

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-529821
(P2021-529821A)

(43) 公表日 令和3年11月4日(2021.11.4)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------------|-----------------|-------------|
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | 4 B 0 5 0 |
| C 1 2 N 9/52 (2006.01) | C 1 2 N 9/52 | 4 C 0 8 4 |
| C 1 2 N 15/57 (2006.01) | C 1 2 N 15/57 | 4 C 0 8 6 |
| C 1 2 N 15/31 (2006.01) | C 1 2 N 15/31 | 4 C 0 8 7 |
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N 15/63 Z | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 111 頁) 最終頁に続く

| | |
|--|---------------------|
| (21) 出願番号 特願2021-502435 (P2021-502435) | (71) 出願人 591100596 |
| (86) (22) 出願日 令和1年7月17日 (2019.7.17) | アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ |
| (85) 翻訳文提出日 令和3年3月15日 (2021.3.15) | サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ |
| (86) 国際出願番号 PCT/EP2019/069280 | ディカル |
| (87) 国際公開番号 W02020/016318 | フランス国、エフー75013 パリ、リ |
| (87) 国際公開日 令和2年1月23日 (2020.1.23) | ユ・ドゥ・トルビアック 101 |
| (31) 優先権主張番号 18305971.6 | (71) 出願人 503197304 |
| (32) 優先日 平成30年7月17日 (2018.7.17) | ジェネトン |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP) | フランス・F-91000・エヴリ・リュ |
| (31) 優先権主張番号 62/768, 731 | (71) 出願人 518059934 |
| (32) 優先日 平成30年11月16日 (2018.11.16) | ソルボンヌ・ユニヴェルシテ |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US) | SORBONNE UNIVERSITE |
| | フランス国、75006 パリ、リュ・ド |
| | ゥ・レコール・ドゥ・メドゥシーヌ 21 |
| | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 イムノグロブリンを除去又は減少させるための遺伝子治療ベクターの形質導入を増加または増強するための組成物および方法

(57) 【要約】

本明細書に開示されるのは、免疫グロブリンに存在するペプチド結合を切断するプロテアーゼを投与することによって、または免疫グロブリンに存在する炭水化物残基を切断するグリコシダーゼを投与することによって、またはインピボでの免疫グロブリンの同様の酵素的切断によって、抗体を中和する遺伝子治療を開発するか又は既に素材する患者を処置するための方法である。また、IdeSおよび他の免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドを、それを必要とする患者の疾患の遺伝子治療治療に利用するための方法も開示されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質の機能または活性の喪失によって引き起こされる疾患の処置を必要とする対象を処置する方法であって、(a)タンパク質の機能または活性を提供または補足するタンパク質またはペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターを前記対象に投与すること；及び(b)前記組換えウイルスベクターおよび/または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体のエフェクター機能を分解または消化および/または阻害または低減するのに有効な量のプロテアーゼまたはグリコシダーゼを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2】

機能活性または発現の獲得によって引き起こされる疾患の処置を必要とする対象を処置する方法であって、(a)前記タンパク質の機能、活性、または発現の獲得の発現を阻害、減少または減少させる核酸に転写される異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターを前記対象に投与すること；および(b)前記組換えウイルスベクターに結合する抗体のエフェクター機能を分解または消化および/または阻害または低減するのに有効なプロテアーゼまたはグリコシダーゼを前記対象に投与することを含む、前記方法

【請求項 3】

タンパク質の機能または活性の喪失によって引き起こされる疾患の処置を必要とする対象を処置する方法であって、(a)ウイルスベクター結合抗体のエフェクター機能を分解または消化および/または阻害または低減するのに有効なプロテアーゼまたはグリコシダーゼを前記対象に投与すること；および(b)前記タンパク質の機能または活性を提供または補足するタンパク質またはペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターを前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 4】

タンパク質の機能活性または発現の獲得によって引き起こされる疾患の処置を必要とする対象を処置する方法であって、(a)ウイルスベクター結合抗体のエフェクター機能を分解または消化および/または阻害または低下させるのに有効なプロテアーゼまたはグリコシダーゼを前記対象に投与すること；および(b)前記対象に、前記タンパク質の機能獲得、活性または発現の発現を阻害、減少または低減させる核酸に転写される異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターを投与することを含む、前記方法。

【請求項 5】

ステップ(a)が実行された後、約90日以内にステップ(b)が実行される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 6】

前記プロテアーゼが、システインプロテアーゼまたはチオールプロテアーゼを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記プロテアーゼが、ストレプトコッカスピオゲネス、ストレプトコッカス・エクイ(*Streptococcus equi*)、またはマイコプラズマ・カニス(*Mycoplasma canis*)からのプロテアーゼを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記プロテアーゼが、配列番号3～18、23または48のいずれかに記載のIdeSまたはその改変変異体を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記グリコシダーゼが、エンドグリコシダーゼを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記エンドグリコシダーゼが、配列番号44～47のいずれかに記載の配列を含む、請求項9に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記プロテアーゼまたはグリコシダーゼが、ヒト抗体のエフェクター機能を分解または消化および/または阻害または低減する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記レンチウイルスベクターが、抗体が結合するエンベロープタンパク質を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記 AAV ベクターが、抗体が結合するキャプシドタンパク質を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 AAV ベクターが、抗体が結合する VP 1、VP 2 および/または VP 3 キャプシドタンパク質を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 AAV ベクターが、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 3B、AAV - 2 i 8、Rh 10、Rh 7 4、配列番号 1 および配列番号 2 VP 1、VP 2 および/または VP 3 キャプシドタンパク質からなる群より選択される VP 1、VP 2 および/または VP 3 キャプシドタンパク質に対して 60% 以上の配列同一性を有する VP 1、VP 2 および/または VP 3 キャプシドタンパク質を含む、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 AAV ベクターが、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 3B、AAV - 2 i 8、Rh 10、Rh 7 4、配列番号 1 および配列番号 2 VP 1、VP 2 および/または VP 3 キャプシドタンパク質からなる群より選択される VP 1、VP 2 および/または VP 3 キャプシドタンパク質に対して 100% の配列同一性を有する VP 1、VP 2 および/または VP 3 キャプシドタンパク質を含む、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記対象が、前記ウイルスベクターに結合する抗体を有する、請求項 1、3 および 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ウイルスベクターに結合する抗体が、前記対象に存在しない、請求項 1、3 および 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記対象が、異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体を有する、請求項 1、3 および 5 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記抗体が、IgG、IgM、IgA、IgD および/または IgE を含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

ステップ (a) を実施する前、ステップ (a) を実施した後でステップ (b) を実行する前、および/またはステップ (a) および (b) を実行した後に、前記対象に存在するウイルスベクター結合抗体の存在を決定し、その量またはエフェクター機能を定量化することをさらに含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

ステップ (a) を実行する前、ステップ (a) を実行した後でステップ (a) を実行する前、ステップ (b) を実行する前、および/またはステップ (a) および (b) を実行

10

20

30

40

50

した後に、前記サンプルに存在するウイルスベクター結合抗体の存在、量、またはエフェクター機能について前記対象からの生物学的サンプルを分析することをさらに含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記対象からの前記生物学的サンプルが、血液製剤である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記方法が、前記ウイルスベクター結合抗体の 2 0 ~ 5 0 %、5 0 ~ 7 5 %、7 5 ~ 9 0 %、9 0 ~ 9 5 %、または 9 5 % 以上の減少をもたらす、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1 部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を 1 0 0 , 0 0 0 部の緩衝液で希釈されるところの約 1 : 1 0 0 , 0 0 0 未満であり、5 0 % のウイルスベクター中和をもたらす、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1 部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を 5 0 , 0 0 0 部の緩衝液で希釈されるところの約 1 : 5 0 , 0 0 0 未満であり、5 0 % のウイルスベクター中和をもたらす、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1 部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を 1 0 , 0 0 0 部の緩衝液で希釈されるところの約 1 : 1 0 , 0 0 0 未満であり、5 0 % のウイルスベクター中和をもたらす、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

20

【請求項 2 9】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1 部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を 1 , 0 0 0 部の緩衝液で希釈されるところの約 1 : 1 , 0 0 0 未満であり、5 0 % のウイルスベクター中和をもたらす、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1 部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を 1 0 0 部の緩衝液で希釈されるところの約 1 : 1 0 0 未満であり、5 0 % のウイルスベクター中和をもたらす、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1 部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を 1 0 部の緩衝液で希釈されるところの約 1 : 1 0 未満であり、5 0 % のウイルスベクター中和をもたらす、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1 部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を 5 部の緩衝液で希釈されるところの約 1 : 5 未満であり、5 0 % のウイルスベクター中和をもたらす、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

40

【請求項 3 3】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1 部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を 4 部の緩衝液で希釈されるところの約 1 : 4 未満であり、5 0 % のウイルスベクター中和をもたらす、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 4】

50

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を3部の緩衝液で希釈されることの約1:3未満であり、50%のウイルスベクター中和をもたらす、請求項23または24に記載の方法。

【請求項35】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を2部の緩衝液で希釈されることの約1:2未満であり、50%のウイルスベクター中和をもたらす、請求項23または24に記載の方法。

【請求項36】

前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在する前記ウイルスベクター結合抗体が、1部の前記生物学的サンプルまたは血液製剤を1部の緩衝液で希釈されることの約1:1未満であり、50%のウイルスベクター中和をもたらす、請求項23または24に記載の方法。

【請求項37】

ステップ(a)を実施した後でステップ(b)を実施する前、および/またはステップ(a)および(b)を実行した後に、前記異種ポリヌクレオチドによってコードされる前記ポリペプチドまたはペプチドに結合する抗体の存在を決定または定量することをさらに含む、請求項1、3および5~36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

ステップ(a)を実行した後でステップ(b)を実行する前、および/またはステップ(a)および(b)を実行した後に、前記核酸に結合する抗体の存在を決定または定量することをさらに含む、請求項2および4~36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約60日以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約45日以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約30日以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約21日以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約14日以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約7日以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約72時間以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約48時間以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

ステップ(b)が、ステップ(a)の前後約24時間以内に実施される、請求項1~38のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 48】

ステップ (b) が、ステップ (a) の前後約 12 時間以内に実施される、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

ステップ (b) が、ステップ (a) の前後約 6 時間以内に実施される、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記対象が、肺疾患（例えば、嚢胞性線維症）、出血性障害（例えば、阻害剤を伴うまたは伴わない血友病 A または血友病 B）、サラセミア、血液障害（例えば、貧血）、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、てんかん、リソソーム蓄積症（例えば、アスパルチルグルコサミン尿症、バッテン病、後期乳児神経セロイドリポフスチン症 2 型（CLN2）、シスチン症、ファブリー、ゴーチャー病タイプ I、II、および III、グリコーゲン蓄積症 II（ポンペ病）、GM2 - ガングリオシドーシス I 型（テイサックス病）、GM2 - ガングリオシドーシス II 型（サンドホフ病）、ムコリポドーシス I 型（シアリドーシス I 型および II 型）、II（I 細胞病）、III（疑似ハーラー病）および IV、ムコ多糖蓄積症（ハーラー病および変異体、ハンター、サンフィリップタイプ A、B、C、D、モルキオタイプ A および B、マロトラーミーおよびスライ病）、ニーマンピック病タイプ A / B、C1 および C2、および S チンドラー病 I 型および II 型）、遺伝性血管浮腫（HAE）、銅または鉄蓄積障害（例えば、ウィルソン病またはメンケス病）、リソソーム酸性リパーゼ欠損症、神経障害または神経変性障害、癌、1 型または 2 型糖尿病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、代謝障害（例えば、糖原病）、固形臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓）の疾患、または感染性ウイルス（例えば、B および C 型肝炎、HIV など）、細菌性または真菌性疾患を有する、請求項 1 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

【請求項 51】

対象が、血液凝固障害を有する、請求項 1 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

対象が、血友病 A、血友病 A と阻害抗体、血友病 B、血友病 B と阻害抗体、任意の凝固因子：VII、VIIII、IX、X、XI、V、XII、II、フォンウィルブランド因子または組み合わせの FV / FVIIII 欠損症、サラセミア、ビタミン K エポキシドレクターゼ C1 欠損症、またはガンマカルボキシラーゼ欠損症の欠損を有する、請求項 1 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 53】

疾患が、貧血、外傷に関連する出血、損傷、血栓症、血小板減少症、脳卒中、凝固障害、播種性血管内凝固症候群（DIC）；ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖、ワルファリン、小分子抗血栓薬（すなわち、FXa 阻害剤）、またはベルナル・スリエ症候群、グラントマン血小板無力症、または貯蔵プール欠乏症などの血小板障害に関連する過剰抗凝固である、請求項 1 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。。

【請求項 54】

異種ポリヌクレオチドが、インスリン、グルカゴン、成長ホルモン（GH）、副甲状腺ホルモン（PTH）、成長ホルモン放出因子（GRF）、濾胞刺激ホルモン（FSH）、黄体形成ホルモン（LH）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、血管内皮成長因子（VEGF）、アンジオポイエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子（GCSF）、エリスロポエチン（EPO）、結合組織成長因子（CTGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、表皮成長因子（EGF）、形質転換成長因子（TGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、インスリン成長因子 I および II（IGF - I および IGF - II）、TGF、アクチビン、インヒビン、骨形態形成タンパク質（BMP）、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン NT - 3 および NT 4 / 5、繊毛神経栄養因子（CNTF）、グリア細胞株由来の神経栄養的事実または（GDNF）、ニューロツリン、アグリ

40

50

ン、ネトリン - 1 およびネトリン - 2、肝細胞増殖因子 (HGF)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグおよびチロシンヒドロキシラーゼからなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 または 3 ~ 53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

異種ポリヌクレオチドが、トロンボポイエチン (TPO)、インターロイキン (IL - 1 から IL - 36)、単球化学誘引物質タンパク質、白血病阻害因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、Fas リガンド、腫瘍壊死因子 および 、インターフェロン 、 および 、幹細胞因子、flk - 2 / flt 3 リガンド、IgG、IgM、IgA、IgD および IgE、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、一本鎖抗体、T細胞受容体、キメラT細胞受容体、一本鎖T細胞受容体、クラスI およびクラスII MHC 分子からなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 または 3 ~ 53 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 56】

異種ポリヌクレオチドが、CFTR (嚢胞性線維症膜貫通調節タンパク質)、血液凝固 (クロッティング) 因子 (第XIII因子、第IX因子、第VII因子、第X因子、第VII因子、第VIIa因子、プロテインCなど)機能獲得血液凝固因子、抗体、網膜色素上皮特異的65kDaタンパク質 (RPE65)、エリスロポエチン、LDL受容体、リポプロテインリパーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、 - グロビン、 - グロビン、スペクトリン、 - アンチトリプシン、アデノシンデアミナーゼ (ADA)、金属トランスポーター (ATP7A または ATP7)、スルファミダーゼ、リソソーム蓄積症 (ARSA) に関する酵素、ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ、 - 25 グルコセレブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、リソソームヘキサミンダーゼ、分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ、ホルモン、成長因子、インスリン様成長因子 1 または 2、血小板由来成長因子、表皮成長因子、神経成長因子、神経栄養因子 - 3 および - 4、脳由来ニューロトロフィック因子、グリア由来成長因子、形質転換成長因子 および 、サイトカイン、 - インターフェロン、 - インターフェロン、インターフェロン - 、インターロイキン - 2、インターロイキン - 4、インターロイキン 12、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシン、自殺遺伝子産物、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクローム P450、デオキシチジンキナーゼ、腫瘍壊死因子、薬剤耐性タンパク質、腫瘍抑制タンパク質 (例えば、p53、Rb、Wt - 1、NF1、Von Hippel-Lindau (VHL)、腺腫性ポリポーシスコリ (APC))、免疫調節特性を持つペプチド、寛容原性または免疫原性ペプチドまたはタンパク質 Tregitope または hCDR1、インスリン、グルコキナーゼ、グアニル酸シクラーゼ 2D (LCA - GUCY2D)、Rab エスコートタンパク質 1 (脈絡膜血症)、LCA 5 (LCA - レベルシリン)、オルニチンケト酸アミノトランスフェラーゼ (ジャイレート萎縮)、レチノスキシン 1 (X連鎖網膜分離症)、USH1C (アッシャー症候群 1C)、X連鎖網膜色素変性症 GTPase (XLRP)、MERTK (AR型RP:網膜色素変性症)、DFNB1 (コネキシン 26 難聴)、ACHM 2、3 および 4 (色覚異常)、PKD - 1 または PKD - 2 (多発性嚢胞腎)、TPP1、CLN2、スルファターゼ、N - アセチルグルコサミン - 1 - リン酸トランスフェラーゼ、カテプシンA、GM2 - AP、NPC1、VPC2、スフィンゴ脂質活性化タンパク質、ゲノム編集用の1つ以上のジंकフィンガーヌクレアーゼ、およびゲノム編集用の修復テンプレートとして使用される1つ以上のドナー配列をコードする、請求項 1 または 3 ~ 53 のいずれか一項に記載の方法。

20

30

40

【請求項 57】

前記異種ポリヌクレオチドが、阻害性核酸をコードする、請求項 2、4 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記阻害性核酸が、siRNA、アンチセンス分子、miRNA、RNAi、リボザイム、および shRNA からなる群から選択される、請求項 57 に記載の方法。

50

【請求項 59】

前記阻害性核酸が、ハンチンチン (H T T) 遺伝子、歯状鱗翅目萎縮に関連する遺伝子 (アトロフィン 1、A T N 1)、脊髄延髄筋萎縮の X 染色体上のアンドロゲン受容体、ヒトアタキシン - 1、- 2、- 3、および - 7、C a v 2 . 1 P / Q 電位依存性カルシウムチャネル (C A C N A 1 A)、T A T A 結合タンパク質、アタキシン 8 反対鎖 (A T X N 8 O S)、脊髄小脳性運動失調におけるセリン / スレオニンタンパク質ホスファターゼ 2 A 5 5 k D a 調節サブユニット B ベータアイソフォーム (タイプ 1、2、3、6、7、8、12、17)、脆弱 X 症候群の F M R 1 (脆弱 X 精神遅滞 1)、脆弱 X 関連振戦 / 運動失調症候群の F M R 1 (脆弱 X 精神遅滞 1)、脆弱 X E の F M R 1 (脆弱 X 精神遅滞 2) または A F 4 / F M R 2 ファミリーメンバー 2 精神遅滞; 筋緊張性ジストロフィーにおけるミオトニンタンパク質キナーゼ (M T - P K); フリードライヒ運動失調症のフラタキシン; 筋萎縮性側索硬化症におけるスーパーオキシドジスムターゼ 1 (S O D 1) 遺伝子の変異体; パーキンソン病および / またはアルツハイマー病の病因に關与する遺伝子、アポリタンパク質 B (A P O B) およびプロタンパク質転換酵素サブチリシン / ケキシン 9 型 (P C S K 9)、高コレステロール血症; H I V 感染における転写遺伝子のヒト免疫不全ウイルストランス活性化因子である H I V T a t; H I V 感染における H I V T A R、H I V T A R、ヒト免疫不全ウイルストランス活性化因子応答要素遺伝子、H I V 感染症における C - C ケモカイン受容体 (C C R 5)、R S V 感染におけるラウス肉腫ウイルス (R S V) ヌクレオカプシドタンパク質、C 型肝炎ウイルス感染における肝臓特異的マイクロRNA (m i R - 1 2 2)、p 5 3、急性腎障害または移植片機能の遅延腎移植または腎障害急性腎不全; 進行再発性または転移性の固形悪性腫瘍のプロテインキナーゼ N 3 (P K N 3); L M P 2、プロテアソームサブユニットベータタイプ 9 (P S M B 9) としても知られる L M P 2、転移性黒色腫; プロテアソームサブユニットベータタイプ 8 (P S M B 8) としても知られる L M P 7、転移性黒色腫; プロテアソームサブユニットベータタイプ 10 (P S M B 10) としても知られる M E C L 1、転移性黒色腫; 固形腫瘍における血管内皮増殖因子 (V E G F); 固形腫瘍におけるキネシン紡錘体タンパク質、慢性骨髄性白血病におけるアポトーシス抑制因子 B 細胞 C L L / リンパ腫 (B C L - 2); 固形腫瘍におけるリボヌクレオチドレダクターゼ M 2 (R R M 2); 固形腫瘍におけるフェーリン; 肝腫瘍のポロ様キナーゼ 1 (P L K 1)、C 型肝炎感染のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 1 (D G A T 1)、家族性大腸腺腫症のベータカテニン、ベータ 2 アドレナリン受容体、緑内障; 糖尿病性黄斑浮腫 (D M E) または加齢性黄斑変性症における D N A 損傷誘発性転写物 4 タンパク質としても知られる R T P 8 0 1 / R e d d 1; 加齢性黄斑変性症または脈絡膜血管新生における血管内皮増殖因子受容体 I (V E G F R 1)、非動脈炎性虚血性視神経症におけるカスパーゼ 2; 先天性厚硬膜のケラチン 6 A N 1 7 K 変異タンパク質; インフルエンザ感染におけるインフルエンザ A ウイルスのゲノム / 遺伝子配列; S A R S 感染における重症急性呼吸器症候群 (S A R S) コロナウイルスゲノム / 遺伝子配列; 呼吸器合胞体ウイルス感染における呼吸器合胞体ウイルスゲノム / 遺伝子配列; エボラ感染におけるエボラフィロウイルスゲノム / 遺伝子配列; B 型および C 型肝炎感染における B 型および C 型肝炎ウイルスのゲノム / 遺伝子配列; H S V 感染における単純ヘルペスウイルス (H S V) ゲノム / 遺伝子配列、コクサッキーウイルス B 3 感染におけるコクサッキーウイルス B 3 ゲノム / 遺伝子配列。原発性ジストニアにおけるトルシン A (T O R 1 A)、汎クラス I および移植に特異的な H L A 対立遺伝子のような遺伝子の病原性対立遺伝子のサイレンシング (対立遺伝子特異的サイレンシング); 常染色体優性遺伝性網膜色素変性症 (a d R P) の変異ロドプシン遺伝子 (R H O) からなる群から選択されるポリヌクレオチド反復疾患に関連する、遺伝子、遺伝子の転写物または遺伝子の転写物に結合する、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が、遺伝子編集ヌクレアーゼを含む、請求項 1、3 および 5 ~ 59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が、遺伝子編集ヌクレアーゼを含む、請求項 1、3 および 5 ~ 59 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

遺伝子編集ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) を含む、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

遺伝子編集ヌクレアーゼが、機能的なタイプ I CRISPR-Cas9 を含む、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

ステップ (a) および / またはステップ (b) が、2 回以上実行される、請求項 1 から 62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

対象が、ヒトである、請求項 1 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 65】

(a) タンパク質またはペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクター；

(b) 抗体を分解または消化するプロテアーゼまたはグリコシダーゼ、および

(c) (a) および (b) が別個のまたは同じ容器に入っている、請求項 1 ~ 64 のいずれか一項に記載の方法を実施するための説明書が記載されたラベルをその中に備えるパッケージ。

【請求項 66】

(a) タンパク質の発現を阻害、減少、または減少させる核酸に転写される異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクター；

20

(b) 抗体を分解または消化するプロテアーゼまたはグリコシダーゼ、および

(c) (a) および (b) が別個のまたは同じ容器に入っている、請求項 1 ~ 64 のいずれか一項に記載の方法を実施するための説明書が記載されたラベルをその中に備えるパッケージ。

【請求項 67】

それを必要とする患者において遺伝子治療ベクターによって治療される疾患の処置における使用のための、免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチド。

【請求項 68】

前記ベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、レンチウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターである、請求項 67 に記載の使用のための免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチド。

30

【請求項 69】

前記ベクターが、AAV1、AAV2、AAV2 変異体、AAV3、AAV3 変異体、AAV3B、AAV3B 変異体からなる群から選択されるキャプシドタンパク質を含む AAV ベクター、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6 変異体、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVcy10、AAVrh10、AAVrh74、AAVdj、AAV-Anc80、配列番号 1、配列番号 2 または AAV2i8 である、請求項 68 に記載の使用のための免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチド。

【請求項 70】

免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチドが、配列番号 3 ~ 18、23、または 48 のいずれか 1 つの配列を含む、請求項 67 ~ 69 に記載の使用のための免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチド。

40

【請求項 71】

前記免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチドが、配列番号 49 ~ 51 のいずれか 1 つの非天然シグナル配列をさらに含む、請求項 70 に記載の使用のための免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチド。

【請求項 72】

遺伝子治療ベクターによって治療される疾患が、増殖性疾患 (癌、腫瘍、異形成など)、クリグラー・ナジャールおよびクリグラー・ナジャール肝臓の代謝性疾患、フリードライヒ運動失調、感染症、(例えば、タバコ、アルコール、または薬物の) 中毒、てんかん

50

、カナパン病、副腎白質ジストロフィー、（例えば、B型またはC型肝炎ウイルス、HIVによって誘発される）ウイルス性疾患、ヘルペス、レトロウイルスなど）、遺伝性疾患（嚢胞性線維症、ジストログリカノパチー、デュシェンヌ筋ミオパチーまたはジストロフィーなどのミオパチー、筋管ミオパチー、血友病A、血友病B、鎌状細胞貧血、鎌状細胞疾患、ファンコニ貧血、糖尿病、筋萎縮症側方硬化症（ALS）、ミオチューブラリンミオパチー、脊髄筋萎縮症（SMA）などの運動ニューロン疾患、脊髄延髄筋萎縮症、またはシャルコット-マリー-歯病、関節炎、重度の組み合わせ免疫不全症（RS-SCID、ADA-SCID、X-SCIDなど）、ウイスコット・アルドリッチ症候群、X連鎖性血小板減少症、X連鎖性先天性好中球減少症、慢性肉芽腫症など）、凝固因子欠損症、心血管疾患（網膜色素変性症）、虚血、脂質異常症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症など）、網膜色素変性症、リーバー先天性黒内障、リーバー遺伝性視神経症、スターガルト病などの眼疾患；サンフィリップ症候群などのリソソーム蓄積症；CNタイプIまたはIIなどの高ビリルビン血症またはジルベール症候群；ファブリー病、GSD I、GSD II（ポンベ病）、GSD III、GSD IV、GSD V、GSD VI、GSD VIIなどのグリコーゲン蓄積症および心臓の致死的な先天性グリコーゲン蓄積症からなる群から選択される、請求項67～71に記載の使用のための免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチド。

【請求項73】

前記ベクターが、請求項72に記載の疾患を治療するのに適切な治療用ポリヌクレオチドを含む、請求項67～72に記載の使用のための免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチド。

【請求項74】

それを必要とする患者において遺伝子治療ベクターによって治療される疾患の治療に使用するための免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする、核酸配列。

【請求項75】

それを必要とする患者において遺伝子治療ベクターによって治療される疾患の治療に使用するための免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、発現ベクター。

【請求項76】

配列番号3～18、23または48のいずれかの配列を含む免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチド、配列番号3～18、23または48のいずれかの配列を含む免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸配列、または、配列番号3～18、23または48のいずれかの配列を含む免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む、それを必要とする患者の遺伝子治療ベクターによって処置される疾患の治療における使用のための治療用組成物。

【請求項77】

治療有効量の免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドを、それを必要とする対象に投与することを含む、遺伝子治療ベクターによって治療される疾患を処置するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2018年7月17日に出願された欧州特許出願EP18305971.6号、および2018年11月16日に出願された米国仮特許出願第62/767831号の優先権を主張しており、これらの出願の内容全体は、全てのテキスト、表、配列番号及び図面を含み、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

アデノ随伴ウイルス（AAV）および他のウイルスベクター、ならびに脂質、ポリマー、およびタンパク質ベースのナノ粒子遺伝子治療アプローチは、適応免疫システムによって標的化され得、鈍化された効力をもたらし、患者が治療介入に対して完全に抵抗性にな

る可能性を導く。適応免疫系は、抗原特異的免疫グロブリン（例えば、IgG）抗体であって、標的分子の阻害またはクリアランスにつながる抗体の開発に依存する。ヒトは自然に野生型AAVに曝されるので、AAV遺伝子治療は、既存の抗AAV抗体の存在によって阻害され得る。さらに、AAV遺伝子導入後の抗AAV抗体の開発は、同じまたは交差反応性ベクターでの再投与を防止することができる。

【0003】

出生後の野生型AAVへの曝露は、人生の最初の2年以内でウイルスキャプシドに向けられた抗体を誘導する(caledo et al.(2011) Clin Vaccine Immunol. 18, 1586-8; Erles et al.(1999) J Med Virol. 59, 406-1; Li et al (2012) Gene Ther. 19, 288-94)。AAV血清型および個体の年齢に応じて、抗AAV抗体に対する陽性対象の割合は60%に達することができる。いくつかの抗AAV抗体は、比較的低い力価で存在する場合であっても、細胞エントリに重要なウイルスエピトープを標的化し、ウイルス感染性を中和する。重要なことに、抗AAV抗体は、異なるAAV血清型との高度の交差反応性を示す(Boutin et al.(2010) Hum Gene Ther. 21, 704-12)。いくつかの臨床研究および臨床研究において実証されているように、このような中和抗体は、特に、ベクターが血流中に直接送達される場合、形質導入効率を劇的に減少させる(Manno et al. (2006) Nat Med. 12, 342-7; Masat et al. (2013) Discov Med. 15, 379-89; Arruda et al. (2010) Blood. 115, 4678-88; Haurigot et al. (2010) Mol Ther. 18, 1318-29; Jiang et al. (2006) Blood. 108, 3321-8; Scallan et al. (2006) Blood. 107, 1810-7)。

10

【0004】

中和抗AAV抗体の高い予備価は、AAVベクターによる遺伝子導入試験における登録から特定の対象を除外し、特定の患者を承認されたAAV遺伝子治療から除外し、可能な生命を節約する治療にアクセスすることなく特定の患者を放置する。さらに、AAV遺伝子導入に続いて、中和抗AAV抗体が誘導され、これは、同じ個体の再投与の際の形質導入効率を阻害する。例えば、血友病Bは、凝固因子IX(FIX)の欠乏または機能不全に起因する希少でX結合性出血性障害であり、重度(正常な1%未満の循環FIXレベル)の場合、頻繁な出血エピソード、関節障害の発生および早期死のリスクをもたらす(Manucci et al(2001) N Engl J Med. 344, 1773-9)。出血を予防または治療するための外因性FIX投与の現在の処置は理想的ではない。この分子の半減期は、高コストに関連する頻繁な静脈内注射、および阻害性抗体の開発の危険性を規定する。血友病Bの一遺伝子性は、遺伝子治療を、連続的な内因性FIX発現を回復させるための魅力的な選択を行い、現在の治療の制限を回避する。この点に関して、重症患者における血友病Bの長期的な補正のためのAAV媒介性遺伝子導入は、非常に有望である(Nathwani et al. (2011) N Engl J Med. 365, 2357-65; George et al. (2017) N Engl J Med. 377, 2215-2227)。しかし、既存の抗AAV抗体の存在は、AAV媒介遺伝子治療を有する特定の血友病B患者を治療するための障害物を提示する。同様に、AAV媒介遺伝子導入は、血友病A、脊髄性筋萎縮症(Mendell et al. (2017)、N Engl J. Med、377:1713-1722)および多くの他の疾患の治療に非常に有望であることが示されているが、抗AAV抗体の存在の存在は、同様に、これらの疾患および障害を有する特定の患者を処置するための障害物を提示する。

20

30

【0005】

免疫グロブリンのタンパク質分解は、宿主防御システムを回避するために病原体によって使用される一般的なメカニズムである(Travis et al. (2000) Biochim Biophys Acta. 1477, 35-50; Travis et al. (1995) Trends Microbiol. 3, 405-7)。たとえば、IdeSは、他のいくつかの種に加えて、ヒトIgGに見られる標的配列に特異性を示す病原性細菌Streptococcus pyogenesによって発現される、天然に存在する35kDaシステインプロテアーゼ、具体的にはエンドペプチダーゼである。IdeSはヒンジ領域の下でIgGを切断することができ(von Pawel-Rammingen et al. (2003) Curr Opin Microbiol. 6, 50-5)、F(ab')₂およびFc/2フラグメントの生成をもたらす(Ryan et al. (2008) Mol Immunol. 45, 1837-46)。

40

【0006】

50

さらなる例として、EndoSは、Spyogenes由来の天然に存在するグリコシダーゼ、具体的にはエンドグリコシダーゼであり、ヒトIgGからのグリカンの特異的に加水分解し、Fc受容体結合を含む抗体エフェクター機能を変化させる。

【0007】

本明細書に記載されるのは、とりわけ、免疫グロブリンに存在するペプチド結合を切断するプロテアーゼを投与することによって、または炭水化物残基を切断するグリコシダーゼを投与することによって、遺伝子治療ベクターに対する中和抗体を開発するかまたは既に有する可能性がある患者を治療するための方法である。免疫グロブリン、またはインビボでの免疫グロブリンの他の同様の酵素的切断に存在する。本明細書には、とりわけ、切断するプロテアーゼを投与することにより、異種ポリヌクレオチド、または遺伝子治療ベクターによってキャプシド形成された異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する既存の抗体を開発または既に有する可能性がある患者を治療するための方法も記載される。免疫グロブリンに存在するペプチド結合、または免疫グロブリンに存在する炭水化物残基を切断するグリコシダーゼの投与、またはインビボでの免疫グロブリンの他の同様の酵素的切断による。

10

【0008】

要約

本明細書に開示されるのは、IdeSなどのプロテアーゼを利用して、ヒト血漿中の抗体（例えば、IgG）レベルを低下させるための方法である。本発明による方法は、とりわけ、遺伝子治療ベクターに対する既存の中和抗体を有する患者を治療するために、および遺伝子治療ベクターで以前に治療された患者を再投与するために使用され得る。

20

【0009】

特定の実施態様において、タンパク質の機能または活性の喪失によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療する方法は、以下を含む：(a)対象に、タンパク質の機能または活性を提供または補足するタンパク質またはペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターを投与すること；及び(b)前記組換えウイルスベクターおよび/または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体のエフェクター機能を分解または消化および/または阻害または低減するのに有効な量のプロテアーゼまたはグリコシダーゼを対象に投与すること。

30

【0010】

特定の実施態様において、タンパク質の機能活性または発現の獲得によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療する方法は、以下を含む：(a)前記タンパク質の機能、活性、または発現の獲得の発現を阻害、減少、または減少させる核酸に転写される、異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターを対象に投与すること；及び(b)前記組換えウイルスベクターに結合する抗体のエフェクター機能を分解または消化および/または阻害または低減するのに有効なプロテアーゼまたはグリコシダーゼを対象に投与すること。

【0011】

特定の実施態様において、タンパク質の機能または活性の喪失によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療する方法は、以下を含む：(a)分解または消化および/またはウイルスベクター結合抗体のエフェクター機能を阻害または低減するのに有効なプロテアーゼまたはグリコシダーゼを対象に投与すること；及び(b)前記タンパク質の機能または活性を提供または補足するタンパク質またはペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターを対象に投与すること。

40

【0012】

特定の実施態様において、タンパク質の機能活性または発現の獲得によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療する方法は、以下を含む：(a)分解するのに有効なプロテアーゼまたはグリコシダーゼを対象に投与する、またはウイルスベクター結合抗体のエフェクター機能を消化および/または阻害または低減すること；(b)前記タンパク質の機能獲得、活性または発現の発現を阻害、減少または減少させる核酸に転写さ

50

れる異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターを対象に投与すること。

【0013】

特定の実施態様では、対象のステップ（b）を治療する方法において、ステップ（a）が実行された後、約90日以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約60日以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約45日以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約30日以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約21日以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約14日以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約7日以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約72時間以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約48時間以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約24時間以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約12時間以内に実行される。特定の実施態様では、ステップ（b）は、ステップ（a）の前または後の約6時間以内に実行される。

10

【0014】

特定の実施態様において、プロテアーゼは、システインプロテアーゼまたはチオールプロテアーゼを含む。特定の実施態様において、プロテアーゼは、*Streptococcus pyogenes*（ストレプトコッカス・ピオゲネス）、*Streptococcus equi*（ストレプトコッカス・エクイ）または*Mycoplasma canis*（マイコプラズマ・カニス）からのプロテアーゼを含む。特定の実施態様において、プロテアーゼは、配列番号3～18、23または48のいずれかに記載されるIDeSまたはその改変変異体を含む。

20

【0015】

特定の実施態様において、グリコシダーゼは、エンドグリコシダーゼを含む。特定の実施態様において、エンドグリコシダーゼは、配列番号44～47のいずれかに示される配列を含む。

【0016】

特定の実施態様において、プロテアーゼまたはグリコシダーゼは、ヒト抗体のエフェクター機能を分解または消化し、および/または阻害または低減する。

30

【0017】

特定の実施態様において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む。

【0018】

特定の実施態様において、レンチウイルスベクターは、抗体が結合するエンベロープタンパク質を含む。

【0019】

特定の実施態様において、AAVベクターは、抗体が結合するキャプシドタンパク質を含む。

40

【0020】

特定の実施態様において、AAVベクターは、抗体が結合するVP1、VP2および/またはVP3キャプシドタンパク質を含む。

【0021】

特定の実施態様において、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV3B、AAV-2i8、Rh10、Rh74、配列番号1および配列番号2 VP1、VP2および/またはVP3キャプシドタンパク質からなる群から選択されるVP1、VP2および/またはVP3キャプシドタンパク質に対して60%以上の配列同一性を有するVP1、VP2および/またはVP3キャプシドタンパク質を含む。

50

【0022】

特定の実施態様において、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV3B、AAV-2i8、Rh10、Rh74、配列番号1および配列番号2のVP1、VP2および/またはVP3キャプシドタンパク質からなる群から選択されるVP1、VP2および/またはVP3キャプシドタンパク質に対して100%の配列同一性を有するVP1、VP2および/またはVP3キャプシドタンパク質を含む。

【0023】

特定の実施態様において、対象は、前記ウイルスベクターに結合する抗体を有する。

【0024】

特定の実施態様において、ウイルスベクターに結合する抗体は、対象に存在しない。

【0025】

特定の実施態様において、対象は、異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体を有する。

【0026】

特定の実施態様において、抗体は、IgG、IgM、IgA、IgDおよび/またはIgEを含む。

【0027】

特定の実施態様では、方法は、ステップ(a)を実行する前、ステップ(a)を実行した後しかステップ(b)を実行する前、および/またはステップ(a)および(b)を実行した後に、前記対象に存在するウイルスベクター結合抗体の存在を決定し、その量またはエフェクター機能を定量化することを含む。

【0028】

特定の実施態様では、方法は、ステップ(a)を実行する前、ステップ(a)を実行した後、しかステップ(b)を実行する前に、および/またはステップ(a)および(b)を実行した後に前記サンプルに存在するウイルスベクター結合抗体の存在、量、またはエフェクター機能について、前記対象からの生物学的サンプルを分析することを含む。

【0029】

特定の実施態様では、対象からの生物学的サンプルは血液製剤である。特定の実施態様において、血液製剤は、血漿または血清を含む。

【0030】

特定の実施態様において、方法は、前記ウイルスベクター結合抗体の20~50%、50~75%、75~90%、90~95%、または95%以上の減少をもたらす。

【0031】

特定の実施態様において、対象からの生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在するウイルスベクター結合抗体は、約1:100,000未満であり、ここで、100,000部の緩衝液で希釈された前記生物学的サンプルまたは血液製剤の1部は、50%ウイルスベクターの中和をもたらす。

【0032】

特定の実施態様において、前記対象からの前記生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在するウイルスベクター結合抗体は、約1:50,000未満であり、ここで、50,000部の緩衝液で希釈された1部の生物学的サンプルまたは血液製剤は、50%ウイルスベクター中和をもたらす。

【0033】

特定の実施態様において、対象からの生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在するウイルスベクター結合抗体は、約1:10,000未満であり、ここで、10,000部の緩衝液で希釈された生物学的サンプルまたは血液製剤の1部は、50%ウイルスベクター中和をもたらす。

【0034】

特定の実施態様において、対象からの生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在するウ

10

20

30

40

50

イルスペクター結合抗体は、約 1 : 1 , 0 0 0 未満であり、ここで、1 0 0 0 部の緩衝液で希釈された生物学的サンプルまたは血液製剤の 1 部は、5 0 % ウイルスペクター中和をもたらす。

【 0 0 3 5 】

特定の実施態様において、対象からの生物学的サンプルまたは血液製剤に存在するイルスペクター結合抗体は、約 1 : 1 0 0 未満であり、1 0 0 部の緩衝液で希釈された 1 部の生物学的サンプルまたは血液製剤は、5 0 % ウイルスペクター中和をもたらす。

【 0 0 3 6 】

特定の実施態様において、対象からの生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在するイルスペクター結合抗体は、約 1 : 1 0 未満であり、ここで、1 0 部の緩衝液で希釈された 1 部の生物学的サンプルまたは血液製剤は、5 0 % ウイルスペクター中和をもたらす。

10

【 0 0 3 7 】

特定の実施態様において、生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在するイルスペクター結合抗体は、約 1 : 5 未満であり、ここで、生物学的サンプルまたは血液製剤の 1 部を 5 部の緩衝液で希釈すると、5 0 % のイルスペクター中和が得られる。

【 0 0 3 8 】

特定の実施態様において、生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在するイルスペクター結合抗体の比率は、約 1 : 4 未満であり、ここで、4 部の緩衝液で希釈された 1 部の生物学的サンプルまたは血液製剤は、イルスペクターの中和 5 0 % をもたらす。

【 0 0 3 9 】

特定の実施態様において、生物学的サンプルまたは血液製剤中に存在するイルスペクター結合抗体の比率は、約 1 : 3 未満であり、3 部の緩衝液で希釈された 1 部の生物学的サンプルまたは血液製剤は、5 0 % ウイルスペクターの中和をもたらす。

20

【 0 0 4 0 】

特定の実施態様において、対象、生物学的サンプルまたは血液製剤に存在するイルスペクター結合抗体の比率は、約 1 : 2 未満であり、ここで、生物学的サンプルまたは血液製剤の 1 部が 2 部の緩衝液で希釈されると、5 0 % のイルスペクター中和をもたらす。

【 0 0 4 1 】

特定の実施態様において、対象、生物学的サンプルまたは血液製剤に存在するイルスペクター結合抗体の比率は、約 1 : 1 未満であり、ここで、生物学的サンプルまたは血液製剤の 1 部が、緩衝液の 1 部で希釈されると、5 0 % のイルスペクター中和をもたらす。

30

【 0 0 4 2 】

特定の実施態様において、方法は、ステップ (a) を実行した後しかステップ (b) を実行する前および / またはステップ (a) および (b) を実行した後に、異種ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドまたはペプチドに結合する抗体の存在を決定または定量することを含む。

【 0 0 4 3 】

特定の実施態様において、方法は、ステップ (a) を実行した後しかステップ (b) を実行する前、および / またはステップ (a) および (b) を実行した後に、核酸に結合する抗体の存在を決定するか、またはその量を定量化することを含む。

40

【 0 0 4 4 】

特定の実施態様において、対象は、肺疾患 (例えば、嚢胞性線維症) 、出血性障害 (例えば、インヒビターを伴うまたは伴わない血友病 A または血友病 B) 、サラセミア、血液障害 (例えば、貧血) 、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (A L S) 、てんかん、リソソーム蓄積症 (例えば、アスパルチルグルコサミン尿症、パッテン病、後期乳児神経セロイドリポフスチン症 2 型 (C L N 2) 、シスチン症、ファブリー病、ゴーチャー病 I 型、II 型、および III 型、グリコーゲン蓄積症 II (ポンペ病) 、GM 2 - ガングリオシドーシス I 型 (テイサックス病) 、GM 2 - ガングリオシドーシス II 型 (サンドホフ病) 、ムコリポドーシス I 型 (シアリドーシス I 型お

50

よび I I 型)、I I (I 細胞疾患)、I I I (疑似ハーラー病) および I V、ムコ多糖蓄積症 (ハーラー病および変異体、ハンター、サンフィリップタイプ A、B、C、D、モルキオタイプ A および B、マロトー - ラミー および スライ病)、ニーマンピック病タイプ A / B、C 1 および C 2、および シンドラー病タイプ I および I I)、遺伝性血管浮腫 (H A E)、銅または鉄の蓄積障害 (例えば、ウィルソン病またはメンケス病)、リソソーム酸性リパーゼ欠損症、神経障害または神経変性障害、癌、1 型または 2 型糖尿病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、代謝障害 (例えば、糖原病)、固形臓器の疾患 (例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓)、または感染性ウイルス (例えば、B 型および C 型肝炎、H I V など)、細菌性または真菌性疾患を有する。特定の実施態様において、対象は、血液凝固障害を有する。特定の実施態様において、対象は、血友病 A、阻害性抗体を伴う血友病 A、血友病 B、阻害性抗体を伴う血友病 B、任意の凝固因子の欠損: V I I、V I I I、I X、X、X I、V、X I I、I I、フォンウィルブランド因子、または F V / F V I I I 欠損症、サラセミア、ビタミン K エポキシドレダクターゼ C 1 欠損症、またはガンマカルボキシラーゼ欠損症の組み合わせを有する。

10

【0045】

特定の実施態様において、対象は、貧血、外傷に関連する出血、損傷、血栓症、血小板減少症、脳卒中、凝固障害、播種性血管内凝固症候群 (D I C); ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖、ワルファリン、小分子抗血栓薬 (すなわち、F X a 阻害剤)、またはベルナル・スリエ症候群、グランツマン血小板無力症、または貯蔵プール欠乏症などの血小板障害に関連する過剰抗凝固を有する。

20

【0046】

特定の実施態様では、対象は、中枢神経系 (C N S) に影響を与えるか、または中枢神経系 (C N S) に起因する疾患を有する。特定の実施態様では、疾患は神経変性疾患である。特定の実施態様では、C N S または神経変性疾患は、アルツハイマー病、ハンチントン病、A L S、遺伝性痙攣性片麻痺、原発性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、ケネディ病、ポリグルタミン反復病、またはパーキンソン病である。特定の実施態様において、C N S または神経変性疾患は、ポリグルタミン反復疾患である。特定の実施態様において、ポリグルタミン反復性疾患は、脊髄小脳失調症 (S C A 1、S C A 2、S C A 3、S C A 6、S C A 7、または S C A 1 7) である。

30

【0047】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、インスリン、グルカゴン、成長ホルモン (G H)、副甲状腺ホルモン (P T H)、成長ホルモン放出因子 (G R F)、濾胞刺激ホルモン (F S H) からなる群から選択されるタンパク質、黄体形成ホルモン (L H)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (h C G)、血管内皮成長因子 (V E G F)、アンジオポイエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G C S F)、エリスロポイエチン (E P O)、結合組織成長因子 (C T G F)、基本的な線維芽細胞成長因子 (b F G F)、酸性線維芽細胞成長因子 (a F G F)、表皮成長因子 (E G F)、形質転換成長因子 (T G F)、血小板由来成長因子 (P D G F)、インスリン成長因子 I および I I (I G F - I および I G F - I I)、T G F、アクチビン、インヒビン、骨形態形成タンパク質 (B M P)、神経成長因子 (N G F)、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、ニューロトロフィン N T - 3 および N T 4 / 5、繊毛神経栄養因子 (C N T F)、グリア細胞株派生神経栄養因子 (G D N F)、ニューロニン、アグリ n、ネトリン - 1 およびネトリン - 2、肝細胞増殖因子 (H G F)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグおよびチロシンヒドロキシラーゼをコードする。。

40

【0048】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、トロンボポイエチン (T P O)、インターロイキン (I L 1 から I L - 3 6)、単球化学誘引物質タンパク質、白血病阻害因子、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子、F a s リガンドからなる群から選択されるタンパク質、腫瘍壊死因子 および、インターロイキン、および、幹細胞因子、f l k - 2 / f l t 3 リガンド、I g G、I g M、I g A、I g D および I g E、

50

キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、単鎖抗体、T細胞受容体、キメラT細胞受容体、単球T細胞受容体、クラスIおよびクラスII MHC分子をコードする。

【0049】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、CFTR（嚢胞性線維症膜貫通調節タンパク質）、血液凝固（凝固）因子（因子XIII、因子IX、因子VIII、因子X、因子VII、因子VIIa、タンパク質Cなど）、機能獲得血液凝固因子、抗体、網膜色素上皮特異的65kDaタンパク質（RPE65）、エリスロポエチン、LDL受容体、リポタンパク質リパーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、 α -グロビン、 β -グロビン、スペクトリン、 α -アンチトリプシン、アデノシンデアミナーゼ（ADA）、金属トランスポーター（ATP7AまたはATP7）、スルファミダーゼ、リソソーム蓄積症（ARSA）に関する酵素、ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ、 α -25グルコセレブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、リソソームヘキサミンダーゼ、分岐鎖ケト、ホルモン、成長因子、インスリン様成長因子1または2、血小板由来成長因子、表皮成長因子、神経成長因子、神経栄養因子-3および-4、脳由来神経栄養因子、グリア派生成長因子、形質転換成長因子 および、サイトカイン、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、インターフェロン- γ 、インターロイキン-2、インターロイキン-4、インターロイキン12、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシン、自殺遺伝子産物、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクロームP450、デオキシチジンキナーゼ、腫瘍壊死因子、薬剤耐性タンパク質、腫瘍抑制タンパク質（例、p53、Rb、Wt-1、NF1、フォンヒッペル-リンドウ（VHL）、腺腫性ポリポーシスコリ（APC））、免疫調節特性を有するペプチド、寛容原性または免疫原性ペプチドまたはタンパク質トレプトームまたはhCDR1、インスリン、グルコキナーゼ、グアニル酸シクラーゼ2D（LCA-GUCY2D）、Rabエスコートタンパク質1（Choroideremia）、LCA5（LCA-レベルシリン）、オルニチンケト酸アミノトランスフェラーゼ（ジャイレート萎縮）、レチノスキシン1（X連鎖網膜分離症）、USH1C（アッシャー症候群1C）、X連鎖網膜色素変性症GTPase（XLRP）、MERTK（AR型RP：網膜色素変性症）、DFNB1（Connexin26 deafness）、ACHM2、3および4（色覚異常）、PKD-1またはPKD-2（多発性嚢胞腎）、TPP1、CLN2、スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼ、カテプシンA、GM2-AP、NPC1、VPC2、スフィンゴ脂質活性化タンパク質、ゲノム編集用の1つ以上のジンクフィンガーヌクレアーゼ、およびゲノム編集用の修復テンプレートとして使用される1つ以上のドナー配列をコードする。

【0050】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、阻害性核酸をコードする。特定の実施態様において、阻害性核酸は、siRNA、アンチセンス分子、miRNA、RNAi、リボザイム、およびshRNAからなる群から選択される。特定の実施態様において、阻害性核酸は、またはハンチンチン（HTT）遺伝子、歯状パリドルイジアン萎縮に関連する（アトロフィン1、ATN1）、脊髄延髄筋萎縮症のX染色体上のアンドロゲン受容体、ヒトアタキシン-1、-2、-3、および-7、Cav2.1 P/Q電位依存性カルシウムチャンネル（CACNA1A）、TATA-結合タンパク質、アタキシン8反対鎖（ATXN8OS）、脊髄小脳性運動失調におけるセリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼ2A 55kDa調節サブユニットBベータアイソフォーム（タイプ1、2、3、6、7、8、12、17）、FMR1（脆弱X精神遅滞1）脆弱X症候群、脆弱X関連振戦/運動失調症候群のFMR1（脆弱X精神遅滞1）、脆弱XE精神遅滞のFMR1（脆弱X精神遅滞2）またはAF4/FMR2ファミリーメンバー2；筋緊張性ジストロフィーにおけるミオトニンタンパク質キナーゼ（MT-PK）；フリードライヒ運動失調症のフラタキシン；筋萎縮性側索硬化症におけるスーパーオキシドジスムターゼ1（SOD1）遺伝子の変異体；パーキンソン病および/またはアルツハイマー病の病因に関連する遺伝子。アポリポタンパク質B（APOB）およびプロタンパク質転換酵素サブチ

リシン/ケキシン9型(PCSK9)、高コレステロール血症; HIV感染における転写遺伝子のヒト免疫不全ウイルストランス活性化因子であるHIV Tat; HIV感染におけるHIV TAR、HIV TAR、ヒト免疫不全ウイルストランス活性化因子応答要素遺伝子mHIV感染症におけるC-Cケモカイン受容体(CCR5)、RSV感染におけるラウス肉腫ウイルス(RSV)ヌクレオカプシドタンパク質、C型肝炎ウイルス感染における肝臓特異的マイクロRNA(miR-122)、p53、急性腎障害または移植片機能の遅延腎移植または腎障害急性腎不全; 事前に再発性または転移性の固形悪性腫瘍のプロテインキナーゼN3(PKN3)、LMP2、プロテアソームサブユニットベータタイプ9(PSMB9)としても知られるLMP2、転移性黒色腫、LMP7、転移性黒色腫としても知られているプロテアソームサブユニットベータタイプ8(PSMB8)、MECL1、転移性黒色腫としても知られているプロテアソームサブユニットベータタイプ10(PSMB10)、固形腫瘍における血管内皮増殖因子(VEGF); 固形腫瘍におけるキネシン紡錘体タンパク質、慢性骨髄性白血病におけるアポトーシス抑制因子B細胞CLL/リンパ腫(BCL-2)。固形腫瘍におけるリボヌクレオチドレダクターゼM2(RRM2); 固形腫瘍におけるフェーリン; 肝腫瘍のポロ様キナーゼ1(PLK1)、C型肝炎感染のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ1(DGAT1)、家族性大腸腺腫症のベータカテニン。ベータ2アドレナリン受容体、緑内障; 糖尿病性黄斑浮腫(DME)または加齢性黄斑変性症におけるDNA損傷誘発性転写物4タンパク質としても知られているRTP801/Redd1、加齢性黄斑変性症または脈絡膜血管新生における血管内皮増殖因子受容体I(VEGFR1)、非動脈炎性虚血性視神経症におけるカパーゼ2、先天性厚硬膜のケラチン6AN17K変異タンパク質、インフルエンザ感染におけるインフルエンザAウイルスのゲノム/遺伝子配列; SARS感染における重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスゲノム/遺伝子配列; 呼吸器合胞体ウイルス感染における呼吸器合胞体ウイルスゲノム/遺伝子配列; エボラ感染におけるエボラフィロウイルスゲノム/遺伝子配列; B型およびC型肝炎感染におけるB型およびC型肝炎ウイルスのゲノム/遺伝子配列、HSV感染における単純ヘルペスウイルス(HSV)ゲノム/遺伝子配列、コクサッキーウイルスB3感染におけるコクサッキーウイルスB3ゲノム/遺伝子配列; 原発性ジストニアにおけるトルシンA(TOR1A)、汎クラスIおよび移植に特異的なHLA対立遺伝子のような遺伝子の病原性対立遺伝子のサイレンシング(対立遺伝子特異的サイレンシング)、常染色体優性遺伝性網膜色素変性症(adRP)の変異ロドプシン遺伝子(RHO)からなる群から選択される遺伝子、遺伝子の転写物、ポリヌクレオチド反復疾患に関連する遺伝子の転写物に結合する。

【0051】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、遺伝子編集ヌクレアーゼを含む。特定の実施態様において、遺伝子編集ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)を含む。特定の実施態様において、遺伝子編集ヌクレアーゼは、機能的なタイプII CRISPR-Cas9を含む。

【0052】

特定の実施態様では、本発明による方法のステップ(a)および/またはステップ(b)は、2回以上実行される。

【0053】

特定の実施態様では、対象は哺乳動物である。特定の実施態様では、対象はヒトである。

【0054】

本発明による方法を実施するために使用することができる構成要素を有する組成物、例えば、これらに限定されないパッケージおよびキットも本明細書に開示される。

【0055】

特定の実施態様において、パッケージまたはキットは、その中に配置されている: (a) タンパク質またはペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベ

10

20

30

40

50

クター；(b)抗体を分解または消化するプロテアーゼまたはグリコシダーゼ；(c)本明細書に開示される方法を実行するための指示が記載されたラベル；特定の実施態様では、(a)および(b)は、別個のまたは同じ容器内にある。

【0056】

特定の実施態様において、パッケージまたはキットは、その中に配置されている：(a)タンパク質の発現を阻害、減少または減少させる核酸に転写される異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクター；(b)抗体を分解または消化するプロテアーゼまたはグリコシダーゼ；(c)本明細書に開示される方法を実行するための指示が記載されたラベル。特定の実施態様では、(a)および(b)は、別個のまたは同じ容器内にある。

【0057】

特定の実施態様において、それを必要とする対象に治療有効量の免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドを投与することを含む、ベクターを使用する遺伝子治療によって治療される疾患を治療するための方法。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】図1は、IVIgで再構成されたマウスにおけるヒトIgGの加水分解を示すグラフである。野生型C57BL/6マウスをヒトIgG(IVIg、9mg/マウス)で再構成し、30分後にIdeS(250IU/マウス、3マウス)またはPBS(2マウス)を注射した。IdeSの注射前、および1、6、10時間後に採血した。無傷のヒトIgGは、ELISAによってマウス血清で測定され、IVIgを標準として使用して μ g/mLとして表す。

【図2】図2は、抗AAV IgGのインビボ中和のための実験プロトコルのスキームである。野生型C57BL/6マウス(グループあたり6匹のマウス)または血友病B(HB)マウス(グループあたり4匹のマウス)をヒトIgG(IVIg、9mg/マウス、日(D)マイナス1(D-1))で再構成し、そして30分(分、分)後にIdeS(250、500または1250IU/マウス、D-1+30分)を注射した。30時間(hr、h)後(D0)、マウスにAAV8ベクター(2×10^{10} vg/マウス)を注射した。IVIg注射の15分後、IdeS注射の24時間後、およびD-7、D7、D14、D28で採血した。安楽死(D28)で、ベクターゲノムコピー数(VGCN)評価のために肝臓を収集した。対照マウスは、AAVベクター注射の前にIVIgのみ、IdeSのみ、またはPBSのみを投与された。

【図3A-B】図3A、3B、3C、3D、3E、および3Fは、受動免疫マウスにおける、それぞれヒト抗AAV8 IgG、抗AAV8中和抗体(NAb)、抗AAV2 IgG、抗AAV2 NAb、抗AAV9 IgGおよび抗AAV9 NAbに対するIdeSの効果を示すグラフである。D-1+15分およびD-1+24で、IVIgおよびIdeS(IVIg/IdeS)またはIVIgのみ(IVIg/PBS)を注射したマウス(6マウス/グループ)から血液を採取した(図2のスキームを参照)。IdeSの用量は、図3A、3B、3Cおよび3Dで250IU/マウス、そして、3Eおよび3Fで、500IU/マウスであった。抗AAV IgGのレベルはELISAによって測定され、AAVNAbのレベルは中和アッセイによって測定された。それぞれ、抗AAV8、抗AAV2、および抗AAV9 IgGのレベルを図1および2に示した。3A、3C、および3Eの抗AAV8、抗AAV2および抗AAV9 NAbのレベルは、それぞれ μ g/mLで表した。3B、3Dおよび3Fの抗AAV8、抗AAV2および抗AAV9 NAbのレベルは、力価(1/x)で表した。データは平均 \pm SDとして表した。統計的差異は、ノンパラメトリックな両側マンホイットニー検定を使用して評価した(ns：有意ではない)。

【図3C-D】図3A、3B、3C、3D、3E、および3Fは、受動免疫マウスにおける、それぞれヒト抗AAV8 IgG、抗AAV8中和抗体(NAb)、抗AAV2 IgG、抗AAV2 NAb、抗AAV9 IgGおよび抗AAV9 NAbに対するIdeSの効果を示すグラフである。D-1+15分およびD-1+24で、IVIgおよびIde

10

20

30

40

50

S (I V I g / I d e S) または I V I g のみ (I V I g / P B S) を注射したマウス (6 マウス / グループ) から血液を採取した (図 2 のスキームを参照) 。 I d e S の用量は、図 3 A 、 3 B 、 3 C および 3 D で 2 5 0 I U / マウス、そして、 3 E および 3 F で、 5 0 0 I U / マウスであった。抗 A A V I g G のレベルは E L I S A によって測定され、 A A V N A b のレベルは中和アッセイによって測定された。それぞれ、抗 A A V 8 、 抗 A A V 2 、 および抗 A A V 9 I g G のレベルを図 1 および 2 に示した。 3 A 、 3 C 、 および 3 E の抗 A A V 8 、 抗 A A V 2 および抗 A A V 9 N A b のレベルは、それぞれ $\mu\text{g} / \text{mL}$ で表した。 3 B 、 3 D および 3 F の抗 A A V 8 、 抗 A A V 2 および抗 A A V 9 N A b のレベルは、力価 (1 / x) で表した。データは平均 \pm S D として表した。統計的差異は、ノンパラメトリックな両側マンホイットニー検定を使用して評価した (n s : 有意ではない) 。

10

【図 3 E - F】図 3 A 、 3 B 、 3 C 、 3 D 、 3 E 、 および 3 F は、受動免疫マウスにおける、それぞれヒト抗 A A V 8 I g G 、 抗 A A V 8 中和抗体 (N A b) 、 抗 A A V 2 I g G 、 抗 A A V 2 N A b 、 抗 A A V 9 I g G および抗 A A V 9 N A b に対する I d e S の効果を示すグラフである。 D - 1 + 1 5 分 および D - 1 + 2 4 で、 I V I g および I d e S (I V I g / I d e S) または I V I g のみ (I V I g / P B S) を注射したマウス (6 マウス / グループ) から血液を採取した (図 2 のスキームを参照) 。 I d e S の用量は、図 3 A 、 3 B 、 3 C および 3 D で 2 5 0 I U / マウス、そして、 3 E および 3 F で、 5 0 0 I U / マウスであった。抗 A A V I g G のレベルは E L I S A によって測定され、 A A V N A b のレベルは中和アッセイによって測定された。それぞれ、抗 A A V 8 、 抗 A A V 2 、 および抗 A A V 9 I g G のレベルを図 1 および 2 に示した。 3 A 、 3 C 、 および 3 E の抗 A A V 8 、 抗 A A V 2 および抗 A A V 9 N A b のレベルは、それぞれ $\mu\text{g} / \text{mL}$ で表した。 3 B 、 3 D および 3 F の抗 A A V 8 、 抗 A A V 2 および抗 A A V 9 N A b のレベルは、力価 (1 / x) で表した。データは平均 \pm S D として表した。統計的差異は、ノンパラメトリックな両側マンホイットニー検定を使用して評価した (n s : 有意ではない) 。

20

【図 4 A - B】図 4 A 、 4 B 、 4 C および 4 D は、 I d e S 処置が、受動的に免疫されたマウスにおいて A A V 8 ベクターで導入遺伝子発現を救済することを示すグラフである。 I V I g または P B S で受動免疫し、 I d e S (2 5 0 I U / マウス (図 4 A および 4 B) または 1 2 5 0 I U / マウス (図 4 C および 4 D)) または P B S を注射したマウス (6 匹のマウス / グループ) を 2×10^{10} v g / で処理した。ヒト第 I X 因子 (h F I X) (図 4 A および 4 B) またはガウシアルシフェラーゼ (G L u c) (図 4 C および 4 D) をコードするマウス A A V 8 ベクター。図 4 A : h F I X 血漿レベルは、特定の抗 h F I X E L I S A を使用して測定された。 h F I X レベルは、精製された h F I X を標準として使用して $\mu\text{g} / \text{mL}$ として表す。図 4 C : 血漿中のガウシアルシフェラーゼ活性は、発光アッセイを使用して測定された。 G L u c アクティビティは、 R L U (R e l a t i v e L i g h t U n i t s) として表す。図 4 B および 4 D : 犠牲時の q P C R によるマウスの肝臓における二倍体ゲノムあたりのベクターゲノムコピー数。データは平均 \pm S D として表す。統計分析は、ダネット検定を使用した二元配置分散分析によって実行された。

30

40

【図 4 C - D】図 4 A 、 4 B 、 4 C および 4 D は、 I d e S 処置が、受動的に免疫されたマウスにおいて A A V 8 ベクターで導入遺伝子発現を救済することを示すグラフである。 I V I g または P B S で受動免疫し、 I d e S (2 5 0 I U / マウス (図 4 A および 4 B) または 1 2 5 0 I U / マウス (図 4 C および 4 D)) または P B S を注射したマウス (6 匹のマウス / グループ) を 2×10^{10} v g / で処理した。ヒト第 I X 因子 (h F I X) (図 4 A および 4 B) またはガウシアルシフェラーゼ (G L u c) (図 4 C および 4 D) をコードするマウス A A V 8 ベクター。図 4 A : h F I X 血漿レベルは、特定の抗 h F I X E L I S A を使用して測定された。 h F I X レベルは、精製された h F I X を標準として使用して $\mu\text{g} / \text{mL}$ として表す。図 4 C : 血漿中のガウシアルシフェラーゼ活性は、発光アッセイを使用して測定された。 G L u c アクティビティは、 R L U (R e l a t

50

ive Light Units)として表す。図4Bおよび4D：犠牲時のqPCRによるマウスの肝臓における二倍体ゲノムあたりのベクターゲノムコピー数。データは平均±SDとして表す。統計分析は、ダネット検定を使用した二元配置分散分析によって実行された。

【図5A-B】図5Aおよび5Bは、IdeSによるヒトおよび非ヒト霊長類抗AAV8 IgGのインビトロ消化のアッセイを示すグラフである。IVIg(200μg)、AAV8血清陽性ヒトの血清、およびAAV8血清陽性サル血清を、IdeS(100IU)またはPBSとともに37°Cで22時間インキュベートした。図5Aは、ELISAによって測定された抗AAV8 IgGのレベルを示している。図5Bは、AAV中和アッセイの結果(左Y軸)および希釈で観察された中和活性の%(右Y軸、黒い星)を示す。データは平均±SDとして表す。

10

【図6A-B】図6Aおよび6Bは、IdeS治療が、受動的に免疫された血友病B(HB)マウスにおいてAAV8ベクターによる効率的な遺伝子治療を可能にすることを示すグラフである。HBマウス(グループあたり4匹のマウス)をヒトIgG(IVIg、9mg/マウス、D-1)で再構成し、30分後にIdeS(1250IU/マウス、D-1+30分)を注射した。24時間後(D0)、マウスに、hFIX導入遺伝子(2x1010vg/マウス)を運ぶAAV8ベクターを注射した。IdeS注射の24時間後、およびD7とD14で採血した。専用のELISAを使用して血漿中のhFIXのレベルを測定した(図6A)。D21で、HBマウスにおける遺伝子治療の有効性は、テールクリップ出血アッセイを使用して評価され、20分間にわたる失血が推定された(図6B)。

20

データは平均±SDとして表す。統計分析は、hFIX ELISAのダネット検定を使用した二元配置分散分析とテールクリップアッセイのダネット検定を使用した一元配置分散分析によって実行された(*:p<0.05;***:p<0.001)。

【図7】図7は、NHPにおける実験プロトコルのスキームである。AAV8(NAb力価1:17.2)に対して血清陽性の2匹のオスのカニクイザルに2x1012vg/kgのAAV8-hFIXベクター(D0)を注入した。ベクター注射の前に、NHP2はD-2日目とD-1日目(NHP処理)にIdeS(500μg/kg)の二重注射(i.v.)を受けた。NHP1は前治療を受けていない(対照NHP)。血液サンプルは、IdeS注射の前後、およびD0、D1、D4、D7、D13、D21、D28、D35、およびD50で収集された。安楽死(D50)で、VGCN評価のために4つの葉から

30

肝生検が収集された。

【図8A-B】図8A、8Bおよび8Cは、AAV8血清陽性サルにおけるIgGに対するIdeS処置の効果を示すグラフである。図8A：血清中の無傷のIgGレベルをELISAで測定し、精製サルIgGを標準として使用してmg/mLとして表す。図8B：血清中の抗AAV8 IgGレベルをELISAによるIdeS処理の前後に測定した。治療を受けたサル(NHP2)では、IdeSの注射後に抗AAV8 IgGレベルが2.7分の1に減少した(2.86から1.05μg/mL)。図8C：中和アッセイを使用して、IdeS処理の前後に抗AAV8 NAbレベルを測定した。処理されたサル(NHP2)では、抗AAV8 NAb力価が3分の1に減少しました(力価は17.2から5.4)。

40

データは平均±SDとして表す。統計分析は、Tukey検定を使用した双方向ANOVAによって実行された(ns:有意ではない;*:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001; ****:p<0.0001)。

【図8C】図8A、8Bおよび8Cは、AAV8血清陽性サルにおけるIgGに対するIdeS処置の効果を示すグラフである。図8A：血清中の無傷のIgGレベルをELISAで測定し、精製サルIgGを標準として使用してmg/mLとして表す。図8B：血清中の抗AAV8 IgGレベルをELISAによるIdeS処理の前後に測定した。治療を受けたサル(NHP2)では、IdeSの注射後に抗AAV8 IgGレベルが2.7分の1に減少した(2.86から1.05μg/mL)。図8C：中和アッセイを使用して、IdeS処理の前後に抗AAV8 NAbレベルを測定した。処理されたサル(NHP2)では、抗AAV8 NAb力価が3分の1に減少しました(力価は17.2から5.4

50

に)。データは平均 \pm SDとして表す。統計分析は、Tukey検定を使用した双方向ANOVAによって実行された(ns : 有意ではない ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$)。

【図9A - B】図9Aおよび9Bは、IdeSで処理されたAAV8血清陽性サルにおけるより高い導入遺伝子発現を示すグラフである。図9A : hFIX血漿レベルは、特定の抗hFIX ELISAを使用して測定された。hFIXレベルは、精製されたhFIXを標準として使用してng/mLとして表す。図9B : 犠牲時のqPCRによる肝臓の二倍体ゲノムあたりのベクターゲノムコピー数(VGCN)。VGCN評価は、4つの葉の異なる部位(右、左、尾状(尾状)、および方形(方形))で行われた4つのウェッジ生検から行われた。データは平均 \pm SDとして表す。統計分析は、Sidakの多重比較検定を使用した二元配置分散分析によって実行された(*** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$)。対照サル(NHP1)と比較して、IdeS治療を受けたサル(NHP2)は、血漿中のhFIXのレベルが高く、AAV肝臓への形質導入がより効率的であった。

10

【図10A - B】図10Aおよび10Bは、IdeSで処置されたAAV8血清陽性サルにおける、それぞれ、抗AAV8 IgGおよび抗AAV8 NA bのレベルを示すグラフである。抗AAV8 IgGのレベルはELISAで測定され、 μ g/mLで表す(図10A)。抗AAV8 NA bは中和アッセイで測定され、力価(1 : x)で表す(図10B)。データは平均 \pm SDとして表す。統計分析は、Tukeyの多重比較検定を使用した二元配置分散分析によって実行された(**** : $p < 0.0001$)。

20

【図11】図11は、NHPにおけるAAV8再投与のための実験プロトコルのスキームである。AAV8(NA b力価1 : 31.6)に対して血清陽性の2匹のオスのカニクイザルに 5×10^{12} vg/kgのAAV8-hFIXベクター(D0)を注入した。ベクター注射の前に、NHP4はD-1日目にIdeS(500 μ g/kg)の単回静脈内(IV)注射を受けた(NHP処理)。NHP3は前治療を受けていない(対照NHP)。その後、両方のサルは、D80日とD81日にIdeS(500 μ g/kg)を2回IV注射し、D82に 5×10^{12} vg/kgのAAV8-hFIXベクターを注射した。血液サンプルは、実験中のさまざまな時点で収集された。安楽死(D105)で、VGCN評価のために4つの葉から肝生検が収集された。

【図12A - B】図12Aおよび12Bは、IdeS処理が、AAV8血清陽性サルにおいて効率的なAAVベクターの再投与を可能にし、導入遺伝子発現の増加をもたらすことを示すグラフである。図12A : hFIX血漿レベルは、特定の抗hFIX ELISAを使用して測定された。hFIXレベルは、精製されたhFIXを標準として使用してng/mLとして表す。図12B : 肝臓における二倍体ゲノムあたりのベクターゲノムコピー数(VGCN)は、犠牲の時にqPCRによって決定された。VGCN評価は、4つの葉の異なる部位(左、右、尾状(尾状)、および方形(方形))で行われた4つのウェッジ生検から行われた。データは平均 \pm SDとして表す。統計分析は、Sidakの多重比較検定を使用した二元配置分散分析によって実行された(* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; **** : $p < 0.0001$)。

30

【図13A - B】図13Aおよび13Bは、AAV8ベクターの再投与時にIdeSで処理されたAAV8血清陽性サルにおける、それぞれ、抗AAV8 IgGおよび抗AAV8 NA bのレベルを示すグラフである。図13A : 抗AAV8 IgGレベルをELISAで測定した。図13B : 中和アッセイを使用して抗AAV8 NA b力価を測定した。データは平均 \pm SDとして表す。

40

【図14A - B】図14A、14Bおよび14Cは、IdeSの量を増やしながらいんキュベートしたヒト患者血清(図14A)、非ヒト霊長類(アカゲザル)血漿(図14B)およびハムスター血漿(図14C)のサンプルにおけるIdeSによるIgGの切断のSDS-PAGE分析を示す。サンプルは、IdeSなしで、またはIdeSの濃度を上げながら、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。サンプル緩衝液の添加により反応を停止させた。サンプルは、非還元SDS-PAGEおよびクーマシー染色によって分析された

50

。

【図14C】図14A、14Bおよび14Cは、IdeSの量を増やしながらいンキュベートしたヒト患者血清(図14A)、非ヒト霊長類(アカゲザル)血漿(図14B)およびハムスター血漿(図14C)のサンプルにおけるIdeSによるIgGの切断のSDS-PAGE分析を示す。サンプルは、IdeSなしで、またはIdeSの濃度を上げながら、37°Cで1時間インキュベートした。サンプル緩衝液の添加により反応を停止させた。サンプルは、非還元SDS-PAGEおよびクーマシー染色によって分析された。

【図15】図15は、IdeZの有無にかかわらず前処理された様々な量のIVIgで免疫化された動物におけるAAV-Spk1-GAAベクターの注入後のマウス血漿中のGAA活性レベルを示すグラフである。AAV-Spk1-GAAベクターはIVIg免疫の1日後に注入された。導入遺伝子活性は、ベクター投与の2週間後にGAA活性アッセイによって評価された。nmol/hr/mLで表したGAA活性は、各グループの各マウスについてプロットされた。対照マウスには、IVIgの非存在下でベクターのみを投与した。

【図16】図16は、IdeS注入前後のマウス血漿における抗Spk1中和抗体(NAb)力価レベルを示す。この研究における相対的なNAb力価レベルは、低力価(<1:1、1:1-1:2.5)(太字)、中程度(1:2.5-1:5)(太字のイタリック体)、および高力価(太字)として指定されている。>1:5-1:10)(イタリック体)。

【図17】図17は、IdeS注入前後のマウス血漿中の抗Spk1 IgG NAbレベル(ng/mL)を示している。陰性対照動物は、IVIgまたはIdeSのいずれでも治療されなかった。IdeS Lowは、研究で使用された0.4mg/kg IdeSを指し、IdeS Highは4mg/kg IdeSを指す。

【図18】図18は、IVIgで免疫され、次いでIdeSで処置された動物におけるAAV-Spk1-GAAベクターの注入後のマウス血漿中のGAA活性レベル(nmol/hr/mL)を示す。すべての動物に 2×10^{12} vg/kg AAV-Spk1-GAAベクターを投与した。導入遺伝子活性は、IVIgで免疫され、IdeSの有無にかかわらず処理され、最後にベクターで投与されたマウスの血漿サンプルで測定された。導入遺伝子活性は、ベクター投与の1週間後にGAA活性アッセイによって評価された。nmol/hr/mLで表したGAA活性は、各グループの各マウスについてプロットされている。

【図19】図19は、以前にIVIg(0、300、800、または1600)を注入された動物におけるAAV-Spk1-GAAベクター(2×10^{12} vg/kg)の注入の2週間後のGAA活性レベル(nmol/hr/mL)を示す。mg/kg)およびIdeS(0、0.4、1.0または2.0mg/kg)で処理。GAA活動は、各グループの各マウスについてプロットされた。対応する抗Spk1 NAb力価を発現しなかった(すなわち、NAb力価<1:1または1:1-1:2.5 pre-IdeS治療を有する)IVIg投与群のマウスは除外された。

【図20】図20は、IdeSの異なる調製物(ロット#1およびロット#2)を測定した、ヒト抗キャプシド中和IgGの人工力価を有する、C57BL/6マウスの血漿中の抗Spk1 NAb力価レベルを示す。

【図21】図21は、投与前、およびAAV-Spk1-hFVIIの投与後1週間および2週間での、ヒト抗キャプシド中和IgGの人工力価を有する、C57BL/6マウスからの血漿中のヒト第VII因子のレベルを示すグラフである。

【図22】図22は、IdeS注入前後のマウス血漿中の抗Spk1キャプシドIgGレベル(ng/mL)を示すグラフである。C57BL/6マウスにIVIgを投与して、ヒト抗キャプシド中和IgGの人工力価を誘導した。陰性対照動物は、IVIgまたはIdeSのいずれでも治療されなかった。低IVIgは研究で使用された300mg/kg IIVIgを指し、中IVIgは800mg/kgを指し、高IVIgは1600mg/kgを指す。各IVIgグループ内で、動物はIdeSの用量を増やして治療された(0、

10

20

30

40

50

0.4、1.0、2.0 mg/kg I.d.e.S)。IVIgで治療されたが、抗キャプシドIgG応答を示さなかった動物は、グラフから除外されました。

【0059】

本明細書で提供されるのは、抗体を分解または消化する、および/または抗体のエフェクター機能を阻害または低減する薬剤の投与を含む、遺伝子治療の利益または有効性を改善するための方法である。組換えウイルスベクターなどのウイルスベクターに結合する抗体を分解または消化する方法、および/または核酸によってキャプシド形成された異種ポリヌクレオチドによってコードされる核酸またはタンパク質またはペプチドに結合する抗体を分解または消化する方法も本明細書に提供される。組換えウイルスベクターおよび/または組換えウイルスベクターに結合する抗体のエフェクター機能、および/または組換えウイルスベクターによってキャプシド形成された異種ポリヌクレオチドによってコードされる核酸またはタンパク質またはペプチドを阻害または低減する。遺伝子治療ベクターが以前に投与された対象に遺伝子治療ベクターを再投与または再投与する方法も本明細書に提供され、対象は、遺伝子治療ベクターに結合および/または中和する抗体を開発した。

10

【0060】

特定の実施態様において、方法は、抗体を分解または消化するのに有効な量のプロテアーゼ、または組換えウイルスベクター、および/または核酸、および/またはおよび/または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体のエフェクター機能を阻害または低減するのに有効なグリコシダーゼを対象に投与することを含む。特定の実施態様において、方法は、抗体を分解または消化するのに有効な量のエンドペプチダーゼ、または組換えウイルスベクターおよび/または核酸/または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体のエフェクター機能を阻害または低減するのに有効なエンドグリコシダーゼを対象に投与することを含む。

20

【0061】

特定の実施態様において、方法は、組換えウイルスベクター、および/または核酸、および/または異種ポリヌクレオチドによりコードされたタンパク質またはペプチドに結合する抗体のFc受容体結合を低減するのに有効な量のグリコシダーゼを対象に投与することを含む。特定の実施態様において、方法は、組換えウイルスベクター、および/または核酸、および/または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体のFc受容体結合を低減するのに有効な量のエンドグリコシダーゼを対象に投与することを含む。

30

【0062】

特定の実施態様において、本発明は、それを必要とする患者においてベクターを使用する遺伝子治療によって治療される疾患の治療において使用するための免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドに関する。

【0063】

特定の実施態様において、本発明は、i)免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチド、およびii)それを必要とする患者における前記ベクターを使用する遺伝子治療によって治療される疾患の治療における同時、別個、または連続使用のための組み合わせ調製物としてのベクターに関する。

40

【0064】

特定の実施態様において、本発明は、免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドと、それを必要とする患者において前記ベクターを使用する遺伝子治療によって治療される疾患の治療に使用するためのベクターとの組み合わせに関する。

【0065】

特定の実施態様において、免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドは、前記ベクターの前に、同時に(同時に)、または後に投与される。

【0066】

50

本明細書で使用される場合、「ベクターを使用する遺伝子治療によって治療される疾患」という用語は、ポリヌクレオチド（少なくとも1つのポリペプチドまたは阻害性核酸をコードする）が上記の病気を治療する（遺伝子治療）薬物として患者の細胞に送達される疾患を意味する。

【0067】

特定の実施態様において、ベクターは、疾患を治療するのに有用な少なくとも1つの特定のポリペプチドまたは阻害性核酸をコードする。特定の実施態様において、ベクターは、疾患を治療するのに適切な治療用ポリヌクレオチドをコードする/含む。

【0068】

特定の実施態様では、ベクターは、遺伝子治療を使用して疾患を治療するのに適切な治療用ポリヌクレオチドをコードする/含む。

【0069】

特定の実施態様において、患者は、ベクター血清陽性患者である。

【0070】

特定の実施態様において、患者は、ベクター血清陰性患者である。

【0071】

本明細書で使用される場合、「免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチド」という用語は、免疫グロブリンGを分解するプロテアーゼであるポリペプチドを意味する。特定の実施態様では、免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドは、ババイン、ペプシンまたは免疫グロブリンG分解である。S. y o g e n e s (I d e S) の酵素ポリペプチド、または他の細菌または微生物からの変異体、またはそれらの操作されたバージョン。特定の実施態様において、免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドは、免疫グロブリンGを特異的に分解する。特定の実施態様において、免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドは、配列番号3~43または48のいずれかから選択される配列を含む。

【0072】

本明細書で使用される場合、「患者」および「対象」という用語は、動物、典型的には、げっ歯類、ネコ、イヌ、および霊長類などの哺乳動物を交換可能に指す。特に、本発明による対象または患者はヒトである。

【0073】

本明細書で使用される場合、「治療」または「治療」という用語は、遺伝子療法のような予防的または予防的治療、ならびに疾患にかかるリスクがあるまたは発症した疑いのある対象の治療を含む、治癒的または疾患修飾的治療の両方を指す。病気、ならびに病気または病状に苦しんでいると診断された対象、および臨床的再発の抑制を含む。治療は、障害または再発性障害の1つまたは複数の症状を予防、治癒、発症を遅らせる、重症度を軽減する、または改善するために、または、そのような治療がない場合に予想されるよりも対象の生存を延長するために、的障害を有する、または最終的に障害を獲得する可能性がある対象に投与することができる。

【0074】

本明細書にさらに提供される組成物は、例えばパッケージまたはキットとして提供され、(a)タンパク質またはペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドまたは異種ポリヌクレオチドからなる組換えウイルスベクター；(b)抗体を分解または消化するプロテアーゼまたはグリコシダーゼ；および(c)本明細書に記載される方法を実行するための指示書を有するラベルを有し、ここで(a)および(b)は別個の容器または同じ容器に入っている。特定の実施態様において、本明細書において使用され得るウイルスベクターは、例えば、限定されないが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む。特定の実施態様において、本発明において使用され得るウイルスベクターは、例えば、限定されずに、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルパー依存性アデノウイルス、ハイブリッドアデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ボックスウイルス、エプスタインバーウイルス、ワクシニアウイルス、およびヒトサイトメガロウイルスベクター(それらの組換えバージョンを含む)を含む。

10

20

30

40

50

【0075】

本明細書で限定無く使用されるように、「組換え」という用語は、組換え A A A V (r A A V) ベクターのようなウイルスベクターの改変体として、また組換えポリヌクレオチドおよびポリペプチドのような配列の改変体として、組成物が、一般に自然界では発生しない方法で操作された(すなわち、工学的に操作された)ものであることを意味する。組換え A A A V ベクターの特定の例は、野生型 A A A V ゲノム中に通常存在しない核酸(異種ポリヌクレオチド)がウイルスゲノム内に挿入されることであろう。その例は、治療用タンパク質またはポリヌクレオチド配列をコードする核酸(例えば、遺伝子)が、その遺伝子が A A V ゲノム内で通常関連する 5'、3' および / またはイントロン領域を有するか否かを問わず、ベクターにクローニングされることであろう。組換え体」という用語は、A A A V ベクター、ポリヌクレオチドなどの配列に関連して本明細書では必ずしも使用されないが、A A A V ベクター、ポリヌクレオチドなどを含む組換え体の形態は、そのような省略にもかかわらず、明示的に含まれる。

10

【0076】

「r A A V ベクター」は、例えば、分子法を用いて野生型 A A V ゲノムの全部または一部を除去し、治療用タンパク質またはポリヌクレオチド配列をコードする核酸などの非ネイティブ(異種)核酸で置換することにより、A A V の野生型ゲノムに由来する。典型的には、r A A V ベクターでは、A A V ゲノムの1つまたは両方の倒立末端リピート(I T R)配列が保持される。r A A V は、A A V ゲノムの全部または一部が、治療用タンパク質またはポリヌクレオチド配列をコードする異種核酸など、A A V ゲノム核酸に関して非ネイティブ配列で置換されているので、A A V ゲノムとは区別される。非ネイティブ(異種)配列の組み込みは、したがって、「組換え」A A V ベクターとしてA A V を定義し、これは「r A A V ベクター」と呼ばれることができる。

20

【0077】

組換え A A V ベクター配列は、ex vivo、in vitro、またはin vivoでの細胞のその後の感染(導入)のための「粒子」として本明細書で言及されるようにパッケージ化され得る。組換えベクター配列がA A V 粒子にカプセル化またはパッケージ化される場合、粒子はまた、「r A A V」、「r A A V 粒子」および / または「r A A V ビリオン」と呼ばれ得る。そのようなr A A V、r A A V 粒子およびr A A V ビリオンは、ベクターゲノムをカプセル化またはパッケージ化するタンパク質を含む。特に例としては、A A V の場合には、キャプシドタンパク質が挙げられる。

30

【0078】

「ベクターゲノム」(「v g」と略記されることがある)とは、最終的にパッケージ化またはカプセル化されてr A A V 粒子を形成する組換えプラスミド配列の部分を指す。組換えプラスミドを用いて組換え A A A V ベクターを構築または製造する場合、A A A V ベクターゲノムには、組換えプラスミドのベクターゲノム配列に対応しない「プラスミド」の部分が含まれる。組換えプラスミドのこの非ベクターゲノム部分は、「プラスミドバックボーン」と呼ばれ、これは、増殖および組換え A A A V ベクターの製造に必要なプロセスであるプラスミドのクローニングおよび増幅のために重要であるが、それ自体はr A A V 粒子にパッケージ化またはカプセル化されていない。したがって、「ベクターゲノム」とは、r A A V によってパッケージ化またはカプセル化された核酸を指す。

40

【0079】

本明細書で使用されるように、A A A V ベクターに関する用語「血清型」は、他のA A V 血清型と血清学的に区別されるキャピンドを意味する。血清学的に区別できるかどうかは、他のA A V と比較して、あるA A V に対する抗体間の交差反応性の欠如に基づいて決定される。交差反応性の違いは、通常、キャプシドタンパク質配列 / 抗原性決定因子の違いに起因する(例えば、A A A V 血清型のV P 1、V P 2、および / またはV P 3 配列の違いに起因する)。あるA A V に対する抗体は、キャピンドタンパク質配列の相同性に起因して、1つ以上の他のA A V 血清型と交差反応することがある。

【0080】

50

従来の定義の下では、血清型とは、関心のあるウイルスが、中和活性のために、既存の特徴的なすべての血清型に特異的な血清に対して試験され、関心のあるウイルスを中和する抗体が発見されていないことを意味する。より多くの天然に存在するウイルス単離体が発見され、および/またはカプシド変異体が生成されるにつれて、現在存在するいずれかの血清型との血清学的差異が存在する場合もあれば、存在しない場合もある。したがって、新しいウイルス（例えば、AAV）が血清学的差異を有さない場合、この新しいウイルス（例えば、AAV）は、対応する血清型のサブグループまたはバリエーションであろう。多くの場合、中和活性のための血清学的検査は、従来の血清型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に、キャピキシド配列の改変を有する変異ウイルスに対してまだ実施されていない。したがって、便宜上、および繰り返しを避けるために、「血清型」という用語は、血清学的に区別されたウイルス（例えば、AAV）および血清学的に区別されていないウイルス（例えば、AAV）の両方を広く指すが、これらは、ある血清型のサブグループ内にあるかもしれないし、または所定の血清型のバリエーション内にあるかもしれない。

10

20

30

40

50

【0081】

rAAVベクターは、任意のウイルス株または血清型を含む。例えば、限定することなく、rAAVベクターのゲノムまたは粒子（キャプシド、例えばVP1、VP2および/またはVP3）は、例えばAAV-1、-2、-3、-4、-5、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-rh74、-rh10またはAAV-2i8などの任意のAAV血清型に基づくことができる。そのようなベクターは、同一の株または血清型（またはサブグループまたはバリエーション）に基づくか、または互いに異なるものであり得る。例えば、限定することなく、1つの血清型ゲノムに基づくrAAVプラスミドまたはベクターゲノムまたは粒子（キャプシド）は、ベクターをパッケージ化するキャプシドタンパク質の1つ以上と同一であり得る。さらに、rAAVプラスミドまたはベクターゲノムは、ベクターゲノムをパッケージ化するキャプシドタンパク質の1つ以上とは異なるAAV血清型ゲノムに基づくことができ、その場合、3つのキャプシドタンパク質のうち少なくとも1つは、異なるAAV血清型、例えば、以下のようなものであり得る。AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、-rh74、-rh10、AAV-2i8、SPK1（配列番号1）、SPK2（配列番号2）、またはその変種、例えば、より具体的には、rAAV2ベクターゲノムは、AAV2 ITRを含むが、異なる血清型、例えば、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、-rh74、-rh10、AAV-2i8、SPK1（配列番号1）、SPK2（配列番号2）、またはそれらの変種からのカプシドを含むことができる。従って、rAAVベクターは、特定の血清型に特徴的な遺伝子/タンパク質配列と同一の遺伝子/タンパク質配列、および“混合された”血清型を含み、これは“シュードタイプ”とも呼ばれ得る。

【0082】

特定の実施態様では、ベクターは、AAVベクター、レンチウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターである。

【0083】

特定の実施態様では、用語ベクターはまた、最初の投与後に中和免疫グロブリンGを誘導する組換えベクターを含む。

【0084】

特定の実施態様では、ベクターはAAVベクターである。特定の実施態様において、ベクターは、ヒトFIXをコードするAAV8ベクターである（ヒトFIXをコードする治療用ポリヌクレオチドからなる）。特定の実施態様において、ベクターは、血友病の治療に有用なヒトFIXをコードするAAV8ベクターである

【0085】

特定の実施態様において、rAAVプラスミドまたはベクターゲノムまたは粒子は、爬

虫類または無脊椎動物の AAV 変異体、たとえば、トカゲパルボウイルス (Penzes et al., 2015, J. Gen. Virol., 96:2769-2779) または昆虫およびエビパルボウイルス (Roekring et al., 2002, Virus Res., 87:79-87) である。

【0086】

特定の実施態様では、組換えプラスミドまたはベクターゲノムまたは粒子は、ボカウイルスバリエーションに基づく。ヒトボカウイルスバリエーションは、例えば、Guido et al., 2016, World J. Gastroenterol., 22: 8684-8697 に記載されている。

【0087】

特定の実施態様では、rAAV ベクターは、少なくとも 70% 以上のカプシド配列を含むか、またはそれからなる (例えば、以下のようなものがある。75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%) 1 つ以上の AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、-rh74、-rh10、AAV-2i8、SPK1 (配列番号 1)、SPK2 (配列番号 2) キャプシドタンパク質 (VP1、VP2、および/または VP3 配列) と同一である。特定の実施態様では、rAAV ベクターは、少なくとも 70% 以上の配列 (例えば 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% など)、1 つ以上の AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、-rh74、-rh10 または AAV-2i8、ITR(s) と同一の配列を含むか、またはそれからなる。) 10

【0088】

特定の実施態様において、rAAV ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh10、Rh74、および AAV-2i8 バリエーション (例えば、アミノ酸の挿入、追加、置換および欠失などの ITR およびカプシド変種)、それらの変種は、例えば、WO2013/158879 (国際出願 PCT/US2013/037170)、WO2015/013313 (国際出願 PCT/US2014/047670) および US2013/059732 (米国特許出願第 13/594,773 号) に記載されているようなものである。 20

【0089】

rAAV、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、-rh74、-rh10、AAV-2i8、SPK1 (配列番号 1)、SPK2 (配列番号 2) およびその変異体、ハイブリッドおよびキメラ配列は、当業者に知られている技術を使用して構築することができ、1 つまたは複数の機能的な AAV ITR 配列でフランキングされた 1 つまたは複数の異種ポリヌクレオチド配列 (トランスジェーン) を含むように構築することができる。そのような AAV ベクターは、典型的には、組換えベクターの rAAV ベクター粒子へのレスキュー、複製、およびパッケージングに必要な、少なくとも 1 つの機能的フランキング ITR 配列 (複数可) を保持する。従って、rAAV ベクターゲノムは、複製およびパッケージングに必要な配列 (例えば、機能的 ITR 配列) をシスで含むであろう。機能的 ITR 配列) を含む)。特定の実施態様において、本発明で使用されるレンチウイルスは、ヒト免疫不全-1 (HIV-1)、ヒト免疫不全-2 (HIV-2)、シミアン免疫不全ウイルス (SIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、ジェンブラナ病ウイルス (JDV)、ウマ感染性貧血ウイルス (EIAV)、またはカプリン関節炎脳炎ウイルス (CAEV) であってもよい。レンチウイルスベクターは、インピトロおよびインピボの両方で、異種ポリヌクレオチド配列の非分裂細胞への効率的な送達、統合および長期発現を提供することができる。様々なレンチウイルスベクターが当技術分野で知られている、Naldini et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 93:11382-11388 (1996); Science, 272: 263-267 (1996)), Zufferey et al., (Nat. Biotechnol., 15:871-875, 1997), Dull et al., (J Virol. 1998 Nov;72(11):8463-71, 30

10

20

30

40

50

1998)を参照。米国特許6,013,516および5,994,136のいずれかが、本発明における使用に適したウイルスベクターであり得る。体液性免疫などの免疫応答は、野生型ウイルスに曝露された被験体において、野生型ウイルスに対して発達し得る。そのような曝露は、そのようなウイルスベクターを採用する遺伝子治療法による治療の前であっても、野生型ウイルスに基づくウイルスベクターに結合する被験体中の既存の抗体を生じさせることができる。

【0090】

本明細書で使用されるように、用語「AAVベクター」は、当技術分野での一般的な意味を有し、AAV1を含むがこれらに限定されないアデノ随伴ウイルス血清型に由来するベクターを指す。AAV2、変種AAV2、AAV3、変種AAV3、変種AAV3B、変種AAV3B、変種AAV4、変種AAV5、変種AAV6、変種AAV6、変種AAV7、変種AAV8、変種AAV9、AAVcy10およびAAVrh10のようなAAV10、AAVrh74、AAVDJ、AAV-Anc80; AAV-LK03、AAV2i8およびブタAAV、例えばAAVpo4およびAAVpo6カプシドを有するか、またはキメラカプシドを有するか、またはヒト、サルまたは他の種に感染することができるAAVの任意の他の天然に存在する血清型、およびシャッフリング、ペプチド挿入、エラーが発生しやすいPCR、合理的設計、または機械学習およびAAVLK03、AAVDJ、Anc80、AAV2i8、AAV-PHP-Bのような他の技術を使用して工学的に設計された他のすべての血清型。AAVベクターは、AAV野生型遺伝子の全部または一部、好ましくはrepおよび/またはcap遺伝子の1つ以上を欠失させてもよいが、機能的フランキング倒立末端リピート(ITR)配列を保持する。機能的なITR配列は、AAAウイルスのレスキュー、複製およびパッケージングに必要である。したがって、AAVベクターは、本明細書において、ウイルスの複製およびパッケージングのためにシスで必要とされる配列(例えば、機能的ITR)を少なくとも含むように定義される。ITRは、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的なレスキュー、複製およびパッケージングを提供する限り、例えばヌクレオチドの挿入、欠失または置換によって改変されてもよい。AAV発現ベクターは、少なくとも転写方向に操作的に連結された構成要素として、転写開始領域、即ち本発明の核酸分子、および転写終結領域を含む制御要素を提供するために、公知の技術を用いて構築される。制御要素は、哺乳動物細胞において機能的であるように選択される。手術的に連結された構成要素を含む結果として得られるコンストラクトは、機能的なAAV ITR配列で結合されている(5'および3')。

【0091】

「アデノ随伴ウイルス倒立末端リピート」または「AAV ITRs」とは、AAVゲノムの各末端に見られる、DNA複製の起源として、またウイルスのパッケージングシグナルとしてシスと一緒に機能する、技術的に認知された領域を意味する。AAAのITRは、AAAの複製コード領域とともに、2つの隣接するITRの間に介在するヌクレオチド配列の哺乳類細胞ゲノムへの効率的な切除およびレスキュー、および統合を提供する。AAV ITR領域のヌクレオチド配列は既知である。AAV-2配列については、例えば、Kotin, 1994; Berns, KI "Parvoviridae and their Replication" in *Fundamental Virology*, 2nd Edition, (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.)を参照されたい。本明細書で使用されるように、「AAV ITR」は、必ずしも野生型ヌクレオチド配列を構成するものではなく、例えばヌクレオチドの挿入、欠失または置換によって改変されてもよい。さらに、AAV ITRは、限定されないが、AAA-1、AAA-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6などを含むいくつかのAAV血清型のいずれかに由来するものであってもよい。さらに、AAVベクター中の選択されたヌクレオチド配列をフランキングする5'および3' ITRは、それらが意図された通りに機能する限り、すなわち、宿主細胞ゲノムまたはベクターからの関心のある配列の切除およびレスキューを可能にし、AAA Rep遺伝子産物が細胞内に存在する場合に、異種配列のレシピエント細胞ゲノムへの統合を可能にするために、必ずしも同一であるか、同一

の A A A V 血清型または単離物に由来する必要はない。特定の実施態様において、本発明の A A V ベクターは、哺乳類の中枢神経系および末梢神経系の細胞、特にニューロン、ニューロン前駆細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびグリア細胞の細胞に対してトロピズムを有し、かつ高い導入効率を有する A A V 血清型に由来するベクターから選択される。特定の実施態様において、A A V ベクターは、脳細胞、特にニューロンを良好にトランスフェクションすることが記載されている A A V 4、A A V 9 または A A V r h 1 0 である。特定の実施態様において、本発明の A A V ベクターは、二本鎖、自己相補性 A A V (s c A A V) ベクターである。一本鎖 A A V ベクターの使用の代替として、自己相補性ベクターを使用することができる。トランスダクションに必要なゲノム含有粒子の数という点での A A A V ベクターの効率は、発現前に一本鎖 D N A (s s D N A) ゲノムを二本鎖 D N A (d s D N A) に変換する必要性によって妨げられる。このステップは、D N A 合成または複数のベクターゲノム間の塩基対合を必要とせずに d s D N A に折りたたむことができる逆リピートゲノムをパッケージ化した自己相補的ベクターの使用によって回避することができる。自己相補的 A A V (s c A A V) ベクターは、結果としてトランスジーンを発現を増加させることができる。A A V 生物学、I T R 機能、および s c A A V コンストラクトの概要については、McCarty D M. Self-complementary A A V ベクター；進歩と応用を参照。このように、本研究では、自己相補的な A A V ベクターの開発を目指している。Ther. 2008 October; 16 (10): at pages 1648-51, first full paragraph, incorporated by reference to disclosure of AAV and scAAV constructs, ITR function, and role of TRS ITR in scAAV constructs. T R S I T R を構成する r A A V ベクターは、複製サイクル中に正しくニックネームされることができず、したがって、自己相補的な二本鎖 A A V (s c A A V) ゲノムを生成し、これは感染性 A A V 粒子に効率的にパッケージングすることができる。種々の r A A V、s s A A V、および s c A A V ベクター、ならびに特定の用途のための各クラスのベクターの利点および欠点、ならびに遺伝子導入用途においてそのようなベクターを使用する方法は、当技術分野の当業者にはよく知られている（例えば、Choi et al. 2005年、J. Virol. 79(11):6801-7; McCartyら、2004年、Annu Rev Genet. 38:819-45; McCartyら、2001年、Gene Ther. 8(16):1248-54；およびMcCarty 2008年、Mol. Ther.、16(10):1648-56；引用されたすべての参考文献は、A A V、r A A V、および s c A A V ベクターの開示のために参照により本明細書に組み込まれる。）

10

20

30

【 0 0 9 2 】

本発明の A A V ベクターは、主要な A A V オープンリーディングフレーム（「 O R F 」）を切除した A A V ゲノムに選択された配列を直接挿入することにより構築することができる。A A V ゲノムの他の部分は、複製およびパッケージング機能を可能にするために十分な部分の I T R が残っている限り、削除することもできる。そのような構築物は、当技術分野でよく知られている技術を用いて設計することができる。例えば、米国特許第 5, 173, 414 号および第 5, 139, 941 号；国際公開第 W O 92 / 01070 号および W O 93 / 03769 号を参照のこと。あるいは、A A V の I T R は、ウイルスゲノムから、または標準的なライゲーション技術を用いて、別のベクターに存在する選択された核酸構築物の 5' および 3' と同じで融合したものを含む A A V ベクターから切除することができる。I T R を含む A A V ベクターは、例えば、米国特許第 5, 139, 941 号に記載されている。特に、いくつかの A A V ベクターは、Accession Number 53222、53223、53224、53225 および 53226 の下で American Type Culture Collection（「 A T C C 」）から入手可能である、そこに記載されている。さらに、キメラ遺伝子は、1 つ以上の選択された核酸配列の 5' および 3' に配列された A A V I T R 配列を含むように、合成的に作製することができる。哺乳類 C N S および P N S 細胞におけるキメラ遺伝子配列の発現のための好ましいコドンを使用することができる。完全なキメラ配列は、標準的な方法で調製されたオーバーラップオリゴヌクレオチドから組み立てられる。A A V ビリオンを産生するために、A A V 発現ベクターを、トランスフェクションなどの公知の技術を用いて、適当な宿主細胞に導入する。多くのトランスフェクション技術が当技術分野で

40

50

一般に知られている。例えば、Grahamら(1973);Sambrookら(1989)Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York、Davisら(1986)Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier、およびChuら(1981)を参照のこと。特に好適なトランスフェクション方法としては、リン酸カルシウム共沈法(Grahamら、1973)、培養細胞への直接マイクロインジェクション(Capecciら、1980)、エレクトロポレーション(Shigekawaraら、1988)、リボソーム媒介遺伝子導入(Manninoら、1988)、脂質媒介導入(Felgnerら、1987)、および高速マイクロプロジェクトイルを用いた核酸送達(Kleinら、1987)などが挙げられる。

【0093】

典型的には、本発明のベクターは発現カセットからなる。本明細書で使用されるように、「発現カセット」という用語は、本発明の核酸分子を発現させるのに十分な核酸エレメントからなる核酸構築物を指す。典型的には、発現カセットは、プロモーター配列にオペレーショナルに連結された本発明の核酸分子からなる。オペレーショナルに連結されている」という用語は、一方の機能が他方の機能によって影響を受けるように、単一の核酸フラグメント上に2つ以上の核酸フラグメントを関連付けることを意味する。例えば、プロモーターは、そのコーディング配列の発現に影響を与えることができる場合(例えば、コーディング配列がプロモーターの転写制御下にある場合)、コーディング配列とオペレーショナルに連結される。符号化配列は、センス配向またはアンチセンス配向で調節配列にオペレーショナルに連結され得る。特定の実施態様では、プロモーターは異種プロモーターである。本明細書で使用されるように、「異種プロモーター」という用語は、自然界では、所与のコード化配列にオペレーショナルに連結されていることが見出されないプロモーターを指す。特定の実施態様では、発現カセットは、追加の要素、例えば、イントロン、エンハンサー、ポリアデニル化部位、ウッドチャック応答要素(WRE)、および/またはエンコード配列の発現レベルに影響を与えることが知られている他の要素を含んでもよい。本明細書で使用されるように、用語「プロモーター」は、コード化配列または機能性RNAの発現を制御することが可能なヌクレオチド配列を指す。一般に、本発明の核酸分子は、プロモーター配列の3'に位置する。特定の実施態様では、プロモーター配列は、近位およびより遠位の上流要素からなり、エンハンサー要素を含むことができる。エンハンサー」は、プロモーター活性を刺激し得るヌクレオチド配列であり、プロモーターの生得的な要素であってもよく、プロモーターのレベルまたは組織特異性を高めるために挿入された異種要素であってもよい。特定の実施態様では、プロモーターは、その全体がネイティブ遺伝子に由来する。特定の実施態様では、プロモーターは、異なる天然に存在するプロモーターに由来する異なる要素からなる。特定の実施態様では、プロモーターは合成ヌクレオチド配列からなる。異なるプロモーターが、異なる組織または細胞型において、または異なる発生段階において、または異なる環境条件にตอบสนองして、または薬物または転写コファクターの存在または非存在にตอบสนองして、遺伝子の発現を指示することは、当技術分野に熟練した者によって理解されるであろう。ユビキタスプロモーター、細胞型特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、発生段階特異的プロモーター、および条件付きプロモーター、例えば、薬物応答性プロモーター(例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター)は、当技術分野の当業者にはよく知られている。プロモーターの例としては、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PKG)プロモーター、CAG(CMVエンハンサー、チキン アクチンプロモーター(CBA)およびウサギ グロビンイントロンの複合体)、NSE(神経特異的エノラーゼ)、シナプシンまたはNeuNプロモーター、SV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRプロモーター;アデノウイルス主要後期プロモーター(Ad MLP);単純ヘルペスウイルス(HSV)プロモーター、CMV即時初期プロモーター領域(CMVIE)などのサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、SFFVプロモーター、ルス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、合成プロモーター、ハイブリッドプロモーターなどが挙げられる。他のプロモーターは、ヒト由来のものであってもよいし、マウス由来のものを含む他の種由来のものであってもよい

10

20

30

40

50

。一般的なプロモーターとしては、例えば、以下のものが挙げられる。ヒトサイトメガロウイルス（CMV）即時初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ルス肉腫ウイルス長末端リピート、[] - アクチン、ラットインスリンプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ヒト - 1 抗トリプシン（hAAT）プロモーター、トランススチレチンプロモーター、TBGプロモーターおよび他の肝臓特異的プロモーター、デスミンプロモーターおよび同様の筋肉特異的プロモーターなどが挙げられる。EF1 - プロモーター、CAGプロモーターおよび他の構成プロモーター、マルチ組織特異性を有するハイブリッドプロモーター、シナプシンおよびグリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターのようなニューロンに特異的なプロモーター、これらはすべて、当技術分野の当業者によく知られており、かつ容易に入手可能なプロモーターであり、関心のあるコード化配列の高レベル発現を得るために使用することができる。さらに、マウスメタロチオネイン遺伝子のような非ウイルス遺伝子に由来する配列もまた、本明細書において使用を見出すであろう。そのようなプロモーター配列は、例えば、Stratagene（サンディエゴ、カリフォルニア州）から市販されている。

10

20

30

40

50

【0094】

特定の実施態様では、発現カセットは、本発明の瞬間核酸分子によってコードされるポリペプチドの分泌を可能にする適切な分泌シグナル配列からなる。本明細書で使用されるように、用語「分泌シグナル配列」またはそのパリエーションは、ネイティブポリペプチドで見られる分泌のレベルと比較して、細胞からの操作可能に連結されたポリペプチドの分泌を（上記で定義したように）増強するように機能するアミノ酸配列を指すことが意図される。上記で定義したように、「強化された」分泌によって、細胞から分泌される細胞によって合成されたポリペプチドの相対的な割合が増加することを意味する；分泌されたタンパク質の絶対量もまた増加することは必要ではない。特定の実施態様では、ポリペプチドの本質的にすべて（すなわち、少なくとも95%、97%、98%、99%またはそれ以上）が分泌される。しかしながら、分泌のレベルがネイティブポリペプチドと比較して増強される限り、ポリペプチドの本質的にすべてまたはさらに大部分が分泌されることは必要ではない。一般に、分泌シグナル配列は小胞体内で切断され、特定の実施態様では、分泌シグナル配列は分泌に先立って切断される。しかしながら、細胞からのポリペプチドの分泌が増強され、ポリペプチドが機能的である限り、分泌シグナル配列が切断される必要はない。したがって、特定の実施態様では、分泌シグナル配列は部分的にまたは全体的に保持される。分泌シグナル配列は、全体または部分的に、分泌されたポリペプチドの分泌シグナル（すなわち、前駆体からの）に由来することができ、および/または全体または部分的に合成されたものであることができる。分泌シグナル配列の長さは重要ではなく、一般に、既知の分泌シグナル配列は、約10~15から約50~60アミノ酸の長さである。さらに、分泌されたポリペプチドからの既知の分泌シグナル配列は、結果として得られる分泌シグナル配列が操作可能に連結されたポリペプチドの分泌を増強するように機能する限り、（例えば、アミノ酸の置換、欠失、切り捨てまたは挿入によって）改変または改変され得る。即ち、本発明の分泌シグナル配列は、天然に存在する分泌シグナル配列またはその改変物（上述のように）から構成され得るか、本質的に構成され得るか、または構成され得る。細胞からの分泌を指示する多数の分泌タンパク質および配列が当技術分野で知られている。即ち、本発明の分泌シグナル配列は、その全部または一部が合成または人工的であることがさらに可能である。合成または人工の分泌シグナルペプチドは、当技術分野で知られており、例えば、Barashら、Biochem.Biophys. Res. Comm. 294:835-42 (2002)を参照のこと。

【0095】

特定の実施態様において、本発明は、ベクターを用いた遺伝子治療により疾患を治療する方法を含み、その方法は、治療上有効な量の免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドを必要とする被験者に投与することからなる。

【0096】

核酸、ベクター、組換え宿主細胞およびその用途

特定の実施態様において、本発明は、必要とする患者においてベクターを用いた遺伝子治療によって治療された疾患の治療において使用するための免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸配列に関するものであり、本発明は、免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸配列に関するものである。

【0097】

特定の実施態様において、本発明は、i) 免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸配列、およびii) ベクターを含み、それを必要とする患者において、前記ベクターを用いた遺伝子治療によって治療された疾患の治療において、同時、分離または逐次的に使用するための組み合わせの調製物としてのベクターを含む。

【0098】

特定の実施態様において、本発明は、免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸配列と、それを必要とする患者において前記ベクターを使用して遺伝子治療によって治療された疾患の治療に使用するためのベクターとの組み合わせを含む。

【0099】

特定の実施態様において、本発明は、本明細書に記載されているように、配列番号4のI d e Sポリペプチドまたはその機能保存的変異体をコードする核酸配列を含む。

【0100】

特定の実施態様において、配列番号4のI d e Sポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号52を含むか、またはそれからなる。

【0101】

特定の実施態様では、核酸配列は、配列番号52の配列に対して、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または99.9%の同一性を構成する。

【0102】

特定の実施態様では、本発明の核酸のmRNAを使用することができる。

【0103】

本発明の核酸は、単独または組み合わせで、限定されないが、任意の化学的、生物学的、遺伝学的または酵素学的手法など、当技術分野でそれ自体知られている任意の技術によって製造することができる。

【0104】

特定の実施態様において、本発明は、必要とする患者におけるベクターを用いた遺伝子治療によって治療された疾患の治療における使用のために、免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸配列からなる発現ベクターを含む。

【0105】

特定の実施態様では、発現ベクターは、配列番号52を含むアミノ配列をコードする核酸配列、または上述の機能保存的変異体を含む核酸配列を含む。

【0106】

特定の実施態様では、配列番号52またはその機能保存的変異体からなるベクターはAVベクターではない。

【0107】

本発明で使用することができる発現ベクターは、核酸配列に操作的に連結された少なくとも1つの発現制御要素を含んでいてもよい。発現制御要素は、核酸配列の発現を制御し、調節するためにベクターに挿入される。発現制御要素の例としては、これらに限定されないが、ファージラムダ、酵母プロモーター、およびポリマウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスまたはSV40に由来するプロモーターのLACシステム、オペレーターおよびプロモーター領域が挙げられる。追加の好ましいまたは必須の操作要素には、リーダー配列、末端コドン、ポリアデニル化シグナル、および宿主系における核酸配列の適切な転写およびその後の翻訳に必要なまたは好ましい他の任意の配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。必要とされるまたは好ましい発現制御要素の正しい組み合わせは、選択された宿主系に依存することが、当技術分野に熟練した者によ

10

20

30

40

50

って理解されるであろう。発現ベクターは、宿主系における核酸配列を含む発現ベクターのトランスファーおよびその後の複製に必要な要素をさらに含むべきであることが、当業者にはさらに理解されるであろう。そのような要素の例は、複製の起源および選択可能なマーカーを含むが、これらに限定されない。そのようなベクターは、従来の方法を用いて、または市販のものを用いて容易に構築されることが、当技術分野に熟練した者によってさらに理解されるであろう。

【0108】

特定の実施態様では、本発明の瞬間は、上述のような発現ベクターからなる宿主細胞を含む。

【0109】

特定の実施態様において、宿主細胞は、例えば、限定されないが、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞などの真核生物細胞、および大腸菌などの原核生物細胞であってもよい。遺伝子を担持するベクターを細胞に導入する手段としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、またはD E A E - デキストラン、リポフェクション、リン酸カルシウム、または当業者に知られている他の手順を用いたトランスフェクションが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0110】

特定の実施態様では、真核細胞で機能する真核細胞発現ベクターが使用される。そのようなベクターの例としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルス、ポリオウイルスなどのウイルスベクター；レンチウイルス、細菌発現ベクター、プラスミド、例えば p c D N A 3 またはパキロウイルストランスフェクションベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい真核細胞株としては、C O S 細胞、C H O 細胞、H e L a 細胞、N I H / 3 T 3 細胞、2 9 3 細胞 (A T C C # C R L 1 5 7 3)、T 2 細胞、樹状細胞、または単球が挙げられるが、これらに限定されない。

【0111】

体液性免疫などの免疫応答もまた、組換えウイルスベクター、および/または異種ポリヌクレオチド、またはウイルスベクターによってカプセル化された異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに対して発現することができる。ウイルスベクターの細胞導入、異種ポリヌクレオチドの発現もしくは機能、または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質もしくはペプチドの機能もしくは活性の阻害もしくは低下をもたらす、該ウイルスベクターが投与される被験体における、該ウイルスベクターの細胞導入、異種ポリヌクレオチドの発現もしくは機能、または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質もしくはペプチドの機能もしくは活性の阻害もしくは低下をもたらす。

【0112】

本発明において使用されるウイルスベクター、例えば「中和」抗体と称することができる組換えウイルスベクターに結合する抗体は、遺伝子治療に有用なウイルスベクターの細胞導入を減少させるか、または阻害することができる。その結果、理論に拘束されないが、細胞導入が減少または阻害されることにより、ウイルスパッケージ化異種ポリヌクレオチドの細胞内への導入、およびその後の発現、ならびに適切には、タンパク質またはペプチドへのその後の翻訳が減少する。さらに、ウイルスベクターによってカプセル化された異種ポリヌクレオチドまたは異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体は、異種ポリヌクレオチドの発現、異種ポリヌクレオチドの機能または活性、または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドの機能または活性を阻害することができる。

【0113】

従って、組換えウイルスベクター（例えば、A A V）に結合する抗体が存在し得、および/または被験体中の異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体が存在し得、この抗体は、被験体中の異種ポリヌクレオチドによって

10

20

30

40

50

コードされるタンパク質またはペプチドに結合する。さらに、組換えウイルスベクターによってカプセル化された異種ポリヌクレオチドに結合する抗体が存在し得る。

【0114】

組換えウイルスベクター（例えば、AAV）に結合する抗体、または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体は、それらが産生されるべきであるが、本明細書に記載されているように、プロテアーゼによって分解または消化され得る。組換えウイルスベクター（例えば、AAA V）に結合する抗体、または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体は、それらが産生されるべきであるが、本明細書に記載されるように、そのエフェクター機能を低下させるかまたは阻害することもできる。

10

【0115】

本明細書で使用されるように、抗体に関する「エフェクター機能」とは、抗体の通常の機能的属性を意味する。抗体の機能的属性の非限定的な例としては、例えば、抗原への結合；補体カスケードの活性化（補体依存性細胞毒性と呼ばれる）；マクロファージ、単球、ナチュラルキラー細胞、好酸球などのエフェクター細胞上のFc受容体に結合して、抗体-依存性細胞毒性（ADCC）に関与すること；および食細胞や樹状細胞などの免疫細胞による結合抗原/病原体の摂取のためのシグナルとしての機能が挙げられる。抗体エフェクター機能の減少または阻害は、したがって、前記の非限定的な機能的属性のうちの任意の1つ以上を指すことができる。エフェクター機能アッセイは、例えばWO2016012285に記載されているように、当技術分野で知られている。

20

【0116】

「Fc受容体」とは、任意のFc受容体を指す。Fc受容体の特に非限定的な例としては、細胞上に存在するFc免疫グロブリン受容体（FcR）が挙げられる。ヒトにおいて、FcRは、FcRI（CD64）、FcRIIA（CD32A）、FcRIIB（CD32B）、FcRIIIA（CD16a）およびFcRIIIB（CD16b）からなるFc受容体ファミリーの1つ、一部または全部を指す。FcRは、FcRI（CD64）、FcRIIA（CD32A）、FcRIIB（CD32B）、FcRIIIA（CD16a）およびFcRIIIB（CD16b）の天然に存在する多型を含む。

30

【0117】

特定の実施態様では、ウイルスベクターへの抗体結合は、プロテアーゼの方法で減少または阻害される。

【0118】

特定の実施態様では、マクロファージ、単球、ナチュラルキラー細胞または好酸球などのエフェクター細胞上のFc受容体への抗体の結合は、グリコシダーゼを介して減少または阻害される。特定の実施態様では、エンドグリコシダーゼは、抗体のFc相互作用ドメイン上のグリカン構造を加水分解する。特定の実施態様では、エンドグリコシダーゼは、IgGのFc相互作用ドメイン上のグリカン構造、例えば、位置Asn-297（Kabataナンバリング）のN-連結パイ-アンテナリー・グリカンのようなグリカン構造を加水分解する。

40

【0119】

特定の実施態様では、補体カスケードの抗体活性化は、プロテアーゼを介して減少または阻害される。

【0120】

特定の実施態様では、食細胞または樹状細胞などの免疫細胞による抗体刺激または摂取の減少は、プロテアーゼまたはグリコシダーゼを介して減少または阻害される。

【0121】

特定の実施態様では、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、組換えウイルス（例えば、AAV）ベクターの投与前に被験者に投与される。特定の実施態様では、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、組換えウイルス（例えば、AAA V）ベクタ

50

一の投与後に被験者に投与される。特定の実施態様では、組換えウイルス（例えば、AAV）ベクターとプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、実質的に同時期に、またはほぼ同時に投与される。

【0122】

抗体は、IgG、IgM、IgA、IgDおよび/またはIgEのいずれかからなる。従って、本発明は、これらの5つのクラスの抗体のうちの一つ、これらの5つのクラスの抗体のうち任意の2つ、これらの5つのクラスの抗体のうち任意の3つ、これらの5つのクラスの抗体のうち任意の4つ、またはこれらの5つのクラスの抗体のすべてのうちの任意の一つのエフェクター機能を消化、分解、または還元もしくは阻害することに向けられている。

10

【0123】

被験体中の抗体のレベルは、組換えウイルスベクターの投与の前および/または後に分析、測定または決定することができる。被験者中の抗体のレベルはまた、プロテアーゼまたはグリコシダーゼの投与の前および/または後に分析、測定または決定することができる。被験体中の抗体のレベルはまた、プロテアーゼまたはグリコシダーゼの投与前および/または投与後と同様に、組換えウイルスベクターの投与前および/または投与後に、複数回分析または測定してもよい。

【0124】

被験体中の抗体のエフェクター機能は、組換えウイルスベクターの投与の前および/または後に分析、測定または決定することができる。被験者中の抗体のエフェクター機能はまた、プロテアーゼまたはグリコシダーゼの投与の前および/または後に分析、測定または決定することができる。被験体中の抗体のエフェクター機能は、プロテアーゼまたはグリコシダーゼの投与前および/または投与後と同様に、組換えウイルスベクターの投与前および/または投与後に、複数回分析または測定してもよい。

20

【0125】

平衡結合定数の増加は、IgGとFc受容体間の結合の減少に対応する。したがって、グリコシダーゼ活性の結果として抗体のFc受容体結合が減少すると、IgG:FcR相互作用の平衡結合定数が増加する可能性がある。抗体のFc受容体結合の減少は、IgG:FcR相互作用の平衡結合定数を、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、または少なくとも4、または少なくとも5、または少なくとも6、または少なくとも7、または

30

【0126】

特定の実施態様では、野生型ウイルスへの曝露によって引き起こされる被験体における免疫応答（例えば、体液性免疫応答）は、被験体への組換えウイルスベクターの投与に先立って、野生型ウイルスに基づく組換えウイルスベクターに結合する抗体を分解または消化するのに有効な量のプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼを投与することによって処置される。

【0127】

特定の実施態様において、AAVのような組換えウイルスベクターの投与によって引き起こされる免疫応答（例えば、体液性免疫応答）は、組換えウイルスベクターに結合する抗体を分解または消化するのに有効なプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼ、または異種ポリヌクレオチド、またはウイルスベクターによってカプセル化された異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体の量を投与することによって処置される。

40

【0128】

特定の実施態様では、被験体への組換えウイルスベクターの投与は、組換えウイルスベクターに対する免疫応答（例えば、体液性免疫応答）、または異種ポリヌクレオチドまたはウイルスベクターによってカプセル化された異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体を阻害または防止するためのプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの投与に先立って行われる。

50

【0129】

特定の実施態様では、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、免疫応答（例えば、体液性免疫応答）の前、例えば中和抗体の発現前、または異種ポリヌクレオチドまたはウイルスベクターによってカプセル化された異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体の発現前に、被験体に投与される。

【0130】

プロテアーゼは、タンパク質を分解または消化する酵素である。本明細書で使用されるように、プロテアーゼはまた、ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、ペプチドヒドロラーゼ、またはタンパク質分解酵素と称される。

【0131】

本発明において使用され得るプロテアーゼは、その基質特異性に基づいて2つの広範なグループに細分化され得る。プロテアーゼは、N末端またはC末端に向かって位置するペプチド結合を加水分解するエキソ型（エキソプロテアーゼまたはエキソペプチダーゼ）であってもよい。エキソプロテアーゼまたはエキソペプチダーゼの非限定的な例としては、例えば、フラボザイム（Novozymes）、プロテアックス（Amano）、およびブタ膵臓由来のパンクレアチンが挙げられる。

【0132】

本発明で用いることができるプロテアーゼは、ポリペプチド鎖中のペプチド結合を内部で加水分解するエンド型（エンドプロテアーゼまたはエンドペプチダーゼ）であってもよい。エンドプロテアーゼの例としては、例えば、Ide S、Ide Z、Ide E、Ide MC、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、ペプシンなどが挙げられる。

【0133】

本発明において使用され得るプロテアーゼの例は、例えば、限定されないが、Streptococcus pyogenes、Streptococcus equi、Mycoplasma canis、S. agalactiae、S. pseudopercinusまたはPseudomonas putida由来のシステインプロテアーゼを含む。特定の実施態様において、プロテアーゼは、Streptococcus pyogenes由来のエンドペプチダーゼIde S、または配列番号3～18のいずれかに記載のその改変体を含む。特定の実施態様では、プロテアーゼは、配列番号19または配列番号20に記載のプロテアーゼまたはその改変体を含む。特定の実施態様では、プロテアーゼは、Streptococcus equi由来のエンドペプチダーゼIde Z、または配列番号21～43のいずれかに記載のその改変体を含む。

【0134】

本発明で使用され得る他のプロテアーゼには、例えば、限定されず、WO2017/134274に記載されたS. suis、S. porcinus、S. equiからのIgeE酵素が含まれる。本発明で使用され得る他のプロテアーゼは、例えば、限定されず、WO2018/093868に記載されているIde MCおよびホモログを含む。本発明で使用され得る他のエンドペプチダーゼは、例えば、限定されずに、WO2016/128559に記載された、N末端メチオニンおよびシグナルペプチドを有するIde Zおよびシグナルペプチドを有さないIde S/Ide Zハイブリッドタンパク質を含む。本発明で使用され得る他のプロテアーゼは、例えば、限定されず、Jordanら(N Engl. J Med. 377;5, 2017)、LannergardおよびGuss(FEMS Microbiol Lett. 262(2006); 230-235)、およびHultingら(FEMS Microbiol Lett. 298(2009), 44-50)に記載されているプロテアーゼを含む。

【0135】

グリコシダーゼとは、複合糖に含まれるグリコシド結合を加水分解する酵素のことである。一般的には、エクソグリコシダーゼとエンドグリコシダーゼの2つのグループに大別される。グリコシダーゼは、抗体などの糖タンパク質から糖鎖/オリゴ糖を切断して放出する。

【0136】

本発明のインスタントで使用することができるエキソグリコシダーゼとしては、例えば、これらに限定されず、N-アセチルグルコサミニダーゼ、フコシダーゼ、ガラクトシダ

10

20

30

40

50

ーゼ、グルコシダーゼ、マンノシダーゼ、ノイラミニダーゼ、およびキシロシダーゼが挙げられる。本発明で用いることができるエンドグリコシダーゼとしては、例えば、限定されないが、EndoS、Endo D、Endoglycosidase-H、Endo F1、Endo F2、Endo F3などが挙げられる。

【0137】

したがって、特定の実施態様では、グリコシダーゼはエンドグリコシダーゼからなる。特定の実施態様では、グリコシダーゼはエキソグリコシダーゼからなる。

【0138】

エンドグリコシダーゼの例としては、例えば、EndoSが挙げられるが、これに限定されるものではない。特定の実施態様では、エンドグリコシダーゼは、配列番号44-47のいずれかに記載の配列、またはその改変体からなる。

10

【0139】

特定の実施態様において、EndoSポリペプチドは、EndoSポリペプチド、EndoSポリペプチドのフラグメント、EndoSポリペプチドのバリエーション、またはEndoSポリペプチドのフラグメントのバリエーションを含み、前記ポリペプチド、フラグメント、バリエーション、またはフラグメントのバリエーションは、免疫グロブリン(Ig)エンドグリコシダーゼ活性を有することを条件とする。

【0140】

特定の実施態様では、EndoSポリペプチドは、*S. pyogenes* EndoSである。EndoSポリペプチドのバリエーションは、別の細菌などの別の生物由来のEndoSポリペプチドであってもよい。特定の実施態様では、細菌は、*Streptococcus equi*、*Streptococcus zooepidemicus* または *Streptococcus pyogenes* などの *Streptococcus* (Streptococcus) である。あるいは、変異体は、例えば *Corynebacterium pseudotuberculosis*、例えば CP40 タンパク質；*Enterococcus faecalis*、例えば EndoE タンパク質；または EndoF2 タンパク質のような *Elestrabacterium meningosepticum* (旧 *Flavobacterium meningosepticum*) 由来であってもよい。

20

【0141】

EndoSポリペプチドは、(a) 配列番号s: 44-47のいずれか1つのアミノ酸配列；または(b) Igエンドグリコシダーゼ活性を有する(a)のフラグメント；または(c) 配列番号s: 44-47のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有し、かつIgエンドグリコシダーゼ活性を有する(a)の変異体からなるか、または(c)からなることができる。44-47のいずれか1つの配列番号44-47のアミノ酸配列の対応する部分と少なくとも50%の同一性を有し、かつIgエンドグリコシダーゼ活性を有する、(b)の変形体；または(d) 配列番号44-47のいずれか1つの配列番号44-47のアミノ酸配列の対応する部分と少なくとも50%の同一性を有し、かつIgエンドグリコシダーゼ活性を有する。

30

【0142】

特定の実施態様では、バリエーションポリペプチドは、配列番号s: 44-47の任意の1つのアミノ酸配列、またはIgエンドグリコシダーゼ活性を有するそのフラグメントに対して、少なくとも約60%以上の同一性(例えば、60~70%、70~80%、または80~90%の同一性)を有する。特定の実施態様では、バリエーションポリペプチドは、配列番号s: 44-47のいずれか1つのアミノ酸配列、またはIgエンドグリコシダーゼ活性を有するそのフラグメントに対して90~100%の同一性を有する。

40

【0143】

プロテアーゼは、(a) 配列番号3-43または48のいずれかのアミノ酸配列；または(b) プロテアーゼ活性を有する(a)のフラグメント；または(c) 配列番号3-43または48のいずれか1つの配列番号s: 3-43または48のいずれか1つのアミノ酸配列の対応する部分と少なくとも50%の同一性を有し、かつプロテアーゼ活性を有する、(b)の変種；または(d)の変種。特定の実施態様では、バリエーションポ

50

リペプチドは、配列番号 s : 3 - 43 または 48 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、またはプロテアーゼ活性を有するその断片に対して、少なくとも約 60 % 以上の同一性（例えば、60 ~ 70 %、70 ~ 80 % または 80 ~ 90 % の同一性）を有する。特定の実施態様では、バリエーションポリペプチドは、配列番号 s : 3 - 43 もしくは 48 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、またはプロテアーゼ活性を有するそのフラグメントに対して 90 ~ 100 % の同一性を有する。

【0144】

特定の実施態様では、プロテアーゼまたはグリコシダーゼは、そのネイティブシグナル配列のデポイドであり、追加の N 末端メチオニンを有するものであり、例えば、S . p y o g e n e s の I d e S の成熟形態である配列番号 48（シグナル配列を有さないが、追加の N 末端メチオニンを有する）のようなものである。本発明の方法で使用される任意のプロテアーゼまたはグリコシダーゼは、ネイティブシグナル配列の代わりに付加された N 末端メチオニンを含むことができる。

10

【0145】

特定の実施態様では、プロテアーゼまたはグリコシダーゼは、そのネイティブシグナル配列の代わりに、非ネイティブ N 末端シグナル配列またはリーダーペプチド配列を有する。本発明の方法で使用される任意のプロテアーゼまたはグリコシダーゼは、ネイティブシグナル配列の代わりに非ネイティブ N 末端シグナル配列を含むことができる。特定の実施態様では、非ネイティブ N 末端シグナル配列は、配列番号 49 ~ 51、またはその機能保存的変種から選択される。

20

【0146】

特定の実施態様では、免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチドは、患者に存在するアデノウイルス中和抗体を分解することができる。

【0147】

特定の実施態様では、免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチドは、患者に存在する A A V 中和抗体を分解することができる。

【0148】

特定の実施態様において、免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチドは、S . p y o g e n e s (I d e S) ポリペプチドの免疫グロブリン G 分解酵素である。

【0149】

特定の実施態様において、免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチドは、患者に存在するアデノウイルス中和抗体を分解するために投与される、S . ピオゲネス (I d e S) ポリペプチドの免疫グロブリン G 分解酵素である。

30

【0150】

特定の実施態様において、免疫グロブリン G 分解酵素ポリペプチドは、患者に存在する A A V 中和抗体を分解するために投与される、S . ピオゲネス (I d e S) ポリペプチドの免疫グロブリン G 分解酵素である。

【0151】

したがって、特定の実施態様において、本発明は、遺伝子治療ベクターを必要とする患者に投与することによって治療された疾患の治療における、S . p y o g e n e s (I d e S) ポリペプチドの免疫グロブリン G 分解酵素の使用に関する。

40

【0152】

このように、特定の実施態様において、本発明は、遺伝子治療ベクターを必要とする患者に投与することによって治療される疾患の治療における、S . p y o g e n e s (I d e S) ポリペプチドの免疫グロブリン G 分解酵素の使用に関するものであり、ここで、I d e S は、患者に存在する中和抗 A A V 抗体を分解するために患者に投与される。

【0153】

特定の実施態様では、患者はベクター血清陽性患者であり、本発明は、A A V 血清陽性患者の治療に使用するための S . p y o g e n e s (I d e S) ポリペプチドの免疫グロブリン G 分解酵素に関する。

50

【0154】

特定の実施態様では、患者はベクターセロネガティブ患者であり、本発明は、AAVセロネガティブ患者の治療に使用するための *S. pyogenes* (IdeS) ポリペプチドの免疫グロブリンG分解酵素に関する。

【0155】

特定の実施態様において、本発明による IdeS ポリペプチドは、*S. pyogenes* IdeS、またはシステインプロテアーゼ活性を保持する *S. pyogenes* IdeS のバリエーションまたはフラグメントである。変異体は、別の生物、例えば別の細菌からの IdeS ポリペプチドであってもよい。好ましくは、この細菌はストレプトコッカス属である。好ましくは、ストレプトコッカスは、A群ストレプトコッカス、C群ストレプトコッカス、またはG群ストレプトコッカスである。特に、バリエーションは、*S. equi* または *S. zooepidemicus* のようなC群ストレプトコッカスからの IdeS ポリペプチドであってもよい。あるいは、バリエーションは、シュードモナス・プティダ (*Pseudomonas putida*) 由来のものであってもよいし、他の細菌株由来の組換えバリエーションであってもよい。特定の実施態様では、本発明に従った IdeS ポリペプチドは、配列番号 s : 3 - 43 または 48 のいずれかの配列を含む。

10

【0156】

特定の実施態様において、ポリペプチドのシステインプロテアーゼ活性は、IgA、IgM、IgD および IgE アイソタイプを切断することなく、IgG 重鎖の下側ヒンジ領域のグリシン残基 237 で IgG の4つのヒトサブクラスのすべてを切断する能力を有する。

20

【0157】

特定の実施態様では、IdeS ポリペプチドは、配列番号 3 ~ 18、23 または 48 のいずれかのアミノ酸配列、またはその機能保存的バリエーションを含むか、またはそれからなる。

【0158】

特定の実施態様では、本発明に従ったポリペプチドは、配列番号 3 ~ 18、23、または 48 のいずれかの配列から 1、2、3、4、または 5 個のアミノ酸で異なってもよい。

【0159】

特定の実施態様では、本発明は、配列番号 3 ~ 18、23 または 48 のいずれかのポリペプチドの機能保存的変異体であるポリペプチドを含む。

30

【0160】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97% または 100% の、配列番号 3 ~ 18、23、または 48 のいずれかの配列と同一性があり、IgA、IgM、IgD および IgE アイソタイプを切断することなく IgG 重鎖の下部ヒンジ領域のグリシン残基 237 で IgG の4つのヒトサブクラスすべてを切断することができる。

【0161】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号 3 ~ 18、23 または 48 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるか、または配列番号 3 ~ 18、23 または 48 のいずれかの配列と少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または 99.9% の同一性を含むその変異体からなり、IgA、IgM、IgD、および IgE アイソタイプを切断することなく、IgG 重鎖の下部ヒンジ領域のグリシン残基 237 で IgG の4つのヒトサブクラスすべてを切断することができる。

40

【0162】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、IgA、IgM、IgD および IgE アイソタイプを切断することなく、IgA 重鎖の下側ヒンジ領域のグリシン残基 23

50

7でI g Gの4つのヒトサブクラスのすべてを切断することが依然として可能である、配列番号3～18、23または48のいずれかのポリペプチドのフラグメントである。

【0163】

特定の実施態様において、本発明の即席ポリペプチドは、配列番号3～18、23または48のいずれかのアミノ酸残基に対応する残基L y s - 55および/またはC y s - 65および/またはH i s - 233および/またはA s p - 255および/またはA s p - 257を含む。特定の実施態様では、本発明のポリペプチドは、配列番号4のL y s - 55、C y s - 65、H i s - 233、A s p - 255およびA s p - 257に対応する残基のそれぞれを含む。特定の実施態様では、本発明のインスタントポリペプチドは、配列番号4のL y s - 55、C y s - 65、H i s - 233、A s p - 255およびA s p - 257に対応する残基のうち少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、またはすべての5つの残基を含む。

10

【0164】

本発明のポリペプチドまたはフラグメントが、ヒトI g Gの4つのサブクラスを切断することができるかどうかを検証するために、各ポリペプチドまたはフラグメントを用いて試験を行ってもよい。例えば、試験されたポリペプチドまたはフラグメントをヒトI g Gとインキュベートした後、消化フラグメントの研究はウェスタンブロットによって行われる。インタクトなI g Gの検出の欠如およびヒトI g Gの消化フラグメントの検出は、試験されたポリペプチドまたはフラグメントが、I g Gの4つのヒトサブクラスすべてを切断する能力を有することを示すであろう。

20

【0165】

本明細書で使用されるように、用語「機能保存的バリエーション」とは、ペプチドの全体的なコンフォメーションおよび機能を変化させることなく、タンパク質または酵素中の所定のアミノ酸残基が変更（挿入、欠失または置換）されたものを指す。このようなバリエーションには、欠失、挿入および/または置換のようなアミノ酸の変化を有するタンパク質が含まれる。「欠失」とは、タンパク質中の1個以上のアミノ酸の欠失を意味する。「挿入」とは、タンパク質中の1つ以上のアミノ酸の付加を意味する。「置換」とは、タンパク質中の別のアミノ酸残基による1個以上のアミノ酸の置換を意味する。典型的には、所与のアミノ酸は、類似の特性（例えば、極性、水素結合能、酸性、塩基性、疎水性、芳香族など）を有するアミノ酸によって置換される。この所定のアミノ酸は、天然アミノ酸であってもよいし、非天然アミノ酸であってもよい。保存されていると示されたアミノ酸以外のアミノ酸は、類似した機能の任意の2つのタンパク質間のパーセントのタンパク質またはアミノ酸配列の類似度が変化してもよく、例えば、類似度がM E G A L I G Nアルゴリズムに基づいているクラスタ法などのアラインメントスキームに従って決定されるように、70%から99%の間であるように、タンパク質中で異なってもよい。機能保存的バリエーションはまた、B L A S TまたはF A S T Aアルゴリズムによって決定される少なくとも60%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%のアミノ酸同一性を有し、比較対象のネイティブまたは親タンパク質と同じまたは実質的に類似した特性または機能を有するポリペプチドを含む。つのアミノ酸配列は、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上のアミノ酸が同一であり、または約90%以上、より好ましくは95%以上のアミノ酸が、短い方の配列の全長にわたって類似（機能的に同一）している場合、「実質的に相同」または「実質的に類似」である。好ましくは、類似または相同な配列は、例えば、G C G (G e n e t i c s s C o m p u t e r G l o u p e r , P r o g r a m i n a l M a n u a l f o r t h e G C G パッケージ、バージョン7、M a d i s o n , W i s c o n s i n) のパイルアッププログラム、またはB L A S T、F A S T Aなどの配列比較アルゴリズムのいずれかを用いたアラインメントによって同定される。

30

40

【0166】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、1つ以上の残基が機能的に類似し

50

た残基で保存的に置換されている配列番号4または配列番号48の配列からなり、本明細書に記載されているような配列番号4または配列番号48のポリペプチドの機能的側面を表示する。

【0167】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、1つ以上の残基が機能的に類似した残基で保存的に置換されており、本明細書に記載されているような配列番号3-18、23または48のポリペプチドの機能的側面を表示する配列番号3-18、23または48のいずれかの配列からなる。

【0168】

保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンのような1つの非極性(疎水性)残基を別の残基に置換すること、アルギニンとリジンの間のような1つの極性(親水性)残基を別の残基に置換することが挙げられる。グルタミンとアスパラギンの間、グリシンとセリンの間、リジン、アルギニンまたはヒスチジンのような1つの塩基性残基の別のものへの置換、またはアスパラギン酸またはグルタミン酸のような1つの酸性残基の別のものへの置換。

【0169】

「保存的置換」という用語は、非誘導体化残基の代わりに化学的に誘導体化された残基を使用することを含む。「化学的誘導体化」とは、官能性側基の反応により化学的に誘導体化された1つ以上の残基を有する対象ペプチドを指す。このような誘導体化された分子の例としては、例えば、遊離アミノ基が誘導体化されてアミン塩酸塩、p-トルエンシルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチロキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成している分子が挙げられる。遊離カルボキシル基は、塩、メチルおよびエチルエステル、または他のタイプのエステルまたはヒドラジドを形成するために誘導体化されていてもよい。遊離ヒドロキシル基は、O-アシルまたはO-アルキル誘導体を形成するために誘導体化されてもよい。ヒスチジンのイミダゾール窒素は、N-イム-ベンジルヒスチジンを形成するように誘導体化されてもよい。化学的誘導体はまた、20の標準アミノ酸の1種以上の天然に存在するアミノ酸誘導体を含むペプチドを含む。例としては、4-ヒドロキシプロリンが挙げられる。4-ヒドロキシプロリンがプロリンに置換されてもよく、5-ヒドロキシリジンがリジンに置換されてもよく、3-メチルヒスチジンがヒスチジンに置換されてもよく、ホモセリンがセリンに置換されてもよく、オルニチンがリジンに置換されてもよい。用語「保存的置換」はまた、ペプチドまたはタンパク質の二次構造を制御し安定化することを目的とした非天然アミノ酸の使用を含む。これらの非天然アミノ酸は、以下に記載するように、プロリノアミノ酸、 α -アミノ酸、N-メチルアミノ酸、シクロプロピルアミノ酸、 β -アミノ酸、置換アミノ酸などの化学的に修飾されたアミノ酸である。これらの非天然アミノ酸には、フッ素化、塩素化、臭素化またはヨウ素化された修飾アミノ酸も含まれていてもよい。

【0170】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、配列番号の少なくとも1、2、5、10、20、30、50またはそれ以上の突然変異(アミノ酸の置換、欠失または挿入であり得る)によって異なる。配列番号4または配列番号3~18、23または48の配列のいずれか。例えば、1~50、2~30、3~20または5~10アミノ酸の置換、欠失または挿入を行うことができる。修飾されたポリペプチドは、一般に、IgG特異的システインプロテアーゼとしての活性を保持している。特定の実施態様では、アミノ酸置換は保存的置換である。

【0171】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、シグナル配列をさらに含み得る。

【0172】

特定の実施態様において、シグナル配列は、アミノ酸配列：配列番号49、配列番号50または配列番号51またはそれらの機能保存的変異体を含むか、またはそれらからなる。

10

20

30

40

50

【0173】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、タグを含み得る。タグは、ペプチドの精製に役立つタグを含む配列であり、免疫標識技術を使用する細胞または組織サンプル内の前記ペプチドまたはポリペプチドの局在化、イムノプロットングによる前記ペプチドまたはポリペプチドの検出などのために、アフィニティークロマトグラフィーなどの様々な技術によって取り付けられる。本技術で一般的に用いられるタグは、GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）タグ、FLAG（商標）タグ、Streptタグ（商標）、V5タグ、mycタグ、Hisタグなどである。

【0174】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、蛍光色素によって標識され得る。色素標識蛍光ペプチドは、細胞研究における重要なツールである。ペプチドは、N末端側またはC末端側で標識することができる。

10

【0175】

アミン反応性蛍光色素を使用するN末端ペプチド標識：アミン反応性蛍光プローブは、N末端またはリジン残基でペプチドを修飾するために広く使用されている。さまざまなペプチドを標識するために多くの蛍光アミノ反応性色素が開発されており、得られたコンジュゲートは生物学的用途で広く使用されている。アミン反応性蛍光試薬の3つの主要なクラスは、現在、ペプチドの標識に使用されている。スクシンイミジルエステル（SE）、イソチオシアネート、および塩化スルホニルである。

【0176】

アミン含有蛍光色素を使用するC末端標識であるアミン含有色素を使用して、水溶性カルボジイミド（EDCなど）を使用してペプチドを修飾し、ペプチドのカルボキシ基をアミド基に変換する。NHSまたはNHSSのいずれかを使用して、EDCを介したタンパク質-カルボン酸コンジュゲーションのカップリング効率を向上させることができる。

20

【0177】

特定の実施態様において、本発明による治療方法において使用されるポリペプチドは、それらの治療効果を改善するために改変され得る。治療用化合物のそのような修飾は、毒性を減少させ、循環時間を増加させ、生体内分布を修飾し、または免疫原性を低下させるために使用され得る。例えば、潜在的に重要な治療用化合物の毒性は、生体内分布を改変する様々な薬物担体ビヒクルと組み合わせることによって大幅に減少させることができる。

30

【0178】

薬物の生存能力を改善するための戦略は、水溶性ポリマーの利用である。さまざまな水溶性ポリマーが生体内分布を変化させ、細胞取り込みのモードを改善し、生理学的障壁を通過する透過性を変化させ、体からのクリアランス率を変更することが示されている。ターゲティング効果または徐放効果のいずれかを達成するために、末端基として、骨格の一部として、またはポリマー鎖上のペンダント基として薬物部分を含む水溶性ポリマーが合成されてきた。

【0179】

ポリエチレングリコール（PEG）は、その高度の生体適合性および改変の容易さを考慮して、薬物担体として広く使用されてきた。さまざまな薬物、タンパク質、およびリポソームへの付着は、滞留時間を改善し、毒性を減少させることが示されている。PEGは、鎖の末端にあるヒドロキシル基を介して、および他の化学的方法を介して、活性剤に結合することができる。ただし、PEG自体は1分子あたり最大2つの活性剤に制限されている。別のアプローチでは、PEGとアミノ酸の共重合体が、PEGの生体適合性を保持するが、分子あたりの多数の付着点（より多くの薬物負荷を提供する）という追加の利点があり、合成的に可能である新規生体材料として検討され、さまざまなアプリケーションに適合するように設計されている。

40

【0180】

当業者は、薬物の効果的な修飾のためのペグ化技術を知っている。たとえば、PEGと

50

リジンなどの三官能性モノマーの交互ポリマーからなるドラッグデリバリーポリマーは、Vectra Med (Plainsboro, N. J.) によって使用されてきた。PEG鎖(通常2000ダルトン以下)は、安定したウレタン結合を介してリジンのα-およびε-アミノ基に結合している。このようなコポリマーは、ポリマー鎖に沿って厳密に制御された所定の間隔で反応性ペンダント基(リジンのカルボン酸基)を提供しながら、PEGの望ましい特性を保持する。反応性ペンダント基は、誘導體化、架橋、または他の分子との結合に使用できる。これらのポリマーは、ポリマーの分子量、PEGセグメントの分子量、および薬物とポリマーの間の切断可能な結合を変化させることにより、安定した長期循環プロ薬物を製造するのに有用である。PEGセグメントの分子量は、薬物/結合基複合体の間隔とコンジュゲートの分子量あたりの薬物の量に影響する(PEGセグメントが小さいほど、薬物の負荷が大きくなる)。一般に、ブロックコポリマーコンジュゲートの全体的な分子量を増加させると、コンジュゲートの循環半減期が増加する。それにもかかわらず、コンジュゲートは、容易に分解可能であるか、または閾値を制限する糸球体濾過よりも低い分子量(例えば、45 kDa未満)を有していなければならない。

10

20

30

40

50

【0181】

さらに、循環半減期および生体内分布を維持するのに重要なポリマー骨格に加えて、リンカーを使用して、特定のトリガー、典型的には酵素によって骨格ポリマーから放出されるまで治療薬をプロドラッグ形態に維持することができる。標的組織における活動。例えば、このタイプの組織活性化薬物送達は、生体内分布の特定の部位への送達が必要であり、治療薬が病状の部位またはその近くで放出される場合に特に有用である。活性化薬物送達で使用するための連結グロブライブラリーは当業者に知られており、酵素反応速度論、活性酵素の有病率、および選択された疾患特異的酵素の切断特異性に基づくことができる(例えば、Vectra Medによって確立された技術を参照)。、プレーンズボロ、ニュージャージー州)。そのようなリンカーは、治療的送達のために本明細書に記載のペプチド由来を修飾する際に使用することができる。

【0182】

本発明によれば、ポリペプチドは、従来の自動化ペプチド合成法によって、または組換え発現によって産生され得る。タンパク質を設計および製造するための一般的な原理は、当業者によく知られている。

【0183】

本発明のポリペプチドは、従来の技術に従って、溶液中または固体支持体上で合成することができる。さまざまな自動シンセサイザーが市販されており、Stewart and Young; Tam et al.、1983; Merrifield、1986およびBaranyおよびMerrifield、GrossおよびMeienhofer、1979で説明されている既知のプロトコルに従って使用できる。本発明のペプチドは、Applied Biosystems Inc.のモデル433Aなどの例示的なペプチドシンセサイザーを使用する固相技術によって合成することもできる。自動ペプチド合成または組換え法によって生成されたものは、逆相HPLC分析を使用して決定できる。各ペプチドの化学的真正性は、当業者に周知の任意の方法によって確立することができる。

【0184】

自動ペプチド合成の代替として、選択したタンパク質をコードするヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトし、そして以下のような発現に適した条件下で培養する組換えDNA技術を使用することができる。より長いポリペプチドを産生するためには、組換え法が特に好ましい。

【0185】

ペプチドまたはタンパク質コード配列を含み、発現するために、様々な発現ベクター/宿主システムを利用することができる。これらには、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物が含まれるが、これらに限定されない。酵母発現ベクターで形質転換された酵母(Giga-Hama et al.、1999); ウイルス発現ベクターに感染した昆虫細胞系(例えば、バキュロウイルス、Gh

osh et al.、2002を参照)。ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)でトランスフェクトされた、または細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド; 例えば、Babe et al.、2000を参照)で形質転換された植物細胞系; または動物細胞システム。当業者は、タンパク質の哺乳動物発現を最適化するための様々な技術を知っている。例えば、Kaufman, 2000; Colosimo et al.、2000を参照されたい。組換えタンパク質産生に有用な哺乳動物細胞には、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、COS細胞(COS-7など)、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562および293細胞が含まれるが、これらに限定されない。細菌、酵母および他の無脊椎動物におけるペプチド基質または融合ポリペプチドの組換え発現のための例示的なプロトコールは、当業者に知られており、本明細書で以下に簡単に説明する。米国特許米国特許第6,569,645号; 米国特許米国特許第6,043,344号; 米国特許米国特許第6,074,849号; および米国特許第5,059,059号。米国特許第6,579,520号は、ペプチドの組換え生産のための特定の例を提供し、これらの特許は、それらの教示の参照により本明細書に明示的に組み込まれる。組換えタンパク質の発現のための哺乳動物宿主システムもまた、当業者によく知られている。宿主細胞株は、発現されたタンパク質を処理するか、またはタンパク質活性を提供するのに有用である特定の翻訳後修飾を生成する特定の能力のために選択され得る。ポリペプチドのそのような修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が含まれるが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」型を切断する翻訳後プロセッシングも、正しい挿入、折り畳み、および/または機能にとって重要である可能性がある。CHO、HeLa、MDCK、293、WI38などの異なる宿主細胞は、そのような翻訳後活性のための特定の細胞機構および特徴的なメカニズムを有し、導入された外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選択され得る。

10

20

【0186】

本発明のポリペプチド由来の組換え生産において、ペプチド由来をコードするためのポリヌクレオチド分子を含むベクターを使用することが必要であろう。そのようなベクターを調製する方法、ならびにそのようなベクターで形質転換された宿主細胞を産生する方法は、当業者によく知られている。そのような試みで使用されるポリヌクレオチド分子は、宿主における増殖のために、一般に選択可能なマーカーおよび複製起点を含むベクターに結合され得る。発現構築物のこれらの要素は、当業者によく知られている。一般に、発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫の遺伝子に由来するものなど、適切な転写または翻訳調節配列に作動可能に連結されている所与のタンパク質をコードするDNAを含む。調節配列の例には、転写プロモーター、オペレーター、またはエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、および転写および翻訳を制御する適切な配列が含まれる。

30

【0187】

「発現ベクター」、「発現構築物」または「発現カセット」という用語は、本明細書全体で交換可能に使用され、遺伝子産物をコードする核酸を含む任意のタイプの遺伝子構築物を含み、その一部または全部が核酸をコードする配列は転写することができる。

40

【0188】

本発明のペプチドまたはポリペプチドの発現のための適切な発現ベクターの選択は、もちろん、使用される特定の宿主細胞に依存し、そして通常の職人の技術の範囲内である。哺乳動物発現ベクターの構築方法は、例えば、岡山ら、1983; Cosman et al.、1986; Cosman et al.、1984; EP-A-0367566; およびWO91/18982に記載されている。発現ベクターを作製するための他の考慮事項は、例えば、Makrides et al.、1999; Kost et al.、1999。Wurm et al.、1999に詳述されており、組換えタンパク質生産のための哺乳動物細胞における大規模な一過性発現を考慮するための教育因子として本明細書に組み込まれる。

50

【0189】

発現は、宿主細胞における目的の核酸の発現を駆動するために使用され得るウイルスおよび哺乳動物の両方の供給源からのエンハンサー/プロモーターなどの適切なシグナルがベクターにおいて提供されることを必要とする。通常、発現されている核酸はプロモーターの転写制御下にある。「プロモーター」は、遺伝子の特定の転写を開始するために必要とされる、細胞の合成機構によって認識される、または導入された合成機構によって認識されるDNA配列を含む。ヌクレオチド配列は、調節配列が目的のペプチド（すなわち、4N1K、変異体など）をコードするDNAに機能的に関連している場合に作動可能に連結されている。したがって、プロモーターヌクレオチド配列が配列の転写を指示する場合、プロモーターヌクレオチド配列は、所与のDNA配列に作動可能に連結されている。

10

【0190】

同様に、「転写制御下」という語句は、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ために、核酸に対して正しい位置および配向にあることを意味する。核酸の発現を駆動する任意のプロモーターを使用することができる。目的の核酸配列の発現を制御するために使用される特定のプロモーターは、それが標的細胞における核酸の発現を指示することができる限り、重要であるとは考えられていない。したがって、ヒト細胞が標的とされる場合、ヒト細胞で発現することができるプロモーターに隣接し、その制御下に核酸コード領域を配置することが好ましい。一般的に言えば、そのようなプロモーターは、ヒトまたはウイルスのプロモーターのいずれかを含み得る。一般的なプロモーターには、例えば、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ルース肉腫ウイルスロングターミナルリピート、 α -アクチン、ラットインスリンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、ヒトアルファ-1が含まれる。抗トリプシンプロモーター、トランスチレチンプロモーター、TBGプロモーターおよび他の肝臓特異的プロモーター、デスミンプロモーターおよび類似の筋肉特異的プロモーター、EF1-アルファプロモーター、CAGプロモーターおよび他の構成的プロモーター、多組織特異性を有するハイブリッドプロモーター、プロモーターシナプシンおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターのようなニューロンに特異的であり、これらはすべて、周知のプロモーターであり、当業者に容易に利用可能であり、目的のコード配列の高レベルの発現を得るために使用することができる。目的のコード配列の発現を達成するために当技術分野で周知である他のウイルスまたは哺乳動物の細胞または細菌ファージプロモーターの使用もまた、発現のレベルがタンパク質の回収可能な収量を生み出すのに十分であるという条件で企図される。興味よく知られている特性を持つプロモーターを使用することにより、トランスフェクションまたは形質転換後の目的のタンパク質の発現レベルとパターンを最適化することができる。誘導性プロモーターも使用することができる。

20

30

【0191】

タンパク質発現において使用される別の調節エレメントは、エンハンサーである。これらは、DNAの同じ分子上の離れた位置にあるプロモーターからの転写を増加させる遺伝的要素である。発現構築物がcDNAインサートを使用する場合、遺伝子転写物の適切なポリアデニル化をもたらすために、通常、ポリアデニル化シグナル配列を含めることが望まれるであろう。選択されたトランスジェニック動物種の細胞によって認識される任意のポリアデニル化シグナル配列は、ヒトまたはウシ成長ホルモンおよびSV40ポリアデニル化シグナルなどの本発明での使用に適している。

40

【0192】

上記で説明したように、IdeSのような免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドの使用は、AAVベクターを使用する遺伝子治療によって治療される疾患の治療に適し得る。

【0193】

治療組成物

特定の実施態様において、本発明は、それを必要とする患者においてベクターを使用する遺伝子治療によって治療される疾患の治療に使用するための本発明による免疫グロブリ

50

ンG分解酵素ポリペプチドまたは免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸を含む治療組成物、または免疫グロブリンG分解酵素ポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターに関する。

【0194】

本発明の任意の治療薬は、薬学的に許容される賦形剤、および任意選択で生分解性ポリマーなどの徐放性マトリックスと組み合わせて、治療用組成物を形成することができる。

【0195】

薬学的に」または「薬学的に許容される」は、必要に応じて、哺乳動物、特にヒトに投与されたときに有害、アレルギーまたは他の有害な反応を生じない分子実体および組成物を指す。薬学的に許容される担体または賦形剤とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料、または任意のタイプの製剤補助剤を指す。

10

【0196】

医薬組成物の形態、投与経路、投与量およびレジメンは、当然、治療される状態、疾患の重症度、患者の年齢、体重、および性別などに依存する。

【0197】

本発明の医薬組成物は、局所、経口、鼻腔内、非経口、眼内、静脈内、筋肉内または皮下投与などのために処方され得る。

【0198】

本発明の医薬組成物は、注射することができる製剤に薬学的に許容されるビヒクルを含み得る。これらは、特に等張性、滅菌、生理食塩水（リン酸ナトリウムまたは二ナトリウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムまたはマグネシウムなど、またはそのような塩の混合物）、または乾燥した、特に凍結乾燥した組成物であり得、添加時に、滅菌水または生理食塩水の場合は、注射液の構成が可能である。投与に使用される用量は、様々なパラメーターの関数として、特に、使用される投与様式、関連する病状、あるいは所望の治療期間のモードの機能として適合させることができる。

20

【0199】

さらに、他の薬学的に許容される形態には、例えば、経口投与用の錠剤または他の固体、徐放性カプセル；現使用することができる他のフォームが含まれる。

【0200】

本発明の医薬組成物は、さらなる治療的に活性な薬剤を含み得る。

30

【0201】

プロテアーゼまたはグリコシダーゼは、任意の適切な用量で対象に投与することができる。例えば、適切な投与量は、対象の約0.05 mg/kgから約5 mg/kg体重、または対象の約0.1 mg/kgから約4 mg/kg体重であり得る。

【0202】

特定の実施態様において、IdeZは、対象の約0.01 mg/kgから約10 mg/kg体重の投薬量で投与される。例えば、適切な投与量は、対象の約0.05 mg/kgから約5 mg/kg体重、または対象の約0.1 mg/kgから約4 mg/kg体重であり得る。

【0203】

特定の実施態様において、IdeSは、対象の約0.01 mg/kgから約10 mg/kg体重の投薬量で投与される。例えば、適切な投与量は、対象の約0.05 mg/kgから約5 mg/kg体重、または対象の約0.1 mg/kgから約4 mg/kg体重であり得る。

40

【0204】

特定の実施態様において、EndoSは、対象の約0.01 mg/kgから約10 mg/kg体重の投薬量で投与される。例えば、適切な投与量は、対象の約0.05 mg/kgから約5 mg/kg体重、または対象の約0.1 mg/kgから約4 mg/kg体重であり得る。

【0205】

50

本発明による方法は、本明細書に別段の記載がない限り、任意の適切な順序で実施することができる。特定の実施態様では、方法は、最初に（a）中和抗体を分解または消化するのに有効なプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼを対象に投与することを含み得る。次に（b）組換えウイルスベクターを対象に投与する。特定の実施態様において、（b）組換えウイルスベクターを対象に投与することは、（a）中和抗体を分解または消化するのに有効なプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼを対象に投与した後、約1分から約90日の間に行われる。特定の実施態様において、（a）中和抗体を分解または消化するのに有効なプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼを対象に投与すること、および（b）組換えウイルスベクターを対象に投与することは、ほぼ同時に行われる。

【0206】

特定の実施態様において、方法は、最初に（a）異種ポリヌクレオチドを保有する組換えウイルスベクターを対象に投与し、次に（b）組換えウイルスベクターおよび/または異種ポリヌクレオチドまたは異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体を分解または消化するのに有効な量のプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼを対象に投与することを含み得る。特定の実施態様において、（a）異種ポリヌクレオチドを有する組換えウイルスベクターを対象に投与した後、約1分から約90日の間に、（b）組換えウイルスベクターおよび/または異種ポリヌクレオチドまたは異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体を分解または消化するのに有効な量のプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼを対象に投与することが行われる。特定の実施態様において、（a）異種ポリヌクレオチドまたは異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドを対象に投与すること、および/または（b）組換えウイルスベクターに結合する抗体を分解または消化するのに有効な量のプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼを対象に投与することは、ほぼ同時に実行される。

【0207】

中和抗体などの抗体は、既存のものであり得、そしてウイルスベクターの投与前でさえ、組換えウイルスベクター細胞の形質導入を阻害または低減するレベルで対象に存在し得る。あるいは、抗体は、組換えウイルスベクターが基づいているウイルスへの曝露後に対象において発生し得る。さらに、中和抗体などの抗体、または異種ポリヌクレオチドに結合する抗体、またはウイルスベクターによってキャプシド形成された異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドは、組換えウイルスベクターの投与後に対象において発生し得る。

【0208】

したがって、本明細書の方法は、既存の抗体を有する対象および既存の抗体を有さない対象に適用可能である。本明細書に記載されるように、そのような対象には、野生型ウイルスに曝露され、野生型ウイルスに基づくウイルスベクターに対する既存の抗体を開発した対象、ならびにウイルスベクター遺伝子治療を受け、抗体を開発した対象が含まれる。続いて、同じウイルスベクター遺伝子治療の1つまたは複数の追加用量で治療するか（再投与と呼ばれる）、または同じウイルスベクターを使用して遺伝子治療を提供するために異なる遺伝子治療処置（例えば、異なる異種ポリヌクレオチド）で治療することができる。

【0209】

対象は、ウイルスベクター投与前および/またはプロテアーゼグリコシダーゼの投与前に抗体について試験され得る。試験する抗体の非限定的な例には、中和抗体、本明細書に記載のプロテアーゼまたはグリコシダーゼに結合する抗体、異種ポリヌクレオチドに結合する抗体、および異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体が含まれる。したがって、対象は、組換えウイルスベクターおよび/またはプロテアーゼグリコシダーゼの投与前の投与前に、中和抗体、本明細書に記載のプロテアーゼまたはグリコシダーゼに結合する抗体、異種ポリヌクレオチドに結合する抗体、または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合す

10

20

30

40

50

る抗体についてスクリーニングすることができる。。

【0210】

本明細書に記載のプロテアーゼまたはグリコシダーゼに結合する既存の抗体（例えば、IgG）を有する対象は、任意選択で、本発明による方法による初期治療から除外することができる。しかしながら、プロテアーゼまたはグリコシダーゼに結合する抗体を有するまたは開発するすべての対象が、本発明による治療方法から除外される必要があるわけではない。例えば、力価が15mg/リットル未満である検出可能な抗Ides IgGを有する対象は、依然として、本発明による方法を使用して治療することができる。

【0211】

対象はまた、中和抗体、異種ポリヌクレオチドに結合する抗体、または組換えウイルスベクターの投与後に異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体についてスクリーニングすることができる。そのような対象は、場合により、既存の抗体が検出されていない対象において、そのような抗体が発生するか、または発生が妨げられるかどうかを決定するために、または、既存の抗体を有する対象において、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼがそのような既存の抗体を減少または排除するかどうかを決定するために、組換えウイルスベクターの投与後一定期間モニターすることができる。

【0212】

特定の実施態様において、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、中和抗体、本明細書に記載のプロテアーゼまたはグリコシダーゼに結合する抗体、異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する異種ポリヌクレオチドまたは抗体に結合する抗体の存在について陽性であると試験した後、対象に投与される。特定の実施態様において、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、中和抗体、本明細書に記載のプロテアーゼまたはグリコシダーゼに結合する抗体、または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチド異種ポリヌクレオチドに結合する抗体である。

【0213】

特定の実施態様において、対象は、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの投与前または後に抗体について試験されない。したがって、中和抗体、本明細書に記載のプロテアーゼまたはグリコシダーゼに結合する抗体、異種ポリヌクレオチドに結合する抗体、またはプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの投与後に異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体について試験する。または、組換えウイルスベクターの投与は、本発明による治療方法において任意である。

【0214】

プロテアーゼまたはグリコシダーゼは、対象に何度でも投与することができる。例えば、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、対象に2~5回、2~10回、2~15回投与することができる。

【0215】

プロテアーゼまたはグリコシダーゼは、連続日、隔日、または不規則な基準などの定期的に、任意の期間、対象に投与することができる。特定の実施態様において、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、約1~12週間、または約1~10週間、または約1~8週間、または約1~6週間、または約1~4週間、または組換えウイルスベクターの投与後約1~2週間、または約2週間投与される。

【0216】

特定の実施態様において、組換えウイルスベクターは、プロテアーゼまたはグリコシダーゼが対象に投与される前または後に投与される。特定の実施態様において、組換えウイルスベクターは、例えば、プロテアーゼまたはグリコシダーゼを対象に投与してから、1~12、12~24、または24~48時間、または2~4、4~6、6~8、8~10、10~14、14~20、20~25、25~30、30~50、または50日以上で対象に投与される。特定の実施態様において、プロテアーゼまたはグリコシルは、例えば

10

20

30

40

50

、組換えウイルスベクターを対象に投与してから、1～12、12～24、または24～48時間、または2～4、4～6、6～8、8～10、10～14、14～20、20～25、25～30、30～50、または50日以上で対象に投与される。

【0217】

組換えウイルスベクター、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、単独でまたは組み合わせて投与することができる。特定の実施態様において、組換えウイルスベクターは、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼとは別に対象に投与される。特定の実施態様において、組換えウイルスベクターは、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼと組み合わせて対象に投与される。

【0218】

特定の実施態様において、プロテアーゼおよびグリコシダーゼの混合物は、対象に1回または複数回投与される。特定の実施態様において、2つ以上のプロテアーゼまたはグリコシダーゼが、対象に1回以上投与される。

【0219】

特定の実施態様において、少なくとも1つの免疫抑制剤は、組換えウイルスベクター、プロテアーゼまたはグリコシダーゼの対象への投与の前に、実質的に同時に、または後に、対象に投与される。特定の実施態様において、免疫抑制剤は、ステロイドなどの抗炎症剤である。特定の実施態様において、免疫抑制剤は、プレドニゾン、シクロスポリン（例えば、シクロスポリンA）、ミコフェノール酸、リツキシマブ、ラバマイシンまたはそれらの誘導体である。

【0220】

体液性免疫を低下させるための追加の戦略には、抗体を除去、枯渇、捕捉、および/または不活性化する方法が含まれ、一般にアフエーシス、より具体的には、血液製剤が関与する血漿交換と呼ばれる。アフエーシスまたはプラズマフェーシスは、患者に戻る前に、コンポーネントの追加、削除、および/または交換によってプラズマを変更するデバイスを通じて、被験者の血漿をエクスピボ（体外）で循環させるプロセスである。血漿交換は、血液製剤（例えば、血漿）からヒト免疫グロブリン（例えば、IgG、IgE、IgA、IgD）を除去するために使用することができる。この手順は、組換えウイルスベクターに結合し、異種ポリヌクレオチドに結合し、異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合し、プロテアーゼに結合し、および/またはそれにより、グリコシダーゼは、例えば、ウイルスベクターの中和に寄与する可能性がある、治療された対象における抗体の力価を低下させる。例として、AAVキャプシドアフィニティーマトリックスカラムで構成されるデバイスがある。このようなAAVキャプシドアフィニティーマトリックスに血液製剤（血漿など）を通過させると、AAV抗体のみ、およびすべてのアイソタイプ（IgG、IgMなどを含む）が結合する。免疫吸着（米国特許出願公開米国特許出願公開第2008/0169273A1号）もまた、免疫グロブリン、より具体的には抗AAV抗体を枯渇させるために使用することができる。親和性リガンド（国際特許出願公開WO/2018/158397）もまた、免疫グロブリン、より具体的には抗AAV抗体を枯渇させるために使用することができる。前述の戦略のいずれも、組換えウイルスベクター、プロテアーゼまたはグリコシダーゼを対象に投与する前、実質的に同時に、または投与後に使用することができる。

【0221】

全身遺伝子導入におけるAAVに対する体液性免疫を低減（克服）または回避するための追加の戦略には、抗AAV抗体を吸着するためのおとりとしてのAAV空キャプシド粒子および/またはキャプシドタンパク質の使用が含まれる。さらにさらなる戦略は、Mingozzi et al.、2013、Blood、122：23-36に記載されている。

【0222】

本発明によれば、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼは、リボソーム、ナノ粒子、脂質ナノ粒子、ポリマー、微粒子、マイクロカプセル、ミセル、または細胞外小胞とカプセル化または複合体化され得る。

10

20

30

40

50

【0223】

本発明によれば、ウイルス粒子は、リポソーム、ナノ粒子、脂質ナノ粒子、ポリマー、微粒子、マイクロカプセル、ミセル、または細胞外小胞とカプセル化または複合体化され得る。

【0224】

特定の実施態様において、リポソーム、ナノ粒子、脂質ナノ粒子、ポリマー、微粒子、マイクロカプセル、ミセル、または細胞外小胞は、遺伝子治療核酸の非ウイルス送達のために本発明において使用され得る。

【0225】

「脂質ナノ粒子」または「LNP」は、組換えウイルスベクターおよび/またはプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの送達に有用であり、ナノスケール、すなわち約10nmから約、または約50から約500nm、または約75から約127nmの寸法を有する脂質ベースの小胞を指す。理論に拘束されることなく、LNPは、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、または組換えウイルスベクターに免疫系からの部分的または完全なシールドを提供すると考えられている。シールドは、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、または組換えウイルスベクターに対する実質的な免疫応答をインビボで誘導することを回避しながら、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、または組換えウイルスベクターの組織または細胞への送達を可能にする。シールドはまた、インビボで（例えば、ヒトなどの対象において）、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、または組換えウイルスベクターに対する実質的な免疫応答を誘導することなく、反復投与を可能にし得る。シールドはまた、送達効率、治療効果の持続時間、および/またはインビボでの治療効果を改善または増加させ得る。

10

20

【0226】

AAVのpI（等電点）は、約6から約6.5の範囲にある。したがって、AAV表面はわずかに負の電荷を帯びている。したがって、LNPが、例えば、アミノ脂質などのカチオン性脂質を含むことが有益である可能性がある。例示的なアミノ脂質は、米国特許第9,352,042号、第9,220,683号、第9,186,325号、第9,139,554号、第9,126,966号、第9,018,187号、第8,999,351号、第8,722,082号、第8,642,076号、第8,569,256号、第8,466,122号、および第7,745,651号ならびに米国特許公開第2016/0213785号、2016/0199485号、2015/0265708号、2014/0288146号、2013/0123338号、2013/0116307号、2013/0064894号、2012/0172411号、および2010/0117125号に記載されている。。

30

【0227】

「カチオン性脂質」および「アミノ脂質」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の脂肪酸または脂肪アルキル鎖およびpH滴定可能なアミノ基（例えば、アルキルアミノまたはジアルキルアミノ基）を含む。カチオン性脂質は、典型的には、カチオン性脂質のpKaより低いpHでプロトン化され（すなわち、正に帯電し）、pKaより高いpHで実質的に中性である。カチオン性脂質はまた、滴定可能なカチオン性脂質であり得る。特定の実施態様において、カチオン性脂質は、以下を含む：プロトン化可能な第三級アミン（例えば、pH滴定可能な）基、各アルキル鎖が独立して0から3（例えば、0、1、2、または3）の二重結合を有するC18アルキル鎖；頭部基とアルキル鎖の間のエーテル、エステル、またはケタール結合。

40

【0228】

カチオン性脂質は、限定されないが、1,2-ジリノレイルオキシ-N、N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N、N-ジメチルアミノプロパン(DLenDMA)、1,2-ジ-リノレニルオキシ-N、N-ジメチルアミノプロパン(-DLenDMA)、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-C2-DMA、DLin-C2K-DMA、XTC2、およびC2Kとしても知られる)、2,2-ジリノレイル-

50

4 - ジメチルアミノメチル - [1 , 3] - ジオキソラン (D L i n - K - D M A)、ジリノレイルメチル - 3 - ジメチルアミノプロピオネート (D L i n - M - C 2 - D M A、M C 2 としても知られる)、(6 Z、9 Z、2 8 Z、3 1 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6、9、2 8、3 1 - テトラエン - 1 9 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (D L i n - M - C 3 - D M A、M C 3 としても知られる)、塩その、およびそれらの混合物を含み得る。他のカチオン性脂質には、これらに限定されないが、1、2 - ジステアリルオキシ - N、N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (D S D M A)、1、2 - ジオレイルオキシ - N、N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (D O D M A)、2、2 - ジリノレイル - 4 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - [1 , 3] - ジオキソラン (D L i n - K - C 3 - D M A)、2、2 - ジリノレイル - 4 - (3 - ジメチルアミノブチル) - [1 , 3] - ジオキソラン (D L i n - K - C 4 - D M A)、D L e n - C 2 K - D M A、D L e n - C 2 K - D M A、および (D L i n - M P - D M A) (1 - B 1 1 とも呼ばれる) を含む。

【 0 2 2 9 】

さらなるカチオン性脂質は、限定されないが、2、2 - ジリノレイル - 5 - ジメチルアミノメチル - [1 , 3] - ジオキサラン (D L i n - K 6 - D M A)、2、2 - ジリノレイル - 4 - N - メチルペピアジノ - [1 , 3] - ジオキソラン (D L i n - K - M P Z)、1、2 - ジリノレイルカルバモイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n - C - D A P)、1、2 - ジリノレオキシ - 3 - (ジメチルアミノ) アセトキシプロパン (D L i n - D A C)、1、2 - ジリノレオキシ - 3 - モルホリノプロパン (D L i n - M A)、1、2 - ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n D A P)、1、2 - ジリノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n - S - D M A)、1 - リノレオイル - 2 - リノレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n - 2 - D M A P)、1、2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (D L i n - T M A . C l)、1、2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (D L i n - T A P . C l)、1、2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (N - メチルピペラジノ) プロパン (D L i n - M P Z)、3 - (N、N - ジリノレイルアミノ) - 1、2 - プロパンジオール (D L i n A P)、3 - (N、N - ジオレイルアミノ) - 1、2 - プロパンジオール (D O A P)、1、2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (2 - N、N - ジメチルアミノ) エトキシプロパン (D L i n - E G - D M A)、N、N - ジオレイル - N、N - ジメチルアンモニウムクロリド (D O D A C)、N - (1 - (2、3 - ジオレイルオキシ) プロピル) - N、N、N - トリメット塩化ヒラモニウム (D O T M A)、N、N - ジステアリル - N、N - ジメチルアンモニウムプロミド (D D A B)、N - (1 - (2、3 - ジオレイルオキシ) プロピル) - N、N、N - トリメチルアンモニウムクロリド (D O T A P)、3 - (N - (N'、N' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル) コレステロール (D C - C h o l)、N - (1、2 - ジミリスチルオキシプロパン - 3 - イル) - N、N - ジメチル - N - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (D M R I E)、2、3 - ジオレイルオキシ - N - [2 (スペルミン - カルボキサミド) エチル] - N、N - ジメチル - 1 - プロパンモニウムトリフルオロアセテート (D O S P A)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (D O G S)、3 - ジメチルアミノ - 2 - (コレスト - 5 - エン - 3 - ベータ - オキシブタン - 4 - オキシ) - 1 - (シス、シス - 9、1 2 - オクタデカジエノキシ) プロパン (C L i n D M A)、2 - [5' - (コレスト - 5 - エン - 3 - ベータ - オキシ) - 3' - オキサペントキシ) - 3 - ジメチル - 1 - (シス、シス - 9'、1 - 2' - オクタデカジエノキシ) プロパン (C p L i n D M A)、N、N - ジメチル - 3、4 - ジオレイルオキシベンジルアミン (D M O B A)、1、2 - N、N' - ジオレイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパン (D O c a r b D A P)、1、2 - N、N' - ジリノレイルカルバミル - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n c a r b D A P)、デキサメタゾン - スペリミン (D S) および二置換スペルミン (D 2 S) またはそれらの混合物を含み得る。

【 0 2 3 0 】

10

20

30

40

50

L I P O F E C T I N (登録商標) (G I B C O / B R L から入手可能なD O T M A およびD O P E を含む)、およびL I P O F E C T A M I N E (登録商標) (G I B C O / B R L から入手可能なD O S P A およびD O P E を含む)などのカチオン性脂質の多くの市販の調製物を使用することができる。

【0231】

特定の実施態様において、カチオン性脂質は、L N P の約10重量%から脂質ナノ粒子の約85重量%まで、またはL N P の約50重量%から約75重量%までの量で存在し得る。

【0232】

ステロールは、L N P に流動性を与える可能性がある。本明細書で使用される場合、「ステロール」は、植物(植物ステロール)または動物(動物ステロール)由来の任意の天然に存在するステロール、ならびに非天然に存在する合成ステロールを指し、これらはすべて、ステロイドAリングの3-位にヒドロキシル基が存在することを特徴とする。ステロールは、リポソーム、脂質小胞または脂質粒子調製物の分野で従来から使用されている任意のステロール、最も一般的にはコレステロールであり得る。植物ステロールには、カンペステロール、シトステロール、およびスチグマステロールが含まれる場合がある。ステロールには、米国特許出願公開第2011/0177156号に記載されているようなステロール修飾脂質も含まれる。特定の実施態様において、ステロールは、L N P の約5重量%から脂質ナノ粒子の約50重量%まで、またはL N P の約10重量%からL N P の約25重量%までの量で存在し得る。

10

20

【0233】

L N P は中性脂質を含むことができる。中性脂質は、生理学的pHで非荷電または中性の双性イオン形態のいずれかで存在する任意の脂質種を含み得る。そのような脂質には、これらに限定されないが、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、およびセレブロシドが含まれる。中性脂質の選択は、一般に、とりわけ粒子サイズと必要な安定性を考慮して導かれる。特定の実施態様において、中性脂質成分は、2つのアシル基(例えば、ジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミン)を有する脂質であり得る。

30

【0234】

様々な鎖長および飽和度の様々なアシル鎖基を有する脂質が利用可能であるか、または周知の技術によって単離または合成され得る。特定の実施態様では、C14からC22の範囲の炭素鎖長を有する飽和脂肪酸を含む脂質を使用することができる。特定の実施態様において、C14からC22の範囲の炭素鎖長を有する一酸または二不飽和脂肪酸を有する脂質が使用される。さらに、飽和および不飽和脂肪酸鎖の混合物を有する脂質を使用することができる。例示的な中性脂質には、限定されないが、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-エタノールアミン(D O P E)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(D S P C)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(P O P C)、または関連するホスファチジルコリンが含まれる。中性脂質は、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、またはセリンやイノシトールなどの他のヘッドグループを持つリン脂質で構成されている場合もある。

40

【0235】

特定の実施態様において、中性脂質は、脂質ナノ粒子の約0.1重量%からL N P の約75重量%まで、またはL N P の約5重量%から約15重量%までの量で存在し得る。

【0236】

L N P カプセル化プロテアーゼ、グリコシダーゼ、または組換えウイルスベクターは、医薬組成物、例えば、医薬的に許容される担体または賦形剤に組み込むことができる。そのような医薬組成物は、とりわけ、L N P カプセル化プロテアーゼ、グリコシダーゼ、または組換えウイルスベクターの、インビボまたはエクシボでの対象への投与および送達

50

に有用である。

【0237】

LNPの調製物は、例えば、これらに限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)およびステロールを含み得る追加の成分と組み合わせることができる。

【0238】

「PEG」という用語は、2つの末端ヒドロキシル基を有するエチレンPEG繰り返し単位の線状の水溶性ポリマーであるポリエチレングリコールを指す。PEGは分子量によって分類される。たとえば、PEG2000の平均分子量は約2,000ダルトンであり、PEG5000の平均分子量は約5,000ダルトンである。PEGは、Sigma Chemical Co. および他の会社から市販されており、例えば、以下の機能性PEGが含まれる：モノメトキシポリエチレングリコール(MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコール-コハク酸塩(MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシンイミジルコハク酸塩(MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコール-アミン(MePEG-NH₂)、モノメトキシポリエチレングリコール-トレシル酸塩(MePEG-TRES)、およびモノメトキシポリエチレングリコール-イミダゾリル-カルボニル(MePEG-IM)。

10

【0239】

特定の実施態様において、PEGは、約550から約10,000ダルトンの平均分子量を有するポリエチレングリコールであり得、そして任意選択で、アルキル、アルコキシ、アシルまたはアリールによって置換される。特定の実施態様において、PEGは、末端ヒドロキシル位置においてメチルで置換され得る。特定の実施態様では、PEGは、約750から約5000ダルトン、または約1,000から約5000ダルトン、または約1500から約3000ダルトン、または約2000ダルトンまたは約750ダルトンの平均分子量を有し得る。PEGは、必要に応じて、アルキル、アルコキシ、アシルまたはアリールで置換することができる。特定の実施態様において、末端ヒドロキシル基は、メトキシ基またはメチル基で置換され得る。

20

【0240】

PEG修飾脂質には、米国特許第8,936,942号および第7,803,397号に記載されているPEG-ジアルキルオキシプロピルコンジュゲート(PEG-DAA)が含まれる。有用なPEG修飾脂質(または脂質-ポリオキシエチレンコンジュゲート)は、脂質小胞の表面にPEG部分を固定するための様々な「固定」脂質部分を有し得る。適切なPEG修飾脂質の例には、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、米国特許第5,820,873号に記載されているPEG-セラミドコンジュゲート(例えば、PEG-CerC14またはPEG-CerC20)、PEG修飾ジアルキルアミンおよびPEG修飾1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンが含まれる。特定の実施態様において、PEG修飾脂質は、PEG修飾ジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロールであり得る。特定の実施態様では、PEGは、LNPの約0.5重量%からLNPの約20重量%、またはLNPの約5重量%からLNPの約15重量%の量であり得る。

30

【0241】

さらに、LNPは、PEG修飾およびステロール修飾LNPであり得る。追加のコンポーネントと組み合わせたLNPは、同じLNPでも別々のLNPであることができる。言い換えれば、同じLNPをPEG修飾およびステロール修飾することができ、あるいは、第1のLNPをPEG修飾し、第2のLNPをステロール修飾することができる。場合により、1番目と2番目の変更されたLNPを組み合わせることができる。

40

【0242】

特定の実施態様では、LNPをカプセル化する前に、約10nmから500nm、または約50nmから約200nm、または75nmから約125nmの範囲のサイズを有し得る。特定の実施態様において、LNPカプセル化プロテアーゼ、グリコシダーゼ、または組換えウイルスベクターは、約10nmから500nmの範囲のサイズを有し得る。

50

【0243】

「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書では互換的に使用され、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA)を含むすべての形態の核酸、オリゴヌクレオチドを指す。核酸には、ゲノムDNA、cDNAおよびアンチセンスDNA、およびスプライシングまたはスプライシングされていないmRNA、rRNA、tRNAおよび阻害性DNAまたはRNA(RNAi、例えば、スモールまたはショートヘアピン(sh)RNA、マイクロRNA(miRNA)、スモールまたはショート干渉(si)RNA、トランススプライシングRNA、またはアンチセンスRNA)が含まれる。

【0244】

核酸には、天然に存在する、合成の、および意図的に修飾または改変されたポリヌクレオチドが含まれる。核酸は、単一、二重、または三重、線形または円形であり得、任意の長さであり得る。核酸を議論する際に、特定のポリヌクレオチドの配列または構造は、5'から3'方向に配列を提供するという慣習に従って本明細書に記載され得る。

【0245】

「異種」核酸配列は、細胞へのポリヌクレオチドのベクター媒介性の移入/送達の目的でプラスミドまたはベクターに挿入されたポリヌクレオチドを指す。異種核酸配列は、ウイルス核酸とは異なり、すなわち、ウイルス核酸に関して非天然である。細胞に移入/送達されると、ベクター内に含まれる異種核酸配列を発現させることができる(例えば、必要に応じて転写および翻訳される)。あるいは、ベクター内に含まれる、細胞内で移入/送達された異種ポリヌクレオチドを発現させる必要はない。「異種」という用語は、本明細書では核酸配列およびポリヌクレオチドに関して常に使用されるわけではないが、修飾因子「異種」がなくても、核酸配列またはポリヌクレオチドへの言及は、省略にもかかわらず、異種核酸配列およびポリヌクレオチドを含むことを意図する。

【0246】

「導入遺伝子」は、本明細書では、細胞または生物に意図されているかまたは導入されている核酸を都合よく指すために使用される。導入遺伝子には、異種ポリヌクレオチド配列またはタンパク質またはペプチドをコードする異種核酸などの任意の核酸が含まれる。導入遺伝子および異種核酸/ポリヌクレオチド配列という用語は、本明細書では交換可能に使用される。

【0247】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、ポンペ病の治療のためのGAA(酸性-グルコシダーゼ); ウィルソン病の治療のためのATP7B(銅輸送ATPase 2) ファブリー病の治療のためのアルファガラクトシダーゼ; シトルリン血症1型の治療のためのASS1(アルギノコハク酸シンターゼ); ゴーシェ病1型の治療のためのベータグルコセレブロシダーゼ; テイサックス病の治療のためのベータヘキソサミニダーゼA; C1阻害剤欠乏症I型およびII型としても知られる、遺伝性血管性浮腫(HAE)の治療のためのSERPING1(C1プロテアーゼ阻害剤またはC1エステラーゼ阻害剤); および糖原病I型(GSDI)の治療のためのグルコース-6-ホスファターゼからなる群から選択されるタンパク質をコードする。

【0248】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、インスリン、グルカゴン、成長ホルモン(GH)、副甲状腺ホルモン(PTH)、成長ホルモン放出因子(GRF)、濾胞刺激ホルモン(FSH)黄体形成ホルモン(LH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、血管内皮成長因子(VEGF)、アンジオポイエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)、エリスロポイエチン(EPO)、結合組織成長因子(CTGF)、基本線維芽細胞成長因子(bFGF)、酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)、表皮成長因子(EGF)、形質転換成長因子(TGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン成長因子IおよびII(IGF-IおよびIGF-II)、TGF、アクチビン、インヒピン、骨形態形成タンパク質(BMP)、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィンNT-3およびNT4/5、

10

20

30

40

50

織毛神経栄養因子 (CNTF)、グリア細胞株派生神経栄養因子 (GDNF)、ニューロリン、アグリン、ネトリン-1およびネトリン-2、肝細胞増殖因子 (HGF)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグおよびチロシンヒドロキシラーゼからなる群から選択されるタンパク質をコードする。

【0249】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、酸性 - グルコシダーゼ (GAA) をコードする。ポンペ病または別のグリコーゲン蓄積症の対象へのGAAをコードする異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターの投与は、GAAタンパク質の発現をもたらす可能性がある。患者におけるGAAタンパク質の発現は、グリコーゲンの蓄積を抑制、阻害、または低減し、グリコーゲンの蓄積を防止し、またはグリコーゲンを分解

10

【0250】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、トロンボポイエチン (TPO)、インターロイキン (IL-1からIL-36など)、単球化学誘引物質タンパク質、白血病阻害因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、 Fasリガンド、腫瘍壊死因子 および 、インターロイキン 、 、 および 、 幹細胞因子、 flk-2 / flt3リガンド、 IgG、 IgM、 IgA、 IgDおよび IgE、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、単一鎖抗体、T細胞受容体、キメラT細胞受容体、単球T細胞受容体、クラスIおよびクラスII MHC分子からなる群から選択されるタンパク質をコードする。

20

【0251】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、CFTR (嚢胞性線維症膜貫通調節タンパク質)、血液凝固 (clotting) 因子 (因子XIII、因子IX、因子VIII、因子X、因子VII、因子VIIa、タンパク質Cなど)機能獲得血液凝固因子、抗体、網膜色素上皮特異的65kDaタンパク質 (RPE65)、エリスロポエチン、LDL受容体、リポタンパク質リパーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、 - グロビン、 - グロビン、スペクトリン、 - アンチトリプシン、アデノシンデアミナーゼ (ADA)、金属輸送体 (ATP7AまたはATP7)、スルファミダーゼ、リソソーム蓄積症 (ARSA) に関する酵素、ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ、 - 25グルコセレブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、リソソームヘキササミニダーゼ、分岐鎖ケト酸ホルモン、成長因子、インスリン様成長因子1または2、血小板由来成長因子、表皮成長因子、神経成長因子、神経栄養因子-3および-4、脳由来神経栄養因子、グリア由来成長因子、形質転換成長因子 および 、 サイトカイン、 - インターフェロン、 - インターフェロン、インターフェロン - 、 インターロイキン-2、インターロイキン-4、インターロイキン12、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシン、自殺遺伝子産物、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクロームP450、デオキシチジンキナーゼ、腫瘍壊死因子、薬剤耐性タンパク質、腫瘍抑制タンパク質 (例、p53、Rb、Wt-1、NF1、フォンヒッペル-リンダウ (VHL)、腺腫性ポリポーシスコリ (APC))、免疫調節特性を有するペプチド、寛容原性または免疫原性ペプチドまたはタンパク質トレプトープまたはhCDR1、インスリン、グルコキナーゼ、グアニル酸シクラーゼ2D (LCA-GUCY2D)、Rabエスコートタンパク質1 (Chorooideremia)、LCA5 (LCA-レベルシリン)、オルニチンケト酸アミノトランスフェラーゼ (ジャイレート萎縮)、レチノスキシン1 (X連鎖網膜分離症)、USH1C (アッシャー症候群1C)、X連鎖網膜色素変性症GTPase (XLRP)、MERTK (AR型RP:網膜色素変性症)、DFNB1 (コネキシン26難聴)、ACHM 2、3および4 (色覚異常)、PKD-1またはPKD-2 (多発性嚢胞腎)、TPP1、CLN2、スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼ、カテプシンA、GM2-AP、NPC1、VPC2、スフィンゴ脂質活性化タンパク質、ゲノム編集用の1つ以上のジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはゲノム編集用の修復テンプレ

30

40

50

トとして使用される1つ以上のドナー配列をコードする。

【0252】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、貧血の治療のためにエリスロポエチン（EPO）、さまざまな免疫障害、ウイルス感染症、および癌の治療のためのインターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、およびインターフェロンガンマ、様々な炎症性疾患または免疫不全の治療のための、IL-1からIL-36のいずれか1つを含むインターロイキン（IL）、および対応する受容体、免疫障害の治療のためのケモカイン（C-X-Cモチーフ）リガンド5（CXCL5）を含むケモカイン；クローン病などの免疫障害の治療のための顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、さまざまなヒト炎症性疾患の治療のための顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、さまざまなヒト炎症性疾患の治療のためのマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、上皮組織損傷の治療のためのケラチノサイト成長因子（KGF）；再発性流産、HIV関連合併症、およびインスリン抵抗性治療のための単球走化性タンパク質-1（MCP-1）などのケモカイン、腫瘍壊死因子（TNF）およびさまざまな免疫障害の治療のための受容体；肺気腫または慢性閉塞性肺疾患（COPD）の治療のための1-アンチトリプシン；ムコ多糖症I型（MPS I）の治療のための-L-イズロニダーゼ；OTC欠乏症の治療のためのオルニチントランスカルバモイラーゼ（OTC）；フェニルケトン尿症（PKU）の治療のためのフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）またはフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）、リポタンパク質リパーゼ欠損症の治療のためのリポタンパク質リパーゼ；アポリポタンパク質（Apo）A-I欠損症の治療のためのアポリポタンパク質；家族性高コレステロール血症（FH）の治療のための低密度リポタンパク質受容体（LDL-R）。低アルブミン血症の治療のためのアルブミン；レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）；カルバモイルシンテターゼI；アルギニノコハク酸シンテターゼ；アルギニノコハク酸リアーゼ；アルギナーゼ；フマリルアセトアセターヒドロラーゼ；ポルフォピリノーゲンデアミナーゼ；ホモシスチン尿症の治療のためのシスタチオンベータシンテターゼ；分枝鎖ケト酸デカルボキシラーゼ；イソバレルルCoAデヒドロゲナーゼ；プロピオニルCoAカルボキシラーゼ；メチルマロニルCoAムターゼ；グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ；インスリン；ピルビン酸カルボキシラーゼ；肝ホスホリラーゼ；ホスホリラーゼキナーゼ；グリシンデカルボキシラーゼ；Hタンパク質；Tタンパク質；嚢胞性線維症膜貫通調節因子（CFTR）；スターガルト病の治療のためのATP結合カセット、サブファミリーA（ABC1）、メンバー4（ABC4）。またはジストロフィンをコードする。

10

20

30

40

【0253】

「ポリペプチド」、「タンパク質」および「ペプチド」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。「ポリペプチド」、「タンパク質」、および「ポリヌクレオチド配列」によってコードされる「ペプチド」には、天然に存在するタンパク質と同様に、完全長の天然配列、ならびに部分配列、改変された形態または変異体は、天然の完全長タンパク質のある程度の機能性を保持している。本発明において、ポリヌクレオチド配列によってコードされるそのようなポリペプチド、タンパク質およびペプチドは、欠陥があるか、またはその発現が不十分であるか、または処置された哺乳動物において不十分である内因性タンパク質と同一であり得るが、同一である必要はない。

【0254】

特定の実施態様において、異種ポリヌクレオチドは、siRNA、アンチセンス分子、miRNA、RNAi、リボザイム、およびshRNAからなる群から選択される阻害性核酸をコードする。

【0255】

特定の実施態様において、阻害性核酸は、ハンチンチン（HTT）遺伝子、歯状鱗翅目萎縮（アトロフィン1、ATN1）、脊髄延髄筋萎縮のX染色体上のアンドロゲン受容体、ヒトアタキシン-1、-2、-3、および-7、Cav2.1 P/Q電位依存性カルシウムチャネル（CACNA1A）、TATA結合タンパク質、アタキシン8反対鎖（A

50

T X N 8 O S)、脊髄小脳性運動失調におけるセリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼ 2 A 5 5 k D a 調節サブユニット B ベータアイソフォーム (タイプ 1、2、3、6、7、8、12 17)、F M R 1 (脆弱 X 精神遅滞 1) 脆弱 X 症候群、F M R 1 (脆弱 X 精神遅滞 1) 脆弱 X 関連振戦/運動失調症候群、F M R 1 (脆弱 X 精神遅滞 2) または A F 4 / F M R 2 ファミリーメンバー 2 脆弱 X E 精神遅滞; 筋緊張性ジストロフィーにおけるミオトニンタンパク質キナーゼ (M T - P K); フリードライヒ運動失調症のフラタキシシン; 筋萎縮性側索硬化症におけるスーパーオキシドジスムターゼ 1 (S O D 1) 遺伝子の変異体; パーキンソン病および/またはアルツハイマー病の病因に關与する遺伝子。アポリポタンパク質 B (A P O B) およびプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシニン 9 型 (P C S K 9)、高コレステロール血症; H I V 感染における転写遺伝子のヒト免疫不全ウイルストランス活性化因子である H I V T a t; H I V 感染における H I V T A R、H I V T A R、ヒト免疫不全ウイルストランス活性化因子応答要素遺伝子、H I V 感染症における C - C ケモカイン受容体 (C C R 5)、R S V 感染におけるラウス肉腫ウイルス (R S V) ヌクレオカプシドタンパク質、C 型肝炎ウイルス感染における肝臓特異的マイクロ RNA (m i R - 1 2 2)、p 5 3、急性腎障害または移植片機能の遅延腎移植または腎障害急性腎不全; 事前に再発性または転移性の固形悪性腫瘍のプロテインキナーゼ N 3 (P K N 3)、L M P 2、プロテアソームサブユニットベータタイプ 9 (P S M B 9) としても知られる L M P 2、転移性黒色腫、プロテアソームサブユニットベータタイプ 8 (P S M B 8) としても知られる L M P 7、転移性黒色腫、プロテアソームサブユニットベータタイプ 10 (P S M B 10) としても知られる M E C L 1、固形腫瘍における血管内皮増殖因子 (V E G F); 固形腫瘍におけるキネシン紡錘体タンパク質、慢性骨髄性白血病におけるアポトーシス抑制因子 B 細胞 C L L / リンパ腫 (B C L - 2)、固形腫瘍におけるリボヌクレオチドレダクターゼ M 2 (R R M 2); 固形腫瘍におけるフェーリン; 肝腫瘍のポロ様キナーゼ 1 (P L K 1)、C 型肝炎感染のジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 1 (D G A T 1)、家族性大腸腺腫症のベータカテニン、ベータ 2 アドレナリン受容体、緑内障; 糖尿病性黄斑浮腫 (D M E) または加齢性黄斑変性症における D A N 損傷誘発性転写物 4 タンパク質としても知られる R T P 8 0 1 / R e d d 1、加齢性黄斑変性症または脈絡膜血管新生における血管内皮増殖因子受容体 I (V E G F R 1)、非動脈炎性虚血性視神経症におけるカスパーゼ 2。先天性厚硬膜のケラチン 6 A N 1 7 K 変異タンパク質。インフルエンザ感染におけるインフルエンザ A ウイルスのゲノム/遺伝子配列; S A R S 感染における重症急性呼吸器症候群 (S A R S) コロナウイルスゲノム/遺伝子配列; 呼吸器合胞体ウイルス感染における呼吸器合胞体ウイルスゲノム/遺伝子配列; エボラ感染におけるエボラフィロウイルスゲノム/遺伝子配列; B 型および C 型肝炎感染における B 型および C 型肝炎ウイルスのゲノム/遺伝子配列、H S V 感染における単純ヘルペスウイルス (H S V) ゲノム/遺伝子配列、コクサッキーウイルス B 3 感染におけるコクサッキーウイルス B 3 ゲノム/遺伝子配列。原発性ジストニアにおけるトルシン A (T O R 1 A)、汎クラス I および移植に特異的な H L A 対立遺伝子のような遺伝子の病原性対立遺伝子のサイレンシング (対立遺伝子特異的サイレンシング)、常染色体優性遺伝性網膜色素変性症 (a d R P) の変異ロドプシン遺伝子 (R H O) に關連する遺伝子からなる群から選択されるポリヌクレオチド反復疾患に關連する遺伝子、遺伝子の転写物、または遺伝子の転写物に結合する。

【 0 2 5 6 】

組換えウイルスベクター用量は、任意の適切な用量で投与することができる。一般に、用量は少なくとも 1×10^8 、またはそれ以上の範囲であり、例えば、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} または 1×10^{14} 、またはそれ以上の、キログラムあたりのベクターゲノム (治療効果を達成するための、対象の体重の $v g / k g$)。マウスでは $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11} v g / k g$ 、犬では $1 \times 10^{12} - 1 \times 10^{13} v g / k g$ の範囲の A A V 用量が有効であった。より具体的には、約 $1 \times 10^{11} v g / k g$ から約 $5 \times 10^{14} v g / k g$ まで、または約 $5 \times 10^{11} v g / k g$ から約 $1 \times 10^{14} v g / k g$ まで、または約 $5 \times 10^{11} v g / k g$ から約 5×10

10^3 v g / k g までの用量、または約 5×10^{11} v g / k g から約 1×10^{13} v g / k g まで、または約 5×10^{11} v g / k g または約 5×10^{12} v g / k g まで、または約 5×10^{11} v g / k g から約 1×10^{12} v g / k g まで。用量は、例えば、約 5×10^{14} v g / k g、または約 5×10^{14} v g / k g 未満、例えば、約 2×10^{11} から約 2×10^{14} v g / k g までの用量、特に、例えば、約 2×10^{12} v g / k g、約 6×10^{12} v g / k g、または約 2×10^{13} v g / k g であり得る。。

【0257】

特定の実施態様において、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの対象への投与は、対象の治療に有効であることが必要とされる異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターの用量を減少させる。特定の実施態様において、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの対象への投与は、異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターの増加した用量の投与を可能にする。

10

【0258】

用量は変化する可能性があり、治療が向けられる疾患のタイプ、発症、進行、重症度、頻度、期間、または確率、所望の臨床エンドポイント、以前または同時の治療、一般的な健康、年齢、性別、対象の人種または免疫学的能力、および熟練した職人によって評価される他の要因に依存する。投与量、数、頻度または期間は、治療または治療の有害な副作用、合併症または他の危険因子、ならびに対象の状態によって示されるように、比例して増加または減少し得る。当業者は、治療的または予防的利益を提供するのに十分な量を提供するために必要な投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得る要因を理解するであろう。

20

【0259】

治療効果を達成するための用量、例えば、ベクターゲノム中の用量/体重1キログラム当たり (v g / k g) は、投与経路、投与レベルを含むがこれらに限定されないいくつかの要因:

治療効果を達成するために必要な異種ポリヌクレオチド発現、治療される特定の疾患、組換えウイルスベクターに対する任意の宿主免疫応答、異種ポリヌクレオチドまたは発現産物 (タンパク質またはペプチド) に対する宿主免疫応答、および発現されたタンパク質またはペプチドの安定性

に基づいて変化する。当業者は、前述の因子ならびに他の因子に基づいて、特定の疾患または障害を有する患者を治療するための組換えウイルスベクターゲノム用量範囲を決定することができる。

30

【0260】

「有効量」または「十分な量」は、単回または複数回の用量で、単独で、または1つまたは複数の他の組成物、治療、プロトコル、または治療レジメン剤と組み合わせて、検出可能な応答を提供する量、任意の期間 (長期または短期)、測定可能または検出可能な程度の対象における期待されるまたは望ましい結果または利益、または任意の期間 (例えば、分、時間、日、月、年、または治療) を指す。治療 (例えば、改善する、または治療上の利益または改善を提供するため) のための「有効量」または「十分な量」の用量は、通常、1つ、複数、またはすべての有害な症状、結果または合併症に対する応答を提供するのに効果的である。疾患、例えば、疾患によって引き起こされるか、または疾患に関連する、1つまたは複数の有害な症状、障害、病気、病状、または合併症、ただし、病気の進行または悪化の減少、減少、阻害、抑制、制限または制御は満足 of いく転帰である。

40

【0261】

有効量または十分な量は、単回投与で提供することもできるが、単回投与でする必要はなく、複数回投与を必要とする場合があり、単独で、または別の組成物 (例えば、薬剤) プロトコルまたは治療レジメンと組み合わせて投与することもできるが、そうである必要はない。例えば、量は、対象の必要性、治療される疾患の種類、状態および重症度、または治療の副作用 (もしあれば) によって示されるように、比例して増加され得る。さらに、有効量または十分な量は、追加の用量、量または期間のため、第2の組成物 (例えば

50

、別の薬物または薬剤)、治療、プロトコルまたは治療レジメンなしで単回または複数回の用量で与えられる場合、有効または十分である必要はない。所与の対象において効果的または十分であると見なされるために、そのような用量、または追加の組成物(例えば、薬物または薬剤)、治療、プロトコルまたは治療レジメンを超えて含まれ得る。有効と見なされる量には、リソソーム蓄積症(ポンペ病など)の治療のための組換えGAAの投与、または凝固障害(例、血友病A(HemA)または血友病B(HemB))の治療のためのタンパク質(例、FVIIまたはFIX)組換え凝固因子の投与など、別の治療、治療レジメンまたはプロトコルの使用の削減をもたらす量も含まれる。

【0262】

ポンペ病の場合、有効量は、例えばグリコーゲンの産生または蓄積を阻害または低減する、グリコーゲンの分解または除去を増強または増加させる、対象の体の組織におけるリソソームの変化を低減する、または対象の筋肉の緊張および/または対象の筋力および/または呼吸機能を改善するGAAの量である。有効量は、例えば、血漿からの筋芽細胞によるGAA取り込みの動態を確認することによって決定することができる。約141~147nMの筋芽細胞GAA取り込み速度(K取り込み)が効果的であるように見える場合がある(例えば、Maga et al.、J. Biol. Chem. 2012を参照)。動物モデルでは、血漿中のGAA活性レベルが約1,000nmol/hr/mL、例えば、約1,000~約2,000nmol/hr/mLは、治療上有効であることが観察されている。

10

【0263】

HemAおよびHemBについて、一般的に言えば、治療効果を達成するためには、正常な個体に見られる因子濃度の1%を超える血液凝固因子濃度が、重篤な疾患を変化させるために必要であると考えられている。中程度の表現型。重度の表現型は、関節の損傷と生命を脅かす出血を特徴とする。中等度の疾患表現型を軽度の表現型に変換するには、正常の5%を超える血液凝固因子濃度が必要であると考えられている。

20

【0264】

正常なヒトにおけるFVIIおよびFIXレベルは、約150~200ng/mLの血漿であるが、より少ない(例えば、約100~150ng/mLの範囲)またはより高い(例えば、約200~300ng/mLの範囲)可能性がある。)であり、例えば活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)1段階凝固アッセイによって決定される機能的凝固のため、依然として正常と見なされる。したがって、対象/ヒトにおけるFVIIまたはFIXの総量が、正常な対象/ヒトに存在するFVIIまたはFIXの1%を超える、例えば、100~300ng/mLの1%であるような治療効果を達成することができる。。

30

【0265】

組成物は、組み合わせ組成物として対象に投与するか、または異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターの同時または連続または連続(前または後)の送達または投与など、別々に投与することができる。本発明は、本発明の方法または使用が、本明細書に記載されるか、または当業者に知られている任意の化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコル、プロセス、治療薬または組成物と組み合わせられる組み合わせを提供する。化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコル、プロセス、治療薬または組成物は、異種ポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターの投与前、投与と同時に、または投与後に、対象に投与または実施することができる。

40

【0266】

したがって、本発明は、とりわけ、別の化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコル、プロセス、または治療の必要性または使用の減少をもたらす方法および使用を含む。例えば、血液凝固疾患の場合、本発明による治療方法は、所与の対象において、(異常または変異)対象の内因性凝固因子の欠乏または欠陥を補うための組換え凝固因子タンパク質のより少ない頻度または減少した用量または投与の排除である場合、治療上の利益を有する。別の例では、ポンペ病などのリソソーム蓄積症の場合、本発明による治療方法は、GAAを含む組換えウイルスベクターのより少ない頻度または減量が以前に投与され

50

た、または継続したとしても、治療上の利益を有する。被験者に投与される。したがって、別の治療または療法の必要性または使用を減らすことは、本発明に含まれる。

【0267】

有効量または十分な量は、治療されるすべての対象において有効である必要はなく、所与のグループまたは集団における治療対象の大多数においても有効である必要はない。有効量または十分な量とは、グループや一般集団ではなく、特定の対象における有効性または十分性を意味する。そのような方法に典型的であるように、一部の被験者は、所与の治療方法または使用に対して、より大きな反応を示すか、またはより少ないまたは全く反応を示さないであろう。

【0268】

「改善する」という用語は、対象の疾患またはその症状、あるいは根底にある細胞応答における検出可能または測定可能な改善を意味する。検出可能または測定可能な改善には、疾患の発生、頻度、重症度、進行、または期間の主観的または客観的な減少、減少、抑制、抑制、制限または制御、または疾患によって引き起こされるまたは疾患に関連する合併症、または改善が含まれる病気の症状または根本的な原因または結果、または病気の逆転。ポンペ病の場合、有効量は、例えば、グリコーゲンの産生または蓄積を阻害または低減し、グリコーゲンの分解または除去を増強または増加させ、筋緊張および/または筋力および/または呼吸機能を改善する量であろう。HemAまたはHemBの場合、有効量は、例えば、対象における急性出血エピソードの頻度または重症度を減少させる量、または例えば、凝固アッセイによって測定される凝固時間を減少させる量であろう。

【0269】

したがって、本発明の医薬組成物は、意図された治療目的を達成するために有効成分が有効量で含まれる組成物を含む。治療上有効な用量を決定することは、当技術分野で知られている技術およびガイダンスを使用し、本明細書で提供される教示を使用して、熟練した開業医の能力の範囲内である。

【0270】

治療用量は、他の要因の中でも、対象の年齢および全身状態、異常な表現型の重症度、および発現レベルを調節する制御配列の強度に依存するであろう。したがって、ヒトにおける治療上有効な量は、ベクターベースの治療に対する個々の患者の反応に基づいて開業医によって決定され得る比較的広い範囲に入るであろう。そのような用量は、単独で、または免疫抑制剤または薬物と組み合わせて使用することができる。

【0271】

導入遺伝子の発現および任意選択でコードされたタンパク質の産生を可能にするために、医薬組成物などの組成物を対象に送達することができる。特定の実施態様では、対象が治療有効量の血液凝固因子を産生して対象の止血を改善することを可能にするのに十分な遺伝物質を含む医薬組成物。特定の実施態様において、対象が治療有効量のGAAを産生することを可能にするのに十分な異種ポリヌクレオチドを含む医薬組成物。

【0272】

特定の実施態様において、対象における治療効果は、ある期間、例えば、2~4、4~6、6~8、8~10、10~14、14~20、20~25、25~30日、または30~50日以上、たとえば、50~75、75~100、100~150、150~200日以上の間持続される。したがって、特定の実施態様において、組換えウイルスベクターは、治療効果を提供する。

【0273】

特定の実施態様において、組換えウイルスベクターは、免疫抑制剤なしで治療効果を提供する。特定の実施態様において、少なくとも1つの免疫抑制剤は、組換えウイルスベクターの対象への投与の前に、実質的に同時に、または後に、対象に投与される。

【0274】

特定の実施態様において、免疫抑制剤は、抗炎症剤である。特定の実施態様において、免疫抑制剤はステロイドである。特定の実施態様において、免疫抑制剤は、プレドニゾン

10

20

30

40

50

、シクロスポリン（例えば、シクロスポリンA）、ミコフェノール酸、リツキシマブ、ラパマイシンまたはそれらの誘導体である。追加の特定の薬剤には、安定化合物が含まれる。本発明による方法で使用することができる他の免疫抑制剤には、例えば、限定されないが、B細胞標的化抗体、例えば、リツキシマブプロテアソーム阻害剤、例えば、ボルテゾミブ；ラパマイシン（mTOR）阻害剤の哺乳類標的、例えば、ラパマイシン；チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、イブルチニブ；B細胞活性化因子（BAFF）の阻害剤；および増殖誘導リガンドの阻害剤（APRIL）が含まれる。

【0275】

組成物は、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、および水を含むがこれらに限定されない、任意の無菌の生体適合性医薬担体で投与することができる。組成物は、単独で、または投与量、投与頻度、および/または治療効果に影響を与える他の薬剤と組み合わせ、患者に投与することができる。

10

【0276】

本発明の方法および使用は、全身的、局所的または局所的に、または任意の経路、例えば注射または注入による送達および投与を含む。インビボでの医薬組成物の送達は、対流増強送達などの他の送達方法が想定されているが、一般に、従来の注射器を使用する注射を介して達成され得る（例えば、米国特許第5,720,720号を参照のこと）。例えば、組成物は、皮下、表皮、皮内、髄腔内、眼窩内、粘膜内、腹腔内、静脈内、胸膜内、動脈内、経口、肝内、門脈を介して、または筋肉内に送達され得る。他の投与様式には、経口および肺投与、坐剤、および経皮適用が含まれる。血液凝固障害のある患者の治療を専門とする臨床医は、患者の状態および治療の目的（例えば、GAAの増加、血液凝固の強化など）を含むがこれらに限定されない多くの基準に基づいて、アデノウイルス関連ベクターの投与のための最適な経路を決定することができる。

20

【0277】

本発明による治療の方法は、所望の治療的、有益な、相加的、相乗的または補完的な活性または効果を有する任意の化合物、薬剤、薬物、治療または他の治療レジメンまたはプロトコルの追加の使用を含む併用療法を含む。例示的な組み合わせ組成物および治療には、生物学的製剤（タンパク質）、薬剤（例えば、免疫抑制剤）および薬物などの第2の活性物質が含まれる。そのような生物学的製剤（タンパク質）、薬剤、薬物、治療および治療は、本発明による他の治療方法、例えば、ポンペ病などのリソソーム貯蔵病、またはHemAやHemBなどの血液凝固病の対象を治療する治療法の対象を治療する治療方法の前に、実質的に同時に、または後に投与または実施することができる。

30

【0278】

化合物、薬剤、薬物、治療または他の治療レジメンまたはプロトコルは、組み合わせ組成物として投与するか、または核酸、ベクター、組換えベクター（例えば、組換えウイルスベクター）、または組換えウイルス粒子の送達または投与を同時にまたは連続してまたは連続して（前または後に）など、別々に投与することができる。したがって、本発明は、本発明による治療方法が、本明細書に記載されているか、または当業者に知られている任意の化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコル、プロセス、治療薬または組成物と組み合わせている組み合わせを提供する。当業者。化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコル、プロセス、治療薬または組成物は、核酸、ベクター、組換えベクター（例えば、組換えウイルスベクター）または本発明に従って患者に投与される組換えウイルス粒子の投与前、投与と同時に、または投与後に投与または実施することができる。

40

【0279】

特定の実施態様において、対象へのプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの投与は、中和抗体、異種ポリヌクレオチドに結合する抗体、および/または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体の発生の防止につながる可能性がある。本明細書に記載のように、そのような対象へのプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの投与は、ウイルスベクターの投与前、ウイルスベクターの投与時

50

に実質的に同時に、またはウイルスベクターの対象への投与後に行うことができる。

【0280】

特定の実施態様において、既存の抗体を有する対象へのプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの投与は、中和抗体、異種ポリヌクレオチドに結合する抗体、および/または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体の減少をもたらす。プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの投与後、そのような対象は、本明細書の方法に従って組換えウイルスベクターを投与することができる。そのような対象は、組換えウイルスベクターの投与後に残っている既存の抗体の存在について任意選択で評価され得る。あるいは、そのような対象は、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼが対象におけるそのような既存の抗体を減少または排除する所定の時間が経過した後に、組換えウイルスベクターを投与することができる。

10

【0281】

特定の実施態様において、組換えウイルスベクターを投与された対象から得られた生物学的サンプル中のそのような抗体の測定によって反映されるように、対象へのプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの投与は、少なくとも20%から50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の中和抗体、異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する異種ポリヌクレオチドおよび/または抗体の分解または消化をもたらす得る。特定の実施態様において、本発明による方法は、中和抗体、および/または異種ポリヌクレオチドに結合する抗体、および/または異種ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質またはペプチドに結合する抗体の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%を分解または消化する。

20

【0282】

分析され得る対象からの生物学的サンプルの非限定的な例には、全血、血清、血漿など、およびそれらの組み合わせが含まれる。生物学的サンプルは、細胞を欠いている場合もあれば、細胞（例えば、赤血球、血小板、および/またはリンパ球）を含む場合もある。

【0283】

特定の実施態様において、対象の生物学的サンプルに存在する中和抗体は、約1:25未満に分解または消化され得、ここで、25の緩衝液で希釈された生物学的サンプルの1部は、50%の組換えウイルスベクター中和をもたらす。特定の実施態様において、対象の生物学的サンプル中に存在する中和抗体は、約1:20未満、約1:15未満、約1:10未満、約1:5未満、約1:4未満、約1:3未満、約1:2未満、または約1:1未満に分解または消化され得、ここで、1部の生物学的サンプルは、それぞれ、20、15、10、5、4、3、2、1部で希釈され、50%の組換えウイルスベクター中和をもたらす。

30

【0284】

生物学的サンプル中のAAV中和抗体の例示的な分析および測定は、本明細書に開示されており、米国特許出願公開第2016/0123990にも記載されている。Fc受容体への抗体の結合は、平衡結合定数を決定することによって測定できる。抗体のFc受容体結合の減少は、IgG:FcR相互作用の平衡結合定数の増加によって決定される。

40

【0285】

本発明による方法は、機能の喪失および獲得および機能の遺伝的欠陥の両方に適用可能である。本明細書で使用される遺伝的欠陥に関する「機能喪失」という用語は、前記遺伝子によってコードされるタンパク質（すなわち、突然変異タンパク質）が通常、野生型タンパク質に関連する機能を部分的または完全な喪失を示す遺伝子の任意の突然変異を指す。本明細書で使用される遺伝的欠陥に関する「機能獲得」という用語は、前記遺伝子によってコードされるタンパク質（すなわち、変異タンパク質）が、通常はタンパク質（すなわち、野生型タンパク質）に関連しない機能を獲得する遺伝子の任意の突然変異を指し、

50

病気または障害を引き起こすか、またはその一因となる。機能獲得型変異は、遺伝子内の1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、追加、または置換である可能性があり、これにより、コードされたタンパク質の機能に変化が生じる。特定の実施態様において、機能獲得型突然変異は、突然変異タンパク質の機能を変化させるか、または他のタンパク質との相互作用を引き起こす。特定の実施態様において、機能獲得型突然変異は、例えば、改変された突然変異タンパク質と前記正常な野生型タンパク質との相互作用によって、正常な野生型タンパク質の減少または除去を引き起こす。

【0286】

本発明による方法によって治療され得る疾患および障害には、例えば、限定されないが、肺疾患（例えば、嚢胞性線維症）、出血性障害（例えば、阻害剤を伴うまたは伴わない血友病Aまたは血友病B）、サラセミア、血液障害（例、貧血）、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、てんかん、リソソーム蓄積症（例、アスパルチルグルコサミン尿症、バッテン病、後期乳児神経セロイドリポフスチン症2型（CLN2）、シスチン症、ファブリー病、ゴーチャー病タイプI、II、III、グリコーゲン蓄積症II（ポンペ病）、GM2-ガングリオシドーシスI型（テイサックス病）、GM2-ガングリオシドーシスII型（サンドホフ病）、ムコリピドーシスタイプI（シアリドーシスI型およびII型）、II（I細胞病）、III（疑似ハーラー病）およびIV、ムコ多糖蓄積症（ハーラー病および変異体、ハンター、サンフィリップ型A、B、C、D、モルキオ型AとB、マロトー-ラミー病およびスライ病）、ニーマンピック病タイプA/B、C1およびC2、シンドラー病タイプIおよびII）、遺伝性血管浮腫（HAE）、銅または鉄の蓄積障害（例、ウィルソン病またはメンケス病）、リソソーム酸性リパーゼ欠損症、神経障害または神経変性障害、癌、1型または2型糖尿病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、代謝障害（例、グリコーゲン蓄積症）、固形臓器の疾患（例、脳、肝臓、腎臓、心臓）、または感染性ウイルス（例えば、B型およびC型肝炎、HIVなど）、細菌性または真菌性疾患が含まれる。

【0287】

ポンペ病とも呼ばれるグリコーゲン蓄積症タイプIIは、本発明による方法によって治療することができる。ポンペ病は、グリコーゲンの分解を触媒するリソソーム酵素である-グルコシダーゼ（GAA）をコードする遺伝子の変異によって引き起こされる常染色体劣性疾患である。結果として生じる酵素の欠乏は、体のすべての組織におけるグリコーゲンの病理学的蓄積とリソソームの変化を引き起こし、心臓、呼吸器、および骨格筋の機能障害を引き起こす（van der Ploeg&Reuser、2008）。

【0288】

本発明による方法によって治療され得る血液凝固障害には、例えば、これらに限定されないが、血友病A、阻害抗体を伴う血友病A、血友病B、阻害抗体を伴う血友病B、任意の凝固因子：VII、VIII、IX、X、XI、V、XII、I、フォンウィルブラント因子、またはFV/FVIII欠損症、サラセミア、ビタミンKエポキシドレダクターゼC1欠損症またはガンマカルボキシラーゼ欠損症の組み合わせの欠損が含まれる。

【0289】

本発明による方法によって治療され得る他の疾患および障害には、例えば、これらに限定されないが、貧血、外傷に関連する出血、損傷、血栓症、血小板減少症、脳卒中、凝固障害、播種性血管内凝固症候群（DIC）、ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖、ワルファリン、小分子抗血栓薬（すなわち、FXa阻害剤）、またはベルナル・スリエ症候群、グランツマン血小板無力症、または貯蔵プール欠乏症などの血小板障害に関連する過剰抗凝固が含まれる。

【0290】

特定の実施態様において、対象は、中枢神経系（CNS）に影響を与えるか、またはそれに起因する疾患を有する。特定の実施態様では、疾患は神経変性疾患である。CNSまたは神経変性疾患の非限定的な例には、アルツハイマー病、ハンチントン病、ALS、遺伝性痙攣性片麻痺、原発性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、ケネディ病、ポリグルタミン反復

10

20

30

40

50

病、またはパーキンソン病が含まれる。特定の実施態様では、疾患は、精神疾患、追加（例えば、タバコ、アルコール、または薬物への）、てんかん、カナバン病、または副腎白質ジストロフィーである。特定の実施態様において、CNSまたは神経変性疾患は、例えば、これらに限定されないが、脊髄小脳失調症（SCA1、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、またはSCA17）などのポリグルタミン反復疾患である。

【0291】

本発明は、ヒトおよび獣医学的用途において使用され得る。したがって、適切な対象には、ヒトなどの哺乳動物、ならびにヒト以外の哺乳動物が含まれる。「対象」という用語は、動物、典型的にはヒトなどの哺乳動物、ヒト以外の霊長類（類人猿、ギボン、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、マカク）、家畜（犬および猫）、家畜（家禽ニワトリやアヒル、馬、牛、山羊、羊、豚など）、実験動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット）を指す。人間の対象には、胎児、新生児、乳児、若年および成人の被験者が含まれる。対象はまた、動物疾患モデル、例えば、ポンペ病（GAAの喪失）、およびグリコーゲン貯蔵疾患（GSD）および当業者に知られている他のタンパク質/酵素欠損症のマウスおよび他の動物モデルを含む。

10

【0292】

本発明は、包装材料およびその中の1つまたは複数の構成要素を含むキットなどの組成物を提供する。キットは、典型的には、構成要素の説明またはその中の構成要素のインビトロ、インビボ、またはエクスピボで使用するための説明書を含むラベルまたは包装挿入物を含む。キットは、そのような成分のコレクション、例えば、核酸、組換えベクター、ウイルス（例えば、AAV、レンチウイルス）ベクター、またはウイルス粒子、ならびに抗体を分解または消化するプロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼを含むことができる。

20

【0293】

キットは、キットの1つまたは複数の構成要素を収容する物理的構造を指す。包装材料は、コンポーネントを無菌的に維持ことができ、そのような目的に一般的に使用される材料（例えば、紙、段ボール、ガラス、プラスチック、ホイル、アンブル、バイアル、チューブなど）で作ることができる。

【0294】

標識または挿入物は、その中の1つまたは複数の成分の識別情報、用量量、作用機序を含む有効成分の臨床薬理学、薬物動態学および薬力学を含むことができる。ラベルまたは挿入物には、製造業者、ロット番号、製造場所と日付、有効期限を識別する情報を含めることができる。ラベルまたは挿入物には、製造業者情報、ロット番号、製造業者の場所および日付を識別する情報を含めることができる。ラベルまたは挿入物には、キットコンポーネントが使用される可能性のある疾患に関する情報を含めることができる。ラベルまたは挿入物は、方法、使用、または治療プロトコルまたは治療レジメンにおいて1つまたは複数のキット構成要素を使用するための臨床医または対象に対する指示を含むことができる。指示には、投与量、頻度または期間、および本明細書に記載の方法、使用、治療プロトコル、または予防的または治療的レジームのいずれかを実施するための指示を含めることができる。

30

40

【0295】

ラベルまたは挿入物は、予防的または治療的利益など、構成要素が提供し得る任意の利益に関する情報を含むことができる。ラベルまたは挿入物には、特定の組成物を使用することが適切でない状況に関する被験者または臨床医への警告など、潜在的な有害な副作用、合併症または反応に関する情報を含めることができる。有害な副作用または合併症は、対象が組成物と適合しない可能性のある1つまたは複数の他の薬物を服用している、服用している、または服用している場合、または対象が別の治療プロトコルまたは治療レジメンを服用している、服用している、または服用している場合にも発生する可能性がある。組成物と互換性がないため、指示にはそのような非互換性に関する情報が含まれる可能性がある。

50

【0296】

ラベルまたは挿入物は、「印刷物」、例えば、紙またはボール紙、または別個であるか、構成要素、キットまたは梱包材（例えば、箱）に貼り付けられるか、またはキット成分を含むアンプル、チューブまたはバイアルに取り付けられることを含む。

【0297】

本発明のいくつかの実施態様が記載されている。それにもかかわらず、当業者は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明を様々な使用法および条件に適合させるために、本発明の様々な変更および修正を行うことができる。したがって、以下の実施例は、いかなる方法でも特許請求される本発明の範囲を説明することを意図しているが、限定することを意図していない。

10

【実施例1】

【0298】

材料と方法

AAVベクター

AAVベクターは、以前に記載されたように調製された (Ayuso et al.ら (2010) Gene Ther. 17、503-10)。ゲノム含有ベクターは、塩化セシウム勾配精製によるトリプルトランスフェクションプロトコルに従ってローラーボトルで生成された (Ayuso et al. (2010))。AAVベクターの滴定は、ABI PRISM 7900 HT シーケンス検出器で Absolute ROX ミックス (Taqman、Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州) を使用して実行されるリアルタイムPCR (qPCR) によって実行された。ただし、空のキャプシドは SDS - PAGE とそれに続く滴定によって滴定された。標準として使用される AAV キャプシドに対するデンシトメトリーによる銀染色および定量化。インビトロ中和アッセイでは、ルシフェラーゼをコードする AAV 8 ベクター (AAV 8 - Luc) を、以前に記載されているようにレポーターとして使用した (Miao et al. (2006) Blood. 108, 19-27)。インビボ実験で使用された AAV ベクターは、肝臓特異的プロモーターの制御下で、ヒト FIX または ガウシアルシフェラーゼを発現した (Manno et al. (2006); Mingozzi et al. (2013) Gene Ther. 20、417-24)。

20

【0299】

IdeS エンドペプチダーゼの設計と製造

IdeS コーディング配列 (CDS) を、pEX - N - His タグ付きクローニングベクター (Origon Technologies、Inc.、Roxville MD) にクローン化し、これをメーカーの指示に従い BL 21 コンピテント E. coli (NEB、Ipswich、MA) に形質転換した。細菌培養物に IPTG 0.5 mM を添加することにより、37 °C で 4 時間タンパク質発現を誘導した。タンパク質の検出と精製は、それぞれ抗 FabRICATOR 抗体 A3 - AF1 - 010 (Genovis) と ニッケルアフィニティーカラム (GE Healthcare) を使用して行った。エンドトキシンの除去は、ポリ (- リジン) 樹脂スピンカラム (Thermo Scientific、マサチューセッツ州ウォルサム) を使用して実行し、残留エンドトキシン濃度は、Endosafe Cartridge Technology (Charles River Laboratories) を使用した LAL テストによって製造元の指示に従って評価した。IdeS エンドペプチダーゼは、50 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、0.25% ヒトアルブミン、pH 6.6 で構成される注射液バッファーで希釈した。

30

40

【0300】

細胞培養

2V6.11 細胞 (ATCC CRL - 2784) は、10% FBS、2 mM GlutaMAX (Invitrogen Life Technology、カリフォルニア州カールズバッド) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) において 37、5% CO2 条件下で維持され、AAV 中和アッセイに使用された。

50

【0301】

IdeSによるIgGのin vitro消化

AAV8血清陽性ヒト(NAb力価:1:31.6)およびサル(NAb力価:1:100)またはIVIg(NAb力価:1:316)からの血清を、PBSで4-4.5mg/mL IgGに希釈した。50マイクロリットルの希釈IgG(200µg)をIdeS(100IU、50IU/µL)またはPBSとともに37で22時間インキュベートした。抗AAV8IgGは、ELISAおよび中和アッセイによって測定された。サルIgGの場合、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と結合したサルIgGのガンマ鎖に特異的な抗体(フィッツジェラルド、米国マサチューセッツ州アクトン)を使用した。

【0302】

抗ヒトIgG ELISA

ELISAプレートをヤギ抗ヒトカッパ抗体(PBS中2.5µg/mL)でコーティングし、PBS-1%ウシ血清アルブミン(BSA)でブロックした。市販のIVIg調製物を標準として使用して、IgGサンプルを1/10希釈でインキュベートした。次に、二次HRP標識マウス抗ヒトIgG-Fc抗体とo-フェニレンジアミン二塩酸塩(OPD)基質を使用して、無傷のIgGを明らかにした。

【0303】

AAV抗体アッセイ

抗AAV IgG捕捉アッセイは、以前に記載されたように実施された(Mingozziら(2013)Sci Transl Med.5、194ra92)。簡単に説明すると、組換えAAV空キャプシドをコーティングバッファー(35mM重炭酸塩、13mM炭酸塩、pH>9.2)で希釈して、1mLあたり2x10¹⁰ベクター粒子の最終濃度にした。96ウェルNunc Maxisorp Immunoplate(ThermoFisher、Waltham、USA)の各ウェルに50マイクロリットルを追加した。精製したヒトIgG(Tegeline、LFB、フランス)から作成した標準曲線をプレートに直接加えた。プレートを4°Cで一晩コーティングした。翌日、プレートを洗浄バッファー(PBS、0.05%Tween-20)で3回洗浄し、ブロッキングバッファー(PBS、6%無脂肪ミルク)で室温で2時間ブロックした。プレートを再度洗浄バッファー(PBS、0.05%Tween-20)で3回洗浄し、ブロッキングバッファーで希釈した血清と37°Cで1時間インキュベートした。3回洗浄した後、HRPと結合したヒトIgGの重鎖に特異的な抗体(Southern Biotech、Birmingham、USA)を37°Cで1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄バッファーで3回洗浄し、OPD基質(Sigma、セントルイス、米国)で明らかにした。反応をH₂SO₄3M溶液で停止し、マイクロプレートリーダー(ENSPIRETM、Perkin Elmer、ウォルサム、米国)を使用して492nmで光学密度(OD)測定を行った。抗AAV IgG濃度は、4パラメーター回帰を使用して特定の標準曲線に対して決定され、結果はIgGのµg/mLとして表された。NHP研究の場合、標準曲線用の精製サルIgGと、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(Fitzgerald、Acton、MA USA)と結合したサルIgGのガンマ鎖に特異的な抗体を使用した。

【0304】

AAV中和アッセイ

NAbアッセイは、以前に記載されたように実施された(Melianiら(2015)Hum Gene Ther Methods.26、45-53)。簡単に説明すると、1日目に、96ウェルプレートに2x10⁴の2V6.11細胞/ウェルをボナスステロンA(Life Technologies、Carlsbad、USA)の存在下で24時間播種した。組換えAAV8-CMV-ルシフェラーゼを無血清DMEM(Life Technologies、Carlsbad、USA)で希釈し、血清サンプルの片対数倍段階希釈液とインキュベートした後、37で1時間インキュベートした。続いて、血清-ベクター混合物を細胞に加えた。各希釈は、2回または3回テストされた。24時間後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーター(ENSPIRETM、Perkin Elmer、米国ウォルサム)

10

20

30

40

50

で測定した。形質導入効率は、1秒あたりの相対光単位 (RLU) として測定された。中和力価は、血清を含まない対照 (100%形質導入) と比較して、AAV形質導入を50%以上阻害した最高の血清希釈として報告された。

【0305】

マウスの研究

マウス研究は、動物の世話および実験に関するフランスおよびヨーロッパの法律 (2010/63/EUおよびCE12-037) に従って実施され、地域の制度的倫理委員会によって承認された (プロトコル n 2007-014-B)。

【0306】

6~8週齢の雄のC57BL/6マウス、または雄および雌の第IX因子 (FIX) 欠損血友病B (HB) マウスを使用した。すべての実験において、動物は、最終容量100 μ Lの9mgのIVIg (PRIVIGEN、CSL Behring、US-PA) の静脈内注射によって受動免疫された。30分後、マウスは眼窩後方注射により250 UI、500 UI、または1250 UIのIdeS (Promega、マディソン、US-WI) を受け取りた。翌日、IdeS注射の30時間後、すべてのマウスに 1×10^{12} vg/kg (2×10^{10} vg/マウス) の用量のAAV8ベクターを尾静脈経路で注射した。血液サンプル (D-7、D+7、D+14、およびD+28) は、ヘパリンでコーティングされた毛細管 (Sarstedt、Nuembrecht、ドイツ) の眼窩後神経叢から、またはサンプルD-1+15mnの下顎道から収集された。およびD0。安楽死時に、肝臓全体が収集され、その後のベクターゲノムコピー数評価のために急速冷凍された。

10

20

【0307】

NHP研究

NHPを使用するすべての手順は、施設の動物管理および使用委員会 (プロトコル番号2018120409565637、APAFIS18092) によって承認され、ナント獣医学校 (オニリス、ナント、フランス) で実施された。2匹のカニクイザル (Macaca fascicularis、2~3歳) を、抗AAV8中和抗体価 (1:10~1:31.6) に基づいて選択した。-2日目に、1匹の動物 (NHP2) にIdeS (500 μ g/kg) をゆっくりと静脈内注入した。24時間後 (D-1)、同じプロトコルに従ってIdeSの2回目の注射を繰り返した。翌日、2回目のIdeS注射の24時間後、2匹のサル (NHP1、対照動物、NHP2処理動物) に 2×10^{12} vg/kgの用量でAAV8-hFIXベクターを注入した。血液サンプルをD-7、D-2、D-2+10h、D-1、D-1+10h、D0で収集し、IgG抗体の分解に対するIdeS治療の有効性を評価した (D-2)。治療中およびAAV投与前 (D0)。D4、D7、D13、D21、D28、D35、D50日目の抗AAV8体液性応答と導入遺伝子発現を追跡するために、他の血液サンプルを収集した。安楽死 (D50) で、肝臓の4つの葉から採取された4つのウェッジ生検が収集され、その後のベクターゲノムコピー数調査のために急速冷凍された。

30

【0308】

再投与研究のために、2匹のAAV8血清陽性サルに 5×10^{12} vg/kgのAAV8-hFIXベクター (D0) を注入した。ベクター注射の前に、1匹のサルがD-1日目にIdeS (500 μ g/kg) を1回注射された。その後、両方のサルは、D80日とD81日にIdeS (500 μ g/kg) を二重注射し、D82に 5×10^{12} vg/kgのAAV8-hFIXベクターを注射した。血液サンプルは、実験中のさまざまな時点で収集された。安楽死 (D105) で、VGCN評価のために4つの葉から肝生検が収集された。

40

【0309】

抗モンキーIgGELISA

サルIgGレベルは、サンドイッチ酵素結合免疫測定法 (ELISA) によって測定された。簡単に説明すると、捕捉抗体と検出抗体として、それぞれヤギ抗ヒトIgG F (

50

ab') 2 (Thermo Scientific) とヤギ抗モンキー IgG - HRP (Fitzgerald) を使用した。OPDペルオキシダーゼ基質システム (SIGMAFASTTM - OPD、Sigma) が啓示に使用された。

【0310】

ヒトFIX ELISA

マウス血漿中のヒトFIX (hFIX) タンパク質レベルは、製造業者の指示に従って測定された。ELISAアッセイ用の捕捉および二次HRP抗体は、Affinity Biological (Ancaster, Canada) から購入した。NHPサンプルでは、抗hFIX抗体 (MAI - 43012、Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサム) と抗hFIX - HRP抗体 (CL20040APHP、Tebu-bio、フランス) をそれぞれコーティングと検出に使用した。hFIX抗原レベルは、SIGMAFAST (商標) OPD基質 (Sigma-Aldrich) を製造元の指示に従って追加し、492 nmの吸光度でODを測定することによって決定された。

10

【0311】

ベクターゲノムコピー数 (VGCN)

肝臓ベクターゲノムコピー数は、肝臓プロモーターおよびマウスのTitinまたはeGlobin遺伝子に特異的なプライマーおよびプローブを用いたqPCRアッセイを使用して決定された。プロモーター特異的プライマーとプローブはThermo Scientific (Waltham, MA, USA) によって合成された。マウスチチンとeGlobinは、Thermo Scientific (米国マサチューセッツ州ウォルサム) によって合成された、マウスとNHPの研究でそれぞれ正規化遺伝子として使用された。FastPrepマシン (MP Biomedicals) およびGentra Puregen Blood Kit (Qiagen, ref 158467) を使用して、全臓器 (マウス) または生検 (NHP) をホモジナイズした後、組織からDNAを抽出した。各サンプルを3回テストし、2倍体ゲノムあたりのゲノムコピー数を線形化プラスミドで作成した標準曲線に対して決定した。

20

【0312】

ガウシアルシフェラーゼアッセイ

PBS (1:50) で希釈した50 μ Lの血漿サンプルを、白色の96ウェルマイクロプレート (OptiPlate - 96 Perkin Elmer、米国ウォルサム) にロードした。ガウシアルシフェラーゼ活性は、ルミノメーター (ENSPIRETM、パーキンエルマー、ウォルサム、米国) で測定された。50 μ Lの基質溶液 (セレンテラジン、Sigma Aldrich) を自動注入した後、1秒かけて測定を行った。シグナルバックグラウンドは各値から差し引かれた。Gaussialシフェラーゼ活性はRLU / 秒として表され、値は繰り返しアッセイからの重複の平均 + / - SDである。

30

【0313】

テールクリップ出血アッセイ

動物を、IP送達されたケタミンおよびキシラジンの混合物で麻酔し、腹臥位に置いた。尾の遠位3 mmセグメントをメスで切断した。尾は、37 °Cに予熱した等張食塩水を含む50 mL Falconチューブにすぐに浸した。尾の位置は垂直で、先端は体の水平線から約2 cm下に配置されていた。再出血を検出するために、出血が止まったとしても、各動物を20分間モニターした。出血時間はストップクロックを使用して決定された。出血のオン/オフサイクルが発生した場合は、20分の期間内の出血時間の合計が使用された。実験の終わりに、動物は頸椎脱臼によって犠牲にされた。

40

【実施例2】

【0314】

AAV8での結果

本発明者らは、最初に、野生型マウスの受動免疫に続いて、すなわち、内因性マウスIgGが存在する状況において、IdeSがインビボでヒトIgGを加水分解するかどうかを

50

調査した。野生型マウスにヒト I g G (I V I g) を注射し、30分後に I d e S を注射した。次に、無傷のヒト I g G を、1、6、および24時間後に収集した血清でテストした(図1)。未処理のマウスにおけるヒト I g G のレベルは、0時間での 9.9 ± 1.2 mg/mL (平均 \pm SD) から24時間での 3.7 ± 0.6 mg/mL への時間とともに進行性の低下を示し、マウスにおけるヒト I g G の半減期と一致した (Roopenian et al. (2003) J Immunol. 170, 3528-33)。対照的に、I d e S 処理マウスのヒト I g G は、0時間で 11.1 ± 1.0 mg/mL から24時間で 0.7 ± 0.03 mg/mL への急速な消失を示した。したがって、I d e S による治療は、注射後6時間と24時間の両方でヒト I g G の濃度を5分の1に減少させた。

【0315】

インビボで抗 A A V 8 I g G のレベルを低下させる I d e S の能力を調査するために、我々は以前に記載された受動免疫モデルを使用した (S c a l l a n ら (2006))。野生型 C 5 7 B L / 6 マウスに9mgの I V I g を注射した。30分後、マウスに未処理の対照群として I d e S (250UI) または P B S を注射した。I d e S 注射の30時間後、マウスにヒト F I X 導入遺伝子をコードする A A V 8 ベクターを注射した。これは 1×10^{12} v g / k g の用量で投与された(図2)。次の治療コホートの表に概説されているように、マウスを4つのグループ (n = 6 マウス / グループ) に割り当てた。

【表0】

| Group | IVIg | IdeS | AAV8-hFIX |
|-------|------|------|-----------|
| 1 | + | + | + |
| 2 | + | - | + |
| 3 | - | + | + |
| 4 | - | - | + |

【0316】

動物をベクター送達後4週間追跡し、F I X 導入遺伝子発現レベルを測定するために、7、7、14、28日目に血漿を収集した(図2)。抗 A A V 8 I g G および N A b は、ヒト I g G による再構成後 (D - 1 + 15分) および I d e S または P B S の注射後 (D 0) に採取された血液からの血清で測定された。以前に公開されたように (S c a l l a n et al. (2006))、E L I S A の両方で検出されたように、I V I g にはかなりのレベルの機能的に関連する抗 A A V 8 I g G が含まれていた(図3A、 2.56 ± 0.21 μ g/mL および 2.83 ± 0.22 μ g/mL、平均 \pm SD、それぞれグループ1および2) および中和アッセイ(図3B、それぞれ1:22.6 [範囲: 1:10 ~ 31.6] 力価および1:19 [範囲: 1:10 ~ 31.6])。I d e S の注射により、抗 A A V 8 I g G の循環レベルが大幅に低下した。抗 A A V 8 I g G (グループ1および2でそれぞれ 0.39 ± 0.10 μ g/mL および 1.67 ± 0.42 μ g/mL) および A A V 8 N A b の減少は、24時間後にそれぞれ4.3倍および10倍でした。P B S で治療したマウス(グループ2)での抗 A A V 8 I g G の経時的なレベルの低下は、マウスでのヒト I g G の自然な除去を表している。

【0317】

次に、I V I g または P B S で再構成され、I d e S または P B S で処理された野生型マウスに、h F I X をコードする A A V 8 ベクターを注射し、h F I X 血漿レベルを7、14および28日後に測定した。予想通り、抗 A A V 8 I g G を欠く再構成されていないマウスは、4週間にわたって血中の h F I X の一定の産生と蓄積を示した(図4A)。これは、マウスの肝臓における実質的な遺伝子コピー数を伴っていた(図4B)。対照的に、抗 A A V 8 中和 I g G を含むヒト I g G で再構成されたマウス(図3A)は、h F I X を産生できなかった。興味深いことに、I d e S を使用したヒト I g G 再構成マウスの治療は、遺伝子治療後の h F I X 産生を回復させることができた。曲線下面積を測定する

ことにより評価した場合、I d e S 処理マウスで産生された h F I X のレベルは、対照の非再構成マウスで産生されたレベルの 50.31% に相当した (図 4 A)。したがって、遺伝子コピー数は、ヒト I g G 再構成 I d e S 処理マウスの肝臓では $2.016 \pm 0.620 \text{ v g} / \text{二倍体細胞}$ であったが (図 4 B)、I d e S を受け取らないヒト I g G 再構成マウスでは $0.005 \pm 0.002 \text{ v g} / \text{二倍体細胞}$ であった ($P = 0.002$)。

【0318】

I d e S は、非ヒト霊長類を含む異なる種からの I g G を加水分解する。したがって、I d e S と A A V 8 血清陽性のヒトおよび非ヒト霊長類 (N H P、サル) の血清サンプルとのインキュベーションが中和抗 A A V 8 I g G を加水分解するかどうかを調査した。図 5 A に示すように、I d e S は実際にヒト血清とサル血清の両方で抗 A A V 8 I g G を加水分解し、22 時間のインキュベーションでサル血清中の抗 A A V 8 I g G レベルが 15 分の 1 に減少した ($0.42 \pm 0.01 \mu \text{g} / \text{I d e S}$ または P B S で処理した場合、それぞれ m L および $6.29 \pm 0.10 \mu \text{g} / \text{m L}$)。抗 A A V 8 N A b 力価は、I d e S とインキュベートしたヒト血清でも低下した (図 5 B)。サル血清を I d e S とインキュベートしても、抗 A A V 8 N A b 力価の低下は観察されませんでした。I d e S インキュベーション後にこれらの抗体の中和能が 76% から 64% に低下した (図 5 B)。抗 A A V N A b 力価の低下が見られないのは、高親和性サル抗 A A V 8 I g G の機能的な F (a b ') 2 フラグメントがインキュベーション混合物に残っているためである可能性がある。

10

20

【実施例 3】

【0319】

A A V 2 および A A V 9 での結果

抗 A A V 2 および抗 A A V 9 I g G および N A b は、野生型マウスを 9 m g のヒト I g G で再構成した後 (D - 1 + 15 分) および I d e S の注射 (250 I U または 500 I U、それぞれ A A V 2 または A A V 9 の場合) (または P B S (D 0) 後に収集した血液から調製した血清で測定した (図 2)。I V I g は、E L I S A で検出されたように、かなりのレベルの機能的に関連する抗 A A V 2 および抗 A A V 9 I g G を含んでいた (図 3 C、抗 A A V 2 I g G $9.05 \pm 1.20 \mu \text{g} / \text{m L}$ および $8.92 \pm 0.63 \mu \text{g} / \text{m L}$ 、平均 \pm S D ; 図 3 E、抗 A A V 9 I g G $5.51 \pm 0.492 \mu \text{g} / \text{m L}$ および $5.145 \pm 0.691 \mu \text{g} / \text{m L}$ 、それぞれグループ 1 および 2) および中和アッセイ (図 3 D、1 : 886 および 1 : 772 [範囲 : 1 : 316 ~ 1000] 抗 A A V 2 N A b 力価 ; 図 3 F、1 : 15.4 および 1 : 24.4 [範囲 : 1 : 10 ~ 31.6] 抗 A A V 9 N A b 力価、それぞれグループ 1 および 2)。I d e S の注射により、抗 A A V 2 および A A V 9 I g G の循環レベルが大幅に低下した。抗 A A V 2 I g G の減少は 6 倍 (グループ 1 および 2 でそれぞれ $1.51 \pm 0.31 \mu \text{g} / \text{m L}$ および $4.58 \pm 0.45 \mu \text{g} / \text{m L}$) であり、抗 A A V 2 N A b の減少は 24 時間後に 28 倍でした。抗 A A V 9 I g G の減少は 36 倍 (グループ 1 および 2 でそれぞれ $0.153 \pm 0.074 \mu \text{g} / \text{m L}$ および $2.92 \pm 0.50 \mu \text{g} / \text{m L}$) であり、抗 A A V 9 N A b の減少は 24 時間後に 20 倍でした。P B S 処理マウス (グループ 2) での時間の経過に伴う抗 A A V 2 および A A V 9 I g G のレベルの低下は、マウスでのヒト I g G の自然な除去を表している。

30

40

【実施例 4】

【0320】

G a u s s i a ルシフェラーゼの結果

プールされたヒト I g G で受動免疫された野生型マウスは、G L u c をコードする A A V 8 の注射の前に、I d e S (1250 U I / マウス) または P B S を受けた。G L u c の発現は、7、14、および 28 日後にマウス血漿で測定された。抗 A A V 8 I g G を欠く再構成されていないマウスは、4 週間にわたって血中の G L u c の一定の産生と蓄積を示した (図 4 C)。これは、マウスの肝臓における実質的な遺伝子コピー数を伴っていた (図 4 D)。対照的に、抗 A A V 8 中和 I g G を含むヒト I g G で再構成されたマウスは

50

、G L u cを産生できなかつた(図4C)。興味深いことに、受動免疫されたマウスをI d e Sで処理すると、G L u cの場合にほぼ完全な遺伝子治療効率が回復した(図4C)。

【0321】

したがって、遺伝子コピーの数は、ヒトI g G再構成I d e S処置マウスの肝臓において 0.759 ± 0.148 v g / 二倍体細胞であり(図4D)、I d e Sを投与されなかつたヒトI g G再構成マウスにおいて、 0.0006 ± 0.0004 v g / 二倍体細胞であった($P < 0.0001$)。

【実施例5】

【0322】

H Bマウス研究

I V I gまたはP B Sで再構成された第I X因子欠損血友病B(H B)マウスを、I d e S(1250 U I / マウス)またはP B Sで処理し、h F I XをコードするA A V 8ベクターを注射し、そしてh F I X血漿レベルを7と14日後に測定した。抗A A V 8 I g Gを欠く再構成されていないH Bマウスは、2週間にわたって血中のh F I Xの産生と蓄積を示した(図6A)。対照的に、抗A A V 8中和I g Gを含むヒトI g Gで再構成されたマウスは、h F I Xを産生できなかつた(図6A)。興味深いことに、I d e Sで処理された受動免疫マウスは、遺伝子治療の完全な効率を回復し、対照の非再構成マウスの場合に観察されたものと同じ循環h F I Xレベルを達成した(図6A)。I d e S / A A V 8の併用治療後に達成された内因的に産生されたh F I Xのレベルは、尾クリッピングアッセイにおいてマウスを急性出血から保護した。実際、失血量は、A A V 8で治療した非免疫マウスおよび野生型C 5 7 B L / 6マウス(点線)と統計的に有意ではなかつた。対照的に、I d e Sを投与されなかつた受動免疫マウスは、他のグループのマウスよりも有意に多くの血液を失った。

【実施例6】

【0323】

N H P研究

本発明者らは、非ヒト霊長類におけるI d e S治療の有効性を調査した。図7に示す実験スキームに示すように、1匹のカニクイザル(N H P 2)をI d e S(500μ g / k g)の2回のI V注射で処理した。無傷のI g Gは、E L I S Aによって血清中で測定され、精製サルを使用してm g / m Lとして表す。標準としてのI g G(図8A)。データは、I d e Sの2回目の注入(D - 1 + 10 h、D 0)の後でも、一部のインタクトなI g Gが残っている状態で総N H P 2 I g Gが除去されたことを示している。I g Gの回復はD 4で始まり、治療の21日後に完全に回復した。抗A A V 8 I g Gは、I d e S治療の前後に測定された。処理されたサル(N H P 2)の抗A A V 8 I g Gレベルは、E L I S Aで測定した場合、I d e Sの2回目の注射後に2.7分の1に減少した(2.86 から 1.05μ g / m L)(図8B)。同様に、中和アッセイで測定した場合、抗A A V 8 N A b力価は3分の1に減少した(力価は 17.2 から 5.4 に)(図8C)。

【0324】

I d e Sで処理されなかつたN H P 2および対照サル(N H P 1)は、h F I XをコードするA A V 8(2×10^{12} v g / k g)を受け、血漿中のh F I Xのレベルが、50日間にわたって経時的に測定された。対照サル(N H P 1)と比較して、I d e S治療(N H P 2)を受けたサルは、時間の経過とともに犠牲になるまで、有意に高いh F I X発現レベルを示した(図9A)。この結果は、肝臓V G C Nの評価と一致している。実際、処置されたサル(N H P 2)は、対照の未処置のサル(N H P 1)よりも効率的な肝臓形質導入を示した(図9B、 10.1 ± 1.6 対 1.6 ± 0.2)。また、A A V 8を介した遺伝子治療後のN H P 1およびN H P 2サルの血中の中和抗A A V 8 I g Gのレベルを追跡した。I d e S処理サル(N H P 2)では、抗A A V 8 I g G体液性応答は未処理サル(N H P 1)と比較して11分の1に減少した(図10A、 75.4 ± 0.3 対 816.7 ± 122)。体液性応答の同様の減少が抗A A V 8 N A bで観察された(図10B：

10

20

30

40

50

NHP 2、1 : 3 1 6 対 NHP 1、1 : 3 1 6 0)。

【0325】

次に、IdeS および AAV8 の再投与のプロトコルを開発した (図 1 1)。この目的のために、抗 AAV8 IgG の初期レベルが類似している 2 匹のサルを、以前の IdeS 治療あり (NHP 4) またはなし (NHP 3) の hFIX エンコード AAV8 で治療した。予想通り、最初の AAV8 注射後の hFIX の内因性レベルは、IdeS を投与されなかった AAV8 処理対照サル (NHP 3) よりも IdeS / AAV8 処理サル (NHP 4) の方が大きかった (図 1 2 A)。次に、両方のサルに IdeS を 2 回注射し、hFIX をコードする AAV8 を再投与した。NHP 3 は内因性 hFIX の産生に失敗した。これは、中和抗 AAV8 IgG のレベルの上昇、肝臓への形質導入効率の低下、および抗 hFIX 抗体の発生に関連していた (データは示していない)。逆に、NHP 4 は、IdeS / AAV8 による 2 回目の治療後、hFIX の産生が増加した。これは、抗 AAV8 IgG および NAb の低レベルと一致していた。興味深いことに、hFIX レベルは、ベクターの最初の注射後よりもベクターの再投与後の方が安定していた。これらの結果は、肝臓 VGCN の評価と一致している (図 1 2 B)。サルの血中の中和抗 AAV8 IgG のレベルを 105 日間にわたって追跡調査した。IdeS 処理サル (NHP 4) では、実験終了時に抗 AAV8 IgG 体液性応答はほとんど検出されなかった (図 1 3 A、NHP 4 では $2.25 \pm 0.071 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、NHP 3 では $1552.5 \pm 337.9 \mu\text{g}/\text{mL}$)。体液性応答の同様の減少が抗 AAV8 NAb で観察された (図 1 3 B、NHP 4 の 1 : 17.2 対 NHP 3 の 1 : 10000)。

10

20

【0326】

結論

データは、IdeS 治療が、第 IX 因子をコードする AAV8 ベクターを用いた血友病 B の状況において遺伝子治療を阻害する中和抗体を減少させるのに効果的であることを示している (実施例 1、4 および 5 を参照)。データは、他の AAV 血清型に対する遺伝子治療のための IdeS 治療の使用をサポートしている (実施例 2 を参照)。

【実施例 7】

【0327】

方法

インビトロでのエンドペプチダーゼによる免疫グロブリン G (IgG) の切断 : Spk 2 キャプシドに対する中和抗体 (NAb) を含むまたは含まないヒト血清または非ヒト霊長類 (NHP) 血漿サンプルを、Streptococcus pyogenes 由来の免疫グロブリン分解酵素 (IdeS; Promega) の用量を増加させながら 37 で 1 時間インキュベートした。Promega の指示書によると、1 ユニットは、37 で 30 分間に $1 \mu\text{g}$ の組換えモノクローナル IgG の 95% 以上を切断することと定義されている。反応量は PBS で調整した。全 IgG の切断は、SDS-PAGE およびクマシー染色によって評価された。

30

【0328】

切断された IgG の SDS-PAGE 分析 : 切断されたサンプルは、NuPAGE (登録商標) LDS サンプル緩衝液 (4X) (ThermoFisher Scientific) を用いて非還元 SDS-PAGE のために調製され、70 に 10 分間加熱された。次に、MOPS SDS ランニングバッファーを使用して、NuPAGE (登録商標) Novex 4 ~ 12% Bis-Tris ゲルでサンプルを分析した。ゲルはクマシーブルーで染色された。

40

【0329】

抗 AAV キャプシド中和抗体 (NAb) 力価 : AAV-Spk1 または AAV-Spk2 キャプシドに対する中和抗体を、細胞ベースのインビトロアッセイおよびそれぞれ、Renilla ルシフェラーゼ導入遺伝子をキャプシド化するレポーターベクター、AAV-Spk1 または AAV-Spk2 レポーターのいずれかを使用して定量化した。簡単に説明すると、初期継代 (#26 未満の継代) 293E4 細胞を解凍し、平底の白い 96 ウェルプレートに 2×10^4 細胞 / $200 \mu\text{L}$ / ウェルで播種した。ヘルパーウイルススタン

50

パク質であるヒトアデノウイルスE4の発現を誘導するために、ボナステロンA (Invitrogen; カタログ番号H101-01)を各ウェルに最終濃度1 μ g/mLで添加した。次に、細胞を37 $^{\circ}$ C/5%CO₂インキュベーターで一晩培養した。翌日、サンプルを56 $^{\circ}$ Cで30分間熱不活化し、FBSを希釈液として使用して4点希釈液(1:1から1:5)を調製した。ファクターアッセイコントロール血漿(FACT; King George Bio-Medical, Inc.)は、アッセイ性能を評価するために3.16倍(半対数)段階希釈で調製した。AAV-ルシフェラーゼベクターをDMEMで7.5 \times 10⁷vg/mLに希釈し、FACTコントロールとサンプルに添加した。ベクターおよびコントロール/サンプルを37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。「中和された」コントロール/サンプルのウェルあたり7.5 μ Lの容量を、細胞を播種したプレートの各ウェルに移し、細胞をインキュベーターに戻して一晩インキュベートした。翌日、細胞をPBSで1回洗浄し、Renilla Assay Lysis Bufferで溶解し、Renilla Luciferase Assay System(Promega)でルシフェラーゼ活性を測定し、SpectraMax Lマイクロプレートリーダーで読み取った。

10

【0330】

IVIgを使用する人工免疫マウスモデル：雄C57BL/6マウスにおいて人工NAb力価を作り出すために、ヒト血液から精製された10%免疫グロブリンG(IgG)を含む静脈内免疫グロブリン(IVIg; Gamunex)を腹腔内注射(IV)ベクター投与の1日前(IP)静脈内注射した。IdeSによるIgGのinvitro切断、またはIdeSと比較してマウスIgG2aおよびIgG3に対する活性が改善されたStreptococcus equi由来の同様のエンドペプチダーゼであるIdeZがinvivoでの形質導入効率を救うことができるかどうかを判断するために、IP投与前に37 $^{\circ}$ Cで一晩IVIgを125ユニットのIdeZで処理した(Promega)。全IgGの切断は、SDS-PAGEおよびクマシー染色によって評価された。IVIg投与の1日後、ベクター(AAV-Spk1-GAA)を2 \times 10¹²vg/kgで投与した。マウス血漿サンプルを毎週収集し、導入遺伝子(GAA酵素)の活性についてサンプルを分析した。IdeSによるIgGのinvivo切断がinvivoでの形質導入効率を救うことができるかどうかを決定するために、300mg/kgのIVIgをIP投与によって注入した。24時間後、0.4または4mg/kg IdeSのいずれかをIV投与によって注入した。次に、IdeS注入の24時間後、ベクター(AAV-Spk1-GAA)を2 \times 10¹²vg/kgで投与した。

20

30

【0331】

GAA活性アッセイ：GAA活性は、pH4での基質4-メチル-ウンベリフェリル-D-グルコシドの切断の測定によって評価された(Galjaard et al., Clin Chim Acta 1973; 49(3):361-75)。簡単に説明すると、MilliQ水で1:250に希釈した10 μ Lの血漿サンプルに20 μ Lの基質を添加することで反応を開始した。反応混合物を37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、続いてpH10.5の炭酸緩衝液で停止させた。その後、標準曲線を、4-メチル-ウンベリフェリル-D-グルコシドから遊離した青色蛍光色素である4-メチルウンベリフェロンでプレATINGした。これは、370nmで励起すると440nmで蛍光発光を生成する。

40

【0332】

抗AAVキャプシドIgG抗体：抗AAVキャプシド総IgG形成は、捕捉アッセイで測定された。ELISAプレートウェルを1 μ g/mLのAAV-Spk1キャプシド粒子を含む50 μ Lの溶液でコーティングした。全ヒトIgG(Southern Biotech, 0150-01)を希釈して、10,000ng/mLから0.5ng/mLの範囲の10点検量線を作成し、プレートに添加した。逆算後のアッセイの定量限界は460ng/mLであった。アッセイ性能を評価するために、3つのレベルの品質管理サンプルを準備し、各プレートに含めた。キャプシド粒子、標準、および品質管理(QC)を4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。洗浄後、ウェルを2%BSA、0.05%Tween-

50

20を含むPBSで室温で2時間ブロックした。次に、ブロッキングバッファーでサンプルを段階希釈してプレートにロードし、室温で2時間インキュベートした。ブロッキングバッファーで1:5000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合ヒツジ抗ヒトIgG抗体(GEHealthcare、カタログ番号NA933V)を検出抗体として使用し、プレート上で室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ活性は、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン基質(TMB)と室温で10分間インキュベートした後に明らかになった。反応を1M硫酸で停止し、次にプレートを吸光度プレートリーダーで450nmの光学密度(OD)について読み取った。IgG濃度は、精製されたヒト総IgGの段階希釈で作成された標準曲線に対して決定された。

【実施例8】

【0333】

IdeSは、*in vitro*でヒト、NHP、ハムスターのサンプルからIgGを切断する

ストレプトコッカス・ピオゲネス(IdeS)由来の免疫グロブリンG(IgG)分解酵素は、IgGの4つのヒトサブクラスすべてを高い特異性で切断するシステインプロテアーゼである。IdeSは、IgG重鎖の下部ヒンジ領域にあるGly236でヒトIgGを加水分解する。

【0334】

血清中のIgGを切断するIdeSの能力を分析するために、抗Spk2NAb力価を伴うまたは伴わないヒト血清およびNHP(アカゲザル)血漿サンプルに、増加する用量のIdeS(0-100単位;Promega)を加えた。ナイーブ(<1:1)または比較的中程度(1:5-1:10)または比較的高い(1:20-1:40)NAb力価を有するヒトサンプルでは、IdeSの最低用量が全IgG(~150kD)を切断しFcフラグメント(~25kD)を遊離させた(図14A)。NHPサンプルでは、IgGはすべてのNAb力価グループで同様に切断された(<1:1、1:50-1:100、>1:100、図14B)。

【0335】

ハムスターは、AAV再投与のためのIdeS治療を調べるために、マウスよりも優れたモデルを提供することが期待される。IdeSは、プールされたハムスター血漿(および陽性対照としてプールされたヒト血漿)とともに、増加する量のIdeS(0~50ユニット;Promega)をインキュベートすることにより、ハムスターIgGを切断する能力についてテストされた。サンプルは、非還元SDS-PAGEおよびクーマシーブルー染色によって分析された。IdeSは、*in vitro*でプールされたハムスター血漿およびプールされたヒト血漿中のIgGを切断するのに効果的であった(図14C)。

【0336】

これらの結果は、IdeSがヒトIgG、アカゲザルIgGおよびハムスターIgGの非常に効率的かつ特異的なプロテアーゼであることを示している。

【実施例9】

【0337】

IdeSによるIgGの切断により、*in vitro*でNAb力価が低下するIdeSによるIgGの切断が中和を低減するのに十分であるかどうかを分析するために、AAVベクター形質導入効率をインビトロでアッセイした。このアッセイでは、さまざまな種の血清または血漿サンプルを、レニラルシフェラーゼをコードするAAVベクターを血漿または血清とブレインキュベートし、培養中のヒト細胞をこれらの混合物で形質導入し、続いてルシフェラーゼ活性のレベルを評価することにより、AAVキャプシドに対する中和抗体の存在を評価できる。

【0338】

ナイーブ(<1:1)または高い抗Spk2NAb力価(1:10-1:20)を有するヒト患者血清サンプルを、過剰のIdeS(50単位)の有無にかかわらず前処理し

10

20

30

40

50

、次にNA b力価を評価された。興味深いことに、以前に報告された1:10 - 1:20のNA b力価の患者サンプルは、1つの研究で1:5 - 1:10 NA b力価へのIde S前処理で少なくとも2分の1の減少を示した(表1)。これらの結果は、Ig G抗体がIde Sによって切断されると、AAVベクターの形質導入が増加することを示している。

【0339】

表1 過剰なIde Sとインキュベートしたヒト血清の抗Spk2 NA b力価分析。

【表1】

Study 1

| Sample # | Spark ID | IdeS | Vector | Previous Titer | Titer Range |
|--------------|----------|------|--------|----------------|---------------|
| FACT Plate 1 | NA | NA | NA | NA | 1:100 - 1:316 |
| S1 | 397 | No | Spk2 | <1:1 | <1:1 |
| S2 | 427 | No | Spk2 | 1:10 - 1:20 | 1:10 - 1:20 |
| S3 | 397 | Yes | Spk2 | <1:1 | <1:1 |
| S4 | 427 | Yes | Spk2 | 1:10 - 1:20 | 1:5 - 1:10 |

Study 2

| Sample # | Spark ID | IdeS | Vector | Previous Titer | Titer Range |
|----------|------------|------|--------|----------------|-------------|
| S1 | FBS | No | Spk2 | NA | <1:1 |
| S2 | FBS | Yes | Spk2 | NA | <1:1 |
| S3 | BRH1450399 | No | Spk2 | 1:2.5 | 1:2.5 |
| S4 | BRH1450399 | Yes | Spk2 | 1:2.5 | 1:1 |
| S5 | BRH1450436 | No | Spk2 | ~1:5 | 1:5 |
| S6 | BRH1450436 | Yes | Spk2 | ~1:5 | 1:1 |
| S7 | BRH1450427 | No | Spk2 | 1:10 | 1:10 |
| S8 | BRH1450427 | Yes | Spk2 | 1:10 | 1:10 |

【0340】

Ide Sエンドペプチダーゼで処理した後の抗Spk2 NA b力価分析。ヒト患者サンプル(Spark IDで指定)は、Ide Sの有無にかかわらず前処理された。NA b力価は、後にin vitroベクター形質導入アッセイによって評価された。

【実施例10】

【0341】

in vitroでのIde ZによるIVIgの分解はin vivoでのベクターの形質導入効率を増加させる

細胞毒性および補体結合などのIg G抗体のエフェクター機能は、Fc部分によって媒介される。中和は、抗原に対する特異性について、重鎖および軽鎖の可変領域に依存している。F(ab')₂フラグメントにはまだ無傷の抗原結合領域が含まれているが、データは、ストレプトコッカス・エキイの同様のエンドペプチダーゼであるIde SまたはIde ZによるF(ab')₂フラグメントの遊離を示唆しており、マウスIg G2aおよびIg G3は、Fc部分がないと安定性が低下するため、無傷のIg Gよりも循環からのF(ab')₂フラグメントのクリアランスが速くなる。このアッセイでは、Ide SまたはIde Zによって事前に切断された中和抗体の投与により、in vivo設定でAAVに対する中和活性が低下するかどうかをテストした。

【0342】

マウスを、 0.1 mg/kg のIde Zの有無にかかわらず前処理された抗AAVキャプシド中和抗体を含むヒトIgGのプールであるIVIgで免疫化した。次に、マウスに $2 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ AAV-Spk1-GAAを投与した。 1.0 mg または 5.0 mg のIVIgで治療されたマウスは、対照マウス($33, 551 \pm 13, 635 \text{ nmol/hr/mL}$)と比較して、血漿中のGAA活性レベルが低下した(それぞれ $10, 951 \pm 1, 554 \text{ nmol/hr/mL}$ および $1, 041 \pm 553 \text{ nmol/hr/mL}$)。IVIgによるベクター中和が用量依存的であることを示している(図15)。

【0343】

Ide Zによる 40 mg/kg のIVIgの前処理は、形質導入効率を救い、対照に匹敵するGAA活性レベル($37, 707 \pm 11, 449 \text{ nmol/hr/mL}$)をもたらした。 200 mg/kg IVIgのIde Z前処理により、ベクターの中和が部分的に緩和され($13, 440 \text{ nmol/hr/mL} \pm 15, 543$)、1匹の動物が完全に活性を回復した($41, 025 \text{ nmol/hr/mL}$)。注目すべきことに、Ide Z自体はAAVベクターの形質導入効率を妨げなかった。IVIgの用量保持は、IgGの切断を確認するためにクーマシー染色を用いたSDS-PAGEによって分析された。これらの結果は、Ide S/Ide ZによるAAVキャプシドに対する中和抗体の*in vitro*切断が*in vivo*でのAAVベクター形質導入および導入遺伝子発現を救うことができることを示している。

10

【実施例11】

【0344】

インビボでのIde SによるIVIgの分解は、インビボでのベクターの形質導入効率を増加させる

インビボでのIgGの切断が血漿中のベクター形質導入および導入遺伝子の発現/活性に影響を及ぼし得るかどうかを分析するために、マウスに最初に無傷のIVIgを注入して、ヒト抗キャプシド中和IgGの人工力価を作成した。24時間後、マウスに2つの濃度(0.4 mg/kg または 4 mg/kg)のIde Sを注入し、Ide S注入の24時間後に、すべてのマウスに $2 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ AAV-Spk1-GAAを投与した。抗Spk1NAb力価とIgGレベルの両方を、Ide S注入前とIde S注入後(ベクター投与の直前)に分析した。

20

【0345】

Ide S注入は、NAb(図16)およびIgGレベル(図17)の両方の用量依存的減少を誘発した。Ide Sの最高用量(4 mg/kg)は、NAb力価を少なくとも $1:40$ から $< 1:1$ に低下させることができた。

30

【0346】

ベクター注入の1週間後にGAA活性を測定した場合、ベクターのみを投与した対照マウスは、 $49, 387 \pm 7, 345 \text{ nmol/hr/mL}$ のGAA活性レベルを示した(図18)。 300 mg/kg IVIgを注射されたマウスは、形質導入のほぼ完全な阻害と一致する血漿中のGAA導入遺伝子活性レベル($1, 702 \pm 336 \text{ nmol/hr/mL}$)を示した。Ide Sは、導入遺伝子の活性レベルの用量依存的な救済を示した。 0.4 mg/kg Ide SはGAA活性の70%レスキュー($34, 408 \pm 10, 562 \text{ nmol/hr/mL}$)をもたらし、 4 mg/kg Ide Sは99%GAA活性のレスキュー($48, 948 \pm 5, 322 \text{ nmol/hr/mL}$)をもたらした。これらの結果は、インビボでのIde S治療が中和抗体力価を低下させ、治療に抵抗性である動物におけるAAVベクターの投与および形質導入を可能にすることを実証している。

40

【実施例12】

【0347】

インビボでのIde SによるIVIgの分解は、インビボでのベクターの形質導入効率を増加させる

Ide Sは、インビボでより高い力価の抗キャプシドIgGを切断し、より高度のAAVベクター中和の状況においてAAV形質導入を救済する能力について評価された。マウス

50

(オスC57BL/6)に、さまざまな用量の無傷のヒトIVIg(300mg/kg(低)、800mg/kg(中)、または1600mg/kg(高))を注入して、ヒト抗の人工力価を作成した。-キャプシド中和IgG。24時間後、マウスに3つの濃度(0.4mg/kg(低)、1mg/kg(中)、または2mg/kg(高))のIdeSを注入した。IdeS注入の24時間後、マウスに 2×10^{12} vg/kgでAAV-Spk1-GAAを投与した。抗Spk1NAb力価は、実施例1に記載の抗AAVキャプシドNAb力価アッセイを使用して、IdeS注入前およびIdeS注入後(ベクター投与の直前)の両方で決定された。AAVトランスダクションをベクター投与の2週間後の実施例1に記載されるように、GAA活性アッセイを使用する血漿中の導入遺伝子(GAA)活性の測定によって評価した。

10

【0348】

IVIgのすべての用量について、IdeSでの前処理は、AAVNAb力価の用量依存的な減少をもたらした(表2)。表2は、各グループの各動物のIdeS注入前後の中和抗Spk1抗体(NAb)力価を示している。AAVNAb力価は、低(<1:1、1:1-1:2.5)、低から中範囲(1:2.5-1:5)、中から高範囲(1:5-1:10)および高(>1:10-1:20)として指定される。IdeSの最高用量(2mg/kg)は、>1:160(1600mg/kgIVIgで生成)のNAb力価を1:1-1:2.5まで低下させることができた。

表2 IdeS注入前後のマウス血漿中の抗NAb力価

20

【表2】

| | Pre-IdeS | Post-IdeS | | Pre-IdeS | Post-IdeS |
|----------------------------|-------------|-------------|----------------------------|--------------|--------------|
| Negative Control | <1:1 | <1:1 | Mid IVIg + No IdeS | 1:40 - 1:80 | 1:20 - 1:40 |
| 0 mg/kg IVIg + | <1:1 | <1:1 | 800 mg/kg IVIg + | 1:40 - 1:80 | 1:80 - 1:160 |
| 0 mg/kg IdeS | <1:1 | <1:1 | 0 mg/kg IdeS | 1:40 - 1:80 | 1:40 - 1:80 |
| | <1:1 | <1:1 | | 1:40 - 1:80 | 1:40 - 1:80 |
| | <1:1 | <1:1 | | 1:40 - 1:80 | 1:40 |
| | <1:1 | <1:1 | Mid IVIg + Low IdeS | 1:40 - 1:80 | 1:5 - 1:10 |
| | <1:1 | <1:1 | 800 mg/kg IVIg + | 1:40 - 1:80 | 1:5 - 1:10 |
| Low IVIg + No IdeS | 1:20 - 1:40 | 1:20 - 1:40 | 0.4 mg/kg IdeS | 1:20 - 1:40 | 1:2.5 |
| 300 mg/kg IVIg + | 1:40 | 1:10 - 1:20 | | 1:20 - 1:40 | 1:2.5 - 1:5 |
| 0 mg/kg IdeS | 1:20 - 1:40 | 1:20 - 1:40 | | 1:40 - 1:80 | 1:5 - 1:10 |
| | 1:40 - 1:80 | 1:10 - 1:20 | Mid IVIg + Mid IdeS | 1:80 - 1:160 | 1:2.5 - 1:5 |
| | 1:10 - 1:20 | 1:20 - 1:40 | 800 mg/kg IVIg + | 1:40 - 1:80 | 1:1-1:2.5 |
| Low IVIg + Low IdeS | 1:20 - 1:40 | 1:2.5 - 1:5 | 1.0 mg/kg IdeS | 1:40 - 1:80 | <1:1 |

30

40

| | | | | | | |
|--|-----------------|----------------|---|-----------------|------------|-----------|
| 300 mg/kg IVIg + 0.4 mg/kg IdeS | 1:20 - 1:40 | 1:1 - 1:2.5 | 1:80 - 1:160 | 1:1-1:2.5 | 10 | |
| | 1:20 - 1:40 | 1:40 - 1:80 | | 1:40 - 1:80 | | 1:1-1:2.5 |
| | 1:20 - 1:40 | 1:1 - 1:2.5 | | 1:40 - 1:80 | | <1:1 |
| | 1:20 - 1:40 | 1:2.5 | | 1:40 - 1:80 | | <1:1 |
| Low IVIg + Mid IdeS 300 mg/kg IVIg + 1.0 mg/kg IdeS | 1:40 - 1:80 | 1:1 - 1:2.5 | 800 mg/kg IVIg + 2.0 mg/kg IdeS | 1:80 - 1:160 | 20 | |
| | 1:80 - 1:160 | < 1:1 | | 1:80 - 1:160 | | <1:1 |
| | 1:80 - 1:160 | 1:1 - 1:2.5 | | 1:1 - 1:2.5 | | <1:1 |
| | 1:20 - 1:40 | 1:1 - 1:2.5 | | 1:20 - 1:40 | | <1:1 |
| | 1:20 - 1:40 | 1:1 - 1:2.5 | | 1:80 | | 1:1-1:2.5 |
| Low IVIg + High IdeS 300 mg/kg IVIg + 2.0 mg/kg IdeS | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | High IVIg + No IdeS 1600 mg/kg IVIg + 0 mg/kg IdeS | > 1:160 | 1:80-1:160 | 30 |
| | 1:10 - 1:20 | < 1:1 | | > 1:160 | 1:40-1:80 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | >1:160 | 1:40-1:80 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | >1:160 | 1:40-1:80 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | >1:160 | 1:40-1:80 | |
| High IVIg + Low IdeS 1600 mg/kg IVIg + 0.4 mg/kg IdeS | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | High IVIg + Mid IdeS 1600 mg/kg IVIg + 1.0 mg/kg IdeS | 1:1-1:2.5 | 1:1-1:2.5 | 40 |
| | 1:10 - 1:20 | < 1:1 | | >1:160 | 1:5-1:10 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | 1:20-1:40 | 1:2.5-1:5 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | >1:160 | 1:10-1:20 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | >1:160 | 1:10-1:20 | |
| High IVIg + High IdeS 1600 mg/kg IVIg + 2.0 mg/kg IdeS | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | 1600 mg/kg IVIg + 2.0 mg/kg IdeS | >1:160 | 1:2.5-1:5 | 50 |
| | 1:10 - 1:20 | < 1:1 | | >1:160 | 1:2.5-1:5 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | >1:160 | 1:2.5-1:5 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | >1:160 | 1:2.5-1:5 | |
| | 1:20 - 1:40 | < 1:1 | | <1:1 | <1:1 | |

【 0 3 4 9 】

ベクター注入の2週間後に測定されたGAA活性の結果を図19に示す。陰性対照マウス(投与されたベクターのみ)の血漿は、 $26, 689 \pm 12, 420 \text{ nmol/hr/mL}$ のGAA活性レベルを示した。300 mg/kg(およびそれ以上)のIVIgを注

射し、I d e Sを投与しなかったマウスは、A A Vベクター形質導入のN A b阻害と一致して、わずかに 436 ± 41 nmol / hr / mLの血漿G A A活性レベルを示した。前の例の結果と一致して、血漿中のG A A活性レベルによって測定されるように、I d e S前処理はA A Vベクター形質導入の用量依存的救済をもたらした：0.4 mg / kg I d e Sは $7,702 \pm 4,710$ nmol / hr / mLのG A A活性レベルをもたらし、1 mg / kg I d e Sは $15,444 \pm 4,226$ nmol / hr / mLのG A A活性レベルをもたらし、2 mg / kg I d e Sは $14,375 \pm 2,572$ nmol / hr / mLのG A A活性レベルをもたらした。

【0350】

より高い用量のI V I g (800または1600 mg / kg I V I gのいずれか)を受けた群は、I d e Sの増加に伴うG A A活性レベルの用量依存的増加の同様の傾向を示した。800 mg / kg I V I gの場合、0.4 mg / kg I d e Sは $4,188 \pm 2,549$ nmol / hr / mLのG A A活性レベルをもたらし、1 mg / kg I d e Sは $17,813 \pm 11,283$ nmol / hr / mL、および2 mgのG A A活性レベルをもたらした。/ kg I d e Sは、 $26,846 \pm 7,354$ nmol / hr / mLのG A A活性レベルをもたらした。1600 mg / kg I V I gの場合、0.4 mg / kg I d e Sは 580 ± 217 nmol / hr / mLのG A A活性レベルをもたらし、1 mg / kg I d e Sは $12,511 \pm 1,602$ nmol / hr / mLおよび2 mg / のG A A活性レベルをもたらした。kg I d e Sは、 $11,573 \pm 1,313$ nmol / hr / mLのG A A活性レベルをもたらした。I V I gの最高用量(1600 mg / kg)では、最低I d e S用量(0.4 mg / kg)はベクター形質導入を救うことができなかった。ただし、I V I gの1600 mg / kg用量では、循環中に超生理学的レベルの総I g Gが存在し、基質の量が増加するため、0.4 mg / kg用量でのI d e Sの有効性が低下する可能性がある。

【0351】

これらの結果は、インピボでのI d e S治療が中和抗体力価を低下させ、ウイルスベクター遺伝子治療治療法に抵抗性である動物におけるウイルスベクターの投薬および形質導入を可能にすることを示している。

【実施例13】

【0352】

この併用療法の適用は広範囲にわたる。たとえば、I d e SによるA A Vキャプシドまたは他のモードの遺伝子送達に対するN A bの克服は、既存の中和抗体力価を持つ患者の治療、および有効レベルが時間または他の紛らわしい問題のために達成されなかったか、失われたかのどちらかである。さらに、本明細書の方法は、肝細胞の拡大および発生中の導入遺伝子発現の潜在的な喪失のために遺伝子治療に難治性であると見られている小児集団への肝遺伝子導入を可能にする。これらの結果は、I d e S投与により、A A Vキャプシドに対する中和抗体が減少または除去され、以前は遺伝子治療に適さないと見なされていた患者、またはA A V遺伝子治療後にA A V抗体を発症した患者の治療が可能になることを示している。

【実施例14】

【0353】

A A V再投与のハムスターモデル

ハムスターは、目的の導入遺伝子を保有するr A A Vベクター粒子を注入され、抗A A V N A bの発生後(例えば、4週間)にI d e Sを投与され、そして別の導入遺伝子を保有する追加のr A A V粒子が注入される。このモデルにより、I d e S治療の前後、r A A Vによる再投与の前後など、さまざまな段階での形質導入効果の分析が可能になる。

【0354】

A A Vキャプシドに対する中和抗体の効果を分解または低減するI d e Sの能力を評価するために、そのI g GがエンドペプチダーゼI d e Sによって効率的に切断される種であるシリアゴールデンハムスターで研究が行われる。ハムスターには、最初に 2×10^1

10

20

30

40

50

2×10^{12} v g / k g S p k 1 - F V I I I、S p k 1 - F I X、またはその他の S p k 1 カプセル化ベクターが注入される。抗 S p k 1 I g G E L I S A または細胞ベースの中和抗体アッセイによる S p k 1 キャプシドへの N A b の発生の測定に加えて、血漿中の導入遺伝子産物（すなわち、F V I I I、F I X など）の発現について動物をモニターする。N A b 力価の発現後、ベクター注入から 3 ~ 5 週間以内に、動物に静脈内、皮下、腹腔内、またはその他の投与経路で、0、0.5、1、および 2 m g / k g（およびより高い用量）の I d e S の単回または複数回の漸増用量を注入する。I d e S 投与後、動物の後に、S p k 1 に対する抗 S p k 1 キャプシド I g G および / または N A b を測定する。動物が N A b レベルの十分な減少を示したら、 2×10^{12} v g / k g S p k 1 - G A A を注入する。形質導入に続いて、G A A 発現は、達成された形質導入のレベルを決定するために、G A A 活性アッセイおよび / または G A A 抗原レベル測定によって血漿中で測定される。

10

【0355】

これらの研究は、I d e S がインビボで A A V キャプシド特異的 N A b を、再投与を可能にするのに十分に低いレベルに減少させるかどうかを示す。抗 F V I I I I g G の測定（i n v i v o で開発された場合）は、導入遺伝子産物を標的とする N A b の減少における I d e S の有効性、および有効性が失われる前に許容される I d e S 再投与のラウンド数に関する情報を提供する。

【実施例 15】

【0356】

A A V 再投与のカニクイザルモデル

20

大型動物モデルにおいて A A V キャプシドに対する N A b の効果を分解または低減する I d e S の能力を評価するために、カニクイザル（*Macaca fascicularis*）において研究が行われる。サルは、S p k 1 キャプシドに対する既存の N A b について最初にスクリーニングされる。N A b 陽性の動物は、野生または集団飼育で自然に発生する A A V への曝露に起因する可能性がある。動物は、負または正の N A b 力価、および正の場合は既存の N A b 力価の高さに基づいてグループに分類される。

【0357】

研究の再投与群において、動物は、 2×10^{12} v g / k g の S p k 1 - F I X、または他の S p k 1 カプセル化ベクターで投与される。抗 S p k 1 I g G E L I S A または細胞ベースの N A b アッセイによる S p k 1 キャプシドへの N A b の発生の測定に加えて、血漿中の導入遺伝子産物（すなわち、F I X または他のもの）の発現について動物をモニターする。N A b 力価の発現後、ベクター注入から 3 ~ 5 週間以内に、動物に静脈内、皮下、腹腔内、またはその他の投与経路で、0、0.5、1、および 2 m g / k g の I d e S の単回または複数回の漸増用量を注入する。および高用量。I d e S 投与後、動物の後に、S p k 1 に対する抗 S p k 1 キャプシド I g G および / または N A b を測定する。動物が N A b レベルの十分な減少を示したら、 2×10^{12} v g / k g S p k 1 - G A A を注入する。形質導入に続いて、G A A 発現は、達成された形質導入のレベルを決定するために、G A A 活性アッセイおよび / または G A A 抗原レベル評価によって血漿中で測定される。

30

【0358】

研究の別のアームは、既存の N A b 力価を克服する I d e S の能力を評価する。異なる N A b 力価レベルを示す動物は、力価に基づいてグループ化され、静脈内、皮下、腹腔内、または他の投与経路によって、0、0.5、1、および 2 m g / k g（およびそれ以上の用量）の I d e S の単回または複数回の漸増用量で注入される。I d e S 投与後、動物の後に S p k 1 に対する抗 S p k 1 キャプシド I g G および / または N A b を測定し、動物が N A b レベルの十分な低下を示したら、 2×10^{12} v g / k g S p k 1 - G A A を注入する。形質導入に続いて、G A A 発現は、達成された形質導入のレベルを決定するために、G A A 活性アッセイおよび / または G A A 抗原レベル測定によって血漿中で測定される。

40

【0359】

50

これらの研究は、I d e S がインビボでA A Vキャプシド特異的N A bを、ヒトA A V投与の優れたモデルである種であるカニクイザルにおける再投与を可能にするのに十分に低いレベルに低減するかどうかを示す。これらの研究はまた、I d e S 投与によって克服できる最大の既存のN A b力価を示している。抗F I X I g G (i n v i v oで開発された場合)の測定は、導入遺伝子産物を標的とするN A bの減少におけるI d e Sの有効性、および有効性が失われる前に許容されるI d e S再投与のラウンド数に関する情報を提供する。

【実施例16】

【0360】

I d e SとA A V - S p k 1 - h F V I I Iを使用したマウス研究

I d e Sの2つの異なる調製物(ロット1およびロット2)を、ヒト抗キャプシド中和I g Gの人工力価を有するマウスで試験した。C 5 7 B L / 6マウスに-2日目に300mg/kgのI V I gを注射し、続いて-1日目に1mg/kgのI d e Sを注射し(A A Vの前投与)、最後にA A V - S p k 1ベクターをコードする5x10¹⁰ベクターゲノムを注射しました。0日目(投与後)のヒト第V I I I因子(A A V - S p k 1 - h F V I I I)。陰性対照動物はI V I gまたはI d e S治療を受けておらず、「I d e Sなし」グループはI V I gおよびA A V - S p k 1 - h F V I I Iベクターのみを受けていた。血漿中の中和抗体力価は、サンプルに8点力価(1:1~1:160)を使用して、実施例7に記載されたものと同様の抗A A Vキャプシド中和アッセイを使用して、I d e S投与の前後に決定された。発光はG l o M a x (R) D i s c o v e r M i c r o p l a t e R e a d e r (P r o m e g a)で読み取られた。力価は、発光が50%を超えて阻害された最高の希釈または範囲として決定された。I d e S治療前後のN A b力価は、両方のロットのI d e SがマウスのN A b力価を低下させるのに効果的であることを示している(図20)。

【0361】

ヒトF V I I I抗原レベルは、E L I S Aプレベクター注入によって、およびベクター注入の1週間後および2週間後に測定された(図21)。インビボでのI d e S処理の両方のロットは、中和抗体力価を低下させ、A A Vベクターの投与および導入遺伝子の発現を可能にした。

【実施例17】

【0362】

抗A A V - S p k 1 I g Gを用いたマウス研究

C 5 7 B L / 6マウスは、ヒト抗キャプシド中和I g Gの人工力価を誘導するためにI V I gを与えられた。3つの濃度のI V I g(300mg/kg(低)、800mg/kg(中)、および1600mg/kg(高))を使用し、各I V I gグループ内で、動物をI d e Sの用量を増やして処理した(0、0.4、1.0、2.0mg/kg)抗S p k 1キャプシドI g GレベルをE L I S Aで評価した。簡単に説明すると、96ウェルプレートをS p k 1空キャプシドでコーティングし、B S Aでブロックし、洗浄し、血漿とインキュベートし、1:100に希釈した。インキュベーション後、プレートを洗浄し、H R Pと結合した二次抗体と1時間インキュベートした。その後、プレートを再度洗浄し、T M B基質を使用して発色させた。プレートを吸光度プレートリーダーで読み取り、光学密度(O D)を測定した。450nm。発光をヒトI g Gの標準曲線と比較して、抗体濃度を決定した。I d e Sの3つの濃度すべて(0.4、1.0、2.0mg/kg)は、3つの濃度すべてで抗S p k 1カプシドI g Gの血清レベルを排除または大幅に低下させた(I V I gの低、中、高)(図22)。

【実施例18】

【0363】

S p k 1(配列番号1):

10

20

30

40

【表 3】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNNGRGLVLPGYKYLGP
 NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGN
 LGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQPAKKRL
 NFGQTGDSESVDPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNW
 HCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDF
 NRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFT
 DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQML
 RTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFS
 QAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVP
 GVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYG
 VVADNLQQQNAAPIVGAVNSQ GALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLM
 GGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

10

【0364】

20

S p k 2 (配列番号 2) :

【表 4】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGP
 NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVKGSGKQPARKR
 LNFGQTGDSESVDPDPQPLGEPPAAPSTLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNW
 HCDSQWLGDVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNR
 FHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTD
 SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR
 TGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQGTTSGTTNQSRLLS
 QAGPQMSLQARNWLPGPCYRQQLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNG
 PAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGT
 VANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGF
 GLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRPL

30

40

【0365】

N 末端メチオニンおよびシグナル配列を含む I d e S の配列。(配列番号 3、N C B I 参照配列番号 W P _ 0 1 0 9 2 2 1 6 0 . 1) :

【表 5】

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTP
 ANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIK
 RYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPD
 HVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKE
 ISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDSNLKAIVTDSDSNASIGMK
 KYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVGLFTLSTGQDSWNQTN

10

【0366】

N末端メチオニンおよびシグナル配列を欠くIdeSの成熟配列(GenBankアクセ
 ション番号ADF13949.1)。(配列番号4)：

【表 6】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
 GGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
 NLWGADFDSDSNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSWNQTN

20

【0367】

配列番号5から18は、WO2016/28558の表Cからの例示的なIdeSポ
 リペプチドの配列である。

【0368】

配列番号5

【表 7】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIDTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
 GGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
 NLWGADFDSDSNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSWNQTN

30

【0369】

配列番号6

【表 8】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFKGEQMFDVKEAIDTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKRGSKDP
 RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
 INLWGADFDSDSNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSWNQTN

40

50

【 0 3 7 0 】

配列番号 7

【 表 9 】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLCCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIDTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDP
 RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHV
 INLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNKAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSWNQTN

10

【 0 3 7 1 】

配列番号 8

【 表 1 0 】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLCCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLREHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
 GGIFFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELDEGKALGLSHTYANVRINHVI
 NLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSWNQTN

20

【 0 3 7 2 】

配列番号 9

【 表 1 1 】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLCCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIRTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
 GGIFFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELEEGKALGLSHTYANVRINHVI
 NLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNKAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSWNQTN

30

【 0 3 7 3 】

配列番号 1 0

【 表 1 2 】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLCCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
 GGIFFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVI
 NLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEKNIGAQV
 LGLFTLSTGQKSWNQTN

40

【 0 3 7 4 】

配列番号 1 1

50

【表 1 3】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLCLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIRTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
 GGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKSELENGKALGLSHTYANVRINHVI
 NLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNKAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSWNQTN

10

【 0 3 7 5】

配列番号 1 2

【表 1 4】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLCLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIRTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDP
 RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELEEGKALGLSHTYANVRINHV
 INLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSWNQTN

20

【 0 3 7 6】

配列番号 1 3

【表 1 5】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLCLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIERYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIDTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDP
 RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHV
 INLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQKSWNQTN

30

【 0 3 7 7】

配列番号 1 4

【表 1 6】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
 GKDDLCLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTK
 NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
 GGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVI
 NLWGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQV
 LGLFTLSTGQDSW

40

【 0 3 7 8】

配列番号 1 5

【表 17】

SVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHW
 WFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYL
 STKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSR
 HDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNSGNLKAIVT
 DSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

【0379】

10

配列番号 16

【表 18】

SVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHW
 WFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYL
 STKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSR
 HDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNSGNLKAIVT
 DSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

【0380】

20

配列番号 17

【表 19】

SVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHW
 WFDQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKKAIIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYL
 STKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSR
 HDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNSGNLKAIVT
 DSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQKSWNQTN

【0381】

30

配列番号 18

【表 20】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTF
 NGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKKAIIDT
 KNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKD
 PRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINH
 VINLWGADFDNSGNLKAIVTSDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQ
 VLGLFTLSTGQKSWNQTNNGGGHHHHHH

40

【0382】

S . a g a l a c t i a e の I g d E は、ヒト I g G 1 に特異的である (W O 2 0 1 7 1
 3 4 2 7 4) (配列番号 1 9) :

【表 2 1】

NQNNIQETNLVEKNSDKFIQELNRYKTEIPNFKGFNVWILGDKGYKLNINLEEIKNIQ
 ATLKKERNEEYVFKLNGKIAHDTTVFLMNKHKHLLKNIEEFKTITQKRLTERGKFPYD
 TVHSTFEIKDENFIMERLKSSGLSMGKPVDMGVNGIPIYTKTLSIDNKF AFENNSKDSS
 YSSNINISEDKIKENDQKILDLIVKSGANNQNL TDEEKVIAFTKYIGEITNYDNEAYRARN
 VDTEYYRASDLFSVTERKLAMCVGYSVTAARAFNIMGIPSYVVS GKS PQGISHAAVRA Y
 YNRSWHIIDITASTYWKNGNYKTTYSDFIKEYCIDGYDVYDPAKTNNR FKV KYMESNE
 AFENWIHNNGSKSMLFINESAALKDKKPKDDFVPVTEKEKNE LIDKYKKLLSQIPENTQ
 NPGEKNIRDYLNKEYEILKKNLFEHEHAEFKESLNLNESFY LQLKKEEKPSDNLKKE
 EKPRENSVKERETPAENND FVSVTEKNNLIDKYKELLSKIPENTQNPGEKNIRNYLEKEY
 EELLQKDKLKFHEYTEFTKSLNLNETFYSQLKEGEMKLS ENPEKGETNTN

10

【0383】

S. pseudoporcinus の Ig d E は、ヒト Ig G 1 とブタ Ig G の両方を分
 解する (W O 2 0 1 7 1 3 4 2 7 4) (配列番号 2 0) :

【表 2 2】

RENENVRQLQSENKQMKAVNLQEFSEKLGKGEIAENQQFHIFKLGLNYYIGGVRINELS
 DLAKNHDFIMIDNRATHNKYGVPHIIMNKDDVIVHNQEDYNKEMAELTFAGDKPIQSD
 SYLPQKKRIHALFEIGLDSNRRQLLNAAGLKT PENSVIELDTFKIYSHGLAVDNKY YDEY
 SHFNNNTNVNITKQRFTENDNLIHNLITSTAKDQPTDRDKVKTFVMYVANHTIYD WNA
 ANNAVSNISDVNYLGSDFLFSITERKKAMCVGFSTTAARAFNMLGIPAYVVEGKNAQG
 VDHATARVYYNGKWH TIDGTGFINGNRTRSTLYTESHF RSVGEDSYQLVGLNEDIPFDR
 NYMKIDKVYEEWAPKQKTADLLL VNKDKSLVGLDRVAYVEPVYVDKNRQDAL TQIYK
 KKKETMESSKKNPSSGGFSSLLGSASSDI AKLEGSSQLTQE EYDKIHRSM TSIL TFFAQL
 DKDAAEAFEKGN DYKNYLATTKHAQ

20

30

【0384】

I d e Z の完全な配列は、NCBI 参照配列番号 W P 0 1 4 6 2 2 7 8 0 . 1 (配列番号
 2 1) として入手できる。この配列には、N 末端メチオニンとそれに続く 3 3 アミノ酸分
 泌シグナル配列が含まれる。N 末端メチオニンとシグナル配列 (N 末端に合計 3 4 アミノ
 酸) は通常、除去されて成熟 I d e Z タンパク質を形成する。

【表 2 3】

MKTIAYPNKP HSL SAGLLTAIAIFSLASSNITYADDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKG
 VTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKA FDKDNL LCGAATAGNMLHWWFDQ
 NKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKA AIDTKDSQTNSQLFN YFRDKAFP NLSARQL
 GVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTLLLTARH
 DLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDS
 DANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQV LGLFTLSSGKDIWQKLS

40

【0385】

完全な配列の N 末端から 3 4 アミノ酸を含まない I d e Z の配列 (配列番号 2 2) :

【表 2 4】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITK
 AFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKA
 AIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNR
 RPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYAN
 VSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGE
 NIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

10

【0386】

I d e Z に基づく N 末端部分を有し、N 末端メチオニンを含まない I d e S / Z ハイブリッドの配列およびシグナル配列 (N 末端に合計 3 4 アミノ酸) (配列番号 2 3) :

【表 2 5】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVFHAPYVANQGWDIT
 KAFDQKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFGDNMFDVKK
 AIDTKNHQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEG
 SKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSI
 NHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDSNASIGMKKYFVG VNAHGHVAISAKKIEGENIG
 AQVLGLFTLSTGQDSWQKLS

20

【0387】

配列番号 2 4 ~ 4 3 は、配列番号 2 2 の I d e Z と比較して修飾されたペプチドに対応する。

【0388】

配列番号 2 4

【表 2 6】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLANQGWDITK
 AFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKEAIRT
 KDSQTNSQLFEYFRDKAFPYLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVVKRPYQ
 DKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKEELTKGRALALSHTYANVS
 ISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINKHGHVAISAKKIEGENIG
 AQVLGLFTLSSGKDIWQKLN

30

【0389】

配列番号 2 5

【表 2 7】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITK
 TFNGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNEELFDLKA
 AIDTKDSQTNSQLFNYFKEKAFPNSRQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNR
 RPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDFKEKGLKDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVS
 ISHVINLWGADFDAEGLNKAIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGKVAISAKKIEGENIG
 AQVLGLFTLSSGKDIWQQLS

40

【0390】

50

配列番号 2 6

【表 2 8】

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKA
 FDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKA AIDT
 KDSQTNSQLFNYFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQ
 DKDKRGGIFDAVFTRGDQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVS
 ISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIG
 AQLGLFTLSSGKDIWQKLS

10

【0 3 9 1】

配列番号 2 7

【表 2 9】

SVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKA FDGKDNLLCGAATAGNML
 HWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKA AIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFP
 NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQT
 TLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLE
 AIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQLGLFTLSSGKDIWQKLS

20

【0 3 9 2】

配列番号 2 8

【表 3 0】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKA
 FDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKA AIDT
 KDSQTNSQLFNYFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQ
 DKDKRGGIFDAVFTRGDQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVS
 ISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIG
 AQLGLFTLSSGKDIWQKLS

30

【0 3 9 3】

配列番号 2 9

【表 3 1】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKA FD
 GKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKA AIDTKD
 SQTNSQLFNYFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDK
 DKRGGIFDAVFTRGDQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSIS
 HVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGA
 QVLGLFTLSSGKDIWQKLS

40

【0 3 9 4】

配列番号 3 0

【表 3 2】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAF
DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKA AIDTK
DSQTNSQLFN YFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQD
KDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSI
SHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIG
AQLGLFTLSSGKDIWQKLS

10

【0 3 9 5】

配列番号 3 1

【表 3 3】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKA
FDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIINNQELFDLKA AIDTKDS
QTNSQLFN YFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKD
KRRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSI
SHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGA
QVLGLFTLSSGKDIWQKLS

20

【0 3 9 6】

配列番号 3 2

【表 3 4】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKA
FDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKA AIDTKD
SQTNSQLFN YFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDK
DKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSI
SHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGA
QVLGLFTLSSGKDIWQKLS

30

【0 3 9 7】

配列番号 3 3

【表 3 5】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKA
FDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIIRNQELFDLKA AIDTKDS
QTNSQLFN YFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKD
KRRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSI
SHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGA
QVLGLFTLSSGKDIWQKLS

40

【0 3 9 8】

配列番号 3 4

【表 3 6】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLANQGWDITKAFD
GKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKEAIRTKDS
QTNSQLFEYFRDKAFPYLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVCRPYQDKD
KRGGIFDAVFTRGNQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKEELTKGRALALSHTYANVSISH
VINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINKHGHVAISAKKIEGENIGAQ
VLGLFTLSSGKDIWQKLN

10

【0 3 9 9】

配列番号 3 5

【表 3 7】

SVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGDKNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNS
ARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTLL
TARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIY
VTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

20

【0 4 0 0】

配列番号 3 6

【表 3 8】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFD
GADNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKD
SQTNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDK
DKRGGIFDAVFTRGNQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSIS
HVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGA
QVLGLFTLSSGKDIWQKLS

30

【0 4 0 1】

配列番号 3 7

【表 3 9】

SVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGDKNLLCGAATAGNMLHW
WFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNS
ARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTLL
TARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIY
VTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

40

【0 4 0 2】

配列番号 3 8

【表 4 0】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKA
 GDKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKA
 AIDTKD SQTNSQLFNYFRDKAFPNL SARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQST
 DVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTE
 GRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDS DANASIGMKKYFV
 GINAHGHV AISAKKIEGENIGA QVLGLFTLSSGKDIWQKLS

10

【0 4 0 3】

配列番号 3 9

【表 4 1】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKA
 FDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFN GENMFDV
 KKAIDTKNHQLDSKLFNYFKEKAFPYLSAKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNH
 GPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTK
 GKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDS SDSNASIGMKKYFV
 GVNAHGHV AISAKKIEGENIGA QVLGLFTLSTGQDSWQKLS

20

【0 4 0 4】

配列番号 4 0

【表 4 2】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKA
 FDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGENMFDVKEAIR
 TKNHQLDSKLF EYFKEKAFPYLSAKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGP
 TPVKKGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKSEL
 TNGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDS SDSNASIGMKKYFV
 GVNKHGHV AISAKKIEGENIGA QVLGLFTLSTGQDSWQKLN

30

【0 4 0 5】

配列番号 4 1

【表 4 3】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKT
 FNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAID
 TKNHQLDSKLF EYFKEKAFPYLSKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGP
 TPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKQELTEG
 KALGLSHTYANVRINHVINLWGADFD AEGNLKAIYVTDS SDSNASIGMKKYFV
 GVNAAGKV AISAKKIEGENIGA QVLGLFTLSTGQDSWNQTS

40

【0 4 0 6】

配列番号 4 2

【表 4 4】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKT
 FNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVDVKEAIR
 TKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSK
 DPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRIN
 HVINLWGADFDAEGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNKAGKVAISAKKIEGENIGA
 QVLGLFTLSTGQDSWNQTN

【0 4 0 7】

配列番号 4 3

【表 4 5】

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYVANQGWDITKA
 GKDNLCCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEQMFVDVKAIDTK
 NHQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
 GGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIHKQELTKGKALGLSHTYANVSINHVIN
 LWGADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNAHGHVAISAKKIEGENIGAQVL
 GLFTLSTGQDSWQKLS

【0 4 0 8】

Streptococcus pyogenes 由来のエンドグリコシダーゼ EndoS
 49 のタンパク質配列は、米国特許第 9, 493, 752 号 (配列番号 44) に提示され
 ている :

【表 4 6】

MDKHLLVKRTLGCVCAATLMGAALATHHDSLNTVKAEKTVQTGKTDQVGAQLVQ
 EIREGKRGPLYAGYFRTWHDRASGTIDGKQHPENTMAEVPKEVDILFVFDHTASDSP
 FWSELKDSYVHKLHQGTALVQTIGVNELNGRTGLSKDYPDTPEGNKALAAAIKAFV
 TDRGVDGLDIDIEHEFTNKRTPEEDARALNVFKEIAQLIGKNGSDKSKLLIMDTLSVEN
 NPIFKGIAEDLDYLLRQYYGSQGGAEVDTINSQYQNYIDASQFMIGFSFFEESASK
 GNLWFDVNEYDPNPEKGDIEGTRAKKYAEWQPSTGGLKAGIFSVAIDRDGVAHVPS
 TYKNRTSTNLQRHEVDNISHTDYTVSRKLTLMTEDKRYDVIDQKDIPDPALREQIIQV
 GQYKGDRLERYNKTLVLTGDKIQNLKGLEKLSKLQKLELRQLSNVKEITPELLPESMKKD
 AELVMVGMTGLEKLNLSGLNRQTLGDIDVNSITHLTSFDISHNSLDLSEKSEDRKLLMTL
 MEQVSNHQKITVKNTAFENQKPKGYYPQTYDTKEGHYDVAEHDILTDFVFGTVTKR
 NTFIGDEEAFIYKEGAVDGRQYVSKDYTYEAFRKDYKGYKVHLTASNGETVTSKVT
 ATTDETYLVDSGGEKVVHMKLNIGSGAIMMENLAKGAKVIGTSGDFEQAKKIFDGE
 KSDRFFTGWQTNWIAFDLGEINLAKEWRLFNAETNTEIKTDSNLVAKGRLQILKDTTID
 LEKMDIKNRKEYLSNDENWTDVAQMDDAKAIKSNVLSRYWRFVCGGASSYYP
 QYTELQILGQRLSNDVANTLKD

【0 4 0 9】

S. pyogenes 由来の成熟エンドグリコシダーゼ S (EndoS) のタンパク質配
 列は、米国特許第 8, 889, 128 号および第 9, 707, 279 号に提示されている

。(配列番号45) :

【表47】

EEKTVQVQKGLPSIDSLHYLSENSKKEFKEELSKAGQESQKVKEILAKAQQADKQAQEL
 AKMKIPEKIPMKPLHGPLYGGYFRTWHDKTSDPTEKDKVNSMGELPKEVDLAFIFHDW
 TKDYSLFWKELATKHVPKLNKQGTRVIRTIPWRFLAGGDNNGIAEDTSKYPTPEGNKA
 LAKAIVDEYVYKYNLDGLDVDVEHDSIPKVDKEDTAGVERSIQVFEEIGKLIGPKGVD
 KSRLFIMDSTYMADKNPLIERGAPYINLLLQVYGSQGEKGGWEPVSNRPEKTMEERW
 QGYSKYIRPEQYMIGFSFYEENAQEGNLWYDINSRKDEDKANGINTDITGTRAERYARW
 QPKTGGVKGGIFSVAIDRDGVAHQPKKYAKQKEFKDATDNIFHSDYSVSKALKTVMLK
 DKSVDLIDEKDFDPKALREAVMAQVGTTRKGDLEFRNGTLRLDNPAIQSLEGLNKFKKL
 AQLDLIGLSRITKLDERSVLPANMKPGKDTLETVLETYKKDNKEEPATIPPVSLKVSGLTG
 LKELDLSGFDRETLAAGLDAATLTSLEKVDISGNKLDLAPGTENRQIFDTMLSTISNHVGS
 NEQTVKFDKQKPTGHYPDTYGKTSRLRPVANEKVDLQSQLLFGTVTNQGTLINEADY
 KAYQNHKIAGRSFVDSNYHYNNFKVSYENYTVKVTDSTLGTITTDKTLATDKEETYKVD
 FFSPADKTKAVHTAKVIVGDEKTMVMVLAEGATVIGGSADPVNARKVFDGQLGSETDN
 ISLGWDSKQSIIFKLIKEDGLIKHWRFFNDSARNPETTNKPIQEASLQIFNIKDYNLNLE
 NPNKFDDEKYWITVDTYSAQGERATAFSNTLNNITSKYWRVVFDTKGDRYSSPVPEL
 QILGYPLPNADTIMKTVTTAKELSQQKDKFSQKMLDELKIKEMALETSLNSKIFDVTAIN
 ANAGVLKDCIEKRQLLKK

10

20

【0410】

Streptococcus pyogenes (GenBankアクセッション番号AK00850.1)からのエンドグリコシダーゼEndoSの分泌シグナルを含む完全な配列。(配列番号46) :

【表 4 8】

MDKHLLVKRTLGCVCAATLMGAALATHHDSLNTVKAEKTVQVQKGLPSIDSLHYLSE
 NSKKEFKEELSKAGQESQKVKEILAKAQQADKQAQELAKMKIPEKIPMKPLHGPLYGG
 YFRTWHDKTSDPTEKDKVNSMGELPKEVDLAFIFHDWTKDYSLFWKELATKHVPKLN
 KQGTRVIRTIPWRFLAGGDNNGIAEDTSKYPNTPEGNKALAKAIVDEYVYKYNLDGLDV
 DVEHDSIPKVDKEDTAGVERSIQVFEEIGKLGPKGVDKSRLFIMDSTYMADKNPLIER
 GAPYINLLLQVYGSQGEKGGWEPVSNRPEKTMEERWQGYSKYIRPEQYMIGFSFYEE
 NAQEGNLWYDINSRKDEDKANGINTDITGTRAERYARWPKTGGVKGGIFSYAIDRDG
 VAHQPKKYAKQKEFKDATDNIFHSDYSVSKALKTVMLKDKSYDLIDEKDFPKALREA
 VMAQVGTRKGDLEFRNGTLRLDNPAIQSLEGLNKFKKLAQLDLIGLSRITKLDRSVLPA
 NMKPGKDTLETVLETYKKNKEEPATIPPVSLKVSGLTGLKELDLSGFDRETLAGLDAA
 TLTSLEKVDISGNKLDLAPGTENRQIFDTMLSTISNHVGSNEQTVKFDKQKPTGHYPDTY
 GKTSRLRPVANEKVDLQSLLFGTVTNQGTLINEADYKAYQNHKIAGRSFVDSNYHY
 NNFKVSYENYTVKVTDSLGTITDKTLATDKEETYKVDFFPADKTKAVHTAKVIVGD
 EKTMMVNLAEGATVIGGSADPVNARKVFDGQLGSETDNISLGWDSKQSIIFKLKEDGLI
 KHWRFFNDSARNPETTNKPIQEASLQIFNIKDYNLNLENPNKFDDEKYWITVDTYSA
 QGERATAFSNTLNNITSKYWRVVFDTKGDYSSPVPELQILGYPLPNADTIMKTVTTA
 KELSQQKDKFSQKMLDELKIKEMALETSLNSKIFDVTAINANAGVLKDCIEKRQLLKK

10

20

【0411】

シグナル配列を含む、*Streptococcus pyogenes* AP1 から単離された EndoS のタンパク質配列は、米国特許第 8,889,128 号および第 9,707,279 号に記載されている。(配列番号 47) :

【表 4 9】

MDKHLLVKRTLGCVCAATLMGAALATHHDSLNTVKAEEKTVQVQKGLPSIDSLHYLSE
 NSKKEFKEELSKAGQESQKVKEILAKAQQADKQAQELAKMKIPEKIPMKPLHGPLYGG
 YFRTWHDKTSDPTEKDKVNSMGELPKEVDLAFIFHDWTKDYSLFWKELATKHVPKLN
 KQGTRVIRTIPWRFLAGGDNNGIAEDTSKYPNTPEGNKALAKAIVDEYVYKYNLDGLDV
 DVEHDSIPKVDKEDTAGVERSIQVFEEIGKLIGPKGVDKSRLFIMDSTYMADKNPLIER
 GAPYINLLLQVYGSQGEKGGWEPVSNRPEKTMEERWQGYSKYIRPEQYMIGFSFYEE
 NAQEGNLWYDINSRKDEDKANGINTDITGTRAERYARWQPKTGGVKGGIFSAYAIDRDG
 VAHQPKKYAKQKEFKDATDNIFHSDYSVSKALKTVMLKDKSYDLIDEKDFPKALREA
 VMAQVGTRKGDLEFRNGTLRLDNPAIQSLEGLNKFKKLAQLDLIGLSRITKLDKRSVLP
 NMKPGKDTLETVLETYKKNKEEPATIPPVSLKVSGLTGLKELDLSGFDRETLAGLDA
 TLTSLEKVDISGNKLDLAPGTENRQIFDTMLSTISNHVGSNEQTVKFDKQKPTGHYPDTY
 GKTSRLRPVANEKVDLQSQLLFGTVTNQGTLINEADYKAYQNHKIAGRSFVDSNYHY
 NNFKVSYENYTVKVTDSLGTITDKTLATDKEETYKVDFFSPADKTKAVHTAKVIVGD
 EKTMMVNLAEGATVIGGSADPVNARKVFDGQLGSETDNISLGWDSKQSIIFKLKEDGLI
 KHWRFFNDSARNPETTNKPIQEASLQIFNIKDYNDNLENPNKFDDEKYWITVDTYSA
 QGERATAFSNTLNNITSKYWRVVFDTKGDYSSPVPELQILGYPLPNADTIMKTVTTA
 KELSQQKDKFSQKMLDELKIKEMALETSLNSKIFDVTAINANAGVLKDCIEKRQLLKK

10

20

【0 4 1 2】

N 末端メチオニンが添加された I d e S の成熟配列（配列番号 4 8）：

【表 5 0】

MDSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTF
 NGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDT
 KNHQLDLKLFEYFKEKAFPYLSKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKD
 PRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINH
 VINLWGADFDSDNGNLKAIYVTSDSDNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQ
 VLGLFTLSTGQDSWNQTN

30

【0 4 1 3】

配列番号 4 9 ~ 5 1 は、本明細書に開示されるプロテアーゼまたはグリコシダーゼのい
 ずれかの N 末端で融合することができるシグナル配列のアミノ酸配列である。

【0 4 1 4】

配列番号 4 9

40

【表 5 1】

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIA

【0 4 1 5】

配列番号 5 0

【表 5 2】

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFALSVDKGVIA

【0 4 1 6】

配列番号 5 1

50

【表 5 3】

MRKRCYSTSAVVLAAVTLFALSVDRGVIA

【0 4 1 7】

成熟 I d e S、配列番号 4 をコードするポリヌクレオチド配列（配列番号 5 2）：

【表 5 4】

gat agt ttt tct gct aat caa gag att aga tat tcg gaa gta aca cct tat cac gtt act tcc gtt tgg acc aaa gga gtt
 act cct cca gca aac ttc act caa ggt gaa gat gtt ttt cac gct cct tat gtt gct aac caa gga tgg tat gat att acc
 aaa aca ttc aat gga aaa gac gat ctt ctt tgc ggg gct gcc aca gca ggg aat atg ctt cac tgg tgg ttc gat caa
 aac aaa gac caa att aaa cgt tat ttg gaa gag cat cca gaa aag caa aaa ata aac ttc aat ggc gaa cag atg ttt
 gac gta aaa gaa gct atc gac act aaa aac cac cag cta gat agt aaa tta ttt gaa tat ttt aaa gaa aaa gct ttc
 cct tat cta tct act aaa cac cta gga gtt ttc cct gat cat gta att gat atg ttc att aac ggc tac cgc ctt agt cta
 act aac cac ggt cca acg cca gta aaa gaa ggt agt aaa gat ccc cga ggt ggt att ttt gac gcc gta ttt aca aga
 ggt gat caa agt aag cta ttg aca agt cgt cat gat ttt aaa gaa aaa aat ctc aaa gaa atc agt gat ctc att aag
 aaa gag tta acc gaa ggc aag gct cta ggc cta tca cac acc tac gct aac gta cgc atc aac cat gtt ata aac ctg
 tgg gga gct gac ttt gat tct aac ggg aac ctt aaa gct att tat gta aca gac tct gat agt aat gca tct att ggt atg
 aag aaa tac ttt gtt ggt gtt aat tcc gct gga aaa gta gct att tct gct aaa gaa ata aaa gaa gat aat att ggt gct
 caa gta cta ggg tta ttt aca ctt tca aca ggg caa gat agt tgg aat cag acc aat taa

10

20

【0 4 1 8】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、適切な方法および材料が本明細書に記載されている。

【0 4 1 9】

本明細書で引用されるすべての特許、特許出願、刊行物および他の参考文献、GenBank 引用および ATCC 引用は、それらの全体が参照により組み込まれる。競合する場合は、定義を含む仕様が優先される。

30

【0 4 2 0】

本明細書に開示されるすべての特徴は、任意の組み合わせで組み合わせることができる。本明細書に開示されている各機能は、同じ、同等の、または同様の目的を果たす代替機能に置き換えることができる。したがって、特に明記しない限り、開示された特徴は、同等または類似の特徴の属の例である。

【0 4 2 1】

本明細書で使用される場合、単数形の「a」、「および」、「および the」は、文脈が他に明確に示さない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「核酸」への言及は、複数のそのような核酸を含み、「ベクター」への言及は、複数のそのようなベクターを含み、「ウイルス」または「粒子」への言及は、複数のそのようなウイルス/粒子を含む。

40

【0 4 2 2】

本明細書で使用される「約」という用語は、基礎となるパラメータの 10% 以内の値（すなわち、プラスマイナス 10%）を指す。たとえば、「約 1 : 10」は 1 . 1 : 10 . 1 または 0 . 9 : 9 . 9 を意味し、約 5 時間は 4 . 5 時間または 5 . 5 時間などを意味する。値の文字列の先頭にある「約」という用語は、各値を 10% 変更する。

【0 4 2 3】

すべての数値または数値範囲は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、そのような範囲内の整数および値の分数または範囲内の整数を含む。したがって、説明のために、9

50

5%以上の削減への言及は、95%、96%、97%、98%、99%、100%など、ならびに95.1%、95.2%、95.3%、95.4%、95.5%など、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%などを含む。したがって、説明するために、「1~4」などの数値範囲への言及は、2、3、ならびに1.1、1.2、1.3、1.4などを含む。たとえば、「1~4週間」には、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27日または28日を含む。

【0424】

さらに、「0.01から10」などの数値範囲への言及は、0.011、0.012、0.013など、ならびに9.5、9.6、9.7、9.8、9.9などを含む。例えば、対象の約「0.01mg/kgから約10mg/kg」体重の投薬量は、0.011mg/kg、0.012mg/kg、0.013mg/kg、0.014mg/kg、0.015mg/kgなど、ならびに9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kgなどを含む。

10

【0425】

より大きい(より大きい)またはより小さい整数への参照は、それぞれ、参照数より大きいまたはより小さい任意の数を含む。したがって、例えば、2つを超える参照には、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15などが含まれる。例えば、組換えウイルスベクター、プロテアーゼおよび/またはグリコシダーゼの「2回以上」の投与には、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上の回数が含まれる。

20

【0426】

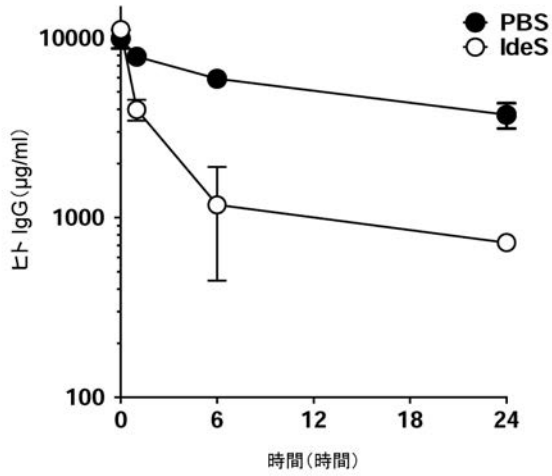
さらに、「1から90」などの数値範囲への言及は、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5など、ならびに81、82、83、84、85などを含む。たとえば、「約1分から約90日の間」には、1.1分、1.2分、1.3分、1.4分、1.5分などのほか、1日、2日、3日、4日、5日・・・81日、82日、83日、84日、85日などが含まれる。

【0427】

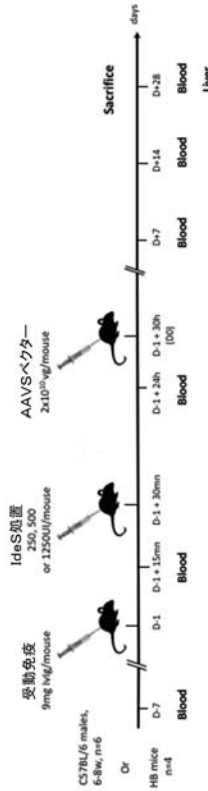
本発明は、一般に、本発明の多数の実施態様を説明するために肯定的な言葉を使用して本明細書に開示される。本発明はまた、物質または材料、方法のステップおよび条件、プロトコール、または手順など、特定の主題が完全にまたは部分的に除外される実施態様も具体的に含む。例えば、本発明の特定の実施態様では、材料および/または方法のステップは除外される。したがって、本発明は、本発明が含まないものに関して本明細書で一般に表現されていないが、それにもかかわらず、本発明で明示的に除外されない態様は、本明細書で開示される。

30

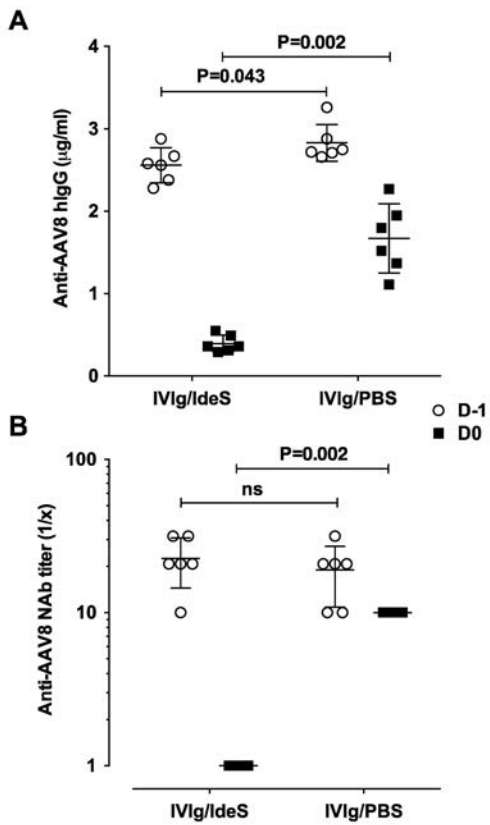
【 図 1 】



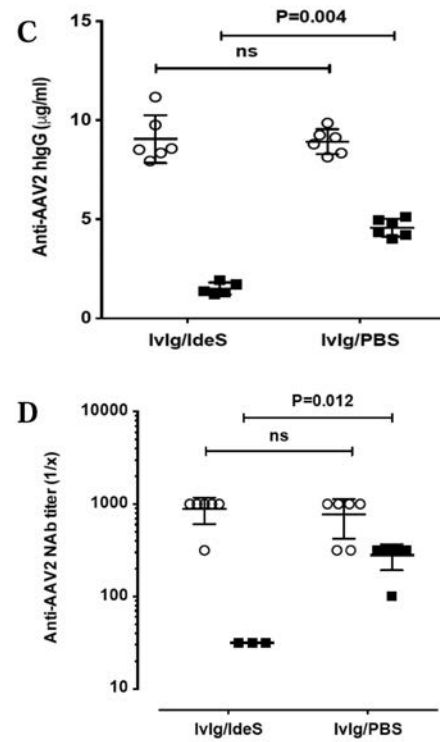
【 図 2 】



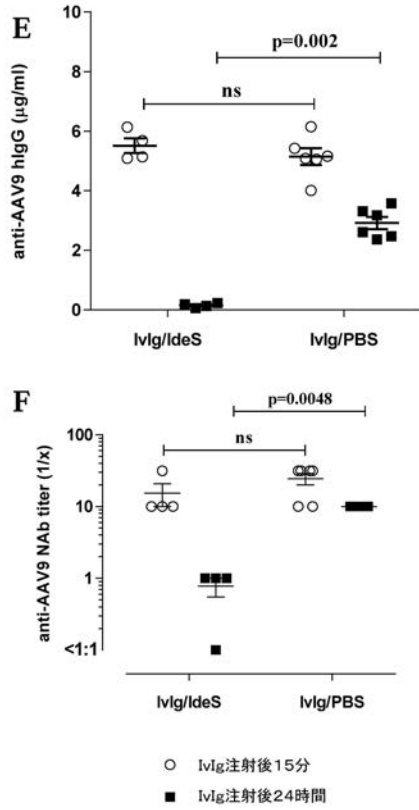
【 図 3 A - B 】



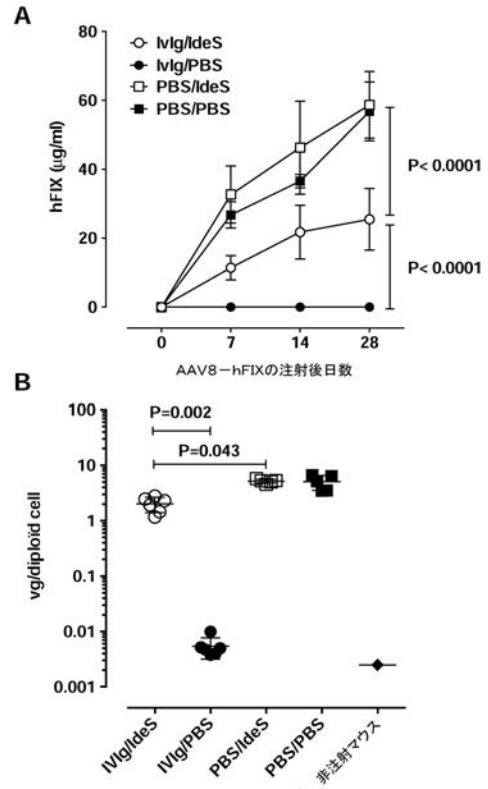
【 図 3 C - D 】



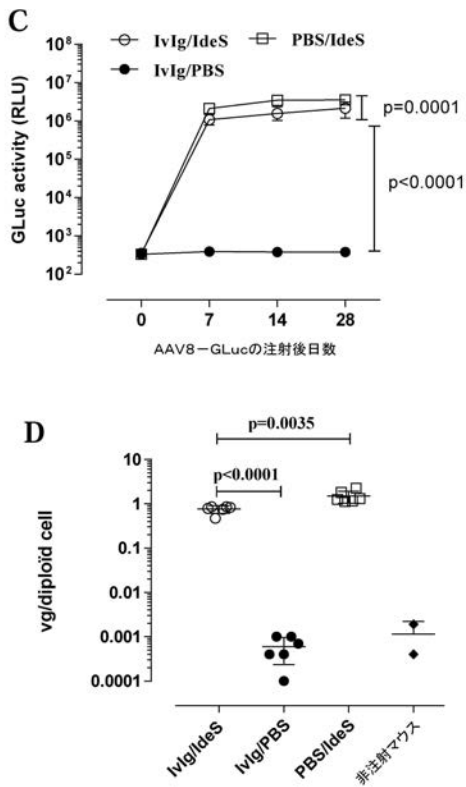
【 図 3 E - F 】



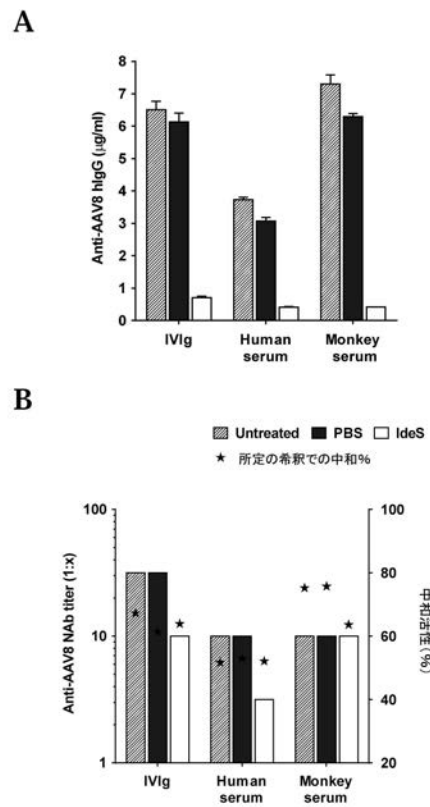
【 図 4 A - B 】



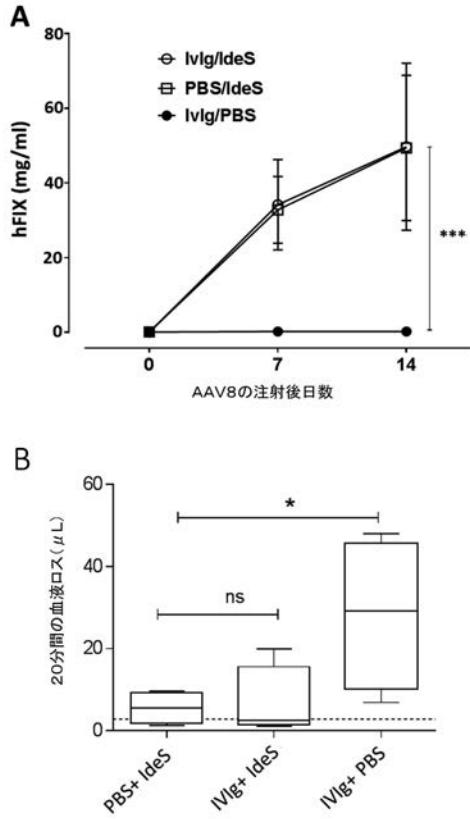
【 図 4 C - D 】



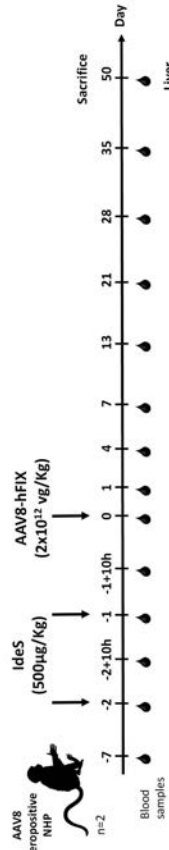
【 図 5 A - B 】



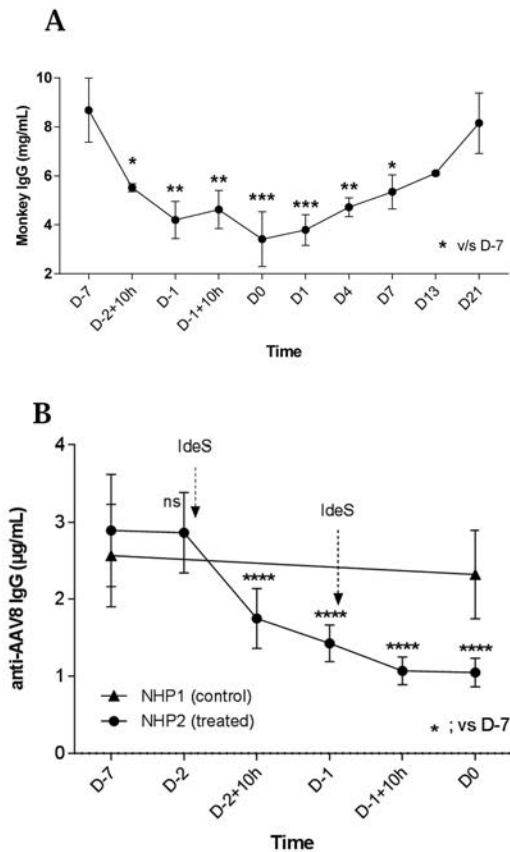
【 図 6 A - B 】



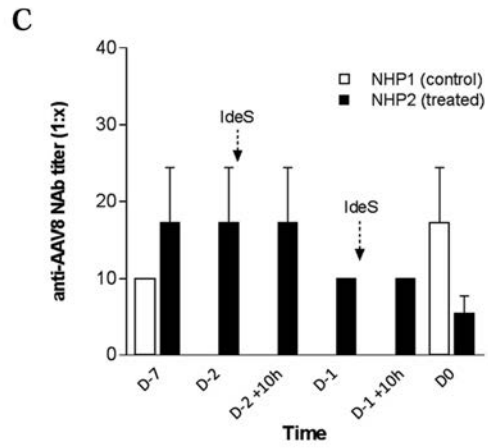
【 図 7 】



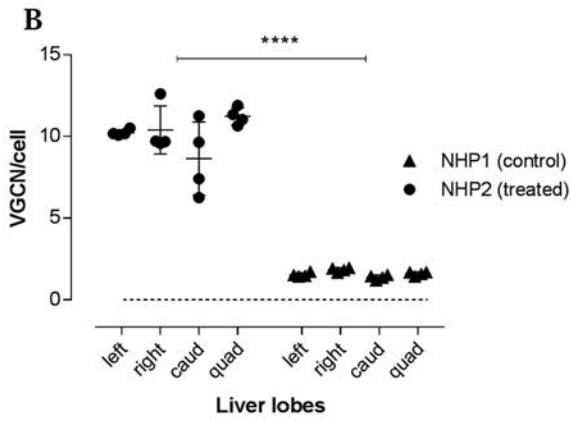
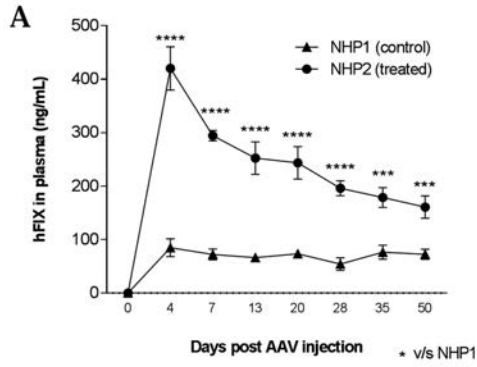
【 図 8 A - B 】



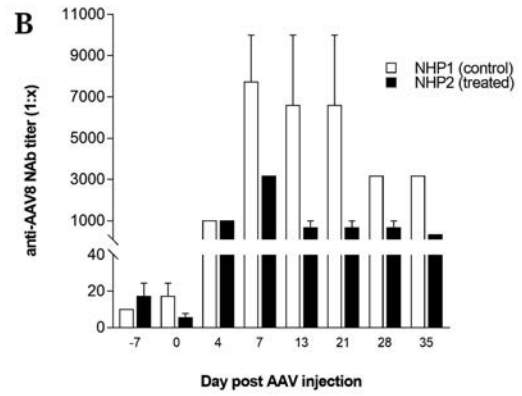
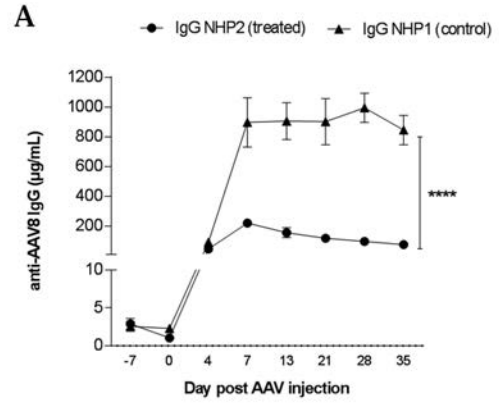
【 図 8 C 】



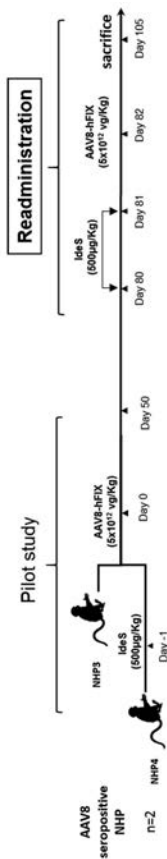
【 9 A - B 】



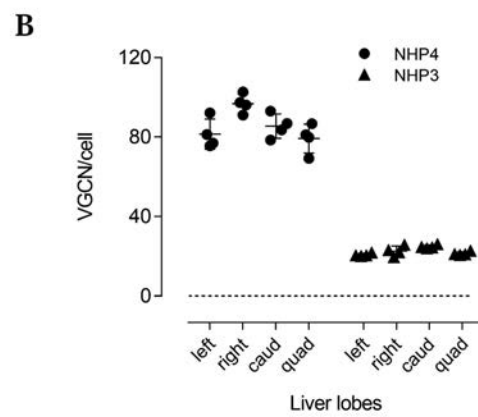
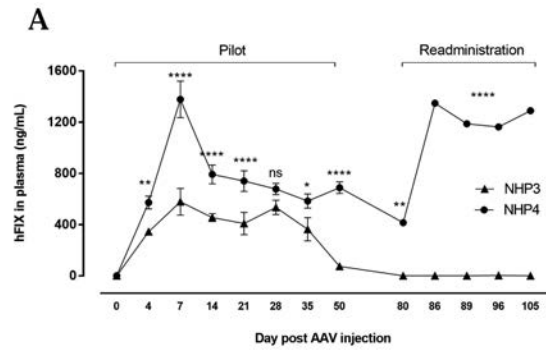
【 10 A - B 】



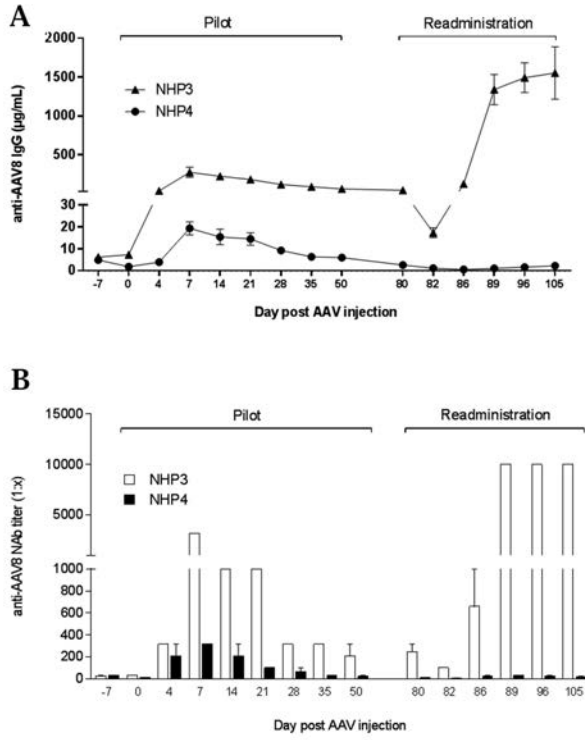
【 11 】



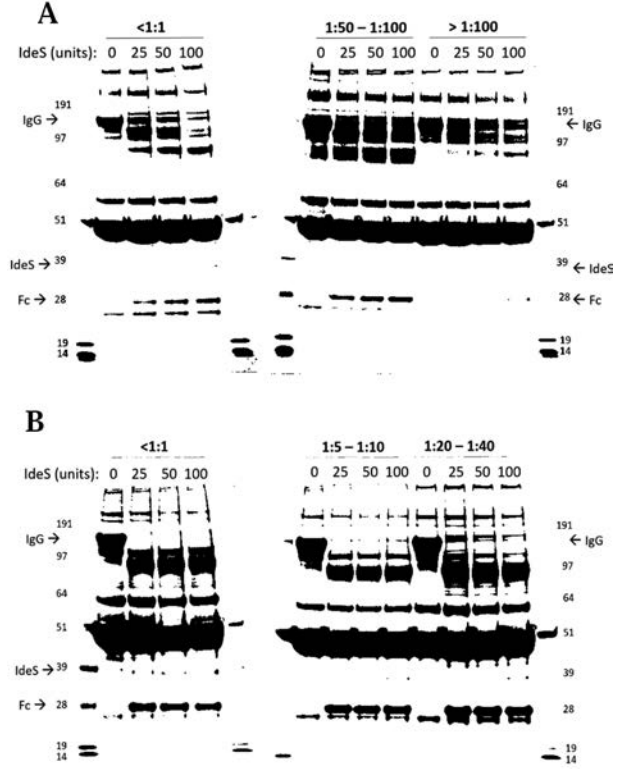
【 12 A - B 】



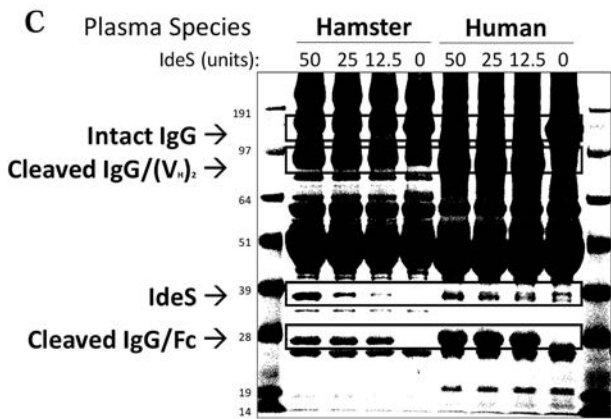
【 図 1 3 A - B 】



【 図 1 4 A - B 】



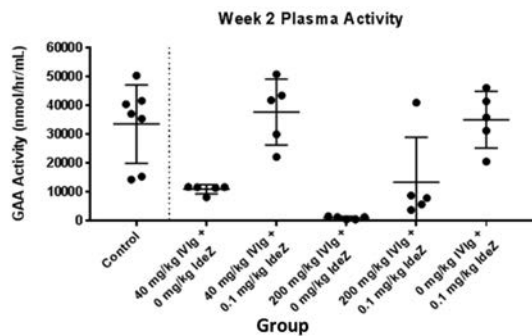
【 図 1 4 C 】



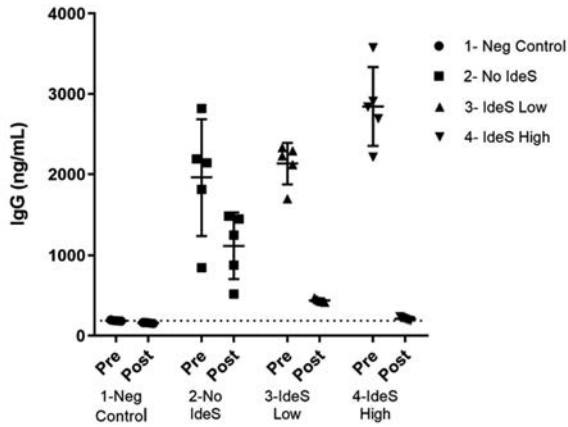
【 図 1 6 】

| | Pre-IdeS | Post-IdeS |
|-----------------------|-----------|-------------|
| 1- Neg Control | <1:1 | <1:1 |
| 0 mg/kg IVIg | <1:1 | Animal died |
| + | <1:1 | <1:1 |
| 0 mg/kg IdeS | <1:1 | <1:1 |
| 2- No IdeS | 1:10-1:20 | 1:20-1:40 |
| 300 mg/kg IVIg + | 1:2.5-1:5 | 1:5-1:10 |
| 0 mg/kg IdeS | 1:10-1:20 | 1:20-1:40 |
| | 1:20-1:40 | 1:10-1:20 |
| 3- IdeS Low | 1:10-1:20 | 1:2.5-1:5 |
| 300 mg/kg IVIg + | 1:10-1:20 | 1:1-1:2.5 |
| 0.4 mg/kg IdeS | 1:10-1:20 | 1:2.5-1:5 |
| | 1:10-1:20 | 1:1-1:2.5 |
| 4- Ides High | 1:20-1:40 | <1:1 |
| 300 mg/kg IVIg + | 1:20-1:40 | <1:1 |
| 4 mg/kg IdeS | 1:20-1:40 | 1:1-1:2.5 |
| | 1:40 | <1:1 |

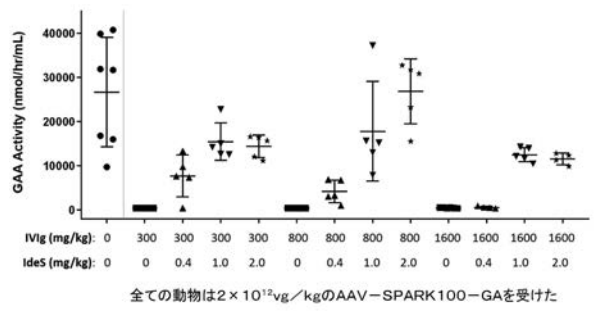
【 図 1 5 】



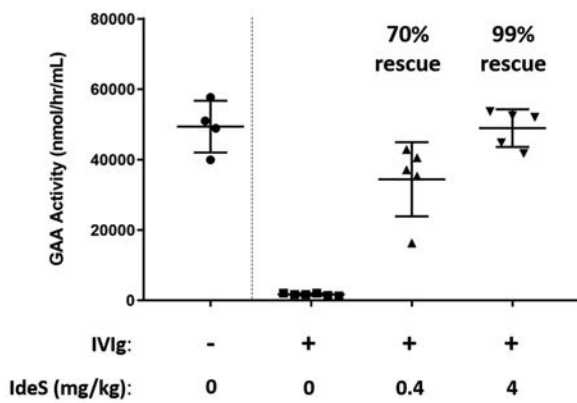
【 図 1 7 】



【 図 1 9 】



【 図 1 8 】

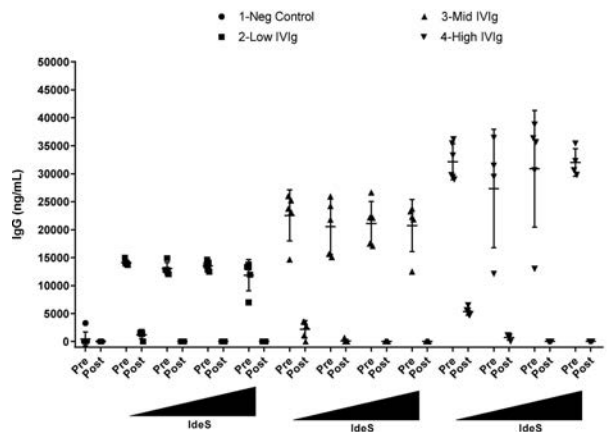


【 図 2 0 】

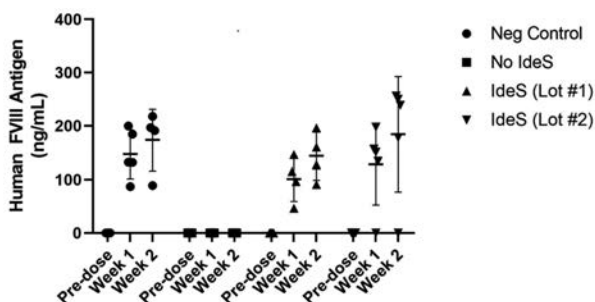
| | Pre-IdeS | Post-IdeS |
|------------------|------------|-----------|
| | < 1:2.5 | < 1:2.5 |
| Neg Control | < 1:1 | < 1:1 |
| 0 mg/kg IVIg + | < 1:1 | < 1:1 |
| 0 mg/kg IdeS | < 1:1 | < 1:1 |
| | < 1:1 | < 1:1 |
| No IdeS | 1:40-1:80 | 1:20-1:40 |
| 300 mg/kg IVIg + | 1:40-1:80 | 1:20-1:40 |
| 0 mg/kg IdeS | 1:20-1:40 | 1:20-1:40 |
| | 1:40-1:80 | 1:40-1:80 |
| IdeS (Lot #1) | 1:80-1:160 | 1:1-1:2.5 |
| 300mg/kg IVIg + | 1:40-1:80 | < 1:1 |
| 1 mg/kg IdeS | 1:80-1:160 | n.d. |
| | 1:80-1:160 | < 1:2.5 |
| IdeS (Lot #2) | 1:40-1:80 | 1:1-1:2.5 |
| 300mg/kg IVIg + | 1:20-1:40 | < 1:1 |
| 1 mg/kg IdeS | > 1:160 | < 1:1 |
| | 1:40-1:80 | 1:20-1:40 |
| | 1:40-1:80 | 1:1-1:2.5 |

n.d. - no data

【 図 2 2 】



【 図 2 1 】



【配列表】

2021529821000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2019/069280 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/48 ADD. A61K39/12 C12N9/64 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
|---|---|--|
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2016/128559 A1 (HANSA MEDICAL AB [SE]) 18 August 2016 (2016-08-18) page 6, line 2 sequence 2 page 71 page 5, line 30 - line 33 ----- -/-- | 1-77 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 4 December 2019 | | 13/12/2019 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Wagner, René |

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/069280

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | <p>Kyoko Tomita: "Correlation between Adenovirus-neutralizing Antibody Titer and Adenovirus Vector-mediated Transduction Efficiency Following Intratumoral Injection", Anticancer Research, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 1145-1152, XP055527280, Retrieved from the Internet: URL:http://ar.iiarjournals.org/content/32/4/1145.full.pdf#page=1&view=FiH [retrieved on 2018-11-27] title</p> | 1-71 |
| A | <p>RAHMAN A ET AL: "Specific depletion of human anti-adenovirus antibodies facilitates transduction in an in vivo model for systemic gene therapy", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, ACADEMIC PRESS ; NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 3, no. 5, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 768-778, XP002977532, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1006/MTHE.2001.0316 the whole document</p> | 1-71 |
| A | <p>JULIE R DELLINGER: "A Bacterial IgG-Degrading Enzyme to Unhinge Antibodies", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, - NEJM -, vol. 377, no. 5, 3 August 2017 (2017-08-03), pages 487-489, XP055527722, US ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMe1706903 the whole document</p> | 1-71 |
| A | <p>WO 2018/093868 A1 (UNIV FLORIDA [US]) 24 May 2018 (2018-05-24) cited in the application the whole document</p> | 1-71 |
| A | <p>P Colella ET AL: "Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy.", Mol Ther Methods Clin Dev., 1 December 2017 (2017-12-01), pages 87-104, XP055509603, DOI: 10.1016/j.omtm.2017.11.007 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5758940/pdf/main.pdf [retrieved on 2018-09-25] the whole document</p> | 1-77 |

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/069280

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2016128559 A1 | 18-08-2016 | AU 2016217801 A1 | 10-08-2017 |
| | | BR 112017017286 A2 | 17-04-2018 |
| | | CA 2976016 A1 | 18-08-2016 |
| | | CL 2017002066 A1 | 02-02-2018 |
| | | CN 107532158 A | 02-01-2018 |
| | | CO 2017009060 A2 | 16-01-2018 |
| | | EA 201791775 A1 | 28-02-2018 |
| | | EP 3256579 A1 | 20-12-2017 |
| | | JP 2018510622 A | 19-04-2018 |
| | | KR 20170110153 A | 10-10-2017 |
| | | SG 11201706349Y A | 28-09-2017 |
| | | US 2018037962 A1 | 08-02-2018 |
| | | WO 2016128559 A1 | 18-08-2016 |
| WO 2018093868 A1 | 24-05-2018 | US 2019262434 A1 | 29-08-2019 |
| | | WO 2018093868 A1 | 24-05-2018 |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | |
| A 6 1 K 35/76 (2015.01) | A 6 1 K 35/76 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| A 6 1 K 38/48 (2006.01) | A 6 1 K 38/48 | |
| A 6 1 K 38/47 (2006.01) | A 6 1 K 38/47 | |
| A 6 1 P 7/04 (2006.01) | A 6 1 P 7/04 | |
| A 6 1 P 7/06 (2006.01) | A 6 1 P 7/06 | |
| C 1 2 N 9/24 (2006.01) | C 1 2 N 9/24 | Z N A |
| C 1 2 N 15/864 (2006.01) | C 1 2 N 15/864 | 1 0 0 Z |
| C 1 2 N 15/861 (2006.01) | C 1 2 N 15/861 | Z |
| C 1 2 N 15/867 (2006.01) | C 1 2 N 15/867 | Z |

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (71) 出願人 520053762
ユニヴェルシテ ドゥ パリ
UNIVERSITE DE PARIS
フランス共和国, 7 5 0 0 6 パリ, ブールバール サン-ジェルマン 8 5
- (71) 出願人 518138077
スパーク セラピューティクス インコーポレイテッド
SPARK THERAPEUTICS, INC.
アメリカ合衆国, ペンシルベニア州, フィラデルフィア, スイート 1 3 0 0, マーケット
ストリート 3 7 3 7
- (74) 代理人 110001508
特許業務法人 津国
- (72) 発明者 ラクロワ - デスマゼス, セバスチャン
フランス国, 7 5 0 0 6 パリ, リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥシーヌ 1 5、サントル・
ドゥ・ルシェルシュ・デ・コルドリエ、アンセルム・ユエムエール・1 1 3 8
- (72) 発明者 ミンゴッツィ, フェデリコ
アメリカ合衆国、ペンシルベニア 1 9 1 1 8、フィラデルフィア、セント・アンドリュース・ロ
ード 6 0 4
- (72) 発明者 ディミトロフ, ヨルダン
フランス国、7 5 0 0 6 パリ、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥシーヌ 1 5、アンセルム
・ユ 1 1 3 8
- (72) 発明者 レボルニュ, クリスティアン
フランス国、9 1 0 0 0 エヴリー、リュ・ドゥ・ランテルナシオナル 1・ビス、イエムエフ(イ
ミュノロジー・エ・マラディ・デュ・フォワ)
- (72) 発明者 アーマー, ショーン

アメリカ合衆国、ペンシルベニア 1 8 9 6 6、ホーランド、スループレッド・ドライブ 1 6

F ターム(参考) 4B050 CC03 CC07 DD02 KK20 LL01

4C084 AA02 AA13 BA44 CA04 DC02 DC22 NA05 ZA511 ZA512 ZA531

ZA532 ZA551 ZA552 ZC021 ZC022

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 NA05 ZA51 ZA53 ZA55 ZC02

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 ZA51 ZA53 ZA55 ZC02