

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7389040号
(P7389040)

(45)発行日 令和5年11月29日(2023.11.29)

(24)登録日 令和5年11月20日(2023.11.20)

(51)国際特許分類	F I	
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	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
請求項の数 23 (全46頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-539801(P2020-539801)	(73)特許権者	518274098 メイラジーティーエックス・ユーケー・ ザ・セカンド・リミテッド イギリス・N1・7NQ・ロンドン・ブ リタニア・ウォーク・92
(86)(22)出願日	平成31年1月17日(2019.1.17)	(73)特許権者	520043028 ウニヴェルシテート ハイデルベルク ドイツ連邦共和国 69117 ハイデル ベルク グラーベンガッセ 1
(65)公表番号	特表2021-510528(P2021-510528 A)	(74)代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(43)公表日	令和3年4月30日(2021.4.30)	(74)代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/051128	(74)代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(87)国際公開番号	WO2019/141765		
(87)国際公開日	令和1年7月25日(2019.7.25)		
審査請求日	令和4年1月14日(2022.1.14)		
(31)優先権主張番号	18152133.7		
(32)優先日	平成30年1月17日(2018.1.17)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 遺伝子治療のための修飾 r A A V キャプシドタンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

修飾キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)ビリオンを含む
関節炎疾患の処置若しくは予防において使用するため又は関節炎疾患に関連する症状の
処置若しくは予防において使用するための医薬組成物であって、

前記修飾キャプシドタンパク質が、

- i) 配列番号1を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列、
- ii) 配列番号2を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列、
- iii) 配列番号3を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列、
- iv) 配列番号4を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列、
- v) 配列番号5を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列、
- vi) 配列番号6を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列、
- vii) 配列番号7を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、アミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

前記修飾キャプシドタンパク質が、前記タンパク質のC末端部分にアミノ酸配列Zを含み、前記アミノ酸配列Zの残基が、前記キャプシドタンパク質の表面上に露出しており、前記アミノ酸配列Zが、

a. 以下の式：

$$z_0 - G - Q - z_1 - G - z_2 - z_3 - z_4 - R - z_5 - z_6 - z_7 - z_8 - z_9 - A - Q - A - A$$

(式中、 z_0 は無しまたはQ、 z_1 はRまたはS、 z_2 はCまたはN、 z_3 はD、EまたはY、 z_4 はC、A、SまたはV、 z_5 はG、VまたはS、 z_6 はDまたは無し、 z_7 はCまたは無し、 z_8 はF、R、VまたはA、 z_9 はC、D、NまたはEである)

のアミノ酸残基の配列を含む又はそれからなり、

b. 野生型AAVキャプシドタンパク質のC末端から100～200位のアミノ酸残基に対応する位置に存在する、

医薬組成物。

【請求項2】

前記アミノ酸配列Zが、野生型AAVキャプシドタンパク質のC末端から120～180位のアミノ酸残基に対応する位置に存在する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記アミノ酸配列Zが、野生型AAVキャプシドタンパク質のC末端から130～170位のアミノ酸残基に対応する位置に存在する、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記アミノ酸配列Zが、野生型AAVキャプシドタンパク質のC末端から140～160位のアミノ酸残基に対応する位置に存在する、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記配列Zが、式II：

$$E E E I x x x x P V A T E x x G x x x x N x Q y - Z - (x) _ n L P G M V W Q x R D V Y L Q G P I W A K I P H T D G$$

によって表される位置にて前記修飾キャプシドタンパク質に含まれ、

c. 式中、Zは、請求項1で定義した通りであり、xは、単一のアミノ酸残基を表し、yは、0、1又は2個のアミノ酸残基を表し、

d. nは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15である、請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記キャプシドタンパク質が、

i) 配列番号1を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号1の588～602位のアミノ酸が、配列番号11のアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列、

ii) 配列番号2を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号2の585～599位のアミノ酸が、配列番号10のアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列、

iii) 配列番号3を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号3の587～601位のアミノ酸が、配列番号9のアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列、

iv) 配列番号4を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号4の586～600位のアミノ酸が、配列番号8のアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列、

v) 配列番号5を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号5の588～602位のアミノ酸が、配列番号9のアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列、

vi) 配列番号6を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、配列

10

20

30

40

50

番号6の588～602位のアミノ酸が、配列番号8のアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列、

v i i) 配列番号7を有するアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、配列番号7の587～601位のアミノ酸が、配列番号12のアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

前記修飾キャプシドタンパク質が、同じ条件下で試験したとき、配列番号19のアミノ酸配列を有する非修飾キャプシドタンパク質と比較して、発現において少なくとも2倍の増加を提供する、請求項1～5のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記修飾キャプシドタンパク質が、同じ条件下で試験したとき、配列番号19のアミノ酸配列を有する非修飾キャプシドタンパク質と比較して、ヒトFLS細胞における発現において少なくとも2倍の増加を提供する、請求項6に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記キャプシドタンパク質が、配列番号1～7からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記rAAVピリオンが、

i) 少なくとも1つのAAV逆方向末端反復(I T R) 配列を含むヌクレオチド配列、及び

i i) 目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項10】

目的の遺伝子産物をコードする前記ヌクレオチド配列が、2つのAAV I T R 配列の間に位置する、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

目的の前記遺伝子産物が、関節炎疾患に関連する症状を、処置、予防又は抑制する、請求項9又は10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

目的の前記遺伝子産物が、インターロイキン、免疫調節剤、抗体、shRNA、miRNA、ガイドRNA、成長因子、プロテアーゼ、ヌクレオチダーゼ/ヌクレオシダーゼ、ペプチド、プロテアーゼ阻害剤、阻害剤、酵素及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】

目的の前記遺伝子産物が、CD39、CD73及びIFN- のうちの少なくとも1つである、請求項12に記載の医薬組成物。

【請求項14】

目的の前記遺伝子産物が、腫瘍壊死因子アルファ(T N F) 阻害剤である、請求項9又は10に記載の医薬組成物。

【請求項15】

前記T N F 阻害剤が、エタネルセプト、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルチリズマブペゴル、及びゴリムマブからなる群から選択される、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

前記T N F 阻害剤が、エタネルセプトである、請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】

前記rAAVピリオンが、

(i) 少なくとも1つのガイドRNAをコードする配列を含むポリヌクレオチド(ここで、前記又は各ガイドRNAは、ゲノム内の標的ポリヌクレオチド配列(複数可)に実質的に相補的である)、及び

10

20

30

40

50

(i i)ヌクレアーゼをコードする配列を含むポリヌクレオチド(ここで、前記ヌクレアーゼが、前記ガイドRNAとリボヌクレアーゼ複合体を形成し、前記リボヌクレアーゼ複合体が、前記ゲノム内で部位特異的二本鎖DNA切断(DSDB)を作成する)のうち少なくとも1つを含む、請求項1~16のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項18】

前記医薬組成物が、空キャプシドを、少なくとも1:1の空キャプシド対rAAVビリオンの比率にてさらに含む、請求項1~17のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項19】

前記医薬組成物が、免疫抑制剤とともにさらに投与される、請求項1~18のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項20】

前記関節炎疾患が、関節リウマチ(RA)、若年性関節リウマチ、変形性関節症(OA)、痛風、偽痛風、脊椎関節炎(SpA)、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、敗血症性関節炎、関節炎、若年性特発性関節炎、鈍的外傷、関節置換術、及びスティル病からなる群から選択される、請求項1~19のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項21】

前記医薬組成物が、全身及び/又は局所投与される、請求項1~20のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項22】

前記医薬組成物及び前記免疫抑制剤のうち少なくとも一方が、局所投与される、請求項19に記載の医薬組成物。

20

【請求項23】

前記局所投与が、関節内投与である、請求項21又は22に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)をベースとする遺伝子治療の分野、特に関節炎疾患の処置または予防における突然変異キャプシドrAAVの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターは、in vivoでのヒトにおける遺伝子の送達に関して優れた安全性及び有効性プロファイルを実証している。それゆえ、rAAVベクターは、in vivo遺伝子治療において広く使用されており、前臨床モデルならびに臨床試験において安全及び有効であると示されている。rAAVベクターは、血友病B、血友病A、嚢胞性線維症、アルファ1抗トリプシン欠乏症、脊髄性筋萎縮症(SMA)、パーキンソン病、デュシェンヌ型筋ジストロフィー及びレーバー先天性黒内障を含む、様々な疾患に関する多くの遺伝子治療臨床試験において成果を収めている(Selot et al., Current Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 14, 1072-1082)。アリボジーンチパルボベック(Glybera(登録商標)、uniQure)は、リポ蛋白リパーゼ欠損症(LPLD)の処置のための遺伝子治療として、ヨーロッパにおいて販売承認を取得している。その後、皮膚癌の処置のためのヘルペスウイルスをベースとするタリモジェンラヘルパレブベク(T-Vec、Imlygic(登録商標)、Amgen)及びADA-SCIDの処置のためのex vivo幹細胞レトロウイルスをベースとする遺伝子治療ストリムベリス(GSK)に遺伝子治療薬承認が与えられた。

30

【0003】

rAAVベクターをベースとする遺伝子治療は、人口の約1%が罹る慢性炎症性疾患である、関節リウマチ(RA)にも適用されている。RAの病理は滑膜性関節全体に広がる。関節の局所的な性質は、in vivo遺伝子治療を非常に魅力的なものにする。RAにおけるバランスを抗炎症状態にシフトすることを目的とした抗炎症タンパク質を提供す

40

50

る治療が適用されている。

【0004】

多くの研究が、所望の特性を備えたAAVキャプシドタンパク質の開発に焦点を合わせている。そのような特性としては、より高い形質導入効率、組織/臓器向性、望ましくない組織/臓器の脱標的化、または既存の中和抗体の回避が含まれ得る。

【0005】

しかしながら、当該技術分野では、rAAV遺伝子治療ベクターをさらに改善する必要が依然としてある。特に、関節炎疾患におけるrAAV遺伝子治療ベクターの使用を改善する必要があり、より正確には、滑膜性関節または滑膜性関節内の特定の細胞型、好ましくは線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)などの標的組織に遺伝物質を送達する効率を改善する必要がある。

10

【発明の概要】

【0006】

第一の態様では、本発明は、関節炎疾患の処置もしくは予防において使用するためまたは関節炎疾患に関連する症状の処置もしくは予防において使用するための修飾キャプシドタンパク質を含み、修飾キャプシドタンパク質がタンパク質のC末端部分にアミノ酸配列Zを含み、その残基がキャプシドタンパク質の表面上に露出している、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ピリオンに関する。好ましくは、アミノ酸配列Zは、

a. 式I:

$y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$ のアミノ酸残基の配列を含むまたはそれからなり、

20

式中、xは単一のアミノ酸残基を表し、yは0、1または2個のアミノ酸残基を表し、

b. 野生型AAVキャプシドタンパク質のC末端から100~200、好ましくは120~180、より好ましくは130~170、より好ましくは140~160位のアミノ酸残基に対応する位置に存在する。

【0007】

好ましくは、式Iのアミノ酸残基は、キャプシドタンパク質の表面上に露出している。

好ましい実施形態では、配列Zは、式II:

$EEEIxxxxPVATExxxGxxxxNxy - Z - (x)_nLPGMVWQxRDVYLQGP I WAK I PHTDG$ によって表される位置にて修飾キャプシドタンパク質に含まれ、

30

式中、Z、x及びyは、上記に定義した通りであり、nは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15である。

【0008】

好ましい実施形態では、本発明は、関節炎疾患の処置もしくは予防において使用するためまたは関節炎疾患に関連する症状の処置もしくは予防において使用するための修飾キャプシドタンパク質を含み、修飾キャプシドタンパク質が、i) 配列番号1を有するアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、配列番号1の588~602位のアミノ酸が配列番号11と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、ii) 配列番号2を有するアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、配列番号2の585~599位のアミノ酸が配列番号10と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、iii) 配列番号3を有するアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、配列番号3の587~601位のアミノ酸が配列番号9と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、iv) 配列番号4を有するアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、配列番号4の586~600位のアミノ酸が配列番号8と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、v) 配列番号5を有するアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、配列番号5の588~602位のアミノ酸が配列番号9と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、vi) 配列番号6を有するアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、配列番号6の588~602位のアミノ酸が配列番号8と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、及びvii)

40

50

）配列番号7を有するアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、配列番号7の587～601位のアミノ酸が配列番号12と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、修飾キャプシドタンパク質が、同じ条件下で試験したとき、配列番号13～19からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する非修飾キャプシドタンパク質と比較して、発現において少なくとも2倍の増加を提供し、好ましくは、非修飾キャプシドタンパク質は、配列番号19を有するアミノ酸配列を有するまたは修飾キャプシドタンパク質と同じ血清型を有する、rAAVピリオンに関する。

【0009】

好ましい実施形態では、修飾キャプシドタンパク質は、同じ条件下で試験したとき、配列番号13～19からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する非修飾キャプシドタンパク質と比較して、ヒトFLS細胞における発現において少なくとも2倍の増加を提供し、好ましくは、非修飾キャプシドタンパク質は、配列番号19を有するアミノ酸配列を有するまたは修飾キャプシドタンパク質と同じ血清型を有する。

10

【0010】

あるいは、または先行する実施形態のいずれか1つと組み合わせて、本発明の好ましい実施形態では、キャプシドタンパク質は、配列番号1～7からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

【0011】

あるいは、または先行する実施形態のいずれか1つと組み合わせて、本発明の好ましい実施形態では、rAAVピリオンは、少なくとも1つのAAV逆方向末端反復(ITR)配列を含むヌクレオチド配列を含む。好ましくは、ピリオンは、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。さらにより好ましくは、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、2つのAAV ITR配列の間に位置する。

20

【0012】

好ましい実施形態では、目的の遺伝子産物は、関節炎疾患に関連する症状を、処置、予防または抑制し、好ましくは、目的の遺伝子産物は、インターロイキン、免疫調節剤、抗体、shRNA、miRNA、ガイドRNA、lncRNA、成長因子、プロテアーゼ、ヌクレオチダーゼ/ヌクレオシダーゼ、ペプチド、プロテアーゼ阻害剤、阻害剤、酵素及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくは、目的の遺伝子産物は、CD39、CD73及びIFN- γ のうちの少なくとも1つである。

30

【0013】

あるいは、または先行する実施形態のいずれか1つと組み合わせて、本発明の好ましい実施形態では、rAAVピリオンは、(i)少なくとも1つのガイドRNAをコードする配列を含むポリヌクレオチド、ここで、該または各ガイドRNAは、ゲノム内の標的ポリヌクレオチド配列(複数可)に実質的に相補的である、及び(ii)ヌクレアーゼをコードする配列を含むポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つを含み、ヌクレアーゼは、ガイドRNAとリボヌクレアーゼ複合体を形成し、リボヌクレアーゼ複合体は、ゲノム内で部位特異的二本鎖DNA切断(DSDB)を作成する。

【0014】

別の態様では、本発明は、関節炎疾患の処置もしくは予防において使用するためまたは関節炎疾患に関連する症状の処置もしくは予防において使用するためのrAAV組成物に関し、該rAAV組成物は、本発明に従うrAAVピリオン及び医薬的に許容可能な担体を含む。一実施形態では、rAAV組成物は、空キャプシドを、少なくとも1:1、少なくとも5:1または少なくとも10:1の空キャプシド対rAAVピリオンの比率にてさらに含む。

40

【0015】

別の態様では、本発明は、関節炎疾患の処置もしくは予防において使用するためまたは関節炎疾患に関連する症状の処置もしくは予防において使用するためのrAAV組成物及び免疫抑制剤に関し、該rAAV組成物は本発明に従うrAAV組成物であり、好ましく

50

は、処置または予防は、個体への r A A V 組成物の投与及び免疫抑制剤の投与を含む。

【 0 0 1 6 】

あるいは、または先行する実施形態のいずれか 1 つと組み合わせて、本発明の好ましい実施形態では、関節炎疾患は、関節リウマチ (R A)、若年性関節リウマチ、変形性関節症 (O A)、痛風、偽痛風、脊椎関節炎 (S p A)、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、敗血症性関節炎、関節炎、若年性特発性関節炎、鈍的外傷、関節置換術、ステイル病からなる群から選択される。

【 0 0 1 7 】

あるいは、または先行する実施形態のいずれか 1 つと組み合わせて、本発明の好ましい実施形態では、r A A V ビリオンまたは r A A V 組成物は、全身及び/または局所投与される。好ましい実施形態では、r A A V 組成物及び免疫抑制剤のうちの少なくとも一方は局所投与される。好ましくは、局所投与は、関節内投与である。

10

【 0 0 1 8 】

さらなる態様では、本発明は、関節炎疾患に関連する症状を処置する、予防する、または抑制する方法に関し、該方法は、本発明に従う有効量の r A A V ビリオンまたは r A A V 組成物を含む医薬品の関節内投与のステップを含む。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 9 】

本発明者らは、修飾キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンが、細胞の形質導入において驚くほど効率的であり、特に滑膜性関節の細胞の形質導入において効率的であることを発見した。線維芽細胞様滑膜細胞 (F L S) が典型的には、例えば関節リウマチなどの関節炎疾患の処置における関節内の主要な標的細胞であるため、本発明の目的は、r A A V 投与の際に、当該技術分野で公知のキャプシドタンパク質と比較して、以下の特性、i) 滑膜組織、特に F L S におけるより高い発現レベル、i i) 滑膜組織向性の改善、特に F L S に対する向性の改善、及び/または i i i) 望ましくない組織/臓器に対する脱標的化の改善のうちの 1 つまたは複数において改善されているキャプシドタンパク質を提供することである。特に、本発明の修飾キャプシドタンパク質を含む r A A V ビリオンのこれらの特性は、非修飾キャプシドタンパク質、好ましくは修飾キャプシドタンパク質と同じ血清型の野生型キャプシドタンパク質及び/または A A V 5 キャプシドタンパク質と比較して改善されている。A A V 5 キャプシドが、他の A A V 血清型と比較したとき、最も高い F L S 発現レベルをもたらすことが、以前に確立されている (A d r i a a n s e n e t a l . (2 0 0 5) A n n R h e u m D i s 6 4 : 1 6 7 7 - 1 6 8 4 ; A p p a r a i l l y e t a l . (2 0 0 5) H u m . G e n e T h e r . 1 6 : 4 2 6 - 4 3 4) 。組織/細胞向性特性を付与するのはキャプシドであるため、本発明に記載の修飾キャプシドは、好ましくは非修飾 A A V 5 と比較したとき、亢進された F L S 形質導入能力の特性を有する。特に、本発明のキャプシドタンパク質が、滑膜組織、特に F L S において、好ましくは関節内投与の際に、非修飾キャプシドタンパク質 (すなわち、試験されるべき修飾を伴わない同じキャプシドタンパク質、好ましくは修飾キャプシドタンパク質と同じ血清型のもの)、好ましくは野生型非修飾キャプシドタンパク質 (好ましくは、修飾キャプシドタンパク質と同じ血清型のもの)、より好ましくは非修飾 A A V 5 または w t A A V 5 キャプシドタンパク質と比較して、より高い発現レベルを提供することが好ましい。

20

30

40

【 0 0 2 0 】

従って、第一の態様では、本発明は、修飾キャプシドタンパク質を含む r A A V ビリオンに関する。本明細書で定義する r A A V ビリオンは、遺伝子治療における使用に関して特に有用である。

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用する場合、「遺伝子治療」は、疾患もしくは障害を処置もしくは予防するため、または疾患もしくは障害の症状を処置もしくは予防するための、個体の細胞及び/または組織への核酸配列 (例えば、本明細書で以下に定義されるような導入遺伝子 (目

50

的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列とも称する))の挿入である。

【0022】

AAVは分裂細胞及び静止細胞の両方に感染する可能性があり、感染はキャプシドタンパク質と細胞膜受容体との相互作用、それに続くAAVビリオンのエンドサイトーシスによって生じる。AAVはディペンドウイルス属に属し、これはパルボウイルスとも称される、Parvovirinaeのサブファミリーに属し、脊椎動物に感染することができる。Parvovirinaeは、小DNA動物ウイルスのファミリー、すなわちParvoviridaeファミリーに属する。これらの属の名称から推測され得るように、ディペンドウイルスのメンバーは、細胞培養における増殖性感染のために、通常、ヘルパーウイルス、例えばアデノウイルスまたはヘルペスウイルスとの同時感染を必要とするという点で、特有である。ディペンドウイルス属には、通常はヒトに感染するAAV及び、他の温血動物に感染する関連ウイルス(例えば、ウシ、イヌ、ウマ、及びヒツジのアデノ随伴ウイルス)が含まれる。パルボウイルス及びParvoviridaeの他のメンバーに関するさらなる情報は、Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996)に記載されている。便宜上、本発明は、AAVを参照することにより、本明細書にてさらに例示及び説明される。しかしながら、本発明が、AAVに限定されず、他のパルボウイルスに等しく適用され得ることが理解されたい。

10

【0023】

全ての公知のAAV血清型のゲノム構成は非常に類似している。AAVのゲノムは、長さが約5,000ヌクレオチド(nt)未満の直鎖状、一本鎖DNA分子である。逆方向末端反復(ITR)は、非構造的複製(Rep)タンパク質及び構造的(VP)タンパク質の、固有のコードヌクレオチド配列に隣接する。VPタンパク質(VP1、VP2及びVP3)は、VP2/VP3のオープンリーディングフレームと重複する別のオープンリーディングフレームにおいてコードされている、集合活性化タンパク質(AAP)の助けを借りて(一部の血清型に関して)、キャプシドまたはタンパク質外殻を形成する。末端ヌクレオチドは自己相補性であり、T字型ヘアピンを形成する、エネルギー的に安定な分子内二重鎖が形成され得るように構成されている。末端ヌクレオチドのサイズは、血清型に依存する。例えば、AAV2の場合、末端145ntのうち、125ntは自己相補性であり、残りの20ntは一本鎖のままである。これらのヘアピン構造は、ウイルスDNA複製の起点として機能し、細胞DNAポリメラーゼ複合体のプライマーとして機能する。哺乳動物細胞における野生型AAV(wtAAV)感染後、Repタンパク質(すなわち、Rep78及びRep52)は、それぞれp5プロモーター及びp19プロモーターによって転写されたmRNAから発現される。どちらのRepタンパク質も、ウイルスゲノムの複製において機能を有する。Rep ORFにおけるスプライシング事象により、実際には4つのRepタンパク質(すなわち、Rep78、Rep68、Rep52及びRep40)の発現がもたらされる。しかしながら、スプライシングされていないmRNAによってコードされる、Rep78及びRep52タンパク質が、哺乳動物細胞では、AAVベクター産生に十分であることが示されている。哺乳動物細胞におけるwtAAVまたはrAAVの産生は、2つのスプライスアクセプター部位の交互の使用及び、VP2のACG開始コドンの準最適な利用との組み合わせにさらに依存し、これにより、およそ1:1:10の比率(VP1:VP2:VP3)にて3つ全てのキャプシドタンパク質の適切な発現が確かなものとなる。

20

30

40

【0024】

本明細書で使用する場合、「rAAVビリオン」(本明細書では「rAAVベクター」または「rAAV導入遺伝子ベクター」とも称する)は、非天然核酸配列を含むAAVキャプシドを意味する。rAAV内のそのような配列は、一般に、好ましくはwtAAVからの、ITR配列に隣接し、好ましくは、目的の遺伝子産物、例えば導入遺伝子または相同性アームをコードする。言い換えると、rAAVビリオンは、(i)目的の遺伝子産物

50

をコードするヌクレオチド配列及び (i i) 少なくとも1つの A A V I T R 配列を含む、キャプシドタンパク質によってキャプシド形成された r A A V ゲノムを意味する。r A A V ゲノムは、1つまたは好ましくは全ての w t A A V 遺伝子が削除され得るが、依然として機能的な I T R 核酸配列を含み得る。好ましくは、r A A V ビリオンは、ウイルスタンパク質をコードするいずれのヌクレオチド配列、例えば A A V の r e p (複製) または c a p (キャプシド) 遺伝子を含まない。ゆえに、r A A V ビリオンは w t A A V ビリオンと区別され、それはウイルスタンパク質の全てまたは一部が、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列で置換されているためであり、これは本明細書においてさらに定義するように A A V 核酸配列に関して非天然核酸である。

【0025】

好ましい実施形態では、本発明の修飾キャプシドタンパク質を含む r A A V ビリオンは、関節炎疾患の処置もしくは予防において使用するためまたは関節炎疾患に関連する症状の処置もしくは予防において使用するためのものである。本明細書に記載する医学的用途 (例えば、関節炎疾患 (に関連する症状) の処置または予防のための遺伝子治療) は、本明細書に定義する疾患 (複数可) 及び/または障害 (複数可) の予防または処置のための医薬品として使用するための本発明に従う r A A V ビリオンとして製剤化されるが、(i) 本明細書に定義する疾患 (複数可) 及び/もしくは障害 (複数可) またはその症状を予防または処置する方法であって、十分または有効量の本発明に従う r A A V ビリオンを、それを必要とする対象に投与することを含む該方法として、(i i) 本明細書に定義する疾患 (複数可) 及び/または障害 (複数可) を予防または処置するための医薬品の調製において使用するための本発明に従う r A A V ビリオンとして、あるいは (i i i) 本明細書に定義する疾患 (複数可) 及び/または障害 (複数可) の予防または処置のための本発明に従う r A A V ビリオンの使用として等しく製剤化され得る。そのような医学的使用は全て、本発明により想定される。好ましくは、修飾キャプシドタンパク質は、タンパク質の C 末端部分にアミノ酸配列 Z を含み、その残基はキャプシドタンパク質の表面上に露出している。

【0026】

本明細書で使用する場合、「処置する」、「処置」、または「処置すること」という用語は、本発明の r A A V ビリオンの関節炎疾患を有する対象への適用または投与を指し、その目的は、関節炎疾患の、または関節炎疾患に関連する症状の進行または重症度を、治療する、部分的または完全に逆転、緩和、寛解、阻害、遅延、抑制、減速または停止させることである。「処置すること」という用語は、関節炎疾患の少なくとも1つの有害作用または症状を低下または緩和することを含む。1つまたは複数の症状または臨床マーカーが低下する場合に、処置は概して「有効」である。あるいは、関節炎疾患の進行が低下または停止する場合に、処置は「有効」である。すなわち、「処置」には、症状またはマーカーの改善だけでなく、処置の不在で予想され得る症状の進行または悪化の休止または少なくとも減速も含まれる。有益または所望の臨床結果としては、検出可能であるか検出不能であるかに関わらず、1つまたは複数の症状 (複数可) の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の病態の安定化 (すなわち、悪化しない)、疾患進行の遅延または減速、疾患病態の寛解または緩和、及び (部分的か完全かに関わらず) 緩解が挙げられるが、これらに限定されない。関節炎疾患の「処置」という用語は、関節炎疾患の症状または副作用の軽減を提供すること (緩和処置を含む) も含む。本明細書で使用する場合、「予防する」、「予防」、または「予防的 (p r e v e n t a t i v e) 」 (予防的 (p r o p h y l a c t i c) とも称する) という用語は、関節炎疾患に対する素因を有する対象への本発明に従う r A A V ビリオンの適用または投与を指し、起こり得る関節炎疾患の1つまたは複数の症状または特徴の、発症を遅延もしくは予防する、進行を緩和、寛解、軽減、阻害する、重症度を低下させる、及び/または発生率を低下させることを目的とする。ゆえに、本発明に従う r A A V ビリオンは、関節炎疾患の兆候を呈さない対象及び/または関節炎疾患の初期徴候のみを呈する対象に、好ましくは関節炎疾患に関連する病理を発症するリスクを低減する目的で、投与されてよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用する場合、「治癒する」または「治癒すること」という用語は、関節炎疾患の1つまたは複数、好ましくは全ての症状または特徴を完全に緩和することを意味する。本明細書で使用する場合、「遅延する」または「遅延すること」という用語は、関節炎疾患の症状または特徴のうちの1つまたは複数の発症を遅延させる及び/または進行を阻害する及び/または重症度を低下することを意味する。

【 0 0 2 8 】

好ましい実施形態では、本発明の修飾キャプシドタンパク質は、同じ条件下で試験したとき、非修飾キャプシドタンパク質と比較して発現において少なくとも2倍の増加を提供する。好ましくは、非修飾キャプシドタンパク質は、修飾キャプシドタンパク質と同じ血清型のキャプシドタンパク質であるが、試験されるべき修飾を伴わない。より好ましくは、非修飾キャプシドタンパク質は、修飾キャプシドタンパク質と同じ血清型の野生型(wt)キャプシドタンパク質であり、wtキャプシドタンパク質は、好ましくは、配列番号13~19からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。あるいは、非修飾キャプシドタンパク質は、配列番号13~19からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することが好ましい。最も好ましくは、非修飾キャプシドタンパク質は、配列番号19に示されるようなアミノ酸配列を有する。好ましい非修飾キャプシドタンパク質は、rAAVピリオンによって標的とされるべき組織に依存し得る。例えば、AAV5キャプシドタンパク質を伴うrAAVは、FLS細胞に適したピリオンであるように思われ(Apparailly et al. (2005) Human Gene Therapy 16(4): 426-434; Adriaansen et al. (2005) Ann. Rheum. Dis. 64(12): 1677-1684)、従って-rAAV突然変異ピリオンの元の血清型に関係なく-rAAV対照ピリオンは、好ましくはAAV5キャプシドタンパク質、より好ましくは野生型AAV5(wtAAV5)キャプシドタンパク質を含み、より好ましくは、AAV5キャプシドタンパク質は配列番号19に示されるアミノ酸配列を有し、さらにより好ましくは、rAAV対照ピリオンは、rAAV5ピリオンである。rAAV対照ピリオンは、修飾キャプシドタンパク質の代わりに、本明細書に定義するような非修飾キャプシドタンパク質を含むrAAVピリオンである。好ましい実施形態では、rAAVピリオン(修飾キャプシドタンパク質を含む)は、実施例に記載の方法を使用して、修飾キャプシドタンパク質の代わりに本明細書に定義するような非修飾キャプシドタンパク質を伴う同じrAAVピリオンと比較して、リウマチ様関節炎患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞(RA-FLS)及び/またはHEK293、好ましくはHEK293T細胞において、in vitro形質導入の際により高い発現を提供する。言い換えれば、キャプシドタンパク質を除いて、rAAVピリオン及びrAAV対照ピリオンは好ましくは同一である。好ましくは、形質導入効率は、in vitro形質導入アッセイにおいて検出され、これはGFP、YFP及び/またはルシフェラーゼなどの導入遺伝子によりコードされるレポーター遺伝子の発現レベルを測定することによる。好ましい実施形態では、発現を決定するための試験は、実施例2/3に記載するようなin vitro形質導入アッセイである。簡潔には、96ウェルプレート(DMEM-Glutamax-I(Gibco、参照番号31966-021)、10%FBS(熱非働化(HI)ウシ胎児血清、Gibco参照番号A15-151)、100µg/mlペニシリン/100µg/mlストレプトマイシン(Sigma-Aldrich、参照番号P0781; 37/5%CO₂)に、RA-FLS(van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427に記載される通りに単離される)を2500個の細胞/ウェルでプレートするか、またはHEK293T細胞(ヒト胚性腎細胞)を40,000個の細胞/ウェルでプレートする。24時間後、上清を除去し、rAAV突然変異ピリオンまたはrAAV対照ピリオンを含有する培地(DMEM-glutamax-I(Gibco、参照番号31966-021)、0.001%プルロニックF68(Sigma、参照番号p5559))により置換する-サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの制御下で全てが黄色蛍光タンパク質(YFP)及び/また

10

20

30

40

50

はルシフェラーゼを発現する - 感染多重度 (MOI) は、10,000、20,000、100,000とする。粗溶解物 (すなわち、rAAV産生のために必要な全てのプラスミドを用いてトランスフェクトされ、レポーター発現ビリオンを含有する細胞の非精製上清) または精製AAV (好ましくは、イオジキサノール精製または塩化セシウム (CsCl) 密度勾配精製に基づく) を使用することができる。形質導入の4時間後、ドキシソルピシン (Sigma、参照番号D1515、最終濃度0.4 μM)、FBS (最終濃度1%) を含有する培地 (DMEM - GlutaMAX - I、10% FBS 100U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン) を加える。48時間後 (HEK293T) または4~6日後 (RA-FLS)、細胞を、蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーにより、YFPまたはルシフェラーゼを発現している細胞の割合 (%) についてアッセイする。好ましくは、*in vitro* 形質導入アッセイを、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の患者から単離されたFLSなどの異なる患者から単離されたFLSを用いて、複数回行う。

10

【0029】

「血清型」は、従来、別のウイルスと比較してあるウイルスに対する抗体間の交差反応性の欠如に基づいて定義される。このような交差反応性の差は、通常、キャプシドタンパク質配列 / 抗原決定基における差に起因する (例えば、AAV血清型のVP1、VP2及び / またはVP3配列の差に起因する)。従来の定義下では、血清型とは、目的のウイルスが、全ての既存の及び特徴決定された血清型に特異的である血清に対して、中和活性に関して試験され、目的のウイルスを中和する抗体が見出されていないことを意味する。より多くの天然に生じるウイルス単離体が発見され、キャプシド突然変異体が生成されるにつれ、現在存在する血清型のいずれかとの血清学的な差がある場合もあり、ない場合もある。ゆえに、新規AAVが血清学的な差を有さない場合、この新規AAVは、対応する血清型の亜群または変異体であるだろう。多くの場合では、それらが血清型の従来の定義に従って別の血清型であるかどうかを決定するための、中和活性に関する血清学試験は、キャプシド配列修飾を有する突然変異ウイルスに対してまだ行われていない。従って、便宜上及び反復を避けるために、「血清型」という用語は、血清学的に区別されるウイルス (例えば、AAV)、ならびに所与の血清型の亜群または変異体内にあり得る血清学的に区別されていないウイルス (例えば、AAV) の両方を広く指す。

20

【0030】

「形質導入」は、ウイルスベクターによるレシピエント宿主細胞への導入遺伝子の移行を指す。本発明のrAAVビリオンによる標的細胞の形質導入は、そのrAAVビリオンに含有される導入遺伝子の形質導入される細胞への移行をもたらす。「宿主細胞」または「標的細胞」は、個体の滑膜細胞 (synovioocyte) もしくは滑膜細胞 (synovial cell) などの、または患者からの単離されたFLS細胞もしくは*in vitro* 形質導入アッセイの場合にはHEK293T細胞などの、DNA送達が生じる細胞を指す。AAVベクターは、分裂細胞及び非分裂細胞の両方を形質導入することができる。例えばGFPなどの目的の遺伝子産物を含む細胞では、目的の遺伝子産物は、細胞のrAAV「形質導入」によって、導入 / 移行 / 形質導入されている。導入遺伝子が導入されている細胞は、「形質導入された」細胞と呼ばれる。

30

40

【0031】

導入遺伝子が形質導入されるレシピエント宿主細胞は、好ましくは、処置されるべき疾患に罹っている細胞、例えば、関節炎の場合では、滑膜細胞、より具体的にはFLS、マクロファージ、単球、好中球、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、T-リンパ球、樹状細胞、形質細胞、マスト細胞、Bリンパ球などである。本明細書で使用する場合、「滑膜」または「滑膜組織」または「滑膜細胞」は、滑膜性関節の非軟骨性表面を覆う、細胞の内張を指し、Tak (2000, Examination of the synovium and synovial fluid. Firestein GS, Panyani GS, Wollheim FA editors. Rheumatoid Arthritis. New York: Oxford Univ. Press, Inc. 55-68) に記載

50

）においてさらに記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。滑膜は、内膜の内層（または滑膜表層）及び滑膜下内層（滑膜下層）からなり、関節包と合わさる。内膜の内層は、内膜マクロファージ（またはマクロファージ様滑膜細胞もしくはA型滑膜細胞）及びFLS（またはB型滑膜細胞）を含む。それゆえ、「滑膜」は、「滑膜組織」で置き換えられてよい、または同義である。滑膜細胞は、FLS及びマクロファージ様滑膜細胞を含む滑膜内に存在する任意の細胞を含むことができる。滑膜細胞は、好中球、T細胞、B細胞及び/または結合組織細胞であってよく、これらは全てが滑膜内に存在してよい。

【0032】

「線維芽細胞様滑膜細胞」（FLS）は、例えばいくつかのタイプのコラーゲンなどの特定のタンパク質の発現など、線維芽細胞と共通する多くの特徴を示す間葉系起源の細胞である。しかしながら、FLSは、例えばルブリシンなど、他の線維芽細胞系統には通常存在しないタンパク質も分泌する。加えて、FLSは、細胞接着の媒介に重要である分子、例えばカドヘリン-11、VCAM-1、数種のインテグリン及びそれらの受容体を発現する。CD55の発現はFLSに特有であり、それゆえ典型的にはこのタンパク質を使用して、免疫組織化学によって滑膜内のFLSを同定する。FLSは、滑膜の関節の内側に位置する特殊化した細胞型を表し、その細胞は、関節リウマチ（RA）などの慢性炎症性疾患の病理発生において決定的な役割を担う。「リウマチ様滑膜」または「リウマチ様滑膜細胞」または「リウマチ様滑膜組織」という用語は、RAに罹患している個体の関節の炎症を起こした滑膜を指す。リウマチ様滑膜は、内膜の内層肥厚ならびに、滑膜下層におけるFLS、T細胞、形質細胞、マクロファージ、B細胞、ナチュラルキラー細胞及び樹状細胞の蓄積を特徴とする。これらの蓄積された細胞は、リウマチ様滑膜細胞の定義に含まれている。RAが進行する間、滑膜組織は一定の炎症過程が生じる場所となり、最終的には軟骨の損傷ならびに関節の破壊及び変形をもたらす。RAの間に滑膜内に存在するFLSは、正常組織内に存在するFLSと比較して変化した表現型を示すことが報告されている。例えば、リウマチ様滑膜内のFLSは「接触阻害」を喪失する、つまり、より多くの細胞が互いに接触するようになった際にその増殖を停止する特性を喪失する。加えて、これらは接着面上で増殖する依存性を喪失する。結果として、罹患した滑膜内のFLSの数が増加する。炎症は、数種の炎症誘発性シグナル伝達分子、具体的にはインターロイキンIL-6及びIL-8、プロスタノイドならびにマトリックスメタロプロテナーゼ（MMP）の産生によって、さらに亢進される。

【0033】

あるいは、または別の実施形態と組み合わせて、本発明のさらに好ましい実施形態では、本発明に従う修飾キャプシドタンパク質を含むrAAVビリオンは、同じ条件下で試験したとき、本明細書に定義するような非修飾キャプシドタンパク質を含むrAAVビリオンと、好ましくは配列番号13～19からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する非修飾キャプシドタンパク質と比較して、ヒトFLSにおける導入遺伝子の発現において少なくとも2倍の増加を提供し、好ましくは、非修飾キャプシドタンパク質は、修飾キャプシドタンパク質と同じ血清型を有するまたは配列番号19に示されるアミノ酸配列を有する。

【0034】

より好ましくは、本発明のrAAVビリオンは、上記のような*in vitro*形質導入の際に、rAAV対照ビリオンと比較してヒトFLS細胞において少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50倍の増加した発現レベルで、導入遺伝子の発現レベルの増加をもたらす。

【0035】

また好ましい、または上記に加えて、rAAVビリオンは、疑似滑膜腔（*air pouch synovium*）（APS）マウスモデル（実施例4に記載のようにEdwards et al（1981）J Pathol 134：147-156から適応）への*in vivo*投与の際に、rAAV対照ビリオンと比較して、好ましくはwtAAV5キャプシドタンパク質を含むrAAVビリオンと比較して、導入遺伝子の発現の増加を

10

20

30

40

50

提供し、ただし rAAV が（そのキャプシドタンパク質（複数可）以外の）他の点では同一であることを条件とする。好ましくは、導入遺伝子の発現は、本発明の方法の突然変異キャプシドタンパク質を含む rAAV を使用して、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35 倍増加する。例示的な方法は、実施例に提供する。

【0036】

また好ましい、または上記に加えて、修飾キャプシドタンパク質を含む rAAV ビリオンは、同じ血清型の、非修飾、好ましくは野生型の AAV キャプシドタンパク質を含む同じ rAAV ビリオンと比較して、同様またはより低い中和抗体（nAb）力価を提供する。WtAAV5 キャプシドは、魅力的な nAb プロファイルを有することが知られており、それゆえ、wtAAV5 と比較して本発明に従う修飾キャプシドタンパク質を含む rAAV の同様またはより低い nAb 力価は好ましい。

10

【0037】

あるいは、*in vitro* 形質導入アッセイを、上記と同様だが、標的とするべき細胞型に応じて、FLS とは異なる細胞型 / 細胞株において、例えば、初代肝細胞、肝細胞株、例えば、HuH、HepG2、HepA1-6、心臓細胞、骨格筋細胞、肺細胞、例えば細胞株 A549、CNS 細胞、眼細胞、消化管細胞、骨髄細胞及び血液細胞、例えば細胞株 THP-1 からなる群から選択される細胞において行うことができる。これもまた、野生型キャプシドタンパク質の向性に応じて、好ましい対照として異なる AAV 血清型を必要とし得る。一般に、対照ベクターは、好ましくは、適した組織を自然に標的とする野生型キャプシドタンパク質を含む。当業者が理解するように、これはまた、投与様式：局所性または全身性に依存し得る。例えば、AAV2 は、最も広範に検査されてきた AAV であり、骨格筋細胞、ニューロン、血管平滑筋細胞及び肝細胞に対する向性を示し、AAV6 は、気道上皮細胞に対する向性を示し、AAV7 は、骨格筋細胞に対する向性を示し、AAV8 は、肝細胞に対する向性を示し、AAV1 及び AAV5 は、血管内皮細胞に対する向性を示す。全身投与の際、AAV1~3 及び 5~9 は肝臓に対して向性を有し、AAV9、8、7、6、1 で高いタンパク質レベルが、及びより少ない程度に 5 及び 2 で観察され、心臓は、AAV4、6、7、8 及び 9 により形質導入され、胸部発現は、AAV4 及び 6 に関して見られる（Zincarelli et al (2008) *Molecular Therapy* 16(6): 1073-1080）。

20

30

【0038】

いかなる理論にも束縛されることを望まないが、本発明者らは、rAAV 対照ビリオンと比較して本発明の修飾キャプシドタンパク質を含む rAAV ビリオンによって達成される発現の増加は、細胞への rAAV の形質導入の改善によって、おそらくは向性の変化によって引き起こされ、結果として (i) 形質導入される細胞集団内の細胞数の増加、及び / または (ii) 例えば、より良好なビリオンの取り込み及び / または細胞内プロセッシングに起因する細胞あたりの発現レベルの増加がもたらされると考える。

【0039】

本発明に従う修飾キャプシドタンパク質を伴う rAAV ビリオンの別の利点は、好ましくは、既存の中和抗体の潜在的な回避などの他の改善であり得る。

40

【0040】

本発明の好ましい実施形態では、修飾キャプシドタンパク質はアミノ酸配列 Z を含み、好ましくはアミノ酸配列 Z はタンパク質の C 末端部分に含まれる。好ましくは、配列 Z の長さは 12 ~ 18 アミノ酸残基である（本明細書では「ループ領域」及び「インサート」とも称する）。好ましい実施形態では、配列 Z は、キャプシドタンパク質の C 末端部分に、好ましくは、野生型キャプシドタンパク質の C 末端から、100 ~ 200、好ましくは 120 ~ 180、より好ましくは 130 ~ 170、より好ましくは 140 ~ 160、最も好ましくは約 150 位のアミノ酸に対応する位置に配置され、例えば、配列番号 13 ~ 19 に示される。アミノ酸配列 Z の残基は、好ましくは、キャプシドタンパク質の表面上に露出している、例えば、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12

50

、13、14、15、16、17、または18個の残基がキャプシドタンパク質の表面上に露出している(いわゆる「ループ」)。好ましい実施形態では、配列Zの長さは、14~18アミノ酸残基、より好ましくは、15、16、17または18残基、最も好ましくは15、17または18アミノ酸残基である。配列Zは、非修飾、例えば野生型キャプシドタンパク質配列と比較して、いくつかのアミノ酸残基を置換し得る。好ましくは、インサートは、同じ配列だがインサートを伴わない、好ましくは非修飾、より好ましくは野生型配列の3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸残基、より好ましくは6または7アミノ酸残基を置換する。配列Z/インサートとは別に、ゆえに、フレームワークにおいて、キャプシドタンパク質は、アミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)などのさらなる修飾を含み得る、またはフレームワークキャプシドタンパク質は野生型アミノ酸配列であり得る。インサートが含まれるフレームワークAAVは、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAVrh10またはAAVDJなどの任意の血清型のものであり得る。好ましくは、配列Zが含まれるフレームワークAAVは、AAV1、AAV2、AAV7、AAV9、AAVrh10、AAVDJからなる群から、より好ましくは、配列番号13~19のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を有する非修飾キャプシドタンパク質から選択される。本発明に従うインサートは、好ましくは、キャプシドタンパク質のC末端部分に、好ましくは、野生型キャプシドタンパク質のC末端から、100~200、好ましくは120~180、より好ましくは130~170、より好ましくは140~160、最も好ましくはおよそ150位のアミノ酸残基に対応する位置に含まれ、例えば、配列番号13~19などに示され、ここでインサートの位置は、式II:

EEEIxxxxPVATExxGxxxxNxy-Z-(x)_nLPGMVWQxRDVYLQGPiWAKIPHTDGによって表され、

式中、xは単一のアミノ酸残基を表し、yは0、1、もしくは2個のアミノ酸残基(複数可)(ゆえに、存在しない場合がある)を表し、nは5、6、7、8、9、10、11、12、13、14もしくは15、好ましくは8、9もしくは10である、またはインサートの位置は、式IIと少なくとも90、93、95、96、97、98または99%の配列同一性を有する配列によって表される。好ましくは、本発明の配列ZのN末端に先行する最後の3個のアミノ酸残基は、NLQ、NHQまたはNFQである。好ましくは、yは0または2個のアミノ酸残基を表す。いくつかの場合では、yは2個のアミノ酸残基を表し、ゆえに、2個の追加のアミノ酸残基、好ましくは2個のセリン残基が、NxQモチーフと本発明のインサートとの間に存在し得る。これは好ましくは、NxQモチーフがNFQである場合、例えば、AAVキャプシドが配列番号1において表されるようなAAV1キャプシド配列である場合である。当業者は、これらのモチーフ及びインサートが配置されるこの領域を、またこれらも本発明の範囲に包含される、アミノ酸置換または欠失などのいくつかの変更を有するか否かも決定することができるだろう。

【0041】

好ましい実施形態では、図4及び5に示されるアライメントに基づいて、インサート(配列Z)は、式： $x_1 - G - Q - x_2 - G - x_3 - x_4 - x_5 - R - x_6 - x_7 - x_8 - x_9 - x_{10} - x_{11} - x_{12} - x_{13} - x_{14} - x_{15}$ の配列を含むまたはそれからなり、式中、 x_1 はQまたは無し、 x_2 はSまたはR、 x_3 はNまたはC、 x_4 はD、YまたはE、 x_5 はC、V、SまたはA、 x_6 はG、SまたはV、 x_7 は無し、A、VまたはR、 x_8 はD、NまたはE、 x_9 はCまたはA、 x_{10} はFまたはQ、 x_{11} は無し、CまたはA、 x_{12} は無しまたはA、 x_{13} は無しまたはQ、 x_{14} は無しまたはA、 x_{15} は無しまたはAである。あるいはインサート(配列Z)は、式： $y_1 - G - Q - y_2 - G - y_3 - y_4 - y_5 - R - y_6 - y_7 - y_8 - y_9 - y_{10} - A - y_{11} - y_{12} - y_{13}$ の配列を含むまたはそれからなり、式中、 y_1 はQまたは無し、 y_2 はSまたはR、 y_3 はNまたはC、 y_4 はD、YまたはE、 y_5 はC、V、SまたはA、 y_6 はG、SまたはV、 y_7 は無しまたはD、 y_8 は無しまたはC、 y_9 はA、V、RまたはF、 y_{10} はN、D、EまたはC、 y_{11} は無しまたはQ、 y_{12} は無しまたはA、 y_{13} は無しまたはAである。さらに別の代替で

10

20

30

40

50

は、最も好ましい実施形態では、図 6 及び 7 に示すアライメントに基づいて、インサート（配列 Z）は、一般式 I：

$y - G - Q - x - G - (x)_3 - R - (x)_3 - y - A - Q - A - A$ の配列を含むまたはそれからなり、

式中、 x は単一のアミノ酸残基を表し、 y は 0、1 または 2 個のアミノ酸残基（ゆえに存在しない場合もある）を表す。好ましくは、 (i) N 末端にて y が 0 個のアミノ酸を表す場合に、式 I 内の他の y は 0 個のアミノ酸残基を表す、または (ii) N 末端にて y が 1 個のアミノ酸残基を表す場合に、式 I 内の他の y は 2 個のアミノ酸残基を表す。より好ましくは、インサート（配列 Z）は、より特異的な式：

$z_0 - G - Q - z_1 - G - z_2 - z_3 - z_4 - R - z_5 - z_6 - z_7 - z_8 - z_9 - A - Q - A - A$ の配列を含むまたはそれからなり、

式中、 z_0 は無しまたは Q、 z_1 は R または S、 z_2 は C または N、 z_3 は D、E または Y、 z_4 は C、A、S または V、 z_5 は G、V または S、 z_6 は d または無し、 z_7 は C または無し、 z_8 は F、R、V または A、 z_9 は C、D、N または E である。より好ましくは、 z_0 が無しの場合、 z_6 及び z_7 はどちらも無しを表す。

【0042】

より好ましくは、配列 Z / インサートは、配列番号 8 ~ 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列のいずれか 1 つと、少なくとも 80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98 または 99%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。配列 Z / インサートが、上記の式のいずれか 1 つによって表されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなり、配列番号 8 ~ 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列のいずれか 1 つと、少なくとも 80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98 または 99%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有することが好ましい。

【0043】

哺乳動物細胞では、正しい化学量論での 3 つの AAV キャプシドタンパク質（VP1、VP2、及び VP3）の発現は、2 つのスプライスアクセプター部位の交互使用と、昆虫細胞では正確に複製されない、VP2 の ACG 開始コドンの準最適活用との組み合わせに依存する。正しい化学量論は、AAV 粒子の感染性にとって重要である。昆虫細胞で 3 つの AAV キャプシドタンパク質を正しい化学量論で産生するには、スプライシングを必要とせず 3 つ全ての VP タンパク質を発現できる単一のポリシストロニックメッセンジャーへと転写される構築物を使用するのが一般的である。これを達成するためには、VP1 タンパク質は、ATG の代わりに準最適な翻訳開始コドンの制御下にあり得る。そのような準最適な翻訳開始コドンの例は、ACG、TTG、CTG 及び GTG である (Urab et al. (2002) Human Gene Therapy 13:1935-1943; 米国特許第 20030148506 号; 米国特許第 20040197895 号; WO2007/046703)。あるいは、昆虫細胞における rAAV の産生では、核酸カセットを使用して VP1、VP2、及び VP3 タンパク質を発現させることができ、この場合これらのタンパク質は、VP2 ACG 開始コドンの前にプロモーターを含むイントロンを含む VP 発現カセットが開示されている欧州特許第 2,061,891B1 に記載されるような重複オープンリーディングフレーム (ORF) を含む核酸配列によってコードされている。本発明の修飾キャプシドタンパク質は、VP1 キャプシドタンパク質のタンパク質配列に関して定義される。しかしながら、配列 Z / インサートは、VP1 タンパク質の C 末端部分に位置するので、VP2 および VP3 タンパク質もまた配列 Z / インサートを保有し、ゆえに（例えば、昆虫細胞または哺乳動物細胞などにおける rAAV の産生方法に関係なく）修飾されることが本発明に含まれる。

【0044】

あるいは、または別の実施形態と組み合わせて、本発明のさらなる好ましい実施形態では、本発明に従う修飾キャプシドタンパク質は、 $i)$ 配列番号 1 を有するアミノ酸配列と少なくとも 70、75、80、85、87、90、91、92、93、94、95、96

10

20

30

40

50

、 97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号1の位置588～602にあるアミノ酸が配列番号11と少なくとも80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列、ii)配列番号2を有するアミノ酸配列と少なくとも70、75、80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号2の位置585～599にあるアミノ酸が配列番号10と少なくとも80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列、iii)配列番号3を有するアミノ酸配列と少なくとも70、75、80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号3の位置587～601にあるアミノ酸が配列番号9と少なくとも80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列、iv)配列番号4を有するアミノ酸配列と少なくとも70、75、80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号4の位置586～600にあるアミノ酸が配列番号8と少なくとも80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列、v)配列番号5を有するアミノ酸配列と少なくとも70、75、80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号5の位置588～602にあるアミノ酸が配列番号9と少なくとも80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列、vi)配列番号6を有するアミノ酸配列と少なくとも70、75、80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号6の位置588～602にあるアミノ酸が配列番号8と少なくとも80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列、及びvii)配列番号7を有するアミノ酸配列と少なくとも70、75、80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有し、配列番号7の位置587～601にあるアミノ酸が配列番号12と少なくとも80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。好ましくは、インサートが含まれるフレームワークAAVキャプシドタンパク質は、例えば、AAV5、AAV1、AAV2、AAV7、AAV9、AAVrh10もしくはAAVDJなどの野生型AAVキャプシドのアミノ酸配列、または保存的アミノ酸置換を含むアミノ酸配列を有する。より好ましくは、インサートが含まれるフレームワークAAVキャプシドタンパク質は、wtAAV5キャプシドのアミノ酸配列、または保存的アミノ酸置換を含むアミノ酸配列を有する。

【0045】

「配列同一性」は、本明細書では、配列を比較することにより決定される、2つ以上のアミノ酸（ポリペプチドまたはタンパク質）配列または2つ以上の核酸（ポリヌクレオチド）配列間の関係として定義される。好ましい実施形態では、配列同一性は、2つの所与の配列番号の全長またはその一部に基づいて計算される。その一部は、好ましくは、両方の配列番号の少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90%または100%を意味する。当該技術分野では、「同一性」はまた、場合によっては、そのような配列のストリング間の一致によって決定される、アミノ酸配列または核酸配列間の配列関連性の程度を意味する。本明細書で別段に示されない限り、所与の配列番号との同一性または類似性は、前記配列の全長に基づく（すなわち、その全体の長さにわたるまたは全体としての）同一性または類似性を意味する。

10

20

30

40

50

【0046】

2つのアミノ酸配列間の「類似性」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列及びその保存されたアミノ酸置換を第二のポリペプチドの配列と比較することにより決定される。「同一性」及び「類似性」は、公知の方法によって容易に計算することができ、限定されないが、(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; 及び Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; 及び Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)) に記載のものが含まれる。

10

【0047】

同一性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間で最大の一致を与えるように設計される。同一性及び類似性を決定する方法は、一般に利用可能なコンピュタープログラムに体系化されてる。2つの配列間の同一性及び類似性を決定するための好ましいコンピュタープログラム方法には、例えば、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984))、BestFit、BLASTP、BLASTN、及びFASTA (Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)) が含まれる。BLAST Xプログラムは、NCBI及び他の情報源から一般に利用可能である (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。周知のスミスウォーターマンアルゴリズムを使用して、同一性を決定してもよい。

20

30

【0048】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメーターには、以下のアルゴリズム: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970); 比較マトリックス: Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 10915-10919 (1992) からのBLOSSUM62; ギャップペナルティ: 12; 及びギャップ長ペナルティ: 4が含まれる。このようなプログラムは、ウィスコンシン州マディソンにあるGenetics Computer Groupからの「Ogap」プログラムとして一般に利用可能である。前述のパラメーターは、アミノ酸比較のためのデフォルトパラメータである (エンドギャップについてはペナルティは伴わない)。

40

【0049】

核酸比較のための好ましいパラメーターには、以下のアルゴリズム: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970); 比較マトリックス: マッチ=+10、ミスマッチ=0; ギャップペナルティ: 50; ギャップ長ペナルティ: 3が含まれる。ウィスコンシン州マディソンにあるGenetics Computer Groupからギャッププログラムとして利用可能である (www.biology.wustl.edu/gcg/gap)。上記に記載するものは、核酸比較のためのデフォルトパラメータである。

【0050】

50

任意選択的に、アミノ酸類似性の程度を決定する際に、当業者は、当業者に明らかであるように、いわゆる「保存的」アミノ酸置換も考慮に入れてもよい。保存的アミノ酸置換は、類似する側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンであり；脂肪族 - ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリン及びスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギン及びグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンであり；硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システイン及びメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、及びアスパラギン - グルタミンである。本明細書に開示するアミノ酸配列の置換変異体は、開示する配列中の少なくとも1つの残基が除去され、異なる残基が代わりに挿入されているものである。好ましくは、アミノ酸変化は保存的である。天然に生じるアミノ酸のそれぞれの好ましい保存的置換は以下の通りである：AlaからSer；ArgからLys；AsnからGlnまたはHis；AspからGlu；CysからSerまたはAla；GlnからAsn；GluからAsp；GlyからPro；HisからAsnまたはGln；IleからLeuまたはVal；LeuからIleまたはVal；LysからArg；GlnまたはGlu；MetからLeuまたはIle；PheからMet、LeuまたはTyr；SerからThr；ThrからSer；TrpからTyr；TyrからTrpまたはPhe；及びValからIleまたはLeu。

【0051】

あるいは、または別の実施形態と組み合わせて、本発明のさらに好ましい実施形態では、キャプシドタンパク質は、配列番号1～7からなる群から、より好ましくは配列番号1、2、3、4、6及び7からなる群から、さらにより好ましくは配列番号3、4及び6からなる群から、なおもより好ましくは配列番号4及び6からなる群から、最も好ましくは配列番号4から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

【0052】

機能性ITR配列は、rAAVビリオンの複製、レスキュー、及びパッケージングに必要である。ITR配列は、野生型配列であってよい、または野生型配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは100%の配列同一性を有してよい、またはそれらが機能性である限り、例えば、ヌクレオチドの挿入、突然変異、欠失もしくは置換によって改変されてよい。この文脈において、機能性とは、ゲノムをキャプシド外殻内に直接パッケージングし、次いで形質導入されるべき宿主細胞または標的細胞における発現を可能にする能力を指す。典型的には、野生型AAVゲノムのITRは、rAAVベクター内に保持される。ITRは、AAVウイルスゲノムからクローニングする、またはAAV ITRを含むベクターから切り出すことができる。ITRヌクレオチド配列は、標準的な分子生物学技術を使用して、本明細書に定義するような導入遺伝子にいずれかの末端にて連結し得るか、またはITR間の野生型AAV配列を所望のヌクレオチド配列で置換し得る。rAAVベクターは、好ましくは、少なくともAAV血清型のうちの1つのITR領域のヌクレオチド配列、またはそれに実質的に同一であるヌクレオチド配列、及び2つのITRの間に挿入された（適切な調節エレメントの制御下にある）治療用タンパク質をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む。現在使用されているrAAVベクターの大部分は、AAV血清型2由来のITR配列を使用する。rAAVベクターに存在する最も好ましいITRは、AAV2血清型のものである。他の好ましいITRは、AAV1、AAV3、AAV5またはAAV6血清型のものである（Grimmet al. (2006) J Virol 80(1): 426-439）。rAAVゲノムは、一本鎖または二本鎖（自己相補性）DNAを含むことができる。一本鎖核酸分子は、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかであり、これは、両方の極性が等しくAAVキャプシドへとパッケージングすることができるからである。一本鎖rAAVベクターは、野生型AAV血清型2（AAV2）ITR配列を利用し得、二本鎖（自己相補性）rAAVベクターは

、 I T R の修飾版を利用し得る。あるいは、一実施形態では、二本鎖ベクターは1つの I T R を含み、この I T R は A A V 4 由来である。 r A A V ベクターは、マーカーまたはレポーター遺伝子、例えば当該技術分野で公知の、例えば、抗生物質耐性遺伝子、蛍光タンパク質（例えば、 g f p ）をコードする遺伝子、あるいは化学的、酵素的または別途検出可能及び/もしくは選択可能な生成物をコードする遺伝子（例えば、 l a c Z 、アルカリホスファターゼ（ A P ） 、 S E A P 、 L u c 、 N e o 、 B l a 、 など）をさらに含んでよい。

【 0 0 5 3 】

r A A V ベクターは、 A A V 血清型キャプシド及び A A V ゲノム I T R の任意の考えられ得る組み合わせを含み、当該技術分野で公知の方法を使用して、例えば、哺乳動物 r A A V 産生システムまたは昆虫細胞 r A A V 産生システムを使用して産生される。当該技術分野で公知の方法は、例えば、 P a n e t a l . (J . o f V i r o l o g y (1 9 9 9) 7 3 : 3 4 1 0 - 3 4 1 7) 、 C l a r k e t a l . (H u m a n G e n e T h e r a p y (1 9 9 9) 1 0 : 1 0 3 1 - 1 0 3 9) 、 W a n g e t a l . (M e t h o d s M o l . B i o l . (2 0 1 1) 8 0 7 : 3 6 1 - 4 0 4) 、 G r i m m (M e t h o d s (2 0 0 2) 2 8 (2) : 1 4 6 - 1 5 7) に記載されており、昆虫細胞システムは、 U r a b e e t a l (H u m a n G e n e T h e r a p y (2 0 0 2) 1 3 : 1 9 3 5 - 1 9 4 3) 、 K o h l b r e n n e r e t a l (M o l e c u l a r T h e r a p y (2 0 0 5) 1 2 (6) : 1 2 1 7 - 1 2 2 5) 、 国際特許公開 W O 2 0 0 7 / 0 4 6 7 0 3 、 国際特許公開 W O 2 0 0 7 / 1 4 8 9 7 1 、 国際特許公開 W O 2 0 0 9 / 0 1 4 4 4 5 、 国際特許公開 W O 2 0 0 9 / 1 0 4 9 6 4 、 国際特許公開 W O 2 0 0 9 / 1 5 4 4 5 2 、 国際特許公開 W O 2 0 1 1 / 1 1 2 0 8 9 、 国際特許公開 W O 2 0 1 3 / 0 3 6 1 1 8 、 米国特許第 6 , 7 2 3 , 5 5 1 B 号に基づき、これらは参照により本明細書に組み込まれる。要約すると、本方法は、概して、(a) 宿主細胞への r A A V ゲノム構築物の導入、(b) 宿主細胞への A A V ヘルパー構築物の導入、ここでヘルパー構築物は、野生型 r A A V ゲノムから欠失したウイルス機能を含み、及び(c) 宿主細胞へのヘルパーウイルス構築物の導入を伴い得る。 r A A V ベクターへの r A A V ゲノムの複製及びパッケージングを達成するためには、 r A A V ベクター複製及びパッケージングのための全ての機能が存在する必要がある。宿主細胞への導入は、標準的な分子生物学技術を使用して行うことができ、同時にまたは連続して行うことができる。最後に、宿主細胞を培養して r A A V ベクターを生成し、これを次いで、 C s C l 勾配 (X i a o e t a l . 1 9 9 6 , J . V i r o l . 7 0 : 8 0 9 8 - 8 1 0 8) またはイオジキサノール精製などの標準的な技術を使用して精製する。精製された r A A V ベクターは、次いで、典型的には、本方法において使用する準備が整う。 10^{12} 粒子 / m l を超える高力価及び高純度（検出可能なヘルパー及び野生型ウイルスを含まない）を達成することができる（例えば、 C l a r k e t a l . 上掲及び F l o t t e e t a l . 1 9 9 5 , G e n e T h e r . 2 : 2 9 - 3 7 を参照されたい）。 I T R 領域間の r A A V ベクターへと挿入される導入遺伝子の合計サイズは、一般的に、5 キロベース (k b) より小さいサイズである。

【 0 0 5 4 】

本発明の文脈において、キャプシドタンパク質外殻は、(i) 目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列及び(i i) 少なくとも1つの A A V I T R 配列を含む、 r A A V ゲノムとは異なる血清型のものであり得る。ゆえに、本発明の r A A V ゲノムは、本発明のキャプシドタンパク質外殻、すなわち、正二十面体キャプシドタンパク質によってキャプシド化され得、これは本発明に従うキャプシドタンパク質 (V P 1 、 V P 2 、 及び/または V P 3) 、例えば、本発明に従う A A V キャプシドタンパク質の変異体を含み、一方でその r A A V ベクターに含有される I T R 配列は、例えば A A V 2 または A A V 5 を含む、上記の A A V 血清型のいずれかであり得る。一実施形態では、 r A A V ビリオンに存在する r A A V ゲノムまたは I T R は、 A A V 血清型 2 または A A V 血清型 5 または A A V 血清型 8 に由来する。 A A V 5 及び他の A A V 血清型の完全なゲノムが配列決定さ

れており (Chiorini et al., 1999, J. of Virology Vol. 73, No. 2, p1309-1319)、AAV5のヌクレオチド配列はGenBankにて入手可能である (アクセッション番号AF085716)。ゆえに、AAV2及びAAV5のITRヌクレオチド配列は、当業者にとって容易に入手可能である。AAV2の完全なゲノムは、NCBI (NCBI参照配列NC_001401.2)にて入手可能である。それらは、例として、例えば、Applied Biosystems Inc. (Fosters, CA, USA)によって供給されるようなオリゴヌクレオチド合成装置を使用して当該技術分野で公知の化学合成によって、または標準的な分子生物学技術によって、クローン化または作成することができる。

【0055】

あるいは、または別の実施形態と組み合わせて、本発明のさらなる好ましい実施形態では、rAAVベクターは、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0056】

「導入遺伝子」または「目的の遺伝子産物」という用語は、本明細書では互換可能に使用され、AAV核酸配列に関して非天然の核酸を指す。それらは、細胞または生物に導入することができるポリヌクレオチドを指すために使用される。目的の遺伝子産物には、任意のポリヌクレオチド、例えばポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子、阻害性ポリヌクレオチドへと転写されるポリヌクレオチド、または転写されない (例えば、転写を駆動するプロモーターなどの発現制御エレメントを欠く) ポリヌクレオチドが含まれる。本発明の目的の遺伝子産物は、それぞれが異なるか、または異なる治療分子をコードする、少なくとも2つのヌクレオチド配列を含み得る。少なくとも2つの異なるヌクレオチド配列は、IRES (内部リボソーム進入部位) エレメントによって連結され、単一のプロモーターの制御下でバイシストロン性転写物を提供し得る。好適なIRESエレメントは、例えば、Hsieh et al. (1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 910-917) に記載されている。さらに、異なる (治療用) ポリペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも2つの異なるヌクレオチド配列は、ウイルス2A配列によって連結されて、単一のプロモーターから両方の導入遺伝子を効率的に発現させ得る。2A配列の例としては、口蹄疫ウイルス、ウマ鼻炎Aウイルス、ゾーシー・アシグナウイルス (Thosea asigna) ウイルス、ブタテスクウイルス-1 (Kim et al., PLoS One (2011) 6(4): e18556) からの配列が挙げられる。目的の遺伝子産物は、好ましくは、rAAVゲノム内またはITR配列間に挿入される。目的の遺伝子産物はまた、コード配列及び3'終結配列に作動可能に連結したプロモーターまたは転写調節配列などの発現調節エレメントを含む発現構築物であってもよい。目的の遺伝子産物は、欠損しているものを置換または補足する機能性突然変異対立遺伝子であることができる。遺伝子治療はまた、本質的に阻害性である、すなわち、望ましくないまたは異常な (例えば、病原性) 遺伝子またはタンパク質などの内因性または外因性遺伝子またはタンパク質の発現、活性または機能を、阻害、低減または低下させる導入遺伝子の挿入も含む。そのような導入遺伝子は、外因性であり得る。外因性分子または配列は、処置されるべき細胞、組織及び/または個体において通常は発生しない分子または配列であると理解される。後天性疾患及び先天性疾患の両方が遺伝子治療に適している。

【0057】

「遺伝子」または「コード配列」は、特定のタンパク質を「コードする」DNAまたはRNA領域を指す。コード配列は、プロモーターなどの適切な調節領域の制御下に置かれたとき、ポリペプチドへと転写 (DNA) 及び翻訳 (RNA) される。遺伝子は、いくつかの作動可能に連結したフラグメント、例えばプロモーター、5'リーダー配列、イントロン、コード配列及び3'非翻訳配列を含み得、これはポリアデニル化部位またはシグナル配列を含む。キメラ遺伝子または組換え遺伝子は、例えば、転写されたDNA領域の一部または全部に本来はプロモーターが結合しない遺伝子のような、自然界には通常見出されない遺伝子である。「遺伝子の発現」は、遺伝子がRNAに転写される及び/または活性タ

10

20

30

40

50

ンパク質に翻訳されるプロセスを指す。

【0058】

本明細書で使用する場合、「プロモーター」または「転写調節配列」という用語は、1つまたは複数のコード配列の転写を制御するように機能し、コード配列の転写開始部位の転写方向に対して上流に位置する核酸フラグメントを指し、限定されるものではないが、転写因子結合部位、抑制タンパク質結合部位及び活性化タンパク質結合部位、ならびにプロモーターからの転写量を直接的にまたは間接的に調節することが当業者に知られている他の任意のヌクレオチド配列を含む、DNA依存性RNAポリメラーゼ結合部位、転写開始部位、及び任意の他のDNA配列の存在によって構造的に同定される。「構造的」プロモーターは、ほとんどの生理学的条件下及び発生学的条件下で、ほとんどの組織において活性であるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、例えば、化学誘引物質の適用により生理学的または発生学的に調節されるプロモーターである。好ましい誘導性プロモーターは、炎症時に誘導性であるNF- κ B応答性プロモーターである。「組織特異的」プロモーターは、特定のタイプの組織または細胞において優先的に活性である。適切なプロモーター配列の選択は、一般に、DNAセグメントの発現のために選択された宿主細胞に依存する。本発明のrAAV及び/または導入遺伝子内の好ましいプロモーター配列は、リウマチ様滑膜の細胞、例えば内膜マクロファージ及び/またはFLS及び/または他の滑膜細胞、例えば、限定されないが、T細胞において発現を付与するプロモーターである。好ましいプロモーターは、例えば、滑膜細胞で発現することが知られている遺伝子のプロモーター、例えばCMVプロモーター、IL-6遺伝子のプロモーターもしくはSV40プロモーター、または本明細書で先に同定したNF- κ B誘導性プロモーターなどであり、当業者により容易に決定される。あるいは、導入遺伝子は、効率的な全身発現を可能にするプロモーターに作動可能に連結される。好適なプロモーター配列は、CMVプロモーター、CBA（ニワトリベータアクチン）、または肝臓特異的プロモーター、例えばヒトアルファ-1抗トリプシン（hAAT）またはTBG（チロキシン結合グロブリン）である。好ましくは、rAAV及び/または導入遺伝子内のプロモーターは、ステロイド誘導性プロモーターではない。より好ましくは、rAAV及び/または導入遺伝子内のプロモーターは、デキサメタゾン誘導性プロモーターではない。

【0059】

本明細書で使用する場合、「作動可能に連結」という用語は、機能的関係におけるポリヌクレオチド（またはポリペプチド）エレメントの連結を指す。核酸は、別の核酸配列との機能的関係に置かれたとき、「作動可能に連結」している。例えば、転写調節配列は、コード配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結している。「作動可能に連結」しているということは、連結したDNA配列が典型的には連続しており、必要であれば2つのタンパク質コード領域の連結が連続しており、リーディングフレーム内に存在することを意味する。

【0060】

「目的の遺伝子産物」は、「治療用ポリペプチド」または「治療用タンパク質」であることができ、個体に対して有益な効果を有することができるポリペプチドまたはタンパク質として本明細書において理解されるべきであり、好ましくは、前記個体はヒトであり、より好ましくは、前記ヒトは疾患に罹患している。このような治療用ポリペプチドは、酵素、補因子、サイトカイン、抗体、成長因子、ホルモン及び抗炎症性タンパク質からなる群から選択され得るが、これらに限定されない。

【0061】

あるいは、または別の実施形態と組み合わせ、本発明のさらなる好ましい実施形態では、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、2つのAAV ITR配列の間に配置される。あるいは、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、2つのAAV ITR配列に隣接している、すなわち、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列のいずれかの末端に1つのITRがある。

【0062】

10

20

30

40

50

あるいは、または別の実施形態と組み合わせ、本発明のさらなる好ましい実施形態では、目的の遺伝子産物は、関節炎疾患に関連する症状を、処置、予防または抑制し、好ましくは、目的の遺伝子産物は、インターロイキン、免疫調節剤、抗体、shRNA、miRNA、成長因子、プロテアーゼ、ヌクレオチダーゼ/ヌクレオシダーゼ、ペプチド、プロテアーゼ阻害剤、阻害剤、酵素及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくは、目的の遺伝子産物は、CD39、CD73及びIFN- γ のうち少なくとも1つである。これらの例は、インターロイキン1(IL-1)阻害剤(例えば、アナキニラ、カナキヌマブ、リロナセプト)、腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)阻害剤(例えば、エタネルセプト、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルチリズマブペゴル、ゴリムマブ)、IL-1受容体アンタゴニスト、可溶性IL-1受容体、IL-17阻害剤(例えば、セクキヌマブ、プロダルマブ、イキセキズマブ、IL-12/IL-23阻害剤(ウステキヌマブ、リサンキズマブ、グセルクマブ、チルドラキズマブ)、T細胞共刺激阻害剤(例えば、アバタセプト)、B細胞枯渇剤及び阻害剤(例えば、リツキシマブ、ベリムマブ、イナルマブ、タバルマブ)、IL-15阻害剤(例えば、AMG-714)、IL-22阻害剤(例えば、フェザクニマブ)、GM-CSFの阻害剤(レンジルマブ、ナミルマブ)インスリン様成長因子(IGF-1)、線維芽細胞成長因子(FGF)(例えば、rhFGF-18/スプリフェルミン)、核因子カッパ- β リガンドの受容体活性化因子(RANKL)阻害剤(例えば、デノスマブ)、補体5a阻害剤(例えば、C5aR-151)、骨形成タンパク質ファミリーメンバー(BMP)、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- β)、増殖分化因子ファミリー(GDF)、インターロイキン-18阻害剤(例えば、タデキニグアルファ/IL-18結合タンパク質)、IL-2阻害剤(例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブ)、可溶性TNF α (sTNF α)受容体p55またはsTNF α 受容体p75、IgGと融合したsTNF α 受容体、TNF α 受容体p55の阻害剤、sTNF α 受容体p75の阻害剤、ドミナントネガティブI β キナーゼ(dn-IKK- β)、インターロイキン4(IL-4)、インターロイキン10(IL-10)(F8IL10/デカビル(Dekavil))、インターロイキン-13(IL-13)、インターフェロンベータ(IFN- β)、MMPファミリーの組織阻害剤(TIMP)、プラスミノゲン活性化阻害剤(PAI)、セリンプロテアーゼ阻害剤(セルピン)、シグナル伝達分子/転写因子(例えば、SMAD、Sox9、IkB)、細胞外マトリックス成分(例えば、コラーゲン、軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)、プロテオグリカン、エラスチン)、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、分化抗原群39(CD39)及び分化抗原群73(CD73)、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、ならびにそれらの組み合わせである。

【0063】

本発明の全ての実施形態において使用するための機能的なゲノム編集システムは、当業者に公知であり、以下：転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN、Gaj et al. (2013) Trends Biotechnol. 31(7):397-405)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN、Gaj et al. (2013)上記)、I-SceIなどのメガヌクレアーゼ(Arnould et al. (2007) J Mol Biol 371(1):49-65; Takeuchi et al. (2011) PNAS USA 108(32):13077-13082)、RNA誘導型ヌクレアーゼ系、例えばCRISPR/Cas(Mali et al. (2013) Nat methods 10(10):957-963; Mali et al. (2013) Nat Biotechnol 31(9):833-838; Cong et al. (2013) Science 339(6121):819-823)及びCRISPR/Cpf1(Zetsche et al. (2015) Cell 163(3):759-771)、三重鎖形成分子、合成ポリアミドならびにデザイナージンクフィンガータンパク質(Uil et al. (2003) Nucleic Acids Res 31(21):6064-6078)を含む。機能性ゲノム編集システムは、ヌクレアーゼを使用して、ゲノム内の所望の位置にて部位特異的二本鎖切断を作製する。誘導された二本鎖切断は

10

20

30

40

50

、非相同末端結合または相同組換えを通して修復される。結果として、標的とする突然変異が得られる。遺伝子のごく一部が改変される必要がある場合、完全なコード配列及び調節配列が r A A V ビリオンに含まれている必要がないため、これらの方法のいずれかによって、欠損遺伝子（疾患または障害の原因となる）を正常な対立遺伝子に、その本来の位置にて置き換えることは有利である。部分的に置換された遺伝子の発現はまた、ビリオンによって運ばれる完全な遺伝子よりも正常な細胞生物学と一致すると考えられる。好ましい遺伝子編集システムは、C R I S P R（C R I S P R / C p f 1 及び C R I S P R - C a s を含む）であり、それは他の方法よりも迅速及び安価だからである。主要な利点としてはまた、C R I S P R は、C R I S P R シングルガイド RNA を使用して、簡単に転用して異なる DNA 配列を標的とすることができることである。ゆえに、あるいは、または別の実施形態と組み合わせ、本発明のさらなる好ましい実施形態では、r A A V ゲノムは、(i) 少なくとも 1 つのガイド RNA (g R N A) をコードする配列を含むポリヌクレオチド、ここで、ガイド RNA は、ゲノム内の標的ポリヌクレオチド配列（複数可）に実質的に相補的 - 好ましくは相補的 - である、及び (i i) ヌクレアーゼをコードする配列を含むポリヌクレオチドのうち少なくとも 1 つを含み、ヌクレアーゼは、ガイド RNA とリボヌクレアーゼ複合体を形成し、リボヌクレアーゼ複合体は、ゲノム内で部位特異的二本鎖 DNA 切断 (D S D B) を作成する。

【 0 0 6 4 】

第二の態様では、本発明は、関節炎疾患に関連する症状の処置、予防または抑制において使用するための r A A V 組成物に関し、該 r A A V 組成物は、本発明の r A A V ビリオンならびに医薬的に許容可能な担体、希釈剤、可溶化剤、充填剤、防腐剤及び / または賦形剤、好ましくは医薬的に許容可能な担体を含む。そのような医薬的に許容可能な担体、希釈剤、可溶化剤、充填剤、防腐剤及び / または賦形剤は、例えば、Remington : The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD : Lippincott Williams & Wilkins, 2000に見出され得る。任意の好適な医薬的に許容可能な担体、希釈剤、可溶化剤、充填剤、防腐剤及び / または賦形剤を本組成物において使用することができる（例えば、Remington : The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997を参照されたい）。好ましい医薬形態は、滅菌生理食塩水、デキストロース溶液、もしくは緩衝溶液、または他の医薬的に許容可能な滅菌液体と組み合わせられているだろう。あるいは、例えば、マイクロキャリアーズなどの固体担体を使用してもよい。

【 0 0 6 5 】

医薬組成物は、典型的には、製造及び保管の条件下で滅菌及び安定である。医薬組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度を収容するのに好適な他の秩序構造として製剤化され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びその好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であってよい。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物内に含むことが好ましいだろう。注射可能な組成物の持続的吸収は、組成物内に、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを含むことによって、もたすことができる。パルポウイルスビリオンは、ポーラスとして、または制御放出製剤にて、例えば、徐放性ポリマー、またはインプラント及びマイクロカプセル化送達システムを含む、急速な放出から化合物を保護することになる他の担体を含む組成物にて、投与することができる。生分解性、生体適合性のポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸、及びポリ乳酸、ポリグリコールコポリマー (P L G) を例えば使用してよい。本明細書

10

20

30

40

50

で使用する場合、「医薬的に許容可能な担体」または「賦形剤」は、好ましくは、生理学的に適合性のある、あらゆる及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤などを含む。医薬的に許容可能な担体には、滅菌水溶液または分散液、及び滅菌注射溶液または分散液を即時調製するための滅菌粉末が含まれる。医薬的に活性な物質に関するこのような媒体及び作用物質の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来の媒体または作用物質が本活性化化合物と不適合である場合を除き、本発明の医薬組成物におけるその使用が企図される。

【0066】

投与の容易性及び投薬量の均一性のために、非経口組成物を単位剤形で製剤化することが有利であり得る。本明細書で使用する場合、「単位剤形」は、処置されるべき対象のための単位の投薬として適した、物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要とされる医薬担体を伴って所望の治療効果をもたらすように算出された所定量の活性化化合物を含有する。本発明の単位剤形に関する仕様は、活性化化合物の固有の特徴及び達成されるべき特定の治療効果によって、ならびに個体の状態の処置のためにかかる活性化化合物を配合する技術分野に固有の制限によって指示され得る。

10

【0067】

補助的な活性成分もまた、本発明の医薬組成物内に組み込むことができる。追加の治療薬の同時投与に関するガイダンスは、例えば、Canadian Pharmacists AssociationのCompendium of Pharmaceutical and Specialties (CPS)に見出され得る。

20

【0068】

一実施形態では、rAAV組成物は、空の粒子（すなわち、キャプシドのみの粒子、ゆえに、rAAVゲノムを含まない）をさらに含む。それゆえ、あるいは、または別の実施形態と組み合わせると、本発明のさらなる実施形態では、本発明のrAAV組成物は、空キャプシドを、少なくとも1:1、より好ましくは少なくとも5:1、さらにより好ましくは少なくとも10:1の空キャプシド対rAAVビリオンの比率にてさらに含む。rAAV組成物は、上で定義するようなrAAVビリオンならびに、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO2016/055437で定義された、及びAalbers et al. (2017) Hum. Gene Ther. 28(2):168-178に記載されるような空キャプシドを含むことができる。空キャプシドは、本発明の組成物のrAAV導入遺伝子ベクターと比較して、同じ血清型または異なる血清型のものであり得る。好ましくは、空キャプシドは、rAAVビリオンと同じ血清型のものである。そのようなrAAV組成物内で、空キャプシド及びrAAVビリオンのキャプシドは、本発明の修飾キャプシドタンパク質、好ましくは同じ型の修飾キャプシドタンパク質を含み得る。しかしながら、空キャプシドが、rAAVビリオンの修飾キャプシドタンパク質と比較して、異なる血清型を有するまたは異って修飾されたキャプシドタンパク質である、rAAV組成物も包含される。空キャプシドが、血清型の混合物、例えば、限定されないが、AAV2及びAAV5キャプシドの混合物を有する、rAAV組成物がさらに包含される。本発明者らは、有意な量の空キャプシドと混合されたrAAVビリオンの関節内投与後、関節における導入遺伝子発現の増加効果を報告する。好ましくは、rAAVビリオン及び空キャプシドでは、少なくとも1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、15:1、20:1、50:1、100:1または1000:1、好ましくは少なくとも5:1の空キャプシド対rAAVビリオンの比率（すなわち、空キャプシドの量は、rAAV導入遺伝子ベクターの量の少なくとも5倍である）にて組成物内に存在する。好ましくは、前記組成物は、rAAVビリオン及び空キャプシドを、最大で10000:1、5000:1、4000:1、3000:1、2000:1、1000:1、500:1、400:1、300:1、200:1、100:1、90:1、80:1、70:1、60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、15:1、10:1または5:1、好ましくは最大で1000:1の空キャプシド対rAAV導入遺伝子ベクターの比率にて含む。好ましくは、前記組成物は、rAAVビリオン及び空キャプシドを、1:1~100:1、

30

40

50

2 : 1 ~ 100 : 1、5 : 1 ~ 100 : 1、1 : 1 ~ 20 : 1、2 : 1 ~ 20 : 1の間、または好ましくは5 : 1 ~ 20 : 1の間の空キャプシド対rAAVビリオンの比率にて含む。

【0069】

rAAVビリオン及び空キャプシドが単一の組成物内に存在する実施形態を、本明細書内上記で提供する。また、本発明には、rAAVビリオン及び空キャプシドが（少なくとも2つ以上の）分離した、別個の組成物内に存在する代替の実施形態も包含される。この代替の実施形態では、rAAVビリオン及び空キャプシドは、時間（例えば、連続して）及び/または局所性において分離して投与することができ、ここで、局所性は投与部位として理解されたい。さらに、rAAVビリオン及び空キャプシドは、同時に、例えば、実質的に同じタイミングで、任意選択で分離した場所にて、投与されることができる。

10

【0070】

第三の態様では、本発明は、関節炎疾患の処置もしくは予防において使用するためまたは関節炎疾患に関連する症状の処置もしくは予防において使用するためのrAAV組成物及び免疫抑制剤に関し、rAAV組成物は上記に定義した通りであり、処置または予防は、個体へのrAAV組成物の投与及び免疫抑制剤の投与を含む。参照により本明細書に組み込まれる、WO2016/055437は、対象が免疫抑制剤とrAAVビリオンの両方で処置されたとき、AAV導入遺伝子発現に対する免疫抑制剤の増加効果を開示している。さらに、WO2016/055437は、rAAV導入遺伝子発現に対する空のベクターを伴う免疫抑制剤の驚くべき相乗効果を開示している。一実施形態では、免疫抑制剤は、rAAV組成物とは分離して適用され、分離とは、場所及び/または時間において分離することを意味する。そのような実施形態では、免疫抑制剤及びrAAV組成物は、分離した及び別個の組成物内に存在し得る。免疫抑制剤、rAAVビリオン及び任意選択で空のベクターは、さらにはそれぞれが、分離した、別個の組成物内に存在し得る。別の実施形態では、免疫抑制剤及びrAAV組成物は、単一の組成物内に存在し得る。さらなる実施形態では、rAAVビリオン及び免疫抑制剤は、単一の組成物内に存在し、好ましくは、この組成物は、空キャプシドを含む分離した組成物と一緒に処置において使用される。なおもさらなる実施形態では、免疫抑制剤及び空キャプシドは、単一の組成物内に存在し、好ましくは、この組成物は、rAAVビリオンを含む分離した組成物と一緒に処置において使用される。それゆえ、本発明は、本明細書に定義するような空キャプシド及び免疫抑制剤を含む組成物、本明細書に定義するようなrAAVビリオン及び免疫抑制剤を含む組成物、ならびに本明細書に定義するようなrAAV組成物及び免疫抑制剤を含む組成物も提供する。

20

30

【0071】

好ましくは、本発明で使用するための免疫抑制剤は、自然免疫細胞阻害剤、好ましくはマクロファージ阻害剤である。本明細書では、自然免疫細胞は、好中球、マクロファージ、単球、好酸球、好塩基球、または樹状細胞として定義し、外来物質に対する炎症反応に関与する可能性がある。自然免疫細胞阻害剤は、本明細書では、自然免疫細胞活性及び/または自然免疫細胞数の低減をもたらす作用物質として定義する。マクロファージ阻害剤は、本明細書では、マクロファージ活性及び/またはマクロファージ数の低減をもたらす作用物質として定義する。「マクロファージ」は、本明細書では、食作用と呼ばれるプロセスにおいて細胞デブリ、外来物質、微生物、及び癌細胞を貪食して消化する自然免疫細胞として理解される。好ましくは、本発明の自然免疫細胞阻害剤またはマクロファージ阻害剤は、処置前の自然免疫細胞またはマクロファージの初期の数または活性と比較して、自然免疫細胞またはマクロファージの数または活性の少なくとも1、2、5、10、15、20、25、30、35、45、55、65、75、85、95%または好ましくは100%の減少をもたらす。自然免疫細胞またはマクロファージの活性及び/または数は、当業者に公知の任意の好適なアッセイ、例えば限定されないが、Ferrari et al. (Journal of Immunological Methods, 131 (1990) 165 - 172) に記載されるようなin vitroでマクロファージ細胞傷

40

50

害活性を試験するための MTT (3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウムブロミド) 比色アッセイによって、サイトカインレベル (例えば、CCL2、TNF) の測定によって、組織学的及び組織化学的検出方法によって、例えば CD68 標識によって、または Yi - Xiang J . Wang (Quant . Imaging Med Surg (2011) 1 : 35 - 40) によって概説されている、好ましくは SPIO の静脈内投与後の、マクロファージによる超常磁性酸化鉄 (SPIO) 取り込みの *in vivo* での磁気共鳴画像 (MRI) 検出によって、検出することができる。検出は、*in vitro* または *in vivo* のいずれかであり得る。好ましくは、*in vivo* 検出は、動物モデル、好ましくはラットまたはマウスモデルにおけるものである。

10

【0072】

好ましくは、免疫抑制剤は、グルココルチコイド及び/またはビスホスホネート、好ましくはリポソームビスホスホネートである。グルココルチコイドの特定の非限定的な例は、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、ベクロメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、酢酸デオキシコルチコステロン及びアルドステロンである。好ましくは、免疫抑制剤は、トリアムシノロンである。ビスホスホネートの特定の非限定的な例は、エチドロネート、クロドロネート、チルドロネート、パミドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、アレンドロネート、イバンドロネート、リセドロネート及びゾレドロネートである。好ましくは、ビスホスホネートは、リポソーム封入ビスホスホネートまたはリポソームビスホスホネート、好ましくはリポソームクロドロネートである。好ましくは、グルココルチコイドはデキサメタゾンではない。本発明の炎症性またはマクロファージ阻害剤は、グルココルチコイド及び/またはビスホスホネートに限定されないことが理解されたい。例えば、本発明の炎症性またはマクロファージ阻害剤は、炎症性またはマクロファージ枯渇抗体、例えば抗 F4 / 80 抗体であることもできる。好ましくは、このような抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。本発明で使用されるさらなる関連免疫抑制剤は、細胞分裂阻害薬 (例えば、アルキル化剤及び/または代謝拮抗剤、例えばメトトレキサート)、プリン作動性シグナル伝達経路を修飾する薬剤 (例えば、メトトレキサート、アデノシン類似体、アデノシン受容体アンタゴニストまたはアゴニスト)、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID、例えば、イブプロフェン、ジクロフェナク、メロキシカム、ナプロキセン、アセチルサリチル酸)、生物学的製剤、例えば TNF ブロッカー (例えば、インフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ)、IL - 6 ブロッカー (例えば、トシリズマブ)、IL - 2 ブロッカー (例えば、バシリキシマブ、ダクリズマブ)、IL - 1 ブロッカー (例えば、アナキンラ、リロナセプト、カナキヌマブ)、IL - 17 (セクキヌマブ、プロダルマブ、イクセキヌマブ)、抗 IL - 12 / IL - 23 (ウステキヌマブ)、PDE 4 阻害剤 (アプレミラスト) ムロモナブ、アバタセプト、及び/もしくはリツキシマブ、ならびに/または他の化合物、例えばヒドロキシクロロキン、クロロキン、レフルノミド、スルファサラジン、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、金塩、mTOR 阻害剤 (例えば、ラバマイシン / シロリムス、エベロリムス) 及びペニシラミンである。

20

30

40

【0073】

好ましくは、rAAV 組成物及び/または空キャプシドを含む組成物及び/または免疫抑制剤を含む組成物は、本明細書の他の箇所定義するような医薬的に許容可能な担体、希釈剤、可溶化剤、充填剤、防腐剤及び/または賦形剤をさらに含む。

【0074】

好ましくは、本発明に従う遺伝子治療は、rAAV 組成物内に存在するか、または分離した別個の組成物に含まれる、すなわち rAAV 組成物とは分離し別個である、本明細書に定義するような免疫抑制剤の投与をさらに含む。投与時に、本発明の rAAV 組成物及び/または空キャプシド及び/または免疫抑制剤は、個体、前記個体の細胞、組織または臓器、好ましくは本明細書に定義するような状態または疾患に罹患している個体に送達さ

50

れる。好ましくは、r A A V 組成物及び免疫抑制剤は、同時に投与される。同時投与は、本明細書では、多かれ少なかれ同時に、好ましくは15分、30分、1時間、2時間、3時間、12時間または24時間以上時間が離れない、好ましくは15分以上時間が離れない、投与として理解されたい。別の実施形態では、r A A V 組成物及び免疫抑制剤は、連続して投与され、好ましくは、免疫抑制剤は、r A A V 組成物の前に投与される。好ましくは、免疫抑制剤は、r A A V 組成物の投与の少なくとも1時間、3時間、12時間、24時間、2日、4日または1週間前に投与される。r A A V ビリオン及び空キャプシドが分離した組成物内に存在する場合、免疫抑制剤は同時に、または空キャプシドの少なくとも15分、1時間、2時間、3時間、1日、2日もしくは1週間前に投与され得、空キャプシドは同様に、同時に、またはr A A V ビリオンの少なくとも15分、1時間、2時間、3時間、1日、2日もしくは3日前に投与される。

10

【0075】

本明細書に定義する実施形態内では、免疫抑制剤は、繰り返して、すなわち、r A A V 組成物の前及び/またはこれと同時に投与され得る。本明細書で上記に示したように、好ましくは、r A A V 組成物は、有意な量の空キャプシドを含む。さらに、本発明は、r A A V 導入遺伝子ベクター及び空キャプシドの両方を、分離した、別個の組成物にて投与することを包含し、それらは、本発明の方法または使用において同時にまたは連続的に投与され得る。分離した組成物に含まれる場合、r A A V 導入遺伝子ベクター及び空キャプシドは、好ましくは同時に投与される。さらなる実施形態では、空キャプシドは、r A A V 導入遺伝子ベクター投与の、最大で3日、2日、1日、24時間、12時間、3時間、2時間、1時間、30分、15分または5分、好ましくは最大で24時間前に投与される。さらに、分離した組成物に含まれる場合、r A A V 導入遺伝子ベクター及び空キャプシドは、好ましくは同じ部位にて投与される。

20

【0076】

免疫抑制剤の用量は、免疫抑制剤の種類に依存する。有効な投与量は当業者に公知である。トリアムシノロンの好ましい治療上有効な投与量は上記に示されている。リボソームクロドロネートの好ましい治療上有効な投与量は、好ましくは当業者に公知の治療有効量、例えば、好ましくは80~320mg/関節内用量、より好ましくは160mg/関節内用量である(Barrera et al. 2000, Arthritis & Rheumatism Vol 43(9), p1951-1959)。

30

【0077】

一般に、関節障害は関節症と呼ばれ、1つまたは複数の関節の炎症を伴う場合、その障害は関節炎と呼ばれる。大半の関節障害は関節炎を伴うが、しかしながら、体の外傷を原因とする関節の損傷は、典型的には、関節炎と呼ばない。本明細書で使用する場合、「関節炎疾患」という用語は、「関節炎」とも称され、本明細書では、1つまたは複数の関節の炎症を伴う関節障害の形態として定義する。現在、百を超えるさまざまな形態の関節炎があると推定されている。関節炎疾患は、本明細書では、「関節痛」または「関節疾患」を指すと理解される。好ましい実施形態では、関節炎疾患は、成人発症ステイル病、強直性脊椎炎、関節炎、腰痛、ベーチェット病、鈍的外傷、滑液包炎、ピロリン酸カルシウム沈着症(CPPD)、手根管症候群、軟骨軟化症膝蓋骨、慢性疲労症候群、複合性局所疼痛症候群、クリオピリン関連周期性症候群(CAPS)、変性椎間板疾患、股関節の発達異形成、エーラース-ダンロス、家族性地中海熱、線維筋痛症、第五病、巨細胞性動脈炎、痛風、ヘモクロマトーシス、感染性関節炎、炎症性関節炎、炎症性腸疾患、関節置換術、若年性関節炎、若年性皮膚筋炎(JD)、若年性特発性関節炎(JIA)、若年性関節リウマチ、若年性強皮症、川崎病、ループス、小児及び10代におけるループス、ライム病、混合性結合組織病、筋炎(多発性筋炎、皮膚筋炎を含む)、変形性関節症(OA)、骨粗しょう症、パジェット、パリンドロームリウマチ、膝蓋大腿痛症候群、小児リウマチ性疾患、小児SLE、リウマチ性多発筋痛症、偽痛風、乾癬性関節炎、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、ライター症候群、リウマチ熱、リウマチ、関節リウマチ、強皮症、敗血症性関節炎、シェーグレン病、脊柱管狭窄症、脊椎関節炎

40

50

、スティル病、全身若年性特発性関節炎、全身性ループスエリテマトーデス、小児及び10代における全身性ループスエリテマトーデス、全身性硬化症、側頭動脈炎、腱炎、血管炎、及びウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される。さらなる好ましい実施形態では、関節炎疾患は、関節リウマチ（RA）、若年性関節リウマチ、変形性関節症（OA）、痛風、偽痛風、脊椎関節炎（SpA）、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、敗血症性関節炎、関節炎、若年性特発性関節炎、鈍的外傷、関節置換術、スティル病からなる群から選択される。さらに好ましい実施形態では、関節炎疾患は、1つまたは複数の関節の炎症を伴う関節障害である。好ましくは、関節炎疾患は、関節リウマチ（RA）、若年性関節リウマチ、変形性関節症（OA）、痛風、偽痛風、脊椎関節炎（SpA）、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、敗血症性関節炎、関節炎、若年性特発性関節炎、及びスティル病からなる群から選択される。

10

【0078】

あるいは、または別の実施形態と組み合わせて、本発明のさらなる好ましい実施形態では、rAAVピリオンまたはrAAV組成物は、全身及び/または局所投与される。本発明のrAAV組成物及び/または空キャプシド及び/または免疫抑制剤は、当該技術分野で公知の好適な手段を使用して直接または間接的に投与されてよい。本発明の方法及び使用は、rAAV組成物及び/または空ベクター及び/または免疫抑制剤の、全身、局在もしくは局所、または任意の経路による、例えば、注射、注入、経口（例えば、摂取または吸入）、もしくは局所性（例えば、経皮）による送達及び投与を含む。例示的な投与及び送達経路には、静脈内（i.v.）、関節内、腹腔内（i.p.）、動脈内、筋肉内、非経口、皮下、胸膜内、局所、皮膚、皮内、経皮、非経口的、例えば、経粘膜、頭蓋内、脊髄内、経口（栄養）、粘膜、呼吸、鼻腔内、挿管、肺内、肺内注入、バツカル、舌下、血管内、髄腔内、体腔内、イオン導入、眼内、眼科的、光学的、腺内、臓器内、リンパ管内が含まれる。個体または前記個体の細胞、組織、臓器に、本発明のrAAV組成物及び/または空キャプシド及び/または免疫抑制剤を提供するための手段における改善は、これまでにすでに達成された進展を考慮して予想される。当然、そのような将来の改善を組み込んで、本発明に記載の効果を達成してよい。本発明のrAAV組成物及び/または空キャプシド及び/または免疫抑制剤を投与するとき、このような組み合わせ及び/または組成物は、送達方法に適合する溶液中に溶解することが好ましい。静脈内、皮下、筋肉内、髄腔内、関節内及び/または脳室内投与に関しては、溶液が生理食塩水であることが好ましい。免疫抑制剤が本発明のrAAV組成物内に存在する場合、免疫抑制剤は、rAAV組成物と同じ部位にて、すなわち、好ましくは上記に示すように局所性に投与される。免疫抑制剤がrAAV組成物とは異なる別個の組成物内に含まれる実施形態では、免疫抑制剤は全身性に、好ましくは筋肉内または静脈内に投与され得る。rAAV組成物はまた、局所性に、好ましくは本明細書に定義するようなマクロファージの実質的な数を含む身体の部位にて投与され得、免疫抑制剤は全身性に、好ましくは筋肉内または静脈内に投与される。また、本発明は、免疫抑制剤及びrAAV組成物が、別個の組成物内に存在する場合であっても、同じ部位にて、好ましくは局所性に、より好ましくは関節内に投与される実施形態も包含する。本明細書でさらに示されるように、そのような別個の組成物の投与は、同時または連続的のいずれかであってよい。本発明の好ましい実施形態では、rAAV組成物及び免疫抑制剤のうちの少なくとも1つは、局所投与される。より好ましくは、局所投与は、関節内投与である。「関節内注射」（「関節注射」または「関節内注射」としても知られる）は、本明細書では、関節への注射または注入として定義する。関節内注射は、典型的には、炎症を患う関節への抗炎症剤の投与に使用される。

20

30

40

【0079】

さらなる態様では、本発明は、本発明のrAAVピリオンならびに医薬的に許容可能な担体、希釈剤、可溶化剤、充填剤、防腐剤及び/または賦形剤、好ましくは本明細書に定義するような医薬的に許容可能な担体を含むrAAV組成物に関する。好ましい実施形態では、組成物は、本明細書に定義するような空キャプシド及び/または本明細書に定義するような免疫抑制剤を、さらに含む。

50

【 0 0 8 0 】

さらなる態様では、本発明は、関節炎疾患に関連する症状を処置する、予防する、または抑制する方法に関し、該方法は、有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に定義するような r A A V ビリオンまたは上記に定義するような r A A V 組成物を含む医薬品の関節内投与のステップを含む。

【 0 0 8 1 】

「治療有効量」は、所望の治療結果を達成するために必要な投与量及び期間にて有効な量を指す。治療有効量の核酸、核酸構築物、r A A V ビリオンまたは医薬組成物は、処置される対象の病状、年齢、性別、及び体重、ならびに核酸、核酸構築物、r A A V ビリオン、または医薬組成物が対象において所望の応答を誘発するための能力などの要因によって変動し得る。最適な治療応答をもたらすように、投与レジメンを調整してよい。治療有効量はまた、典型的に、核酸、核酸構築物、r A A V ビリオン、または医薬組成物の任意の毒性または有害効果を、治療上有益な効果が上回る量である。「予防有効量」は、所望の予防結果、例えば様々な状態の予防または阻害を達成するために必要な投与量及び期間にて有効な量を指す。予防用量は、疾患の発症前または初期にある対象において使用されてよく、予防有効量は、場合によっては治療有効量より多くても少なくてもよい。投与される投与量は、処置される対象の状態及びサイズ、ならびに治療製剤、処置の頻度及び投与経路に大きく依存し得る。用量、製剤、及び頻度を含む継続療法のレジメンは、初期応答及び臨床判断によって導かれ得る。

【 0 0 8 2 】

「対象」または「患者」という用語は、本明細書では互換可能に使用され、本発明の組成物及び/または r A A V を用いて処置可能な、ヒト種を含む、動物を指す。従って、「対象」または「患者」という用語には、ヒト、非ヒト霊長類、例えばチンパンジー、及び他の類人猿及びサル種、または任意の哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ウシなどが含まれるが、これらに限定されない。本発明の好ましい実施形態では、本発明に従う r A A V を用いて処置される対象は、哺乳動物、より好ましくはヒト、イヌ、ネコまたはウマ、最も好ましくはヒトである。

【 0 0 8 3 】

本明細書及びその請求項において、「含む (c o m p r i s e) 」という動詞及びその活用形は、非限定的な意味で使用され、この語の後に記載される事項を含むが、具体的に言及されない事項が除外されるわけではないことを意味する。加えて、不定冠詞「 a 」または「 a n 」による要素への言及は、要素が 1 つ及び 1 つのみ存在することを文脈が明確に要求しない限り、複数の要素が存在する可能性を排除しない。ゆえに、不定冠詞「 a 」または「 a n 」は、通常「少なくとも 1 つ」を意味する。

【 0 0 8 4 】

「およそ」または「約」という語は、数値に伴って使用されるとき(およそ 1 0、約 1 0)、好ましくは、その値が、所定の値 1 0 より、1 0 % 多いまたは少ない値であり得ることを意味する。

【 0 0 8 5 】

本明細書内で引用される全ての特許及び参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 8 6 】

以下の実施例は、例証目的で提示されるにすぎず、決して本発明の範囲を限定することを意図しない。

【 0 0 8 7 】

本発明を、添付の図面を参照して、以下により詳細に考察する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 8 】

【 図 1 A 】 H E K 2 9 3 T 細胞及び F L S 細胞でのキャプシド血清型のスクリーニング。黄色蛍光タンパク質 (Y F P) を発現する 7 種の突然変異キャプシド血清型 (及び A A V

10

20

30

40

50

5) を含有する粗溶解物を使用して、HEK293T細胞または(それぞれ異なるRA患者に由来する)3種の異なるFLS細胞株を形質導入した。72時間後(HEK293T)または6日後(FLS)、細胞を、フローサイトメトリーにより、YFPを発現している細胞の割合(%)に関してアッセイした。試料の凡例を、表2に示す。パネルAは、YFPを発現するHEK293T細胞の割合(%)を示す。

【図1B】HEK293T細胞及びFLS細胞でのキャプシド血清型のスクリーニング。黄色蛍光タンパク質(YFP)を発現する7種の突然変異キャプシド血清型(及びAAV5)を含有する粗溶解物を使用して、HEK293T細胞または(それぞれ異なるRA患者に由来する)3種の異なるFLS細胞株を形質導入した。72時間後(HEK293T)または6日後(FLS)、細胞を、フローサイトメトリーにより、YFPを発現している細胞の割合(%)に関してアッセイした。試料の凡例を、表2に示す。パネルBは、3種の異なるFLS細胞株におけるYFP発現細胞の割合(%)を示す。

10

【図1C】HEK293T細胞及びFLS細胞でのキャプシド血清型のスクリーニング。黄色蛍光タンパク質(YFP)を発現する7種の突然変異キャプシド血清型(及びAAV5)を含有する粗溶解物を使用して、HEK293T細胞または(それぞれ異なるRA患者に由来する)3種の異なるFLS細胞株を形質導入した。72時間後(HEK293T)または6日後(FLS)、細胞を、フローサイトメトリーにより、YFPを発現している細胞の割合(%)に関してアッセイした。試料の凡例を、表2に示す。パネルCは、HEK293T細胞における平均蛍光強度(MFI)を示す。

【図1D】HEK293T細胞及びFLS細胞でのキャプシド血清型のスクリーニング。黄色蛍光タンパク質(YFP)を発現する7種の突然変異キャプシド血清型(及びAAV5)を含有する粗溶解物を使用して、HEK293T細胞または(それぞれ異なるRA患者に由来する)3種の異なるFLS細胞株を形質導入した。72時間後(HEK293T)または6日後(FLS)、細胞を、フローサイトメトリーにより、YFPを発現している細胞の割合(%)に関してアッセイした。試料の凡例を、表2に示す。パネルDは、3種の異なるFLS細胞株(全ての細胞)におけるMFIを示す。

20

【図1E】HEK293T細胞及びFLS細胞でのキャプシド血清型のスクリーニング。黄色蛍光タンパク質(YFP)を発現する7種の突然変異キャプシド血清型(及びAAV5)を含有する粗溶解物を使用して、HEK293T細胞または(それぞれ異なるRA患者に由来する)3種の異なるFLS細胞株を形質導入した。72時間後(HEK293T)または6日後(FLS)、細胞を、フローサイトメトリーにより、YFPを発現している細胞の割合(%)に関してアッセイした。試料の凡例を、表2に示す。パネルEは、3種の異なるFLS細胞株(陽性集団のみ)におけるMFIを示す。

30

【図2A】キャプシド突然変異体は、FLS細胞においてwtAAV5に対してルシフェラーゼ発現の増加を示す。YFP-Luc融合タンパク質を発現する精製AAV(4種の突然変異血清型またはAAV5)を使用して、異なるRA患者に由来する3種の異なるFLS細胞株:BB5498(FLS1)、BB5540(FLS2)及びBB7144(FLS3)を、2つのMOI(20000または100000rAAV粒子/細胞)を使用して形質導入した。4日後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ発現を測定した。データは、絶対ルシフェラーゼ発現値(RLU;白色棒)またはAAV5に対する増加倍数(黒色棒)として表示する。空白の棒は、ルシフェラーゼ(RLU)を示し、塗りつぶされた棒は、AAV5に対する「増加倍数」を示す。パネルAは、MOI20KでのFLS1を示す。

40

【図2B】キャプシド突然変異体は、FLS細胞においてwtAAV5に対してルシフェラーゼ発現の増加を示す。YFP-Luc融合タンパク質を発現する精製AAV(4種の突然変異血清型またはAAV5)を使用して、異なるRA患者に由来する3種の異なるFLS細胞株:BB5498(FLS1)、BB5540(FLS2)及びBB7144(FLS3)を、2つのMOI(20000または100000rAAV粒子/細胞)を使用して形質導入した。4日後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ発現を測定した。データは、絶対ルシフェラーゼ発現値(RLU;白色棒)またはAAV5に対する増加倍数(黒色

50

棒)として表示する。空白の棒は、ルシフェラーゼ(RLU)を示し、塗りつぶされた棒は、AAV5に対する「増加倍数」を示す。パネルBは、MOI100KでのFLS1を示す。

【図2C】キャプシド突然変異体は、FLS細胞においてwtAAV5に対してルシフェラーゼ発現の増加を示す。YFP-Luc融合タンパク質を発現する精製AAV(4種の突然変異血清型またはAAV5)を使用して、異なるRA患者に由来する3種の異なるFLS細胞株:BB5498(FLS1)、BB5540(FLS2)及びBB7144(FLS3)を、2つのMOI(20000または100000rAAV粒子/細胞)を使用して形質導入した。4日後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ発現を測定した。データは、絶対ルシフェラーゼ発現値(RLU;白色棒)またはAAV5に対する増加倍数(黒色棒)として表示する。空白の棒は、ルシフェラーゼ(RLU)を示し、塗りつぶされた棒は、AAV5に対する「増加倍数」を示す。パネルCは、MOI20KでのFLS2を示す。

10

【図2D】キャプシド突然変異体は、FLS細胞においてwtAAV5に対してルシフェラーゼ発現の増加を示す。YFP-Luc融合タンパク質を発現する精製AAV(4種の突然変異血清型またはAAV5)を使用して、異なるRA患者に由来する3種の異なるFLS細胞株:BB5498(FLS1)、BB5540(FLS2)及びBB7144(FLS3)を、2つのMOI(20000または100000rAAV粒子/細胞)を使用して形質導入した。4日後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ発現を測定した。データは、絶対ルシフェラーゼ発現値(RLU;白色棒)またはAAV5に対する増加倍数(黒色棒)として表示する。空白の棒は、ルシフェラーゼ(RLU)を示し、塗りつぶされた棒は、AAV5に対する「増加倍数」を示す。パネルDは、MOI100KでのFLS2を示す。

20

【図2E】キャプシド突然変異体は、FLS細胞においてwtAAV5に対してルシフェラーゼ発現の増加を示す。YFP-Luc融合タンパク質を発現する精製AAV(4種の突然変異血清型またはAAV5)を使用して、異なるRA患者に由来する3種の異なるFLS細胞株:BB5498(FLS1)、BB5540(FLS2)及びBB7144(FLS3)を、2つのMOI(20000または100000rAAV粒子/細胞)を使用して形質導入した。4日後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ発現を測定した。データは、絶対ルシフェラーゼ発現値(RLU;白色棒)またはAAV5に対する増加倍数(黒色棒)として表示する。空白の棒は、ルシフェラーゼ(RLU)を示し、塗りつぶされた棒は、AAV5に対する「増加倍数」を示す。パネルEは、MOI20KでのFLS3を示す。

30

【図2F】キャプシド突然変異体は、FLS細胞においてwtAAV5に対してルシフェラーゼ発現の増加を示す。YFP-Luc融合タンパク質を発現する精製AAV(4種の突然変異血清型またはAAV5)を使用して、異なるRA患者に由来する3種の異なるFLS細胞株:BB5498(FLS1)、BB5540(FLS2)及びBB7144(FLS3)を、2つのMOI(20000または100000rAAV粒子/細胞)を使用して形質導入した。4日後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ発現を測定した。データは、絶対ルシフェラーゼ発現値(RLU;白色棒)またはAAV5に対する増加倍数(黒色棒)として表示する。空白の棒は、ルシフェラーゼ(RLU)を示し、塗りつぶされた棒は、AAV5に対する「増加倍数」を示す。パネルFは、MOI100KでのFLS3を示す。

40

【図2G】異なる実験では、RA患者に由来する3種の追加のFLS細胞株:BB4308(FLS4)、BX1592(FLS5)、BB4426(FLS6)を、ルシフェラーゼを発現するAAV(7種の突然変異血清型またはAAV5)を用いて、2つのMOI(10Kまたは100KrAAV粒子/細胞)を使用して、形質導入した。空白の棒は、ルシフェラーゼ発現(RLU)を示し、塗りつぶされた棒は、AAV5に対する「増加倍数」を示す。パネルGは、MOI10KでのFLS4を示す。

【図2H】異なる実験では、RA患者に由来する3種の追加のFLS細胞株:BB430

50

8 (F L S 4)、 B X 1 5 9 2 (F L S 5)、 B B 4 4 2 6 (F L S 6) を、ルシフェラーゼを発現する A A V (7 種 の 突 然 変 異 血 清 型 又 は A A V 5) を 用 いて、 2 つ の M O I (1 0 K 又 は 1 0 0 K r A A V 粒 子 / 細 胞) を 使 用 して、 形 質 導 入 した。 空 白 の 棒 は、 ルシフェラーゼ発現 (R L U) を 示 し、 塗 り つ ぶ さ れ た 棒 は、 A A V 5 に 対 す る 「 増 加 倍 数 」 を 示 す。 パネル H は、 M O I 1 0 0 K で の F L S 4 を 示 す。

【 図 2 I 】 異 なる 実 験 で は、 R A 患 者 に 由 来 す る 3 種 の 追 加 の F L S 細 胞 株 : B B 4 3 0 8 (F L S 4)、 B X 1 5 9 2 (F L S 5)、 B B 4 4 2 6 (F L S 6) を、ルシフェラーゼを発現する A A V (7 種 の 突 然 変 異 血 清 型 又 は A A V 5) を 用 いて、 2 つ の M O I (1 0 K 又 は 1 0 0 K r A A V 粒 子 / 細 胞) を 使 用 して、 形 質 導 入 した。 空 白 の 棒 は、 ルシフェラーゼ発現 (R L U) を 示 し、 塗 り つ ぶ さ れ た 棒 は、 A A V 5 に 対 す る 「 増 加 倍 数 」 を 示 す。 パネル I は、 M O I 1 0 K で の F L S 5 を 示 す。

10

【 図 2 J 】 異 なる 実 験 で は、 R A 患 者 に 由 来 す る 3 種 の 追 加 の F L S 細 胞 株 : B B 4 3 0 8 (F L S 4)、 B X 1 5 9 2 (F L S 5)、 B B 4 4 2 6 (F L S 6) を、ルシフェラーゼを発現する A A V (7 種 の 突 然 変 異 血 清 型 又 は A A V 5) を 用 いて、 2 つ の M O I (1 0 K 又 は 1 0 0 K r A A V 粒 子 / 細 胞) を 使 用 して、 形 質 導 入 した。 空 白 の 棒 は、 ルシフェラーゼ発現 (R L U) を 示 し、 塗 り つ ぶ さ れ た 棒 は、 A A V 5 に 対 す る 「 増 加 倍 数 」 を 示 す。 パネル J は、 M O I 1 0 0 K で の F L S 5 を 示 す。

【 図 2 K 】 異 なる 実 験 で は、 R A 患 者 に 由 来 す る 3 種 の 追 加 の F L S 細 胞 株 : B B 4 3 0 8 (F L S 4)、 B X 1 5 9 2 (F L S 5)、 B B 4 4 2 6 (F L S 6) を、ルシフェラーゼを発現する A A V (7 種 の 突 然 変 異 血 清 型 又 は A A V 5) を 用 いて、 2 つ の M O I (1 0 K 又 は 1 0 0 K r A A V 粒 子 / 細 胞) を 使 用 して、 形 質 導 入 した。 空 白 の 棒 は、 ルシフェラーゼ発現 (R L U) を 示 し、 塗 り つ ぶ さ れ た 棒 は、 A A V 5 に 対 す る 「 増 加 倍 数 」 を 示 す。 パネル K は、 M O I 1 0 K で の F L S 6 を 示 す。

20

【 図 2 L 】 異 なる 実 験 で は、 R A 患 者 に 由 来 す る 3 種 の 追 加 の F L S 細 胞 株 : B B 4 3 0 8 (F L S 4)、 B X 1 5 9 2 (F L S 5)、 B B 4 4 2 6 (F L S 6) を、ルシフェラーゼを発現する A A V (7 種 の 突 然 変 異 血 清 型 又 は A A V 5) を 用 いて、 2 つ の M O I (1 0 K 又 は 1 0 0 K r A A V 粒 子 / 細 胞) を 使 用 して、 形 質 導 入 した。 空 白 の 棒 は、 ルシフェラーゼ発現 (R L U) を 示 し、 塗 り つ ぶ さ れ た 棒 は、 A A V 5 に 対 す る 「 増 加 倍 数 」 を 示 す。 パネル L は、 M O I 1 0 0 K で の F L S 3 を 示 す。

【 図 2 M 】 7 種 の 突 然 変 異 血 清 型 又 は A A V 5 (M O I 1 0 0 K) の 形 質 導 入 有 効 性 を H E K 2 9 3 T 細 胞 に お い て も 評 価 した。 空 白 の 棒 は、 ルシフェラーゼ発現 (R L U) を 示 し、 塗 り つ ぶ さ れ た 棒 は、 A A V 5 に 対 す る 「 増 加 倍 数 」 を 示 す。

30

【 図 3 A 】 キャプシド突然変異体は、 *in vivo* で 遺 伝 子 発 現 の 増 加 を 呈 す る。 2 種 の キャプシド突然変異体 (A A V 9 - A 2 及 び A A V 7 - A 6) を、 疑 似 滑 膜 腔 モ デ ル を 使 用 して *w t* A A V 5 と 比 較 した。 ルシフェラーゼ発現ベクターを空気嚢形成後 0 日目に投与し、ルシフェラーゼ発現を形質導入後 3 日目にライブ動物のイメージング (I V I S) に より 測 定 した。 示 さ れ て い る デ ー タ は、 平 均 + S E M で の 空 気 嚢 に お け る ル ミ ネ セ ン ス (フ ォ ト ン / 秒 / 平 方 セ ン チ メ ー ト ル m^2 / ス テ ラ ジ ア ン) で あ る。

【 図 3 B 】 第 二 の 実 験 で は、 5 種 の 選 択 した キャプシド突然変異体 (A A V 1 - P 4、 A A V 7 - A 6、 A A V 9 - A 2、 A A V r h 1 0 - A 2、 A A V r h 1 0 - A 6) 及 び *w t* A A V 5 を マ ウ ス の 膝 関 節 に 注 入 した。 ルシフェラーゼ発現ベクターを 0 日目に注射し、投与後、指定の時点にてライブイメージング (I V I S) に より 発 現 を 測 定 した。 示 さ れ て い る デ ー タ は、 平 均 + S E M で の ル ミ ネ セ ン ス (フ ォ ト ン / 秒 / 平 方 セ ン チ メ ー ト ル m^2 / ス テ ラ ジ ア ン) (左 パ ネ ル) で あ る。 1 4 日 目 で *w t* A A V 5 に 対 し て * * P < 0 . 0 5、 * * * P < 0 . 0 1、 * * * * P < 0 . 0 0 0 0 1。

40

【 図 3 C 】 *w t* A A V 5 に 対 す る 増 加 倍 数。

【 図 4 】 M A F F T F F T - N S - I (v 7 . 2 1 5) に よ る C L U S T A L 形 式 の ア ラ イ メ ン ト。 ア ラ イ メ ン ト の 下 に は、 保 存 さ れ た 残 基 (*)、 及 び 非 保 存 的 な 突 然 変 異 () を 示 す キ ー が あ る。

【 図 5 】 M U S C L E (3 . 8) に よ る C L U S T A L マ ル チ プ ル 配 列 ア ラ イ メ ン ト。 ア

50

ライメントの下には、保存された残基（*）、保存的な突然変異（:）、半保存的な突然変異（.）、及び非保存的な突然変異（ ）を示すキーがある。

【図6】MAFFT FFT-NS-I (v7.215)によるインサートP4、A2、A6、P2、及びQR-P2（配列番号8～12）のCLUSTAL形式のアライメント。アライメントの下には、保存された残基（*）、及び非保存的な突然変異（ ）を示すキーがある。

【図7】MUSCLE (3.8)によるインサートP4、A2、A6、P2及びQR-P2（配列番号8～12）のCLUSTALマルチプル配列アライメント。アライメントの下には、保存された残基（*）、及び非保存的な突然変異（ ）を示すキーがある。

【0089】

配列表

表1は、配列番号と関連させた配列参照の説明を提供する。

【0090】

【表1】

表1：配列参照の説明

配列番号	血清型	修飾キャプシド／インサート／野生型
1	AAV1	修飾キャプシド
2	AAV2	修飾キャプシド
3	AAV7	修飾キャプシド
4	AAV9	修飾キャプシド
5	AAVrh10	修飾キャプシド
6	AAVrh10	修飾キャプシド
7	AAVDJ-QR	修飾キャプシド
8	インサートA2	インサート
9	インサートA6	インサート
10	インサートP2	インサート
11	インサートP4	インサート
12	インサートQR-P2	インサート
13	AAV1	野生型キャプシド
14	AAV2	野生型キャプシド
15	AAV7	野生型キャプシド
16	AAV9	野生型キャプシド
17	AAVrh10	野生型キャプシド
18	AAVDJ-QR	合成キャプシド
19	AAV5	野生型キャプシド

【実施例】

【0091】

実施例1

キャプシドライブラリーの初期スクリーニング

1.1.材料及び方法

91の異なるAAVキャプシド血清型からのAAVを含有する粗溶解物がスポットされた（その後乾燥された）96ウェルプレートを、ハイデルベルク大学のDirk Grimm及びKathleen Bornerから入手した。各ベクターは、CMVプロモーターによって駆動されるYFP導入遺伝子をコードした。FLSが関節における主要な標

的細胞であるため、(van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70:423-427にて説明されている通りに) 関節リウマチ患者 (RA-FLS) の関節から単離されたヒトFLSにおいて発現の増加を示す血清型について、AAVキャプシド突然変異体ライブラリーをスクリーニングした。RA-FLSを、スポットされたプレート (DMEM-Glutamax-I (Gibco、参照番号31966-021)、10% FBS (熱非働化 (HI) ウシ血清ゴールド、Gibco、参照番号A15-151)、10mM HEPES (Gibco、参照番号15630-056)、50 µg/ml ゲンタマイシン (Gibco、参照番号15710-049)、100 U/ml ペニシリン/100 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich、参照番号P0781) 上に直接プレATINGし (2500/ウェル、37 / 5% CO₂)、全てのウェルを、6日後に蛍光顕微鏡によりYFP発現に関して可視化した。

10

【0092】

1.2. 結果

RA患者由来のFLSにおけるキャプシド突然変異体対WT-AAV5の形質導入有効性。

91キャプシド突然変異体のスクリーニングにおいて、全体的な発現レベルは低かったが、本発明者らは、wtAAV5よりも高い発現を示す7種の異なる血清型を同定した：AAV9-A2、AAV7-A6、AAV1-P4、AAVDJ-QR-P2、AAVrh10-A6、AAVrh10-A2及びAAV2-P2 (アミノ酸配列配列番号1~7、wtAAV5配列番号19)。

20

【0093】

7種のベクター全ての粗溶解物を、3種の異なる患者FLS細胞株及びHEK293T細胞においてin vitro形質導入アッセイにて使用した (実施例2)。

【0094】

【表2】

表2：図1の試料凡例

試料	キャプシド血清型	インサート/修飾配列	インサート	VP1内の位置	配列番号
5	5	無し	無し	—	19
61	AAV1	GQSGNDVRS ANAQAA	P4	588~ 602	1
33	AAV9	GQRGNYSRG VDAQAA	A2	586~ 600	4
34	AAVrh 10	GQRGNYSRG VDAQAA	A2	588~ 602	6
50	AAV2	QGQSGCDCR GDCFCA (QA A)	P2	585~ 599	2
88	AAV-D J-QR	QGQSGCDCR GDCFCA (QA A)	QR- P2	587~ 601	7
43	AAV7	GQRGNEARV REAQAA	A6	587~ 601	3
46	AAVrh 10	GQRGNEARV REAQAA	A6	588~ 602	5

30

40

【0095】

実施例2

7種の選択した突然変異体の粗溶解物の発現

50

2.1. 材料及び方法

AAV産生

粗AAV溶解物の生産に関する詳細は、Grosse et al. (J. Virol, 2017, doi: 10.1128/JVI.01198-17)に見出すことができる。
【0096】

選択した7種のキャプシド突然変異体（及び対照としてwtAAV5）のそれぞれの粗溶解物のアリコートを使用して、細胞（HEK293TまたはRA患者から単離した3種の異なるFLS細胞株）を形質導入し、YFP発現をフローサイトメトリーにより、形質導入の3日（HEK293T）～5日（FLS）後に測定した。詳細には、HEK293Tを、96ウェルプレート（Greiner Bio-One、参照番号655180）に45000個の細胞/ウェルにて播種した。RA-FLSは、96ウェルプレートに2500個の細胞/ウェルにて播種した。一晚インキュベーションした後、細胞上清を、0.001%プルロニックF68溶液（Sigma P5556）を含有する40μl DMEM-glutaMAX-I（Gibco 31966-021）で置き換えた。ウイルス溶解物を、二重で、10μl/ウェルで加えた。4時間後、FBS（熱非働化（HI）ウシ血清ゴールド、Gibco、参照番号A15-151）、最終濃度1%）を含有するDMEM-glutaMAX-I中のドキシソルピシン（最終濃度0.4μM）（Sigma D1515）を、ウェルに加えた（50μl/ウェル）。翌日、FLSの培地を除去し、DMEM-glutaMAX-I（10%FBS（熱非働化（HI）ウシ血清ゴールド、Gibco、参照番号A15-151）、10mM HEPES（Gibco、参照番号15630）、50μg/mlゲンタマイシン（Gibco参照番号15710-049）、100U/mlペニシリン/100μg/mlストレプトマイシン（Sigma-Aldrich、参照番号P0781））を加えた（200μl/ウェル）。HEK293T細胞の培地は変更しなかった。形質導入の3日（HEK293T細胞）または6日（FLS）後、細胞を、PBS（Gibco、参照番号10010）中0.5%トリプシン/EDTA（Gibco参照番号15400-054）を使用してトリプシン処理し、フローサイトメトリー（FACSCanto II, BD Biosciences）によってYFP発現に関して分析した。全ての細胞に関する発現細胞の割合（%）及び平均蛍光強度（MFI）の両方を決定した。

【0097】

2.2. 結果

7種のベクター全ての粗溶解物を、3種の異なる患者FLS細胞株及びHEK293T細胞において*in vitro*形質導入アッセイにて使用した。蛍光顕微鏡法（データは示さず）またはフローサイトメトリー（図1パネルA～E）により、YFPを発現する細胞の割合（%）に関して細胞をアッセイした。細胞型間でいくらか変動したが、全ての突然変異キャプシドは、AAV5-WTよりも、FLS細胞及びHEK293T細胞の両方において高い発現を示した（図1）。表2は、図1の試料凡例を提供する。これらの結果に基づき、4種のキャプシド突然変異体をさらなる調査のために選択した（実施例3を参照されたい）。

【0098】

実施例3

HEK293T及びFLSにおけるキャプシド変異体の*in vitro*試験

3.1 材料及び方法

3.1.1 4種の突然変異キャプシドタンパク質、AAV9-A2、AAV7-A6、AAV1-P4、及びAAVDJ-QR-P2をさらに調査した。（可視化（YFP）ならびにルシフェラーゼアッセイによる定量化を可能にするために）YFP-ルシフェラーゼ融合タンパク質を発現する精製されたベクター（イオジキサノール勾配）を生成した。（van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427に記載される通りに）関節リウマチ患者から単離された3種の異なる初代FLS株を、各血清型を用いて、2つのベクター用量（MOI20, 000

10

20

30

40

50

または100,000)にて形質導入し、4日後、細胞を回収し、遺伝子発現をルシフェラーゼアッセイ(Promegaルシフェラーゼアッセイキット)により定量化した。

【0099】

詳細には、RA-FLSを、培地(DMEM-Glutamax(Gibco参照番号31966-021)、10%FBS(熱非働化(HI)ウシ血清ゴールド、参照番号A15-151)、10mM HEPES(Gibco参照番号15630-056)、50µg/mlゲンタマイシン(Gibco、参照番号15710-049)、100u/mlペニシリン/100µg/mlストレプトマイシン(Sigma-Aldrich Merck参照番号P0781)中、96ウェルプレート(Greiner Bio-One、参照番号655207)に2500個の細胞/ウェルにてプレATINGした。48時間後、培地を除去し、(0.001%プルロニック-68溶液(Sigma参照番号p5556)を含有するDMEM-Glutamax中)ウイルスを、20,000または100,000のMOIにて加えた。4時間後、ドキシソルピシン(Sigma、参照番号D1515、最終濃度0.4µM)及びFBS(最終濃度1%)を含有する培地を加えた。

10

【0100】

24時間後、培地を、DMEM-Glutamax(10%FBS、10mM HEPES、50µg/mlゲンタマイシン、100u/mlペニシリン、100µg/mlストレプトマイシン)で置き換えた。形質導入の4日後、細胞を、100µl PBS(Gibco、参照番号10010)を用いて1回洗浄し、ルシフェラーゼ活性を、ONE Glo(商標)ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega、参照番号E6110)を使用して決定した。100µlの溶解バッファーを加え、細胞を室温にて900rpmで10分間、撹拌機上に置いた。続いて、20µlの溶解物を、白色96ウェルプレートに移し、80µlの基質を(3分間(暗所)で加え、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した(1秒/ウェル、synergy HT、Biotek)。

20

【0101】

3.1.2.同様の実験では、関節リウマチ患者から単離された3種の追加のFLS細胞株を、ルシフェラーゼ遺伝子(MOI10,000及び100,000)を含有する3.1.1(AAV9-A2、AAV1-P4、AAV7-A6、AAVDJ-QR-P2、AAVrh10-A6、AAVrh10-A2、AAV2-P2)に記載したものと異なるAAV調製物からのAAV5及び7キャプシド突然変異体を用いて形質導入した。空粒子の数は、AAV調製物間で異なった。形質導入の有効性に対する影響の可能性を排除するために、空キャプシド補正を、AAV5空粒子を追加して、調製物一つあたりの空粒子の割合(%)を等しくすることによって行った。

30

【0102】

3.1.3.3.1.2にて記載したものと同一調製物からの7種のキャプシド突然変異体を、HEK293T細胞においても試験した。詳細には、HEK293Tを、96ウェルプレート(Greiner Bio-One、参照番号655180)に50000個の細胞/ウェルにて播種した。一晩インキュベーションした後、細胞上清を、0.001%プルロニックF68溶液(Sigma P5556)を含有するDMEM-glutamax-I(Gibco 31966-021)で置き換えた。さまざまなベクターを、二重で、100,000のMOIにて追加した。このプロトコルでは、空キャプシド補正を、3.1.2に記載する通りに行った。4時間後、FBS(熱非働化(HI)ウシ血清ゴールド、Gibco、参照番号A15-151)、最終濃度1%を含有するDMEM-glutamax-I中のドキシソルピシン(最終濃度0.4µM)(Sigma D1515)を、ウェルに加えた。形質導入の3日後、細胞を回収し、遺伝子発現を、ルミノメーター(BMG Labtech Fluostar Omega)でルシフェラーゼアッセイ(Promegaルシフェラーゼアッセイキット)により、定量化した。

40

【0103】

3.2.結果

50

3.2.1 3.1.1に記載のプロトコルに従って、4種の突然変異キャプシド(ならびに、同じ様式で作成された、対照としてのAAV5)のうちの1つを含む組換えAAVを使用して、3種の異なるFLS細胞株の*in vitro*形質導入を行った。AAV5と比較すると、4種の血清型全てが発現レベルの増加を示し、使用した血清型及び細胞株に応じて、2倍から35倍の範囲で増加した(図2A~F)。

【0104】

3.2.2 別の一連の実験では、7種の突然変異キャプシド(ならびに、同じ様式で作成された、AAV5対照)の*in vitro*形質導入有効性を、3種のFLS細胞株にて評価した。AAV5と比較すると、7種の血清型全てがルシフェラーゼの発現レベルの増加を示し、使用した血清型及び細胞株に応じて、6倍から55倍の範囲で増加した(図2G~L)。

10

【0105】

3.2.3 同様の実験を、HEK293T細胞において行った。7種の血清型全てを用いた形質導入は、wtAAV5と比較して、2倍から12倍の増加範囲でルシフェラーゼ発現の亢進をもたらした(図2M)。

【0106】

実施例4

疑似滑膜腔モデルでの*in vivo*研究

4.1.材料及び方法

動物

20

雌Balb/cマウス(8~10週齢、体重20~25g;(Harlan,Boxmeer,the Netherlands))を、アムステルダムのアカデミックメディカルセンターの動物施設にて個別の換気ケージに収容した。食餌及び水は、自由に入手可能とした。全ての動物実験は、アムステルダム大学のAnimal Research Ethics Committeeのガイドラインに従って行われた。

【0107】

疑似滑膜腔(APS)モデル

2種の血清型、AAV9-A2及びAAV7-A6を、wtAAV5に対して比較した。疑似滑膜腔モデルは、Edwards et al(1981;J Pathol 134:147-156)から適応した。0日目に、3mlの空気を、7~9週齢の雌Balb/cOlaHsdマウス(Harlan)の背部皮膚内へと皮下注射した(0日目)。空気嚢の形成直後に、1mlの空気を除去し、1mlのAAV(0.001%ブルロニックF68(Sigma、参照番号p5556)を含有するPBS(Gibco、参照番号10010中2e10ベクターゲノム/マウスを、直接空気嚢内に加えた。形質導入の3日後、遺伝子発現を、*in vivo*動物イメージングにより測定した。

30

【0108】

ルシフェラーゼ発現のイメージング

ルシフェラーゼ発現を3日目に測定した。当初は、ベクター投与後最大3ヶ月間にわたって発現のモニタリングを継続する予定だったが、動物施設がバルボウイルスに感染したため、全ての進行中の実験が早期に終了した。D-ルシフェリンカリウム塩基質(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)を、(150mg/kg体重、およそ200µlの容量にて)腹腔内注射した。冷却した電荷結合素子(CCD)カメラシステム(Photon Imager, Biospace Lab, Paris, France)を使用して、基質投与の10分後、5分間、光子計数を獲得し、画像処理ならびにシグナル強度の定量化及び分析を、M3 Vision(Biospace Lab)を使用して行った。放出された光子の数/秒/平方センチメートル/ステラジアンを、ルシフェラーゼ活性の尺度として計算した。

40

【0109】

一般的な動物条件及び倫理に関する陳述

空気嚢形成、ベクター投与、及び*in vivo*イメージングは、イソフルラン麻酔(

50

3%イソフルラン及び酸素)下で行った。実験の最後に、動物を、イソフルラン麻酔下で心臓穿刺により屍殺し、その後頸椎脱臼を行った。研究は、アムステルダム大学の動物実験委員会(animal care and use committee)によって審査及び承認され、オランダの動物福祉法(オランダ語:「Wet op Dierproeven」)の推奨事項に厳密に従って実施された。動物は、アムステルダム大学の動物施設において、病原菌の無い条件下で維持された。

【0110】

4.2. 結果

これらの有望な結果に基づいて、疑似滑膜腔(APS)モデルを使用して、予備的なin vivo研究を行い、2種の血清型、AAV9-A2及びAAV7-A6を、wtAAV5に対して比較した。不幸にも動物施設における感染があり、この研究を早期に終了する必要があったため、本発明者らは、単一の時点、ベクター投与3日後からのデータしか得られなかった。この時点で、AAV5と比較したとき、キャプシド突然変異体は、遺伝子発現の増加を引き起こしており、AAV7-A6は約6倍及びAAV9-A2は約2.2倍の発現増加を示した(図3A)。

10

【0111】

実施例5:

in vivo研究: 健常動物における関節内注射

5.1. 材料及び方法

動物

雄DBA1/Jマウス(12週齢、Envigo)を、アムステルダムのアカデミックメディカルセンターの動物施設にて個別の換気ケージに収容した。食餌及び水は、自由に入手可能とした。全ての動物実験は、オランダのアムステルダム大学のCentral Commission Animal Experiments(CCD)及びAnimal Research Ethics Committeeの承認後に行われた。

20

【0112】

発現研究

キャプシド突然変異体を含む5種のrAAV、すなわちAAV9-A2、AAV1-P4、AAV7-A6、AAVrh10-A6及びAAVrh10-A2を、wtAAV5に対して比較した。キャプシドの負荷が発現に影響を与える可能性がある(Aalbers CJ et al., Hum Gene Ther 2017; 28(2): 168-178)ため、rAAV調製物を、キャプシドの負荷に関して、wtAAV5空粒子を追加することによって補正した。健常マウス(n=9/群)の両膝に、ルシフェラーゼ遺伝子を運ぶAAVベクターを関節内注射した(7.5×10^9 ウイルスゲノム/膝)。遺伝子発現を、ベクター投与後のいくつかの時点にてin vivoイメージングによって決定した。

30

【0113】

ルシフェラーゼ発現のイメージング

ルシフェラーゼ発現は、指定の時点で決定した(図3B)。各時点にて、D-ルシフェリンカリウム塩基質(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)を、(150mg/kg体重、およそ200µlの容量にて)腹腔内注射した。冷却した電荷結合素子(CCD)カメラシステム(Photon Imager, Biospace Lab, Paris, France)を使用して、基質投与の15分後、5分間、光子計数を獲得した。画像処理ならびにシグナル強度の定量化及び分析を、M3 Vision(Biospace Lab)を使用して行った。放出された光子の数/秒/平方センチメートル/ステラジアンを、ルシフェラーゼ活性の尺度として計算した。

40

【0114】

一般的な動物条件及び倫理に関する陳述

ベクター投与及びin vivoイメージングは、イソフルラン麻酔(4%イソフルラ

50

ン及び酸素)の下で行った。研究は、オランダの動物福祉法(オランダ語:「Wet op Dierproeven」)の推奨事項に厳密に従って実施された。動物は、アムステルダム大学の動物施設において、病原菌の無い条件下で維持された。

【0115】

5.2. 結果

最初の時点である3日目に、膝におけるAAV媒介性発現が全ての群において検出され、経時的に増加している(図3B)。AAV1-P4を除く全てのキャプシド突然変異体は、wtAAV5と比較して発現の増加を示し、AAV9-A2が最も高い発現を示している(14日目にてwtAAV5に対して約5倍増加)(図3C)。14日目の発現レベルは、高低順で: AAV9-A2 > AAVrh10-A2 > AAVrh10-A6 > AAV7-A6 > wtAAV5 > AAV1-P4である。7日目に、AAVrh10-A2、AAV9-A2及びAAVrh10-A6が、wtAAV5と比較して有意に増加した発現を示している(14日目にてwtAAV5に対して、**P < 0.05、***P < 0.01、****P < 0.0001)(図3B)。

10

【0116】

実施例6:

ヒト血清におけるキャプシド突然変異体に対する中和抗体力価の決定

6.1 材料及び方法

HEK293T細胞を、96ウェル透明底プレート中9%FBS、0.9%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有するDMEMにプレーティングした。細胞を、(37、5%CO₂にて)24時間放置してから形質導入した。ヒト血清試料(フランスの血液研究所から入手)を以下の通りに希釈した: 無添加の未希釈の血清 - 1:4 - 1:16 - 1:64 - 1:256 - 1:1,024(無添加の血清とは、1容量の血清に対して1容量のウイルスを意味する)。プールされたマウス血漿試料(10匹のDBA/1マウス由来、AAV5ベクターの関節内注射の42日後に採取)を、以下の通りにFBS中に段階的に希釈した: 1:10 - 1:50 - 1:250 - 1:6,250 - 1:31,250。ヒト静脈内免疫グロブリン(IVIg, Sanquin、ロット15D30H4560A)の溶液を、1:10から1:10,000に至るまで段階的にセミログ希釈した。試料及び対照を、適切なキャプシド突然変異体またはwtAAV5ベクターと一緒に30分±5分間、35~38にて、2,500のMOIにて(以前に決定通り)、インキュベートした。48±2時間後、ルシフェラーゼ試薬を添加し、VictorXマイクロプレートリーダーを用いてルミネセンス発光を測定した。形質導入阻害力価は、検出可能な中和活性、すなわち50%を超える中和活性に依然として関連している血清の最高希釈として決定された。

20

30

【0117】

6.2 結果

表3に表すように、試料の70%~85%は、wtAAV5または7種のキャプシド突然変異体に対する中和抗体を含有しなかった。大半の試料は、7種のキャプシド突然変異体に対する応答性が共通していたため、野生型AAV5キャプシドに対する応答性を有する血清試料も、他のキャプシドに対して応答した。応答のレベルに関しては、それらはキャプシド突然変異体間でも同等であった。応答しなかった試料の数(ND=不検出)を、各キャプシド突然変異体に対して示す。力価を異なるベクターと比較することは非常に難しいため、これらのデータは情報としてのみ提供する。関節内注射された関節からのプールされたマウス血清試料に関して、それは動物を免疫化するために使用したWTAAV5キャプシドに対してのみ応答し、突然変異キャプシドに対する応答は観察されなかった(表3)。全てのキャプシド突然変異体及びWTAAV5を、IVIg(力価>100)によって中和した(データは示さず)。

40

【0118】

50

【表 3】

表 3：各血清試料ならびにプールされたマウス血漿について、阻害力価が報告され、検出可能な中和活性に依然として関連する最高希釈に対応する。力価 > 8 は、血清陽性に見なす。陽性シグナルは、太字/イタリックにてハイライトする。ND = 検出不能

	AAV 5	AAV 9A2	AAV- DJ-Q R-P2	AAV rh1 0-A 2	AAV 1-P 4	AAV 2-P 2	AAV 7-A 6	AAV rh1 0-A 6
試料 1	256	256	256	256	>10 24	256	>10 24	>10 24
試料 2	4	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 3	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 4	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 5	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 6	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 7	64	64	64	256	256	64	256	256
試料 8	16	16	16	64	16	64	64	64
試料 9	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 10	4	4	16	4	64	64	64	64
試料 11	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 12	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	1	検出不能	検出不能
試料 13	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 14	検出不能	1	検出不能	検出不能	4	1	検出不能	1
試料 15	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 16	1	1	4	4	4	16	1	1
試料 17	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 18	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能
試料 19	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	4	検出不能	検出不能	検出不能
試料 20	4	256	64	4	検出不能	256	16	16
陰性試料の割合 (%)	85	80	75	85	80	70	75	75
マウス血漿	256	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能	検出不能

10

20

30

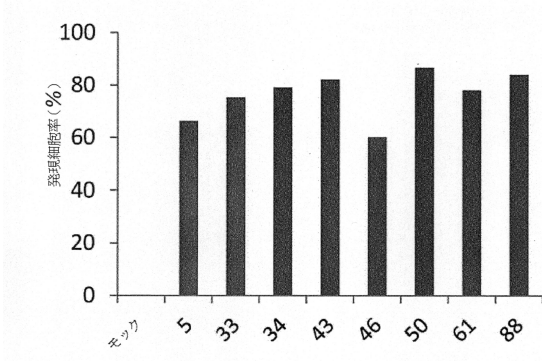
40

【0119】

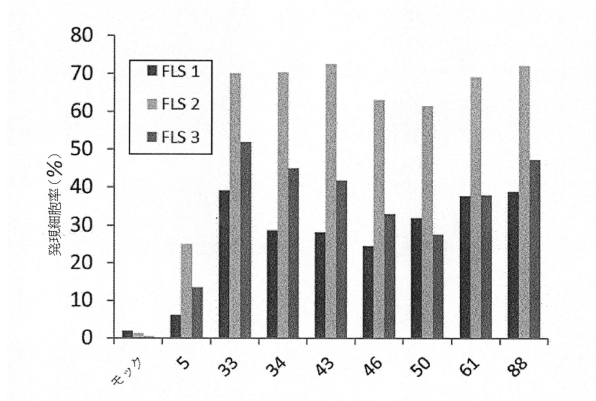
本発明を、図面に示すようないくつかの例示的な実施形態を参照して上記に説明してきた。一部分または要素の変更及び代替実装が可能であり、添付の特許請求の範囲にて定義される保護の範囲に含まれる。

【図面】

【図 1 A】

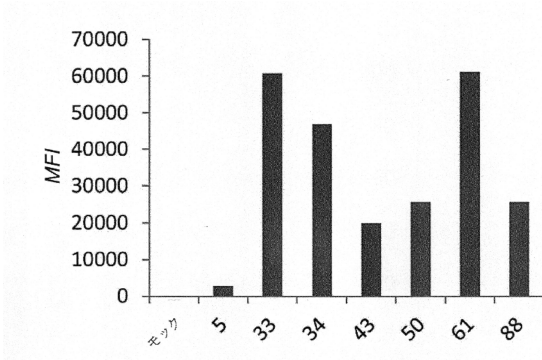


【図 1 B】

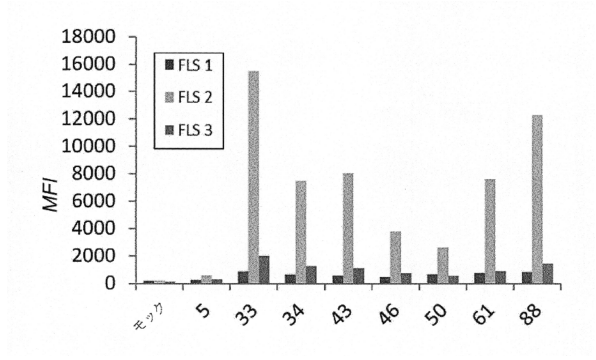


10

【図 1 C】

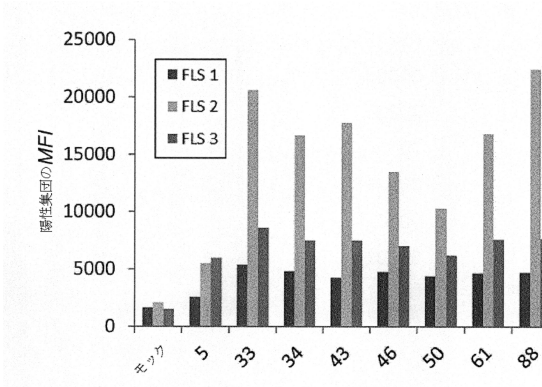


【図 1 D】

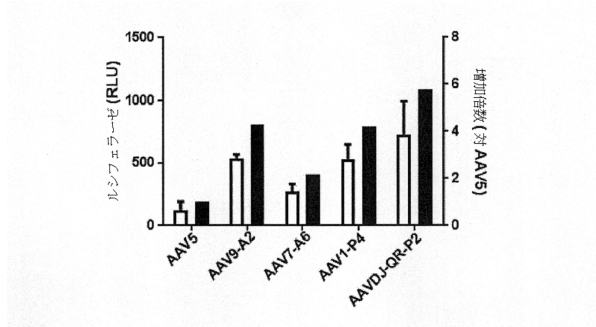


20

【図 1 E】



【図 2 A】

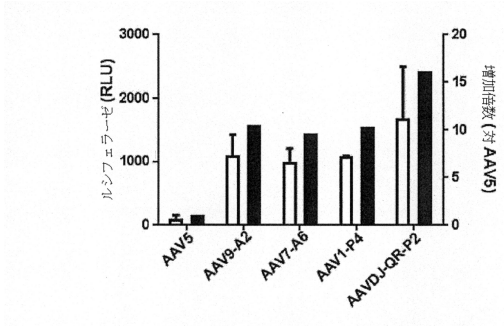


30

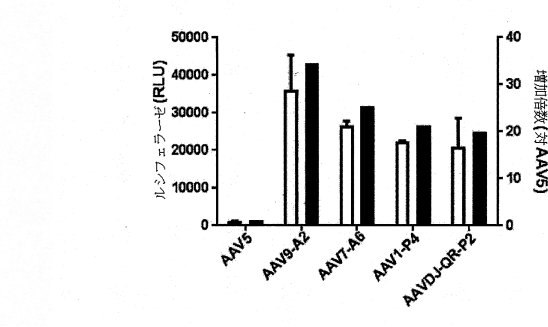
40

50

【 図 2 B 】

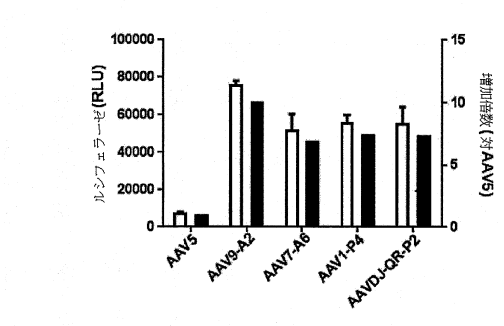


【 図 2 C 】

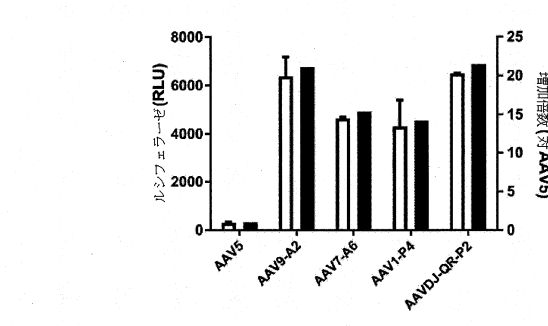


10

【 図 2 D 】

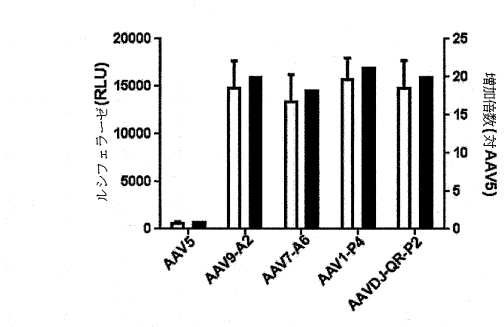


【 図 2 E 】

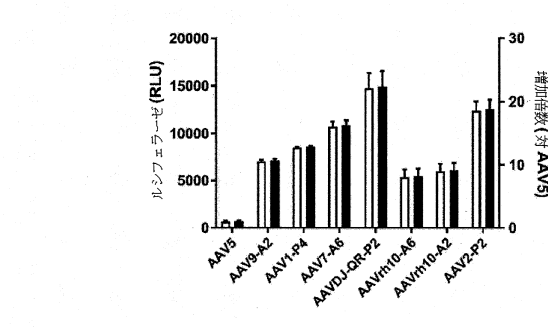


20

【 図 2 F 】



【 図 2 G 】

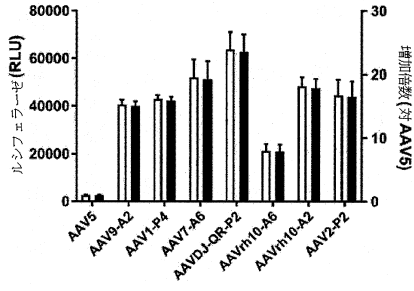


30

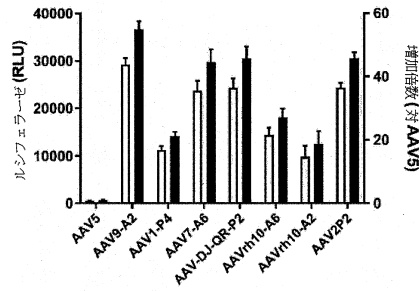
40

50

【 図 2 H 】

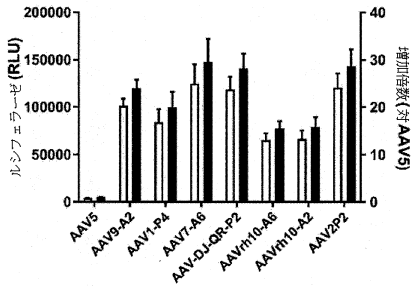


【 図 2 I 】

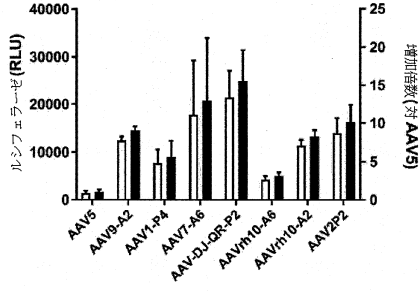


10

【 図 2 J 】

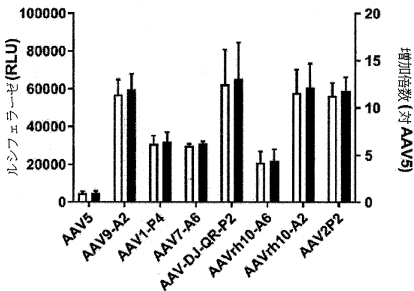


【 図 2 K 】

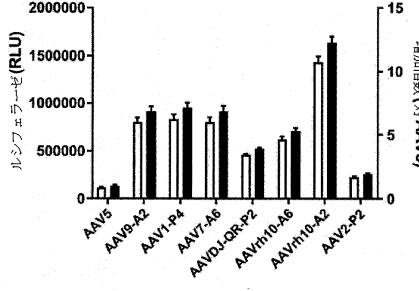


20

【 図 2 L 】



【 図 2 M 】

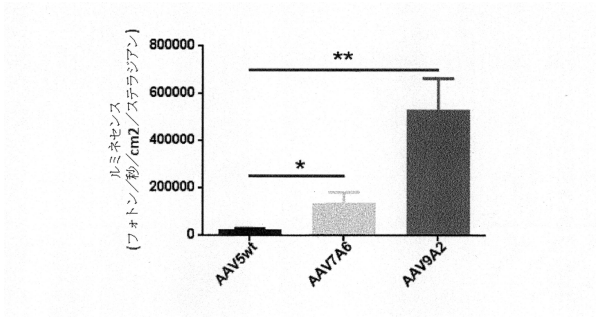


30

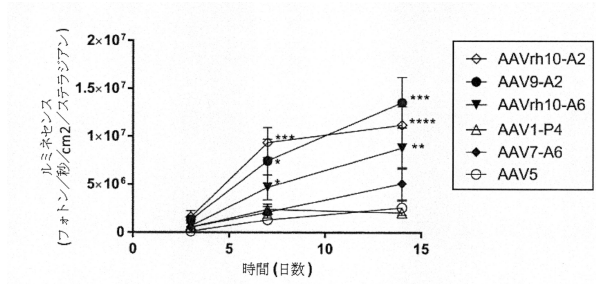
40

50

【図 3 A】

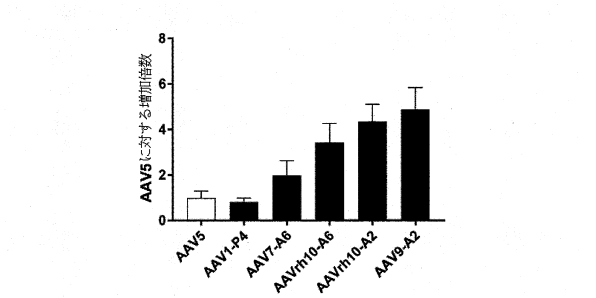


【図 3 B】



10

【図 3 C】



【図 4】

MAFFT FFT-NS-i (v7.215)によるCLUSTAL形式のアライメント

```

AAV1P4          -gqsgndvrs--anaqaa
AAV9A2          -gqrgnysrg--vdaqaa
AAVrh10A2      -gqrgnysrg--vdaqaa
AAV7A6          -gqrgnearv--reaq--
AAV7A6+        -gqrgnearv--reaqaa
AAV10A6        -gqrgnearv--reaqaa
AAV2P2         qqsggcdcrgcdfca---
AAV-DJ-QR-P2  qqrgcdcrgcdfca---
AAV2P2+        qqsggcdcrgcdfcaqaa
AAV-DJ-QR-P2+ qqrgcdcrgcdfcaqaa
                ** * * *

```

20

【図 5】

MUSCLE (3.8)によるCLUSTAL マルチプル配列アライメント

```

AAV2P2          QQSGCDCRG-DCFCA---
AAV2P2+         QQSGCDCRG-DCFCAQAA
AAV-DJ-QR-P2   QQRGCDCRG-DCFCA---
AAV-DJ-QR-P2+ QQRGCDCRG-DCFCAQAA
AAV1P4         -GQSGNDVRSANAQAA---
AAV9A2         -GQRGNYSRGVDAQAA---
AAVrh10A2     -GQRGNYSRGVDAQAA---
AAV7A6         -GQRGNEARVREAQ-----
AAV7A6+       -GQRGNEARVREAQAA---
AAV10A6       -GQRGNEARVREAQAA---
                ** * * *

```

【図 6】

MAFFT FFT-NS-i (v7.215)によるCLUSTAL形式のアライメント

```

インサートP4    -gqsgndvrs--anaqaa
インサートA2    -gqrgnysrg--vdaqaa
インサートA6    -gqrgnearv--reaqaa
インサートP2    qqsggcdcrgcdfcaqaa
インサートQR-P2 qqrgcdcrgcdfcaqaa
                ** * * *

```

30

40

50

【 図 7 】

MUSCLE (3.8)によるCLUSTALマルチプル配列アライメント

```

インサートP2      QGQSGCDCRGDCFCAQAA
インサートQR-E2   QGQSGCDCRGDCFCAQAA
インサートP4      -GGSGNDVRS--NAQAA
インサートA2      -GQSGNYSRGV--DAQAA
インサートA6      -GQSGNEARVR--EAQAA
                  ** * * *      ****

```

【 配列表 】

0007389040000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P	19/06	(2006.01)	F I	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	38/16	(2006.01)		A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	38/46	(2006.01)		A 6 1 K	38/46	
C 1 2 N	7/01	(2006.01)		C 1 2 N	7/01	Z N A
C 1 2 N	15/35	(2006.01)		C 1 2 N	15/35	

(72)発明者 ジョナサン・ダグラス・フィン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 7 6 ・メルローズ・フランクリン・ストリート・1 0
5 9

(72)発明者 デルク・グリム

ドイツ・6 9 1 1 7 ・ハイデルベルク・ハウプトシュトラッセ・7 9

(72)発明者 キャスリーン・ベルナー

ドイツ・6 9 1 8 9 ・シュリースハイム・ルターリッشه・キルヒガッセ・1 0

(72)発明者 スサンネ・アンナ・スヌーク

オランダ・1 8 5 1 ・エムテール・ハイルー・ゼーフェンハイゼルラン・8 7

(72)発明者 ニールス・ブルクストラ

オランダ・2 4 2 1 ・ハーイェー・ニウコープ・デ・フェーンデレイ・2 8

(72)発明者 サビーネ・マリア・ヘルトルーデ・ファン・デル・サンデン

オランダ・1 1 0 3 ・エルアー・アムステルダム・ゲールディンクホフ・2 7 4

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 4 7 6 0 (W O , A 1)

特表 2 0 1 7 - 5 3 1 6 5 2 (J P , A)

特表 2 0 0 7 - 5 0 4 2 1 9 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 0 0 3 1 1 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K

C 1 2 N

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

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

U n i P r o t / G e n e S e q