

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6348064号  
(P6348064)

(45) 発行日 平成30年6月27日 (2018. 6. 27)

(24) 登録日 平成30年6月8日 (2018. 6. 8)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 35/76 (2015. 01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 7/04 (2006. 01)

A 6 1 P 7/04

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00

A

請求項の数 55 (全 63 頁)

(21) 出願番号 特願2014-542594 (P2014-542594)  
 (86) (22) 出願日 平成24年11月21日 (2012. 11. 21)  
 (65) 公表番号 特表2014-534245 (P2014-534245A)  
 (43) 公表日 平成26年12月18日 (2014. 12. 18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/066380  
 (87) 国際公開番号 W02013/078400  
 (87) 国際公開日 平成25年5月30日 (2013. 5. 30)  
 審査請求日 平成27年11月19日 (2015. 11. 19)  
 (31) 優先権主張番号 61/639, 025  
 (32) 優先日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/562, 795  
 (32) 優先日 平成23年11月22日 (2011. 11. 22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 511242188  
 ザ チルドレンズ ホスピタル オブ フ  
 ィラデルフィア  
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191  
 04, フィラデルフィア, 34ティー  
 エイチ アンド シビック センター プ  
 ールバード  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 効率の高いトランスジーン送達のためのウイルスベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A A Vベクターと、A A V空キャプシドとを含む、被験体へ投与して、前記被験体における前記A A Vベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するためのA A Vベクター処方物であって、前記A A Vベクターが血液凝固因子をコードするトランスジーンを含み、かつ前記A A Vベクター：前記A A V空キャプシドが、約 1 : 1 ~ 1 : 1 0 の A A Vベクター 対 A A V空キャプシドの比率にある、A A Vベクター処方物。

【請求項 2】

A A Vベクターと、A A V空キャプシドとを含む、前記A A Vベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するための薬学的処方物であって、前記A A Vベクターが血液凝固因子をコードするトランスジーンを含み、かつ前記A A Vベクター：前記A A V空キャプシドが、約 1 : 1 ~ 1 : 1 0 の A A Vベクター 対 A A V空キャプシドの比率にある、薬学的処方物。

【請求項 3】

前記トランスジーンが第 I X 因子をコードする、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

【請求項 4】

前記A A V空キャプシドが、細胞取り込みを低下させるか、または抑制するように化学的に改変される、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

【請求項 5】

前記A A V空キャプシドが、架橋剤で処理されるか、または細胞上に発現するA A V受

容体への結合の低下もしくは減少を示す変異型キャプシドを含む、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

【請求項 6】

前記変異型キャプシドが、非荷電または疎水性残基と置換されている、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの結合に寄与する 1 または複数のアルギニン残基を含む、請求項 5 に記載の処方物。

【請求項 7】

前記変異型キャプシドが、1 つ以上のアルギニン残基が位置 4 5 1、4 4 8、5 3 0、5 8 5、または 5 8 8 のいずれかで置換されている A A V 2 を含む、請求項 6 に記載の処方物。

10

【請求項 8】

前記変異型キャプシドが、1 つ以上のアルギニン残基が位置 4 5 1 でシステインと、位置 4 4 8 でシステインと、位置 5 3 0 でアラニンと、位置 5 8 5 でアラニンと、または位置 5 8 8 でアラニンとのいずれかで置換されている A A V 2 を含む、請求項 6 に記載の処方物。

【請求項 9】

前記トランスジーンが第 V I I I 因子をコードする、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

【請求項 10】

前記 A A V ベクターが、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される血清型を有するか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、または A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および / もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

20

【請求項 11】

前記 A A V 空キャプシドが、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される血清型であるか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、または A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および / もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

30

【請求項 12】

前記 A A V 空キャプシドが、前記 A A V ベクターと比較して、インビボもしくはインビトロで細胞を形質導入する能力が低下しているか、または前記 A A V ベクターが、前記 A A V 空キャプシドと比較して、インビボまたはインビトロで細胞を形質導入する能力がより高い、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

【請求項 13】

前記細胞が、肝臓、脾臓、肺、中枢神経系もしくは末梢神経系の細胞、脳もしくは脊椎 ( s p i n e ) 細胞、腎臓、眼、脾臓、皮膚、胸腺、精巣、肺、横隔膜、心臓 ( 心臓の )、筋肉もしくは腰筋、または腸細胞、脂肪組織、筋肉、滑膜細胞、軟骨細胞、破骨細胞、上皮細胞、内皮細胞、または唾液腺細胞、内耳神経細胞、または造血系細胞 ; または肝臓細胞、脾臓、肺、中枢神経系もしくは末梢神経系の細胞、脳もしくは脊椎細胞、腎臓、眼、脾臓、皮膚、胸腺、精巣、肺、横隔膜、心臓 ( 心臓の )、筋肉もしくは腰筋、もしくは腸細胞、脂肪組織、筋肉、滑膜細胞、軟骨細胞、破骨細胞、上皮細胞、内皮細胞、もしくは唾液腺細胞、内耳神経細胞、もしくは造血系細胞へ発生もしくは分化する多能性前駆細胞もしくは複能性前駆細胞などの幹細胞を含む、請求項 1 2 に記載の処方物。

40

【請求項 14】

前記細胞が、肝臓の肝実質細胞もしくは類洞内皮細胞、島細胞、神経細胞、グリア細胞、もしくは上皮細胞、網膜細胞、内分泌細胞、白色、褐色、もしくはベージュ脂肪組織

50

細胞、線維芽細胞、血球もしくはリンパ球；または肝実質細胞もしくは類洞内皮細胞、島細胞、神経細胞、グリア細胞、もしくは上皮細胞、網膜細胞、内分泌細胞、白色、褐色、もしくはベージュ脂肪組織細胞、線維芽細胞、血球もしくはリンパ球へ発生もしくは分化する幹細胞、多能性前駆細胞もしくは複能性前駆細胞を含む、請求項 1 2 に記載の処方物。

【請求項 1 5】

前記 A A V ベクターと A A V 空キャプシド ( A A V ベクター : A A V 空キャプシド ) が、約 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、または 1 : 1 0 の A A V ベクター 対 A A V 空キャプシドの比率にある、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

10

【請求項 1 6】

前記 A A V ベクターと A A V 空キャプシド ( A A V ウイルスベクター : A A V 空キャプシド ) が、約 1 : 1 ~ 1 : 9 の A A V ベクター 対 A A V 空キャプシドの比率にある、請求項 1 または 2 に記載の処方物。

【請求項 1 7】

薬学的に許容され得る担体中に請求項 1 に記載の処方物を含む、A A V ベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するための薬学的組成物。

【請求項 1 8】

架橋された A A V 空キャプシドを含む、A A V ベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するための組成物。

20

【請求項 1 9】

架橋された A A V 空キャプシドを含む、A A V ベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するための薬学的組成物。

【請求項 2 0】

前記 A A V 空キャプシドが、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される血清型を含むか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、または A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および / もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、請求項 1 8 または 1 9 に記載の組成物。

30

【請求項 2 1】

血液凝固因子をコードするトランスジーン of 細胞への形質導入を増大させるか、または改善するための組み合わせ物であって、前記トランスジーンが A A V 遺伝子治療の目的で送達され、前記組み合わせ物が、以下：

a ) 前記トランスジーンを含む A A V ベクターであって、細胞に投与されることを特徴とする A A V ベクター；および

b ) A A V 空キャプシドであって、被験体に、前記トランスジーンの前記細胞への形質導入を増大させるか、または改善するのに有効な量で、投与されることを特徴とする、A A V 空キャプシド、  
を含み、そして

40

c ) 前記 A A V ベクター：前記 A A V 空キャプシドが、約 1 : 1 ~ 1 : 1 0 の A A V ベクター 対 A A V 空キャプシドの比率にある、組み合わせ物。

【請求項 2 2】

血液凝固因子をコードするトランスジーンを含む A A V ベクターに対する免疫応答を低下させるか、または抑制するための組み合わせ物であって、以下：

a ) 前記トランスジーンを含む A A V ベクターであって、被験体に投与されることを特徴とする A A V ベクター；および

b ) A A V 空キャプシドであって、前記被験体に、前記トランスジーンを含む前記 A A V ベクターに対する免疫応答を低下させるか、または抑制するのに有効な量で、投与されることを特徴とする、A A V 空キャプシド、

50

を含み、そして

c) 前記 A A V ベクター：前記 A A V 空キャプシドが、約 1 : 1 ~ 1 : 1 0 の A A V ベクター 対 A A V 空キャプシドの比率にある、組み合わせ物。

【請求項 2 3】

前記細胞が被験体内にある、請求項 2 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 2 4】

トランスジーンの被験体の細胞への送達を増大または改善するための組み合わせ物であって、有効量の請求項 1 または 2 に記載の処方物を含む、組み合わせ物。

【請求項 2 5】

前記被験体が、前記 A A V ベクターに対する先在する免疫応答を有するか、または前記 A A V ベクターに対する免疫応答を発生する可能性が高い、請求項 2 2、2 3、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

10

【請求項 2 6】

前記被験体が、凝固障害を有する、請求項 2 2、2 3、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 2 7】

前記血液凝固因子が、第 I X 因子、またはその活性化形態である、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 2 8】

前記血液凝固因子が、第 V I I I 因子、またはその活性化形態である、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

20

【請求項 2 9】

前記 A A V ベクターが、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される血清型を有するか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、もしくは A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および/もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 3 0】

前記 A A V 空キャプシドが、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される A A V 血清型由来であるか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、もしくは A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および/もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

30

【請求項 3 1】

前記細胞がインビトロまたはインビボにあるものである、請求項 2 1 または 2 3 に記載の組み合わせ物。

【請求項 3 2】

前記被験体がヒトである、請求項 2 2、2 3、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

40

【請求項 3 3】

前記 A A V 空キャプシドが、前記 A A V ベクターの前に、またはそれと実質的に同時に、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 3 4】

前記 A A V 空キャプシドが、前記 A A V ベクターと混合される、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 3 5】

投与される前記 A A V ベクター 対 前記 A A V 空キャプシドが、約 1 : 1 ~ 1 : 9 の間の A A V ベクター 対 A A V 空キャプシドの比率にある、請求項 2 1、2 2、または

50

24に記載の組み合わせ物。

【請求項36】

前記被験体が、約  $5 \times 10^{10}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $4.5 \times 10^{11}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $5 \times 10^{11}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

【請求項37】

前記被験体が、約  $5 \times 10^{10}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $5 \times 10^{12}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $5.05 \times 10^{12}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

10

【請求項38】

前記被験体が、約  $1 \times 10^{11}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $9 \times 10^{11}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $10 \times 10^{11}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

【請求項39】

前記被験体が、約  $1 \times 10^{11}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $1 \times 10^{13}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $1.01 \times 10^{13}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

20

【請求項40】

前記被験体が、約  $5 \times 10^{11}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $2 \times 10^{12}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $2.5 \times 10^{12}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

【請求項41】

前記被験体が、約  $5 \times 10^{11}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $4.5 \times 10^{12}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $5 \times 10^{12}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

30

【請求項42】

前記被験体が、約  $5 \times 10^{11}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $1 \times 10^{13}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $1.05 \times 10^{13}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

【請求項43】

前記被験体が、約  $1 \times 10^{12}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $4 \times 10^{12}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $5 \times 10^{12}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

40

【請求項44】

前記被験体が、約  $1 \times 10^{12}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $9 \times 10^{12}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $1 \times 10^{13}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項21、22、または24に記載の組み合わせ物。

【請求項45】

前記被験体が、約  $2 \times 10^{12}$  のAAVベクターゲノム/キログラム (vg/kg) および約  $8 \times 10^{12}$  のAAV空キャプシド/キログラム (cp/kg)、合計として、約  $1 \times 10^{13}$  vg + cp/kg のAAVベクター/キャプシド用量を投与されることを

50

特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 4 6】

前記被験体が、約  $5 \times 10^{12}$  の A A V ベクターゲノム / キログラム ( v g / k g ) および約  $5 \times 10^{12}$  の A A V 空キャプシド / キログラム ( c p / k g )、合計として、約  $1 \times 10^{13}$  v g + c p / k g の A A V ベクター / キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 4 7】

前記被験体が、約  $1 \times 10^{13}$  の A A V ベクターゲノム / キログラム ( v g / k g ) および約  $1 \times 10^{13}$  の A A V 空キャプシド / キログラム ( c p / k g )、合計として、約  $2 \times 10^{13}$  v g + c p / k g の A A V ベクター / キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

10

【請求項 4 8】

前記被験体が、約  $1 \times 10^{13}$  の A A V ベクターゲノム / キログラム ( v g / k g ) および約  $4 \times 10^{13}$  の A A V 空キャプシド / キログラム ( c p / k g )、合計として、約  $5 \times 10^{13}$  v g + c p / k g の A A V ベクター / キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 4 9】

前記被験体が、約  $2 \times 10^{13}$  の A A V ベクターゲノム / キログラム ( v g / k g ) および約  $4 \times 10^{13}$  の A A V 空キャプシド / キログラム ( c p / k g )、合計として、約  $6 \times 10^{13}$  v g + c p / k g の A A V ベクター / キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

20

【請求項 5 0】

前記被験体が、約  $5 \times 10^{13}$  の A A V ベクターゲノム / キログラム ( v g / k g ) および約  $5 \times 10^{13}$  の A A V 空キャプシド / キログラム ( c p / k g )、合計として、約  $1 \times 10^{14}$  v g + c p / k g の A A V ベクター / キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 5 1】

前記被験体が、約  $1 \times 10^{14}$  の A A V ベクターゲノム / キログラム ( v g / k g ) および約  $1 \times 10^{14}$  の A A V 空キャプシド / キログラム ( c p / k g )、合計として、約  $2 \times 10^{14}$  v g + c p / k g の A A V ベクター / キャプシド用量を投与されることを特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

30

【請求項 5 2】

前記 A A V ベクター、または前記 A A V 空キャプシドが、全身性に、領域性に、もしくは局所性に、および / または注射を介して、注入を介して、もしくはカテーテルを介して投与されることを特徴とする、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 5 3】

前記 A A V ベクター、または前記 A A V 空キャプシドが、静脈内に、動脈内に、眼内に、脳室内に、くも膜下腔内に、槽内に、腹腔内に、関節内に、筋肉内に、皮下に、頭蓋内に、局所的に、経皮的に、皮内に、光学的に、非経口的に (例えば、経粘膜)、経口的に (例えば、経口摂取または鼻腔内または吸入)、投与されることを特徴とする請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

40

【請求項 5 4】

前記 A A V ベクター : 前記 A A V 空キャプシドが、約 1 : 1 ~ 1 : 9 の A A V ベクター対 A A V 空キャプシドの比率にある、請求項 1 または 2 に記載の処方物、あるいは、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【請求項 5 5】

前記 A A V ベクター : 前記 A A V 空キャプシドが、約 1 : 2 ~ 1 : 6 の A A V ベクター対 A A V 空キャプシドの比率にある、請求項 1 または 2 に記載の処方物、あるいは、請求項 2 1、2 2、または 2 4 に記載の組み合わせ物。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

この出願は、2012年8月10日に出願された出願第61/682,019号、2012年8月26日に出願された出願第61/639,025号および2011年11月22日に出願された出願第61/562,795号（これら出願の全ては、それらの全体が参考として本明細書に明示的に援用される）に対する優先権を主張する。

## 【0002】

## 政府の支援

本発明は、National Institutes of HealthおよびHoward Hughes Medical Instituteによって付与された助成金第HL078810号の下、政府の支援を受けてなされた。米国政府は、本発明に権利を有する。

## 【0003】

本出願は、遺伝子治療および分子生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、ウイルス中和を緩和し、かつ望ましくない抗AAV免疫応答を回避し、それにしたがって、治療用ポリヌクレオチドの効率的な血管内送達およびより予想可能な発現、ならびに存在する抗ベクター免疫の存在下における再投与の能力を提供するように処方されているアデノ随伴ウイルスベクターの組成物を提供する。

## 【背景技術】

## 【0004】

## 導入

アデノ随伴ウイルスは、parvoviridae科、parvovirinae亜科、dependovirus属、adeno-associated virus種のヘルパー依存性ウイルスである。それは、複製のためにヘルパーウイルスを必要とし、それゆえに、自然感染は、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスの感染の状況において起こる。アデノ随伴ウイルスの感染が引き起こす病態は知られていない。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、主に遺伝的疾患の処置のために用いられる、スケーラブルで、効率的な非細胞変性遺伝子送達媒体である（Mingozzi F.ら、Nat. Rev. Genet. 2011; 12: 341-355）。非分裂細胞を形質導入し、かつエピソーム的に持続するそれらの能力は、動物において長期のトランスジーン発現をもたらす。広範囲のヒト疾患の動物モデルが、AAVベクターによる処置に成功しており、その疾患には、脳、心臓、肺、眼、および肝臓の疾患が挙げられる（Mingozzi F.ら、Nat. Rev. Genet. 2011; 12: 341-355）。血友病Bは、遺伝子移入ベクターの使用のアプローチしやすい標的であり、低くも第IX因子（hFIX）の野生型レベルの1~2%の発現により治療効果が実現され得るからである（High KA.、Ann. NY Acad. Sci. 2001; 953: 64-74）。

## 【0005】

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、インビボの遺伝子移入のための最も有望なウイルスベクターの一つである。近年、実験動物モデルおよびヒトにおけるいくつかの研究が、この治療プラットフォームの可能性を示した。特に、RPE65欠損症および血友病Bに冒されたヒトにおいて有効性データの確信が得られている。いくつかのAAVに基づいた遺伝子移入製造物が、今、多くの適応症について臨床試験中であり、いくつかの場合では、臨床開発は、後期およびライセンス供与に向かいつつある。

## 【0006】

様々な障害の処置へのAAVに基づいた遺伝子治療アプローチの有望さにもかかわらず、アデノ随伴ウイルス（AAV）またはAAVベクターへの曝露後、免疫応答が起き、これらの防御応答は、AAVベクターの治療効力を限定する可能性がある。体液性応答（抗AAV中和抗体またはNAbs）は、ウイルス中和を生じる場合が多く、標的細胞のウイルス形質導入の有意な低下を引き起こし、それにより、送達される治療用ポリペプチドの量

10

20

30

40

50

を制限する。抗AAV中和抗体は、AAVベクターを効率的に中和する；これは、ヒト(Manno C.S.ら、Nat Med. 2006; 12: 342-347)、マウス(Scallan C.D.ら、Blood. 2006; 107: 1810-1817)、および非ヒト霊長類(Jiang H.ら、Blood. 2006; 108: 3321-3328)において報告されている。AAVベクターに曝露された被験体は、全ての4つのIgGサブクラスのAAVキャプシドに対するIgMおよびIgG応答を含む、体液性免疫応答を示した。臨床試験被験体におけるAAVキャプシドに対するIgG応答は、先在する抗AAV抗体のレベルに反比例し、ベクター用量とは無関係であった。ヒトはまた、天然で、野生型AAVに曝され、したがって、彼らは、全てのAAV血清型と交差反応する抗体を生じる。複雑にさせるさらなる要因は、NAbをスクリーニングするために現在、実施されているアッセイの感度があまり高くなく、それゆえに、これらのアッセイで陰性または低力価と判定される被験体でさえ、実際、AAV形質導入をブロックするのに十分である低レベルの抗AAV抗体を有する場合がある。

10

#### 【0007】

抗体応答に加えて、AAVベクターに曝露された個体はまた、AAVベクターキャプシドに対して特異的に向けられる細胞傷害性T細胞(CTL)応答を生じる(Li H.ら、Nature. 475、217-221(2011); Arruda V.R.ら、Blood. 115、4678-4688(2010); Chen Y.H.ら、Nat. Med. 15、1215-1218(2009); Boutin S.ら、Hum. Gene Ther. 21、704-712(2010); Calcedo R.ら、J. Infect. Dis. 199、381-390(2009))。これらのCTL応答は、AAVベクターを形質導入された細胞のクリアランスの原因であり、結果として、治療効力の制限が生じる。CTL応答は、ベクター用量依存的な様式で引き起こされ(Li H.ら、Nature. 475、217-221(2011); Chen Y.H.ら、Nat. Med. 15、1215-1218(2009); Calcedo R.ら、J. Infect. Dis. 199、381-390(2009))、それゆえに、より低いベクター用量で高レベルの形質導入効率を達成することの重要性の根拠となる。

20

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0008】

【非特許文献1】Mingozzi F.ら、Nat. Rev. Genet. (2011) 12: 341~355

【非特許文献2】High K.A., Ann. NY Acad. Sci. (2001) 953: 64~74

30

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

遺伝子治療専門家にとって難しいこととは、細胞形質導入を増加させるためにより高い力価のベクターを用いるという、第1の障壁への明らかな解決法が、抗ベクター応答の誘発および形質導入された細胞の破壊を回避するために全体的なベクター用量ができる限り低いことを必要とするという、第2の障壁の回避の成功を侵害する傾向があることである。したがって、前述の難点を改善または回避するAAVベクターの処方の向上が大いに望ましい。

40

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明に従って、遺伝子治療を目的とする投与および遺伝子形質導入のためのウイルスベクター処方物が提供される。一実施形態において、処方物は、あらかじめ決められた比率のウイルスベクターと空キャプシドを含み、そのウイルスベクターが、トランスジーンを含み、かつ空キャプシドのあらかじめ決められる量が、前記患者において前記処方物に対する望まれない免疫応答を抑制するように計算される。別の実施形態において、処方物

50

は、あらかじめ決められた比率のウイルスベクターとウイルスゲノム含有キャプシドを含み、そのウイルスベクターが、トランスジーンを含み、かつウイルスゲノム含有キャプシドのあらかじめ決められる量が、前記患者において前記処方物に対する望まれない免疫応答を抑制するように計算される。さらに別の実施形態において、処方物は、あらかじめ決められた比率のウイルスベクターとキャプシドタンパク質を含み、そのウイルスベクターがトランスジーンを含み、かつキャプシドタンパク質のあらかじめ決められる量が、前記患者において前記処方物に対する望まれない免疫応答を抑制するように計算される。

#### 【0011】

本発明に従って、ウイルスベクター処方物を用いることにより提供される、患者への遺伝子治療を目的とする遺伝子形質導入を増加または向上させる方法もまた、提供される。一実施形態において、方法は、トランスジーンを含むウイルスベクターを細胞に投与するステップ；および空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質を、トランスジーンの細胞への形質導入を増加または向上させるのに有効な量で被験体に投与するステップを含む。別の実施形態において、方法は、あらかじめ決められた比率のウイルスベクターの投与と空キャプシドの投与を含み、そのウイルスベクターが、トランスジーンを含み、かつ空キャプシドのあらかじめ決められる量が、前記患者において前記処方物に対する望まれない免疫応答を抑制するように計算される。さらなる実施形態において、方法は、あらかじめ決められた比率のウイルスベクターとウイルスゲノム含有キャプシドの投与を含み、そのウイルスベクターが、トランスジーンを含み、かつウイルスゲノム含有キャプシドのあらかじめ決められる量が、前記患者において前記処方物に対する望まれない免疫応答を抑制するように計算される。さらに別の実施形態において、方法は、あらかじめ決められた比率のウイルスベクターとキャプシドタンパク質の投与を含み、そのウイルスベクターがトランスジーンを含み、かつキャプシドタンパク質のあらかじめ決められる量が、前記患者において前記処方物に対する望まれない免疫応答を抑制するように計算される。

#### 【0012】

本発明に従って、トランスジーンを含むウイルスベクターに対する免疫応答を低下させるか、または抑制するための方法がさらに提供される。一実施形態において、方法は、トランスジーンを含むウイルスベクターを被験体に投与するステップ；および空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質を、トランスジーンを含むウイルスベクターに対する免疫応答を低下させるか、または抑制するのに有効な量で被験体に投与するステップを含む。

#### 【0013】

そのような方法において、ウイルスベクターおよび空キャプシドは、別々に（例えば、逐次的に）投与することができ、ウイルスベクターおよびウイルスゲノム含有キャプシドは、別々に（例えば、逐次的に）投与することができ、ならびにウイルスベクターおよびキャプシドタンパク質は、別々に（例えば、逐次的に）投与することができる。そのような方法において、ウイルスベクターおよび空キャプシドは、同時に、または組み合わせとして投与することができ、ウイルスベクターおよびウイルスゲノム含有キャプシドは、同時に、または組み合わせとして投与することができ、ならびにウイルスベクターおよびキャプシドタンパク質は、同時に、または組み合わせとして投与することができる。

#### 【0014】

本明細書に開示された本発明の処方物、組成物、方法、および使用の特定の実施形態において、ウイルスベクターおよびキャプシド（空またはゲノム含有）またはキャプシドタンパク質は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターまたはAAVキャプシドである。そのようなAAVベクター、キャプシド（空またはゲノム含有）またはキャプシドタンパク質は、同一の、または異なる血清型であり得、任意の天然の、および非天然のAAV血清型であり得る。そのような非限定的血清型には、例えば、AAV-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-rh74、-rh10、およびAAV-2i8が挙げられる。

## 【 0 0 1 5 】

一態様において、空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはキャプシドタンパク質は、改変されていない。別の態様において、空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはキャプシドタンパク質は、細胞取り込みを低下させるか、または抑制するように改変されている。特別の態様において、キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはキャプシドタンパク質は、（例えば、化学的に）架橋され得、または改変され得る（受容体結合を低下させるためにアミノ酸残基が置換される）。さらなる特別の態様において、ウイルスエンベロープ（例えば、キャプシド）は、細胞受容体への結合（例えば、ヘパラン硫酸プロテオグリカンへの結合）を低下させるように改変される（例えば、変異している）。様々なそのような態様において、空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはキャプシドタンパク質の改変されていない、または改変されたタンパク質（例えば、キャプシドタンパク質）は、トランスジーンを含有するウイルスベクターと比較して、受容体に結合する（例えば、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合する）能力または（インビトロ、エキスピボ、またはインビボで）細胞を形質導入する能力が低下している。他のそのような態様において、トランスジーンを含有するウイルスベクターは、空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはキャプシドタンパク質の改変されていない、または改変されたタンパク質（例えば、キャプシドタンパク質）と比較して、受容体に結合する（例えば、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合する）能力または（インビトロ、エキスピボ、またはインビボで）細胞を形質導入する能力がより高い。

10

## 【 0 0 1 6 】

追加の態様において、ベクターおよびキャプシド（空またはゲノム含有）またはキャプシドタンパク質は、投与に適した生物学的に許容され得る担体中に存在する。様々な態様において、処方物の全身性、領域性、または局所性投与が用いられる。

20

## 【 0 0 1 7 】

トランスジーンを細胞へ送達するための方法であって、処方物の投与を必要とする患者への有効量の処方物の投与を含む方法もまた提供される。一実施形態において、患者は、代謝性または遺伝的障害を有し、トランスジーンは、その障害の1つ以上の症状を矯正し、または寛解させる治療用分子をコードする。

## 【 0 0 1 8 】

A A Vの任意の血清型が、本発明の処方物および方法および使用に用いられてもよい。一つのアプローチにおいて、キャプシド（空またはゲノム含有）またはキャプシドタンパク質およびウイルスベクターは、同じ血清型由来である。別のアプローチにおいて、キャプシド（空またはゲノム含有）またはキャプシドタンパク質およびウイルスベクターは、A A Vの異なる血清型から得られる。

30

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目1）

あらかじめ決められた比率のウイルスベクターと、空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質のいずれかとを含む、被験体への投与のためのウイルスベクター処方物であって、前記ウイルスベクターがトランスジーンを含み、かつ前記空キャプシド、前記ウイルスゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスキャプシドタンパク質が、患者における前記処方物に対する望まれない免疫応答を抑制する、ウイルスベクター処方物。

40

（項目2）

あらかじめ決められた比率のウイルスベクターと、空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質のいずれかとを含む処方物であって、前記ウイルスベクターがトランスジーンを含み、かつ前記空キャプシド、前記ウイルスゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスキャプシドタンパク質が、前記ウイルスベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するように、被験体由来の生物学的試料中に測定される、前記ウイルスベクターに結合するか、または前記ウイルスベクターと反応するだろう抗体の量に従って調整される量である、処方物。

50

( 項目 3 )

前記トランスジーンが、前記ウイルスベクターに関して外来のものである、項目 1 または 2 に記載の処方物。

( 項目 4 )

前記空キャプシド、前記ウイルスゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスキャプシドタンパク質が、細胞取り込みを低下させるか、または抑制するように化学的に改変される、項目 1 または 2 に記載の処方物。

( 項目 5 )

前記空キャプシド、前記ウイルスゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスキャプシドタンパク質が、架橋剤で処理されるか、または細胞上に発現する A A V 受容体への結合の低下もしくは減少を示す変異型キャプシドを含む、項目 1 または 2 に記載の処方物。

10

( 項目 6 )

前記変異型キャプシドが、非荷電または疎水性残基と置換されている、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの結合に寄与する 1 または複数のアルギニン残基を含む、項目 5 に記載の処方物。

( 項目 7 )

前記変異型キャプシドが、1 つ以上のアルギニン残基が位置 4 5 1、4 4 8、5 3 0、5 8 5、または 5 8 8 のいずれかで置換されている A A V 2 を含む、項目 6 に記載の処方物。

( 項目 8 )

前記変異型キャプシドが、1 つ以上のアルギニン残基が位置 4 5 1 でシステインと、位置 4 4 8 でシステインと、位置 5 3 0 でアラニンと、位置 5 8 5 でアラニンと、または位置 5 8 8 でアラニンとのいずれかで置換されている A A V 2 を含む、項目 6 に記載の処方物。

20

( 項目 9 )

前記ウイルスベクター、および前記空キャプシド、前記ウイルスゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスキャプシドタンパク質が、A A V ベクター、および A A V 空キャプシド、A A V ウイルスゲノム含有キャプシド、または A A V キャプシドタンパク質である、項目 1 または 2 に記載の処方物。

( 項目 1 0 )

前記トランスジーン配列がタンパク質またはペプチドをコードする、項目 3 に記載の処方物。

30

( 項目 1 1 )

前記タンパク質または前記ペプチドが、嚢胞性線維症膜貫通制御因子タンパク質 ( C F T R )、ジストロフィン、ユートロフィン、血液凝固因子 ( 凝固因子 ) ( 例えば、第 X I I 因子、第 I X 因子、第 X 因子、第 V I I I 因子、第 V I I a 因子、プロテイン C、第 V I I 因子、B ドメイン欠損第 V I I I 因子、または凝固因子の高活性もしくは長時間半減期改変体、または凝固因子の活性形態もしくは不活性形態)、モノクローナル抗体、網膜色素上皮特異的 6 5 k D a タンパク質 ( R P E 6 5 )、エリスロポイエチン、L D L 受容体、リボ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 ( A D A )、金属輸送体 ( A T P 7 A または A T P 7 )、スルファミダーゼ、リソソーム蓄積症に関与する酵素 ( A R S A )、ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、  
- 2 5 グルコセレブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、リソソームヘキソサミニダーゼ、分岐鎖ケト酸脱水素酵素、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、上皮成長因子、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、トランスフォーミング成長因子 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 - 1 2、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、リンフォトキシン、自殺遺伝子産物、単純ヘルペスウイルスチ

40

50

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 P 4 5 0、デオキシシチジンキナーゼ、腫瘍壊死因子、薬剤抵抗性タンパク質、腫瘍抑制タンパク質（例えば、p 5 3、R b、W t - 1、N F 1、フォンヒッペル・リンダウ（V H L）、S E R C A 2 a、大腸腺腫性ポリポーシス（A P C）、V E G F、マイクロジストロフィン、リソソーム酸リパーゼ、アリルスルファターゼ A および B、A T P 7 A および B、免疫調節性を有するペプチド、免疫寛容誘発または免疫原性ペプチドまたはタンパク質 T r e g i t o p e または h C D R 1、インスリン、グルコキナーゼ、グアニル酸シクラーゼ 2 D（L C A - G U C Y 2 D）、R a b エスコートタンパク質 1（コロイデレミア）、L C A 5（L C A - 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（脳回転状萎縮）、レチノスキシン 1（X 連鎖性網膜分離症）、U S H 1 C（アッシャー症候群 1 C）、X 連鎖性網膜色素変性症 G T P アーゼ（X L R P）、M E R T K（R P：網膜色素変性症の A R 形態）、D F N B 1（コネキシン 2 6 聴覚消失）、A C H M 2、3、および 4（全色盲）、P K D - 1 または P K D - 2（多発性嚢胞腎）、T P P 1、C L N 2、リソソーム蓄積症に関連する遺伝子産物（例えば、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、G M 2 - A P、N P C 1、V P C 2、スフィンゴ脂質活性化タンパク質、またはゲノム編集のための 1 つもしくは複数のジंकフィンガーヌクレアーゼ、またはゲノム編集のための修復鋳型として用いられるドナー配列からなる群から選択される、項目 1 0 に記載の処方物。

10

（項目 1 2）

前記トランスジーンが、発現によりゲノム D N A の転写、同族 m R N A の発現、または R N A の安定性もしくは半減期を調節する核酸をコードする、項目 3 に記載の処方物。

20

（項目 1 3）

前記核酸が抑制性ポリヌクレオチドを含む、項目 1 2 に記載の処方物。

（項目 1 4）

前記ウイルスベクターが、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される血清型を有するアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターであるか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、または A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および / もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、項目 1 または 2 に記載の処方物。

30

（項目 1 5）

前記空キャプシドまたは前記ウイルスキャプシドタンパク質が、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される血清型であるか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 1 0、- 1 1、- r h 7 4、- r h 1 0、または A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および / もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、項目 1 または 2 に記載の処方物。

（項目 1 6）

前記空キャプシドもしくは前記ウイルスゲノム含有キャプシドが、前記ウイルスベクターと比較して、インピボもしくはインピトロで細胞を形質導入する能力が低下しているか、または前記ウイルスベクターが、前記空キャプシドもしくは前記ウイルスゲノム含有キャプシドと比較して、インピボまたはインピトロで細胞を形質導入する能力がより高い、項目 1 または 2 に記載の処方物。

40

（項目 1 7）

前記細胞が、肝臓、脾臓、肺、中枢神経系もしくは末梢神経系の細胞、脳もしくは脊椎（s p i n e）細胞、腎臓、眼、脾臓、皮膚、胸腺、精巣、肺、横隔膜、心臓（心臓の）、筋肉もしくは腰筋、または腸細胞、脂肪組織、筋肉、滑膜細胞、軟骨細胞、破骨細胞、上皮細胞、内皮細胞、または唾液腺細胞、内耳神経細胞、または造血系細胞；または肝臓細胞、脾臓、肺、中枢神経系もしくは末梢神経系の細胞、脳もしくは脊椎細胞、腎臓、眼

50

、脾臓、皮膚、胸腺、精巣、肺、横隔膜、心臓（心臓の）、筋肉もしくは腰筋、もしくは腸細胞、脂肪組織、筋肉、滑膜細胞、軟骨細胞、破骨細胞、上皮細胞、内皮細胞、もしくは唾液腺細胞、内耳神経細胞、もしくは造血系細胞へ発生もしくは分化する多能性前駆細胞もしくは複能性前駆細胞などの幹細胞を含む、項目 16 に記載の処方物。

（項目 18）

前記細胞が、肝臓の肝実質細胞もしくは類洞内皮細胞、島細胞、神経細胞、グリア細胞、もしくは上皮細胞、網膜細胞、内分泌細胞、白色、褐色、もしくはベージュ脂肪組織細胞、線維芽細胞、血球もしくはリンパ球；または肝実質細胞もしくは類洞内皮細胞、島細胞、神経細胞、グリア細胞、もしくは上皮細胞、網膜細胞、内分泌細胞、白色、褐色、もしくはベージュ脂肪組織細胞、線維芽細胞、血球もしくはリンパ球へ発生もしくは分化する幹細胞、多能性前駆細胞もしくは複能性前駆細胞を含む、項目 16 に記載の処方物。

10

（項目 19）

ウイルスベクターと空キャプシドの前記あらかじめ決められた比率（ウイルスベクター：空キャプシド）が、約 1：1、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：7、1：8、1：9、1：10、1：11、1：12、1：13、1：14、1：15、1：16、1：18、1：20、1：21、1：22、1：23、1：24、1：25、またはそれを超えるウイルスベクター 対 空キャプシドの比率である、項目 1 または 2 に記載の処方物。

（項目 20）

ウイルスベクターと空キャプシドの前記あらかじめ決められた比率（ウイルスベクター：空キャプシド）が、約 1：10～1：50、1：50～1：100、1：100～1：1000、1：1000～1：5,000、1：5,000～1：10,000、1：10,000～1：25,000、1：25,000～1：50,000、1：50,000～1：100,000、000 またはそれを超えるウイルスベクター 対 空キャプシドの比率である、項目 1 または 2 に記載の処方物。

20

（項目 21）

薬学的に許容され得る担体中に項目 1 に記載の処方物を含む、薬学的組成物。

（項目 22）

架橋された AAV 空キャプシドまたは架橋された AAV ゲノム含有キャプシドを含むか、またはそれらからなる組成物。

30

（項目 23）

架橋された AAV 空キャプシドまたは架橋された AAV ゲノム含有キャプシドを含むか、またはそれらからなる薬学的組成物。

（項目 24）

前記 AAV 空キャプシド、前記 AAV ゲノム含有キャプシド、または AAV キャプシドタンパク質が、AAV-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-rh74、-rh10、および AAV-2i8 からなる群から選択される血清型を含むか、または AAV-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-rh74、-rh10、または AAV-2i8 vp1、vp2、および/もしくは vp3 キャプシド配列に少なくとも 95% 同一のキャプシド配列を含む、項目 22 または 23 に記載の組成物。

40

（項目 25）

トランスジーンを細胞への形質導入を増大させるか、または改善するための方法であって、前記トランスジーンがウイルス遺伝子治療の目的で送達され、以下：

- a) 前記トランスジーンを含むウイルスベクターを細胞に投与するステップ；および
- b) 空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質を被験体に、前記トランスジーンの前記細胞への形質導入を増大させるか、または改善するのに有効な量で、投与するステップ、を含む、方法。

50

( 項目 2 6 )

トランスジーンを含むウイルスベクターに対する免疫応答を低下させるか、または抑制するための方法であって、以下：

- a ) 前記トランスジーンを含むウイルスベクターを被験体に投与するステップ；および
- b ) 空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質を前記被験体に、前記トランスジーンを含む前記ウイルスベクターに対する免疫応答を低下させるか、または抑制するのに有効な量で、投与するステップ、を含む、方法。

( 項目 2 7 )

前記細胞が被験体内にある、項目 2 5 に記載の方法。

10

( 項目 2 8 )

トランスジーンを被験体の細胞に送達するための方法であって、有効量の項目 1 または 2 に記載の処方物の、それを必要とする前記被験体への投与を含む、方法。

( 項目 2 9 )

前記被験体が、前記ウイルスベクターに対する先在する免疫応答を有するか、または前記ウイルスベクターに対する免疫応答を発生する可能性が高い、項目 2 6、2 7、または 2 8 に記載の方法。

( 項目 3 0 )

前記被験体が、凝固障害を有し、かつ前記トランスジーンが凝固因子をコードする、項目 2 6、2 7、または 2 8 に記載の方法。

20

( 項目 3 1 )

前記凝固因子が、ヒトプロテイン C、第 V I I 因子、B ドメイン欠損第 V I I I 因子、第 I X 因子、またはそれらの活性化形態である、項目 3 0 に記載の方法。

( 項目 3 2 )

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターである、項目 2 5、2 6、または 2 8 に記載の方法。

( 項目 3 3 )

前記ウイルスベクターが、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される血清型を有するアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターであるか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、もしくは A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および / もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、項目 2 5、2 6、または 2 8 に記載の方法。

30

( 項目 3 4 )

前記空キャプシドまたは前記ウイルスキャプシドタンパク質が、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、および A A V - 2 i 8 からなる群から選択される A A V 血清型由来であるか、または A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、もしくは A A V - 2 i 8 v p 1、v p 2、および / もしくは v p 3 キャプシド配列に少なくとも 9 5 % 同一のキャプシド配列を含む、項目 2 5、2 6、または 2 8 に記載の方法。

40

( 項目 3 5 )

前記細胞がインビトロまたはインビボにあるものである、項目 2 5 または 2 7 に記載の方法。

( 項目 3 6 )

前記被験体がヒトである、項目 2 6、2 7、または 2 8 に記載の方法。

( 項目 3 7 )

トランスジーン発現から利益を受けるだろう、またはトランスジーン発現を必要とする被験体にトランスジーンを送達するための方法であって、以下：

50

a) 被験体由来の生物学的試料を測定して、ウイルスペクターに結合するか、またはウイルスペクターと反応するだろう抗体の存在および/または量を決定するステップ；

b) 前記ウイルスペクターに結合するか、または前記ウイルスペクターと反応する抗体を有する被験体を選択するステップ；

c) 選択された前記被験体に、トランスジーンを含むウイルスペクターを投与するステップであって、前記ウイルスペクターが前記被験体における前記抗体に結合するか、または前記抗体と反応する、ステップ；ならびに

d) 前記ウイルスペクターに結合するか、または前記ウイルスペクターと反応する前記生物学的試料中で測定される抗体の量に従って調整され、かつ前記ウイルスペクターに対する望まれない免疫応答を抑制するか、または低下させるように計算される量で、空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、またはウイルスクャプシドタンパク質を、選択された前記被験体に投与するステップ、  
を含む、方法。

(項目38)

前記ウイルスペクターがAAVベクターを含む、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目39)

前記空キャプシド、前記ウイルスゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスクャプシドタンパク質が、AAV空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはウイルスクャプシドタンパク質を含む、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目40)

前記空キャプシド、前記ゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスクャプシドタンパク質が、前記ウイルスペクターの前に、またはそれと実質的に同時に、前記被験体に投与される、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目41)

前記空キャプシド、前記ゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスクャプシドタンパク質が、前記ウイルスペクターと混合され、そして前記被験体に投与される、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目42)

投与される前記ウイルスペクター 対 前記空キャプシドまたは前記ゲノム含有キャプシドの比率が、約1:10~1:50、1:50~1:100、1:100~1:1000、1:1000~1:5000、1:5000~1:10000、1:10000~1:100000、1:100000~1:1000000、1:1000000~1:10000000、1:10000000~1:100000000、1:100000000~1:1000000000の間またはそれを超えるウイルスペクター 対 空キャプシドまたはゲノム含有キャプシドの比率にある、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目43)

前記トランスジーン配列がタンパク質またはペプチドをコードする、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目44)

前記タンパク質または前記ペプチドが、嚢胞性線維症膜貫通制御因子タンパク質(CFTR)、ジストロフィン、ユートロフィン、血液凝固因子(凝固因子)(例えば、第XI因子、第IX因子、第X因子、第VIII因子、第VIIIa因子、プロテインC、第VIII因子、Bドメイン欠損第VIII因子、または凝固因子の高活性もしくは長時間半減期改変体、または凝固因子の活性形態もしくは不活性形態)、モノクローナル抗体、網膜色素上皮特異的65kDaタンパク質(RPE65)、エリスロポイエチン、LDL受容体、リボ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、リソソーム蓄積症に関与する酵素(ARSA)、ヒポキサンチンゲアニ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

10

20

30

40

50

ーゼ、分岐鎖ケト酸脱水素酵素、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、上皮成長因子、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、トランスフォーミング成長因子 および、サイトカイン、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、インターフェロン- $\gamma$ 、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、リンフォトキシン、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、薬剤抵抗性タンパク質、腫瘍抑制タンパク質(例えば、p53、Rb、Wt-1、NF1、フォンヒッペル・リンダウ(VHL)、SERCA2a、大腸腺腫性ポリポーシス(APC))、VEGF、マイクロジストロフィン、リソソーム酸リパーゼ、アシルスルファターゼAおよびB、ATP7AおよびB、免疫調節性を有するペプチド、免疫寛容誘発または免疫原性ペプチドまたはタンパク質Tregetope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(コロイデレミア)、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(脳回転状萎縮)、レチノスキシン1(X連鎖性網膜分離症)、USH1C(アッシャー症候群1C)、X連鎖性網膜色素変性症GTPアーゼ(XLRP)、MERTK(RP:網膜色素変性症のAR形態)、DFNB1(コネキシン26聴覚消失)、ACHM 2、3、および4(全色盲)、PKD-1またはPKD-2(多発性嚢胞腎)、TPP1、CLN2、リソソーム蓄積症に關与する遺伝子産物(例えば、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、またはゲノム編集のための1つもしくは複数のジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはゲノム編集のための修復鋳型として用いられるドナー配列からなる群から選択される、項目43に記載の方法。

(項目45)

前記トランスジーンが、発現によりゲノムDNAの転写、同族mRNAの発現、またはRNAの安定性もしくは半減期を調節する核酸をコードする、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目46)

前記核酸が抑制性ポリヌクレオチドを含む、項目45に記載の方法。

(項目47)

前記被験体が、約 $5 \times 10^{10}$ のウイルスベクターゲノム/キログラム(vg/kg)および/または約 $4.5 \times 10^{11}$ の空キャプシド/キログラム(cp/kg)、合計として、約 $5 \times 10^{11}$  vg + cp/kgのウイルスベクター/キャプシド用量を投与される、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目48)

前記被験体が、約 $5 \times 10^{10}$ のウイルスベクターゲノム/キログラム(vg/kg)および/または約 $5 \times 10^{12}$ の空キャプシド/キログラム(cp/kg)、合計として、約 $5.05 \times 10^{12}$  vg + cp/kgのウイルスベクター/キャプシド用量を投与される、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目49)

前記被験体が、約 $1 \times 10^{11}$ のウイルスベクターゲノム/キログラム(vg/kg)および/または約 $9 \times 10^{11}$ の空キャプシド/キログラム(cp/kg)、合計として、約 $10 \times 10^{11}$  vg + cp/kgのウイルスベクター/キャプシド用量を投与される、項目25、26、28、または37に記載の方法。

(項目50)

前記被験体が、約 $1 \times 10^{11}$ のウイルスベクターゲノム/キログラム(vg/kg)および/または約 $1 \times 10^{13}$ の空キャプシド/キログラム(cp/kg)、合計として、約 $1.01 \times 10^{13}$  vg + cp/kgのウイルスベクター/キャプシド用量を投与される、項目25、26、28、または37に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 5 1)

前記被験体が、約  $5 \times 10^{11}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $2 \times 10^{12}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $2.5 \times 10^{12} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記被験体が、約  $5 \times 10^{11}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $4.5 \times 10^{12}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $5 \times 10^{12} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

10

(項目 5 3)

前記被験体が、約  $5 \times 10^{11}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $1 \times 10^{13}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $1.05 \times 10^{13} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記被験体が、約  $1 \times 10^{12}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $4 \times 10^{12}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $5 \times 10^{12} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

20

(項目 5 5)

前記被験体が、約  $1 \times 10^{12}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $9 \times 10^{12}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $1 \times 10^{13} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記被験体が、約  $2 \times 10^{12}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $8 \times 10^{12}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $1 \times 10^{13} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

30

(項目 5 7)

前記被験体が、約  $5 \times 10^{12}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $5 \times 10^{12}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $1 \times 10^{13} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記被験体が、約  $1 \times 10^{13}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $1 \times 10^{13}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $2 \times 10^{13} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

40

(項目 5 9)

前記被験体が、約  $1 \times 10^{13}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $4 \times 10^{13}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $5 \times 10^{13} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記被験体が、約  $2 \times 10^{13}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( $v g / k g$ ) および / または約  $4 \times 10^{13}$  の空キャプシド / キログラム ( $c p / k g$ )、合計として、約  $6 \times 10^{13} \quad v g + c p / k g$  のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 25、26、28、または 37 に記載の方法。

50

(項目 6 1)

前記被験体が、約  $5 \times 10^{13}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( v g / k g ) および / または約  $5 \times 10^{13}$  の空キャプシド / キログラム ( c p / k g )、合計として、約  $1 \times 10^{14}$  v g + c p / k g のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 2 5、2 6、2 8、または 3 7 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記被験体が、約  $1 \times 10^{14}$  のウイルスベクターゲノム / キログラム ( v g / k g ) および / または約  $1 \times 10^{14}$  の空キャプシド / キログラム ( c p / k g )、合計として、約  $2 \times 10^{14}$  v g + c p / k g のウイルスベクター / キャプシド用量を投与される、項目 2 5、2 6、2 8、または 3 7 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記ウイルスベクター、前記空キャプシド、前記ゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスキャプシドタンパク質が、全身性に、領域性に、もしくは局所性に、および / または注射を介して、注入を介して、もしくはカテーテルを介して投与される、項目 2 5、2 6、2 8、または 3 7 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記ウイルスベクター、前記空キャプシド、前記ゲノム含有キャプシド、または前記ウイルスキャプシドタンパク質が、静脈内に、動脈内に、眼内に、脳室内に、くも膜下腔内に、槽内に、腹腔内に、関節内に、筋肉内に、皮下に、頭蓋内に、局所的に、経皮的に、皮内に、光学的に、非経口的に (例えば、経粘膜)、経口的に (例えば、経口摂取または鼻腔内または吸入)、投与される項目 2 5、2 6、2 8、または 3 7 に記載の方法。

(項目 6 5)

前記ウイルスキャプシドタンパク質が、A A V v p 1、v p 2、もしくは v p 3 キャプシドタンパク質のいずれか、または A A V v p 1、v p 2、もしくは v p 3 キャプシドタンパク質のいずれかの組み合わせを含む、項目 1 もしくは 2 に記載の処方物、または項目 2 5、2 6、2 8、もしくは 3 6 に記載の方法。

(項目 6 6)

ウイルスベクターに対する被験体の望ましくない免疫応答を低下させるか、または抑制するための処方物を調製するための方法であって、前記組成物は、以下：

a ) ウイルスベクターに結合するか、またはウイルスベクターと反応するだろう、前記被験体由来の生物学的試料中に測定される抗体の量を伝達する情報を得るステップ；

b ) 得られた前記情報に基づいて、前記被験体に投与された場合、前記ウイルスベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するか、または低下させるように計算される空キャプシドの量を決定するステップ；および

c ) 空キャプシドまたはゲノム含有キャプシドを含む処方物を調製するステップであって、前記処方物中の空キャプシドまたはゲノム含有キャプシドの量が、前記ウイルスベクターに結合するか、または前記ウイルスベクターと反応するだろう、前記生物学的試料中に測定される抗体の量に従って調整され、かつ前記被験体に投与された場合、前記ウイルスベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するか、または低下させるように計算される、ステップ、

に従って調製される、方法。

(項目 6 7)

トランスジーンを含むウイルスベクターに対する被験体の望ましくない免疫応答を低下させるか、または抑制するための処方物を調製するための方法であって、前記組成物は、以下：

a ) 前記被験体由来の生物学的試料を測定して、ウイルスベクターに結合するか、またはウイルスベクターと反応するだろう抗体の量を定量化するステップ；および

b ) 空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質を含む処方物を調製するステップであって、前記処方物中の空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質の量が、前記ウイルスベクターに結合するか

10

20

30

40

50

、または前記ウイルスベクターと反応するだろう、前記生物学的試料中に測定される抗体の量に従って調整され、かつ前記被験体に投与された場合、前記ウイルスベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するか、または低下させるように計算される、ステップ、に従って調製される、方法。

(項目68)

トランスジーンから利益を受けるだろう、またはトランスジーンを必要としている被験体にトランスジーンを導入するための組成物を調製するための方法であって、前記組成物は、以下：

a) 前記被験体由来の生物学的試料を測定して、ウイルスに結合するか、またはウイルスと反応する抗体の量を定量化するステップ；

b) トランスジーンを含むウイルスベクターを提供するステップであって、前記ウイルスに結合するか、または前記ウイルスと反応する少なくとも1つの抗体がまた前記ウイルスベクターにも結合し、または前記ウイルスベクターと反応するように、前記ウイルスベクターが、少なくとも1つの抗原決定基を前記ウイルスと共有する、ステップ；および

c) 空キャプシドまたはウイルスゲノム含有キャプシドを含む処方物を調製するステップであって、前記処方物中の空キャプシドまたはウイルスゲノム含有キャプシドの量が、前記ウイルスベクターに結合するか、または前記ウイルスベクターと反応する抗体の量に従って調整され、かつ前記被験体に投与された場合、前記ウイルスベクターに対する望まれない免疫応答を抑制するか、または低下させるように計算される、ステップ、に従って調製される、方法。

(項目69)

抗体の量が、約1:1~1:5、1:5~1:10、1:10~1:25、1:25~1:50、1:50~1:100、1:100~1:200、またはそれより高い範囲内の力価である、項目2に記載の処方物、または項目37もしくは66~68のいずれか一項に記載の方法。

(項目70)

抗体力価の量が、前記生物学的試料の希釈、ならびに、レポーターAAVベクター、および前記レポーターAAVベクターが形質導入して、レポーターを発現させることができる細胞との希釈された前記試料のインキュベーションによって決定される値であり、レポーターAAVベクターとインキュベートされていない対照血清と比較して、前記レポーターのシグナルの50%未満の抑制が起こる希釈度が前記値である、項目2に記載の処方物。

(項目71)

抗体力価の量が、前記生物学的試料の希釈、ならびに、レポーターAAVベクター、および前記レポーターAAVベクターが形質導入して、レポーターを発現させることができる細胞との希釈された前記試料のインキュベーションによって決定される値であり、レポーターAAVベクターとインキュベートされていない対照血清と比較して、前記レポーターのシグナルの50%未満の抑制が起こる希釈度が前記値である、項目37または66~68のいずれか一項に記載の方法。

(項目72)

試料中の抗体(力価)の量を決定する方法であって、以下：

a) 試料を提供するステップ；

b) 前記試料を希釈するステップ；

c) レポーターAAVベクター、および前記レポーターAAVベクターが形質導入して、レポーターを発現させることができる細胞と希釈された前記試料をインキュベートするステップ；

d) 血清とインキュベートされていない対照レポーターAAVベクターと比較して、前記レポーターのシグナルを測定するステップ、を含み、ここで、

レポーターAAVとインキュベートされていない対照血清と比較して、前記レポーター

10

20

30

40

50

のシグナルの50%未満の抑制が起こる希釈度が、前記試料中の抗体（力価）の量を示す、方法。

（項目73）

試料が血清または血漿を含む、項目2、69、もしくは70に記載の処方物、または項目37、66～68、もしくは72のいずれか一項に記載の方法。

（項目74）

レポーターAAVウイルスで形質導入された前記細胞が、真核細胞を含む、項目2、69、もしくは70に記載の処方物、または項目72に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1A～1Dは、インビボでマウスおよび非ヒト霊長類において、AAV空キャプシドが、抗AAV NAbによるベクター中和を防止することを示唆するデータを示す。（a）PBSのみを腹腔内（IP）に注射されたナীবのマウス、または0.5mg、5mg、15mg、もしくは50mgのIVIgをIPに受動免疫されたマウスにおける抗AAV8抗体分析（群あたりn=5）。免疫化から24時間後、分析を実施した。中和抗体（NAb）力価は、NAbアッセイにおいてレポーターベクターシグナルの<50%抑制が測定された逆数の血清希釈度を表す。積分強度は、バックグラウンド引き算後のドットプロットアッセイにおける平均ピクセル強度を表す；§、範囲；#、最大シグナル強度に占めるパーセント。（b）雄C57BL/6マウス（群あたりn=5）を、0.5mgのIVIgで免疫し（結果として、1～3のNAb力価を生じた）、またはPBSを注射した（-）。24時間後、動物は、単独での（0x）、または10x過剰量のAAV8空キャプシド（ $1 \times 10^{10}$  cp（キャプシド粒子）（灰色棒）または $5 \times 10^{10}$  cp（黒色棒））と共に処方された、 $1 \times 10^9$  vg（ベクターゲノム）（灰色棒）または $5 \times 10^9$  vg（黒色棒）のAAV8-F.IXベクターのいずれかを受けた。ベクター送達後8週間目における血漿中のヒトF.IXトランスジーンレベルは、平均として示されている；エラーバー、平均値の標準偏差。%残留発現は、AAV-F.IXベクターを受けたナীবの動物におけるF.IXトランスジーン血漿中レベルに対して計算される。\*、ナীবマウスに対してp<0.05。（c）動物あたり $5 \times 10^9$  vgのベクター用量でのAAV8-F.IX遺伝子移入後の12週間目に収集されたマウス肝臓におけるベクター遺伝子コピー数。結果は、5つの肝臓の平均コピー数として示されている。エラーバー、平均値の標準偏差。実験群は、パネルbにおいて示されたのと同じである。（d） $1 \times 10^{12}$  vg/kg（灰色棒）または $2 \times 10^{12}$  vg/kg（黒色棒）の用量でAAV8-hF.IXベクターを受けた雄アカゲザルにおける血漿中ヒトF.IXレベル。動物は、PBS中の（0x）、または過剰量の空AAV8キャプシド（9x）中に処方された、AAV8-hF.IXベクターを受けた。結果は、4～8週間目（週1回の測定）における血漿中のhF.IXレベルの平均として示されている。エラーバー、平均値の標準偏差。

【図2】図2A～2Dは、処置前のNAb力価に基づいた規定量での空キャプシドの添加が、抗AAV抗体によりもたらされる遺伝子形質導入障壁を克服することができることを示唆するデータを示す。（a～d）0.5mg（a）、5.0mg（b）、15mg（c）、または50mg（d）のIVIgで免疫され、かつ24時間後に、 $5 \times 10^9$  vg/マウスのAAV8-F.IXベクターのみ（用量）、またはy軸に示されているような過剰の空キャプシド中に処方されたベクターを注射されたマウスにおける、%残留F.IXトランスジーン発現。%残留発現は、AAV-F.IXベクターのみを受けたナীবの動物におけるF.IXトランスジーン産物の血漿中レベルに対して計算される。結果は、残留発現の平均として示されている（群あたりn=5匹の動物）；エラーバーは平均値の標準偏差を表す。

【図3】図3A～3Dは、架橋された空AAVキャプシドが、インビトロおよびインビボでNAbをブロックする能力を保持することを示唆するデータを示す。（a）ルシフェラーゼを発現するAAV8ベクター（AAV8-ルシフェラーゼ、MOI  $1 \times 10^3$ ）を

10

20

30

40

50

、I V I g の 3 . 2 倍希釈溶液と、単独で ( 0 x ) 、または過剰の、未処理 ( 黒色線 ) の、もしくは架橋された ( 赤色線 ) 空 A A V 8 キャプシド ( 1 0 x 、 1 0 0 x 、または 1 0 0 0 x M O I ) の存在下で、インキュベートした。 % 抑制を、バックグラウンド引き算後の、I V I g とインキュベートされていない A A V 8 - ルシフェラーゼベクターについてのレポーターシグナルの強度に対して決定した。 ( b ) 雄 C 5 7 B L / 6 マウス ( 群あたり n = 5 ) を、 0 . 5 m g の I V I g で受動免疫し ( 結果として、 1 ~ 3 の N A b 力価を生じた ) 、または P B S を注射した ( - ) 。 2 4 時間後、動物は、単独での ( 0 x ) 、または 1 0 x 過剰量の未処理の ( 黒色棒、 1 0 x ) 、もしくは架橋された ( 赤色棒、 1 0 x 架橋 ) A A V 8 空キャプシドと共に処方された、  $5 \times 10^9$  v g の A A V 8 - F . I X ベクターを受けた。結果は平均として示され、エラーバーは平均値の標準偏差を表す。 % 残留発現は、 A A V - F . I X ベクターのみを受けたナインの動物における F . I X トランスジーン産物のレベルに対して計算される。 \* 、ナインの動物におけるベクター単独に対して  $p < 0 . 0 5$  。 ( c 、 d ) Q - P C R により決定された遺伝子移入から 2 週間後のマウスの肝臓におけるベクターゲノムのコピー数 ( n = 5 / 群 ) 。 ( c ) 二倍体ゲノムあたりの A A V - G F P ベクターゲノムコピー数。 ( d ) 二倍体ゲノムあたりの A A V - F . I X ベクターゲノムコピー数。全ての動物は、  $5 \times 10^9$  v g の A A V 8 - F . I X ベクターを単独で ( 白色棒、 G F P なし ) か、または  $5 \times 10^{10}$  v g の未処理の A A V 8 - G F P ベクターと共に ( 黒色棒、 G F P ) か、または  $5 \times 10^{10}$  v g の架橋された A A V 8 - G F P ベクターと共に ( 赤色棒、架橋 G F P ) かのいずれかで、受けた。結果は平均として表現されており、エラーバーは平均値の標準偏差を表す。 \* 、未処理の G F P ベクターに対して  $p < 0 . 0 5$  。

【図 4 - 1】図 4 A ~ 4 D は、 A A V ベクターの架橋が、結果として、細胞侵入の障害、ならびにヒト樹状細胞による結合および取り込みの低下を生じることを示唆するデータを示す。 ( a ) H H L 5 ヒト肝実質細胞における未処理の A A V ベクターおよび架橋された A A V ベクターの内部移行。細胞を、 A A V 2 ベクターで  $1 \times 10^5$  の M O I で 1 時間、処理し、その後、抗 A A V 2 モノクローナル抗体 A 2 0 で細胞内染色した。ゲートおよび % は、細胞内に局在した A A V シグナルの量を示す。 ( b ) H H L 5 ヒト肝実質細胞での C T L アッセイ。標的細胞を、未処理の、または架橋された A A V ベクターの増加性 M O I において、一晚、形質導入し、 1 0 : 1 のエフェクター : 標的比で A A V 特異的エフェクター細胞とインキュベートした。 % 細胞傷害性は、バックグラウンド引き算後、 T r i t o n X で標的を処理することにより得られた最大細胞溶解に対して計算される。 ( c 、 d ) ヒト単球由来 D C に、未処理の、または架橋された A A V 2 ベクターを  $1 \times 10^5$  の M O I で形質導入し、その後、抗 A A V 2 抗体 A 2 0 および D R A Q 5 ( c ) または抗 C D 7 1 抗体 ( d ) で細胞内染色した。 ( c ) ベクター内部移行。上方パネル、ベクターは緑色で示され、赤色での核染色。どちらのベクターについても、収集された少なくとも 5 0 0 0 個のうちの 1 個の代表的な細胞が示されている。 C H 1 、明視野 ; C H 2 ベクター ; C H 5 核 ; C H 2 / 5 オーバーレイ。ヒストグラムプロットは、未処理の A A V および架橋された A A V についての 1 時間後 ( 上部パネル ) および 4 時間後 ( 下部パネル ) の内部移行した A A V のパーセントを示す。 ( d ) 形質導入から 4 時間後の初期エンドソームにおけるベクターの共局在。上方パネル、ベクターは緑色で示され、紫色でのエンドソーム染色。どちらのベクターについても、収集された少なくとも 5 0 0 0 個のうちの 1 個の代表的な細胞が示されている。 C H 1 、明視野 ; C H 2 ベクター ; C H 3 エンドソーム ; C H 2 / 3 オーバーレイ。ドットプロット : ゲートおよびパーセント値は、エンドソーム染色およびベクター染色についてダブルポジティブな細胞を示す。ヒストグラム : ゲートおよびパーセント値は、ベクターおよびエンドソームについての染色が共局在しているドットプロットにおいてゲーティングされた細胞を示す。

【図 4 - 2】図 4 A ~ 4 D は、 A A V ベクターの架橋が、結果として、細胞侵入の障害、ならびにヒト樹状細胞による結合および取り込みの低下を生じることを示唆するデータを示す。 ( a ) H H L 5 ヒト肝実質細胞における未処理の A A V ベクターおよび架橋された A A V ベクターの内部移行。細胞を、 A A V 2 ベクターで  $1 \times 10^5$  の M O I で 1 時間、

処理し、その後、抗 A A V 2 モノクローナル抗体 A 2 0 で細胞内染色した。ゲートおよび % は、細胞内に局在した A A V シグナルの量を示す。(b) H H L 5 ヒト肝実質細胞での C T L アッセイ。標的細胞を、未処理の、または架橋された A A V ベクターの増加性 M O I において、一晚、形質導入し、10 : 1 のエフェクター : 標的比で A A V 特異的エフェクター細胞とインキュベートした。% 細胞傷害性は、バックグラウンド引き算後、T r i t o n X で標的を処理することにより得られた最大細胞溶解に対して計算される。(c、d) ヒト単球由来 D C に、未処理の、または架橋された A A V 2 ベクターを  $1 \times 10^5$  の M O I で形質導入し、その後、抗 A A V 2 抗体 A 2 0 および D R A Q 5 (c) または抗 C D 7 1 抗体 (d) で細胞内染色した。(c) ベクター内部移行。上方パネル、ベクターは緑色で示され、赤色での核染色。どちらのベクターについても、収集された少なくとも 5 0 0 0 個のうちの 1 個の代表的な細胞が示されている。C H 1、明視野; C H 2 ベクター; C H 5 核; C H 2 / 5 オーバーレイ。ヒストグラムプロットは、未処理の A A V および架橋された A A V についての 1 時間後 (上部パネル) および 4 時間後 (下部パネル) の内部移行した A A V のパーセントを示す。(d) 形質導入から 4 時間後の初期エンドソームにおけるベクターの共局在。上方パネル、ベクターは緑色で示され、紫色でのエンドソーム染色。どちらのベクターについても、収集された少なくとも 5 0 0 0 個のうちの 1 個の代表的な細胞が示されている。C H 1、明視野; C H 2 ベクター; C H 3 エンドソーム; C H 2 / 3 オーバーレイ。ドットプロット: ゲートおよびパーセント値は、エンドソーム染色およびベクター染色についてダブルポジティブな細胞を示す。ヒストグラム: ゲートおよびパーセント値は、ベクターおよびエンドソームについての染色が共局在しているドットプロットにおいてゲーティングされた細胞を示す。

【図 4 - 3】図 4 A ~ 4 D は、A A V ベクターの架橋が、結果として、細胞侵入の障害、ならびにヒト樹状細胞による結合および取り込みの低下を生じること示唆するデータを示す。(a) H H L 5 ヒト肝実質細胞における未処理の A A V ベクターおよび架橋された A A V ベクターの内部移行。細胞を、A A V 2 ベクターで  $1 \times 10^5$  の M O I で 1 時間、処理し、その後、抗 A A V 2 モノクローナル抗体 A 2 0 で細胞内染色した。ゲートおよび % は、細胞内に局在した A A V シグナルの量を示す。(b) H H L 5 ヒト肝実質細胞での C T L アッセイ。標的細胞を、未処理の、または架橋された A A V ベクターの増加性 M O I において、一晚、形質導入し、10 : 1 のエフェクター : 標的比で A A V 特異的エフェクター細胞とインキュベートした。% 細胞傷害性は、バックグラウンド引き算後、T r i t o n X で標的を処理することにより得られた最大細胞溶解に対して計算される。(c、d) ヒト単球由来 D C に、未処理の、または架橋された A A V 2 ベクターを  $1 \times 10^5$  の M O I で形質導入し、その後、抗 A A V 2 抗体 A 2 0 および D R A Q 5 (c) または抗 C D 7 1 抗体 (d) で細胞内染色した。(c) ベクター内部移行。上方パネル、ベクターは緑色で示され、赤色での核染色。どちらのベクターについても、収集された少なくとも 5 0 0 0 個のうちの 1 個の代表的な細胞が示されている。C H 1、明視野; C H 2 ベクター; C H 5 核; C H 2 / 5 オーバーレイ。ヒストグラムプロットは、未処理の A A V および架橋された A A V についての 1 時間後 (上部パネル) および 4 時間後 (下部パネル) の内部移行した A A V のパーセントを示す。(d) 形質導入から 4 時間後の初期エンドソームにおけるベクターの共局在。上方パネル、ベクターは緑色で示され、紫色でのエンドソーム染色。どちらのベクターについても、収集された少なくとも 5 0 0 0 個のうちの 1 個の代表的な細胞が示されている。C H 1、明視野; C H 2 ベクター; C H 3 エンドソーム; C H 2 / 3 オーバーレイ。ドットプロット: ゲートおよびパーセント値は、エンドソーム染色およびベクター染色についてダブルポジティブな細胞を示す。ヒストグラム: ゲートおよびパーセント値は、ベクターおよびエンドソームについての染色が共局在しているドットプロットにおいてゲーティングされた細胞を示す。

【図 5】図 5 は、A A V <sub>585 / 8</sub> 変異体 (A A V 2 キャプシドタンパク質の R 5 8 5 A および R 5 8 8 A の二重変異体) が、野生型 A A V 2 (A A V <sub>2</sub>) と比較して、インビトロで細胞を形質導入する能力の障害を示したことを示唆するデータを示す。H E K 2 9 3 細胞を、緑色蛍光タンパク質 (G F P) を発現する A A V ベクターで、0 (0 K、ウイル

スなし対照)、10000(10K)、50000(50K)、または100000(100K)の感染の多重度(MOI)において一晚、形質導入した。24時間後、細胞をトリプシン処理し、フローサイトメーターを用いてGFPについて分析した。各条件についての%GFP陽性細胞は、ヒストグラムプロット内に示されている。AAV<sub>2</sub>-GFP対照と比較して、AAV<sub>585/8</sub>-GFPベクター変異体は、インビトロでの形質導入効率の著しい減少を示した。

【図6】図6は、大過剰量のAAV<sub>585/8</sub>空キャプシドが、インビトロでのAAV8ベクターの形質導入を抑制しないことを示唆するデータを示す。HEK293細胞を、ルシフェラーゼを発現するAAV8ベクターで形質導入した。ベクターを、以下の可変量のAAV<sub>585/8</sub>空キャプシドと混合した：AAV8-ルシフェラーゼベクターの量の0倍(0x、空キャプシドなしの対照)、10倍(10x)、100倍(100x)、および1000倍(1000x)。ルシフェラーゼ活性を、ルミノメーターを用いて、形質導入から24時間後、測定した。結果は、相対的光単位(RLU)として表現され、棒は、三連の試験の平均および標準偏差を表す。研究された条件のいずれにおいても、形質導入の有意な抑制は観察されなかった。

【図7】図7は、AAV<sub>585/8</sub>空キャプシドが、インビトロで、AAVベクターを抗AAV抗体媒介性中和から保護することを示唆するデータを示す。ルシフェラーゼを発現するレポーターAAV8ベクターを、単独での(0x)、または増加性量のAAV<sub>585/8</sub>空キャプシド(10x、100x、1000x AAV8-ルシフェラーゼベクターの量)の存在下での、プールされた正常血漿(FACT血漿、George King Bio)の増加性希釈溶液と、インキュベートした。37℃での1時間のインキュベーション後、ベクターを用いて、インビトロでHEK293細胞を形質導入した。パーセント抑制は、レポーターベクターが、プールされた血漿の代わりに培地のみとインキュベートされた対照に対して測定された。増加性量のAAV<sub>585/8</sub>空キャプシドの添加が、AAV8-ルシフェラーゼベクターを抗体媒介性中和から保護している。

【図8】図8A~8Bは、AAV<sub>585/8</sub>空キャプシドが、インビボで、AAVベクターを抗AAV抗体媒介性中和から保護するが、それらが、肝臓を効率的には形質導入しないことを示唆するデータを示す。(a)C57BL/6マウス(群あたりn=4/5)は、凝固因子IX(FIX)を発現するAAV8-FIX16ベクターを5E9vg/マウスの用量で受けた。1つの群(IVIG-)を除き、全ての実験群は、ベクター注射の24時間前に、精製されたヒトIgG(IVIG)を腹腔内に受けた(IVIG+)。AAV8-FIX16ベクターを、単独で(空-)、1000倍過剰量のAAV8空キャプシドと混合して(空「AAV8 1000x」)、または1000倍過剰量のAAV<sub>585/8</sub>空キャプシドと混合して(空「AAV<sub>585/8</sub> 1000x」)、または10倍過剰量のAAV<sub>585/8</sub>空キャプシドと混合して(空「AAV<sub>585/8</sub> 10x」)、与えた。AAV8-FIX16ベクターは、単独で与えられた場合、IVIGによって効率的に中和された。AAV<sub>585/8</sub>空キャプシドは、10xおよび1000xの過剰量において、AAV8-FIX16ベクターを、形質導入効率を抑制することなく、抗体媒介性中和から保護した。逆に、1000x過剰量のAAV8空キャプシドは、おそらく受容体結合競合のために、AAV8-FIX16形質導入の抑制を生じた。(b)C57BL/6マウス(群あたりn=4)は、凝固因子IX(FIX)を発現するAAV8-FIX19ベクターを1E11vg/マウスの用量で受けた。一方の群は、AAV<sub>2</sub>-FIX19ベクターを受け、他方の群は、変異体AAV<sub>585/8</sub>-FIX19ベクターを受けた。変異体ベクターはマウス肝臓を形質導入しない。

【図9】図9は、AAV<sub>585/8</sub>キャプシド抗原がMHCクラスI上に効率的には提示されないことを示唆するデータを示す。増加性MOIのAAV2ベクター対照またはAAV<sub>585/8</sub>ベクターで形質導入されたヒト肝実質細胞標的細胞を、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)アッセイにおける標的として用いた。HLA適合CTLを、インビトロでAAV抗原に対して増殖させ、アッセイにおいてエフェクター細胞として用いた。AAV<sub>585/8</sub>変異体に関して、高域のMOIにわたって殺害は観察されなかった。アッセイに

10

20

30

40

50

おける水平線は、細胞培地中の乳酸デヒドロゲナーゼ（CTL媒介性細胞溶解の尺度としてアッセイにおいて用いられた）のバックグラウンド放出を表す。

【図10】図10A～10Dは、抗AAV IgGの検出について、ドットブロットアッセイのELISAアッセイとの比較を示す。両方のアッセイにおいて、抗IgG重鎖および軽鎖抗体を用いた。ELISAについて、ウェルを、1mg/mlのAAVキャプシドでコーティング緩衝液において、一晚、コーティングした。ブロッキング後、FAC T血漿の段階希釈溶液を、各ウェルに加え、4で一晚、インキュベートした。結合したIgGの検出を、1:1,000の希釈度で用いられるHRPコンジュゲート化抗体で行った。(a、c)抗AAV2 IgG(a)および抗AAV8 IgG(c)の検出のためのドットブロットアッセイ。プロットは、デンシトメトリーによって測定される平均強度を表す；各FAC T希釈度におけるドットブロットの代表的な写真も示されている。(b、d)抗AAV2抗体(b)および抗AAV8抗体(d)ELISAアッセイ。プロットは、各所定のFAC T希釈度における光学密度(OD)を表す。

【図11】図11A～11Cは、AAV空キャプシドが、抗AAV NA bによるベクター中和を防止するが、莫大な過剰である場合だけ、インビトロでの形質導入を抑制しないことを示唆するデータを示す。(a)ルシフェラーゼを発現するAAV8ベクター(AAV8-ルシフェラーゼ、MOI  $1 \times 10^3$ )を単独で(緑色の線)、または過剰の空AAV8キャプシド(10x、100x、または1000xそのMOI)の存在下で、IVIgの3.2倍希釈溶液とインキュベートした。%抑制は、IVIgとインキュベートされていないAAV8-ルシフェラーゼベクターについてのレポーターシグナルの強度と比較して決定された。(b)ルシフェラーゼを発現するAAVベクターのインビトロでの形質導入の効率への空キャプシドの効果。MOI  $1 \times 10^3$ ；過剰の空キャプシドの量は、そのMOIに対する倍数としてx軸に示されている。RLU、相対的光単位。(c)血友病Bを有するヒト被験体由来の血清の中和活性への、過剰量(5x、10x、50x、100x)の空AAV8キャプシドの添加の効果；アッセイは、パネルAにおいてIVIgについて記載されているように、実施された。

【図12】図12は、代替の(非同一の)AAV血清型由来の空キャプシドが、AAV8-F.IXをNA b中和から保護することを示す。雄C57BL/6マウス(群あたりn=5)を、0.5mgのIVIg(1:1)で受動免疫し、またはPBSを腹腔内に注射した(-)。24時間後、動物は、単独での(-)、または10x過剰量のAAV8、AAV2、またはAAV5の空キャプシドと共に処方された、 $5 \times 10^9$ vgのAAV8-F.IXベクターを受けた。結果は、平均として示され、エラーバーは平均値の標準偏差を表す。%残留発現は、AAV-F.IXベクターのみを受けたナインブの動物におけるF.IXトランスジーン産物レベルに対して計算されている。\*、ナインブの動物におけるベクターのみに対して $p < 0.05$ 。

【図13-1】図13A～13Cは、架橋されたAAVキャプシド調製物の特徴づけを示す。(a)未処理の(u)、またはホルムアルデヒドで架橋された(x)AAVベクターの変性SDS-PAGE、続いて銀染色により、キャプシド構造タンパク質VP-1、VP-2、およびVP-3が示されている。2つのベクター調製物が示され、どちらの場合も、未処理のベクターは、架橋溶液中のホルムアルデヒドの添加を除けば、架橋されたベクターと同じ正確な架橋段階を受けた。各調製物について、約 $1 \times 10^{10}$ cpをウェル上に負荷した。(b)未処理の、または架橋されたAAV2-GFPベクターで $1 \times 10^4$ のMOIにおいて24時間、形質導入されたHEK293細胞におけるGFP発現。フローサイトメトリーによって分析されたGFP<sup>+</sup>細胞の%が示されている。(c)架橋キャプシドの抗AAV2 A20抗体による認識。架橋されたAAV2キャプシドがモノクローナル抗体A20によって認識されるかどうかを試験するために、ELISAプレートを、コーティング緩衝液中の抗体の1:500希釈溶液でコーティングした。ブロッキング後、様々な量(x軸)の未処理のAAV2、架橋されたAAV2、またはAAV8(陰性対照)をプレート上に負荷した。ウイルスの結合を、IVIgの1:500希釈溶液を加え、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートされた抗ヒトIgG H+L

10

20

30

40

50

鎖抗体（1：1000、Caltag）を加えることにより検証した。結果は、450nmにおける光学密度（OD）読み取り（y軸）として報告されている。

【図13-2】図13A～13Cは、架橋されたAAVキャプシド調製物の特徴づけを示す。（a）未処理の（u）、またはホルムアルデヒドで架橋された（x）AAVベクターの変性SDS-PAGE、続いて銀染色により、キャプシド構造タンパク質VP-1、VP-2、およびVP-3が示されている。2つのベクター調製物が示され、どちらの場合も、未処理のベクターは、架橋溶液中のホルムアルデヒドの添加を除けば、架橋されたベクターと同じ正確な架橋段階を受けた。各調製物について、約 $1 \times 10^{10}$ cpをウェル上に負荷した。（b）未処理の、または架橋されたAAV2-GFPベクターで $1 \times 10^4$ のMOIにおいて24時間、形質導入されたHEK293細胞におけるGFP発現。フローサイトメトリーによって分析されたGFP<sup>+</sup>細胞の%が示されている。（c）架橋キャプシドの抗AAV2 A20抗体による認識。架橋されたAAV2キャプシドがモノクローナル抗体A20によって認識されるかどうかを試験するために、ELISAプレートを、コーティング緩衝液中の抗体の1：500希釈溶液でコーティングした。ブロッキング後、様々な量（x軸）の未処理のAAV2、架橋されたAAV2、またはAAV8（陰性対照）をプレート上に負荷した。ウイルスの結合を、IVIgの1：500希釈溶液を加え、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートされた抗ヒトIgG H+L鎖抗体（1：1000、Caltag）を加えることにより検証した。結果は、450nmにおける光学密度（OD）読み取り（y軸）として報告されている。

【図14】図14A～14Dは、AAV空キャプシドの推定の作用機構を示す。IVIgで受動免疫されたマウスは、単独での、または増加性量の空AAVキャプシドと共に処方されたAAV8-F.IXベクターを受けた（a）。血漿中のIgG：キャプシド複合体をアッセイした。アッセイにおける標準曲線として、IVIgとインキュベートされた既知量のAAV8キャプシドを用いた（b）。ベクター投与後、IVIgで予備免疫されなかったマウスの血漿において、免疫複合体は検出できなかった（c、列1）。ベクターのみ、またはベクターと空キャプシドを受けた、IVIg注射された動物において、IgG：キャプシド複合体が、増加性量で検出可能であった（c、列2～6）。抗キャプシド抗体の空AAVキャプシドによる吸収は、結果として、マウスにおいて抗AAV8 NAb力価の用量依存性降下を生じ（a）、さらに、増加性レベルのhF.IXトランスジーン発現を生じた（d）。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本明細書に開示された本発明は、AAVベクター（トランスジーンを有する活性AAVベクター）の処方物における、AAV空キャプシド（ゲノムを有さず、および/または細胞に侵入できないように改変もしくは架橋され得る不活性AAV）または（例えば、ウイルスの）ゲノム含有キャプシドの処方物、方法、および使用を含む。この様式で用いられるAAV空キャプシドまたは（ウイルス）ゲノム含有キャプシドは、中和抗体（NAb）によって結合されるベクターデコイとして働き、それにしたがって、中和抗体が（トランスジーンを含有する）AAVベクターを中和することを妨げ、その結果として、AAVベクターが、例えば血流を通して、細胞に送達される場合、優れた遺伝子導入効率を生じる。

【0021】

本明細書で用いられる場合、「遺伝子治療」は、疾患、一般的には遺伝性疾患を処置するための、核酸配列（例えば、遺伝子）の個体の細胞および/または組織への挿入であり、欠陥のある変異対立遺伝子が、機能性遺伝子と置き換えられ、またはそれで補われる。血液凝固障害、うっ血性心不全などの後天性疾患は、遺伝子治療に適している。遺伝子治療にはまた、天然において抑制性である核酸、すなわち、望ましくないまたは異常な（例えば、病原性）遺伝子またはタンパク質などの内因性遺伝子またはタンパク質の発現、活性、または機能を抑制し、減少させるか、または低下させるポリヌクレオチドの挿入が挙げられる。

## 【 0 0 2 2 】

パルボウイルス科由来の「アデノ随伴ウイルス」( A A V )は、一本鎖 D N A のゲノムを有する小さいウイルスである。これらのウイルスは、それらが、細胞に貫入し、核酸 / 遺伝子材料を、例えば、19 番染色体上の特定の部位に、導入することができるため、遺伝子治療ベクターとして有用である。A A V はヒトにおいて病原性疾患と関連していないため、A A V ベクターは、実質的な A A V 病変形成を引き起こすことなく、ヒト患者へ治療用タンパク質および作用物質を送達することができる。

## 【 0 0 2 3 】

「A A V ベクター」または単に「ベクター」は、野生型 A A V ゲノムを除去して、治療用遺伝子発現カセットなどの本来ではない核酸と置き換える分子的方法を用いることにより、野生型 A A V から導かれる。典型的には、野生型 A A V ゲノムの末端逆位配列は、A A V ベクター内に保持される。A A V ベクターは、そのウイルスゲノムの全部または一部がトランスジーンと置き換えられており、そのトランスジーンが、A A V 核酸配列に関して本来ではない核酸であるため、A A V と区別される。

## 【 0 0 2 4 】

本明細書で用いられる場合、「空ウイルス」または「空キャプシド」は、ゲノムを含有しない(ゆえに、用語「空」)。対照的に、「(例えば、ウイルスの)ゲノム含有キャプシド」は、ゲノム、典型的にはウイルスゲノム(例えば、A A V ウイルスゲノム)を含有する。空キャプシドは、それらが、無傷(ゲノム含有ウイルスベクター)ウイルス(例えば、アデノ随伴ウイルス、A A V)と反応する1つ以上の抗体と反応するという点で、ウイルス様粒子である。例えば、空 A A V 8 キャプシドは、A A V 8 もしくは A A V 8 ベクター、または別の A A V 血清型などの A A V に結合する1つ以上の抗体と反応する能力を保持する。例えば、空 A A V 2 キャプシドは、A A V 8 または A A V 8 ベクターに結合する1つ以上の抗体と反応する能力を保持する。

## 【 0 0 2 5 】

空(またはゲノム含有)キャプシドは、細胞に侵入する能力を保持する可能性があるが、細胞に侵入することは必要とされず、例えば、空(またはゲノム含有)キャプシドのキャプシドタンパク質配列を改変または架橋することは、その改変された、または架橋されたキャプシドの細胞に侵入する能力を低下させる。それゆえに、そのような空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、およびキャプシドタンパク質は、トランスジーンを含むウイルスベクターと比較して、細胞への結合が低下している可能性がある。したがって、空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、およびキャプシドタンパク質は、改変されなくてもよいし、改変されて、トランスジーンを含むウイルスベクターと比較して、細胞への結合が低下していてもよい。特別の実施形態において、空キャプシド、ウイルスゲノム含有キャプシド、またはウイルスキャプシドタンパク質は、架橋剤で処理されるか、または A A V 受容体への結合の低下もしくは減少を示す変異型キャプシドを含む。特別の態様において、変異型キャプシドは、非荷電もしくは疎水性残基で置換されている、ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合に寄与する1つもしくは複数のアルギニン(R)残基を含むか、または1つもしくは複数のアルギニン(R)残基が以下の位置のいずれかにおいて置換されている、A A V 2 などの任意の A A V を含む：4 5 1、4 4 8、5 3 0、5 8 5、または 5 8 8 (例えば、以下の位置のいずれかで置換されている1つ以上のアルギニン(R)残基：4 5 1 でシステインと、4 4 8 でシステインと、5 3 0 でアラニンと、5 8 5 でアラニンと、または 5 8 8 でアラニンと)。位置 5 8 5 および 5 8 8 に示された R 置換なしおよび有りの、置換される可能性がある代表的な位置(4 5 1、4 4 8、5 3 0、5 8 5、および 5 8 8)を示す代表的な A A V (A A V 2) キャプシド配列は以下の通りである：

## 【 0 0 2 6 】

## 【化 1】

maadgylpdwledtlsegirqwwklkpgppppkpaerhkddsrqlvlpqykylgpfngldkgepvnea  
 daaalehdkaaydrqlsdgdnpylkynhadaefqerlkedtsfggnlgravfqakkrvleplglveepv  
 ktapgkkrpvehspvepdsssgtgkagqpparkrlnfgqtdadsvdpqplgqppaapsglgtntma  
 tgsgapmadnnegadgvgngsgnwhcdstwmgdrvittstrtwalptynnhlykqissqsgasndnhy  
 fgystpwgyfdfnrfhchfsprdwqrlinnnwgfprkrlnfklfniqvkevtqndgttttiannltstv  
 qvftdseyqlpyvlgshahqgclppfpadvfvmvpqygyltlnngsqavgrssfycleyfpsqmlrtggn  
 ftfsytfedvpfhssyahsqslldrlmnpolidqylylsrntsgtttqsrllqfsqagasdirdqsrn  
 wlpqpcyrqqrsvktsadnnnseyswtgatkyhlngrdslvnpqgamashkddkfkffpqsgvlifgk  
 qgsektndiekvmitdeeeirttnpvateeqygsvstnlqRgnRqaatadvntqgvlpqmvwqdrdv  
 lqgpiwakiphtdghfhpsplmggfglkhhpppqilikntpvpanpsttfsaakfasfitqystgqvsv  
 eiewelqkenskrwnpeiqtysnynksvndftvdtngvyseprpigtryltrnl

10

## 【 0 0 2 7 】

空 A A V または空キャプシドは、A A V ベクター調製物において時々自然に見出される。そのような自然な混合物は、本発明に従って用いることができ、または必要に応じて、空キャプシドおよび/もしくはベクターの量を増加または減少させるように操作することができる。例えば、空キャプシドの量は、被験体においてベクター媒介性遺伝子導入に用いられることを意図される A A V ベクターと反応する抗体の抑制効果を低下させることが予想される量に調整することができる。

20

## 【 0 0 2 8 】

空キャプシドはまた、A A V ベクター調製物とは無関係に産生することができ、必要に応じて、A A V ベクター調製物に加え、または被験体に別々に投与することができる。空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、およびキャプシドタンパク質を、決められた品質および量で作製および精製することができ、任意で、例えば、被験体における A A V 抗体力価または血清型に従って調整し、それらの意図された目的に従って、用い、または投与することができる。

## 【 0 0 2 9 】

空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、およびキャプシドタンパク質は、ウイルスベクターに対する抗体に結合するか、またはそれと反応し、それにより、ウイルスベクターに対する免疫応答を低下させるようにデコイとして機能すると考えられている。そのようなデコイは、ウイルスベクターに対して向けられた抗体を吸収するように働き、それにより、そのような抗体との関連において、細胞のウイルスベクタートランスジーンの形質導入（トランスジーンの導入）を増加または向上させ、次に、遺伝子転写物および/またはコードされたタンパク質の細胞発現を増加させる。

30

## 【 0 0 3 0 】

用語「結合する」、「結合すること」、または「と反応する」とは、抗体、または空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、もしくはキャプシドタンパク質が分子レベルで相互作用することを意味する。したがって、抗体に結合するか、またはそれと反応する空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、またはキャプシドタンパク質は、その抗体と分子レベルで相互作用する。

40

## 【 0 0 3 1 】

本明細書で開示されているように、異なる血清型の空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、およびキャプシドタンパク質は、特別の血清型に対する抗体と交差反応性である。それゆえに、例えば、A A V 2 などの所定の A A V 血清型に対する抗体はまた、1つ以上の他の A A V 血清型にも結合する可能性がある。したがって、A A V 2 空キャプシド、（例えば、ウイルスの）ゲノム含有キャプシド、またはキャプシドタンパク質などの所定の A A V 血清型は、A A V - 1、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、または A A V - 2 i 8 などの異なる天然の、または非天然の A A V 血清型と組み合わせて、本発明の処方物または方法または使用に用いることがで

50

きる。同様に、A A V 8 空キャプシド、(例えば、ウイルスの)ゲノム含有キャプシド、またはキャプシドタンパク質は、A A V - 1、2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、またはA A V - 2 i 8などの異なる天然の、または非天然のA A V血清型と組み合わせて、本発明の処方物または方法または使用に用いることができる。

#### 【0032】

「血清型」は、伝統的には、別のウイルスと比較しての、1つのウイルスに対する抗体の間での交差反応性の欠如に基づいて定義される。そのような交差反応性の差は、通常、キャプシドタンパク質配列/抗原決定基の差による(例えば、A A V血清型のV P 1、V P 2、および/またはV P 3配列の差による)。伝統的な定義によれば、血清型は、目的のウイルスが、中和活性について、全ての存在し、かつ特徴づけられた血清型に特異的な血清に対して試験されており、かつ目的のウイルスを中和する抗体が見出されていないことを意味する。より多くの天然のウイルス分離株が発見され、キャプシド変異体が生じているため、現在存在する血清型のいずれかと血清学的差がない場合もあるし、いずれとも差がある場合もある。したがって、新しいA A Vが血清学的差を有しない場合、この新しいA A Vは、対応する血清型の亜群または改変体である。多くの場合、中和活性についての血清学試験はなお、キャプシド配列改変を有する変異ウイルスに対して、それらが、血清型の伝統的な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実施されなければならない。したがって、便宜上、かつ繰り返しを避けるために、用語「血清型」は、血清学的に異なるウイルス(例えば、A A V)と、加えて、所定の血清型の亜群または改変体内にあり得る、血清学的に異なるウイルス(例えば、A A V)の両方を幅広く指す。

#### 【0033】

例として、A A Vは、様々な天然および非天然の血清型を含む。そのような非限定的血清型には、A A V - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、- 9、- 10、- 11、- r h 7 4、- r h 1 0、およびA A V - 2 i 8が挙げられる。この場合もやはり、便宜上、血清型は、異なる血清型であると完全には特徴づけられておらず、実際、現に、既知の血清型の亜群または改変体を構成する可能性がある、キャプシド配列改変を有するA A Vを含む。

#### 【0034】

本明細書に示されているようなA A Vのベクター、空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、およびキャプシドタンパク質は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、R h 1 0、R h 7 4、またはA A V - 2 i 8 V P 1、V P 2、および/もしくはV P 3キャプシド配列のいずれかと少なくとも80%またはそれ以上(例えば、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%など)同一の配列を含むか、またはその配列からなる、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはそれらの部分配列を有するものを含む。A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、R h 1 0、R h 7 4、またはA A V - 2 i 8についてのそのようなキャプシド配列は、当技術分野において知られている。

#### 【0035】

A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、R h 1 0、R h 7 4、またはA A V - 2 i 8を含むA A Vのベクター、空キャプシド、ゲノム含有キャプシド、および配列関連A A Vベクターは、機能性A A V I T Rに隣接された1つ以上の異種性ポリヌクレオチド配列(トランスジーン)を含むように、当業者に知られている組換え技術を用いて構築することができる。異種性ポリヌクレオチドの組み入れは、そのA A Vを組換えベクターと定義し、それは、「r A A Vベクター」と呼ぶことができる。そのようなベクターは、野生型A A V遺伝子の1つまたは複数、例えば、r e pおよび/またはc a p遺伝子を全部または一部、欠失し得るが、A A Vベクター粒子のレスキュー、複製、およびパッケージングのた

めに必要に応じて、少なくとも1つの機能性隣接 I T R 配列を保持し得る。したがって、A A V ベクターは、ウイルス複製およびパッケージングのためにシスに必要とされる配列（例えば、機能性 I T R ）を含む。

#### 【0036】

「架橋」は、タンパク質鎖間に共有結合を確立するために用いられる化学的、物理学的、または生物学的手順であって、そうでない場合は分離する。非限定的例には、ホルムアルデヒド処理、および二官能性物質での誘導体化が挙げられる。一般的に用いられる架橋剤には、例えば、1, 1 - ビス（ジアゾアセチル）- 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4 - アジドサリチル酸とのエステル、5 mM 3, 3' - ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（D T S S P）、3, 3' - ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス - N - マレイミド - 1, 8 - オクタンなどの二官能性マレイミド、およびメチル - 3 - [（p - アジドフェニル）ジチオ]プロピオイミデートなどの作用物質が挙げられる。本発明による空キャプシド、（例えば、ウイルスの）ゲノム含有キャプシド、およびキャプシドタンパク質は、架橋することができ、架橋されたキャプシドまたはキャプシドタンパク質は、ベクター処方物の構成要素であり得る。

#### 【0037】

用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）を含む全ての型の核酸、オリゴヌクレオチドを指すように、本明細書で交換可能に用いられる。ポリヌクレオチドには、ゲノムDNA、cDNA、およびアンチセンスDNA、ならびにスプライスされた、またはスプライスされていないmRNA、rRNA、tRNA、ならびに抑制性DNAまたはRNA（RNAi、例えば、小分子または低分子ヘアピン型（sh）RNA、マイクロRNA（miRNA）、小分子または低分子干渉（si）RNA、トランススプライシングRNA、またはアンチセンスRNA）が挙げられる。ポリヌクレオチドには、天然の、合成の、および意図的に変更または改変されたポリヌクレオチド、加えて、類似体および誘導体が挙げられる。ポリヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、または三本鎖、直鎖状または環状であり得、任意の長さであり得る。

#### 【0038】

「異種性」ポリヌクレオチドは単に、細胞へのポリヌクレオチドのA A V 媒介性移入 / 送達を目的とした、A A V に挿入されたポリヌクレオチドを指す。異種性ポリヌクレオチドは、典型的には、A A V 核酸とは異なり、すなわち、A A V 核酸に関して「外来のものである」。いったん細胞へ移入 / 送達されると、r A A V ビリオン内に含有された異種性ポリヌクレオチドは、発現することができる（例えば、転写され、適切な場合には、翻訳され得る）。あるいは、r A A V ビリオン内に含有された、細胞中の移入 / 送達される異種性ポリヌクレオチドは、発現する必要はない。用語「異種性」は、本明細書で、常にポリヌクレオチドに関連して用いられるとは限らないが、修飾成句「異種性」がない場合でさえも、ポリヌクレオチドへの言及は、その省略にもかかわらず、異種性ポリヌクレオチドを含む。

#### 【0039】

「ポリヌクレオチド配列」によってコードされる「ポリペプチド」、「タンパク質」、および「ペプチド」は、天然のタンパク質と同様に、完全長未変性配列、加えて、機能性部分配列、改変型、または配列バリエーション（ただし、その部分配列、改変型、またはバリエーションが、未変性の完全長タンパク質のある程度の機能を保持する限り）を含む。本発明の方法および使用において、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、処置される哺乳動物において欠陥があり、または発現が不十分もしくは欠損している内因性タンパク質と同一であり得るが、同一であることを必要とはされない。

#### 【0040】

ウイルス（例えば、A A V ）ベクターは、ポリヌクレオチドを細胞およびその子孫へ安

定的に、または一過性に導入／送達するために用いることができる。用語「トランスジーン」は、ウイルスベクターを経由して、細胞または生物体へ導入することができるそのような異種性ポリヌクレオチドを便宜上、指すように用いられる。トランスジーンは、ポリペプチドもしくはタンパク質をコードする遺伝子、抑制性ポリヌクレオチド（例えば、*siRNA*、*miRNA*、*shRNA*）へ転写されるポリヌクレオチド、または転写されないポリヌクレオチド（例えば、転写を駆動するプロモーターなどの発現調節エレメントを欠く）などの任意のポリヌクレオチドを幅広く含む。例えば、トランスジーンを有する細胞において、そのトランスジーンは、細胞のベクター（例えば、*AAV*）媒介性「形質転換」によって導入／移入されている。トランスジーンが導入されている細胞またはその子孫は、「形質転換細胞」または「形質転換体」と呼ばれる。典型的には、トランスジーンは、形質転換体の子孫に含まれ、または細胞から発生する生物体の一部になる。したがって、（例えば、細胞または組織または器官細胞などの哺乳動物における）「形質転換された」または「トランスフェクションされた」細胞は、外因性分子、例えば、ポリヌクレオチドまたはタンパク質（例えば、トランスジーン）の細胞への組み入れ後の細胞における遺伝的变化を意味する。したがって、「トランスフェクションされた」または「形質転換された」細胞は、例えば、外因性分子が導入されている細胞、またはその子孫である。その細胞（複数可）は、増殖することができ、導入されたタンパク質が発現することができ、または核酸が転写され得る。

#### 【0041】

形質転換され得る細胞には、任意の起源（例えば、中胚葉、外胚葉、または内胚葉）の、任意の組織または器官型の細胞を含む。細胞の非限定的例には、肝臓（例えば、肝実質細胞、類洞内皮細胞（*sinusoidal endothelial cell*））、脾臓（例えば、島細胞）、肺、脳（例えば、神経系細胞、グリア細胞、または上衣細胞）もしくは脊椎などの中枢もしくは末梢神経系、腎臓、眼（例えば、網膜、細胞成分）、脾臓、皮膚、胸腺、精巣、肺、横隔膜、心臓（心臓の）、筋肉もしくは腰筋、または腸（例えば、内分泌）、脂肪組織（白色、褐色、またはベージュ）、筋肉（例えば、線維芽細胞）、滑膜細胞、軟骨細胞、破骨細胞、上皮細胞、内皮細胞、唾液腺細胞、内耳神経細胞、または造血系（例えば、血液またはリンパ）の細胞が挙げられる。追加の例として、肝臓（例えば、肝実質細胞、類洞内皮細胞）、脾臓（例えば、島細胞）、肺、脳（例えば、神経系細胞、グリア細胞、または上衣細胞）もしくは脊椎などの中枢もしくは末梢神経系、腎臓、眼（網膜、細胞成分）、脾臓、皮膚、胸腺、精巣、肺、横隔膜、心臓（心臓の）、筋肉もしくは腰筋、または腸（例えば、内分泌）、脂肪組織（白色、褐色、またはベージュ）、筋肉（例えば、線維芽細胞）、滑膜細胞、軟骨細胞、破骨細胞、上皮細胞、内皮細胞、唾液腺細胞、内耳神経細胞、または造血系（例えば、血液またはリンパ）の細胞へ発生または分化する多能性または複能性前駆細胞などの幹細胞が挙げられる。

#### 【0042】

一実施形態における「治療用分子」は、細胞または被験体におけるタンパク質の欠如または欠陥に起因する症状を軽減し得、または低下させ得るペプチドまたはタンパク質である。あるいは、トランスジーンによってコードされる「治療用」ペプチドまたはタンパク質は、被験体に利益、例えば、遺伝的欠陥を矯正すること、遺伝子（発現または機能）欠損を補正すること、または抗癌効果を与えるものである。治療用ペプチドおよびタンパク質には、嚢胞性線維症膜貫通制御因子タンパク質（*CFTR*）、ジストロフィン、ユートロフィン、血液凝固（*coagulation*または*clotting*）因子（例えば、第ⅩⅢⅢ因子、第ⅩⅢ因子、第Ⅹ因子、第ⅤⅢⅢ因子、第ⅤⅢⅢa因子、プロテインC、第ⅤⅢⅢ因子、Bドメイン欠損第ⅤⅢⅢ因子、または凝固因子の高活性もしくは長時間半減期改変体、または凝固因子の活性形態もしくは不活性形態）、モノクローナル抗体、網膜色素上皮特異的65kDaタンパク質（*RPE65*）、エリスロポイエチン、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、 $\alpha$ -グロビン、 $\beta$ -グロビン、スペクトリン、 $\alpha$ -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

症に關与する酵素（ＡＲＳＡ）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -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ニダーゼ、分岐鎖ケト酸脱水素酵素、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、上皮成長因子、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、トランスフォーミング成長因子 および、サイトカイン、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、インターフェロン -  $\gamma$ 、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、リンフォトキシン、自殺遺伝子産物、単純ヘルペスウイルス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 P 450、デオキシシチジンキナーゼ、腫瘍壊死因子、薬剤抵抗性タンパク質、腫瘍抑制タンパク質（例えば、p53、Rb、Wt-1、NF1、フォンヒッペル・リンダウ（VHL）、SERCA2a、大腸腺腫性ポリポーシス（APC））、VEGF、マイクロジストロフィン、リソソーム酸リパーゼ、アシルスルファターゼ A および B、ATP7A および B、免疫調節性を有するペプチド、免疫寛容誘発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（コロイデミア）、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（脳回転状萎縮）、レチノスキシン 1（X連鎖性網膜分離症）、USH1C（アッシャー症候群 1C）、X連鎖性網膜色素変性症 GTPアーゼ（XLRP）、MERTK（RP：網膜色素変性症の AR 形態）、DFNB1（コネキシン 26 聴覚消失）、ACHM 2、3、および 4（全色盲）、PKD-1 または PKD-2（多発性嚢胞腎）、TPP1、CLN2、リソソーム蓄積症に關与する遺伝子産物（例えば、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、またはゲノム編集のための 1 つもしくは複数のジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはゲノム編集のための修復鋳型として用いられるドナー配列、ならびに治療効果を必要とする被験体において治療効果を生じる任意の他のペプチドまたはタンパク質が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0043】

トランスジーンによってコードされるさらなる例示的な治療用ペプチドまたはタンパク質には、疾患または障害の処置に用いられ得るものが挙げられ、その疾患または障害には、嚢胞性線維症（および肺の他の疾患）、血友病 A、血友病 B、地中海貧血症、貧血および他の血液障害、AIDS、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、てんかんおよび他の神経学的障害、癌、糖尿病、筋肥大（例えば、デュシェンヌ型、ベッカー型）、ゴーシェ病、ハーラー病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、糖原貯蔵障害および他の代謝性欠陥、網膜変性疾患（および眼の他の疾患）、ならびに実質臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓）の疾患が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0044】

本明細書に示されているように、ポリヌクレオチド配列（トランスジーン）は、抑制性およびアンチセンス核酸配列を含む。抑制性、アンチセンス、siRNA、miRNA、shRNA、RNAi、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を調節することができる。そのような分子には、疾患過程の媒介に關与する標的遺伝子の発現を抑制し、それにより、疾患の 1 つ以上の症状を低下させ、抑制し、または軽減することができるものが挙げられる。

#### 【0045】

アンチセンスには、RNA 転写物または DNA（例えば、ゲノム DNA）を結合する、一本鎖、二本鎖、または三本鎖ポリヌクレオチド、およびペプチド核酸（PNA）が挙げられる。標的遺伝子の転写開始部位由来の、例えば、開始点から -10 の位置と +10 の位置の間の、オリゴヌクレオチドは、もう一つの特別な例である。三重鎖形成アンチセンスは、二本鎖 DNA に結合し、それにより、その遺伝子の転写を抑制することができる。

「RNAi」は、遺伝子発現を抑制するための、一本鎖または二本鎖RNA配列の使用である（例えば、Kennerdellら、Cell 95:1017（1998）；およびFireら、Nature、391:806（1998））。したがって、標的遺伝子をコードする領域由来の二本鎖RNA配列を、本発明の方法および使用に従って遺伝子発現／転写を抑制または阻止するために用いてもよい。アンチセンスおよびRNAiは、哺乳動物およびヒトのHTTをコードする核酸などの標的遺伝子配列（例えば、HTT）をコードする核酸に基づいて作製することができる。例えば、一本鎖または二本鎖核酸（例えば、RNA）は、HTT転写物（例えば、mRNA）を標的にすることができる。

#### 【0046】

「siRNA」は、配列特異的な、転写後の遺伝子サイレンシングまたは遺伝子ノックダウンについてのRNA干渉過程に関与する治療用分子を指す。siRNAは、標的にされる遺伝子の同族mRNAの配列との相同性を有する。小分子干渉RNA（siRNA）は、インビトロで合成することができ、またはより長いdsRNAからリボヌクレアーゼIII切断によって作製することができ、配列特異的なmRNA分解の介在物質である。siRNAまたは本発明の他のそのような核酸は、適切に保護されたりボヌクレオシドホスホラミダイトおよび通常のDNA/RNA合成機を用いて化学的に合成することができる。siRNAは、2つの別々の相補的なRNA分子として、または2つの相補的な領域を有する単一のRNA分子として合成することができる。合成RNA分子または合成試薬の商業的供給業者には、Applied Biosystems（Foster City、CA、USA）、Proligo（Hamburg、Germany）、Dharmacon Research（Lafayette、Colo.、USA）、Pierce Chemical（Perbio Scienceの一部、Rockford、Ill.、USA）、Glen Research（Sterling、Va.、USA）、ChemGenes（Ashland、Mass.、USA）、およびCruachem（Glasgow、UK）が挙げられる。標的遺伝子のmRNAを抑制するための特異的なsiRNA構築物は、15～50ヌクレオチド長の間であり得、より典型的には、約20～30ヌクレオチド長である。そのような核酸分子は、当業者に知られた通常の方法を用いて本明細書に開示されたウイルスベクターへ容易に組み入れることができる。

#### 【0047】

本発明に従って抑制性核酸配列で標的にされ得る遺伝子（例えば、ゲノムDNA）または病原性遺伝子の転写物（例えば、RNAまたはmRNA）の特別の非限定的例には、以下が挙げられるが、それらに限定されない：ハンチンチン（HTT）遺伝子などのポリヌクレオチド反復疾患に関連した病原性遺伝子、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症に関連した遺伝子（例えば、アトロフィン1、ATN1）；球脊髄性筋萎縮症における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、（CACNA1A）によってコードされるCa<sub>v</sub>2.1 P/Q電位依存性カルシウムチャネル、TATA結合タンパク質、アタキシン8逆ストランド（ATXN8OSとも呼ばれる）、脊髄小脳失調症（1型、2型、3型、6型、7型、8型、12型、17型）におけるセリン/トレオニンプロテインホスファターゼ2A 55 kDa制御サブユニットB アイソフォーム、脆弱X症候群におけるFMR1（脆弱X精神遅滞1）、脆弱X関連振戦／運動失調症候群におけるFMR1（脆弱X精神遅滞1）、脆弱XE精神遅滞における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プロテインキナーゼ（MT-PK）；フリードライヒ失調症におけるフラタキシン；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発病に関与する遺伝子；アポリポプロテイン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（hypercholesterolemia）；HIV感染におけるHIV Tat、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；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エレメント遺伝子；HIV感染におけるC-Cケモカイ

10

20

30

40

50

ン受容体 (CCR5) ; RSV 感染におけるラウス肉腫ウイルス (RSV)ヌクレオキャ  
 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ミクロRNA (miR-1  
 22) ; 腎臓移植におけるp53、急性腎損傷、もしくは臓器移植後臓器機能障害、また  
 は急性腎不全における腎損傷 ; 進行型再発性または転移性固形悪性腫瘍におけるプロテイン  
 キナーゼN3 (PKN3) ; LMP2、LMP2別名プロテアソームサブユニット 9  
 型 (PSMB 9)、転移性黒色腫 ; LMP7、別名プロテアソームサブユニット 8型  
 (PSMB 8)、転移性黒色腫 ; MECL1、別名プロテアソームサブユニット 10  
 型 (PSMB 10)、転移性黒色腫 ; 固形腫瘍における血管内皮成長因子 (VEGF)  
 ; 固形腫瘍におけるキネシンスピンドルタンパク質、慢性骨髄性白血病におけるアポト  
 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ューリン ; 肝臓腫瘍におけるポロ  
 様キナーゼ1 (PLK1)、C型肝炎感染におけるジアシルグリセロールアシルトランス  
 フェラーゼ1 (DGAT1)、家族性大腸腺腫性ポリポーシスにおける - カテニン ;  
 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RTP801 / Redd1、別名DAN損傷誘発性転写物4タンパク質 ; 加齢性黄  
 斑変性症または脈絡膜新生血管における血管内皮成長因子受容体I (VEGFR1)、非  
 動脈炎性虚血性視神経症におけるカスパーゼ2 ; 先天性爪肥厚症におけるケラチン6A  
 N17K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 ; 呼吸器多核体ウイルス感染における呼吸器多核体ウイルスゲノム /  
 遺伝子配列 ; エボラ感染における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) 様トーシンA  
 (TOR1A)、移植におけるpan-class IおよびHLA対立遺伝子特異的 ; また  
 は常染色体優性遺伝性網膜色素変性症 (adRP) における変異ロドプシン遺伝子 (RHO)。

#### 【0048】

本明細書で用いられる場合、組換えAAVベクターなどのウイルスベクターの修飾成句  
 としての、加えて、組換えポリヌクレオチドおよびポリペプチドなどの配列の修飾成句と  
 しての用語「組換え」は、一般的に天然では生じない様式で、組成物がマニピュレートさ  
 れている (すなわち、操作されている) ことを意味する。組換えAAVの特別の例は、正  
 常には野生型AAVに存在しないポリヌクレオチドがAAV粒子および/またはゲノム内  
 にある場合である。例えば、組換えポリヌクレオチドの特別の例は、タンパク質をコード  
 するポリヌクレオチド (例えば、トランスジーン) が、正常にはその遺伝子がAAVゲノ  
 ム内で付随している5'領域、3'領域、および/またはイントロン領域の有り、または  
 無しで、ベクターヘクローニングされる場合である。用語「組換え」は、本明細書で常に  
 AAVベクター、ならびにポリヌクレオチドおよびポリペプチドなどの配列に関して用い  
 られるとは限らないが、いかなるそのような省略にもかかわらず、AAVおよびAAVベ  
 クター、ならびにポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含む配列の組換え型が明確に含  
 まれる。

#### 【0049】

「発現オペロン」は、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル (例えば、ATG  
 またはAUGコドン)、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなどの転写および翻  
 訳調節配列を有し得る核酸セグメントを指し、それは、宿主細胞または生物体においてポ  
 リペプチドコード配列の発現を促進する。

#### 【0050】

発現調節は、転写、翻訳、スプライシング、メッセージ安定性などのレベルにおいても  
 たらされ得る。用語「発現調節エレメント」は、それが作動可能に連結されている核酸配

10

20

30

40

50

列の発現を制御または影響する1つ以上の核酸配列エレメントを指す。発現調節エレメントは、必要に応じて、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、遺伝子サイレンサー、タンパク質コード遺伝子の直前の開始コドン（例えば、ATG）などを含むことができる。典型的には、転写を調節する発現調節エレメントは、転写されるトランスジーンの5'末端の近く（すなわち、「上流」）に並置している。発現調節エレメントはまた、転写される配列の3'末端（すなわち、「下流」）に、または転写物内に（例えば、イントロン中に）位置することができる。発現調節エレメントは、転写されるトランスジーンからある距離（例えば、そのポリヌクレオチドから100～500、500～1000、2000～5000、5000～10,000またはそれ以上のヌクレオチド）を隔てて、さらにはかなりの距離を隔てても、位置することができる。とは言え、AAVベクターについてのポリヌクレオチドの長さの制限により、そのような発現調節エレメントは、典型的には、トランスジーンから1～1000ヌクレオチド内である。

10

#### 【0051】

核酸配列に作動可能に連結された発現調節エレメントは、その核酸配列の転写、および必要に応じて、翻訳を調節する。用語「作動可能に連結された」とは、言及される構成要素が、それらがそれらの意図された様式で機能することを可能にする関係にある並置を指す。典型的には、発現調節エレメントは、遺伝子の5'末端または3'末端に並置しているが、イントロンのでもあり得る。

#### 【0052】

発現調節エレメントおよびプロモーターには、本明細書で「組織特異的発現調節エレメント/プロモーター」と呼ばれる、特別の組織型または細胞型において活性があるものが挙げられる。組織特異的発現調節エレメントは、典型的には、特定の細胞または組織（例えば、肝臓、脳、中枢神経系、脊髄、眼、網膜、または肺）において活性がある。発現調節エレメントは、典型的には、これらの細胞、組織、または器官において活性があり、特定の細胞型、組織型、または器官型に固有である転写アクチベータータンパク質または転写の他の制御因子によってそれらが認識されるからである。

20

#### 【0053】

発現調節エレメントはまた、制御可能である様式での発現を与えることができ、すなわち、シグナルまたは刺激が、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を増加または減少させる。シグナルまたは刺激に応答して作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を増加させる制御可能なエレメントはまた、「誘導性エレメント」（すなわち、シグナルによって誘導される）とも呼ばれる。特別な例として、ホルモン（例えば、ステロイド）誘導性プロモーターが挙げられるが、それらに限定されない。シグナルまたは刺激に応答して作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を減少させる制御可能なエレメントは、「抑圧性エレメント」（すなわち、シグナルが発現を減少させ、それゆえに、シグナルが除去されるか、または存在しない場合、発現は増加する）と呼ばれる。典型的には、そのようなエレメントによって与えられる増加または減少の量は、存在するシグナルまたは刺激の量に比例する；シグナルまたは刺激の量が多ければ多いほど、発現の増加または減少は大きくなる。

30

#### 【0054】

本明細書で用いられる場合、用語「（複数の）プロモーター」または「プロモーター」は、組換え産物をコードするDNA配列に隣接して位置するDNA配列を指すことができる。プロモーターは、好ましくは、隣接するDNA配列に作動可能に連結されている。プロモーターは、典型的には、プロモーターが存在しない場合の発現した組換え産物の量と比較して、DNA配列から発現した組換え産物の量を増加させる。1つの生物体由来のプロモーターは、別の生物体に由来するDNA配列からの組換え産物発現を増強するために利用することができる。例えば、脊椎動物プロモーターは、脊椎動物においてクラゲGFPの発現のために用いられてもよい。加えて、1つのプロモーターエレメントは、直列に付着した複数のDNA配列について発現した組換え産物の量を増加させることができる。それゆえに、1つのプロモーターエレメントは、1つ以上の組換え産物の発現を増強する

40

50

ことができる。複数のプロモーターエレメントが、当業者によく知られている。

#### 【0055】

一実施形態において、高レベルの構成的発現が望まれる。そのような発現調節エレメントには、多くの異なる細胞型においてトランスジーンを発現を駆動する能力がある遍在性の、または乱交雑性のプロモーター/エンハンサーが挙げられる。そのようなエレメントには、サイトメガロウイルス (CMV) 最初期プロモーター/エンハンサー配列、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター/エンハンサー配列、および様々な哺乳動物細胞型において活性のある他のウイルスプロモーター/エンハンサー、または天然には存在しない合成エレメント (例えば、Boshartら、Cell、41:521-530 (1985) 参照)、SV40 プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、細胞質 - アクチンプロモーター、およびホスホグリセロールキナーゼ (PGK) プロモーターが挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0056】

別の実施形態において、誘導性プロモーターが望まれる場合がある。誘導性プロモーターは、シスまたはトランスのいずれかで、外因的に供給された化合物によって制御されるものであり、それには、非限定的に、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン (MT) プロモーター; デキサメタゾン (Dex) 誘導性マウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーター; T7 ポリメラーゼプロモーター系 (WO 98/10088); テトラサイクリン抑圧性系 (Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:5547-5551 (1992)); テトラサイクリン誘導性系 (Gossenら、Science、268:1766-1769 (1995); Harveyら、Curr. Opin. Chem. Biol. 2:512-518 (1998) も参照); RU486 誘導性系 (Wangら、Nat. Biotech. 15:239-243 (1997) および Wangら、Gene Ther. 4:432-441 (1997)]; およびラパマイシン誘導性系 (Magariら、J. Clin. Invest. 100:2865-2872 (1997); Riveraら、Nat. Medicine、2:1028-1032 (1996)) が挙げられる。この関連において有用であり得る他の型の誘導性プロモーターは、特定の生理学的状態、例えば、温度、急性期により、または複製細胞においてのみ、制御されるものである。

#### 【0057】

別の実施形態において、目的のトランスジーンまたは核酸配列についての本来のプロモーターが用いられる。トランスジーンまたは核酸配列の発現が本来の発現を模倣すべきであることが望まれる場合、本来のプロモーターが好ましくあり得る。トランスジーンまたは他の核酸配列の発現が、時間的に、もしくは発生的に、または組織特異的様式で、または特定の転写刺激に応答して、制御されなければならない場合、本来のプロモーターが用いられ得る。さらなる実施形態において、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位、またはコザックコンセンサス配列などの他の本来の発現調節エレメントもまた、本来の発現を模倣するために用いられ得る。

#### 【0058】

一実施形態において、組換えウイルスゲノムは、組織特異的プロモーター (例えば、肝臓、骨、筋肉、網膜細胞、脳または神経系組織、脾臓、心臓、腎臓などの細胞または組織において活性があるプロモーター) に作動可能に連結されたトランスジーンを含む。例えば、骨格筋における発現が望まれる場合には、筋肉において活性のあるプロモーターが用いられ得る。これらには、骨格 - アクチン、ミオシン軽鎖 2A、ジストロフィン、筋クレアチンキナーゼをコードする遺伝子由来のプロモーター、加えて、天然のプロモーターより高い活性を有する合成の筋肉プロモーターが挙げられる。Liら、Nat. Biotech. 17:241-245 (1999) 参照。組織特異的であるプロモーターの例は、とりわけ、肝臓アルブミン、Miyatakeら、J. Virol.、71:5124-32 (1997); B型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandigら、Gene Ther. 3:1002-9 (1996); - フェトプロテイン (AFP)、Arbu

10

20

30

40

50

thnotら、Hum. Gene. Ther.、7:1503-14(1996);骨(オステオカルシン、Steinら、Mol. Biol. Rep.、24:185-96(1997)];骨シアロタンパク質、Chenら、J. Bone Miner. Res.、11:654-64(1996));リンパ球(CD2、Hansalら、J. Immunol.、161:1063-8(1998));免疫グロブリン重鎖;T細胞受容体(a鎖);ニューロン(ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)プロモーター、Andersenら、Cell. Mol. Neurobiol.、13:503-15(1993));ニューロフィラメント軽鎖遺伝子、Piccioliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:5611-5(1991);ニューロン特異的vgf遺伝子、Piccioliら、Neuron、15:373-84(1995)]について知られている。異なるプロモーター由来の要素の組み合わせによって、または合成DNA配列の開発によって得られる合成プロモーターもまた用いることができる。

10

#### 【0059】

本明細書で用いられる場合、用語「(複数の)エンハンサー」または「エンハンサー」は、組換え産物をコードするDNA配列に隣接して位置するDNA配列を指すことができる。エンハンサー要素は、典型的には、プロモーター要素の上流に位置し、またはコードDNA配列(例えば、組換え産物(複数可)へ転写または翻訳されるDNA配列)の下流に、もしくはその内部に位置することができる。したがって、エンハンサー要素は、組換え産物をコードするDNA配列の100塩基対、200塩基対、または300塩基対またはそれ以上、上流または下流に位置することができる。エンハンサー要素は、プロモーター要素により提供される発現の増加より上に、DNA配列から発現する組換え産物の量を増加させることができる。複数のエンハンサー要素が、当業者にとって容易に入手可能である。

20

#### 【0060】

本明細書で用いられる場合、「核酸」または「核酸分子」は、直鎖かまたは環状のいずれかの形をとる、一本鎖かまたは二本鎖のいずれかの任意のDNAまたはRNA分子、および一本鎖である場合には、その相補的配列の分子を指す。核酸分子を論じることにおいて、特別な核酸分子の配列または構造は、配列を5'から3'の方向に提供する通常の慣習に従って本明細書で記載されてもよい。本発明の核酸に関連して、用語「単離された核酸」が時々、用いられる。この用語は、DNAに適用される場合、それが由来する生物体の天然のゲノムにおいてそれが直接、近接している配列から分離されているDNA分子を指す。例えば、「単離された核酸」は、プラスミドもしくはウイルスベクターなどのベクターへ挿入されるか、または原核細胞もしくは真核細胞もしくは宿主生物体のゲノムDNAへ組み込まれるDNA分子を含んでもよい。

30

#### 【0061】

「ベクター」は、別の遺伝的配列または要素(DNAかまたはRNAのいずれか)が付着して、その結果、その付着した配列または要素の複製をもたらす、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージ、またはウイルス(例えば、AAVベクター)などのレプリコンである。

#### 【0062】

用語「形質転換する」、「トランスフェクションする」、「形質導入する」は、核酸(トランスジーン)が細胞または宿主生物体へ導入される任意の方法または手段を指し、同じ意味を伝えるために交換可能に用いられてもよい。遺伝子治療の使用および方法について、形質転換される細胞は被験体内にあり得る。被験体内の細胞は、インビボで、本明細書に示されているようなトランスジーンで形質転換することができる。あるいは、細胞は、インビトロで、トランスジーンで形質転換することができ、その後、処置をもたらすために被験体の組織へ移植することができる。あるいは、初代細胞単離物または樹立細胞株がトランスジーンで形質転換することができ、その後、任意で、被験体の組織へ移植されてもよい。そのような方法には、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、感染、PEG融合などが挙げられるが、それらに限定されない。

40

50

## 【 0 0 6 3 】

導入される核酸は、レシピエント細胞または生物体の核酸へ組み込まれて（共有結合性に連結されて）もよいし、組み込まれなくてもよい。例えば、細菌、酵母、植物、および哺乳動物の細胞において、導入された核酸は、エピソームエレメントとして、またはプラスミドなどの独立したレプリコンとして維持されてもよい。あるいは、導入された核酸は、レシピエント細胞または生物体の核酸（ゲノムDNA）へ組み込まれた状態になって、その細胞または生物体において安定的に維持され、さらに、レシピエント細胞または生物体の子孫細胞または子孫生物体へ伝えられ、または遺伝してもよい。最後に、導入された核酸は、レシピエント細胞または宿主生物体において一過性でのみ、存在してもよい。

## 【 0 0 6 4 】

用語「選択可能なマーカー遺伝子」は、発現した場合、抗生物質抵抗性などの選択可能な表現型を、形質転換された細胞または植物へ与える遺伝子を指す。「レポーター」遺伝子は、検出可能なシグナルを提供する遺伝子である。レポーター遺伝子の非限定的例は、ルシフェラーゼ遺伝子である。

## 【 0 0 6 5 】

用語「作動可能に連結された」とは、コード配列の発現に必要な制御配列が、DNA分子において、トランスジーン（例えば、タンパク質コード配列または抑制性核酸）に対して、トランスジーン配列の発現をもたらすように、適切な位置に置かれることを意味する。この同じ定義が、発現ベクターにおける転写ユニットおよび他の転写調節エレメント（例えば、エンハンサー）の配置に時々、適用される。

## 【 0 0 6 6 】

本明細書で用いられる場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、本発明の配列、プライマー、およびプローブを指し、2つ以上のリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドで構成される核酸分子として定義され、好ましくは3つより多い。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは、様々な因子に、ならびにオリゴヌクレオチドの特別な適用および使用に依存する。

## 【 0 0 6 7 】

句「特異的にハイブリダイズする」とは、当技術分野において一般的に用いられるあらかじめ決められた条件下でそのようなハイブリダイゼーションを可能にするのに十分に相補的な（時々、「実質的に相補的な」と呼ばれる）配列の2つの一本鎖核酸分子の間での会合を指す。特に、その用語は、オリゴヌクレオチドの非相補的な配列の一本鎖核酸とのハイブリダイゼーションを実質的に除外した、本発明の一本鎖DNAまたはRNA分子内に含有される実質的に相補的な配列とのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを指す。

## 【 0 0 6 8 】

本明細書で用いられる場合、用語「プライマー」は、適切な環境に置かれた場合、鋳型依存性核酸合成のイニシエーターとして機能的に働くことができる、制限酵素消化によって生成される生物学的系に由来するか、または合成的に作製されるかのいずれかの、一本鎖かまたは二本鎖のいずれかの、DNAオリゴヌクレオチドを指す。適当な核酸鋳型、核酸の適切なヌクレオシド三リン酸前駆体、ポリメラーゼ酵素、適切な補因子、ならびに適切な温度およびpHなどの条件と共に提供された場合、プライマーは、ポリメラーゼまたは同様の活性の作用によるヌクレオチドの付加によってその3'末端で伸長され、プライマー伸長産物を生じ得る。プライマーは、その適用の特別な条件および要求に依存して長さが変わり得る。例えば、診断適用において、オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、15～25ヌクレオチド長またはそれ以上である。プライマーは、所望の伸長産物の合成をプライムするために所望の鋳型への十分な相補性をもたなければならず、すなわち、ポリメラーゼまたは同様の酵素による合成の開始に用いられる、適当に並置した、プライマーの3'ヒドロキシル部分を提供するのに十分な様式で、所望の鋳型鎖とアニールすることができる。プライマー配列が、所望の鋳型の正確な相補体を表すことは必要とはされない。例えば、非相補的ヌクレオチド配列が、別の相補的なプライマーの5'末端に

10

20

30

40

50

付着してもよい。あるいは、伸長産物の合成のために鋳型 - プライマー複合体を機能的に提供するのに所望の鋳型鎖の配列と十分な相補性を有する条件で、非相補的塩基が、オリゴヌクレオチドプライマー配列内に散在してもよい。

【0069】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、米国特許第 4,683,195 号、第 4,800,195 号、および第 4,965,188 号に記載されており、その特許の全開示は、参照により本明細書に組み入れられている。

【0070】

用語「単離された」は、天然で付随しているだろう他の化合物から十分、分離されている、化合物または複合体を指し得る。「単離された」とは、他の化合物もしくは材料との人工的もしくは合成的混合物、または基本的な活性もしくは次のアッセイに干渉せず、および、例えば、不完全な精製もしくは安定剤の添加により、存在する可能性がある、不純物の存在を排除することを意図するものではない。

【0071】

用語「免疫応答」は、脊椎動物被験体の免疫系による、抗原または抗原決定基に対する任意の応答を指すことを意図される。例示的な免疫応答は、体液性免疫応答 (例えば、抗原特異的抗体の産生) および細胞性免疫応答 (例えば、リンパ球の活性化または増殖) が挙げられる。

【0072】

本発明の方法は、分裂細胞および非分裂細胞の両方を含む幅広い範囲の宿主細胞へ異種性核酸配列 (トランスジーン) を送達する (形質導入する) ための手段を提供する。本発明のベクターおよび他の試薬、方法、ならびに薬学的処方物は、さらに、処置の方法として、タンパク質、ペプチド、または治療用核酸を、それを必要とする被験体に投与する方法において有用である。したがって、この様式において、タンパク質、ペプチド、または核酸は、インビボで被験体において産生され得る。被験体はそのタンパク質もしくはペプチドが欠損しているという理由により、または被験体におけるそのタンパク質もしくはペプチドの産生が、処置の方法もしくは別の方法として、いくらかの治療効果を与え得るという理由により、被験体は、そのタンパク質もしくはペプチドから利益を得る可能性があり、またはそれを必要としている場合がある。あるいは、例えば、癌またはアテローム性動脈硬化または神経変性疾患の処置について、例えば、治療効果を達成するために、疾患過程に關与する標的遺伝子の発現または産生を抑制するか、または低下させることが望ましい場合がある。

【0073】

一般的に、発明の処方物、方法、および使用は、遺伝子発現に關した任意の障害に關連した症状を処置し、または寛解させるために、生物学的効果を有する任意の核酸 (トランスジーン) を送達するのに用いられてもよい。実例となる疾患状態には以下が挙げられるが、それらに限定されない：嚢胞性線維症 (および肺の他の疾患)、血友病 A、血友病 B、地中海貧血症、貧血および他の血液凝固障害、AIDS、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、てんかんおよび他の神経学的障害、癌、糖尿病、筋肥大 (例えば、デュシェンヌ型、ベッカー型)、ゴーシェ病、ハーラー病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、糖原貯蔵障害および他の代謝性欠陥、ポンペ病、うっ血性心不全、網膜変性疾患 (および眼の他の疾患)、ならびに実質臓器 (例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓) の疾患など。

【0074】

加えて、発明の処方物、方法、および使用は、癌、感染性疾患、および関節リウマチなどの自己免疫疾患に關連した症状を処置し、または寛解させる有益な生物学的効果を与えることが知られているモノクローナル抗体またはその断片をコードする核酸を送達するために用いられてもよい。

【0075】

遺伝子移入は、様々な疾患状態について治療を提供するために用いられる。欠陥遺伝子

10

20

30

40

50

が知られており、かつクローニングされている多くの遺伝性疾患がある。場合によっては、これらのクローニングされた遺伝子の機能が知られている。一般的に、上記の疾患状態は、2つのクラス：一般的に劣性様式で遺伝する、通常、酵素の、欠損状態、および優性様式で遺伝する、少なくとも時々、制御タンパク質または構造タンパク質に関わる不均衡状態に分類される。欠損状態の疾患について、遺伝子移入は、補充療法として正常な遺伝子を冒された組織へ運ぶために、加えて、アンチセンス変異を用いてその疾患についての動物モデルを作製するために、用いることができる。不均衡な疾患状態について、遺伝子移入は、モデル系において疾患状態を引き起こすために用いることができ、その後、そのモデル系は、その疾患状態に対抗しようとする試みに用いることができる。このように、発明の処方物、方法、および使用は、遺伝的疾患の処置を可能にする。本明細書で用いられる場合、疾患状態は、その疾患を引き起こし、またはそれをより重症にさせる欠損または不均衡を部分的に、または全体的に治すことにより処置される。変異を引き起こすための、または欠陥を矯正するための核酸配列の部位特異的組込みの使用もまた可能である。

#### 【0076】

本発明は、ヒトおよび獣医学の両方の医学的適用において有用である。適切な被験体には、ヒトなどの哺乳動物が挙げられる。本明細書で用いられる場合、用語「哺乳動物」には、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギなどが挙げられるが、それらに限定されない。ヒト被験体が最も好ましい。ヒト被験体には、胎児、新生児、乳児、若年、および成人の被験体が挙げられる。

#### 【0077】

特別の実施形態において、本発明は、薬学的に許容され得る担体中のベクターおよび/または空キャプシドもしくは(例えば、ウイルスの)ゲノム含有キャプシド、または他の医学的作用物質、薬学的作用物質、担体、補助剤、希釈剤などを含む薬学的組成物を提供する。注射について、担体は、典型的には液体である。他の投与方法について、担体は、無菌の、発熱物質を含まない水、または無菌の、発熱物質を含まないリン酸緩衝食塩水などの固体または液体のいずれでもよい。吸入投与について、担体は、呼吸用であり、好ましくは、固体または液体の粒子状の形をとる。注射用媒体として、安定化剤、塩もしくは食塩水、および/または緩衝剤などの、注射用溶液についての通常の添加物を含有する水が挙げられ得る。

#### 【0078】

他の実施形態において、本発明は、薬学的に許容され得る担体中のAAVプロウイルスがゲノムへ組み込まれている細胞、または他の医学的作用物質、薬学的作用物質、担体、補助剤、希釈剤などを含む薬学的組成物を提供する。そのような細胞は、インビボ、インビトロ、またはエクスピボで作製することができる。

#### 【0079】

「薬学的に許容され得る」とは、生物学的に、または別なふうに望ましくないということがない材料を意味し、例えば、その材料は、いかなる望ましくない生物学的効果も引き起こすことなく、被験体に投与され得る。したがって、そのような薬学的組成物は、例えば、ウイルス粒子または細胞を直接被験体に、典型的には静脈内投与によって投与することにおいて、用いられてもよい。

#### 【0080】

本明細書で用いられる場合、「治療的有效な」量は、疾患状態に関連した症状の少なくとも1つを軽減する(例えば、緩和する、減少させる、低下させる)のに十分である量である。代わりの言い方をすれば、「治療的有效な」量は、被験体の状態においていくらかの改善を与えるのに十分である量である。

#### 【0081】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載された発明の処方物を用いての、インビボでの投与方法または被験体を処置する方法である。ベクターの、空キャプシドまたは(例えば、ウイルスの)ゲノム含有キャプシドまたはキャプシドタンパク質と別々での、または組み合わせての、それを必要とする被験体(例えば、ヒト)または動物への投与は、ウイ

10

20

30

40

50

ルスベクターを投与するための、当技術分野において知られた任意の手段によることができる。

【0082】

例示的な投与様式には、経口的（例えば、経口摂取、頬、または舌下）、直腸、経粘膜的、局所的、経皮的（局所的）、吸入、非経口的（例えば、静脈内、皮下、皮内、筋肉内、および関節内）、腔内、頭蓋内、脊髄内の投与など、加えて、直接的な組織または器官への注射（腺内、器官内、リンパ管内、肺内）、あるいは、くも膜下腔内、直接的筋肉内、脳室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、心内膜心筋、眼内の注射、または血管内送達挙げられる。あるいは、例えば、全身性様式よりむしろ、局所性様式でウイルスを投与してもよい。

10

【0083】

本発明の特別の実施形態において、トランスジーンは、被験体の肝臓に送達される。肝臓への投与は、当技術分野において知られた任意の方法により達成されてもよく、その方法には、静脈内投与、門脈内投与、胆管内（*intra biliary*）投与、動脈内投与、および肝実質（*paraenchyma*）への直接的注射が挙げられるが、それらに限定されない。

【0084】

細胞（例えば、肝実質細胞などの肝臓細胞）が、ペプチド、タンパク質、または治療用核酸をコードする組換えパルボウイルスベクターに感染し、細胞は、コードされたペプチド、タンパク質、または治療用核酸を発現し、循環器系へ治療の有効量でそれを分泌する。あるいは、ベクターは、別の細胞または組織に送達されて、それによって発現し、その別の細胞または組織には、脳、膵臓、脾臓、または筋肉が挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0085】

治療効果を達成するためのベクター用量、例えば、1キログラムの体重あたりのベクターゲノム（*vg/kg*）または形質導入単位における用量は、いくつかの因子に基づいて変わり、その因子には、投与経路、治療効果を達成するのに必要とされるトランスジーン発現のレベル、処置される特定の疾患、ベクター（例えば、AAV）に対する任意の宿主免疫応答、トランスジーンまたは発現産物（タンパク質）に対する宿主免疫応答、および発現するタンパク質の安定性が挙げられるが、それらに限定されない。当業者は、前述の因子および他の因子に基づいて、特別な疾患または障害を有する患者を処置するためのAAVベクター用量範囲を容易に決定することができる。一般的に、用量は、治療効果を達成し得る、被験体の1キログラムの体重あたり、少なくとも $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ またはそれ以上からの範囲、例えば、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、または $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ またはそれ以上のベクターゲノム（*vg/kg*）である。

30

【0086】

本発明の特別の実施形態において、1回より多い投与（例えば、2回、3回、4回、またはそれ以上の投与）が、トランスジーン発現の治療レベルを達成するために用いられてもよい。この実施形態に従い、かつ本明細書に記載されているように、本発明のパルボウイルス処方物は、処置されることになっている被験体において中和抗体を回避するように投与される。

40

【0087】

AAVベクターに特異的な中和抗体（NAb）の力価は、インビトロアッセイで測定することができ、そのインビトロアッセイにおいて、試験血清が、レポータートランスジーンを有し、かつ細胞を形質導入するために用いられるAAVベクターとインキュベートされる。インビトロでの残留のレポーター遺伝子活性が、AAVベクター特異的NAbの中和の程度を決定するために用いられる。高力価NAbを有する被験体は、大過剰（AAVベクター用量を超過する10～10,000倍のキャプシド粒子濃度）のAAV空キャプシドと共に投与されてもよい；低～陰性の力価NAbを有する被験体は、より低量（AA

50

Vベクター用量を超過する1～10倍のキャプシド粒子濃度)の空キャプシドを受けることができる。

【0088】

本明細書で開示されているように、空キャプシドまたは(例えば、ウイルスの)ゲノム含有キャプシドまたはキャプシドタンパク質は、未処理であることもできるし、または細胞内取り込みを低下させるように改変され、受容体結合(例えば、ヘパラン硫酸プロテオグリカンへの結合)を低下させるように架橋され、もしくは(例えば、キャプシドタンパク質の)1つもしくは複数のアミノ酸残基を変異することにより改変することもできる。AAVベクターは、空キャプシドまたは(例えば、ウイルスの)ゲノム含有キャプシドまたはキャプシドタンパク質と共に処方され、組み合わせとして被験体に投与されてもよいし、またはAAVベクターおよび空キャプシドまたは(例えば、ウイルスの)ゲノム含有キャプシドまたはキャプシドタンパク質は、お互いに別々に被験体へ投与されてもよい。

10

【0089】

要約すれば、本発明のパルボウイルスベクター、試薬、ならびに方法および使用は、トランスジーンを分裂細胞または非分裂細胞のいずれにも方向づけるために、およびそこでその核酸を安定的に発現させるために用いることができる。したがって、本発明のベクターは、疾患状態についての遺伝子治療において、または細胞生理学の実験的改変のために、有用であり得る。

【0090】

他に規定がない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、当業者によって一般的に理解されているのと同じ意味をもつ。本明細書に記載されたものと類似した、または等価の方法および材料は、本発明の実施または試験において用いることができるが、適切な方法および材料は本明細書に記載されている。

20

【0091】

本明細書に引用された全ての出願、刊行物、特許、ならびに他の参考文献、GenBank引用およびATCC引用は、全体として参照により組み入れられている。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配するものとする。

【0092】

本明細書に開示された特徴の全ては、任意の組み合わせで組み合わせられてもよい。本明細書に開示された各特徴は、同じ、等価の、または類似した目的を果たす代替の特徴に置き換えられてもよい。したがって、他に明確な記述がない限り、開示された特徴(例えば、化合物構造)は、等価の、または類似した特徴の類の例である。

30

【0093】

本明細書で用いられる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(a n ( a n d ) )」、「および「その(t h e)」は、文脈が明らかに他に示さない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「1つのポリヌクレオチド(a p o l y n u c l e o t i d e)」への言及は、複数の遺伝子などの複数のそのようなポリヌクレオチドを含む。

【0094】

本明細書で用いられる場合、全ての数値または数の範囲は、文脈が明らかに他に示さない限り、そのような範囲内の整数、およびその値または範囲内の整数の小数部を含む。したがって、実例を示すと、少なくとも90%同一性への言及は、91%、92%、93%、94%、95%、95%、97%、98%、99%など、加えて91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%など、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%などその他を含む。

40

【0095】

「より多い(より大きい)」または「未満」を伴う数への言及は、それぞれ、その指示の数より大きい、または未満の任意の数を含む。したがって、例えば、「1,000未満」への言及は、999、998、997など、数の1までずっと、含む;「100未満」は、99、98、97など、数の1までずっと、含む。

【0096】

50

本明細書で用いられる場合、全ての数値または範囲は、文脈が明らかに他に示さない限り、その値の小数部、およびそのような範囲内の整数、およびそのような範囲内の整数の小数部を含む。したがって、実例を示すと、パーセンテージ範囲、90～100%などの数の範囲は、91%、92%、93%、94%、95%、95%、97%など、加えて91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%など、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%などその他を含む。したがって、1～50の範囲への言及は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20など、加えて1.1、1.2、1.3、1.4、1.5など、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5などその他を含む。

【0097】

10

一連の範囲への言及は、その一連の範囲内の異なる範囲の境界の値を組み合わせる範囲を含む。したがって、実例を示すと、2～72時間、2～48時間、4～24時間、4～18時間、および6～12時間の一連の範囲への言及は、2～6時間、2、12時間、2～18時間、2～24時間など、および4～27時間、4～48時間、4～6時間などの範囲を含む。

【0098】

本明細書で用いられる場合、指数部は、様々な方式で表現することができる。例えば、 $4.5 \times 10^{11}$  はまた、 $4.5 e^{11}$  と表現することができ、 $5.0 \times 10^{11}$  は  $5 e^{11}$  と表現することができる。

【0099】

20

本発明は、一般的に、多数の実施形態および態様を記載するために肯定的言語を用いて本明細書に開示される。本発明はまた、具体的には、物質または材料、方法ステップおよび条件、プロトコール、または手順などの特別な内容が、全部または一部分、排除される実施形態を含む。例えば、本発明の特定の実施形態または態様において、材料および/または方法ステップが排除される。したがって、本発明は、一般的に、本発明が含まないことに関して本明細書で表されていないとしても、本発明において明確には排除されていない態様は、それでもなお、本明細書に開示される。

【0100】

本発明の多くの実施形態が記載されている。とは言え、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、それを様々な利用および条件に適応させるために、本発明を様々に変化および改変することができる。したがって、以下の実施例は、主張される本発明の範囲を例証することを意図されるが、それを限定することを意図するものではない。

30

【実施例】

【0101】

実施例1

この実施例は、様々な材料および方法の記載を含む。

【0102】

AAVベクターおよび空キャプシド：AAVベクターを、以前に記載されているように調製した(Matsushita T.ら、Gene Ther. 5、938-945(1998))。ゲノム含有ベクターおよび空AAVキャプシド粒子を、塩化セシウム勾配遠心分離により精製した(Ayuso E.ら、Gene Ther. 17、503-510(2010))。インビボ実験に用いられるAAVベクターは、肝臓特異的プロモーターの調節下でヒトF.IXを発現した(Manno C.S.ら、Nat. Med. 12、342-347(2006))。

40

【0103】

適切な精製ステップのフローチャートは下に提供される。

回収

接線流濾過による濃縮/ダイアフィルトレーション

50

微少溶液操作による細胞溶解

濾過による清澄化

イオン交換カラムクロマトグラフィーによるAAV粒子の精製

接線流濾過によるカラム溶出液の濃縮（任意）

1 × CsCl 勾配遠心分離

10

接線流濾過による濃縮および緩衝液交換

界面活性剤および濾過（0.2 μm）での最終処方

最終滅菌濾過（0.2 μm）、バイアル充填および完了  
（最終産物）。

#### 【0104】

架橋：AAVキャプシドを、2つの異なるプロトコールで架橋した。1つのプロトコールにおいて、1ミリリットルあたり  $1 \times 10^{13}$  個のAAV粒子を、37%ホルムアルデヒド（Sigma）の1:200希釈溶液と回転ホイール上、4で3週間、インキュベートした。その後、試料中のホルムアルデヒドを、3.75%（w/v）メタ重亜硫酸ナトリウムを加えることにより（1:100）、中和した。ベクターを、1×PBS中で透析し、濾過し、-80で保存した。未処理のベクターを、同様に、ただしホルムアルデヒドの非存在下で、処理した。第2のプロトコールにおいて、ベクターを5mM 3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオネート]（DTSSP、Pierce-Thermo Scientific）とインキュベートした。DTSSPでの架橋を、氷上で2時間、行った。架橋後、ベクターを1×PBS中で透析し、-80で保存した。架橋は、抗AAV2モノクローナル抗体A20によるキャプシド認識に影響しなかった（図13）。

20

#### 【0105】

ヒト血清および細胞試料：研究に用いられる全てのヒト試料を、Children's Hospital of PhiladelphiaおよびUniversity of Pittsburgh's Institutional Review Boards（IRB）によって承認されたプロトコールにより収集した。小児科被験体由来の試料を、商業的供給源（Bioreclamation）から取得した。樹状細胞（DC）の調製に用いられる匿名化された末梢血単核細胞（PBMC）試料（Mingozzi F.ら、Nat. Med. 13, 419-422（2007））を、University of PennsylvaniaにおけるCenter for AIDS Researchから入手した。

30

#### 【0106】

動物研究：動物研究は、Children's Hospital of PhiladelphiaおよびCharles River Laboratories Preclinical ServicesにおけるInstitutional Animal Care and Use Committees（IACUC）によって承認された。週齢8～10週間の雄C57BL/6マウスを、Charles Rivers Laboratoriesから購入した。総体積200 μlの1×PBS中の静脈内免疫グロブリン（IVIg、Gamunex）を、腹腔内に注射した。非ヒト霊長類研究について、ベクターを、以前に記載されているように（Nathwani A.C.ら、Blood. 109, 1414-1421（2007））、末梢静脈注入により送達した。

40

#### 【0107】

50

抗体アッセイ：インビトロ抗AAV中和抗体アッセイは、アッセイの感度を増加させるためにレポーター遺伝子ルシフェラーゼを発現するAAVベクターを用いることにより改変された、以前に記載されたプロトコル(Manno, C. S.ら、Nat Med 12、342-347(2006))に基づいた。アッセイにおいて、NAb力価は、「ウイルスのみ」対照のシグナルと比較してルシフェラーゼシグナルの50%抑制が観察される試験血清の逆数の希釈度に対応する。試験血清の1:1希釈におけるレポーターシグナルのパーセント抑制は、希釈されていない試験試料の抑制活性を表す。

#### 【0108】

抗AAV抗体を検出するためのドットブロットアッセイについて、1μgのAAV2またはAAV8キャプシドを、Minifold I Dot-Blot System (GE Healthcare Life Sciences)を用いてニトロセルロース膜上へスポットした。その後、膜を、TBS Western Blocking Reagent (Roche)で一晩、ブロッキングし、試験血清の1:500希釈溶液と室温で1時間、インキュベートした。0.1% Tween-20 (Bio-Rad)を含むTBSで条片を洗浄し、IRDye 800 CW (LI-COR Biosciences)で標識されたヤギ抗ヒトIgG抗体 (Southern Biotech)を用いて、結合したIgGを検出した。ブロットを、Odyssey Infrared Imaging system (LI-COR Biosciences)を用いて169μmの分解能で取得した。画像デンシトメトリーを、ImageJソフトウェアバージョン1.45s (National Institute of Health)を用いて実施し、生じた平均強度を、バックグラウンドの引き算後、陽性対照 (FACTプールされたヒト血漿、George King)に占める割合として表した。ドットブロットアッセイは、以下の通り、より詳細に記載されている：

キャプシド変異体の作製：AAV2野生型キャプシドタンパク質を、Quickchangeキット (Invitrogen)を用いて変異を誘発した。2つの変異を挿入し、結果として、2個のアミノ酸変化：R585AおよびR588Aを生じた（その変異体キャプシドは、この明細書においてAAV<sub>585/8</sub>と示されている）。そのキャプシドを用いて、以下の材料を調製した：インビトロ形質導入効率研究のためのAAV<sub>585/8</sub>-GFPベクター；マウスにおいて、その変異体キャプシドの肝臓を形質導入し、かつヒト第IX因子を発現する能力を研究するためのAAV<sub>585/8</sub>-FIX19ベクター；およびこの変異体の、抗AAV抗体についてのデコイとして働く能力を研究するためのAAV<sub>585/8</sub>空キャプシド。

#### 【0109】

試薬および装置：

Tris緩衝食塩水、TBS、10x、Sigma T5912または同等物  
ウェスタンブロットブロッキング試薬、Roche Applied Bioscience 11921673001または同等物  
Tween 20、Bio Rad 170-6531または同等物  
ニトロセルロース膜、ポアサイズ0.2μm、Protran BA83-10402488  
ゲルブロットペーパーGB003(15x15cm)Whatman(登録商標)  
密度勾配精製されたAAV空キャプシド  
精製された抗ヒトIgG (UNLB)、Southern Biotech 2040-01  
928-38040 IRDye 800CWタンパク質標識キット - 高分子量  
対照FACT血漿、George King Biomedicalカタログ#0020-1、ロット番号D9d1(入手可能ならば)  
プール小児科血清  
フタ付きの無処理の4ウェルのディッシュ、Thermo Scientificカタログ#267061または同等物

血清学的ピペット、5 mL、10 mL、25 mL  
 50 mL遠心機/コニカルチューブ、Corning 430290  
 試薬リザーバ、Costar 4870  
 12チャンネルのマルチチャンネルピペッター20~200 µL  
 P-20、P-200、およびP-1000 Rainin Pipetman  
 ピペットチップ  
 Nunc-Immuno(商標)チューブMiniSorp 4ml、ポリエチレン、466982  
 12チャンネルのリザーバ、Costar 4877  
 ボルテックスミキサー  
 ピンセット  
 アルミ箔  
 Odysseyソフトウェア(Li-Cor Biosciences)  
 ImageJソフトウェア  
 Microsoft Excel。

# 【0110】

## 装置

生物学的安全キャビネット

フリーザー、-80

冷蔵庫、2~8

真空源

Odyssey Infrared Imaging System(Li-Cor Biosciences)

オービタルシェーカー。

# 【0111】

## 試薬の調製

$1 \times 10^{-3}$  v g/mLの濃度でのAAV空キャプシド

-80における保存100 µLアリコート

ブロッキング緩衝液:ブロッキング緩衝液を1×TBS中に1:10希釈する。プレートあたり70 mLのブロッキング緩衝液を調製し、最高4ヶ月間、-20で保存する。

希釈緩衝液:ブロッキング緩衝液を1×TBS中に1:1希釈する。

洗浄緩衝液:1×TBS、0.1%(v/v)Tween 20の溶液を調製する。最高1ヶ月間、2~8で保存する。

対照血漿FACT:対照血漿を56で30分間、熱失活させ、50 µLアリコートを-80で保存する。製造日から3年間の有効期限を割り当てる。解凍されたアリコートを再凍結してはならない。

試験試料:試験血清または血漿試料を56で30分間、熱失活させ、アリコートを-80で保存する。

標識された抗ヒトIgG CW800:製造会社の使用説明書に従って、抗体を標識する。最終の抗体濃度は、2 mg/mLであり、色素/タンパク質比率は1.5~2の間にあるべきである。

# 【0112】

## 手順

試薬の調製:アッセイの1日目

AAV空キャプシドを、プレートあたり5 mLのMiniSorpチューブにおいて、TBS 1×中、10 µg/mLの最終濃度へ希釈する。

ブロッキング緩衝液を、プレートあたり5 mLのMiniSorpチューブにおいてTBS 1×中、1/1000に希釈する。

容器内にニトロセルロース膜およびゲルプロットペーパーを置いて、それらを1×TBS中、5分間、浸漬させる。

Minifold System Iを真空源に接続し、真空プレナムの上にフィルターサポートプレート置き、登録ピンを一直線に並べる。フィルターサポートプレート上にペーパー置き、切断の角を登録ピンと合わせ、この手順を繰り返して、ゲルプロットペーパーの上にニトロセルロース膜を置く。

減圧を与え、100  $\mu$ l / ウェルをニトロセルロース膜上に、以下のテンプレートに従って、マルチチャンネルピペットでスポットする（BB、ブロッキング緩衝液；AAV、空キャプシド）：

【0113】

【化2】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BB	AAV	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AAV	BB
B	BB	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	BB
C	BB	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	BB
D	BB	AAV	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AAV	BB
E	BB	AAV	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AAV	BB
F	BB	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	BB
G	BB	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	AAV	BB
H	BB	AAV	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AAV	BB

【0114】

なお減圧を続け、クランプを外すことによりマニホールドを取り外し、鉗子を用いて、注意深く膜を取り出す。膜を乾燥させ、50 mlのブロッキング緩衝液でシェーカー（200 rpm）上、4 で一晩、ブロッキングする。

【0115】

試料調製およびインキュベーション：2日目

希釈緩衝液を用いて、試験試料および対照（陽性としてのFACT血漿および陰性小児科試料）の2 mlの1：500希釈溶液を調製する。

鉗子とはさみを用いて膜を長方形に、各片が2つのAAVスポットと2つのBBスポットを有するように切断する。

シェーカー上で、膜を試料および対照と室温で1時間、インキュベートする。

洗浄緩衝液（1回の洗浄あたり10 ml、5分間）で3回、洗浄する。

希釈剤として希釈緩衝液（試料あたり2 ml、プレートあたり50 ml）を用いて、抗ヒトIgG 800 CWの1 / 10000希釈溶液を調製する。

アルミ箔で膜を覆いながら、試料を室温で1時間、インキュベートする。

暗闇中、洗浄緩衝液（1回の洗浄あたり10 ml、5分間）で3回、洗浄する。

ピンセットを用いて、2枚のゲルプロットペーパーの間に各膜を置く。それを乾燥させ、アルミ箔で包む。

画像取得：Odyssey（Odyssey）ソフトウェアを開き、新しいプロジェクトを開く。

Odysseyスキャナ上に乾燥膜を、表を下にして置く。

スキャナ表面上のルーラーを用いて取得領域を決定し、ダイアログパネル上に以下のパラメーターを設定する：

（1）分解能：169  $\mu$ m

（2）焦点：膜

（3）チャンネル：800

（4）強度：5

取得を保存し、カラー化TIFFとして画像をエクスポートする。

【0116】

Image J分析

TIFF画像をImage Jソフトウェアで開き、カラーチャンネルを分割する（Image > Color > Split Channel）。

Specify Selection Tool (Edit > Selection > Specify) を用いて、 $25 \times 25$  楕円形選択を描く。

F A C T および陰性対照を含む、各 A A V および B B スポットについて平均強度を測定する。

各 2 連の読み取りの平均をとる。

結果をアッセイレポート形式へコピーし、レポート形式の下部にある式を用いて、最大平均強度に占めるパーセントを計算する。

【0117】

最大平均強度に占める % の式：

$$\frac{[(\text{未知試料の平均強度}) - (\text{陰性の平均強度})]}{[(\text{陽性の平均強度}) - (\text{陰性の平均強度})]}$$

10

【0118】

第 I X 因子および抗ヒト F . I X 抗体の決定：マウス血漿中のヒト F . I X トランスジェン産物のレベルを、Affinity Biologicals 社製の市販の E L I S A キットを用いて検出した。アカゲザル血漿中のヒト F . I X および抗ヒト F . I X 抗体を、以前に記載されているように (Mingozzi F. ら、Blood . 110、2334 - 2341 (2007))、決定した。

【0119】

A A V ベクターゲノムコピーの決定：リアルタイム定量 P C R ( Q - P C R ) プライマーおよびプローブは以下の通りであった：A A V - F . I X ベクターゲノムの検出について、フォワードプライマー 5' - C G A A T T C T A G T C G T C G A C C A C T T - 3'、リバースプライマー 5' - C A T G T T C A C G C G C T G C A T A - 3'、プローブ 5' - C A C A A T C T G C T A G C A A A G - 3'。A A V - G F P ベクターゲノムの検出について、フォワードプライマー 5' - A A G C T G A C C C T G A A G T T C A T C - 3'、リバースプライマー 5' - C T G C T T C A T G T G G T C G G G - 3'、プローブ 5' - A A G C A C T G C A N C G C C G T A G G T A - 3'。アッセイを、以前に記載されているように (Mingozzi F. ら、Blood . 110、2334 - 2341 (2007))、実施した。

20

【0120】

細胞内画像化および細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) アッセイ：画像取得を、Amnis ImageStreamX instrument (Amnis Corporation) を用いて実施した。画像化を、 $40 \times$  倍率で実施した。各条件について少なくとも 5000 個の細胞を取得した。細胞を、無血清培地中、未処理の、または架橋された A A V 2 ウイルスとインキュベートした。1 時間または 4 時間後、細胞を  $1 \times$  P B S で 2 回、洗浄し、染色した。細胞内染色について、 $5 \times 10^5$  個の細胞を固定し、4 で 20 分間、透過処理し、その後、 $1 \times$  Perm / Wash 緩衝液 (BD Biosciences) で洗浄した。その後、細胞を、ウサギ抗 C D 7 1 抗体 (Epitomics) または D R A Q 5 (Invitrogen) と共に抗 A A V 抗体 A 2 0 (Fitzgerald Industries International) で染色した。室温での 30 分後、細胞を洗浄し、二次抗体で染色した。C T L アッセイは、以前に記載されていた (Pien G. C. ら、J . Clin . Invest . 119、1688 - 1695 (2009) ; Mingozzi F. ら、Blood . 110、2334 - 2341 (2007))。

30

40

【0121】

統計解析：統計解析を、GraphPad Prism バージョン 5 . 0 b (GraphPad Software, Inc) を用いて実施した。p 値  $< 0 . 05$  を有意とみなした。

【0122】

実施例 2

この実施例は、第 I X 遺伝子治療で処置された患者の観察および解析の記載、ならびに

50

低いAAV抗体力価に基づいた被験体の選択にもかかわらず、抗AAV抗体力価において実質的な差異があったという発見を含む。

#### 【0123】

AAV2-F.IX肝臓研究(Manno, C.S.ら、Nat Med 12、342-347(2006))およびAAV8-F.IX肝臓研究(Nathwani, A.C.ら、New Engl. J. of Med. 365、2357-2365(2011))に登録された被験体は、検出可能なレベルの抗AAV抗体を有した(表1; Manno, C.S.ら、Nat Med 12、342-347(2006); およびNathwani, A.C.ら、New Engl. J. of Med. 365、2357-2365(2011))。両方の研究における被験体は、類似したベクター用量を受けた; しかしながら、AAV2研究において、低用量( $8 \times 10^{10}$  ベクターゲノム(vg)/kg)および中位の用量( $4 \times 10^{11}$  vg/kg)のコホートにおける被験体のいずれも、検出可能なレベルのトランスジーン発現を示さなかったが(Manno, C.S.ら、Nat Med 12、342-347(2006))、AAV8試験における被験体は、低用量( $2 \times 10^{11}$  vg/kg)および中位の用量( $6 \times 10^{11}$  vg/kg)の両方のコホートにおいて、検出可能なレベルの凝固因子(>1%)を有した(Nathwani, A.C.ら、New Engl. J. of Med. 365、2357-2365(2011))。これらの研究の異なる成績についての可能な説明は、AAV2ベクターと比較して、AAV8ベクターの肝実質細胞に対するより高いトロピズムであり得(Gao, G.P.ら、Proc Natl Acad Sci USA 99、11854-11859(2002))、またはAAV8が、より高いトランスジーン発現レベルを駆動させることが知られた自己相補的ゲノムを有するという事実であり得た。非ヒト霊長類における発表された研究は、同じトランスジーン発現カセットを有するAAV8ベクターまたはAAV2ベクターの送達後のおおよそ等価のレベルのF.IXトランスジーン発現を示した(Jiang, H.ら、Blood 108、3321-3328(2006); Mingozzi, F.ら、Blood 110、2334-2341(2007))。AAV2およびAAV8の両方の試験において、最高のベクター用量( $2 \times 10^{12}$  vg/kg)で注射された被験体は、類似したピークF.IXトランスジーン産物の血漿中レベルを有した(Manno, C.S.ら、Nat Med 12、342-347(2006); Nathwani, A.C.ら、New Engl. J. of Med. 365、2357-2365(2011))。

#### 【0124】

個体をより厳密に評価するために、以前に記載されたインビトロNAbアッセイを用いて、血友病被験体由来の一連の血清をスクリーニングした(Manno, C.S.ら、Nat Med 12、342-347(2006))。低NAb力価(1~3)を有するそれらの試料の間で、非希釈血清中の幅広い範囲の中和活性が測定された(表1)。その後、試料を、総抗AAV8抗体についての高感度の血清型特異的ドットプロットアッセイ(図10)を用いて分析した(表1)。

#### 【0125】

【表 1】

表1:小児および成人(代表的なセット)における抗AAV8抗体の保持率

被験体 ID	1歳の被験体				被験体 ID	成人被験体			
	中和抗体		総抗体			中和抗体		総抗体	
	NAb 力価	非希釈血清 の%抑制	ドット プロット	積分強度 *		NAb 力価	非希釈血清 の%抑制	ドット プロット	積分強度 *
Ped1	1	46		2	GI049	1	50		100
Ped2	1	10		4	GI058	1	48		15
Ped3	1	20		7	GI070	1	14		12
Ped4	1	0		0	GI080	1	20		23
Ped5	1	11		0	GI082	1	25		9
Ped6	1	8		0	GI095	1	0		3
Ped7	1	10		1	GI099	1	41		15
Ped8	1	0		0	GI102	1	22		6
Ped9	1	20		0	GI105	1	0		16
Ped10	1	0		0	GI133	1	27		9

\*最大(バックグラウンド引き算後の平均積分密度)に対する%

## 【 0 1 2 6 】

低NAb力価を有する被験体の事前選択にもかかわらず、ドットプロット分析は、検出された総抗AAV抗体(中和および非中和の両方)の量における顕著な差異を示し、成人被験体の大部分が、陰性であった小児科被験体と比較して、陽性の結果を示した(表1)。

## 【 0 1 2 7 】

これらの結果は、AAVに対する低力価中和抗体(NAb)を有すると思われる成人ヒト被験体が、NAbについての日常的アッセイによっては確実に検出されない有意な量の抗AAV IgGを有することを示している。

## 【 0 1 2 8 】

## 実施例 3

この実施例は、高力価のAAV NAbを有する動物においてさえも、AAVベクターを過剰量のAAV空キャプシドと共に処方または送達することが、結果として、抗AAV抗体の存在下でさえも、AAVベクター送達後にインビボでの形質導入のレスキューを生じたことを実証する動物研究の記載を含む。

## 【 0 1 2 9 】

インビボでAAVベクターの形質導入の効率への空キャプシドの効果を研究するために、空キャプシドをAAVベクターと処方した。まず、インビトロ研究により、AAVベクター調製物における空キャプシドの包含が、インビトロでヒト血清の中和活性を大いに低下させることが明らかにされた(図11)。

## 【 0 1 3 0 】

第2に、インビボでAAVベクターの形質導入の効率への空キャプシドの効果を研究するために、抗AAV抗体応答のマウスモデル(Scallan C.D.ら、Blood

、107、1810-1817(2006)) (図1a)を作製した。ナイーブのマウスまたは低用量のIVIg(0.5mg/マウス)で免疫されたマウスへ、ヒトF・IXを発現するAAV8ベクター(AAV8-hF・IX)を、1から3までの範囲の抗AAV8 NAb力価を生じるのに十分に、注射した(図1a、b)。 $1 \times 10^9$  および  $5 \times 10^9$  vg/マウスのベクター用量、または10倍(10x)過剰量のAAV8空キャプシド中に処方された同じベクター用量は、ナイーブの動物において血漿中、類似したレベルのhF・IXを生じた。IVIg免疫化は、PBS中に処方されたベクターによるほとんどの肝臓形質導入を効果的にブロックしたが、10x 空キャプシド中のベクターの処方物は、トランスジーン発現をレスキューした(図1b)。 $5 \times 10^9$  vgのAAV8-hF・IXを受けた動物から収集された肝臓において測定されたベクター遺伝子コピー数は、これらの所見を確認した(図1c)。

10

#### 【0131】

その所見を確認するために、AAV8についての天然の宿主であるアカゲザル(Gao G. P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99、11854-11859(2002))における類似した研究を実施した。30匹の動物をスクリーニングして、1のNAb力価を有する合計7匹のサルを同定した。ヒトと同様に、低NAb力価にもかかわらず、選択された動物のベースラインの非希釈血清は、10%から80%までのインビトロでの中和活性、およびドットプロットアッセイにおける様々な量の抗AAV8 IgGを有した(表2)。AAV8-hF・IXの $1 \times 10^{12}$  vg/kgの用量において、ベクターのみを受けた2匹の動物のうち、1匹(1001)は、抗hF・IX抗体の発生のため、hF・IXトランスジーンを一過性のみ、発現し、そのことは、アカゲザルにおいて以前に報告された所見である(Mingozzi F. ら、Blood. 110、2334-2341(2007); Nathwani A. C. ら、Blood. 107、2653-2661(2006); Nathwani A. C. ら、Mol. Ther. 19、876-885(2011)); 他方の動物、1002は、67ng/mlのプラトーhF・IX血漿中レベルに達した。対照的に、9x 空AAV8キャプシド中に処方されたベクターを注射された動物、2001は、ほとんど6倍高い、トランスジーン発現のプラトーレベルに達した(図1dおよび表2)。1002および2001の動物は、ベースラインにおいて類似した抗AAV8中和活性を示した(約30%、表2)。








20

30

#### 【0132】

【表 2】

表2: 非ヒト霊長類における所見の概要

動物 ID	ベクター 用量 (vg/kg)	空キャプシド (cp/kg)	中和 Ab		総 Ab		6週間目のh F. IXレベル (ng/ml)
			抗AAV8 NAb力価 *	非希釈血清 の%抑制	ドット プロット	積分強度*, #	
1001	$1 \times 10^{13}$	-	1	50		79	0 <sup>§</sup>
1002	$1 \times 10^{12}$	-	1	34		41	67
2001	$1 \times 10^{12}$	$9 \times 10^{12}$	1	32		18	347
3001	$2 \times 10^{12}$	-	1	57		100	0
3002	$2 \times 10^{12}$	-	1	10		85	169
4001	$2 \times 10^{12}$	$1.8 \times 10^{13}$	1	80		36	415
4002	$2 \times 10^{12}$	$1.8 \times 10^{13}$	1	55		40	915

Ab, 抗体

\*ベースライン値

#最大(バックグラウンド引き算後の平均積算密度)に対する%

## 【0133】

動物は、抗ヒトF. IX抑制性抗体を発生した。 $2 \times 10^{12}$  vg/kgへの用量増大は、類似した結果をもたらした。ベクターのみを投与された2匹の動物のうちの1匹の3001は、循環hF. IXトランスジーン産物の検出可能なレベルを達成しなかった。その動物は、抗hF. IX抗体を発生せず、肝臓におけるAAVベクターゲノムコピー数(表3)は、ベースラインにおける非希釈血清の57%中和活性が、ベクター形質導入を完全にブロックしたことを示唆している。ベクターのみを投与された他方の動物の3002は、約169 ng/mlの循環hF. IXのプラトーレベルに達した。 $9 \times 10^{12}$  cp/kg空キャプシド中に処方されたベクターを投与された2匹の動物のうち、4001(80%のベースライン中和活性)は、血漿中、約415 ng/mlのhF. IXトランスジーン産物を示した。3001とほとんど同一の55%の血清ベースライン中和活性を有する4002は、915 ng/mlのプラトーhF. IX発現を有した(図1dおよび表2)。処方物における空キャプシドの包含は、AAVベクター体内分布に影響しなかった(表3)。

## 【0134】

【表 3】

表 3：非ヒト霊長類における AAV8-FIXベクター体内分布。各動物は、 $2 \times 10^{12}$  v g / k g のベクターを受けた。4001および4002の動物は、 $9 \times$  空キャプシド中に処方されたベクターを受けた。結果は、二倍体ゲノムあたりのベクターゲノムコピー数として報告されている。

組織	動物ID: 3001		動物ID: 3002		動物ID: 4001		動物ID: 4002	
	Avg	StDev	Avg	StDev	Avg	StDev	Avg	StDev
肝臓尾状葉1	0.0007	0.0001	0.3014	0.0145	0.0206	0.0173	0.5677	0.0339
肝臓尾状葉2	0.0065	0.0030	0.1333	0.0199	0.0011	0.0007	0.4514	0.0312
肝臓外側左葉1	0.0112	0.0057	0.1990	0.0338	0.0713	0.0286	0.0163	0.0079
肝臓外側左葉2	0.0056	0.0042	0.1086	0.0112	0.0454	0.0121	0.6604	0.0196
肝臓外側右葉1	0.0379	0.0054	0.1934	0.0065	0.0506	0.0105	0.5458	0.0160
肝臓外側右葉2	0.0047	0.0031	0.0087	0.0028	0.0599	0.0292	0.3821	0.0378
肝臓内側左葉1	0.0049	0.0025	0.0128	0.0051	0.2285	0.0198	0.5091	0.0436
肝臓内側左葉2	0.0057	0.0040	0.1437	0.0128	0.1451	0.0186	0.0109	0.0035
肝臓内側右葉1	0.0018	0.0004	0.0341	0.0128	0.1202	0.0129	0.6715	0.0373
肝臓内側右葉2	0.0077	0.0056	0.0056	0.0022	0.0128	0.0012	0.6134	0.0210
肝臓方形葉1	0.0051	0.0018	0.0160	0.0047	0.1629	0.0215	0.7107	0.0377
肝臓方形葉2	0.0030	0.0013	0.0294	0.0086	0.0170	0.0069	0.0130	0.0054
平均肝臓	0.0079	0.0098	0.0988	0.0969	0.0780	0.0710	0.4294	0.2673
脳	0.0093	0.0048	0.0254	0.0233	0.0173	0.0124	0.0377	0.0063
腎臓	0.0265	0.0175	0.0959	0.0624	0.0115	0.0038	0.0091	0.0016
脾臓	0.0322	0.0203	0.0273	0.0092	0.0099	0.0060	0.0310	0.0196
胸腺	0.0136	0.0056	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333	0.0076
精巣	0.0155	0.0086	0.1030	0.1204	0.0259	0.0073	0.0079	0.0015
肺	0.0388	0.0175	0.0013	0.0011	0.0790	0.0580	0.1120	0.0380
横隔膜	0.1995	0.1130	0.1194	0.0771	0.1267	0.0354	0.1458	0.0816
腰筋	0.0919	0.0239	0.2118	0.0549	0.0812	0.0143	0.1199	0.0405
心臓	0.0083	0.0058	0.0740	0.0478	0.0150	0.0164	0.0347	0.0177

Avg、三連の試験の平均。StDev、標準偏差。

## 【0135】

これらの結果は、血管内腔を通しての遺伝子移入後の AAVベクター形質導入効率への、空キャプシドが有する増強効果に関する、インビトロおよびマウスにおけるインビボでの所見を、大型動物モデルにおいて確認している。AAVベクターの AAV空キャプシドと共の投与または同時処方、抗 AAV NAb の存在下でさえも、標的細胞の効率的なトランスジーン形質導入および発現を可能にする。

## 【0136】

次の研究において、低力価および高力価の AAV抗体を産生する、IVIg で免疫されたマウス（図 1a）を、増加性量の空キャプシドと組み合わせた AAVベクター遺伝子形質導入について分析した。簡単に述べると、マウスは、単独での、または増加性量の AAV8キャプシド中に処方された、 $5 \times 10^9$  v g / マウスのベクターを受けた（図 2a ~ d）。低力価の抗 AAV8 NAb 力価の存在下において（図 2a）、10 倍過剰量の空キャプシド中でのベクターの処方、AAVベクター形質導入を完全にレスキューした。AAV8-FIX 用量の最高 100x までの空キャプシド過剰量は、AAVベクター形質導入を抑制しなかった。1000 倍過剰量の空キャプシドは、トランスジーン発現の約 40% 損失を生じた。

## 【0137】

同様に、肝臓形質導入の完全なレスキューは、10 および 100 の NAb 力価の存在下において、それぞれ、50x および 100x の過剰量の空キャプシドで得られた（図 2b、c）。しかしながら、1000x 過剰量の空キャプシドを加えることによってさえも（図 2d）、極めて高い NAb 力価（ $> 3000$ ）の存在下における肝臓遺伝子形質導入の完全なレスキューは検出されなかった。

## 【0138】

10

20

30

40

50

抗AAV NAbの明らかな交差反応性により (Boutin S.ら、Hum. Gene Ther. 21、704-712 (2010); Calcedo R.ら、J. Infect. Dis. 199、381-390 (2009))、抗AAV8 NAbの存在下におけるAAV8-F.IXベクター形質導入は、AAV8またはAAV2空キャプシドにより等しくレスキューされたが、AAV5空キャプシドは、それほど効果的ではなかった (図12)。したがって、交差反応性により、1つのAAV血清型由来の空キャプシドが、1つ以上の異なるAAVベクター血清型に対する中和抗体の効果 (affect) を抑制または低下するために用いることができることは明らかである (例えば、AAV2空キャプシドと組み合わせたAAV8ベクター、および逆の場合も同じ)。

【0139】

10

これらの所見は、AAV空キャプシドが、全身性ベクター送達後の肝臓形質導入を、抗AAV NAbの存在下で、かつ用量依存性様式で、増強することを実証している。過剰な空キャプシドを用いることは、より高いNAb力価動物においてAAVベクター中和を克服して、インピボで効率的なトランスジーン形質導入をもたらすであろう。これらの結果はまた、交差反応性空キャプシド血清型を、異なるAAVベクター血清型と組み合わせて用いて、AAVベクター中和を抑制するか、または低下させることができることも実証している。

【0140】

#### 実施例 4

この実施例は、架橋された空キャプシドが、AAV抗体によるAAVベクター中和の機能的抑制を維持しながら、キャプシド免疫原性を低下させることを実証する動物研究の記載を含む。

20

【0141】

空キャプシドの標的細胞への侵入は、キャプシドエピトープのMHCクラスI提示のレベルを増加させる可能性が高い (Mingozzi, F.ら、Current Gene Therapy 11、321-330 (2011); Finn J.D.ら、Mol. Ther. 18、135-142 (2010); Pien G.C.ら、J. Clin. Invest. 119、1688-1695 (2009); Johnson J.S.ら、J. Virol. 83、2632-2644 (2009))。先在する抗AAV抗体に結合するか、またはそれらと反応する能力を実質的に損なうことなく、細胞に侵入するそれらの能力を低下させるために、空AAVキャプシドを、それらをAAV-F.IXベクター処方物へ加える前に架橋した。ホルムアルデヒド架橋方法を用いた結果が表されている; キャプシド架橋のためのDTSSP方法は同様の結果を示した。

30

【0142】

AAVベクターの架橋を、SDS-PAGEおよびインビトロで形質導入効率を試験することにより、検証した (図13)。架橋された空AAVキャプシドは、インビトロで (図3a)、およびマウスにおいてインピボで (図3b)、抗AAV NAbを吸着するそれらの能力を保持した。

【0143】

架橋された空キャプシドの肝臓トロピズムをインピボで分析するために、単独での、または10x過剰量の未処理の、もしくは架橋されたAAV-GFPベクターと混合されたAAV-F.IXベクターをマウスに投与した。架橋は、AAV-GFPベクターの標的を肝臓から有意に外し (図3c)、一方、AAV-F.IXベクターゲノムは、全ての実験群からの動物において、類似したレベルで検出可能であった (図3d)。架橋は、脾臓または他のリンパ器官におけるAAVベクター体内分布を検出可能には変化させなかった。

40

【0144】

未処理の、または架橋された空AAV2キャプシドで、インビトロで形質導入されたヒト肝実質細胞のフロー画像化により、架橋が、空AAVキャプシドの細胞への侵入をブロックすることが示された (図4a)。架橋はまた、架橋されたAAVキャプシドが、イン

50

ピトロでのCTLアッセイにおいて標的ヒト肝実質細胞の殺害を引き起こすことができないことにも関連していた(図4b)(Finn J. D.ら、Mol. Ther. 18、135-142(2010); Pien G. C.ら、J. Clin. Invest. 119、1688-1695(2009))。最後に、AAVキャプシドの架橋は、インピトロでの単球由来ヒトDCにおけるキャプシドの内部移行(図4c)およびエンドソーム局在化(図4d)の両方を減少させた。

#### 【0145】

これらの結果は、架橋されたAAVキャプシドが、抗AAV NAbの存在下でベクター形質導入を増強する能力を保持することを示している。さらに、その研究は、架橋が、AAVベクターの細胞取り込みを有意に減少させ、免疫媒介性破壊としての、形質導入された肝実質細胞(および他のAAVベクターが形質導入された細胞)の衰えのリスクを低下させる可能性があることを示している。

#### 【0146】

##### 実施例5

この実施例は、疾患または障害を処置するためにAAVベクターおよび/または空キャプシドAAVを用いる患者処置研究の記載を含む。

#### 【0147】

AAVベクターの投与を必要とする代謝性または遺伝的疾患に冒された患者において、先在するNAb力価を、インピトロの中和アッセイを用いて決定する。患者由来の血清の段階希釈溶液を、ルシフェラーゼレポーターを発現するAAVベクターと37℃でインキュベートする。増加性量のAAV空キャプシドを、1×から10000×まで、その反応へ加える。<1:1のNAb力価を生じるだろう過剰量の空AAVキャプシドは、トランスジーン移入のためのAAVベクターとの処方物を作製するために用いることができる。したがって、AAVベクターでの遺伝子治療についての候補患者由来の血清または血漿試料などの試料を、AAV抗体(例えば、中和抗体または「NAb」)アッセイを用いて、抗AAV中和抗体について分析する。

#### 【0148】

簡単には、患者由来の試料を、レポータートランスジーン(例えば、ルシフェラーゼ、GFP、CATなど)を発現するAAVベクターとインキュベートすることによりアッセイを実施する。患者の血清または血漿におけるAAVベクターの中和後にインピトロで測定される残留するレポーター遺伝子は、抗体力価を示し、通常、形質導入の50%抑制が観察される血清/血漿希釈度として表される。例えば、血清の1:10の希釈溶液が、AAVレポーター遺伝子ウイルスの活性を抑制するならば、抗AAV NAb量(力価)は、1:10である。

#### 【0149】

AAV抗体量(力価)を提供するアッセイ結果に基づいて、被験体を、任意で、以下と同様の様式で分類することができる:

- 低力価(検出不可能から1:3まで):これらの個体は、AAVベクターと共に1~10×過剰量の空AAVキャプシドを受ける。
- 中位の力価(1:3から1:100まで):これらの個体は、AAVベクターと共に5~1000×過剰量の空AAVキャプシドを受ける。
- 高力価(1:100より上):これらの個体は、AAVベクターと共に10~10000×過剰量の空AAVキャプシドを受ける。

#### 【0150】

調製物に含まれる空キャプシドの量を、増加性量の空AAVキャプシドの存在下で、本明細書に記載されたインピトロのAAV抗体アッセイを実施することにより決定する。例えば、患者が、1:10のNAb力価を有する場合には、血清/血漿は、1×、5×、10×、50×、100×、500×、1000×(およびまた、より精密な過剰量)の空キャプシドとインキュベートして、AAVベクターの薬理的処方物に用いられる空AAVキャプシドの最小量を決定する。

## 【0151】

遺伝子治療の特定の例において、血友病B患者が、AAV-FIXベクターでの遺伝子移入に予定される。患者は、NAbアッセイにより決定された場合、1:10の抗AAV中和抗体力価を有する。しかしながら、5×空キャプシドを加えることにより、力価は<1:1に下がる。

## 【0152】

この患者について、AAV-FIXベクターは、薬学的に許容され得る担体中に、5×架橋された空キャプシドと共に処方される。患者が、 $1 \times 10^{12}$  vg/kgのAAV-FIX用量を受けることが予定されると仮定すると、彼は、 $5 \times 10^{12}$  cp/kgの（任意で、架橋された）AAV空キャプシド中に処方されたこの用量を受ける。AAV-FIXベクターおよびAAV空キャプシドを、最新の優良医薬品製造基準（Good Manufacturing Procedures）を用いて製造し、製造物の純度、効力、安全性、および安定性を保証するために適切な品質管理試験に供する（Wright J. F., Gene Ther. 2008; 15: 840-848）。最終の処方された製造物におけるAAVベクターとの正確かつ再現性のある混合比を可能にするための精製された空キャプシドの濃度の測定は、AAVキャプシドタンパク質の消衰係数（Sommer J. M.ら、Mol. Ther. 2003; 7: 122-128）、または他の公知の方法に基づく。

## 【0153】

空キャプシドまたはウイルスゲノム含有キャプシドは、典型的には、本発明に従って処置されることになっている被験体において産生される抗体と反応する血清型を有する。例えば、AAV8と反応し、またはそれを中和する抗体を産生する被験体は、AAV8空キャプシドまたはAAV8ウイルスゲノム含有キャプシドを投与することができる。ベクター調製物に加えられる空キャプシドまたはウイルスゲノム含有キャプシドはまた、1つより多い血清型と反応する抗体の交差反応性により、別の血清型でもあり得る。例えば、AAV2空キャプシドまたはAAV2ウイルスゲノム含有キャプシドが、抗AAV8抗体のAAV2との交差反応性により、トランスジーンを発現するAAV8ベクターに特定の量で加えられる。

## 【0154】

空キャプシドまたはウイルスゲノム含有キャプシドまたはキャプシドタンパク質はまた、被験体において産生される抗体と反応する2つ以上の血清型の混合物を含むことができる。例えば、AAV2およびAAV8と反応し、またはそれらを中和する抗体を産生する被験体は、AAV2およびAAV8の空キャプシドを投与することができる。

## 【0155】

## 実施例6

この実施例は、AAV<sub>585/8</sub>変異体キャプシドが、抗AAV抗体を吸着することができたが、細胞を実質的に形質導入しなかったという研究の記載を含む。

## 【0156】

その研究を、図5～9についての説明に記載されているように、実施した。その研究により、AAV<sub>585/8</sub>変異体キャプシドが、インビトロおよびインビボで、AAV8ベクターの抗体媒介性中和を抑制またはブロックすることが示されている。その研究によりまた、AAV<sub>585/8</sub>キャプシドが受容体結合において競合しないため、AAV<sub>585/8</sub>キャプシドが、大過剰量の治療用AAVベクターにおいて、ベクター形質導入の効率に干渉することなく、用いることができることが示されている。

## 【0157】

さらに、AAV<sub>585/8</sub>変異体キャプシドは、AAV<sub>2</sub>に由来し、そのAAV<sub>2</sub>は、ヒトにおいて最もよく見られるAAVの血清型である。したがって、AAV<sub>2</sub>は、循環抗体の大部分を吸着し、事実上全てのAAV血清型の中和からの保護を提供するはずである。

## 【0158】

10

20

30

40

50

AAV2変異体キャプシドは、抗AAV抗体の問題に対する普遍的な解決法として働く可能性がある。変異体キャプシドは、インピトロおよびインピボで細胞に実質的に感染せず、標的細胞の全体的な抗原負荷に寄与しないように思われ、それゆえに、AAV2変異体は、AAVベクターが形質導入された標的細胞のCTL媒介性溶解の程度を増加させない。

【0159】

#### 実施例7

この実施例は、AAV空キャプシドの推定の作用機構を示す研究の記載を含む。

【0160】

NAb力価>10にIVIgで受動免疫されたマウスは、単独での、または増加性量のAAV空キャプシドと共に処方された、AAV8-F.IX(第IX因子)ベクターを受けた(図14a)。ベクター送達の1日後、血漿を収集し、IgG:キャプシド複合体についてアッセイした。アッセイにおける標準曲線として、IVIgとインキュベートされた既知量のAAV8キャプシドを用いた(図14b)。ベクター投与後、IVIgで予備免疫されなかったマウスの血漿において、免疫複合体は検出できなかった(図14c、列1)。対照的に、ベクターのみ、またはベクターと空キャプシドを受けたIVIg注射された動物においてIgG:キャプシド複合体が、増加性量で検出可能であった(図14c、列2~6)。抗AAVキャプシド抗体の空AAVキャプシドによる吸収は、結果として、ベクター送達の1日後、マウスにおいて抗AAV8 NAb力価の用量依存性降下を生じ(図14a)、最終的に、増加性レベルのhF.IXトランスジーン発現を生じた(図14d)。前述の研究は、空AAVキャプシドが、デコイとして働き、抗AAV抗体に結合し、それにより、AAVベクターを抗体媒介性中和から保護することを実証している。

【0161】

10

20

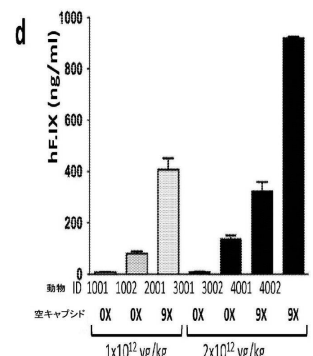
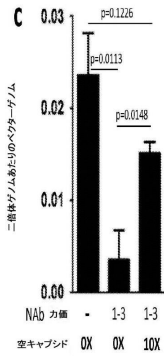
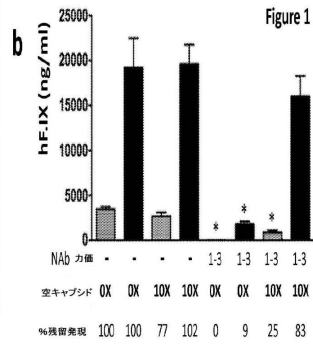
## 【化 3】

## 参考文献

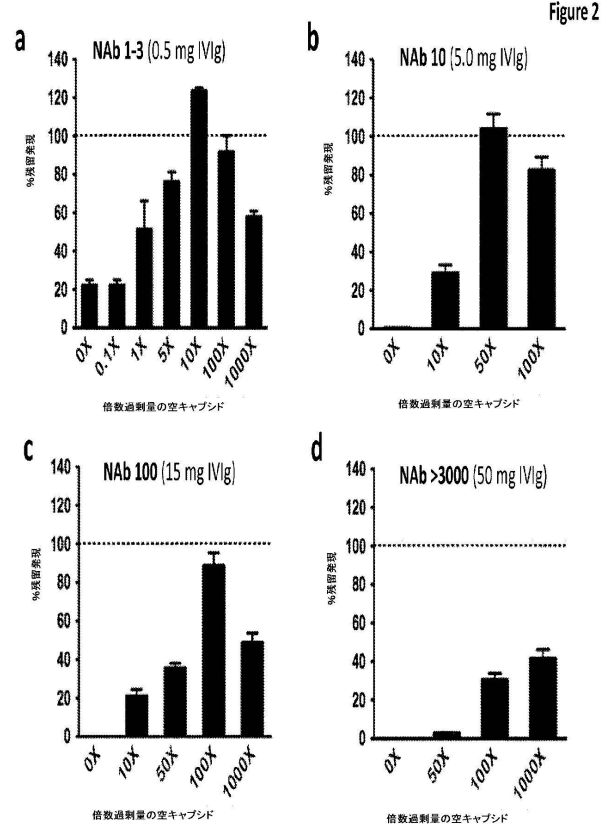
1. Mingozi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet.* 2011;12:341-355.
2. High KA. AAV-mediated gene transfer for hemophilia. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;953:64-74.
3. Basner-Tschakarjan E, Mingozi F, Chen Y, et al. Dose-dependent activation of capsid-specific T cells after AAV serotype 8 vector administration in a clinical study for hemophilia. *Mol Ther.* 2011;in press.
4. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006;12:342-347. 10
5. Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther.* 2011;11:321-330.
6. Mingozi F, Maus MV, Hui DJ, et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med.* 2007;13:419-422.
7. Mingozi F, Meulenberg JJ, Hui DJ, et al. AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood.* 2009;114:2077-2086.
8. Scallan CD, Jiang H, Liu T, et al. Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood.* 2006;107:1810-1817.
9. Jiang H, Couto LB, Patarroyo-White S, et al. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood.* 2006;108:3321-3328. 20
10. Vincent N, Ragot T, Gilgenkrantz H, et al. Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nat Genet.* 1993;5:130-134.
11. Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JJ, Davies KE. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature.* 1996;384:349-353.
12. Finn JD, Hui D, Downey HD, et al. Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction. *Mol Ther.* 2010;18:135-142.
13. Pien GC, Basner-Tschakarjan E, Hui DJ, et al. Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *J Clin Invest.* 2009;119:1688-1695. 30
14. Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Rao PV. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine.* 2009;27:2513-2522.
15. Wright JF. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies. *Gene Ther.* 2008;15:840-848.
16. Sommer JM, Smith PH, Parthasarath S, et al. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsid by optical density measurement. *Mol. Ther.* 2003;7:122-128.

【図 1】

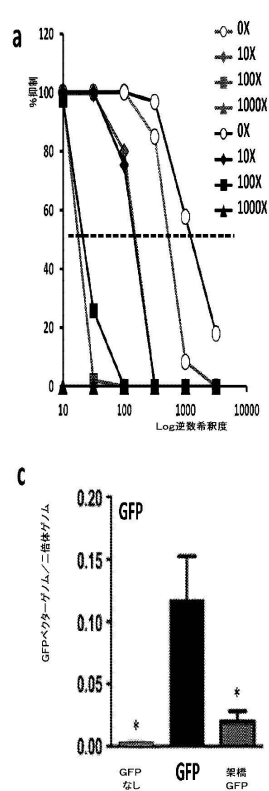
a	中和抗体			総抗体
	NAb 用量 (mg)	希釈されてい ない血清の% 抑制	ドット プロット	
タイプ	.	0	0	0
0.5	1-3	50-70 <sup>b</sup>	0	12
5	10	100	0	49
15	100	100	0	72
50	>3000	100	0	100



【図 2】

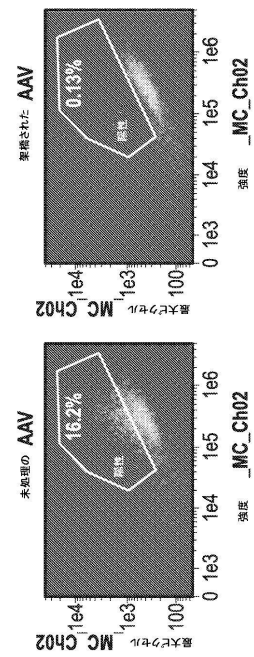
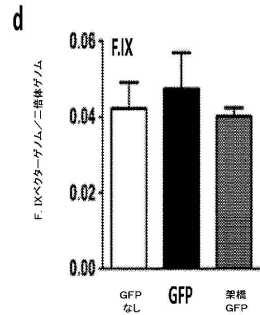
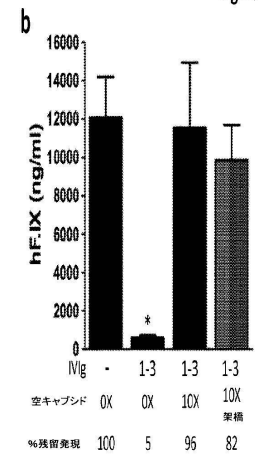


【図 3】



【図 4 - 1】

Figure 3



【図 4 - 2】

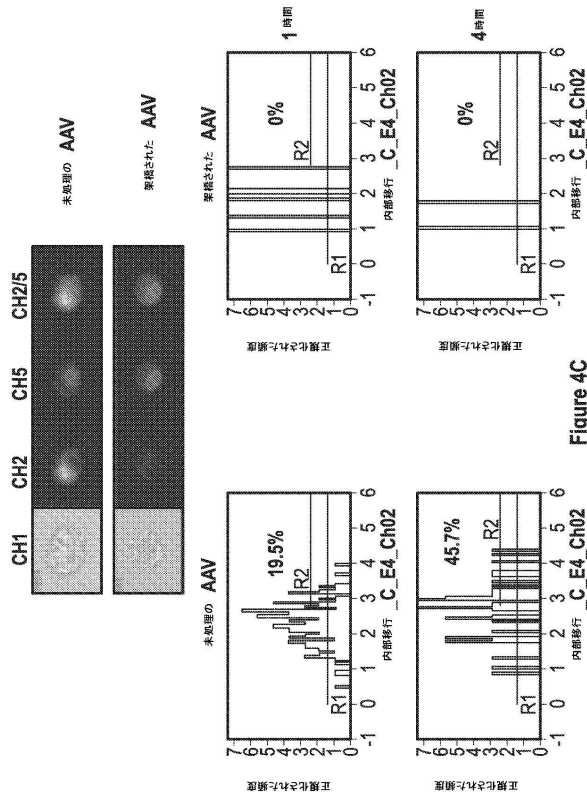


Figure 4C

【図 4 - 3】

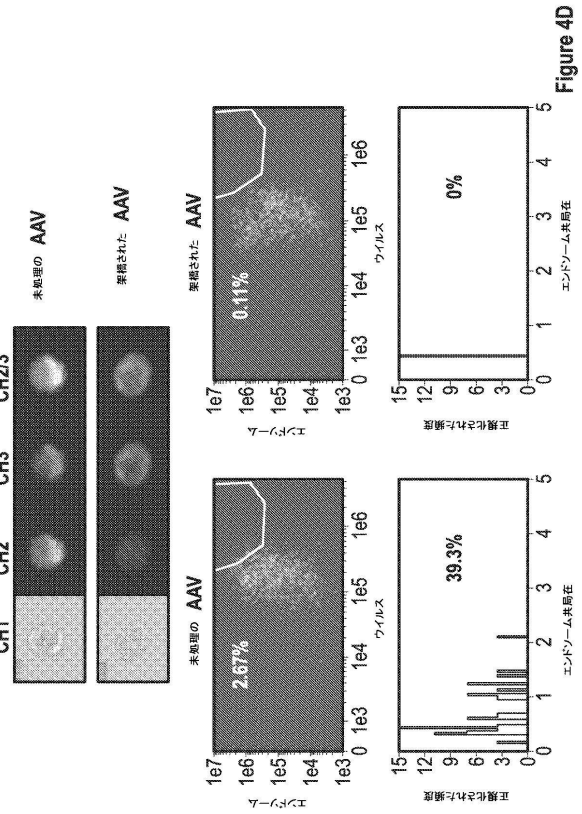


Figure 4D

【図 5】

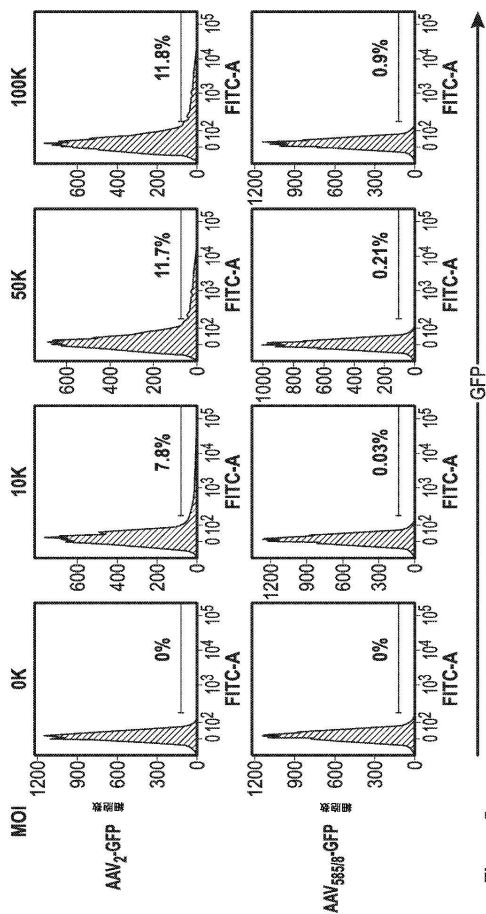
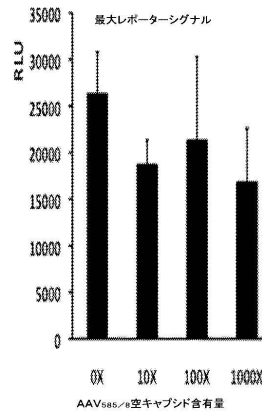


Figure 5

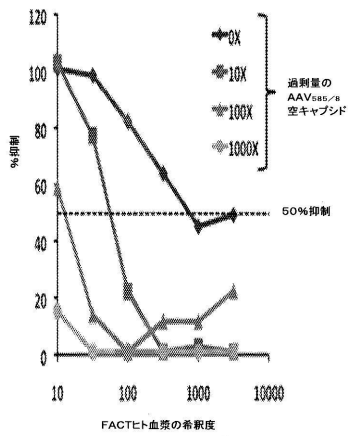
【図 6】

Figure 6



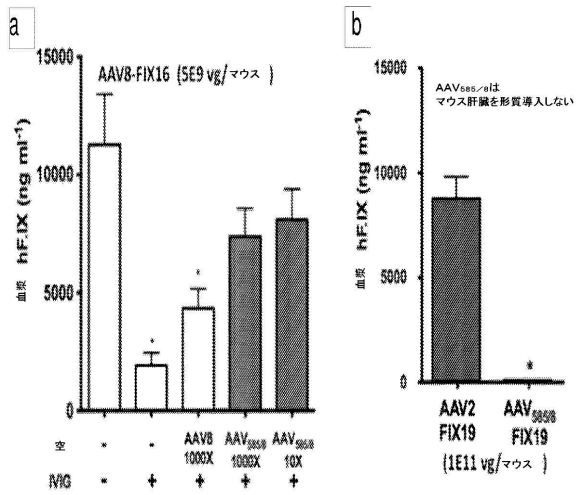
【 図 7 】

Figure 7



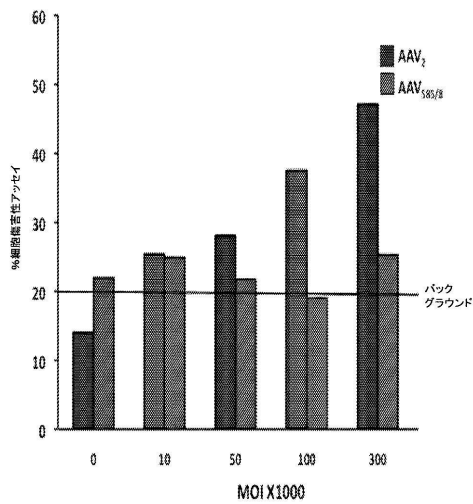
【 図 8 】

Figure 8



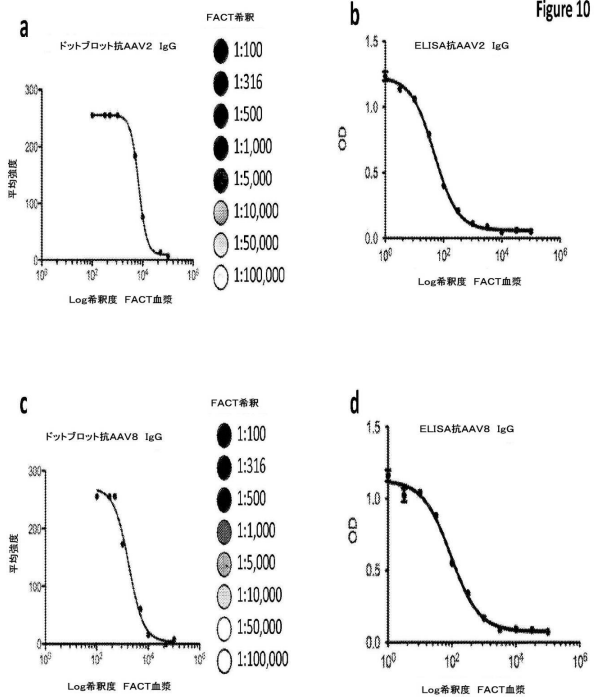
【 図 9 】

Figure 9



【 図 10 】

Figure 10



【図 1 1】

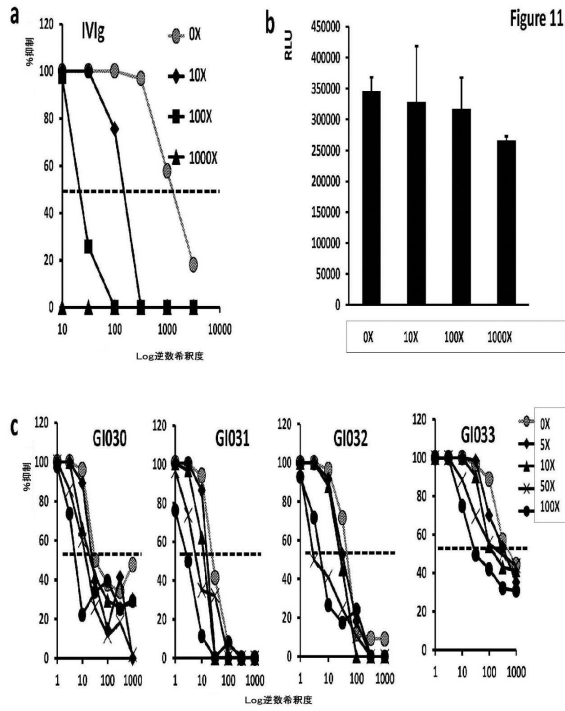


Figure 11

【図 1 2】

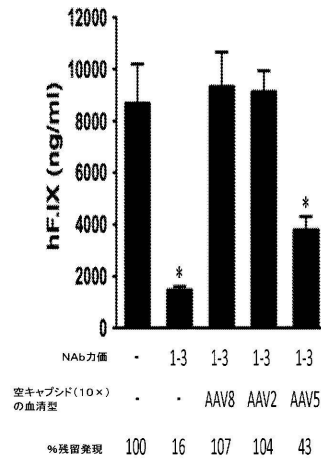


Figure 12

【図 1 3 - 1】

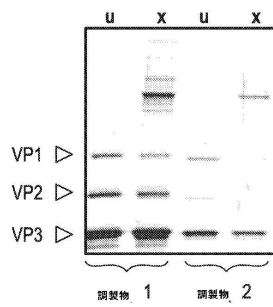


Figure 13A

【図 1 3 - 2】

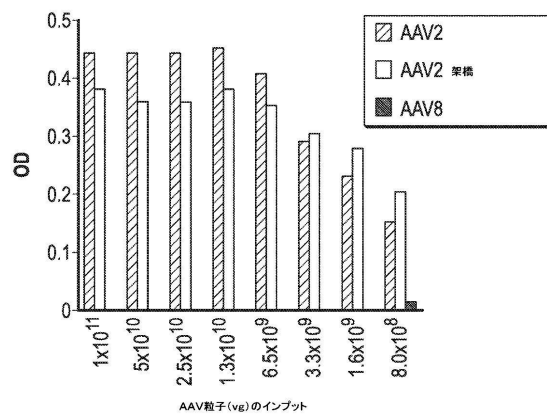


Figure 13C

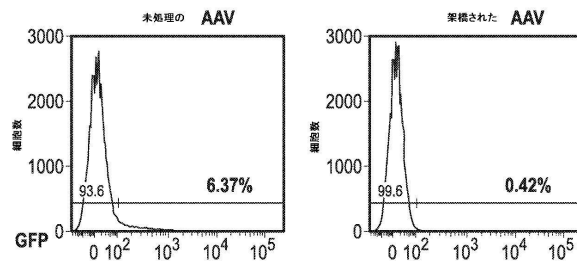


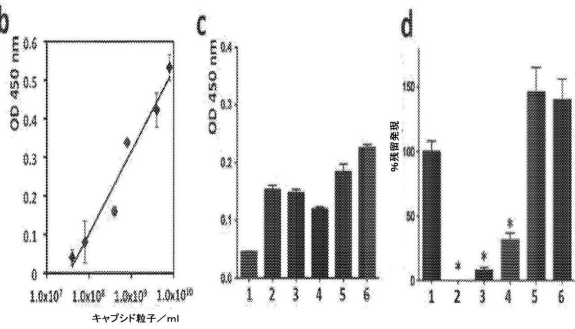
Figure 13B

【 図 1 4 】

aFigure 14

群	AAV8-hFIX 用量 (vg)	倍數過剰 量の空A AV8	総キャプシド 用量(cp)	IVlg (mg)	ベクター送達前 の抗AAV8 Na b力価	Ab-AAV8 複合体(cp/ ml)*	ベクター送達後の 1日目における抗 AAV8 Nab力価
1	5x10 <sup>8</sup>	0X	5.0x10 <sup>9</sup>	-	1	<5.0x10 <sup>7</sup>	1
2	5x10 <sup>8</sup>	0X	5.0x10 <sup>9</sup>	5	>10	1.76x10 <sup>8</sup>	>10
3	5x10 <sup>8</sup>	5X	3.0x10 <sup>10</sup>	5	>10	1.67x10 <sup>8</sup>	3-10
4	5x10 <sup>8</sup>	10X	5.5x10 <sup>10</sup>	5	>10	1.23x10 <sup>8</sup>	1-3
5	5x10 <sup>8</sup>	50X	2.55x10 <sup>11</sup>	5	>10	2.46x10 <sup>8</sup>	1
6	5x10 <sup>8</sup>	100X	5.05x10 <sup>11</sup>	5	>10	3.85x10 <sup>8</sup>	1

\*標準曲線に基づいた推定値；\*、群1に対してp<0.001；vg、ベクターゲノム；cp、キャプシド粒子



【 配 列 表 】

0006348064000001.app

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/682,019

(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ミンゴッツィ, フェデリコ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19119, フィラデルフィア, イースト アレンズ レ  
ーン 326

(72)発明者 アンゲラ, ハビエル

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19143, フィラデルフィア, キングセッシング アベ  
ニュー 4515, スイート 1

(72)発明者 ライト, ジェイ. フレイザー

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08540, プリンストン, リバー バーチ サークル  
68

(72)発明者 ハイ, キャサリン エー.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19066, メリオン ステーション, グリーンウェイ  
レーン 201

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 国際公開第2004/072289(WO, A1)

Blood, 2006年, 107, 1810-7

J. Viro. Meth., 2007年, 140, 183-92

J. Clin. Inve., 2009年, 119, 1688-95

Structure, 1996年, 4(5), 543-54

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)