

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6877408号
(P6877408)

(45) 発行日 令和3年5月26日(2021.5.26)

(24) 登録日 令和3年4月30日(2021.4.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/864	(2006.01)	C 12 N	15/864	1 O O Z
C 12 N	7/01	(2006.01)	C 12 N	7/01	Z N A
A 61 P	13/12	(2006.01)	A 61 P	13/12	
A 61 K	48/00	(2006.01)	A 61 K	48/00	
A 61 P	43/00	(2006.01)	A 61 P	43/00	1 2 1

請求項の数 28 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-510981 (P2018-510981)
(86) (22) 出願日	平成28年8月30日 (2016.8.30)
(65) 公表番号	特表2018-526994 (P2018-526994A)
(43) 公表日	平成30年9月20日 (2018.9.20)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/049487
(87) 國際公開番号	W02017/040524
(87) 國際公開日	平成29年3月9日 (2017.3.9)
審査請求日	令和1年8月9日 (2019.8.9)
(31) 優先権主張番号	62/336,211
(32) 優先日	平成28年5月13日 (2016.5.13)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	62/212,144
(32) 優先日	平成27年8月31日 (2015.8.31)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	502409813 ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバ シティ・オブ・ペンシルベニア アメリカ合衆国ペンシルベニア州1910 4フィラデルフィア・ナインスフロア・ シビックセンターブールバード3600
(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(72) 発明者	ヒンデラー, ク里斯チャン アメリカ合衆国ペンシルベニア州1913 0フィラデルフィア・アパートメントナン バー7ビー・チェスナットストリート19 30

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペット治療用AAV-EPO

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ベクターゲノムを中にパッケージングして有するAAVカプシドを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)であって、前記ベクターゲノムは、機能的ネコエリスロポエチン(EPO)をコードする核酸配列、末端逆位反復配列、及び宿主細胞での前記EPOの発現を指示する発現制御配列を含み、

前記ネコEPOをコードする核酸配列は、配列番号8と少なくとも90%同一である配列を含み且つ少なくとも配列番号4のアミノ酸27～192位をコードする、前記組換えアデノ随伴ウイルス。

【請求項2】

ベクターゲノムを中にパッケージングして有するAAVカプシドを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)であって、前記ベクターゲノムは、機能的イヌエリスロポエチン(EPO)をコードする核酸配列、末端逆位反復配列、及び宿主細胞での前記EPOの発現を指示する発現制御配列を含み、

前記イヌEPOをコードする核酸配列は、配列番号7と少なくとも90%同一である配列を含み且つ少なくとも配列番号3のアミノ酸41～206位をコードする、前記組換えアデノ随伴ウイルス。

【請求項3】

前記コードされたネコEPO配列は、異種リーダー配列と組み合わせて、配列番号4のアミノ酸配列27～192位を含む、請求項1に記載のrAAV。

10

20

【請求項 4】

前記コードされたイヌ E P O 配列は、異種リーダー配列と組み合わせて、配列番号 3 のアミノ酸配列 4 1 ~ 2 0 6 位を含む、請求項 2 に記載の r A A V。

【請求項 5】

前記 E P O をコードする核酸配列は、配列番号 4 のアミノ酸 1 ~ 1 9 2 位をコードする、請求項 1 に記載の r A A V。

【請求項 6】

前記 E P O をコードする核酸配列は、配列番号 3 のアミノ酸 1 ~ 2 0 6 位をコードする、請求項 2 に記載の r A A V。

【請求項 7】

前記ネコ E P O をコードする核酸配列が、配列番号 8 を含む、請求項 1 に記載の r A A V。

10

【請求項 8】

前記イヌ E P O をコードする核酸配列が、配列番号 7 を含む、請求項 2 に記載の r A A V。

【請求項 9】

前記発現制御配列は、プロモーターを含む、請求項 1 または 2 に記載の r A A V。

【請求項 10】

前記プロモーターは、C B 7 プロモーターである、請求項 9 に記載の r A A V。

【請求項 11】

前記プロモーターは、T B G プロモーターである、請求項 9 に記載の r A A V。

20

【請求項 12】

前記プロモーターは、組織特異的プロモーターである、請求項 9 に記載の r A A V。

【請求項 13】

前記組織特異的プロモーターは、腎臓特異的プロモーターである、請求項 12 に記載の r A A V。

【請求項 14】

前記組織特異的プロモーターは、N k c c 2 プロモーター、ウロモジュリンプロモーター、K s p - カドヘリンプロモーター、及び T H P 遺伝子プロモーターから選択される、請求項 12 に記載の r A A V。

30

【請求項 15】

さらに、イントロン、K o z a k 配列、ポリ A、及び転写後調節エレメントのうち 1 つまたは複数を含む、請求項 1 または 2 に記載の r A A V。

【請求項 16】

前記 A A V カプシドは、A A V 8 、r h 6 4 R 1 、A A V 9 、A A V h u . 3 7 、または r h 1 0 、及びそれらの変異体から選択される、請求項 1 または 2 に記載の r A A V。

【請求項 17】

前記カプシドは、A A V 8 カプシドである、請求項 1 または 2 に記載の r A A V。

【請求項 18】

薬学上許容される担体、及び請求項 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の r A A V を含む、医薬組成物。

40

【請求項 19】

慢性腎臓疾患の治療方法であって、薬学上許容される担体、及び請求項 1 に記載の r A A V を含む医薬組成物をネコに投与することを含む、前記方法。

【請求項 20】

慢性腎臓疾患の治療方法であって、薬学上許容される担体、及び請求項 2 に記載の r A A V を含む医薬組成物をイヌに投与することを含む、前記方法。

【請求項 21】

前記組成物は、静脈内投与される、請求項 1 9 または請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 22】

50

前記組成物は、別の治療法と併用して投与される、請求項19または請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記組成物は、 3×10^{10} G C / k g の投与量で投与される、請求項19または請求項20に記載の方法。

【請求項24】

前記組成物は、1回より多く投与される、請求項19または請求項20に記載の方法。

【請求項25】

ネコの慢性腎臓疾患の治療の使用における、請求項1、3、5及び7のいずれか1項に記載のrAAVの使用。 10

【請求項26】

ネコの慢性腎臓疾患の治療に使用するのに適している、請求項1、3、5及び7のいずれか1項に記載の組換えrAAV。

【請求項27】

イヌの慢性腎臓疾患の治療の使用における、請求項2、4、6及び8のいずれか1項に記載のrAAVの使用。

【請求項28】

イヌの慢性腎臓疾患の治療に使用するのに適している、請求項2、4、6及び8のいずれか1項に記載の組換えrAAV。

【発明の詳細な説明】 20

【技術分野】

【0001】

電子形式で提出されたデータの参照による援用

本出願人は、本明細書とともに電子形式で出願された配列表データを、本明細書により参照することにより援用する。このファイルは、「15-7472PCT_Seq_Listing.txt」と名前が付いている。

【背景技術】

【0002】

エリスロポエチン(EPO)は、大部分が腎臓の尿細管周囲細胞内で作られるホルモンである。このホルモンは、骨髄に作用して、赤血球生成を刺激する。エリスロポエチンはまた、成熟赤血球のアポトーシス(プログラム細胞死)を制御する。腎疾患は、エリスロポエチン産生を減少させる。ヒトでは、組換えヒトエリスロポエチン(エポエチン)の開発により、慢性腎臓疾患における貧血の管理に大変革がもたらされた。慢性腎臓疾患に原因があるとされてきた症状の多く、例えば、疲労、嗜眠、傾眠、及び息切れなどは、全て生活の質に望ましくない影響を及ぼすが、これらが、貧血を治すことで解消され、または大幅に改善された。 30

【0003】

慢性腎臓疾患(CKD)を罹患しているネコは200万匹、イヌは350,000匹を超える。CKD関連腎不全のペットも、同様に苦しんでいる。そのようなペットは、十分なEPOを有しておらず、その結果、重度の貧血になる。これまで、獣医師は、動物が、輸液されたEPOに対し免疫応答を生じるようになるまで、ヒト組換えEPOを投与してきた。実質上、これにより、十分によく理解された生理プロセスの、臨床上明らかに必要とされる長期治療法が市場にないこととなる。 40

【0004】

したがって、対象、特にペットでEPOを発現させるのに有用な組成物が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

新規改変エリスロポエチン(EPO)構築物が、本明細書中提供される。これらの構築物は、複数の経路を介して、特に組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターなどの 50

組換えベクターが介在する *in vivo* 発現により、それらを必要とする対象に送達することができる。

【0006】

いくつかの実施形態において、EPOは、内在性配列によりコードされる。すなわち、EPO配列は、最終的に投与が意図される対象と同一種に由来する。

【0007】

いくつかの実施形態において、薬学上許容される担体及び本明細書中記載されるとおりの組換えベクターを含む医薬組成物が提供される。同じく提供されるのは、治療の必要がある対象に、発現力セットを有する本明細書中記載される組換えベクターを投与することによる、慢性腎臓疾患の治療方法であり、この発現力セットは、さらに、対象でのEPO構築物の発現を指示する調節性制御配列を含む。いくつかの実施形態において、治療される対象は、ペットである。1つの実施形態において、対象は、ネコである。別の実施形態において、対象は、イヌである。本明細書中使用される場合、「患者」及び「対象」という用語は、同義で使用され、ヒトまたは獣医学対象を示すことができる。10

【0008】

さらに別の実施形態では、EPOをコードする発現力セットを有する本明細書中記載される組換えベクターを提供することを含む、対象の循環EPOの量を増加させる方法である。

【0009】

上に記載される組換えベクターは、循環赤血球の量の減少を特徴とする、慢性腎臓疾患及び他の症状の治療レジメンに使用することができる。20

【0010】

本発明の他の態様及び利点は、以下の本発明の詳細な説明から容易に明らかとなるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】ネコエリスロポエチンを発現するAAV8で処置したネコのヘマトクリットを示すグラフである。点線は、正常範囲を示す。

【図2】イヌエリスロポエチンを発現するAAV8で処置したイヌのヘマトクリットを示すグラフである。点線は、正常範囲を示す。30

【図3A】イヌEPOプロペプチド配列を示し、リーダー配列には下線を付してある。

【図3B】ネコEPOプロペプチド配列を示し、リーダー配列には下線を付してある。

【図4】ネコエリスロポエチンを発現するAAV8で処置したネコのヘマトクリットを示すグラフである。ネコは、 3.0×10^7 GC、 3.0×10^8 GC、 3.0×10^9 GC、または 3.0×10^{10} GCのAAV8 f. EPOで処置した。

【発明を実施するための形態】

【0012】

ペット(例えば、ネコ及びイヌ)を含む対象で使用するためのEPO発現構築物を保有するアデノ随伴ウイルスベクターが開発された。イヌまたはネコに特異的な組換えEPOタンパク質治療薬は、有効性が期待できるものの、罹患動物にEPOを送達するためのウイルスベクター介在系よりも開発及び製造費用が高くなると思われる。ウイルスベクター治療薬を用いると、組換えEPOの頻繁な注射とは対照的に、動物を1回で治療できるという簡便さもある。EPOの安定発現は、貧血を補正し、動物に改善された生活の質をもたらすであろう。本明細書中記載されるEPO構築物は、対象にとって内在性であり、対象が外来タンパク質に対する免疫応答を生じるリスクを低下させるEPO配列を提供することも特長とする。40

【0013】

同じく提供されるのは、本明細書中記載される構築物の使用である。これら構築物を、複数の経路を介して、必要としている対象に送達すること、及び特にrAAVベクターなどの組換えベクターを介して行われる *in vivo* で発現するように送達することができる。50

記載される。1つの実施形態において、慢性腎臓疾患の治療を必要とする対象でその治療レジメンにおいて構築物を使用する方法及び対象のEPOを増加させる方法が提供される。1つの実施形態において、貧血の治療を必要とする対象でその治療レジメンにおいて構築物を使用する方法が提供される。別の実施形態において、対象の貧血は、他の医薬の使用と関連するものである。貧血の一因となる可能性がある医薬として、HIV/AIDS治療（AZTを含む）及び化学療法をはじめとする癌治療が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態において、対象の貧血は、病状と関連するものである。貧血の一因となる可能性がある病状として、癌、HIV/AIDS、リウマチ様関節炎、クローン病及び他の慢性炎症性疾患及び機能障害性骨髄（例えば、再生不良性貧血、白血病、脊髄形成異常症、または骨髄線維症）、多発性骨髄腫、骨髄増殖性疾患及びリンパ腫、溶血性貧血、鐸状赤血球貧血、ならびにサラセミアが挙げられるが、これらに限定されない。また、対象のEPO活性を向上させる方法も提供される。

【0014】

EPOは、*in vivo*でプロペプチドとして発現し、リーダー配列は、種にまたがって、ある相同性を共有している。配列番号3は、イヌEPOプロペプチドの配列を示し、成熟タンパク質は、41位アミノ酸から始まる。図3a中、リーダー配列に下線を付してある。配列番号4は、ネコEPOプロペプチドの配列を示し、成熟タンパク質は27位アミノ酸から始まる。図3B中、リーダー配列に下線を付してある。

【0015】

1つの実施形態において、EPOの機能的変異体として、本明細書中記載されるまたは当該分野で既知のEPO核酸またはアミノ酸配列から最高約10%の変異を含む可能性があるが、野生型配列の機能を保持する変異体が挙げられる。EPO変異体の基礎となる配列は、いくつかの実施形態において、プロペプチドリーダー配列を含む（例えば、配列番号3及び配列番号4に示されるとおり）。別の実施形態において、本明細書中記載されるEPO変異体は、成熟ペプチド（例えば、配列番号3のアミノ酸41～206位、または配列番号4アミノ酸27～192位）のみを示す。本明細書中使用される場合、「機能を保持する」により、核酸またはアミノ酸が、野生型配列と同じように機能することを意味するが、その発現または活性は必ずしも同じレベルとは限らない。例えば、1つの実施形態において、機能的変異体は、野生型配列と比較して、発現または活性が上昇している。別の実施形態において、機能的変異体は、野生型配列と比較して、発現または活性が低下している。1つの実施形態において、機能的変異体は、野生型配列と比較して、発現または活性が、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上に上昇または低下している。イヌEPOのアミノ酸配列は、本明細書中、配列番号3として提示される。ネコEPOのアミノ酸配列は、本明細書中、配列番号4として提示される。

【0016】

別の実施形態において、EPOの機能的変異体として、本明細書中記載されるまたは当該分野で既知のEPO核酸またはアミノ酸配列から最高約20%の変異を含む可能性があるが、野生型配列の機能を保持する変異体が挙げられる。1つの実施形態において、EPOの機能的変異体として、本明細書中記載されるまたは当該分野で既知のEPO核酸またはアミノ酸配列から最高約30%の変異を含む可能性があるが、野生型配列の機能を保持する変異体が挙げられる。以下の配列比較は、上段にイヌ配列、下段にネコ配列を示し、共通配列は中段にある。

イヌ（クエリ、配列番号3の部分）対ネコ（サブジェクト、配列番号4の部分）

クエリ 19 ECPALLLSSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYILEAREAENVTMGCAQGCSFSEN 78

ECPALLLSSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYILEAREAENVTMGCA+GCSFSEN

サブジェクト 5 ECPALLLSSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYILEAREAENVTMGCAEGCSFSEN 64

クエリ 79 ITVPDTKVNFTWKMDVGQQALEVWQGLALLSEAILRGQALLANASQPSETPQLHVDKA 138

ITVPDTKVNFTWKMDVGQQA+EVWQGLALLSEAILRGQALLAN+SQPSET QLHVDKA

サブジェクト 65 ITVPDTKVNFTWKMDVGQQAVEVWQGLALLSEAILRGQALLANSSQPSETLQLHVDKA 124

10

クエリ 139 VSSLRSLTSLLRALGAQKEAMSLPEEASPAPLRTFTVDTLCKLFRIYSNFLRGKLTLYTG 198

VSSLRSLTSLLRALGAQKEA SLPE S APLRTFTVDTLCKLFRIYSNFLRGKLTLYTG

サブジェクト 125 VSSLRSLTSLLRALGAQKEATSLPEATSAAPLRTFTVDTLCKLFRIYSNFLRGKLTLYTG 184

クエリ 199 EACRRGDR 206

EACRRGDR

サブジェクト 185 EACRRGDR 192

【0017】

20

1つの実施形態において、EPOという用語は、野生型配列（リーダーペプチドを持つまたは持たない配列いずれかである、配列番号3または配列番号4）と比較して、1つまたは複数のアミノ酸置換が行われた活性EPOを示す。1つの実施形態において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、変異が、上記の配列比較で示すように種にまたがって示されるある残基でなされている。別の実施形態において、1つまたは複数のアミノ酸置換は、保存が種にまたがって示されるある残基でなされている。EPOは種にまたがって高い度合いの同一性を共有するものの、1つの実施形態において、最終的にベクターの投与が意図される対象の種に基づいてEPO配列を選択することが望ましい。1つの例において、対象は、哺乳類である。例えば、1つの実施形態において、対象がネコである場合、EPO配列は、ネコタンパク質に由来する。別の実施形態において、EPO配列は、イヌタンパク質に由来する。別の実施形態において、EPO配列は、非ヒト靈長類タンパク質に由来する。別の実施形態において、EPOは、ウシ、ヒツジ、またはブタタンパク質に由来する。別の実施形態において、EPO配列は、配列番号3のものである。別の実施形態において、EPO配列は、配列番号4のものである。

30

【0018】

40

EPOペプチドまたは核酸コード配列は、EPO成熟タンパク質配列と併せて異種リーダー配列を含む場合がある。「異種」という用語は、タンパク質または核酸に関して使用される場合、タンパク質または核酸が、2つ以上の配列またはサブ配列を、自然ではそれらが互いに取ることの見られない関連性で含んでいることを示す。例えば、発現カセットは、典型的には、組換えにより製造され、新たな機能的核酸を作るよう配置された無関係の遺伝子由来の配列を2つ以上有する。例えば、1つの実施形態において、リーダー配列は、EPOとは異なる遺伝子由来の場合がある。したがって、EPOコード配列に関して、リーダーは、異種である。1つの実施形態において、リーダー配列は、EPO配列とは異なる種に由来する。

【0019】

50

1つの実施形態において、配列は、EPO成熟ポリペプチドの上流に融合したIL-2リーダーペプチドをコードする。1つの実施形態において、リーダー配列は、配列番号9：M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N Sである。しかしながら、別の異種リーダー配列を、IL-2シグナル／リーダーペプチドと置き換えてよい。リーダーは、とりわけ、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-12、IL-18など）、免疫グロブリン、イ

ンスリン、アルブミン、 - グルクロニダーゼ、アルカリプロテアーゼまたはフィプロネクチン分泌シグナルペプチド、あるいは組織特異的に分泌されるタンパク質由来の配列で自然に見つかるシグナル配列が可能である。1つの実施形態において、リーダー配列は、EPOプロペプチド由来の内在性リーダー配列である。

【0020】

本明細書中使用される場合、「派生」または「に由来する」という用語は、配列またはタンパク質が、特定の対象種を起源とするか、あるいは特定の対象種を起源とするタンパク質または配列と同じ配列を共有することを意味する。例えば、イヌ「に由来する」プロペプチド配列は、イヌで発現するものと同じプロペプチド配列と同じ配列（または、本明細書中定義されるとおりのその変異体）を共有する。しかしながら、指定される核酸またはアミノ酸は、実際にイヌを起源とする必要はない。所望の配列を製造することを可能にする様々な技法が当該分野で既知であり、そのような技法として、同様なタンパク質（例えば、相同体）の変異誘発または核酸もしくはアミノ酸配列の人為的製造が挙げられる。「派生」核酸またはアミノ酸は、派生配列の実際の起源にかかわらず、その「派生」元の種の同一核酸またはアミノ酸の機能を保持する。

【0021】

本明細書中使用される場合、「EPO構築物」、「EPO発現構築物」という用語、及びそれらの同義語は、本明細書中記載されるとおりのEPO配列を含む。「EPO構築物」、「EPO発現構築物」という用語、及びそれらの同義語は、EPO（内在性もしくは異種リーダーを持つEPO成熟タンパク質またはプロペプチドを含む）をコードする核酸配列またはその発現産物を示すのに使用することができる。

【0022】

「アミノ酸置換」という用語及びその同義語は、アミノ酸を、別の置換用アミノ酸で置き換えることによる、アミノ酸配列の修飾を包含することが意図される。置換は、保存的置換の場合がある。置換は、非保存的置換の場合もある。保存的という用語は、2つのアミノ酸に言及する際、それらのアミノ酸が当業者に認識される共通の性質を共有することを意味することが意図される。例えば、疎水性非酸性側鎖を有するアミノ酸、疎水性酸性側鎖を有するアミノ酸、親水性非酸性側鎖を有するアミノ酸、親水性酸性側鎖を有するアミノ酸、及び親水性塩基性側鎖を有するアミノ酸である。共通の性質は、疎水性側鎖を有するアミノ酸、脂肪族疎水性側鎖を有するアミノ酸、芳香族疎水性側鎖を有するアミノ酸、極性中性側鎖を持つアミノ酸、電荷を帯びた側鎖を持つアミノ酸、電荷を帯びた酸性側鎖を持つアミノ酸、及び電荷を帯びた塩基性側鎖を持つアミノ酸の場合もある。天然及び非天然両方のアミノ酸が当該分野で既知であり、実施形態において、置換用アミノ酸として使用することができる。アミノ酸を置き換える方法は、当業者に周知であり、そのような方法として、アミノ酸配列をコードするスクレオチド配列の突然変異が挙げられるが、これに限定されない。本明細書中「1つまたは複数の」と言及する場合、個々の実施形態、例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれ以上についての実施形態を包含することが意図される。

【0023】

同じく提供されるのは、本明細書中記載される組み立てられたEPOタンパク質である。1つの実施形態において、EPOタンパク質は、記載されるAAV構築物により產生される。1つの実施形態において、EPOタンパク質は、異種リーダーを、成熟EPOタンパク質と組み合わせて含む。1つの実施形態において、異種リーダーは、IL-2由来である。組み立てられたEPOタンパク質は、診断アッセイをはじめとする多くの用途を有する。すなわち、1つの実施形態において、EPOタンパク質は、標識化される。本明細書中使用される場合、「標識」は、EPOタンパク質を標識化するのに有用な化学的または生化学的部分である。「標識」として、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、消光剤、放射性スクレオチド、酵素、基質、補因子、阻害剤、放射性同位元素、磁性粒子、及び当該分野で既知の他の部分が挙げられる。「標識」または「レポーター分子」は、測定可能なシグナルを生成することができ、共有結合または非共有結合で、オリゴスクレオチドまたは又

10

20

30

40

50

クレオチド（例えば、非天然ヌクレオチド）またはリガンドと結合することができる。最も望ましくは、標識は、視覚的に、例えば比色測定で検出可能である。そのような標識は、当該分野で多数知られており、そのような標識として、制限なく、蛍光性の検出可能な蛍光色素、例えば、フルオレセインイソチオシアナート（F I T C）、フィコエリトリン（P E）、アロフィコシアニン（A P C）、コリホスフイン-O（C P O）、またはタンデム型色素、P E - シアニン - 5（P C 5）、及びP E - テキサスレッド（E C D）を挙げることができる。一般的に使用される蛍光色素として、フルオレセインイソチオシアナート（F I T C）、フィコエリトリン（P E）、アロフィコシアニン（A P C）が挙げられ、同じくタンデム型色素、P E - シアニン - 5（P C 5）、P E - シアニン - 7（P C 7）、P E - シアニン - 5 . 5、P E - テキサスレッド（E C D）、ローダミン、P e r C P、フルオレセインイソチオシアナート（F I T C）、及びアレクサダイが挙げられる。そのような標識の併用、例えば、とりわけ、テキサスレッドとローダミン、F I T C + P E、F I T C + P E C y 5、及びP E + P E C y 7は、アッセイ方法に応じて使用され得る。他の望ましい標識またはタグとして、タンパク質の基質上で物理的分離または固定を可能にするものが挙げられる。そのような標識として、ビオチンが挙げられる。他の適切な標識またはタグは、例えば、U S 2 0 1 1 - 0 1 7 7 9 6 7 A 1 に記載されており、これは、本明細書中、参照により援用される。
10

【0024】

別の実施形態において、E P Oペプチドは、E P O配列から最高約10%の変異を含む可能性がある変異体を含む。すなわち、E P Oペプチドは、本明細書中提供される及び/または当該分野で既知のE P O配列と、約90%同一性～約99.9%同一性、約95%～約99%同一性、または約97%～約98%同一性を共有する。
20

【0025】

本明細書中提供されるE P Oペプチドに加えて、これらのペプチドをコードする核酸配列が、提供される。1つの実施形態において、本明細書中記載されるE P Oペプチドをコードする核酸配列が、提供される。別の実施形態において、これには、配列番号3のイヌE P Oタンパク質または配列番号3と少なくとも90%同一性を共有する配列をコードする任意の核酸配列が含まれる。別の実施形態において、これには、配列番号4のネコE P Oタンパク質または配列番号4と少なくとも90%同一性を共有する配列をコードする任意の核酸配列が含まれる。
30

【0026】

1つの実施形態において、イヌE P Oをコードする核酸配列は、配列番号5のものである。1つの実施形態において、ネコE P Oをコードする核酸配列は、配列番号6のものである。さらに別の実施形態において、E P O核酸は、本明細書中記載されるまたは当該分野で既知のE P O配列から最高約10%の変異を含む可能性がある変異体を含む。さらに別の実施形態において、E P O核酸は、本明細書中記載されるまたは当該分野で既知のE P O配列から最高約20%の変異を含む可能性がある変異体を含む。さらに別の実施形態において、E P O核酸は、本明細書中記載されるまたは当該分野で既知のE P O配列から最高約30%の変異を含む可能性がある変異体を含む。別の実施形態において、E P O核酸は、本明細書中記載されるまたは当該分野で既知のE P O配列から最高約40%の変異を含む可能性がある変異体を含む。
40

【0027】

1つの実施形態において、E P Oをコードする核酸配列は、記載された配列と少なくとも90%同一性を共有する配列を含む、本明細書中記載されるE P Oペプチドのいずれかをコードする配列がコドン最適化されたものである。1つの実施形態において、核酸配列は、投与が望まれる対象における発現について、コドン最適化されている。1つの実施形態において、イヌE P Oをコードする核酸配列は、配列番号7のものである。1つの実施形態において、ネコE P Oをコードする核酸配列は、配列番号8のものである。

【0028】

E P Oペプチドの変異体が望ましい場合、これらペプチドのコード配列は、野生型核酸
50

配列の部位特異的変異誘発を用いて生成させることができる。インターネット上のまたは市販されているコンピュータープログラム、ならびにサービス提供企業を利用して、RNA及び/またはcDNAの両方を含めて、アミノ酸配列から核酸コード配列への逆翻訳が可能である。例えば、EMBOSSによるbacktranseq、http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/Gene_Infinity(http://www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html); ExPasy(http://www.expasy.org/tools/)を参照。1つの実施形態において、RNA及び/またはcDNAコード配列は、本明細書中説明されるとおり、最終的に投与が意図される対象種で最適に発現するように設計される。すなわち、1つの実施形態において、コード配列はネコで最適に発現するように設計される。別の実施形態において、コード配列は、イヌで最適に発現するように設計される。さらに別の実施形態において、コード配列は、靈長類で最適に発現するように設計される。

【0029】

コード配列は、コドン最適化を用いて、最適に発現するように設計することができる。コドン最適化された翻訳領域は、様々な異なる方法で設計することができる。この最適化は、オンラインで入手可能な公開された方法、またはコドン最適化サービスを提供する企業による方法を用いて行うことができる。コドン最適化方法の1つは、例えば、国際特許公開第WO2015/012924号に記載されており、これは本明細書中に参照により援用される。簡単に述べると、産物をコードする核酸配列を、同義コドン配列で修飾する。適切には、産物のオープンリーディングフレーム(ORF)の全長を修飾する。しかしながら、いくつかの実施形態において、ORFの断片のみを改変する場合がある。これらの方法の1つを用いることにより、いかなるポリペプチド配列にもその出現頻度を与えることができ、ポリペプチドをコードするコドン最適化された翻訳領域の核酸断片を製造することができる。

【0030】

核酸配列の文脈における「同一性パーセント(%)」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、または「同一なパーセント」という用語は、対応について整列させた場合に同一である、2つの配列中の塩基を指す。配列同一性比較の長さは、ゲノム全長、遺伝子コード配列の全長、または少なくとも約100~150ヌクレオチドの断片、あるいは望み通りの長さにわたる場合がある。しかしながら、それより小さな断片、例えば少なくとも約9ヌクレオチド、通常は少なくとも約20~24ヌクレオチド、少なくとも約28~32ヌクレオチド、少なくとも約36以上のヌクレオチドの断片内での同一性が望ましい場合もある。複数の配列整列プログラムが、核酸配列についても入手可能である。そのようなプログラムの例として、「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「BLAST」、「MAP」、及び「MEME」が挙げられ、これらは、インターネット上のウェブサーバーでアクセスできる。そのようなプログラムの他の提供元も、当業者に既知である。あるいは、ベクターNTIユーティリティーも使用される。ヌクレオチド配列同一性を測定するのに使用可能なアルゴリズムも同じく当該分野で複数知られており、上記のプログラムに含まれているものが挙げられる。別の例として、ポリヌクレオチド配列を、GCGバージョン6.1に含まれるプログラムであるFastA(商標)を用いて比較することができる。FastA(商標)は、クエリ配列とサーチ配列の間で最もオーバーラップする領域の整列及び配列同一性パーセントを提供する。例えば、核酸配列間の配列同一性パーセントは、FastA(商標)をGCGバージョン6.1で提供されるとおりのそのデフォルトパラメーター(語長6及びスコア計算マトリクス用のNOPAMファクター)で用いて求めることができ、これは本明細書中参照により援用される。

【0031】

アミノ酸配列の文脈における「同一性パーセント(%)」、「配列同一性」、「配列同一性パーセント」、または「同一なパーセント」という用語は、対応について整列させた

10

20

30

40

50

場合に同一である、2つの配列中の塩基の多さを示す。同一性パーセントは、タンパク質の全長、ポリペプチド、約70アミノ酸～約100アミノ酸、またはそれらのペプチド断片もしくは対応する核酸配列コード配列にわたるアミノ酸配列について容易に決定することができる。適切なアミノ酸断片は、長さが少なくとも約8アミノ酸の場合があり、最長約150アミノ酸の場合がある。一般に、2つの異なる配列間の「同一性」、「相同性」、または「類似性」について言及する場合、「同一性」、「相同性」、または「類似性」は、「整列した」配列を参照して決定される。「整列した」配列または「整列」は、複数の核酸配列またはタンパク質（アミノ酸）配列を示し、これらは、参照配列と比較した場合に欠けているまたは追加されている塩基もしくはアミノ酸の補正を含むことが多い。整列は、公開されているまたは市販されている様々な複数配列整列プログラムのいずれかを使用して行われる。アミノ酸配列用の配列整列プログラムが入手可能であり、例えば、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、及び「Match-Box」などのプログラムがある。一般に、これらのプログラムのどれでも、初期設定で使用されるが、当業者なら、それらの設定を必要に応じて変更できる。あるいは、当業者なら、上記のアルゴリズム及びプログラムが提供するものと少なくとも同レベルの同一性または整列を提供する別のアルゴリズムまたはコンピュータープログラムを利用できる。例えば、J. D. Thomson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690(1999)を参照。

【0032】

1つの実施形態において、本明細書中記載されるEPO構築物をコードする核酸配列は、操作されて、任意の適した遺伝要素、例えば、ネイキッドDNA、ファージ、トランスポゾン、コスミド、RNA分子（例えば、mRNA）、エピソームなどに導入され、この遺伝要素は、例えば、DNAもしくはRNAを保有するナノ粒子、パッケージング宿主細胞に入ったウイルスベクターを生成するため、及び／または対象の宿主細胞に送達するために、それらが保有するEPO配列を宿主細胞へと移送する。1つの実施形態において、遺伝要素は、プラスミドである。選択された遺伝要素は、任意の適切な方法で送達することができ、そのような方法として、形質移入、電気穿孔法、リポソーム送達、膜融合法、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合が挙げられる。そのような構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作の当業者に既知であり、そのような方法として、遺伝子操作、組換え操作、及び合成技法が挙げられる。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY(2012)を参照。

【0033】

本明細書中使用される場合、「発現カセット」は、EPOペプチドのコード配列、プロモーターを含み、さらにそれらのための他の制御配列を含む場合がある核酸分子を示し、カセットは、操作されて遺伝要素に導入される、及び／またはウイルスベクターのカプシド（例えば、ウイルス粒子）にパッケージングされる場合がある。典型的には、ウイルスベクターを生成するためのそのような発現カセットは、隣にウイルスゲノムのパッケージングシグナル及び他の発現制御配列、例えば本明細書中記載されるものなどを配置した本明細書中記載されるEPO構築物配列を、含む。発現制御配列はどれでも、当該分野で既知の技法を用いて特定種に合わせて最適化することができ、そのような技法として、例えば、本明細書中記載されるとおりのコドン最適化が挙げられる。

【0034】

発現カセットは、典型的には、発現制御配列の一部分としてプロモーター配列を含む。1つの実施形態において、CB7プロモーターが使用される。CB7は、サイトメガロウイルスエンハンサー元素を持つトリ-アクチンプロモーターである。あるいは、他の肝臓特異的プロモーターを使用することができる[例えば、The Liver S

10

20

30

40

50

specific Gene Promoter Database, Cold Spring Harbor, <http://rulai.sch1.edu/LSPD>, alp ha 1 anti-trypsin (A1AT); human albumin Miyatake et al., J. Virol., 71: 5124-32 (1997), humAlb;及びhepatitis B virus core promoter, Sandig et al., Gene Ther., 3: 1002-9 (1996)を参照]。LTR微小エンハンサー/プロモーター、アルファ-抗トリプシンプロモーター、LSP (845 nt) 25 (無イントロンscAAVを必要とする)。1つの実施形態において、肝臓特異的プロモーターのチロキシン結合グロブリン (TBG) が使用される。他のプロモーター、例えば、ウイルスプロモーター、構成的プロモーター、調節型プロモーター [例えば、WO 2011/126808 及び WO 2013/04943 を参考]、または生理学的合図に反応するプロモーターを、本明細書中記載されるベクターに使用することができる。
10

【0035】

プロモーターの他にも、発現カセット及び/またはベクターは、他の適切な転写開始配列、終止配列、エンハンサー配列、効率的なRNAプロセシングシグナル、例えばスライシングシグナル及びポリアデニル化 (ポリA) シグナル；TATA配列；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を向上させる配列 (すなわち、Kozak共通配列)；イントロン；タンパク質安定性を向上させる配列；ならびに、望まれる場合に、コードされた産物の分泌を向上させる配列を含むことができる。発現カセットまたはベクターは、本明細書中記載される要素を全く含まないか、またはそれらのいずれか1つまたは複数を含むことができる。適切なポリA配列の例として、例えば、SV40、ウシ成長ホルモン (bGH)、及びTKポリAが挙げられる。適切なエンハンサーの例として、とりわけ、例えば、CMVエンハンサー、RSVエンハンサー、アルファ胎児タンパク質エンハンサー、LTR微小プロモーター/エンハンサー、LSP (TH結合グロブリンプロモーター/アルファ1-ミクログロブリン/ビクニンエンハンサー) が挙げられる。
20

【0036】

1つの実施形態において、ウイルスベクターは、核酸発現カセットを含み、この核酸発現カセットは、5'AAV末端逆位反復配列 (ITR)、任意選択のエンハンサーを持つプロモーター、EPO配列、ポリA配列、及び3'AAV ITRを含んでおり、この発現カセットは、宿主細胞で機能的EPOを発現する。
30

【0037】

これらの制御配列は、EPO構築物配列と「作動可能に連結されている」。本明細書中使用される場合、「作動可能に連結されている」という用語は、目的の遺伝子と隣接する発現制御配列、及びトランスまたはある距離にあって目的の遺伝子を制御するように作用する発現制御配列の両方を示す。

【0038】

発現カセットは、操作されて、ウイルスベクターの製造に使用されるプラスミド上に導入され得る。発現カセットをAAVウイルス粒子にパッケージングするために必要な最小配列は、AAVの5'ITR及び3'ITRであり、これらは、カプシドと同一AAV起源のものである場合もあるし、異なるAAV起源のものである場合もある (AAV偽型を製造するため)。1つの実施形態において、AAV2由来のITR配列、またはその欠失型 (ITR) が、利便性から、及び規制当局の承認を早めるために使用される。しかしながら、他のAAV源由来のITRが選択される場合もある。ITR源がAAV2であり、AAVカプシドが別のAAV源由来である場合、得られるベクターは、偽型と呼ばれる。典型的には、AAVベクター用発現カセットは、AAVの5'ITR、プロペプチド-EPO活性ペプチドコード配列及び任意の制御配列、ならびにAAVの3'ITRを含む。しかしながら、これらの要素の他の構成が適切な場合もある。ITRと呼ばれる5'ITRの短縮型が報告されてきているが、これはD-配列及び末端分割部位 (trs) が欠失されている。他の実施形態において、全長AAV 5'及び3'ITRが使用される
40
50

。

【0039】

例示のプラスミドを、配列表に提示する。配列番号1は、イヌEPO構築物をコードするプラスミドの配列を提示し、これはpn1044.CB7.caEPOと名付けられている。1つの実施形態において、発現力セットは、操作されて配列番号1のプラスミドに導入されている。配列番号2は、ネコEPO構築物をコードするプラスミドの配列を提示し、これはpn1044.CB7.feEPOと名付けられている。1つの実施形態において、発現力セットは、操作されて配列番号2のプラスミドに導入されている。プラスミド、例えば配列番号1及び配列番号2に示されるものなどは、本明細書中記載される構成要素を1つまたは複数追加で含むように修飾される場合もあるし、必要に応じて構成要素を除去または交換する場合もある。1つの実施形態において、プラスミドは、配列番号1の配列またはそれと少なくとも80%同一性を共有する配列を有する。別の実施形態において、プラスミドは、配列番号2の配列またはそれと少なくとも80%同一性を共有する配列を有する。10

【0040】

「sc」という略号は、自己相補的であることを示す。「自己相補的AAV」は、組換えAAV核酸配列が保有する翻訳領域が分子内二本鎖DNA鑄型を形成するように設計されている発現力セットを有する、プラスミドまたはベクターを示す。感染の際、第二鎖の細胞仲介型合成を待つのではなく、scAAVの2つの相補的半身が会合して、二本鎖DNA(dsDNA)単位を形成することになり、この単位は直ちに複製及び転写を行うことができる。例えば、D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248 - 1254を参照。自己相補的AAVは、例えば、米国特許第6,596,535号、同第7,125,717号、及び同第7,456,683号に記載されており、これらはそれぞれ、その全体が本明細書中に参照により援用される。20

【0041】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ウイルスペクターとは、AAVタンパク質カプシドを有するAAV DNAアーゼ耐性粒子であり、その中に標的細胞に送達するための核酸配列がパッケージングされている。AAVカプシドは、60のカプシド(capsid)タンパク質サブユニット、VP1、VP2、及びVP3で構成されており、これらは選択したAAVに応じて約1:1:10~1:1:20の比で、20面体対称に配列されている。AAV血清型を、AAVウイルスペクター(DNAアーゼ耐性ウイルス粒子)のカプシド源として選択することができ、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh10、AAVrh64R1、AAVrh64R2、rh8、rh.10、既知もしくは記載済みのAAVまたはまだ発見されていないAAVのいずれかの変異体が挙げられる。1つの実施形態において、AAVは、AAV8カプシドであるか、またはその変異体である。例えば、米国特許出願公開第2007-0036760-A1号；米国特許出願公開第2009-0197338-A1号；EP1310571を参照。同じく、WO2003/042397(AAV7及び他のサルAAV)、米国特許第7790449号及び米国特許第7282199号(AAV8)、WO2005/033321、及び米国特許第7,906,111号(AAV9)、ならびにWO2006/110689、ならびにWO2003/042397(rh.10)を参照。あるいは、上記のAAVのいずれかに基づく組換えAAVが、AAVカプシド源として使用され得る。これらの文献は、AAV生成用に選択され得る他のAAVも記載しており、参照により援用される。いくつかの実施形態において、ウイルスペクターに使用するためのAAVcapは、上記AAVCapのうち1つまたはそれをコードする核酸の変異誘発により(すなわち、挿入、削除、または置換により)生成させる304050

ことができる。いくつかの実施形態において、AAVカプシドは、上記AAVカプシドタンパク質の2種、3種、4種、またはそれ以上に由来するドメインを含むキメラである。いくつかの実施形態において、AAVカプシドは、2種または3種の異なるAAVまたは組換えAAV由来のVp1、Vp2、及びVp3単量体のモザイクである。いくつかの実施形態において、rAAV組成物は、上記Capを1種より多く含む。別の実施形態において、AAVカプシドは、上記のまたは既知のAAVカプシド配列いずれかから最高約10%の変異を含み得る変異体を含む。すなわち、AAVカプシドは、本明細書中提供される及び/または当該分野で既知のAAVカプシドと、約90%同一性～約99.9%同一性、約95%～約99%同一性、または約97%～約98%同一性を共有する。1つの実施形態において、AAVカプシドは、AAVカプシドと少なくとも95%同一性を共有する。AAVカプシドの同一性を決定する場合、比較は、可変タンパク質（例えば、Vp1、Vp2、またはVp3）のいずれかにわたり行われ得る。1つの実施形態において、AAVカプシドは、AAV8Vp3と少なくとも95%同一性を共有する。別の実施形態において、自己相補的AAVが使用される。

【0042】

発現カセットをビリオンに封入する場合、ITRは、同一構築物内で遺伝子としてシステム必要とされる唯一のAAV構成要素である。1つの実施形態において、AAVベクターを生成する目的で、複製（rep）及び/またはカプシド（cap）用のコード配列を、AAVゲノムから取り出し、トランスでまたはパッケージング細胞株により供給する。例えば、上記のとおり、偽型AAVは、AAVカプシド源とは異なる提供源由来のITRを含有し得る。これに加えてまたはこれとは別に、キメラAAVカプシドが利用され得る。さらに他のAAV構成要素が選択され得る。そのようなAAV配列の提供源は、本明細書中記載されるものであり、教育関係、企業、または公的提供元（例えば、アメリカ培養細胞系統保存機関、Manassas、VA）から単離または得られる場合もある。あるいは、AAV配列は、合成または他の適切な手段を通じて、公開されている配列、例えば文献またはデータベースなど（例えば、GenBank（登録商標）、PubMed（登録商標）など）で入手可能なものを参照することにより得られる場合もある。

【0043】

対象に送達するのに適したAAVウイルスベクターを生成及び単離する方法は、当該分野で既知である。例えば、米国特許第7790449号、米国特許第7282199号、WO 2003/042397、WO 2005/033321、WO 2006/110689、及びUS 7588772 B2を参照]。1つの系において、プロデューサー細胞株を、ITRならびにrep及びcapをコードする構築物（複数可）が隣に配置された導入遺伝子をコードする構築物で一時的に形質移入する。第二の系では、rep及びcapを安定供給するパッケージング細胞株を、ITRが隣に配置された導入遺伝子をコードする構築物で一時的に形質移入する。これらの系それぞれにおいて、AAVビリオンが、rAAVを混入ウイルスから分離するのに必要なヘルパーAdenoウイルスまたはヘルペスウイルスの感染に反応して産生される。さらに最近、AAVを回収するためにヘルペスウイルスの感染を必要としない系が開発された。必要なヘルパー機能（すなわち、AdenoウイルスE1、E2a、VA、及びE4、またはヘルペスウイルスUL5、UL8、UL52、及びUL29、ならびにヘルペスウイルスピリメラーゼ）も、系により、トランスで供給される。これらのより新しい系では、ヘルパー機能は、必要なヘルパー機能をコードする構築物で細胞を一時的に形質移入することにより供給することができ、または細胞を、ヘルパー機能をコードする遺伝子を安定して含有しているように操作することができ、その遺伝子の発現は、転写レベルまたは転写後レベルで制御することができる。さらに別の系では、ITR及びrep/cap遺伝子が隣に配置された導入遺伝子を、バキュロウイルス系ベクターで感染させることにより、昆虫細胞に導入する。これらの製造系の総説については、全般的には、例えば、Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production"を参照のこと。

ted virus production, "Human Gene Therapy 20: 922 - 929 を参照、これらそれぞれの内容は、その全体が本明細書中に参照により援用される。これら及び他のAAV製造系の作製法及び使用法は、以下の米国特許にも記載されており、これらそれぞれの内容は、その全体が本明細書中に参照により援用される: 5, 139, 941, 5, 741, 683, 6, 057, 152, 6, 204, 059, 6, 268, 213, 6, 491, 907, 6, 660, 514, 6, 951, 753, 7, 094, 604, 7, 172, 893, 7, 201, 898, 7, 229, 823、及び 7, 439, 065。全般的には、例えば、Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119 - 145、Buning et al., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," J. Gene Med. 10: 717 - 733、及び以下に記載される参考文献を参照、これらは、それぞれが、その全体が本明細書中に参照により援用される。本発明のいずれかの実施形態を構築するのに使用される方法は、核酸操作の当業者に既知であり、そのような方法として、遺伝子操作、組換え操作、及び合成技法が挙げられる。例えば、Green and Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) を参照。同様に、rAAVビリオンの生成方法も周知であり、適切な方法の選択は、本発明に制限をかけるものではない。例えば、K. Fisher et al, (1993) J. Virol., 70: 520 - 532 及び米国特許第 5, 478, 745 号を参照。

【0044】

同じく提供されるのは、本明細書中記載されるウイルスベクター構築物を含む組成物である。本明細書中記載される医薬組成物は、それを必要とする対象に、任意の適切な経路でまたは異なる経路の組み合わせで送達されるように設計される。肝臓への直接送達（任意選択で、静脈内を介して、肝動脈を介して、または移植により）、経口、吸入、経鼻、気管内、動脈内、眼内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、及び他の非経口投与経路。本明細書中記載されるウイルスベクターは、1つの組成物としてまたは複数の組成物として送達され得る。任意選択で、2種以上の異なるAAV、または複数のウイルスが、送達され得る [例えば、WO 2011 / 126808 及び WO 2013 / 049493 を参照]。別の実施形態において、複数のウイルスは、異なる複製欠損ウイルス（例えば、AAV 及びアデノウイルス）を含有し得る。

【0045】

複製欠損ウイルスは、遺伝子導入及び遺伝子治療用途で使用するために、生理学的に許容される担体とともに配合することができる。AAVウイルスベクターの場合、ゲノムコピー（「GC」）の定量を、配合物または懸濁液に含まれる用量の尺度として使用することができる。当該分野で既知の任意の方法を用いて、本発明の複製欠損ウイルス組成物のゲノムコピー（GC）数を求めることができる。AAVのGC数測定（titration）を行う1つの方法は、以下の通りである。精製AAVベクター試料を、最初にDNAアーゼで処理して、カプセル化されていないAAVゲノムDNAまたは混入プラスミドDNAを、製造プロセスから排除する。次いで、DNAアーゼ耐性粒子を、熱処理に供して、ゲノムをカプシドから放出させる。次いで、放出されたゲノムを、リアルタイムPCRで、ウイルスゲノムの特定領域（通常は、ポリAシグナル）を標的とするプライマー／プローブセットを用いて、定量する。

【0046】

同じく、複製欠損ウイルス組成物は、約 $1 \cdot 0 \times 10^9$ GC ~ 約 $1 \cdot 0 \times 10^{15}$ GC 範

10

20

30

40

50

囲の量である複製欠損ウイルスを含有するように、投薬単位に配合することができる。別の実施形態において、この量のウイルスゲノムは、分割した用量で送達される場合がある。1つの実施形態において、投与量は、約 5 kg の平均的なネコまたは小型のイヌ対象について約 1.0×10^{10} GC ~ 約 1.0×10^{12} GC である。1つの実施形態において、投与量は、約 20 kg の平均的な中型のイヌ対象について約 1.0×10^{11} GC ~ 約 1.0×10^{13} GC である。平均的なイヌは、体重が約 5 ~ 約 50 kg の範囲にある。1つの実施形態において、投与量は、対象について約 1.0×10^{11} GC ~ 1.0×10^{13} GC である。別の実施形態において、用量は約 3×10^{12} GC である。例えば、AAVウイルスの用量は、約 1×10^{11} GC、約 5×10^{11} GC、約 1×10^{12} GC、約 5×10^{12} GC、または約 1×10^{13} GC の場合がある。¹⁰ 1つの実施形態において、投与量は、約 3×10^{10} GC / kg である。別の例において、構築物は、1 mLあたり約 0.001 mg ~ 約 10 mg の量で送達され得る。1つの実施形態において、構築物は、獣医学的対象について、 $1 \mu\text{L} \sim 100 \text{mL}$ の体積で送達され得る。例えば、種々の獣医学的動物に対する物質の投与を良好に実施するための説明について、Diehl et al., J. Applied Toxicology, 21: 15 - 23 (2001) を参照。この文献は、本明細書中参照により援用される。本明細書中使用される場合、「投与量」という用語は、治療課程にある対象に送達される合計投与量、または（複数回のうち）1回の投与で送達される量を示すことができる。

【0047】

上記の組換えベクターは、公開された方法に従って、宿主細胞に送達することができる。²⁰ rAAVを、好ましくは生理学的に適合性のある担体、希釈剤、賦形剤、及び／またはアジュバントに懸濁させて、望まれる対象に投与することができ、そのような対象として、制限なく、ネコ、イヌ、または他の非ヒト哺乳類対象が挙げられる。適切な担体は、移送ウイルスを仕向ける適応症を考慮して、当業が容易に選択することができる。例えば、適切な担体の1つとして、生理食塩水が挙げられ、これは、様々な緩衝液（例えば、リン酸緩衝食塩水）とともに配合することができる。担体の他の例として、滅菌生理食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油、及び水が挙げられる。キャリアの選択は、本発明を制限するものではない。

【0048】

任意選択で、本発明の組成物は、rAAV及び／または変異体及び担体（複数可）に加えて、他の従来の医薬成分、例えば、保存料、または化学的安定剤を含むことができる。保存料の適切な例として、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、及びパラクロロフェノールが挙げられる。適切な化学的安定剤として、ゼラチン及びアルブミンが挙げられる。³⁰

【0049】

本明細書中記載されるウイルスベクター及び他の構築物は、必要としている対象にEPO構築物を送達するための、及び／または対象の慢性腎臓疾患を治療するための医薬を製造するのに、使用することができる。したがって、別の態様において、慢性腎臓疾患の治療方法が提供される。本方法は、その必要がある対象に、本明細書中記載されるとおりの組成物を投与することを含む。⁴⁰ 1つの実施形態において、組成物は、本明細書中記載されるとおり、EPO発現力セットを含むウイルスベクターを含む。1つの実施形態において、対象は、哺乳類である。別の実施形態において、対象は、ネコまたはイヌである。さらに別の態様において、貧血の治療方法が提供される。本方法は、その必要がある対象に、本明細書中記載されるとおりの組成物を投与することを含む。1つの実施形態において、組成物は、本明細書中記載されるとおり、EPO発現力セットを含むウイルスベクターを含む。1つの実施形態において、対象は、哺乳類である。別の実施形態において、対象は、ネコまたはイヌである。

【0050】

⁵⁰

別の実施形態において、ネコの慢性腎臓疾患の治療方法が提供される。本方法は、ネコ E P O をコードする配列を含む核酸分子を含む A A V ウイルスベクターを投与することを含む。別の実施形態において、イヌの慢性腎臓疾患の治療方法が提供される。本方法は、イヌ E P O をコードする配列を含む核酸分子を含む A A V ウイルスベクターを投与することを含む。

【0051】

治療課程は、任意選択で、同一ウイルスベクター（例えば、A A V 8 ベクター）または異なるウイルスベクター（例えば、A A V 8 及び A A V r h 1 0 ）の繰り返し投与を含むことができる。本明細書中記載されるウイルスベクターを用いてさらに他の組み合わせを選択することができる。任意選択で、本明細書中記載される組成物は、例えば、組換え E P O をはじめとする他の薬物またはタンパク質系療法が関与するレジメンに組み合わせることができる。任意選択で、本明細書中記載される組成物は、食事及び運動レジメンをはじめとする生活様式の変更が関与するレジメンに組み合わせることができる。10

【0052】

なお、「a」または「an」という用語は、1つまたは複数を示す。そのため、「a」（または「an」）、「1つまたは複数」、及び「少なくとも1つの」という用語は、本明細書中、同義で使用される。

【0053】

「comprise（含む）」、「comprises（含む）」、及び「comprising（含んでいる）」という語は、排他的ではなく包括的であることを意図するものである。「consist（からなる）」、「consisting（からなっている）」という語、及びそれらの活用形は、排他的であり、包括的ではないことを意図するものである。明細書中、様々な実施形態が「comprising（含んでいる）」という表現を用いて提示されるが、他の状況下では、関連実施形態も、「consisting of（からなる）」または「consisting essentially of（本質的にからなる）」という表現で解釈され、その表現で記載されることが意図される。20

【0054】

本明細書中使用される場合、「約」という用語は、特に記載がない限り、与えられた参考値から10%の変動可能性を意味する。

【0055】

「調節」という用語またはその变形語は、本明細書中使用される場合、組成物が持つ、生体経路の1つまたは複数の成分を阻害する能力を指す。

【0056】

「対象」は、哺乳類、例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、または非ヒト霊長類、例えば、サル、チンパンジー、ヒヒ、またはゴリラなどである。本明細書中使用される場合、「対象」という用語は、「患者」と同義で使用される。

【0057】

本明細書中使用される場合、「疾患」、「障害」、及び「症状」は、同義で使用され、対象の異常な状態を示す。

【0058】

本明細書中特に記載がない限り、本明細書中使用される技術用語及び学術用語は、当該分野の当業者が一般的に認識するもの及び公開された文書を参照することにより認識されるものと同じ意味を有し、公開された文書は、当業者に、本明細書中使用される用語の多くに対して一般的な案内を提供するものである。

【0059】

以下の実施例は、例示にすぎず、本発明を制限することを意図しない。

【実施例】

【0060】

実施例1 - E P O ベクターの構築

10

20

30

40

50

イヌ及びネコのエリスロポエチンのアミノ酸配列を、Genbankから入手した。アミノ酸配列を逆翻訳してコドン最適化を行い、続いてkozac共通配列、終止コドン、及びクローニング部位を附加した。配列は、GeneArtにより製造され、これを、CMVエンハンサーを持つトリ-ベータアクチンプロモーターを含む発現ベクター(p1044)にクローン導入した。発現構築物は、隣にAAV2-ITRが配置される。イヌ及びネコ構築物を、三重形質移入によりAAV血清型8カプシドにパッケージングし、イオジキサノール勾配精製を行い、Taqman定量PCRにより力価測定した。

【0061】

実施例2 - ネコにおけるネコエリスロポエチンのAAV介在型発現

3匹のネコに、体重1キログラムあたり 3×10^{10} ゲノムコピー(GC/kg)のネコエリスロポエチン発現AAV8を単回筋肉内注射して処置した(図1)。注射時及びその後周期的に、ヘマトクリット測定用に血液試料を採取した。ベクター注射後42日目に、治療的瀉血を開始した。これまで、結果は、EPO発現の持続が、100日超でも見られたことを示している。

【0062】

実施例3 - イヌにおけるイヌエリスロポエチンのAAV介在型発現

3匹のイヌに、 3×10^{10} GC/kgのイヌエリスロポエチン発現AAV8を単回筋肉内注射して処置した。注射時及びその後周期的に、ヘマトクリット測定用に血液試料を採取した(図2)。未処置の同腹仔から採取した血液試料が、対照として含まれた。ベクター注射後60日目に、治療的瀉血を開始した。

【0063】

実施例4 - ネコにおけるネコエリスロポエチンのAAV介在型発現の投与量試験

ネコに、体重1キログラムあたり最高で 3×10^7 、 3×10^8 、 3×10^9 、または 3×10^{10} ゲノムコピー(GC/kg)のネコエリスロポエチン発現AAV8を単回筋肉内注射して処置した。これらの3つのコホートは、1つの投与量あたり4匹のネコからなるものであった。ネコは全頭、正常/野生型であり、無作為に選択された。この試験の目的は、長期間の安全性及び有効性を示して、飼い主がいる動物での試験のための臨床薬候補として可能性があることを強調することであった。図4。

【0064】

実施例5 - ネコにおけるネコエリスロポエチンのAAV介在型発現

ネコに、体重1キログラムあたり最高 3×10^9 ゲノムコピー(GC/kg)のネコエリスロポエチン発現AAV8を、左または右四頭筋に最高 $400 \mu\text{L}$ の合計体積で単回筋肉内注射して処置する。注射時及びその後周期的に、ヘマトクリット測定用に血液試料を採取する。最初のベクター投与から28日またはそれより後に、同一基準を用いて、ベクターを再投与する可能性がある。

【0065】

この試験は、ステージIIIの慢性腎臓疾患と関連した貧血のネコを最高9匹含む。CKD関連貧血は、少なくとも1ヶ月間があいた2つの時点でヘマトクリットが29%未満であり、かつ別の明白な貧血の原因がない、と定義される。登録された対象は、ネコエリスロポエチン導入遺伝子を保有するアデノ随伴ウイルスベクター(AAV8.fEp0)の単回筋肉内注射を受ける。対象は、試験施設で、ベクター投与時、ならびに投与の2、4、6、及び8週後に、評価される。来訪時ごとに、血液を採取して、エリスロポエチン濃度、ヘマトクリット、網状赤血球数、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、及び平均赤血球血色素濃度を評価する。患者は、ヘマトクリット測定のため、試験薬物投与から3ヶ月、6ヶ月、及び12ヶ月後に、試験施設に戻ってくるか、またはそれらの主治医である獣医師により経過観察を受ける。試験薬物は、前に、4匹の正常なネコで、最高3E8ゲノムコピー/kgの用量で安全であることが明らかになっている。この治験に登録された最初の3匹の対象は、1E8ゲノムコピー/kg用量のAAV8.fEp0を投与される。安全性及びベクター活性の最初の評価は、最初の3匹の対象が、ベクター投与後8週に到達してから行われる。3匹の動物からなるこの臨床コホートでの8週目での分析結果

10

20

30

40

50

に応じて、3匹の動物からなる第二コホートの投薬を、以下のスキームを用いて進める：

1. 最初のコホートで何か重篤な有害事象が生じた場合、またはどれか1匹でも動物がヘマトクリット55%に達した場合、用量を3倍減少させ、この減少した用量で、3匹の追加動物を登録する。（合計で6匹の対象が試験に登録される）

2. 有害事象がなく、かつ全てのネコがヘマトクリットの上昇を少なくとも5%示し、またはヘマトクリットの正常範囲に到達した場合、開始用量で3匹の追加動物を登録する。（合計で6匹の対象が試験に登録される）

3. 有害事象がなく、かつ全てのネコがヘマトクリットの少なくとも5%の上昇を示さないまたは正常範囲に到達しない場合、3匹の追加ネコを、3倍多い用量の3E8ゲノムコピー/k gで処置する。このコホートの3匹の動物全てが、ベクター投与後6週に到達した後、再度、安全性及び活性の暫定評価を行う。有害事象がなく、かつ全てのネコがヘマトクリットの上昇を少なくとも5%示し、またはヘマトクリットの正常範囲に到達した場合、この用量で、3匹の追加ネコを、処置する。有害事象がなく、かつ全てのネコがヘマトクリットの少なくとも5%の上昇を示さないまたは正常範囲に到達しない場合、3匹の追加ネコを、6E8ゲノムコピー/k gの用量で処置する。（合計で9匹の対象が試験に登録される）。したがって、この試験は、安全性の暫定評価ならびにヘマトクリットの変化についての結果に応じて、少なくとも6匹かつ最大で9匹の対象を登録する。主要評価項目には、安全性及びベクター発現の評価が含まれる。

副次評価項目には、動物の生活の質及びベクターの長期間持続した発現が含まれる。

組み入れ基準：

ステージIIの腎不全であるネコ（血清クレアチニンが2.95mg/dL）

少なくとも1ヶ月間があいた2つの時点でヘマトクリットが29%

飼い主が、試験薬物投与後、2週目、4週目、6週目、及び8週目に、試験施設に再来訪すること、ならびに試験薬物投与から3ヶ月、6ヶ月、及び12ヶ月後に、試験施設、またはそれらの主治医である獣医師のところに戻ってくることに同意している。

除外基準：

予想される平均余命が3ヶ月未満

腎臓移植

過去に、組換えエリスロポエチンを用いた治療を受けている（エポエチン、ダルベポエチン）

試験責任医師の見解で、試験薬物の安全性及び活性の評価から除外すべきである他の症状がある

AAV8に対する中和抗体が先在する

適格なネコを最初の来訪中にスクリーニングする。これには、全病歴ならびに臨床検査、CBC/化学検査、及びAAV8に対する先在抗体の有無、ならびに同意文書の全面公開が含まれる。

研究プロトコルの条件に同意した全ての適格なネコは、試験参加が認められてから少なくとも1週間後に、最高3E9ゲノムコピー/k gのAAV8.fEPOの単回筋肉内注射を受ける。

ベクター投与後、ネコは、8週間の期間にわたり、1週間おきに、評価される。これらの臨床検査には、CBC網状赤血球数/化学検査、全体臨床評価、及び血清採取が含まれる。8週間後、これらの臨床評価は、3ヶ月ごとになり、ベクター投与後90日目から開始する。3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、及び1年後の評価が行われる。

合併症の可能性

65%ヘマトクリットという赤血球増加症を示した動物はいずれも、3週間ごとに最高10%の血液体積の治療的瀉血を受ける。

【0066】

本明細書中、ならびに仮出願番号第62/212, 144号及び同第62/336, 211号に引用される全ての文献は、本明細書中、参照により援用される。同様に、本明細書中参照される配列番号及び添付の配列表で見られる配列番号は、参照により援用される

10

20

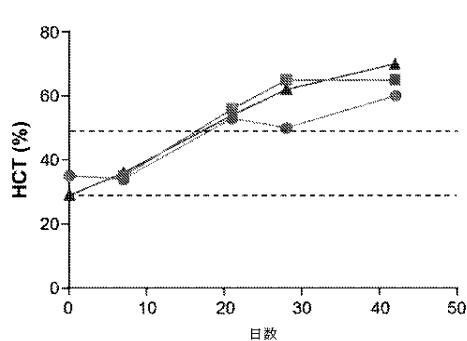
30

40

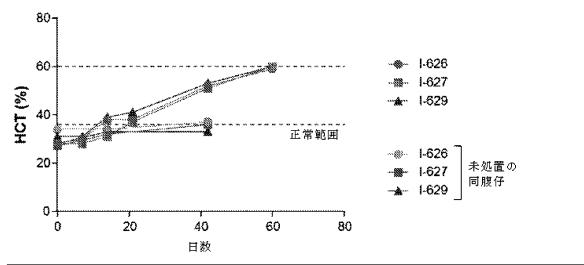
50

。本発明を特定の実施形態を参照して説明してきたものの、当然のことながら、本発明の精神から逸脱することなく改変を行うことができる。そのような改変は、添付の請求項の範囲に含まれることが意図される。

【図1】



【図2】



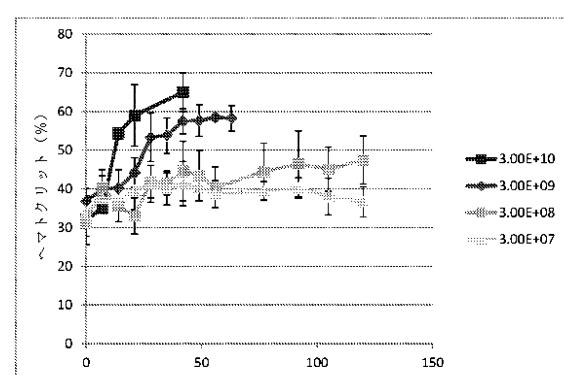
【図3A】

配列番号3イヌEPO
 MCEPAPPKPTQSAWHHSFPECAPALLLLSLLLLPLGLPVVLGAPPRILCDSRVLERYLE
 AREAENVTMGCAQGCSFSENIITVPDFTKVNFTWKRMDVGQQALEVWQGLALISE
 AILRGQALLANASQPSETPQLHVVDKAVSSLRSLTSLLRALGAQKEAMSLPEEASPA
 PLRTFTVDTLCKLFRIYSNFLRGKLTLYTGEACRRGDR

【図3B】

配列番号4ネコEPO
 MGSCCECPALLLLSLLLLPLGLPVVLGAPPRILCDSRVLERYLEAREAEVNTMGCAE
 GCSFSENIITVPDFTKVNFTWKRMDVGQQALEVWQGLALISEAILRGQALLANSSQ
 PSETLQLHVVDKAVSSLRSLTSLLRALGAQKEATSLPEATSAPLRTFTVDTLCKLFRI
 YSNFLRGKLTLYTGEACRRGDR

【図4】



【配列表】

0006877408000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 38/18 (2006.01)	A 6 1 K 38/18
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
C 0 7 K 14/505 (2006.01)	C 0 7 K 14/505
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12

(72)発明者 ウイルソン , ジェームス・エム

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19103 フィラデルフィア・デランシーストリート 1831

(72)発明者 ウイルソン , マシュー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19103 フィラデルフィア・2エフ・デランシーストリート 2
212

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特表2002-504078 (JP, A)

特表2012-504136 (JP, A)

米国特許出願公開第2015/0230430 (US, A1)

特表2013-529063 (JP, A)

特開2000-178207 (JP, A)

Gene Therapy, 2000, Vol.7, p.534-539

AJVR, 2005, Vol. 66, No. 3, p. 450-456

GOODMAN, R.E. et al., *Felis domesticus erythropoietin mRNA, complete cds.*, Database GenBank [online], Accession No. U00685, 25-MAY-1994 uploaded, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U00685.1>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

A 6 1 K

A 6 1 P

C 0 7 K

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

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

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

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