもつ新しい血清型を同定する可能性のある多様な AAV バリアントを単離するため、455名の患者からの844のヒト外科検体を、West China Hospital (Sichuan University, Chengdu, China) から収集した。これらの組織は、広範な組織型 / 臓器型ならびに様々な腫瘍型を網羅している(表 1)。とりわけ、AAV バリアントを、9つの正常な肝臓組織、7つの肝臓腫瘍、4つの前立腺肥大組織、2つの正常な肺組織、1つの脾臓腫瘍組織、1つの乳房がん組織、1つの正常な乳房組織、1つの胃部がん組織、1つの正常な胃部組織、1つの脳組織および1つの神経膠腫試料から同定した。

40

【 0 1 9 3 】

総ゲノム DNA をヒト組織から抽出し、AAV カプシド配列の PCR 増幅に供した。この例で使用された PCR プライマーを表 2 に記載する。簡単には、4.1-kb AAV r e p - c a p 配列の増幅のための汎用 AAV プライマー(例として、RepF318、AV2cas)、または 2.3-kb AAV c a p 配列の増幅のための汎用 AAV プライマー(例とし

50

て、CapF、CapR) のいずれかを PCR のために使用した。

【0194】

表1：wtAAVゲノム増幅のための臨床検体

【表1】

| 臓器 | 組織の分量 | |
|------|-------|------|
| | 正常組織 | 腫瘍組織 |
| 肝臓 | 100 | 101 |
| 脳 | 4 | 50 |
| 胃部 | 37 | 37 |
| 肺 | 100 | 100 |
| 乳房 | 52 | 57 |
| 脾臓 | NA | 45 |
| 直腸 | 50 | 50 |
| 前立腺 | 34 | NA |
| 泌尿器科 | 3 | 12 |
| 子宮頸部 | 2 | 10 |
| 合計 | 378 | 466 |

10

20

30

【0195】

表2：PCRプライマー配列

【表2】

| プライマー | 配列(5' - 3') | 配列番号 |
|---------|------------------------------|------|
| RepF318 | GCCATGCCGGGGTTCTACGAGAT | 872 |
| AV2cas | ACAGGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA | 873 |
| CapF | GACTGCATCTTGAACAATAATGA | 874 |
| CapR | GAAACGAATTAAACCGGTTATTGATTAA | 875 |

40

【0196】

AAV PCR 産物のハイスループット配列決定およびバイオインフォマティクス分析

AAV PCR 産物を、ハイスループット単一分子リアルタイム (SMRT) 配列決定に供した。このアプローチは、他の従来のハイスループットゲノム配列決定方法論から得られたアライメントされた短い読み取りフラグメントからウイルスのゲノム再構築およびキメラ予測を実施する必要性を取り除く。

【0197】

オープンソースの生物情報ツールから開発されたバリエント分析パイプラインを使用して、これまでに記載されていない 600 を超える高信頼 AAV2、AAV2/3 ハイブリッドおよび AAV8 カプシド配列バリエントを同定した。具体的には、224 の AAV8 バリエント (1 ~ 10 の単一アミノ酸バリエントを持つ)；425 の AAV2 バリエント (1 ~ 20 の単一アミノ酸バリエントを持つ)；および 194 の AAV2/3 ハイブリッドバリエント (10 ~ 50 の単一アミノ酸バリエントをもつ) を同定した。表 3、4 およ

50

び5は、固有のカプシドタンパク質バリアントを要約する。比較のため、野生型AAV2、AAV3、およびAAV8カプシドアミノ酸配列を夫々、配列番号869、870、および871に記載する。図7は、1以上の単一アミノ酸バリアントを持つ別々のAAV2カプシドバリアントおよびAAV2/3バリアントの分布を表示する散布プロットである。

【0198】

表3：SMRT配列決定によって同定された固有のAAV2およびAAV2/3ハイブリッドバリアント（アミノ酸配列）およびバイオインフォマティクス分析。

【表3】

| 固有のAAV2バリアント | | | | | |
|----------------|-------|---------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| 試料供給源 | 患者番号 | DNAのサイズ(kb) | 固有のバリアント(a.a.) | 配列番号 | 固有の総バリアント(a.a.) |
| 肝臓 | 7927N | 2.3 kb (cap) | 85 | 325～409 | 409 |
| 肝臓腫瘍 | 37HCC | | 3 | 322～324 | |
| 乳房 | 18B | | 26 | 118～143 | |
| 乳房がん | 19B | | 21 | 211～231 | |
| 肺 | 18L | | 55 | 144～198 | |
| 前立腺 | 5 | | 24 | 1～24 | |
| | 17 | | 12 | 106～117 | |
| | 18 | | 12 | 199～210 | |
| | 27 | | 90 | 232～321 | |
| 膵臓がん | 10 | | 81 | 25～105 | |
| 肝臓 | 1178N | 4.1 kb (rep+cap) | 4 | 410～414; 837～840 | 16 |
| | 9955N | | 3 | 429～434; 850～852 | |
| | 9955C | | 9 | 415～428; 841～849 | |
| 固有のAAV2/3バリアント | | | | | |
| 試料供給源 | 患者番号 | DNAのサイズ(kb) | 固有のバリアント(a.a.) | | 固有の総バリアント(a.a.) |
| 肝臓 | 42 | 2.3 kb (cap) | 6 | 512～517 | 194 |
| | 74 | | 11 | 543～553 | |
| 肝臓腫瘍 | 37HCC | | 6 | 506～511 | |
| | 65 | | 4 | 539～542 | |
| | 7449C | | 15 | 554～568 | |
| | 18B | | 23 | 435～457 | |
| 乳房 | 19B | | 44 | 462～505 | |
| 前立腺 | 5 | | 60 | 569～628 | |
| | 17 | | 4 | 458～461 | |
| | 18 | | N/A(DNA中 420) | - | |
| 胃部がん | 17G | | 21 | 518～538 | |
| 胃部 | 50G | | | | |

DNA配列は4.1kbライブラリについて提供される。

【0199】

表4：SMRT配列決定によって同定された固有のAAV8バリアント（アミノ酸配列）

10

20

30

40

50

およびバイオインフォマティクス分析。

【表4】

| 試料供給源 | 患者番号 | DNAのサイズ(kb) | 固有のバリアント(a.a.) | 配列番号 | 固有の総バリアント(a.a.) |
|-------|-------|----------------|----------------|--------------|-----------------|
| 肝臓 | 0067N | 2.3kb (cap) | 12 | 647～658 | 10 |
| | 3522N | | 73 | 674～746 | |
| | 5110N | | 3 | 747～749 | |
| | 7427N | | 6 | 750～755 | |
| 肝臓腫瘍 | 0067C | | 9 | 638～646 | 208 |
| | 7803C | | 9 | 756～764 | |
| | 8818C | | 63 | 765～827 | |
| 脳 | G5 | | 9 | 828～836 | |
| 神経膠腫 | 2236 | | 14 | 659～672 | |
| 肺 | 24 | | 10 | 629～637; 673 | |

【0200】

表5：追加のAAV8バリアントカプシドタンパク質

【表5】

| AAV8バリアントの名称 | 配列番号 |
|--------------|------|
| B1 | 853 |
| B2 | 854 |
| B3 | 855 |
| B4 | 856 |
| B12 | 857 |
| B18 | 858 |
| B24 | 859 |
| B41 | 860 |
| B44 | 861 |
| B45 | 862 |
| B46 | 863 |
| B60 | 864 |
| B61 | 865 |
| B62 | 866 |
| B63 | 867 |
| B64 | 868 |

【0201】

例2：改善されたin vivo指向性をもつAAV8バリアントの同定。

候補AAV8バリアント(例として、B2、B3、B44およびB61)の一部(A sub

10

20

30

40

50

set of)を、標準的な分子クローニング方法によって AAV パッケージングベクター中へクローニングし、CB6 プロモーターによって推進されるルシフェラーゼレポーター遺伝子とともにパッケージングした。生産されたベクターをマウス中へ注射し、ルシフェラーゼ導入遺伝子発現の *in vivo* レベルを、動物全身イメージング(whole animal imaging)および相対的な発光の定量によって分析した。B2 (配列番号 854) および B3 (配列番号 855) バリアントが、筋肉内注射後の肝臓においてより高い発現を有するが (図 2A ~ 2D)、新生仔マウスの IV 注射後、B61 (配列番号 865) バリアントは、AAV9 と比較して、脳および脊髄においてより高い形質転換効率を有する (図 3A ~ 3B) ことが観察された。このことは、野生型 AAV8 が AAV9 より、血液脳関門を通過しないことが観察されたことから、注目に値する。1つの AAV8 バリアントである B44 (配列番号 861) は、IM 注射後、AAV8 と比較して、肝臓へのより良好な形質転換能を有する (図 4A ~ 4B)。

【0202】

系統発生学的分析を、AAV8 カプシドバリアント B2、B3、B44、および B61 を他の AAV 血清型と比較するために実施した。簡単には、AAV8 バリアントのアミノ酸配列を、ClustalW を使用して、公開されている他の AAV 配列とともにアライメントし、系統樹を、MEGA6.06 の Minimum Evolution 方法を使用して推測した。バイオインフォマティクス分析の結果は、B2、B3、B44、および B61 配列が、Clade E [AAV8] カプシドタンパク質に関するこことを指し示す。図 5。AAV8 バリアントの代表的なアミノ酸置換を表 6 に示す。

【0203】

表 6：野生型 AAV8 と比べた AAV8 バリアントにおける代表的なアミノ酸置換

【表 6】

| AAVバリアント | 代表的な置換(wt AAV8と比べて) |
|----------|---------------------|
| B2 | E63G |
| B3 | K259R |
| B44 | L91Q、T234A、M374T |
| B61 | M374T、M561V |

10

20

30

【0204】

例 3 : rAAV ゲノムパッケージング効率の *in vitro* 検定および候補カプシドバリアントの初期特徴付け。

選択された AAV カプシドバリアントを含有するパッケージングプラスミドコンストラクトの分子クローニング

S M R T 配列決定によって同定された AAV2 および AAV2 / 3 ハイブリッドカプシドバリアントを、標準的な分子クローニングストラテジー (例として、親 AAV2 または AAV2 / 3 カプシド発現プラスミドの部位特異的変異誘発、PCR ベースのクローニングおよびギブソン・アセンブリ (Gibson Assembly)、または外部委託による合成) を使用し、従来のウイルスカプシド遺伝子を置き換えることによって、パッケージングプラスミド中へクローニングした。図 8 は、発見されたカプシドバリアントの多重化スクリーニングにおいて使用されるべきベクターコンストラクトを示す。様々な診断ストラテジーのために使用されるべき提案された導入遺伝子カセットの概要を表 7 に示す。

40

【0205】

表 7：様々な診断ストラテジーのための導入遺伝子カセット

50

【表 7】

| プロモーター | 導入遺伝子 | レポーター／治療用の遺伝子分析 |
|-------------------------|---------|-------------------------------|
| CMVエンハンサー ニワトリβ-アクチン | EGFP | 組織または細胞型に特異的な 形質転換効率 |
| CMVエンハンサー ニワトリβ-アクチン | ルシフェラーゼ | 動物全身指向性プロファイリング および個々の組織定量 |
| サイロキシン 結合グロブリン | 第IX因子 | 分泌された因子の肝臓特異的 形質転換。前臨床試験 |

10

【0206】

ハイスループット小規模ベクター生産およびベクターゲノムのための力価測定(titration)によるパッケージング効率の多重査定

粗製溶解物中のrAAVのベクターゲノムの定量化を、HEK293パッケージング細胞の3重トランスフェクション直後の第1世代(一本鎖AAV)ベクターと第2世代(自己相補的なAAV)ベクターとの両方のrAAVバリアントパッケージング効率を直接試験するために使用する。これは、発見されたすべてのバリアントについてウイルスの質を査定するための小規模ベクター生産、続く銀染色およびベクターゲノムの従来のPCR力価測定の全ワークフローを実施する合理化された代替案を提供する。この方法は、96ウェル形式での実施のために調整され得るところ、高力価ベクターを生産するバリアントを素早く同定するために使用した。

20

【0207】

新規AAVバリアントの血清学的評価

高パッケージング効率をもつ候補バリアントを、AAVで免疫化されたウサギからの血清に対して新規rAAVを試験するためのカプシド免疫学アッセイなどの標準的な手段によって、抗体交差反応について進行中のAAVに対しスクリーニングした。加えて、プールされたヒトIgG(IVIG)中和アッセイを、ヒト集団において液性免疫が既に存在していた可能性を決定するため、各候補バリアントについて実施する。

30

【0208】

例4：ベクター形質転換の生物学、病毒性(pathotoxicity)の流行、組織/臓器の指向性、および体内分布プロファイルを研究すための、rAAV2およびrAAV2/3バリアントのin vivo分析。

マウスの研究

候補カプシドバリアントを、組織分布に基づき分類し、着目した臓器によって優先順位を付ける。候補バリアントの群を、クラスター化・指標付与(clustered-indexing)に供し(図6A)、それによって、候補カプシドバリアントを発現する複数のパッケージングプラスミドを、3重トランスフェクション(例として、分泌された因子の肝臓標的および発現効率を査定するためのF9凝固因子IX(F.IX)、臓器/組織切片および比較免疫蛍光顕微鏡を介する体内分布および組織特異的形質転換の程度を査定するためのEGFP;または生きている動物のイメージング(live animal imaging)を介するCNSおよび肝臓形質転換の質を査定するためのルシフェラーゼ(Luc))によって、固有にDNAがバーコード化された導入遺伝子をパッケージングするよう混合して発現させる。

40

【0209】

肝臓標的導入遺伝子の発現および分泌のためのrAAVバリアントの収容能力を量る研究のため、サイロキシン結合グロブリン(TGB)、肝臓特異的プロモーターを含むrAAVコンストラクトを設計する。動物全身ベクター形質転換をプロファイリングする研究のため、CMV-エンハンサー、ニワトリ-アクチンプロモーター(CB6)調節力セットを含むコンストラクトを設計する。

【0210】

50

指標付導入遺伝子をカプセル化するベクターを、異なる投与ルートによって成体マウスおよび新生(newborn)マウス中へ注射し、AAVバリアントに媒介される導入遺伝子発現をプロファイリングするための1ヶ月の縦断研究において、分泌されたF.IX発現、EGFP発現、またはLuc発現についてスクリーニングする。CNS/脳のための投与ルートは、末梢血管内(IV、血液脳関門を通過する形質転換を試験するため)、脳室内(ICV)、実質内、および髄腔内を包含する。網膜のための投与は、網膜下注射を介して実施される。いくつかの態様において、IV注射はまた、肝臓をも標的にする。

【0211】

対照動物と比較して固有の導入遺伝子(例として、AAV2、AAV2/3、またはAAV8によって送達された導入遺伝子)発現を呈する動物を犠死させて臓器を回収する。個々の臓器を、導入遺伝子メッセージ(message)を含有するバルクDNA抽出物またはcDNAライブラリの従来のPCR增幅、続く各組織中に富化されたバーコード化導入遺伝子を突き止めるためのイルミナ(Illumina)配列決定によって、バーコード化導入遺伝子の存在および存在量についてアッセイする。図9は、導入遺伝子への指標付与(transgene indexing)のための設計の一般ストラテジーを概説する。検出可能なバーコード化導入遺伝子の存在量および組織/臓器分布は、各群の候補rAAVバリアントの指向性および形質転換効率を反映する。所望のベクター特性をもつ高効率候補群を選択する。選択された群からの個々の候補バリアントを、個々の高効率バリエントを同定する目的のスクリーニング第2ラウンドのためのバーコード化導入遺伝子をパッケージングするために使用する。クラスター化 - 指標付与は、仕事量を低減するために階層的な選択の複数のラウンドにおいて繰り返し実行し得る。

10

【0212】

靈長目の非ヒト動物(NHP)の研究

候補rAAVバリアントを、マウスの研究において概説されたクラスター化 - 指標付与の方法論(図6B)と同様の手法によって、靈長目の非ヒト動物における体内分布についてスクリーニングする。異なる投与ルートを介して臓器を標的にする形質転換効率を、先行するマウスの研究において観察されたrAAVバリエントプロファイルを立証するためにNHPにおいて再度査定する。

20

【0213】

免疫原性、ヒト集団における中和抗体の普及、遺伝毒性に耐える能力(capacity for genotoxicity)、病原性の一般的側面を、靈長目の非ヒト動物(NHP)動物における形質転換プロファイルを決定するための一次査定(例えば、T細胞または好中球の浸潤物を精査するための複数の組織および臓器の組織病理学、ALT/AST活性によって肝毒性をモニターすること、および組織切片の検査によって炎症を分析すること)と並行して量る。

30

【0214】

例5：新規AAVカプシド配列の単離。

追加のAAVカプシド配列を単離した。生物情報ツールから開発されたバリエント分析パイプラインを使用して、これまでに記載されていない追加の263の高信頼AAV2およびAAV2/3ハイブリッドカプシド配列バリエントを同定した。比較のため、野生型AAV2およびAAV3カプシドアミノ酸配列を夫々、配列番号869および870に記載する。

40

【0215】

表8：SMRT配列決定およびバイオインフォマティクス分析によって同定された追加の固有のAAV2およびAAV2/3ハイブリッドバリエント(アミノ酸配列)。

50

【表 8】

| 固有のAAV2バリアント | | | | |
|----------------|-------------|------------------|-----------|-------------------|
| 試料供給源 | DNAのサイズ(kb) | 固有のバリアント(a. a.) | 配列番号(aa): | 固有の総バリアント(a. a.) |
| 乳房がん | 2.2 kb | 8 | 1726～1733 | 89 |
| 胃部腫瘍 | | 15 | 1734～1748 | |
| 神経膠腫 | | 2 | 1749～1750 | |
| 肝臓 | | 25 | 1751～1775 | |
| 肝臓腫瘍 | | 36 | 1776～1811 | |
| 肺腫瘍 | | 3 | 1812～1814 | |
| 固有のAAV2／3バリアント | | | | |
| 試料供給源 | DNAのサイズ(kb) | 固有のバリアント(a. a.) | | 固有の総バリアント(a. a.) |
| 乳房がん | 2.2 kb | 18 | 1815～1832 | 174 |
| 胃部 | | 17 | 1833～1849 | |
| 肝臓 | | 117 | 1850～1966 | |
| 肝臓腫瘍 | | 22 | 1967～1988 | |

【0216】

対応するDNA配列をすべてのライブラリに提供する。AAV2カプシドバリアントの核酸配列は、配列番号1989～2077に対応する。AAV2／3カプシドバリアントの核酸配列は、配列番号2078～2251に対応する。

【0217】

本開示は、構成の詳細および本記載に表されるかまたは図面に説明される構成成分の配置に対するその適用において限定されない。本開示は、他の態様でもあり得、様々な手法で実践または実行され得る。また、本明細書に使用される言い回しおよび専門用語も、記載するのが目的であって、限定と見なすべきではない。「包含する（こと）」、「含む（こと）」、または「有する（こと）」、「含有する（こと）」、「伴う（こと）」、およびそれらのバリエーションの使用は、本明細書中、その後にリスト化された項目およびそれらの均等物ならびに付加的項目を網羅することが意図される。

【0218】

よって、本開示の少なくとも1つの態様の幾つかの側面を記載したことで、様々な変更、改変、および改善が、容易に当業者の心に浮かぶであろうことは解されるべきである。かかる変更、改変、および改善は、本開示の一部であることが意図され、本開示の精神および範囲内であることが意図される。結果的に、上述の記載および図面は、ほんの一例に過ぎない。

10

20

30

40

50

【四面】

【 図 1 A - 1 B 】

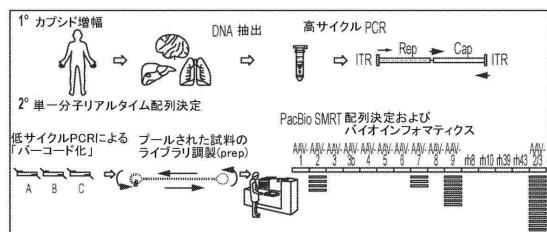
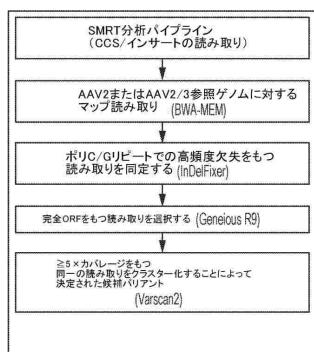


図 1A



1B

【 図 2 A 】

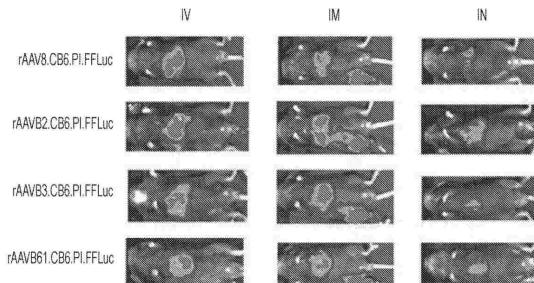


図 2A

10

20

【図2B-2D】

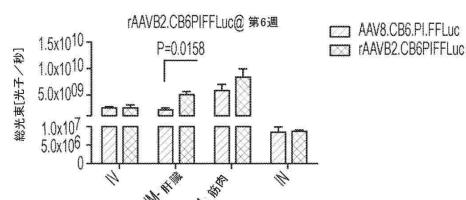


图 2B

【図3A-3B】

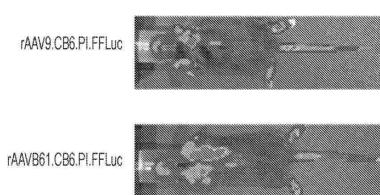


図 3A

30

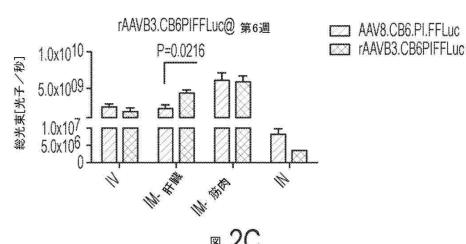
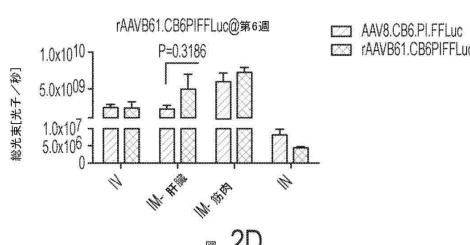


圖 2C



2D

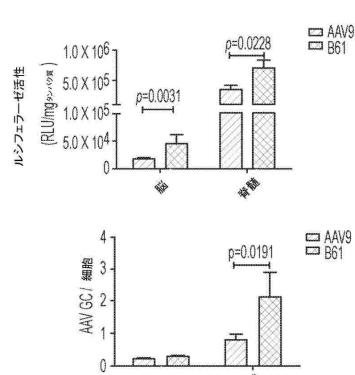
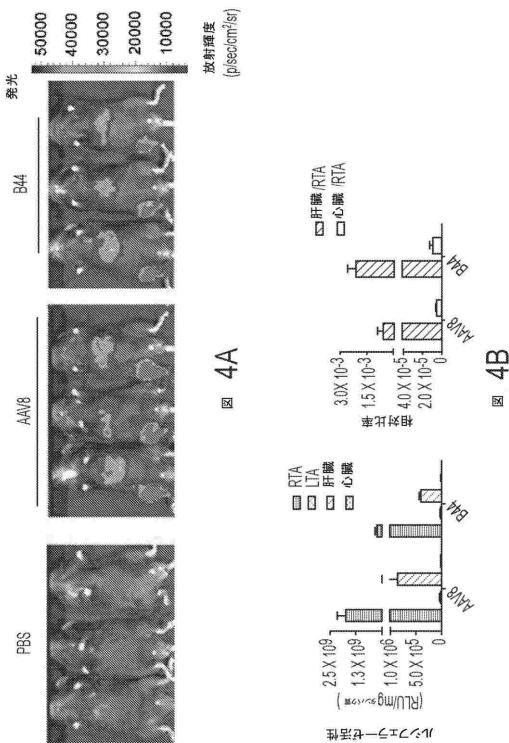


图 3E

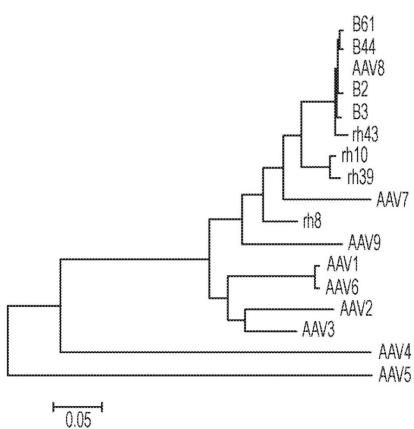
40

50

【図 4 A - 4 B】



【図 5】



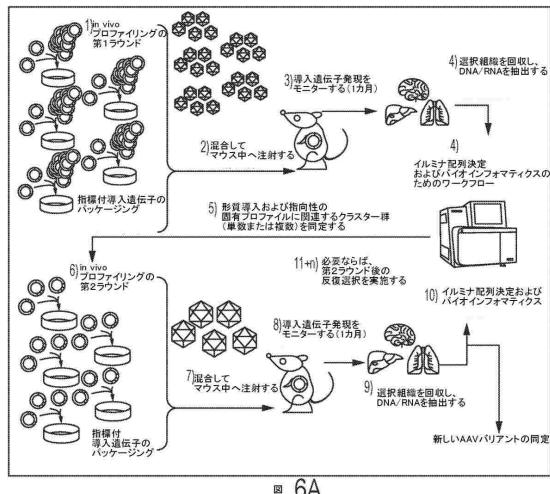
10

20

30

40

【図 6 A - 6 B】



【図 7】

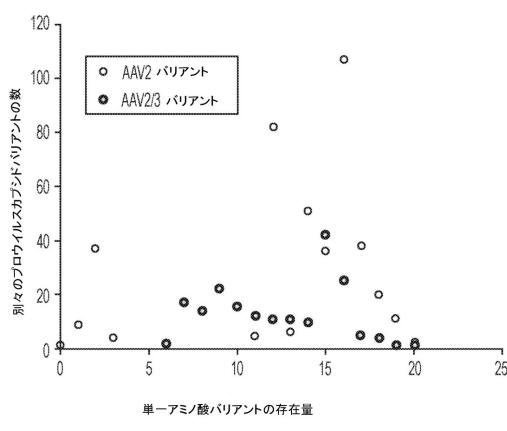
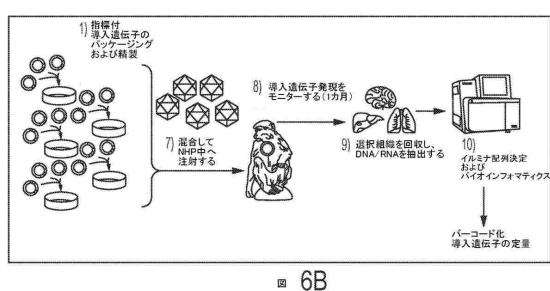


図 7



50

【図 8】

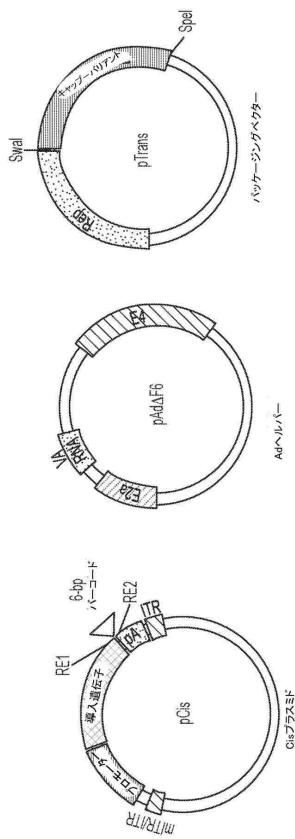
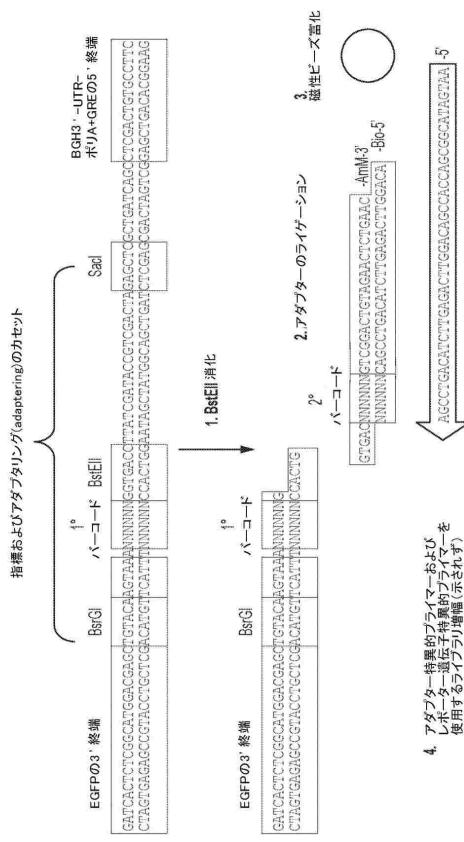


図 8

【図 9】



4. アダプター特異的ブリーマーおよび
レボターゲット遺伝子増幅(示されず)
使用するライブリル増幅(示されず)

図 9

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

| | F I | | |
|-------------------------|---------|--------|---------|
| A 6 1 P 1/00 (2006.01) | A 6 1 P | 1/00 | |
| A 6 1 P 1/16 (2006.01) | A 6 1 P | 1/16 | |
| A 6 1 P 1/18 (2006.01) | A 6 1 P | 1/18 | |
| A 6 1 P 3/06 (2006.01) | A 6 1 P | 3/06 | |
| A 6 1 P 3/10 (2006.01) | A 6 1 P | 3/10 | |
| A 6 1 P 7/02 (2006.01) | A 6 1 P | 7/02 | |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P | 9/00 | |
| A 6 1 P 9/04 (2006.01) | A 6 1 P | 9/04 | |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P | 9/10 | |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01) | A 6 1 P | 9/10 | 1 0 1 |
| A 6 1 P 13/02 (2006.01) | A 6 1 P | 11/00 | |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01) | A 6 1 P | 13/02 | |
| A 6 1 P 15/00 (2006.01) | A 6 1 P | 13/12 | |
| A 6 1 P 19/06 (2006.01) | A 6 1 P | 15/00 | |
| A 6 1 P 21/04 (2006.01) | A 6 1 P | 19/06 | |
| A 6 1 P 25/00 (2006.01) | A 6 1 P | 21/04 | |
| A 6 1 P 25/16 (2006.01) | A 6 1 P | 25/00 | |
| A 6 1 P 27/02 (2006.01) | A 6 1 P | 25/16 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 27/02 | |
| A 6 1 P 37/02 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P | 37/02 | |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 0 5 |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N | 1/15 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N | 1/19 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 1/21 | |
| C 1 2 N 7/01 (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | |
| C 1 2 N 15/113(2010.01) | C 1 2 N | 7/01 | |
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N | 15/113 | Z |
| C 1 2 N 15/864(2006.01) | C 1 2 N | 15/63 | Z |
| | C 1 2 N | 15/864 | 1 0 0 Z |

(31)優先権主張番号 62/486,642

(32)優先日 平成29年4月18日(2017.4.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/408,022

(32)優先日 平成28年10月13日(2016.10.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01605、ウォーチェスター、ポコノ ロード 7

(72)発明者 タイ , フィリップ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01604、ウォーチェスター、フランク ストリート 6
1、アパートメント 42

(72)発明者 ウェイ , ユカン

中華人民共和国、610041、チンドゥー、グワオペン ストリート、ケユアン ストリート
ロード 4、ナンバー 1

(72)発明者 ルオ , リー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01605、ウォーチェスター、ポコノ ロード 7

合議体

審判長 加々美 一恵

審判官 上條 肇

審判官 深草 亜子

(56)参考文献 国際公開第2015 / 121501 (WO , A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/015

MEDLINE / BIOSIS / REGISTRY / CAPLUS (STN)

JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

UniProt / GeneSeq