

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7165357号

(P7165357)

(45)発行日 令和4年11月4日(2022.11.4)

(24)登録日 令和4年10月26日(2022.10.26)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/53 (2006.01)

C 1 2 N 15/53 Z N A

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 35/761 (2015.01)

A 6 1 K 35/761

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 12 (全17頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-504068(P2019-504068)

(86)(22)出願日 平成29年7月26日(2017.7.26)

(65)公表番号 特表2019-521692(P2019-521692
A)

(43)公表日 令和1年8月8日(2019.8.8)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/043999

(87)国際公開番号 WO2018/022783

(87)国際公開日 平成30年2月1日(2018.2.1)

審査請求日 令和2年7月21日(2020.7.21)

(31)優先権主張番号 62/367,012

(32)優先日 平成28年7月26日(2016.7.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 508298488

コーネル ユニヴァーシティ
アメリカ合衆国ニューヨーク州1485
0, イサカ, パイン ツリー ロード
395, スイート 310, センター
フォー テクノロジー ライセンシング,
アット コーネル ユニヴァーシティ

(73)特許権者 516279086

アドヴェラム バイオテクノロジーズ,
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
63, レッドウッド シティ, サジナウ
ドライブ 800

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症の治療のための遺伝子治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結したニワトリ
ベータアクチンプロモーターを含む、アカゲザル・アデノ随伴ウイルス(AAV)ベク
ターであって、前記AAVベクターがAAV血清型rh.10ベクターであり、前記ベク
ターが、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼ配列をコードする核酸配列に作動可能に連結され
たミトコンドリア局在配列をコードする核酸配列を更に含む、ベクター。

【請求項2】

前記ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼがヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼ2(ALDH
2)である、請求項1に記載のベクター。

【請求項3】

前記ベクターが、配列番号1をコードする、請求項1に記載のベクター。

【請求項4】

前記ベクターが、配列番号3をコードする、請求項1に記載のベクター。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか一項に記載のベクター及び医薬的に許容される担体を含む組成
物。

【請求項6】

請求項1～4のいずれか一項に記載のベクター、又は請求項5に記載の組成物を含む、
哺乳動物におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症の治療のための、又は哺乳動物にお

けるアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症によって特徴付けられる疾患若しくはその任意の症状の治療若しくは予防のための、組成物。

【請求項 7】

前記哺乳動物が (i) ~ (i i i) :

(i) ヒトである、

(i i) ALDH2 * 2 アレルに関してヘテロ接合性又はホモ接合性である、

(i i i) エタノール毒性、上部呼吸器 / 消化管のがん、骨粗鬆症、扁平上皮がん、ファンconi貧血、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳卒中、高血圧、心不整脈及び心筋梗塞からなる群から選択される、アルデヒドデヒドロゲナーゼの欠損症によって特徴付けられる疾患を患っている

の 1 以上である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物が、約 30 日以内に 1 回以下で哺乳動物に投与される、請求項 6 又は 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記組成物が、口腔内、筋肉内、経皮、静脈内、動脈内、皮下、皮内又は腹腔内投与により投与される、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記組成物が、哺乳動物における ALDH2 タンパク質の残基 487 がグルタミン酸でない哺乳動物に投与される、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記組成物が、残基 487 のアミノ酸がリジンである哺乳動物に投与される、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

哺乳動物におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症を治療するための医薬、又は哺乳動物におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症によって特徴付けられる疾患若しくはその任意の症状を治療若しくは予防するための医薬を調製するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のベクター又は請求項 5 に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2016年7月26日に出願された米国仮特許出願番号第62/367,012号（参照により本明細書に取り込まれる）についての利益を主張する。

【0002】

電子的に提出された資料の参照による取り込み

本明細書と同時に提出され、以下の通り識別される、コンピューターで読み取り可能なヌクレオチド / アミノ酸の配列表は、参照により、その全体が本明細書に取り込まれる：2016年7月26日付作成の「725826_ST25.TXT」という名前の13,873バイトのASCII（テキスト）ファイル1件。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) は、内在的及び外来の両方のソースのアルデヒドの代謝において重要な役割を果たす、酵素のスーパーファミリーに属する。生理学的及び毒物学的な機能を有する、19個の機能的なALDH遺伝子が、ヒトゲノムにおいて同定されている (Edenberg HJ, Alcohol Res Health 2007, 30(1): 5-13; Steinmetz CGら、Structure 1997, 15: 5(5):701-11)。アセトアルデヒドを酸化する重要な酵素である、アルデヒドデヒドロゲナーゼ2 (ALDH2) は、アルコール代謝のために重要である。広範囲の民族グループの間で、ヒトALDH2の遺伝子多型が良く研究されている (Eriksson

10

20

30

40

50

n CJ, Alcohol Clin Exp Res 2001, 15S-32S ; Yoshidaら、Proc. Natl. Acad. Sci 1984, 81(1) : 258-261)。最も現実問題となるALDH2変異体はALDH2*2アレルであり、東アジア人の約35～45%において見出される (Yoshidaら、Proc. Natl. Acad. Sci 1984, 81(1) : 258-261 ; Li Hら、Ann Hum Genet 2009, 73 : 335-345)。世界人口のうち約5億6千万人 (8%) は、この変異を有しており、それによりALDH2*2は、他の良く知られているヒトの酵素病やヘモグロビン異常を上回って、最もありふれたヒト酵素欠損症となっている (Brooks PJら、PLoS Med 2009, 6(3) : e50 ; Chen CHら、Physiol Rev 2014, 94(1):1-34)。様々な研究によって、ALDH2機能障害が、気道消化器がん、心血管疾患、糖尿病及び神経変性疾患を含む複数のヒトの疾患と結びつけられている (Mandel Sら、Ann NY Acad Sci 2005, 1053 : 356-375 ; Kamino Kら、Biochem. Biophys. Res. Commun 2000, 273:192-96 ; Wang Bら、J. Neurol. Sci 2008, 268:172-75 ; Murata Cら、Alcohol. Clin. Exp Res 2000, 24:5S-11S ; Xu Fら、Hypertens. Res 2010, 33:49-55 ; Yokoyama Aら、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev 1996, 5:99-102 ; Oze Iら、Jpn. J. Clin. Oncol 2011, 41:677-92 ; Takagi Sら、Hypertens. Res 2002, 25:677-81 ; Jo SAら、Clin. Chim. Acta 2007, 382:43-47 ; Xu Fら、J. Cell. Mol. Med 2011, 15:1955-62 ; Takeuchi Fら、Eur. J. Hum. Genet 2012, 20:333-40 ; Wang Qら、DNA Cell Biol 2013, 32:393-99 ; Asakage Tら、Carcinogenesis 2007, 28 : 865-874 ; Ding JH,ら、World J Gastroenterol 2009, 15 : 2395-2400 ; Cui Rら、Gastroenterology 2009, 137:1768-75 ; Li Yら、J Clin Invest 2006, 116 : 506-511 ; Chen Zら、Proc Natl Acad Sci 2005, 102 : 12159-12164 ; Mackenzie ISら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol 2005, 25:1891-95 ; Kato Nら、Nat Genet 2011, 43 : 531-538 ; Chen CHら、Cardiovasc Res 2010, 88(1):51-7)。

【0004】

東アジア人集団において頻繁に観察される、アルコール飲料の摂取後の顔面の紅潮、頭痛、吐き気、めまい及び動悸により特徴付けられるアルコールフラッシング症候群は、ALDH2活性が低下した結果として現れる、アセトアルデヒドの蓄積により引き起こされる (Erikssonら、Clin. Exp. Res., 2001 15S-32S)。ALDH2*2の個体における、このエタノール誘発性の症候群は、ALDH2遺伝子のエキソン12におけるGからAへの点突然変異により引き起こされる。この変異によって、ヒトALDH2タンパク質中の487位のグルタミン酸がリジンへと置換される (E487K) (Yoshidaら、Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81(1) : 258-261)。ALDH2遺伝子において共通するE478K (グルタミン酸からリジンへ) の遺伝子多型によって、そのアセトアルデヒド代謝能力における実質的な低下が起こり得る (Yoshidaら、Proc. Natl. Acad. Sci 1984, 81(1) : 258-261 ; Baan Rら、Lancet Oncol. 2007, 8(4) : 292-293)。ヘテロ接合性の個体は、野生型の50%未満の酵素活性を有しており、ALDH2*2のホモ接合性では、野生型の 1～4%の活性を有する (Faresら、J. Biol. Chem., 1994, 269(19) : 13854-13860)。

【0005】

アジア人の紅潮反応に加えて、ALDH2酵素欠損症と、口腔、咽頭、喉頭及び食道のがんを含む上部気道消化器がんとの間には、明確な関連性がある (Asakage Tら、Carcinogenesis 2007, 28 : 865-874 ; Ding JH,ら、World J Gastroenterol 2009, 15 : 2395-2400 ; Hashibe Mら、Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006, 15(4) : 696-703)。ALDH2欠損個体は、完全なALDH2活性を有する個体よりも、アルコール摂取に由来する食道がん (具体的には、扁平上皮がん) のリスクがかなり高い (Yokoyama Aら、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev 1996, 5:99-102 ; Oze Iら、Jpn. J. Clin. Oncol 2011, 41:677-92 ; Ding JH,ら、World J Gastroenterol 2009, 15 : 2395-2400 ; Cui Rら、Gastroenterology 2009, 137:1768-75 ; Hashibe Mら、Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006, 15(4) : 696-703)。これらのがんのリスクは、飲酒及び喫煙の組合せによって、有意に上昇する (Lee CHら、Int J Cancer 2009, 125 : 1134-1142 ; Morita Mら、Int J Clin Oncol 2010, 15 : 126-134)。ALDH2は

、気道消化器の悪性腫瘍に関連する最も一般的な遺伝子多型であり、食道がんを有する最も若い患者が、ALDH2*2の保有者である。ALDH2*2を保有するアルコールを飲む人とアルコールを飲まない人の両方における食道がんのリスクは、それぞれそれらの野生型のALDH2の対照と比較して、7～12倍上昇している（Yokoyama Aら、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev 1996, 5:99-102）。タバコの煙もまたアセトアルデヒドのソースであり、重度の飲酒と喫煙が組合わさった、ALDH2*2遺伝子型を有する個人は、がんのリスクが最も高い（Lee CHら、Int J Cancer 2009, 125 : 1134-1142 ; Morita Mら、Int J Clin Oncol 2010, 15 : 126-134）。エタノールが同量であると仮定した場合、喫煙者は非喫煙者よりもアセトアルデヒド濃度が2倍高い。更に、喫煙とエタノールへの曝露が同時にされる場合、喫煙者は非喫煙者と比較して、唾液のアセトアルデヒド濃度が7倍高い（Salaspuro Vら、Int J Cancer 2004, 111 : 480-483）。ALDH2*2遺伝子型を有する被検体における、重度のエタノール摂取及び喫煙は、非喫煙者、非飲酒者の野生型ALDH2被検体と比較して、公知の中で最も高いがんのリスク（50.1のオッズ比）及び上皮性悪性腫瘍の最大25年早い発症（45歳と70歳との比較）をもたらす一因となっている（Brooks PJら、PLoS Med 2009, 6(3) : e50 ; Lee CHら、Int J Cancer 2009, 125 : 1134-1142 ; Morita Mら、Int J Clin Oncol 2010, 15 : 126-134）。

【0006】

それゆえ、ALDH2活性を上昇させるため、及びALDH2欠損症と関連する疾患を治療するための組成物及び方法を開発するニーズがある。本発明は、そのような組成物及び方法を提供する。本発明のこの利点及びその他の利点は、本明細書において提供される詳細な説明によって明らかになる。

【発明の概要】


【0007】

発明の概要

本発明は、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターを含むベクターを提供する。本発明はまた、哺乳動物におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症を治療するため、又は哺乳動物におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症によって特徴付けられる疾患若しくはその任意の症状を治療若しくは予防するためのベクターを含む組成物及び該ベクターの使用方法も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1Aは、AAV2逆位末端反復（ITR）、キャプシド化シグナル（encapsidation signal）（）、CMVエンハンサー/ニワトリベータ-アクチン（CAG）プロモーター、最適化したヒトALDH2（hALDH2）cDNA、ヘマグルチニン（HA）タグ及びウサギ-グロブリンポリアダニル化シグナルを示す、AAVrh.10hC1E1ベクターの模式図である。図1Bは、HEK293T細胞中のAAV-hALDH2プラスミドによりコードされるhALDH2の発現を示すウェスタンブロットの図である。図1Cは、HEK293T-orf6細胞中のAAVrh.10hALDH2ベクターによりコードされるhALDH2のhALDH2テトラマーの形成を示すウェスタンブロットの図である。

【図2】図2Aは、C57Bl/6マウスに対して、AAVrh.10hALDH2ベクターの静脈内への単回投与後の、hALDH2の長期間のin vivoでのmRNAの発現を示すグラフである（1グループ当たりn=4）。図2Bは、C57Bl/6マウスに対して、AAVrh.10hALDH2ベクターの静脈内への単回投与後の、hALDH2の長期間のin vivoでのタンパク質の発現を示すグラフである（1グループ当たりn=4）。

【図3】図3は、ALDH2*2マウスを、AAVrh.10hALDH2を用いて治療した効果を示す。ホモ接合のALDH2*2マウス（1グループ当たりn=2、雄性1匹/雌性1匹）に、 10^{11} gcのAAVrh.10-hALDH2又は 10^{11} gcのAAVrh.10-GFP（無治療対照）を静脈内投与した。ベクター投与の2週間後、胃内強制飼養により、マウスに、水中の4 g/kgのエタノールを投与し（challenged）、平均台上での落下前の時間（最大60秒）をエタノール投与前及び投与の24時間後に測定した。各ドットは、個別のマウスを表す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

発明の詳細な説明

本発明は、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターを含む、本質的にそれからなる、又はそれからなるベクターを提供する。本発明のベクターが、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターから本質的になる場合、ベクターに物質的に影響しない追加の構成要素（例、例えば、ポリ（A）配列又はin vitroでのベクターの操作を促進する制限酵素部位等の遺伝的要素）が含まれ得る。該ベクターが、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターからなる場合、該ベクターは、追加の構成要素（即ち、ベクターに内在しておらず、核酸配列の発現をもたらすため、それによってタンパク質を提供するために必要とされない構成要素）を何ら含まない。

10

【0010】

本発明のベクターは、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列と共に、当該技術分野において公知である任意の遺伝子導入ベクターを含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。そのようなベクターの例としては、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター及びプラスミドが挙げられる。好ましい実施形態においては、該ベクターはAAVベクターである。

【0011】

アデノ随伴ウイルスは、パルボウイルス科（parvoviridae）のメンバーであり、約5,000個未満のヌクレオチドの直鎖の一本鎖DNAゲノムを含む。AAVは、効率的な複製のために、ヘルパーウイルス（即ち、アデノウイルス若しくはヘルペスウイルス）の共感染又はヘルパー遺伝子の発現を必要とする。典型的には、治療用核酸の投与のために使用されるAAVベクターは、DNA複製及びパッケージングのための認識シグナルを含む、逆位末端反復（ITR）のみが残るよう、親のゲノムの約96%が欠失している。これにより、ウイルス遺伝子の発現による、免疫学的又は毒性のある副作用が取り除かれる。更に、産生される細胞に対して、特定のAAVタンパク質を送達することにより、細胞のゲノムの特定の領域への、AAV ITRを含むAAVベクターのインテグレーションが必要に応じて可能となる（例、米国特許第6,342,390号及び第6,821,511号を参照）。インテグレートされたAAVゲノムを含む宿主細胞は、細胞増殖又は形態学における変化を示さない（例えば、米国特許第4,797,368号を参照）。

20

30

【0012】

AAV ITRは、非構造的複製（Rep）タンパク質及び構造的キャプシド（Cap）タンパク質（ウイルス粒子タンパク質（VP）としても知られる）をコードする特有のヌクレオチド配列に隣接している。末端の145個のヌクレオチドは自己相補的であり、T字形ヘアピンを形成するエネルギー的に安定な分子内二本鎖が形成され得るように構成されている。これらのヘアピン構造は、細胞内のDNAポリメラーゼ複合体のプライマーとして働くことによって、ウイルスDNAの複製起点として機能する。Rep遺伝子は、Repタンパク質であるRep78、Rep68、Rep52及びRep40をコードする。Rep78及びRep68は、p5プロモーターから転写され、Rep52及びRep40は、p19プロモーターから転写される。Rep78及びRep68タンパク質は、生産的な複製の間に、AAVの末端をほどこくことができるようにするためのヘリカーゼ及びニッカーゼ機能を果たす、多機能なDNA結合タンパク質である（例、Imら、Cell, 61: 447-57 (1990)を参照）。これらのタンパク質はまた、内在的なAAVプロモーター及びヘルパーウイルス内のプロモーターに由来する転写を制御する（例、Pereiraら、J. Virol., 71: 1079-1088 (1997)を参照）。他のRepタンパク質は、Rep78及びRep68の機能を改変する。cap遺伝子は、キャプシドタンパク質であるVP1、VP2及びVP3をコードする。cap遺伝子は、p40プロモーターから転写される。

40

【0013】

本発明のAAVベクターは、当該技術分野において公知である任意のAAV血清型を使用し

50

て生成し得る。幾つかのAAV血清型及び100個超のAAV変異体が、アデノウイルスストック、又はヒト若しくは非ヒト霊長類の組織から単離されている（例、Wuら、*Molecular Therapy*, 14(3) : 316-327 (2006)において概説されている）。一般的に、異なる血清型が同一の遺伝子機能セットを有し、本質的に物理的及び機能的に同等であるウイルス粒子を産生し、実質的に同一の機構により複製され、組み立てられるように、AAV血清型は核酸配列及びアミノ酸配列のレベルで有意に相同なゲノム配列を有している。AAV血清型1～5及び7～9は、他の存在する、且つ特徴付けられた全ての血清型に特異的な中和血清と効率良く交差反応しないという点において、「真の」血清型として定義されている。それに対して、AAV血清型6、10（Rh10としても言及される）及び11は、「真の」血清型の定義に忠実ではないので、「変異型」の血清型と考えられている。AAV血清型2（AAV2）は、病原性が無く、幅広い感染性及び長期間の導入遺伝子の発現を確立する能力のために、遺伝子治療用途で広く使用されている（例、Carter, B.J., *Hum. Gene Ther.*, 16 : 541-550 (2005) ; 及びWuら、上記を参照）。多様なAAV血清型のゲノム配列及びそれらの比較が、例えば、GenBankアクセス番号U89790、J01901、AF043303及びAF085716 ; Chioriniら、*J. Virol.*, 71 : 6823-33 (1997) ; Srivastavaら、*J. Virol.*, 45 : 555-64 (1983) ; Chioriniら、*J. Virol.*, 73 : 1309-1319 (1999) ; Rutledgeら、*J. Virol.*, 72 : 309-319 (1998) ; 並びにWuら、*J. Virol.*, 74 : 8635-47 (2000)に開示されている。

【0014】

AAV rep及びITR配列は、殆ど全てのAAV血清型間で特に保存されている。例えば、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4及びAAV6のRep78タンパク質は、約89～93%同一であることが報告されている（Bantel-Schaalら、*J. Virol.*, 73(2) : 939-947 (1999)を参照）。AAV血清型2、3A、3B及び6が、ゲノムレベルで、ヌクレオチド配列全体で約82%の同一性を共有することが報告されている（Bantel-Schaalら、上記）。更に、多くのAAV血清型のrep配列及びITRは、哺乳動物細胞内でAAV粒子を産生する間に、他の血清型の対応する配列を効率よく交差的に相補する（即ち、機能的に代替する）ことが知られている。

【0015】

一般的に、AAV粒子の細胞内でのトロピズムを決定するcapタンパク質、及び関連するcapタンパク質をコードする配列は、異なるAAV血清型間でRep遺伝子よりも有意に保存されていない。他の血清型の対応する配列を交差的に相補するRep及びITR配列の能力の観点では、AAVベクターは、混合された血清型を含み得、それにより、「キメラ」又は「偽型」のAAVベクターであり得る。典型的には、キメラAAVベクターは、2以上（例、2、3、4等）の異なるAAV血清型に由来するAAVキャプシドタンパク質を含む。それに対して、偽型化AAVベクターは、別のAAV血清型のキャプシドにパッケージングされた1のAAV血清型の1以上のITRを含む。キメラ及び偽型化AAVベクターは、例えば、米国特許第6,723,551号 ; Flotte, *Mol. Ther.*, 13(1) : 1-2 (2006) ; Gaoら、*J. Virol.*, 78 : 6381-6388 (2004) ; Gaoら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 11854-11859 (2002) ; Deら、*Mol. Ther.*, 13 : 67-76 (2006) ; 及びGaoら、*Mol. Ther.*, 13 : 77-87 (2006)において更に記載されている。

【0016】

一実施形態においては、AAVベクターは、ヒトに感染するAAV（例、AAV2）を使用して生成される。好ましい一実施形態においては、ヒトに感染するAAVベクターは、AAV8又はAAV9である。代替的には、AAVベクターは、例、例えば、類人猿（例、チンパンジー）、旧世界ザル（例、マカクザル）及び新世界ザル（例、マーモセット）等の非ヒト霊長類に感染するAAVを使用して生成される。好ましくは、AAVベクターは、ヒトに感染するAAVで偽型化された非ヒト霊長類に感染するAAVを使用して生成される。そのような偽型化AAVベクターの例は、例、Cearleyら、*Molecular Therapy*, 13 : 528-537 (2006)に開示されている。一実施形態においては、AAV2逆位末端反復（ITR）で偽型化された、アカゲザルから単離されたAAVに由来するキャプシドタンパク質を含むAAVベクターを生成し得る。例えば、アカゲザルに感染する、AAV2 ITRで偽型化された、本発明のAA

Vベクターは、AAV10（「AAVrh.10」としても言及される）に由来するキャプシドタンパク質を含み得る（例、Watanabeら、Gene Ther., 17(8)：1042-1051（2010）；及びMaoら、Hum. Gene Therapy, 22：1525-1535（2011）を参照）。別の実施形態においては、本発明のAAVベクターは、非天然で生じたAAVベクターである。

【0017】

本発明のベクターは、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターを含む。DNA領域は、それらが互いに機能的に関連している場合、「作動可能に連結」されている。プロモーターは、それが配列の転写を調節する場合、コード配列に「作動可能に連結」されている。

【0018】

「プロモーター」は、特定の遺伝子の転写を開始するDNAの領域である。異なる様々なソースに由来する多数のプロモーターが当該技術分野において周知である。プロモーターの代表的なソースとしては、例えば、ウイルス、哺乳動物、昆虫、植物、酵母及び細菌が挙げられ、これらのソースに由来する好適なプロモーターは容易に入手可能であるか、又は例えばATCC等の受託機関及び他の商業的な若しくは個別のソースから公に入手可能である配列に基づいて合成により作製し得る。プロモーターは、一方向性（即ち、一方向に転写を開始する）又は二方向性（即ち、3'と5'方向の両方に転写を開始する）であり得る。任意選択で、プロモーターはまたエンハンサーエレメントも含み得る（例、エンハンサーを含むキメラプロモーター）。

【0019】

ベクターはまた、エンハンサーエレメントも含み得る。本明細書において用いられる場合、用語「エンハンサーエレメント」（単に「エンハンサー」としても言及される）は、例えば、それが作動可能に連結されている核酸配列の転写を増大させるDNA配列を指す。エンハンサーは、核酸配列のコード領域から数千ベース離れて位置し得、制御因子の結合、DNAメチル化のパターン、又はDNA構造における変化を媒介し得る。異なる多様なソースに由来する多数のエンハンサーが、当該技術分野において周知であり、クローニングされたポリヌクレオチド（例、例えばATCC等の受託機関及び他の商業的な又は個別のソースに由来する）としてか、又はその内部において利用可能である。ベクターは、プロモーターから離れているか又はその一部としてかのいずれかで、エンハンサー配列を含み得る。組み合わせられたエンハンサーエレメントを含むプロモーターは、「キメラプロモーター」として当該技術分野において公知である。エンハンサーは、コード配列の上流、内部又は下流に位置し得る（例、Niwaら、Gene, 108：193-199（1991）；Dalyら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96：2296-2300（1999）；及びSondhiら、Mol. Ther., 15：481-491（2007）を参照）。

【0020】

本発明のベクターのプロモーターは、キメラプロモーターを含む、当該技術分野において公知である任意のプロモーターを含み得るか、本質的にそれからなり得るか、又はそれからなり得る。そのようなプロモーターの種類の例としては、構成的に活性のあるプロモーター（例、ヒトベータ-アクチン、ニワトリベータ-アクチン、サイトメガロウイルス（CMV）及びSV40）、細胞の種類に特異的なプロモーター（例、CD19遺伝子プロモーター、CaMKIIa及びUAS）、又は誘導性プロモーター（例、Tetシステム（米国特許第5,464,758号及び第5,814,618号）、エクジソン誘導システム（Noら、Proc. Natl. Acad. Sci., 93：3346-3351（1996））、T-REXTMシステム（Invitrogen, Carlsbad, CA）、Cre-ERTタモキシフェン誘導性リコンビナーゼシステム（Indraら、Nuc. Acid. Res., 27：4324-4327（1999）；Nuc. Acid. Res., 28：e99（2000）；米国特許第7,112,715号；及びKramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol., 308：123-144（2005））、並びにLACSWITCHTMシステム（Stratagene, San Diego, CA））が挙げられる。本発明の一実施形態においては、プロモーターは、構成的に活性のあるプロモーター、誘導性プロモーター又は細胞の種類に特異的なプロモーターである。プロモーターの一例は、ニワトリ-β-アクチンプロモーターである。「ニワトリ-β-アクチンプロモーター」（「CAGプロ

10

20

30

40

50

モーター」としても言及される)は、CMV即時/早期エンハンサー、ニワトリベータアクチン-プロモーター及び第一エキソンスプライスドナー、並びにウサギベータグロブインスプライスアクセプターを含む。本発明の一実施形態においては、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列は、ニワトリ -アクチンプロモーターに作動可能に連結し得る。

【0021】

「核酸配列」は、DNA又はRNAのポリマー、即ち、一本鎖若しくは二本鎖であり得、非天然若しくは改変されたヌクレオチドを含み得るポリヌクレオチドを包含することが意図される。本明細書において用いられる場合、用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、リボヌクレオチド(RNA)又はデオキシリボヌクレオチド(DNA)のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマーの形態を指す。これらの用語は、分子の一次構造を指し、従って二本鎖及び一本鎖のDNA、並びに二本鎖及び一本鎖のRNAが含まれる。用語には、同等なものとして、ヌクレオチド類似体から作製されたRNA又はDNAのいずれかの類似体、並びに、例えば、それらに限定されないが、メチル化された及び/又はキャップ化ポリヌクレオチド等の改変されたポリヌクレオチドが含まれる。

【0022】

プロモーターに作動可能に連結された核酸配列は、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする任意の核酸配列を含み得る。好ましくは、核酸配列は、コドンが最適化されていても良い、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼ2(ALDH2)をコードする。コドンを最適化する技術は、当該技術分野において公知である。核酸配列はまた、活性のあるタンパク質、例、ALDH2、及び活性のあるタンパク質の性質(例、有効性、可溶性又は半減期)を改善する第二の成分、通常はタンパク質からなる、融合タンパク質もコードし得る。第二の成分の例は、当該技術分野において公知であり、例えば、免疫グロブリンのFcドメイン及びポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。

【0023】

アルデヒドデヒドロゲナーゼは、内在的なソース及び外来のソースの両方のアルデヒドの代謝において役割を果たす、1ファミリーの酵素である。アルデヒドデヒドロゲナーゼ2(ALDH2)はアセトアルデヒドを酸化し、アルコール代謝に関与する。ヒトALDH2遺伝子は染色体12q24に位置し、13個のコーディングエキソンを含む44キロベースペア長である。ALDH2は、N末端の17アミノ酸が、ミトコンドリアに前駆体タンパク質を向かわせるミトコンドリア局在配列として機能する、517アミノ酸の前駆体タンパク質として合成される。17アミノ酸のミトコンドリア局在配列はミトコンドリア中で切除され、500アミノ酸の成熟ALDH2タンパク質のモノマーが離され、ミトコンドリア中で同一な56kDaのサブユニットの тетрамер を形成するよう他のモノマーと組み合わされる。ALDH2アミノ酸及びヌクレオチド配列の例としては、例えば、配列番号1(成熟した500アミノ酸のタンパク質);配列番号2(成熟した500アミノ酸のタンパク質をコードするヌクレオチド配列);配列番号3(シグナル配列を含む、未成熟な517アミノ酸のタンパク質;またGenBank NP_000681.2及びAAA51693.1)、並びに配列番号4(シグナル配列を含む、未成熟な517アミノ酸のタンパク質をコードする核酸;またGenBank NM_000690.3及びAH002599.2)が挙げられ、核酸配列は更にコドンが最適化され得る。

【0024】

ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列及びそれを含むベクターは、当該技術分野において公知である方法を使用して生成され得る。例えば、核酸配列、ポリペプチド及びタンパク質は、標準的な組換えDNAの方法論を使用して組換え的に産生され得る(例、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第3版) Cold Spring Harbor Pres、Cold Spring Harbor, NY, 2001;及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sonsら、NY, 1994を参照)。更に、合成的に生成されたヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列は、例えば細菌、昆虫、又は哺乳動物等、例、ラット、ヒト等のソースから単離及び/又は精製され得る。単離及び精製の方法は、当該技術分野において周知である。代替的には、本明細書に記載された核酸配列は、商業的に合成され得る。こ

れに関して、核酸配列は、合成、組換え、単離及び／又は精製され得る。配列は、mRNAの安定性が増大するよう、及び突然変異体mRNAによってトランス的に阻害される可能性が低減するよう、更に最適化され得る。

【0025】

ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターに加えて、ベクターは、宿主細胞中で核酸配列の発現を提供する、例えばエンハンサー、ポリアデニル化シグナル、転写ターミネーター、内部リボソーム侵入部位 (IRES)、5' 及び3' 非翻訳領域、イントロン等の追加的な発現制御配列を含み得る。例示的な発現制御配列は当該技術分野において公知であり、例えば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, CA. (1990)に記載されている。

10

【0026】

ベクターは、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結されたシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を更に含み得る。シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列が存在する場合、それはコードされたシグナルペプチドとアルデヒドデヒドロゲナーゼとが互いに連結するようにプロモーター配列の下流に位置する。ベクターは、ミトコンドリア膜を横切って輸送するために好適な任意のシグナルペプチド (ミトコンドリア局在配列) をコードし得、そこではシグナルペプチドが切除され成熟タンパク質が提供される。シグナルペプチドは、正に帯電し、ヘリックスを形成していなければならない。好ましい一実施形態においては、シグナルペプチドはミトコンドリア局在配列である。ミトコンドリア局在配列は、例えば、配列番号5のアミノ酸配列を含み得る。

20

【0027】

また、上記のベクター及び医薬的に許容される (例、生理学的に許容される) 担体を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる組成物も提供される。組成物が、本発明のベクター及び医薬的に許容される担体から本質的になる場合、物質的に組成物に影響しない追加的な構成要素 (例、アジュバント、緩衝剤、安定剤、抗炎症剤、可溶化剤、防腐剤等) が含まれ得る。組成物が、本発明のベクター及び医薬的に許容される担体からなる場合、別に定める場合を除き、組成物は追加的な構成要素を何ら含まない。任意の好適な担体が、本発明の文脈内において使用され得、そのような担体は当該技術分野において周知である。担体の選択は、一つには、組成物が投与され得る特定の部位、及び組成物を投与するために使用する特定の方法によって決定される。組成物は、任意選択で、本明細書に記載されたベクターを除いて滅菌し得る。組成物は保存のために凍結若しくは凍結乾燥し得、使用に先立って、好適な滅菌した担体中で再構成し得る。組成物は、例、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21版) Lippincott Williams & Wilkin, Philadelphia, PA (2001)に記載されている従来技術に従って生成し得る。

30

【0028】

組成物のための好適な製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、及び静菌薬を含み得る、水性及び非水性溶液、等張な滅菌溶液、並びに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び防腐剤を含み得る水性及び非水性の滅菌懸濁液が挙げられる。製剤は、例えばアンプル及びバイアル等の単一用量又は複数用量の密封した容器内に存在し得、使用の直前に、滅菌した液体の担体、例えば、水を添加することだけを必要とする、凍結乾燥 (凍結乾燥 (lyophilized)) の状態で保存し得る。即時の溶液及び懸濁液は、既に記載された種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製し得る。好ましくは、担体は緩衝生理食塩溶液である。より好ましくは、本発明のベクターは、投与に先立って、ダメージから本発明のベクターを保護するため、及び形質導入効率を促進するために、製剤化された組成物中で投与される。例えば、組成物は、ベクターを調製し、保存し又は投与するために使用する、例えばガラス製品、シリンジ又はニードル等の器具上において、ベクターの損耗を低減するために製剤化され得る。組成物は、ベクターの光感受性及び／又は温度感受性を低減するために、製剤化し得る。この目的のために、好ましくは、組成物は、例、例えば上記のもの等の医薬的

40

50

に許容される液体の担体、並びにポリソルベート80、L-アルギニン、ポリビニルピロリドン、トレハロース及びそれらの組合せからなる群から選択される安定化剤を含む。そのような組成物の使用により、ベクターの保存可能期間が引き伸ばされ、管理が容易になり、本発明の方法の効率が増大する。ベクターを含む組成物の製剤は、例えば、Wrightら、*Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 6(2): 174-178 (2003)及びWrightら、*Molecular Therapy*, 12: 171-178 (2005)において更に記載されている。

【0029】

更に、当業者は、本発明のベクターが他の治療剤又は生物学的に活性のある剤を含む組成物中に存在し得ることを理解するであろう。例えば、例えばイブuproフェン又はステロイド等の炎症を調節する因子は、ベクターの*in vivo*での投与と関連した腫れ及び炎症を低減するために組成物の一部であり得る。抗生物質、即ち、殺菌剤及び防かび剤は、存在している感染を治療するために存在し得、及び/又は例えば遺伝子導入手順と関連した感染等の将来的な感染のリスクを低減し得る。

【0030】

本発明は、哺乳動物における、アルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症、特にALDH2欠損症を治療する方法、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症によって特徴付けられる疾患若しくはその任意の症状を治療若しくは予防する方法を提供する。該方法は、本明細書に記載されたベクターを、哺乳動物に投与することを含み、該核酸はアルデヒドデヒドロゲナーゼタンパク質を産生するよう発現し、それによりアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症を治療する、及び/又はそれらと関連する疾患若しくは症状を治療若しくは予防する。

【0031】

哺乳動物は、例えば、タンパク質の欠損、非機能的なタンパク質、又は野生型タンパク質と比較して低下した機能を有するタンパク質となる、アルデヒドデヒドロゲナーゼタンパク質をコードする遺伝子における変異を有する哺乳動物等の、アルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症を有する任意の哺乳動物であり得る。哺乳動物は、ヒト、特にヒトALDH2における欠損症を有するヒトであり得る。特定の実施形態においては、ヒトは、ALDH2*2アレル（即ち、ヒトALDH2タンパク質の487位におけるグルタミン酸からリジンへの置換（E487K）、又は未成熟な配列における504位におけるグルタミン酸からリジンへの置換（E504K）（Yoshidaら、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, 81(1): 258-261））に関してヘテロ接合性又はホモ接合性である。

【0032】

幾つかの実施形態においては、該方法は、アルデヒドデヒドロゲナーゼタンパク質をコードする遺伝子における機能喪失変異を特定することによって、治療する患者を選択することを更に含み得る。該方法は、例えば、ALDH2をコードするアミノ酸又は核酸配列を分析すること、及び成熟した500アミノ酸のヒトALDH2タンパク質のうち残基487（若しくは517アミノ酸の前駆体ALDH2タンパク質における対応するアミノ酸504）が、グルタミン酸であるか、又はその他の幾つかのアミノ酸（例、リジン）であるかどうかを決定することを含み得る。被検体は、成熟ALDH2タンパク質の残基487（若しくは前駆体ALDH2タンパク質の残基504）におけるアミノ酸が、グルタミン酸でない（即ち、任意の他のアミノ酸、特にリジンに変異している）場合、ALDH2欠損症を有する（及び治療のための好適な候補）として選択される。

【0033】

哺乳動物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症、特にALDH2欠損症によって特徴付けられる症状若しくは疾患に罹患し得るか、又は例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症を患っている結果として、そのような症状若しくは疾患を発症するリスクがあり得る。アルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症と関連する疾患の例としては、エタノールの毒性、上部呼吸器/消化管のがん（例、口腔、咽頭、喉頭）及び食道のがん）、骨粗鬆症、放射線皮膚炎、扁平上皮がん、ファンコニ貧血、糖尿病合併症、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳卒中、高血圧、心不整脈、心筋梗塞、及びニトログリセリン不耐症が挙げられる。アルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損症、特にALDH2欠損症の症状は、前記の疾患と共通し

て関連する症状のいずれかのものを含み得る。例えば、ALDH2欠損症の症状は、アルコール摂取後の、肝臓及び／又は血中のアセトアルデヒドの蓄積、並びに顔面の紅潮、頭痛、吐き気、目眩及び／又は動悸である。

【 0 0 3 4 】

アルデヒドデヒドロゲナーゼにおける欠損症を治療することには、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性又はタンパク質レベルを任意の量、増大させることが包含される。アルデヒドデヒドロゲナーゼにおける欠損症によって特徴付けられる疾患又はその症状を治療することには、疾患によりもたらされる任意の生理学的な反応又は症状の進行を、任意の程度、改善する又は遅くする (slowing) ことが包含される。アルデヒドデヒドロゲナーゼにおける欠損症による疾患又はその症状を予防することには、疾患によりもたらされる任意の生理学的な反応又は症状の発症を、任意の量、遅延させる (delaying) ことが包含される。

10

【 0 0 3 5 】

組成物を哺乳動物に送達するために、任意の投与経路を使用し得る。実際に、1超の経路が組成物を投与するために使用され得るが、特定の経路によって、別の経路よりも、より迅速でより効果的な反応が提供され得る。好ましくは、組成物は、筋肉内注射を介して投与される。組成物の用量はまた、体腔内に投与若しくは点滴されるか、経皮吸収されるか (例、経皮パッチを介する)、吸入されるか、摂取されるか、組織に局所投与されるか、又は例えば、静脈内、腹腔内、口腔内、皮内、皮下若しくは動脈内投与により非経口で投与され得る。

20

【 0 0 3 6 】

組成物は、例えばスポンジ、生体適合性メッシュ、機械的リザーバー、又は機械的インプラント等の、制御放出又は持続放出が可能な装置内又は装置上で投与され得る。インプラント (例、米国特許第5,443,505号等を参照)、例えば植込み型装置、例、機械的リザーバー若しくはインプラント若しくはポリマー組成物からなる装置等の装置 (例、米国特許第4,863,457号を参照) は、AAVベクターを投与するために特に有用である。組成物はまた、例えば、ゲルフォーム、ヒアルロン酸、ゼラチン、コンドロイチン硫酸、ポリホスホエステル、例えばビス-2-ヒドロキシエチル-テレフタレート (BHET) 及び／又はポリ乳酸グリコール酸等を含む、持続放出製剤 (例、米国特許第5,378,475号を参照) の形態でも投与され得る。

30

【 0 0 3 7 】

哺乳動物に投与される組成物中におけるベクターの用量は、哺乳動物のサイズ (質量)、任意の副作用の程度、特定の投与経路等を含む多くの要因に依存する。好ましくは、本発明の方法は、「治療有効量」の本明細書に記載された本発明のベクターを含む組成物を投与することを含む。「治療有効量」は、望ましい治療的な結果を得るために、用量で、及び必要な期間に亘って、有効である量を指す。治療有効量は、例えば、個体のアレルギー感受性の程度、年齢、性別及び体重等の因子、並びに個体における望ましい反応を引き出すためのベクターの能力によって変動し得る。「予防有効量」は、望ましい予防的な結果 (例、ALDH2欠損症により誘導されたエタノール毒性又は上部呼吸器／消化管のがんの予防) を得るために、用量で、及び必要な期間に亘って、有効である量を指す。

40

【 0 0 3 8 】

アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードするベクターは、細胞の組成物に対する十分な曝露を確保するために、治療的若しくは予防的な処置の期間、複数回投与され得るか、並びに／又は複数の投与経路 (例、筋肉内及び皮下) を用い得る。例えば、組成物は、治療的又は予防的な処置の期間、哺乳動物に対して、2回以上 (例、2、3、4、5、6、7、8、9又は10回以上) 投与され得る。しかしながら、本発明の好ましい態様によれば、本明細書に記載されたベクター (又は該ベクターを含む組成物) の単回投与は、哺乳動物における治療的又は予防的なレベルにおいて、アルデヒドデヒドロゲナーゼの長期発現を提供するために十分である。好ましくは、それを含むベクター又は組成物の投与後、約30日以上 (例、約45日以上、約60日以上、約75日以上、約90日以上、約4ヶ月以上、約6ヶ月以上

50

、約10ヶ月以上、又は更には約12ヶ月以上)、哺乳動物内において治療的なレベルで発現される。従って、幾つかの実施形態においては、該方法は、該ベクターを哺乳動物に対して、約30日以内に1回以下、約45日以内に1回以下、約60日以内に1回以下、約75日以内に1回以下、又は更には約90日以内に1回以下(例、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約10ヶ月、若しくは約12ヶ月以内に1回以下)で、投与することを含む。

【0039】

特定の治療又は予防効果を得るために必要な、組成物中におけるベクターの用量は、典型的には、1細胞当たりのベクターゲノムコピー(gc/細胞)又は体重1kg当たりのベクターゲノムコピー(gc/kg)の単位で投与される。当業者は、これら及び当該技術分野において周知である他の要因に基づいて、特定の免疫応答を有する患者を治療するために適切なベクター用量の範囲を容易に決定し得る。

【0040】

本発明はまた、本発明のAAVベクターを生成する方法も含む。一実施形態においては、該方法は、ベクターの複製のために必要な、細胞への、あるAAV血清型に由来するAAV Repタンパク質、生成されたAAVベクターの血清型を定義するAAVウイルス構造タンパク質VP1、VP2及びVP3、並びにアデノウイルスヘルパー機能のE2、E4及びVA RNAを有するプラスミドと共に、AAV-ALDH2ベクターを共トランスフェクトさせることを含む。AAV Repタンパク質及びAAV構造タンパク質のアミノ酸配列は、当該技術分野において公知である任意のAAVに由来し得る。好ましい一実施形態においては、AAV Repタンパク質はAAV2由来であり、AAV構造タンパク質はAAVrh.10由来である。該ベクター及びプラスミドがトランスフェクトされる細胞は、当該技術分野において公知である任意の細胞であり得る。好ましい一実施形態においては、該細胞は接着細胞である。特に好ましい実施形態においては、該細胞はヒト胎児腎(HEK)293細胞である。代替的な実施形態においては、本発明のAAVベクターはパキウウイルスシステム中で生成される。

【0041】

以下の実施例は、本発明について更に説明するが、当然、決してその範囲を限定するものとして解釈されるべきでない。

【実施例】

【0042】

実施例1

本実施例は、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターを含むベクターの開発について実例で示す。

発現カセットは、AAV2逆位末端反復(ITR)、キャプシド化シグナル(encapsidation signal)()、ヒトALDH2 cDNA配列に作動可能に連結されたサイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー、ニワトリ β -アクトチンプロモーター(CAGプロモーター)及びウサギ β -グロビンポリアデニル化シグナルからなる(図1A)。マウスALDH2タンパク質からALDH2 cDNAを識別するために、C末端にヘマグルチニン(HA)タグを有するALDH2 cDNA配列を構築した。mRNAの安定性を増大させるため、及び突然変異体mRNAによるトランス阻害の可能性を低減するために、ALDH2 cDNAを最適化した。ALDH2 cDNAを、ヒトにバイアスするコドンを使用し、以下:mRNA不安定化エレメント;低(30%)又は高(80%)GC領域;コード領域内の翻訳開始配列;及び潜在的スプライシングシグナルの除去により、配列を最適化した。最適なコザックコンセンサスにより、最適化したALDH2 cDNAを合成した。

最適化した完全長ALDH2 cDNA配列を合成し、CAGプロモーター調節下のpAAVプラスミドにクローニングした。AAV-hALDH2プラスミドは、ベクターの複製のために必要なAAV2由来のAAV Repタンパク質、生成したAAVベクターの血清型を定義するAAVrh.10ウイルス構造(Cap)タンパク質VP1、2及び3;並びにE2、E4及びVA RNAのアデノウイルスヘルパー機能を有するプラスミドと共に、pAAV プラスミドを、ヒト胎児腎293T細胞(HEK 293T;アメリカンタイプカルチャーコレクション)に共トランスフェクションすることによって生成した。AAV-hALDH2-HAベクター(「AAVrh.10hALDH2」として

言及される)を、イオジキサノール勾配及びQHP陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。定量的TaqManリアルタイムPCR分析によってベクターゲノム力価を決定した。無関係なタンパク質をコードするベクターを、特定の発現研究のための対照として使用した。

AAVrh.10hALDH2に管理された(directed)in vitroでのヒトALDH2タンパク質の発現を評価するために、HEK293T細胞をAAV-hALDH2プラスミドを用いてトランスフェクトするか、又はモックのトランスフェクトを行い、上清を72時間後に回収した。上清中のヒトALDH2発現を、SDS-PAGE及び抗HA抗体を用いたウェスタン分析によって評価した。図1Bに示すように、細胞の培養上清においてヒトALDH2を検出した。本実施例の結果は、AAVベクターに由来するALDH2の発現を示している。

10

AAVrh.10hALDH2に管理されたin vitroでのヒトALDH2タンパク質の発現に由来するALDH2のテトラマー形成を評価するために、HEK293T細胞を、AAVrh.10hALDH2ベクター又は対照のAAVrh.10-h 1ATベクターを用いて感染させ、上清を72時間後に回収した。上清中のヒトALDH2テトラマー形成を、SDS-PAGE及び抗HA抗体を用いたウェスタン分析によって評価した。図1Cに示すように、細胞の培養上清においてヒトALDH2のテトラマーを検出した。本実施例の結果は、AAVベクターに由来するALDH2の発現により、ALDH2のテトラマーが形成されることを示している。

【0043】

実施例2

本実施例は、ヒトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターを含むベクターの長期間のin vivoでの発現について実証する。

20

AAVrh.10hALDH2ベクターを用いた単回での処置後、ヒトALDH2の長期間のin vivoでの血清中での発現を評価するために、約100 μ lの体積での静脈内注射により、 10^{11} ゲノムコピー(gc)のAAVrh.10hALDH2ベクター、AAVrh.10-h 1ATベクター(対照ベクター)又はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を、C57Bl/6雄性及び雌性マウスに投与した(1グループ当たりn=4)。ベクター投与の2週間後、肝臓のホモジェネートから全RNA及びタンパク質を単離し、qPCRによってhALDH2 mRNAの発現を分析し、抗HA抗体を使用したウェスタンによってタンパク質の発現を分析した。

図2A及び2Bに示すように、高レベルのhALDH2 mRNA(1 μ gの全RNA当たり、 $6.58 \pm 2.2 \times 10^4$ (雄性)及び $1.25 \pm 5.4 \times 10^4$ (雌性)のmRNAコピー)、並びに高レベルのhALDH2タンパク質を、AAVrh.10hALDH2を受容した動物中において検出した。

30

これらのデータは、ALDH2のAAVベクター媒介性の発現により、単回での投与で長期間のALDH2の発現がもたらされること(that that)を実証する。

【0044】

実施例3

本実施例は、AAVrh.10hALDH2を、ALDH2欠損症のマウスモデルに投与することにより、エタノールが関連する毒性から保護されることについて実証する。

AAVrh.10hALDH2ベクターから発現したALDH2のin vivoでの活性を評価するために、ヒトALDH2*2アレルに相当するE487K変異を有するALDH2*2マウス(Zambelliら、Sci Trans Med., 6:251ra118 (2014); Jinら、PNAS, 112:9088-9093 (2015))に、 10^{11} ゲノムコピー(gc)でのAAVrh.10hALDH2の単回の静脈内注射、又は 10^{11} ゲノムコピーでのAAVrh.10-GFP(対照)の単回の静脈内注射を施した(1グループ当たりn=2、雄性1匹/雌性1匹)。

40

ベクター投与の2週間後、胃内強制飼養によって、エタノール(4 g/kg)をマウスに投与した。投与の6時間後、マウスは、高い血中アルコール含有量を示し、それは24時間までにバックグラウンド近傍にまで低下した(データ非表示)。平均台テスト(落下までの時間)(Carterら、Current Protocols Neuroscience, Chapter 8:Unit 8 (2001))によって、投与24時間後の行動を評価した。

図3に示すように、AAVrh.10hALDH2で処置した雄性及び雌性マウスは、割り当て時間(即ち、60秒)の間ずっと平均台上に残った一方で、対照ベクターを投与したマウスは

50

、より早い時間で平均台から落下した。

これらのデータは、AAVrh.10hALDH2ベクターから発現したALDH2は、in vivoにおいて活性があり、エタノール関連の毒性に対して保護し得ることを実証する。

【0045】

本明細書中で引用された刊行物、特許出願及び特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個別にかつ具体的に参照により本明細書中に組み入れられることが示され、本明細書中にその全体が記載されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0046】

本発明を記載する文脈（特に、以下の特許請求の範囲の文脈）における用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1つ」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、単数及び複数形の両方を含むものとして解釈されるべきである。1以上の項目の列記が続く、用語「少なくとも1つ」の使用（例えば、「A及びBの少なくとも1つ」）は、本明細書に別段の記載がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、列記された項目から選択された1つの項目（A又はB）、又は列記された項目の2以上の任意の組合せ（A及びB）を意味するものとして解釈されるべきである。「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」及び「含有する（containing）」という用語は、別段の記載がない限り、制限のない用語（open-ended terms）（即ち、「含むが、これに限定されない（including, but not limited to）」を意味する）として解釈されるべきである。本明細書中の値の範囲の列挙は、本明細書中に別段の指示がない限り、単に範囲内の各別個の値を個別に指す簡略方法として役立つことを意図しており、本明細書において個々の値は、それぞれ個別に列挙されているかのように、個々の値は、明細書に取り込まれる。本明細書中に記載された全ての方法は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は特に文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施し得る。本明細書で提供される任意の及び全ての例、又は例示的な言語（例えば「等（such as）」）の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図しており、特段特許請求されない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のいかなる言葉も、本発明の実施に不可欠であるとして、特許請求されていない任意の要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0047】

本発明を実施するための、本発明者が知るベストモードを含む、本発明の好ましい実施形態は、本明細書に記載される。これらの好ましい実施形態の変形は、前述の記載を読むことで当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がこのような変形を適宜使用することを予測し、本発明者らは本発明が本明細書に具体的に記載されたものとは別の方法で実施されることを意図する。従って、本発明は適用法によって許容されるように、本明細書に添付した特許請求の範囲に記載された主題の全ての改変及び均等物を含む。更に、本明細書中で別段の指示がない限り、又は特に文脈によって明らかに矛盾しない限り、それらの全ての可能な変形における上記要素の任意の組合せが本発明に包含される。

10

20

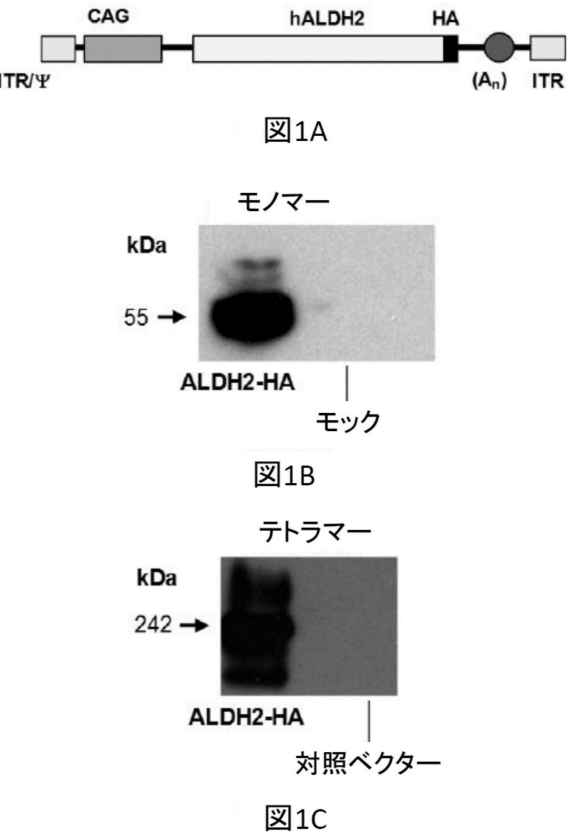
30

40

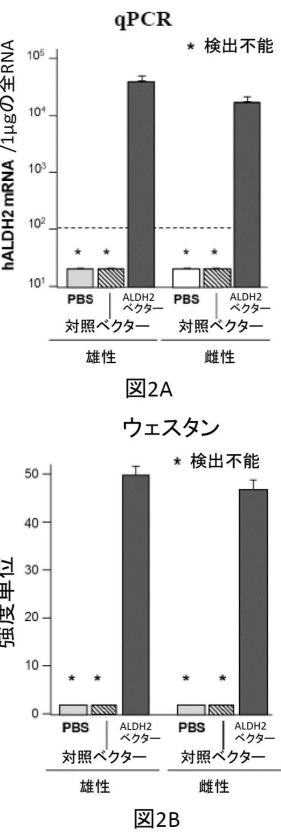
50

【図面】

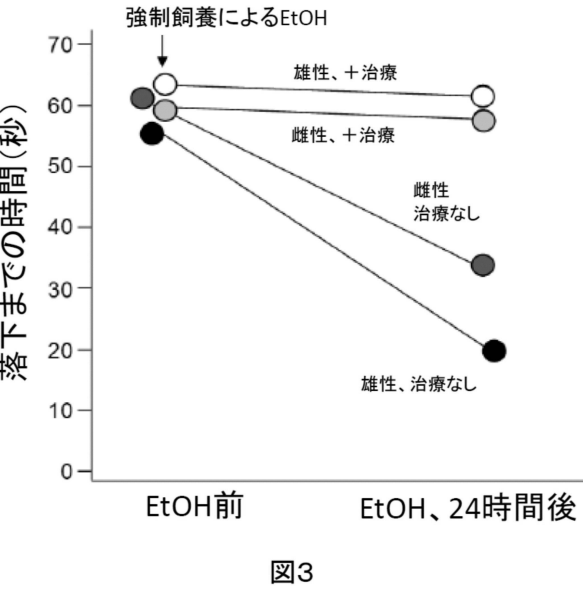
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

0007165357000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	25/32 (2006.01)	A 6 1 P	25/32	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z
C 1 2 Q	1/6827(2018.01)	C 1 2 Q	1/6827	Z

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者 ガスミ、メディ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 0 2 5、メンロー パーク、オブライエン ドライブ 1 0 3 5

(72)発明者 クリスタル、ロナルド ジー .

アメリカ合衆国、ニュー ヨーク州 1 0 0 2 1、ニュー ヨーク、アパートメント 3 4 - ビー、イースト 7 0 番 ストリート 4 3 5

(72)発明者 バゴヴィッチ、オデリア イー .

アメリカ合衆国、ニュー ヨーク州 1 0 0 2 1、ニュー ヨーク、ファースト アヴェニュー 1 3 3 0

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 3 1 4 7 1 (J P , A)

特表 2 0 1 4 - 5 1 1 1 8 0 (J P , A)

特表 2 0 1 2 - 5 0 6 8 5 6 (J P , A)

国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 7 0 4 5 (WO , A 1)

特表 2 0 0 7 - 5 2 4 3 9 2 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 4 / 1 7 6 3 0 9 (WO , A 1)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 2 7 1 3 7 (WO , A 1)

Arch Dermatol Res , Vol.296 , 2005年 , p.568-572

Genetics and molecular research , 2016年 , 15(2);:gmr.15027822

Human gene therapy , 2012年 , Vol.23 , p.903-914

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 6 3
A 6 1 K 3 5 / 7 6
A 6 1 K 3 5 / 7 6 1
A 6 1 K 4 8 / 0 0
A 6 1 P 4 3 / 0 0
A 6 1 P 2 5 / 3 2
A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 P 1 9 / 1 0
A 6 1 P 7 / 0 6
A 6 1 P 2 5 / 1 6
A 6 1 P 2 5 / 2 8
A 6 1 P 9 / 0 0
A 6 1 P 9 / 1 2
A 6 1 P 9 / 0 4
A 6 1 P 9 / 1 0
A 6 1 K 9 / 0 8
A 6 1 K 9 / 1 0
C 1 2 N 1 5 / 5 3
C 1 2 N 1 5 / 8 6 1
C 1 2 N 1 5 / 8 6 4
C 1 2 N 1 5 / 8 6 7
C 1 2 N 1 5 / 8 5
C 1 2 Q 1 / 6 8 2 7

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)