

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4289687号
(P4289687)

(45) 発行日 平成21年7月1日(2009.7.1)

(24) 登録日 平成21年4月10日(2009.4.10)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 48/00 (2006.01)

A 61 K 48/00

A61K 38/43 (2006.01)

A 61 K 37/465

請求項の数 21 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願平10-540610
(86) (22) 出願日	平成10年3月12日(1998.3.12)
(65) 公表番号	特表2001-517221(P2001-517221A)
(43) 公表日	平成13年10月2日(2001.10.2)
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/004790
(87) 国際公開番号	W01998/041240
(87) 国際公開日	平成10年9月24日(1998.9.24)
審査請求日	平成17年3月9日(2005.3.9)
(31) 優先権主張番号	60/040,711
(32) 優先日	平成9年3月14日(1997.3.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者

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 19104—4318
ペンシルバニア州, フィラデルフィア, 3
4番 ストリート アンド シヴィック
センター ブルヴァード

(74) 代理人

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人

弁理士 石井 貞次

(72) 発明者

ハイ, キャサリン, エー.
アメリカ合衆国 19066 ペンシルバ
ニア州, メリオン, グリーンウェイ レー
ン 201

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血友病の治療のための遺伝子治療で使用する方法と組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルスを含む組成物であって、該ウイルスが、少なくとも2つのアデノ関連ウイルス逆方向末端繰り返し配列と、プロモーター／調節配列と、第IX因子遺伝子のイントロンIの一部と、第IX因子をコードし且つ5'および3'非翻訳領域を伴う単離DNAと、転写停止シグナルとを含有する組換えアデノ関連ウイルスベクター(AAV-F.IX)からなる、上記組成物。

【請求項 2】

前記第IX因子遺伝子のイントロンIの一部が、約0.3kb～約1.7kbの長さである、請求項1記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記第IX因子をコードする単離DNAが、成熟第IX因子の初めから5番目のアミノ酸位置にあるリジンの代わりにアラニン残基をコードする突然変異を有する、請求項1記載の組成物。

【請求項 4】

薬剤学的に許容される担体をさらに含む、請求項1記載の組成物。

【請求項 5】

前記プロモーター／調節配列が、サイトメガロウイルス即時型初期プロモーター／エンハンサー、骨格筋アクチシンプロモーター、および筋肉クレアチンキナーゼプロモーター／エンハンサーよりなる群から選択される、請求項1記載の組成物。

20

【請求項 6】

前記転写停止シグナルがSV40転写停止シグナルである、請求項1記載の組成物。

【請求項 7】

請求項1記載の組成物を含むキット。

【請求項 8】

哺乳動物の血友病の治療のための薬剤の製造における、組換えアデノ関連ウイルスベクター(rAAV)からなるウイルスおよび薬剤学的に許容される担体を含む組成物の使用であつて、該rAAVが、少なくとも2つのアデノ関連ウイルス逆方向末端繰り返し配列と、第IX因子をコードし且つ5'および3'非翻訳領域を伴う核酸配列に作動可能なように連結されたプロモーター/調節配列と、第IX因子遺伝子のイントロンIの一部と、転写停止シグナルとを含有する(AAV-F.IX)、上記使用。10

【請求項 9】

前記組換えアデノ関連ウイルスベクターが、哺乳動物の少なくとも2つの部位に前記ベクターを注入することにより投与される、請求項8記載の使用。

【請求項 10】

前記組換えアデノ関連ウイルスベクターが、哺乳動物の少なくとも6つの部位に前記ベクターを注入することにより投与される、請求項8記載の使用。

【請求項 11】

前記組換えアデノ関連ウイルスベクターが、哺乳動物1匹当たり約 1×10^8 ～約 5×10^{16} 個のウイルスベクターゲノムの用量で投与される、請求項8記載の使用。20

【請求項 12】

前記第IX因子がヒト第IX因子である、請求項8記載の使用。

【請求項 13】

前記プロモーター/調節配列が、サイトメガロウイルス即時型初期プロモーター/エンハンサー、骨格筋アクチンプロモーター、および筋肉クレアチンキナーゼプロモーター/エンハンサーよりなる群から選択される、請求項8記載の使用。

【請求項 14】

前記第IX因子遺伝子のイントロンIの一部が、約0.3kb～約1.7kbの長さである、請求項8記載の使用。

【請求項 15】

前記第IX因子をコードする核酸が、成熟第IX因子の初めから5番目のアミノ酸位置にあるリジンの代わりにアラニン残基をコードする突然変異を含む、請求項8記載の使用。30

【請求項 16】

前記哺乳動物がヒトである、請求項8記載の使用。

【請求項 17】

前記投与が哺乳動物の筋肉組織への投与である、請求項9記載の使用。

【請求項 18】

前記ウイルスベクターが野生型AAVによって有意に汚染されていない、請求項1記載の組成物。

【請求項 19】

前記ウイルスベクターがAAV-F.IXの 10^9 ゲノムあたり1感染単位未満しか野生型AAVを含まない、請求項18記載の組成物。40

【請求項 20】

前記ウイルスベクターが野生型AAVによって有意に汚染されていない、請求項8記載の使用。

【請求項 21】

前記ウイルスベクターがAAV-F.IXの 10^9 ゲノムあたり1感染単位未満しか野生型AAVを含まない、請求項20記載の使用。

【発明の詳細な説明】

発明の分野50

本発明は、血流中のタンパク質の欠損が関与する疾患の治療のための遺伝子治療法である。

発明の背景

血液凝固の過程には、カスケード様式に作用して凝血塊を形成させる血液凝固タンパク質として知られている一連のタンパク質が関与する。血友病は、血液凝固因子をコードする遺伝子が、そのコードされるタンパク質がカスケード過程で正常に機能しないような突然変異を有する、ヒトおよび他の哺乳動物の疾患である。具体的には、遺伝性疾患である血友病Bは、血液凝固タンパク質である第IX因子(F.IX)をコードする遺伝子の突然変異を特徴とする。F.IXは、Highらが総説を書いている(1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis (HighとRoberts編, Marcel Dekker, Inc.)中の"Factor IX")。

アデノウイルスベクターは遺伝子治療で周知であり、該ウイルスを免疫抑制剤とともに投与した時、免疫不全マウスまたは免疫適格マウスで高レベルのイヌ第IX因子を発現するのに使用されている。免疫抑制剤の非存在下でアデノウイルスベクターを免疫適格マウスに投与すると、これらのベクターは強い炎症性および細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答を誘導(Daiら、1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1401-1405)し、これが治療の有效な作用を無効にする。さらに、複製欠陥アデノウイルスを筋肉内注入すると、トランスジーンが自己タンパク質(すなわち宿主タンパク質)をコードするなら強い宿主免疫応答が回避されるようにトランスジーンが長期発現を提供することを示唆する報告がある(Tripathyら、1996, Nature Med. 2:545-550; Yangら、1996, Hum. Mol. Genet. 5:1703-1712)。すなわち遺伝子治療の分野において、骨格筋へアデノウイルスベクターを直接注入した後の選択されたトランスジーンのin vitro発現で大きな進歩があるが、これらの免疫学的研究を考慮すると、アデノウイルスベクターの使用は遺伝子治療の最適の治療法ではないかもしれない。

レトロウイルスベクターもまた、血友病B治療のモデルとして実験的に使用されている。しかしこれらのベクターからのF.IXの発現レベルはあまりにも低く、治療的価値がないと報告されている(Kayら、1993, Science 262:117-119)。

マウスの筋肉に注入されたプラスミドDNAは、エリスロポエチン(Epo)を直接発現させることができて実証されている(Tripathyら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10876-10880)が、この遺伝子治療法は治療効果を示すためには明らかに、循環中で(Epoに比較して)比較的高レベルが必要とされるF.IXのような遺伝子産物の発現には充分に効率的ではない。

アデノ関連ウイルス(adeno-associated virus; AAV)は、筋肉への遺伝子の送達のためのアデノウイルスの代替ビヒクルである。組換えAAV(rAAV)はウイルスタンパク質をコードする配列を含有せず、宿主細胞の染色体DNAに組み込まれる能力を有する(Carter, 1992, Curr. Opin. Biotech. 3:533-539; Skulimowskiら、1995, Method Mol. Genet. 7:7-12)。野生型AAVまたはヘルパーアデノウイルスにより大きく汚染されていない純粋なrAAVの産生を促進する産生法および精製法が、現在利用できる(Skulimowskiら、1995、前述; Fisherら、1996, J. Virol. 70:520-532; Samulskiら、1989, J. Virol. 63:3822-3828)。本明細書に記載したように、哺乳動物へのアデノウイルスの投与は前記の免疫学的问题を伴う。

肝細胞や気道上皮細胞についてはヘルパーウイルスの非存在下ではrAAVによるin vivo形質導入の効率は低い(Fisher, 1996、前述)が、ニューロン(Kaplittら、1994, Nature Genet. 8:148-154)や骨格筋纖維(Xiaoら、J. Virol. 70:8098-8108)のような有糸分裂後の特定の細胞は、このベクターで有効に形質導入される。1.5年までのlacZの安定な発現が報告されている(Xiaoら、前述)。アデノウイルスベクターとは対照的に、免疫適格動物にrAAVを筋肉内注入しても、形質導入された筋肉纖維に対してCTL応答は起こらず、細胞内lacZ遺伝子産物に対する循環抗体も存在しない。

rAAVの筋肉内注入後の分泌タンパク質Epoの発現がKesslerら(1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14082-14087)で報告されている。しかし報告されたタンパク質発現のレベルは、F.IXが仲介する治療効果に必要なレベルより1桁~2桁低かった。

10

20

30

40

50

血友病の現在の治療法では、出血が起きると必ず凝固因子濃縮製剤を静脈内に注入する。この治療法は面倒で不便でかつ高価である。濃縮製剤だけで平均的患者は毎年約100,000ドル支払う。さらに濃縮製剤は間欠的に患者に投与されるだけであるため、タイミングよく投与治療しないと致命的となる生死に関わる出血の危険が残る。

治療効果が達成されるように、血友病を有する哺乳動物特に血友病を有するヒトにF.IXを投与する方法に対する長年のかつ深刻なニーズがある。本発明はこのニーズを満たすものである。

発明の概要

本発明は、少なくとも2つのアデノ関連ウイルス逆方向末端繰り返し配列（adeno-associated virus inverted terminal repeat）、プロモーター／調節配列と、第IX因子をコードし且つ5'および3'非翻訳領域を伴う単離DNAと、転写停止シグナルとを含有する組換えアデノ関連ウイルスベクターを含んでなる組成物に関する。

1つの態様において本組成物は、第IX因子遺伝子のイントロンIの一部をさらに含む。好適には第IX因子遺伝子のイントロンIの一部は、約0.3kb～約1.7kbの長さである。

別の態様において、第IX因子をコードする単離DNAは、そのコードされた第IX因子をコラーゲンIVに結合できなくなる突然変異を有する。

1つの実施形態において突然変異DNA中の突然変異は、成熟F.IXの初めから5番目のアミノ酸位置にあるリジンの代わりにアラニン残基をコードする。

さらに別の態様において本組成物は、薬剤学的に許容される担体をさらに含む。

別の態様においてプロモーター／調節配列は、サイトメガロウイルス即時型初期プロモーター／エンハンサー、骨格筋アクチンプロモーター、および筋肉クレアチンキナーゼプロモーター／エンハンサーよりなる群から選択される。さらに転写停止シグナルはSV40転写停止シグナルである。

また本発明には、少なくとも2つのアデノ関連ウイルス逆方向末端繰り返し配列と、プロモーター／調節配列と、第IX因子をコードし且つ5'および3'非翻訳領域を伴う単離DNAと、転写停止シグナルとを含有するベクター、ならびに、使用説明書を含むキットが含まれる。

本発明はまた、哺乳動物の血友病の治療法を含む。この方法は、少なくとも2つのアデノ関連ウイルス逆方向末端繰り返し配列、プロモーター／調節配列、第IX因子をコードし且つ5'非翻訳領域および3'非翻訳領域を伴う単離DNA、および転写停止シグナルを含有する組換えアデノ関連ウイルスベクターと、薬剤学的に許容される担体とを含んでなる組成物を哺乳動物の筋肉組織に投与することを含む。

1つの態様において組換えアデノ関連ウイルスベクターは、筋肉組織の少なくとも2つの部位に組成物を注入することにより投与される。

好適な実施形態において組換えアデノ関連ウイルスベクターは、筋肉組織の少なくとも6つの部位に組成物を注入することにより投与される。

別の態様において組換えアデノウイルスベクターは、哺乳動物1匹当たり約 1×10^8 ～約 5×10^{16} のウイルスベクターゲノムの用量で投与される。

好適な実施形態において哺乳動物はヒトであり、第IX因子はヒト第IX因子である。

さらに別の態様においてプロモーター／調節配列は、サイトメガロウイルス即時型初期プロモーター／エンハンサー、骨格筋アクチンプロモーター、および筋肉クレアチンキナーゼプロモーター／エンハンサーよりなる群から選択される。

別の態様において本組成物はさらに、第IX因子遺伝子のイントロンIの一部を含む。好ましくは第IX因子遺伝子のイントロンIの一部は、約0.3kb～約1.7kbである。

さらに別の態様において第IX因子をコードする単離DNAは、そのコードされた第IX因子がコラーゲンIVに結合できなくなるようにする突然変異を含む。

好適な実施形態において突然変異されたDNA中の突然変異は、成熟F.IXの初めから5番目のアミノ酸位置にあるリジンの代わりにアラニン残基をコードする。さらに好ましくは哺乳動物はヒトである。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

図1は、マウスにAAV-hF.IXを筋肉内注入した後の時間の関数としての、実験マウスの血漿中のヒトF.IX(hF.IX)の濃度の分析を示す一連のグラフである。各線は個々のマウスを示す。

図1Aは、 2×10^{11} のウイルスベクターゲノム/動物(n=4)の筋肉内(IM)注入後のC57BL/6マウスを示す。

図1Bは、 2×10^{11} のウイルスベクターゲノム/動物(n=4)の筋肉内(IM)注入後のRag1マウスを示す。マウスo-oは、注入の5週間後に外傷性瀉血後に死んだ。

図1Cは、 1×10^{10} のウイルスベクターゲノム/動物(n=4)の筋肉内(IM)注入後のRag1マウスを示す。

図2は、 2×10^{11} のAAV-hF.IXウイルスベクターゲノム/動物(n=3)の筋肉内(IM)注入後のC57BL/6マウス中の循環(血漿)抗hF.IX抗体の量の経時変化試験を示すグラフである。抗体のレベルは、標準物質としてマウスモノクローナル抗hF.IX(Boehringer Mannheim)を使用してELISAで測定した。各線は個々の動物を示す。

図3は、種々のウイルスベクターを筋肉内(IM)注入した後のC57BL/6マウスの血漿中のhF.IXに特異的な抗体の存在を示すウェスタンプロットの図である。レーン1は、AAV-lacZを筋肉内(IM)注入した動物であり、注入後18日目に採血した血清を使用した。レーン2は、組換えアデノウイルス-hF.IX(Walterら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3056-3061)を筋肉内(IM)注入した動物であり、注入後20日目に採血した血清を使用した。レーン3~10は、AAV-hF.IXを筋肉内(IM)注入した動物である。レーン3~7は、注入後11、18、32、54、および60日目に分析した同じ動物である。レーン8~10は、注入後18日目に分析した異なる動物である。

図4は、C57BL/6マウスの前脛骨筋の免疫蛍光染色(hF.IXに対する抗体を使用した。)を示す一連の図である。パネルAは注入しなかった筋肉を示す。パネルB、C、およびDは、AAV-hF.IXを注入してから3ヶ月後に染色した筋肉を示す。注入部位当たり 3.3×10^{10} のウイルスベクターゲノムをインキュベートした。倍率は200 \times である。

図5は、AAV-hF.IXを注入したC57BL/6マウスの前脛骨筋の筋肉切片の免疫蛍光染色を示す一連の図である。分析は、注入後3月目に行なった。筋肉切片を、hF.IXに特異的なFITC結合抗体とコラーゲンIVに対するローダミン結合抗体複合体を用いて同時染色した。パネルAは、筋肉纖維と間質腔(interstitial space)中のhF.IXの存在を示すFITC(緑)の蛍光を表す。パネルBは、筋肉纖維の細胞外マトリックス中のコラーゲンIVを示すローダミン(赤)の蛍光を表す。パネルCは、両方の蛍光標識の同時励起を示す。hF.IXとコラーゲンIVは筋肉組織内で同じスペースをしめることを示す、間質腔中の黄色シグナルの存在に注意されたい。倍率は400 \times である。

図6は、AAV-hF.IXを注入した筋肉から単離したDNAの分析である。

図6Aは、2つのAAV-hF.IXベクターゲノムの頭尾(head-to-tail)縦列繰り返しを示す図である。AAV逆方向末端繰り返し(ITR)配列、CMVプロモーター/エンハンサー(CMV)、コーディング配列を含有するヒトF.IX cDNA、および228塩基対(bp)の3'非翻訳領域、イントロンIの1.4kb部分、サルウイルス40ポリアデニル化シグナル(SV40)、および2つのゲノムの接合(junction)部位(J)を図に示す。イントロンIからの1.2kbのEcoRV-EcoRI断片とCMVプロモーターから得られた0.7kbのBgIII断片を、サザンプロットハイブリダイゼーションのプローブとして選択した。プライマー005(正方向プライマー)、013および017(ともに逆方向プライマー)の結合部位の相対的位置も示す。

図6Bは、AAV-hF.IX注入の6週間後のRag1マウスの筋肉から単離されたゲノムDNAのサザンプロットハイブリダイゼーションの図である。hF.IXのイントロンIからの放射性標識EcoRV-EcoRI断片をプローブとして使用した。レーン1は、pAAV-F.IXプラスミドDNAである。レーン2と3は、AAV-hF.IXを注入したマウスから単離したDNAである。レーン4と5は、非注入動物から単離したDNAである。レーン1、2および4は、EcoRVで消化したDNAである。レーン3と5は未消化DNAである。レーン2~5にレーン当たり $15 \mu\text{g}$ のゲノムDNAを加えた。DNAを1%アガロースゲルで分離した後ナイロン膜上に移した(Schleicher and Schuell)。端のサイズマーカーは、1kb DNAラダー(ladder)断片を示す。

10

20

30

40

50

図6Cは、PCRにより増幅したAAV-hF.IXの頭尾（head-to-tail）コンカテマー（concatamer）の接合部（junction）断片のサンプルプロットハイブリダイゼーションの図である。プライマー対005-013（奇数レーン）またはプライマー対005-017（偶数レーン）を使用してゲノムDNAから増幅したPCR産物を示す。レーン1と2は注入しなかった動物である。レーン3～6は、AAV-hF.IXを筋肉内（IM）注入したC57BL/6マウスである。レーン7～10はAAV-hF.IXを筋肉（IM）内注入したRag1マウスである。PCR産物は、前脛骨筋（レーン3、4、7および8）または大腿四頭筋（レーン5、6、9および10）のDNAから得られたDNAから得られた。レーン11と12は、頭尾（head-to-tail）配置で組み込まれたAAV-lacZの少なくとも2つのモノマー複数を含有する細胞株10-3.AV5から得られたDNAから得られたPCR産物である。PCR産物を2%アガロースゲルで分離後ナイロン膜にプロットした。CMVプロモーターから得られた0.7kb BgIII断片をプローブとして使用した。注入して6～8週間後にゲノム筋肉DNAを単離した。
10

図7は、AAV-cF.IX（すなわち、AAVベクター中のイヌF.IX）の略図である。

図8は、それぞれイヌB45に 8×10^{11} およびイヌB46に 1×10^{13} のAAV-cF.IXを筋肉内注入した後の時間の関数としての全血液凝固時間（WBCT）を示す一連のグラフである。血液試料が60分以内に完全に凝固しなかったなら、WBCTは65分とした。星印（*）は部分的凝固を示す。未治療の血友病BのイヌのWBCTは>60分（点線）であり、正常なイヌでは6～8分（破線）の範囲である。縦の矢印は、出血に対して正常な血漿で治療したことを示す。

図9は、イヌB45とB46から得られた血漿試料の活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）による凝固時間を示す一連のグラフである。正常のイヌ：13～18秒（破線）。未治療の血友病Bのイヌ：50～80秒（点線）。縦の矢印は出血に対して正常な血漿で治療したことを示す。
20

図10は、血友病BのイヌB45とイヌB46にそれぞれ 8×10^{11} のAAV-cF.IXまたは 1×10^{13} のAAV-cF.IXを筋肉内注入した後のイヌ第IX因子の血漿レベルを示す一連のグラフである。イヌ第IX因子濃度はELISAにより測定した。縦の矢印は出血に対して正常な血漿で治療したことを示す。第9週～12週のB46での高値は、部分的に正常な血漿による治療のためである。

図11は、イヌB45の骨格筋中のcF.IXの免疫蛍光染色を示す一連の図である。パネルA：注入しなかった筋肉。パネルB～D：第7週に 5×10^{10} のAAV-cF.IXの1つの注入部位から得られた前脛骨筋。
30

図12は、AAV-mF.IX（すなわち、AAVベクター中のマウスF.IX）の略図である。

図13は、mF.IXに特異的なマウス血漿中の抗体の検出のためのウェスタンプロットの図である。mF.IXをニトロセルロース膜に移し、種々のマウス血漿試料の存在下でインキュベートし、次に西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGとともにインキュベートし、ECLで検出した。レーン1～Ad-hF.IXの静脈内注入後にhF.IXに特異的な抗体が生じた血友病Bマウスからの、CD-1バックグラウンドに対して出血して得られた血漿。これらの抗体はマウス第IX因子と交差反応した。レーン2～10-AAV-mF.IXを筋肉内注入したマウスから得られた血漿。レーン2～4-BALB/cマウス。レーン5～7-C57BL/6マウス。レーン8～10-CD-1マウス。すべての試料は、注入の60日後にマウスから得られた。
40

発明の詳細な説明

本発明は、遺伝子送達ベクターとしてrAAVベクターを使用して哺乳動物の筋肉組織にhF.IXを送達すると、筋肉組織内で治療レベルのhF.IXが長期間発現されるという知見に基づく。発現されたタンパク質は、長期間哺乳動物の血漿中に存在し、従って血友病Bを有する哺乳動物にとって非常に大きな治療的利益がある。

本発明は、血友病Bの治療のためのF.IXの送達のみに限定されない。むしろ本発明は、他の血液凝固因子をコードするAAVベクターを包含し、これは本発明の方法を使用して、血友病の治療のために血友病を有する哺乳動物の細胞に送達される。すなわち本発明は、血友病Aの治療のために哺乳動物への第VIII因子の送達（Tuddenham, 1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis (HighとRoberts編、Marcel Dekker, Inc.) 中の "Fac
50

tor VIII") ; 第VII因子欠損の治療のための第VII因子の送達 (Petersenら、1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis (HighとRoberts編、Marcel Dekker, Inc.) 中の "Factor VII") ; 第X因子欠損の治療のための第X因子の送達 (Watzkeら、1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis (HighとRoberts編、Marcel Dekker, Inc.) 中の "Factor X") ; 第XI因子欠損の治療のための第XI因子の送達 (Fukikawaら、1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis (HighとRoberts編、Marcel Dekker, Inc.) 中の "Factor XI") ; 第XIII因子欠損の治療のための第XIII因子の送達 (Laiら、1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis (HighとRoberts編、Marcel Dekker, Inc.) 中の "Factor XIII") ; プロテインC欠損の治療のためのプロテインCの送達 (Suzukiら、1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis (HighとRoberts編、Marcel Dekker, Inc.) 中の "Protein C") を包含する。
10

哺乳動物の細胞への上記タンパク質のそれぞれの送達は、まず所望のタンパク質をコードするDNAを含むAAVベクターを作成し、次にこのベクターを哺乳動物に投与することにより行われる。すなわち本発明は、第XI因子、第VIII因子、第X因子、第VII因子、第XI因子、第XIII因子、またはプロテインCのいずれか1つをコードするDNAを含むAAVベクターを含む。本発明があれば、これらのタンパク質をコードするDNAを含むAAVベクターの作成は、当業者には明らかであろう。

さらに本発明は、血液凝固タンパク質をコードする単離されたDNAを含むrAAVベクターのみに限定するように解されるべきではない。むしろ本発明は、他のタンパク質をコードし、好ましくは哺乳動物の筋肉組織に投与されるDNAを含むrAAVベクターを含む。すなわち本発明は、哺乳動物の他の病状の治療に有用な遺伝子産物をコードするDNAを含むと解されるべきである。このようなDNAおよび関連する病状は以下のものを含むがこれらに限定されない：グリコーゲン貯蔵欠陥タイプ1Aに関連する、グルコース-6-ホスファターゼをコードするDNA；ペプク(Pepck)欠損に関連する、ホスホエノールピルベート-カルボキシキナーゼをコードするDNA；ガラクトース血症に関連する、ガラクトース-1-ホスフェトウリジルトランスフェラーゼをコードするDNA；フェニルケトン尿症に関連する、フェニルアラニンヒドロキシラーゼをコードするDNA；メーブルシロップ尿症に関連する、分岐鎖-ケト酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA；チロシン血症タイプIに関連する、スマリルアセトアセテートヒドロラーゼをコードするDNA；メチルマロン酸血症に関連する、メチルマロニル-CoAムターゼをコードするDNA；中鎖アセチルCoA欠損に関連する、中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼをコードするDNA；オルニチントランスカルバミラーゼ欠損に関連する、オルニチントランスカルバミラーゼをコードするDNA；シトルリン血症に関連する、アルギニノコハク酸シンセターゼをコードするDNA；家族性高コレステロール血症に関連する、低密度リポタンパク質受容体タンパク質をコードするDNA；クリグラー-ナジャー(Crigler-Najjar)病に関連する、UDP-グルコウロノシリトランスフェラーゼをコードするDNA；重症複合免疫不全症に関連する、アデノシンデアミナーゼをコードするDNA；通風とレッシュ-ナイハン(Lesch-Nyan)症候群に関連する、ヒポキサンチングアミニホスホリボシリトランスフェラーゼをコードするDNA；ビオチニダーゼ欠損に関連する、ビオチニダーゼをコードするDNA；ゴーシェ病に関連する、-グルコセレブロシダーゼをコードするDNA；スライ(SIy)症候群に関連する、-グルクロニダーゼをコードするDNA；ツエルヴェーガー(Zellweger)症候群に関連する、ペルオキシソーム膜タンパク質70kDaをコードするDNA；急性間欠性ポルフィリン症に関連する、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼをコードするDNA；-1アンチトリプシン欠損(肺気腫)の治療のための₁アンチトリプシンをコードするDNA；サラセミアまたは腎不全による貧血の治療のためのエリスロポエチンをコードするDNA；および、糖尿病の治療のためのインスリンをコードするDNA。このようなDNAおよび関連疾患は、Kayら(1994, T.I.G. 10:253-257)とParker P onder(1996, Gene Transfer in Cardiovascular Biology:Experimental Approaches and Therapeutic Implications"(Keith March編)中の"Gene Therapy for Blood Protein Deficiencies")の総説がある。
40

明瞭にするためにかつ最良の実施形態の要件を満たすために、以後の説明は哺乳動物の筋
50

肉組織に送達する好適なタンパク質として第IX因子を例示する。

本発明はまた、本発明のrAAVベクターをコードするhF.IXを哺乳動物の筋肉組織の複数の部位に注入すると、哺乳動物でhF.IXの高レベルの長期の発現が起き、哺乳動物に対して治療上の利益を提供するという知見に基づく。

本発明はさらに、hF.IXは哺乳動物の筋肉組織中の間質腔のコラーゲンIVに結合するという追加の知見に基づく。本発明のrAAVベクターを介して哺乳動物の筋肉組織に突然変異型のhF.IX(この突然変異型はコラーゲンIVに結合しない)を送達することも、血友病を有する哺乳動物に対して治療上の利益を提供する。

本発明は、血友病の治療に使用するためのF.IXまたはその生物活性のある断片をコードするDNAを含むrAAVベクターを含む。

本発明はまた、血友病Bを有する哺乳動物好ましくはヒトの治療法を含む。この方法は、本発明のrAAVベクターを哺乳動物の筋肉組織に投与することを含む。

本発明のrAAVベクターは、いくつかの基本的なDNA要素を含む。これらのDNA要素は、少なくとも2コピーのAAV IT配列、プロモーター/エンハンサー要素、転写停止シグナル、F.IXまたはその生物活性を有する断片をコードするDNAをフランкиングするいずれの必要な5'または3'非翻訳領域、を含む。本発明のrAAVベクターはまたイントロンIの一部を含む。また、本発明のrAAVベクターは隨時、コラーゲンへの突然変異F.IXの結合が実質的に低下しているかまたは完全に排除されるように、突然変異を含有するF.IXをコードするDNAを含む。これらの要素を詳細に説明する。

ベクターは、多くの異なるタイプの細胞において異種遺伝子の高レベル発現を駆動させることができる無差別プロモーターを含むプロモーター/調節配列を含む。このようなプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)即時型初期プロモーター/エンハンサー配列、ラウス肉腫ウイルスプロモーター/エンハンサー配列などを含むがこれらに限定されない。本発明のrAAVベクター中のプロモーター/調節配列は、好ましくはCMV即時型初期プロモーター/エンハンサーである。しかし異種遺伝子の発現を駆動させるのに使用されるプロモーター配列は、誘導性プロモーター(例えばステロイド誘導性プロモーターがあるがこれらに限定されない)、組織特異的プロモーター(例えば、筋肉組織特異的な骨格筋-アクチンプロモーター、および筋肉クレアチニーゼプロモーター/エンハンサーなどがあるが、これらに限定されない)などでもよい。

本明細書において用語「プロモーター/調節配列」は、プロモーター/調節配列に作動可能なように結合された遺伝子の発現に必要なDNA配列を意味する。ある場合には、この配列はコアプロモーター配列でもよく、他の場合はこの配列はまた、エンハンサー配列および誘導性/抑制性にまたは組織特異的に遺伝子の発現に必要な他の調節要素を含んでもよい。

本明細書において2つのDNAが「作動可能なように結合」しているという説明は、1本鎖または2本鎖DNAが2つのDNAのそれぞれからなり、このDNA配列の少なくとも1つがもう一方の配列により特徴付けられる生理学的作用を示すことができるよう、DNA内で2つのDNAが配置されていることを意味する。

本発明のrAAVベクターはまた転写停止シグナルを含む。転写停止シグナルは本発明のベクター中に含まれてよいが、好ましくは転写停止シグナルはSV40転写停止シグナルである。このベクターはまたイントロンIの一部を含む。hF.IXの配列についてイントロンIは、PvuII部位(ヌクレオチド番号1098)までのイントロンの5'末端と、ヌクレオチド番号5882のPvuII部位で始まりエキソン2との接合部まで伸びるイントロンの3'末端とを含むDNAの断片である(Yoshitakeら、1985, Biochemistry 24:3736-3750; Kurachiら、1995, J. Biol. Chem. 270:5276-5281; Jallatら、1990, EMBO J. 9:3295-3301)。

F.IXをコードするプラスミドまたはウイルスベクター中にイントロン要素を含めることはF.IXの発現を、イントロン要素の非存在下でのプラスミドまたはウイルス要素でのF.IXの発現と比較して、2~10倍増強させる(Kurachiら、1995、前述)。AAVベクターは典型的には、一般に約4kb~約4.8kbである規定のサイズ範囲を有するDNAの挿入体を受け入れ、F.IX遺伝子のコーディング領域は約1.5kbを含む。すなわち、AAVベクターについて許容さ

10

20

30

40

50

れるDNAの必要な長さを達成するために挿入体断片中に追加のDNAを含むことが必要である。F.IXイントロンI断片はこの要件を満たし、AAVベクターゲノムのバックグラウンドに位置するF.IXの発現を増強する。すなわち、本発明は本発明のrAAVベクター中にイントロンI配列を含めることに限定されず、イントロンIの一部の代わりに他のイントロンまたは他のDNA断片配列を包含すると解されるべきである。

本明細書で使用される用語「イントロンの一部」とは、約0.3kb～約1.7kbの長さのヌクレオチドを有するイントロンIの領域を意味し、この領域はイントロンIの一部の非存在下でのF.IXの発現と比較すると、プラスミドまたはウイルスベクター鋳型上でF.IXの発現を少なくとも約1.5倍上昇させることを意味する。好ましくは本発明において有用なイントロンIの一部は、約1.4kbの長さである。
10

本発明のrAAVベクターはまた、hF.IX DNA配列をフランкиングするDNAの5'および3'非翻訳領域を含む。実験例のセクションに例示するrAAV-hF.IXベクターにおいて、hF.IX配列をフランキングする5'非翻訳領域は以下の通りである：F.IX配列の5'末端で、配列GGTA CCを有するKpnI部位まで3'末端でCMVプロモーターエンハンサー配列が続く。この領域のすぐ下流に、配列AGATCTCCACC [配列番号1] を有する短いポリリンカー配列が続き、これ自身はすぐ下流に、アミノ酸番号-46で始まるhF.IX配列（このコドンはYoshitakeら（1985、前述）の番号付けに従うATGである）が続く。

実験の詳細のセクションで例示されるrAAV-hF.IXベクターにおいて、hF.IX配列をフランキングする3'非翻訳領域は以下の通りである：翻訳停止シグナルの末端で、SV40ポリアシグナル配列にスプライシングされるhF.IXの3'非翻訳領域の最初の228ヌクレオチドが存在する。
20

特にhF.IX以外のタンパク質をコードするDNAが本発明のrAAVベクターで使用される時、DNAの他の5'および3'非翻訳領域がhF.IXの場合に記載したものの代わりに使用される。

本発明の好適なrAAVベクターはまた、F.IXまたは生物活性のあるF.IX断片をコードする単離されたDNAを含む。F.IXをコードするDNAは好ましくはhF.IXであるが、本発明は既知または未知のすべての哺乳動物F.IX配列を含むと解されるべきである。F.IX配列の例は以下の論文に記載されている：Yoshitakeら、1985、前述；Kurachiら、1995、前述；Jallatら、1990、前述；Kurachiら、1982、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6461-6464；Jayeら、1983、Nucl. Acids Res. 11:2325-2335；Ansonら、1984、EMBO J. 3:1053-1060；Wuら、1990、Gene 86:275-278；Evansら、1989、Blood 74:207-212；Pendurthiら、1992、Thromb. Res. 65:177-186；Sakarら、1990、Genomics 1990, 6:133-143；およびKatayamaら、1979、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4990-4994。すなわち本発明は、F.IXは本明細書に記載のhF.IXと実質的に同様に機能する、ヒト以外の哺乳動物からのF.IX遺伝子も含むと解されるべきである。好ましくはF.IXをコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列は、本明細書に記載されその配列はYoshitakeら（1985、前述）が提供しているhF.IXをコードする遺伝子と、約50%相同であり、より好ましくは約70%相同であり、さらに好ましくは約80%相同であり、最も好ましくは約90%相同である。
30

用語「コードするDNA」は、所望のタンパク質をコードするDNA配列と実際のコーディング配列に伴う5'または3'非翻訳領域を含む。

さらに本発明は、本発明の遺伝子治療法において、コードされる変異体または突然変異体を完全長hF.IXとして治療上有効にするか、または完全長hF.IXよりさらに治療上有効にする、野生型hF.IX DNA配列の天然に存在する変異体または組換え法で得られた突然変異体を含む。
40

例えば本明細書に記載の実験から明らかのように、コラーゲンIVは、rAAVベクターを介して哺乳動物の筋肉組織に導入されるhF.IXを捕捉するのに役立つ。従ってこのように導入されたhF.IXの一部は、コラーゲンIVにより筋肉組織中の間質腔中に保持されるため、血液凝固に参加するためには利用不能である。コードされるタンパク質がコラーゲンIVに結合しないように、hF.IX DNAの配列に突然変異を導入することは可能である。そのような突然変異体は本発明の遺伝子治療法において、筋肉組織の間質腔中に捕捉されない型のhF.IXをコードする点で、血友病の治療に有用である。好ましくは成熟タンパク質の最初か
50

ら5番目のアミノ酸位置にあるリジンの代わりにアミノ酸アラニンを含むhF.IXタンパク質をコードする突然変異体hF.IX遺伝子は、コラーゲンIVに対するhF.IXの結合を低下または排除するために、本発明のrAAVベクターで有用である。

本発明はまた、hF.IX生物活性を保持するhF.IXの変異体をコードするDNAを含む。そのような変異体（すなわち、hF.IXのタンパク質またはポリペプチドの類似体）は、タンパク質またはポリペプチドが、本明細書に記載の方法での使用の適合性を向上させる追加の性質を有するように、組換えDNA技術を使用して修飾されているかまたは修飾されてよいタンパク質またはポリペプチド（例えば、血漿中のタンパク質に安定性の向上とタンパク質の比活性の向上を与える変異体があるが、これらに限定されない）を含む。類似体は、保存的アミノ酸配列の差異もしくは配列に影響を与えない修飾、またはその両方により、天然に存在するタンパク質またはペプチドとは異なってもよい。例えば、タンパク質またはペプチドの1次配列を変化させるが通常はその機能を変化させない保存的アミノ酸の変化を作成してもよい。保存的アミノ酸置換は、典型的には以下の群内の置換を含む：

グリシン、アラニン；
バリン、イソロイシン、ロイシン；
アスパラギン酸、グルタミン酸；
アスパラギン、グルタミン；
セリン、スレオニン；
リジン、アルギニン；
フェニルアラニン、チロシン。

好ましくはhF.IX類似体のアミノ酸配列は、Yoshitakeら（1985、前述）が記載したhF.IXのアミノ酸配列と、約70%相同であり、より好ましくは約80%相同であり、さらに好ましくは約90%相同であり、さらに好ましくは約95%、最も好ましくは約99%相同である。

本明細書で使用される「相同」とは、2つのポリマー分子の間、例えば2つの核酸分子（例えば、2つのDNA分子または2つのRNA分子）の間、または2つのポリペプチド分子の間の、サブユニット配列の類似性を意味する。2つの分子の両方のサブユニット位置が同じモノマーサブユニットで占められる時（例えば、もし2つのDNA分子のそれぞれの位置がアデニンで占められるなら）、これらはその位置で相同である。2つの配列の間の相同性は、一致するかまたは相同意位置の数の直接の関数であり、例えば2つの化合物の配列中の位置の半分（例えば、10サブユニットの長さのポリマー中の5つの位置）が相同であるなら、2つの配列は50%相同であり、位置の90%（例えば、10のうち9）が一致しているかまたは相同であるなら、2つの配列は90%の相同性を有する。例えば、DNA配列3' AT TGCC5' と3' TATGCC5' は50%相同である。

F.IXの突然変異体または変異体型の作成のために、任意の数の方法が使用される。例えばからコラーゲンIVに結合しないhF.IXの突然変異体型の作成は、任意の分子生物学のマニュアル、例えばSambrookら（1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY）に記載の通常の組換えDNA技術を使用して、プラスミド鑄型上のF.IX遺伝子に欠失、置換または挿入突然変異を導入することにより行われる。こうして作成した突然変異体F.IXを発現させ、得られるタンパク質を、例えばCheungら（1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11068-11073）が記載したようなコラーゲンIV結合アッセイを用いて、コラーゲンIVへの結合能力を評価する。次にコラーゲンIVに結合しない突然変異タンパク質を、本明細書で定義したようにF.IX生物活性について試験する。コラーゲンIVに結合しないがF.IX生物活性を保持する突然変異F.IXタンパク質をコードするDNAは、本発明のrAAVベクターでの使用に適している。

ポリペプチドをコードするDNA配列を変化させてタンパク質またはポリペプチド中にアミノ酸の変化を導入する方法は、当該分野で周知であり、Sambrookら（1989、前述）にも記載されている。

本明細書において「単離核酸」とは、天然に存在する状態でフランкиングする配列から分離された核酸配列、セグメント、または断片 [例えば通常その断片に隣接する配列（例えば、天然のゲノム中の断片に隣接する配列）から除去されているDNA断片] を意味する。

10

20

30

40

50

この用語はまた、核酸を自然に伴う他の成分（例えば、細胞中に自然に伴うRNAまたはDNAまたはタンパク質）から実質的に精製された核酸にも当てはまる。この用語は従って、例えばベクター中に；自律的に複製するプラスミドまたはウイルス中に；または原核生物または真核生物のゲノムDNA中に取り込まれているか；または他の配列から独立して別の分子として（例えば、PCRまたは制限酵素消化により產生されるcDNAまたはゲノムもしくはcDNA断片として）存在する、組換えDNAを含む。これはまた、追加のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含む。

本明細書において「生物活性のあるF.IX」とは、血液凝固測定法で血液の凝固を仲介することができるF.IXタンパク質を意味する。血液凝固測定法は当該分野で周知であり、例えばWalterら（1996、前述）およびHathawayとGoodnight（1993, Disorders of Hemostasis and Thrombosis: A Clinical Guide, pp.21-29のLaboratory Measurement of Hemostasis and Thrombosis）に記載されている。10

本明細書においてF.IXについて「治療効果」とは、出血後の哺乳動物の血液の凝固を意味する。

本発明は、実験例で例示される特定のrAAVベクターに限定されず、本発明は任意の適当なAAVベクター（例えば、AAV-1、AAV-3、AAV-4、およびAAV-6などに基づくベクターを含むが、これらに限定されない）を含む。

また本発明には、血液凝固測定法で血液の凝固を仲介する治療効果を提供するのに有効な量で、血友病を有する哺乳動物を治療する方法も含まれる。この方法は、哺乳動物にF.IXを含むrAAVベクターを投与することを含む。好ましくは哺乳動物はヒトであり、rAAVベクターは、アミノ酸番号5（成熟タンパク質の最初から付けた番号）はリジンの代わりにアラニンであるような突然変異を隨時含むhF.IXを含む。20

本発明によれば、血友病を有する哺乳動物の治療にはいくつかの方法があることが知見された。本発明の1つの方法において、F.IXを含むrAAVベクターの調製物が、投与当たり1つの部位で動物の筋肉組織に注入され、別の方法では、rAAVの調製物が動物の筋肉組織に同時にまたは数時間かけて複数の筋肉組織部位に注入される。後者の場合、方法がウイルスベクターゲノムを同時に複数注入を含む時、筋肉組織の異なる領域がrAAVベクターを同時に受けるように複数の送達注入装置が使用される。

典型的には、1回の注入で投与されるウイルスベクターゲノム数／哺乳動物は約 1×10^8 ～約 5×10^{16} の範囲である。好ましくは1回の注入で投与されるウイルスベクターゲノム数／哺乳動物は約 1×10^{10} ～約 1×10^{15} の範囲であり、より好ましくは1回の注入で投与されるウイルスベクターゲノム数／哺乳動物は約 5×10^{11} ～約 5×10^{15} の範囲であり、最も好ましくは1回の注入で投与されるウイルスベクターゲノム数／哺乳動物は約 5×10^{13} ～約 5×10^{14} の範囲である。30

本発明の方法が、複数の部位への同時注入または数時間（例えば、約1時間未満から約2または3時間まで）にわたって異なる筋肉部位への注入を含むいくつかの複数の部位への注入を含む時、投与されるウイルスベクターゲノムの総数は、単一部位注入法で記載のものと同じである。

単一部位への注入で本発明のrAAVベクターを投与するには、ウイルスの懸濁液が直接筋肉内に注入される。40

複数の部位への注入のためには、針が哺乳動物の筋肉組織に挿入される。実質的に連続的に針のトラックに沿って、1回の注入で一連の筋肉内部位が注入されるようにベクターは注入され、従って各部位は前の部位よりさらに筋肉組織内の位置にある。各注入は、針のトラックに沿って約5～約30部位を標的とし、患者は全部で約50回の注入を受ける。従つてこの方法は、麻酔下で行うことが好ましい鍼療法に似ている。

rAAVの複数の部位への注入はまた、結核感染の検出に通常使用されるような複数注入装置を使用して行われる。

哺乳動物への投与のために、F.IXを含むrAAVベクターは薬剤学的に許容される担体（例えば、pH約7.8のヘペス緩衝化食塩水）に懸濁される。他の有用な薬剤学的に許容される担体には、グリセロール、水、食塩水、エタノール、および他の薬剤学的に許容される塩（50

例えばリン酸塩、および有機酸の塩)があるが、これらに限定されない。これらのおよび他の薬剤学的に許容される担体の例は、Remington's Pharmaceutical Science (1991, Mack Publication Co., New Jersey) に記載されている。

本発明のrAAVベクターはまた、例えば乾燥した塩調製物中のベクターの凍結乾燥調製物、ベクター/塩組成物の懸濁のための無菌水、およびベクターの懸濁とその哺乳動物への投与のための説明書とを含むキットの形で提供されてもよい。

以下の実験例を参照して本発明をさらに詳細に説明する。これらの例は例示目的で提供されるのみであり、特に明示しない場合は決して本発明を限定するものではない。すなわち本発明は、決して以下の実施例に限定されるものではなく、本明細書の教示の結果として明らかになるすべての変形も包含するものと解されるべきである。

実施例1：組換えアデノ関連ウイルスの筋肉内注入後のヒト血液凝固第IX因子の安定な遺伝子導入と発現

本実施例に記載の実験は以下のように要約される。ヒトF.IXを発現する組換えAAV(rAAV)ベクターの筋肉内注入が治療的レベルのヒトF.IXの発現を指令できるかどうかを調べるために、以下の実験を行なった。hF.IXを発現する高力価($10^{12} \sim 10^{13}$ ゲノム/ml)のrAAVを調製し、精製し、C57BL/6マウスとRag1マウスの後ろ足の筋肉内に注入した。免疫適格C57B/6マウスで、注入の3ヶ月後に採取した筋肉の免疫蛍光染色はhF.IXタンパク質の存在を証明し、筋肉DNAのPCR解析はAAV DNAについて陽性であったが、マウス血漿中にhF.IXは検出されなかった。さらにこれらのマウスがhF.IXに対する循環抗体を産生することが観察された。リコンビナーゼ活性化遺伝子の突然変異を有し從って機能的B細胞とT細胞が欠如したRag1での追跡実験で、筋肉のDNA解析により同様の結果が見られたが、これらのマウスは血漿内に治療的レベル(200~350ng/ml)のhF.IXも証明した。hF.IX発現の経時変化は、数週間にわたってレベルが徐々に上昇した後プラトー(最初の注入後約6ヶ月安定である)に達することを証明している。他の実験では、筋肉纖維間の間質腔でhF.IXとコラーゲンIVの同時局在が観察された。コラーゲンIVはhF.IX結合タンパク質として同定された。すなわちこの知見は、hF.IXの免疫蛍光染色の異常パターンを説明している。これらの実験は、筋肉内注入後の治療的レベルのhF.IXの安定な発現を指令するのにrAAVを使用することができ、これは血友病Bを有する患者の治療のための実用的な方策であることを示している。

この実施例で提示した実験で使用した材料と方法と以下に記載する。

rAAVの產生と精製

Fisherら(1996、前述)が記載したように、F.IXシスプラスミド(pAAV-FIX)とトランス作用性プラスミドpAAV/Ad(Skulimowskiら、1995、前述)を、E1欠失アデノウイルスを感染させたヒト胚腎(293)細胞中に同時トランスフェクションさせて、組換えAAVを作成した。pAAV-FIXはpsub201(Skulimowskiら、1995、前述)から得られ、CMVプロモーター/エンハンサー、イントロンIの1.4kb断片を含むヒトF.IXコード配列(Kurachiら、1995、前述)、およびSV40ポリアデニル化シグナルを、AAV ITR配列にフランкиングされて含有する。AAV repとcap遺伝子機能は、pAAV/Adによりトランスで供給された。E1欠失アデノウイルスは、ヘルパーウイルスによるrAAVストックの混入の可能性の同定を促進するために、lacZまたはアルカリ性ホスファターゼレポーター遺伝子を含有する。トランスフェクションの48時間後超音波処理して細胞を溶解し、放出されたウイルス粒子を、Fisherら(1996、前述)が記載したようにCsCl密度勾配遠心分離を4回行って精製した。

AAV-hF.IX粒子の密度は、 $1.37 \sim 1.40$ g/mlであった。精製したAAV-hF.IXの力値を、CMVプロモーターまたはイントロンI配列に特異的なプローブを使用してスロットプロットハイブリダイゼーションにより測定した。対照は、既知濃度のpAAV-hF.IXプラスミドDNAの標準物質を含む。in vitroで細胞を形質導入するAAV-hF.IXの能力を、増殖しているHeLa細胞を形質導入し、感染後36時間目の培養上清中のhF.IXの濃度をhF.IXに特異的なELISA(Walterら、1996、前述)で測定して確認した。AAV-hF.IX($10^{12} \sim 10^{13}$ ゲノム/ml)を、5%グリセロールを含有するヘペス緩衝食塩水(pH7.8)中で-79°で保存した。

Fisherら(1996、前述)が記載したように293細胞の形質導入後にアルカリ性ホスファターゼ活性を測定して確認した。

10

20

30

40

50

ーゼまたは - ガラクトシダーゼについて染色して解析すると、精製したAAV-hF.IXにはいつも、検出可能な混入アデノウイルスはなかった。野生型AAVは、AAV-hF.IXの 10^9 ゲノム当たり < 1 感染単位で検出された。

野生型AAVの測定は以下のように行なった：チャンバースライド上で増殖させた293細胞をアデノウイルスと精製AAV-hF.IXのアリコートとで同時感染させた。感染後24時間目に免疫蛍光染色のために細胞を固定した。AAVキャプシドタンパク質に対するマウスモノクローナル抗体 (American Research Products, Belmont, MA) を1次抗体とし、1 : 40希釈の抗マウスIgG (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) を2次抗体とした。

動物実験

rAAVの筋肉内注入用に選択したマウス株は、C57BL/6 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA)、ならびにB6、129およびRag1 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) であった。雌のマウス (4 ~ 6 週齢) を、ケタミン (70mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) を腹腔内注入して麻酔し、後肢を縦に1cm切開した。AAV-hF.IX (ヘペス緩衝化食塩水 (pH7.8) 中 2×10^{11} または 1×10^{10} ウィルスベクターゲノム / 動物) を、ハミルトン (Hamilton) シリンジを使用して各脚の前脛骨筋 (25 μl) と四頭筋 (50 μl) に注入した。4-0 Vicryl縫合で切開部分を閉じた。7日間隔で眼窩後神経叢 (retro-orbital plexus) から血液試料をミクロヘマトクリット毛管に集め、血漿をELISAによりhF.IXについて測定した。免疫蛍光染色とDNA解析のために、選択した時点での動物を屠殺し、注入した筋肉組織と注入していない筋肉組織を切り出した。組織をO.C.T. 包埋化合物 (Miles Corporation, Elkart, Indiana) 中に入れ、液体窒素で冷却したイソペンタンで7秒間スナップ凍結し、直ちに液体窒素に移した。

hF.IXの測定

マウス血漿中のヒトF.IX抗原を、Walterら (1996、前述) が記載したようにELISAにより評価した。このELISAはマウスF.IXとは交差反応しなかった。すべての試料は二重測定で評価した。注入したマウスの筋肉から得られたタンパク質抽出物を、ロイペプチド (0.5mg/ml) を含有するPBS中で筋肉を碎いて次に超音波処理して調製した。細胞破片を微量遠心分離により除去し、タンパク質抽出物の1 : 10希釈物をELISAでhF.IXについて測定した。AAV-lacZ注入筋肉から得られた抽出物を陰性対照として使用した。タンパク質濃度をBIORADプロテインアッセイ (Bio-Rad, Hercules, CA) で測定した。

組織切片の免疫蛍光染色

筋肉組織の凍結切片 (6 μg) を、PBS (pH7.4) 中の3%パラホルムアルデヒド中で15分固定し、PBSで5分リーンスし、メタノールで10分インキュベートし、PBSで3回洗浄し、次にPBS / 3%BSAで1時間ブロックした。

組織切片を、PBS / 1%BSAで1 : 1000希釈した親和性精製したヤギ抗ヒトF.IX抗体 (Affinity Biologicals, Hamilton, Ontario, Canada) の存在下で一晩インキュベートした。PBS / 1%BSAで10分間の洗浄を3回行なった後、2次抗体を90分間適用した。この抗体の調製物は、PBS / 1%BSAで1 : 200希釈したFITC - 結合ウサギ抗ヤギIgG (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) を含有した。PBS / 1%BSAでさらに3回洗浄後、切片を蒸留水でリーンスし、空気乾燥し、Fluoromount Gマウントメディウム (Fisher Scientific) でマウントした。すべてのインキュベーション工程は室温で行なったが、1次抗体とのインキュベーションは4度で行なった。ウサギ抗ヒトコラーゲンIVを1次抗体 (Chemicon, Temecula, CA) として1 : 500希釈で、そしてFITC - 結合抗ウサギIgGを2次抗体として、切片を染色した時に同じプロトコールを使用した。

同時局在化試験のために、FITCに結合したヤギ抗hF.IX抗体 (Affinity Biologicals) を、抗コラーゲンIV抗体と一緒に適用した。ローダミン結合抗ウサギIgG (Chemicon) を使用して、コラーゲンIV抗体複合体を検出した。Nikon FXA顕微鏡を使用して蛍光顕微鏡観察を行なった。

循環抗hF.IX抗体についての試験

AAV-hF.IXを筋肉内注入したC57BL/6マウスの血漿試料を、ELISAを使用してhF.IXに対する抗体の存在について試験した。マイクロタイタープレートをhF.IX (0.1M NaHCO₃中 1 μg/

10

20

30

40

50

ml、pH9.2)でコーティングした。希釈した血漿試料(1:16)を二重測定で適用し、hF.IXに反応性である抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼ-結合抗マウスIgG(Zymed, San Francisco, CA)を1:2000希釈で使用して検出した。緩衝液条件は既に記載されている通りである(Walterら、1996、前述)。抗hF.IX抗体のレベルは、最終濃度1μg/mlに希釈したマウス抗hF.IXモノクローナル抗体(Boehringer Mannheim)の吸光度値の比較により推定した。

抗hF.IX抗体の存在はまた、ウェスタンプロット解析により評価した。これらはDaiら(1995、前述)が記載したように行なったが、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG抗体(Boehringer-Mannheim)を2次抗体として使用し、増強化学発光(ECL)試薬(Amersham, MA)とのhF.IX抗体複合体の検出を促進した。マウス血漿の試料は1:500希釈した。
10

DNA解析

Sambrookら(1989、前述)に記載のように、注入した筋肉組織からゲノムDNAを単離した。rAAV縦列繰り返し配列の頭尾接合部(head-to-tail junction)を增幅するためにPCR反応を行なった。正方向プライマー-005(5'-ATAAGCTGCAATAAACAGT-3' [配列番号2])はSV40ポリアデニル化シグナル(塩基対8014~8033位)にアニーリングし、逆方向プライマー-013(5'-CATGGTAATAGCGATGACTA-3' [配列番号3])と017(5'-GCTCTGCTTATATAGACC TC-3' [配列番号4])は、CMVプロモーター(塩基対4625~4606位と4828~4809位)にアニーリングする。1.5mM MgCl₂と0.5μMのプライマー-005/013または005/017を含む総反応量100μl中で100ngのゲノムDNAを使用して、PCR反応を行なった。初期の変性工程(94で4分)後、以下のプロフィール：すなわち94で1分変性、52で1分アニーリング、および72で90秒伸長(最終サイクルの間は10分)を35サイクル行なった。PCR産物を、T/Aクローニングキット(Invitrogen, San Diego, CA)を使用してDNA配列解析のためにクローン化した。CMVプロモーター(PCR断片とのハイブリダイゼーション用)またはAAV-hF.IX中に存在するようなhF.IXのイントロンI(マウスのゲノムDNAとのハイブリダイゼーション用)に特異的な³²P-dCTPランダムプライム標識プローブを使用して、サザンプロットハイブリダイゼーションを行なった。
20

この実施例に示した実験の結果を説明する。

免疫適格マウスでのhF.IXの発現

*in vivo*実験のために選択した組換えAAVベクターは、CMV極早期遺伝子プロモーター/エンハンサーとSV40転写停止シグナルの制御下でヒトF.IX cDNA(イントロンIの一部を含有する)を含有する。この発現カセットはAAV-ITR配列でフランкиングされ、AAVタンパク質コード配列を完全に欠如する。
30

免疫適格C57BL/6マウスにAAV-hF.IXを筋肉内注入した後、hF.IXは、注入した動物の血漿中に一時的に検出されたかまたは全く検出されなかった(図1A)。同じ血漿試料をhF.IXに特異的な抗体について試験した時、すべての注入動物で注入後11日目に開始して強い抗体応答が観察された(図2と3)。実験の期間中、高レベルの循環抗体が持続した。

注入後1ヶ月目に屠殺した動物の注入した筋肉(前脛骨筋と四頭筋)からのタンパク質抽出物は、1.8~2.1ngのhF.IX/mg組織(40~50ng hF.IX/mgタンパク質)の存在を示した。この知見(すなわち、タンパク質抽出物についてELISAで証明された筋肉組織中のhF.IXの存在)は、組織切片についての免疫蛍光試験により確認された。図4のパネルB~Dは、注入後3ヶ月目のC57BL/6マウスの筋肉纖維中のヒトF.IXの発現を示す。hF.IXは筋肉纖維自体に存在するのみでなく、それが蓄積すると思われる纖維の間の間質腔にも存在することに注意されたい。
40

筋肉組織中のhF.IXの上記間質染色パターンは、ヒトコラーゲンIVに特異的なポリクローナル抗体を使用して同じ組織で見られたものと同じであった(図5、パネルB)。hF.IXとコラーゲンIVの抗体染色の同時局在は、2つの異なる蛍光標識物を使用する同時染色実験で確認された(図5、パネルC)。コラーゲンIVは*in vitro*でhF.IXに結合することが報告されている(Cheungら、1996、前述)。第IX因子は注入していない筋肉では検出されず(図4、パネルA)、AAV-lacZを注入した筋肉でも検出されなかった。
50

上記の組織切片でもヘマトキシリン - エオシン染色で解析した切片でも、組換えアデノウイルスを注入した骨格筋について記載したような、炎症または広範な組織傷害は観察されなかった。

免疫不全マウスにおけるhF.IXの発現

C57BL/6マウスについて上述した方法を使用して、Rag1の筋肉組織にAAV-hF.IXを送達した。これらのマウスは、リコンビナーゼ活性化遺伝子1の突然変異についてホモ接合性である。従ってRag1マウスは、機能的に重症複合免疫不全症(SCID)マウスと同等であり、成熟B細胞やT細胞を產生しない。

Rag1マウス1匹当たり 2×10^{11} ウイルスベクターゲノムの用量により、マウス血漿中でhF.IXの安定な発現が得られた(図1B)。注入の2週目までELISAによりヒトF.IXが検出され、以後徐々に上昇した。200~350ng hF.IX/mlマウス血漿の用量で注入後5~7週目に、血漿レベルはプラトーに達した。このレベルは実験の期間(これは注入後4ヶ月まで延長された)中維持された。全部で 1×10^{10} ウイルスベクターゲノムを注入すると、hF.IXの発現は 2×10^{11} のゲノムを注入後に観察されたものより3~4倍低かった。しかしそれでも低い用量を使用しても、ある動物では治療レベル(>100ng/ml)が達成された(図1C)。これらの結果は、より低い用量のAAV-hF.IXを動物に投与して治療効果を達成することが可能である、という事実を確立している。さらにこの結果は、ウイルスのある閾値用量で、あらゆる所与の注入部位がウイルスで飽和され、閾値レベルより上の量のウイルスを注入しても、血漿中の循環hF.IXの量は比例して増加することはないことを示唆する。従って血漿中の循環hF.IXの量を増加させるためには、異なる筋肉の部位に少量のウイルスを複数回投与することが好ましい。

骨格筋中に導入されたDNAの解析

注入した筋肉組織から得られたゲノムDNAを、注入の6~8週間後に単離した。組織中に導入したベクターDNAの存在は、DNAをEcoRVで消化(これは、完全な1.4kbイントロンI配列を含有するベクター構築物から1.8kbの断片を放出する)して証明した。イントロンIに特異的なプローブはこの断片にハイブリダイズした(図6B、レーン2、3)が、注入しなかったマウスから得られたマウスDNAとは交差ハイブリダイズしなかった(レーン4、5)。消化しなかったDNA(図6B、レーン3)は、高分子量DNA中でハイブリダイゼーションシグナルを示した。さらに形質導入した細胞(図4A)中に存在する組換えAAVの頭尾コンカテマーの接合部配列を增幅するために設計したPCRプライマーは、AAV-hF.IX形質導入組織(免疫不全および免疫適格動物の前脛骨筋と四頭筋)から単離した筋肉DNA中のこれらの配列をうまく增幅した。

CMVプロモーター/エンハンサー配列に特異的なプローブを使用するサザンプロットハイブリダイゼーションにより、このPCR産物を視覚化した(図6C、レーン3~10)。プライマー対005-013は1.0kb以下の断片を增幅し、プライマー対005-017は1.2kb以下の断片を増幅した。予測したようにこれらのPCR反応は、前記サイズの明確なバンドを产生しなかつたが、最大のサイズを有する一連の増幅産物を产生した。この結果は、これらの縦列繰り返し配列中に存在するAAVゲノムの不正確な結合により予測できた(McLaughlinら、1988, J. Virol. 62:1963-1973)。この不正確な結合は、クローン化したPCR産物のDNA配列決定から確認されるように、ジャンクション部位でのITR配列の種々の欠失のために生じる。

本明細書に示したデータは、血友病Bを有する患者の遺伝子治療プロトコールの開発についていくつかの意味を有する。まず本明細書に記載の実験で得られたhF.IXの発現レベルは、ヒトで治療効果を達成するのに充分であり、產生され得るrAAVの量によってのみ限定される。第2にこれらのデータから、単一部位への注入より複数の筋肉内部位への注入が好ましいことは明らかである。筋肉組織は豊富にあるため、これは、AAVベクターを使用して血友病の患者を治療するための障害とはならない。

本明細書に記載のhF.IXの発現の経時変化は、hF.IXを発現するアデノウイルスベクターを使用した時観察されるものとは非常に異なる。後者の場合、ほとんど瞬的に治療法レベルのhF.IXが達成される(Walterら、1996、前述; Kayら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U

10

20

30

40

50

SA 91:2353-2357)。しかしこのアプローチの免疫学的結果は好ましくない。AAV-hF.IXの場合、数週間にわたって血漿hF.IXレベルが徐々に上昇することは、患者が筋肉内AAVベクター治療近辺の極初期にはhF.IX濃縮物の使用を続けることが好ましいことを示す。これは治療の障害にはならない。外から投与したhF.IXのt_{1/2}は約12時間であり、このため血漿hF.IXレベルは、トランスジーンの発現の結果として上昇する前にベースラインに戻る。さらにクロススピーシズの境界(cross-species boundary)を超えないなら、筋肉組織中のrAAV導入したトランスジーンの発現は長期間続く(Kesslerら、1996、前述)。これらのすべての理由のために、血友病Bを有する患者にhF.IXを発現するrAAVベクターを投与することは、この疾患の治療の実現可能な方策である。

また、上記以外にhF.IXがコラーゲンIVと同時局在するという観察結果は、血友病Bを有する患者の治療にとって重要な意味を有する。この知見は、F.IXで見られる染色パターンに関するのみでなく、循環中への筋肉細胞合成F.IXの輸送効率が低いという従来報告されている知見を説明しているようであるために興味深い。間質腔中のコラーゲンIVがhF.IXの高親和性結合部位になるなら、この領域は実際に筋肉内で合成されたhF.IXの「シンク」として機能するかも知れない。しかしこラーゲンIVによる間質腔中のhF.IXの捕捉は明らかに、Rag1マウスでの実験が証明するように、遺伝子治療に対して超えられない障害ではない。さらに前記したように、hF.IXをコラーゲンIVに結合できなくなる突然変異を含むhF.IXをコードするAAV-hF.IXベクターを作成することは可能であり、こうしてこの潜在的な欠点を克服することができる。

実施例2：血友病Bを有するイヌでの試験

10

20

本実施例に示す実験は以下のように要約される。

これはモデル研究に基づくと、タンパク質を不安定にすると思われるF.IX遺伝子の触媒ドメイン中の点突然変異を有するイヌは、重症の血友病Bを有する(Evansら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10095-10099)。3匹のそのようなイヌに、イヌF.IX(cF.IX)遺伝子を有するAAV-cF.IXを筋肉内注入した。イヌB45に 8×10^{11} のAAV-cF.IXを投与すると、F.IXの血漿レベルがちょうど検出の閾値になった(約1~3ngイヌF.IX/ml血漿)。ベクター投与後種々の時点で、全血凝固時間(WBCT)は一時的に短くなった。注入の16週後に開始して、WBCTの持続性の部分的な補正が観察され、非常に低レベルの血漿cF.IXが少なくとも6ヶ月続くことが観察された。生検した筋肉から得られた切片の免疫蛍光染色を行うと、形質導入した筋肉纖維中のcF.IXの発現が観察された。ウェスタンプロット解析、ELISA、または凝固インヒビタースクリーニングを行っても、cF.IXに特異的な抗体の産生の証拠は得られなかった。イヌB46に 1×10^{13} のAAV-cF.IXを筋肉内注入すると、cF.IXの血漿レベルが約17ng cF.IX/mlとなり、これは注入後9週目に観察された。WBCTの部分的修正はまず注入後2週目に観察され、以後安定であった。正常な血漿による治療がない場合の最も短いWBCT(16分)は8週目に測定された。凝固時間の改善はaPTTアッセイによって確認され、注入後7週目に低下は明らかであった。ここでも、cF.IXに特異的な抗体の産生の証拠はなかった。止血パラメータの改善にもかかわらず、今日までに達成されたcF.IXのレベルは正常な場合の<1%であり、これらの治療されたイヌが出血を経験したこととは驚くべきことではない。増加した用量のF.IXをイヌに投与すると治療的效果が達成されるであろう。実際最近イヌB48に 7×10^{13} のAAV-cF.IXを筋肉内注入したが、まだプラトーレベルに達していない。このイヌは、cF.IXに対して非阻害性抗体を産生した。この抗体はまず注入の14日後に検出され、注入の42日後に消失した。抗体の消失と一致して、WBCTは15~20分の範囲まで短くなり、これは以後45日間維持された(すなわち、合計90日間の観察)。すべてのイヌは現在試験中である。

30

40

A. AAVベクター中のイヌF.IXの筋肉内投与

本実施例に示す実験で使用した材料と方法を説明する。

ウイルスベクター

図7に略図で示すようにAAV-cF.IXを作成した。このベクターは、以下の発現カセットをフランкиングするAAV逆方向末端繰り返し配列(ITR)を含有する:サイトメガロウイルス極早期エンハンサー/プロモーター(P[CMV])、CMVスプライスドナー/-グロビンス

50

プライスクレオチド2565位のEcoRI部位までのcF.IX cDNA、およびヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル(hGH)。

cF.IXの機能的完全性

ビタミンK(6 μg/ml培地)の存在下での293細胞の一過性トランスフェクションを使用して、cF.IX構築物が機能性cF.IXの発現と分泌を指令することを証明した。cF.IXの存在は、トランスフェクション後96時間目の培地で評価し、調整培地の添加後のF.IX欠損ヒト血漿のaPTT凝固時間の短縮によっても確認された。AAV-cF.IXの異なる調製物を、293細胞により、E1欠失アデノウイルスの存在下または非存在下で種々の感染多度で同数のベクターと比較した。産生されたcF.IXの量は、試験した異なる調製物について同様であった。アデノウイルスの非存在下で感染多度 4×10^3 でAAV-cF.IXで形質導入した293細胞は、1.2 μgのcF.IX / ml培地 / 24時間を産生した。1ウェルあたり 9×10^9 のAAV-cF.IXで形質導入した24ウェルプレート中の分化させたマウスC2C12筋管は、感染後8～15日目に測定した時、30～80ng cF.IX / ml培地 / 24時間を産生した。
10

血友病Bのイヌ

イヌの第IX因子遺伝子の触媒性ドメインの点突然変異についてヘミ接合性である雄とホモ接合性である雌からなる重症の血友病Bを有するイヌのコロニーが、University of North Carolina (Chapel Hill) で20年以上維持されている (Evansら1989、Blood 74:207-212)。これらのイヌの止血パラメータは充分記載されており、血漿F.IX抗原の欠如、全血凝固時間が>60分(正常なイヌは6～8分)、および50～80秒の活性化部分トロンボプラスチン時間の延長(正常なイヌは13～18秒)を含む。これらのイヌは、再発する自発性の出血を経験している。典型的には大きな出血は、10ml/kgの正常イヌ血漿の単回静脈内注入によりうまく管理されているが、たまに出血を制御するために繰り返し注入が必要なこともある。
20

筋肉内注入

全身麻酔下で雄の血友病Bのイヌ(B45とB46)と雌の血友病のイヌB48(すべて同腹子)に、AAV-cF.IXを経皮注射した。この操作の間、動物には正常イヌ血漿を投与しなかった。

表1

	イヌB45	イヌB46	イヌB48
出産日	04-21-97	04-21-97	04-21-97
投与日	06-20-97	08-18-97	12-5-97
投与時の体重	5.68 kg	9.1 kg	20 kg
総AAV-cF.IX注入量	約 8×10^{11}	約 1×10^{13}	約 7×10^{13}
注入部位の数	18(外側広筋5部位、前脛骨筋4部位、各後肢) 一部の注入では、後の注入部位の視覚化と生検のため に炭素粒子を含有した	8部位(外側広筋60部位 2部位、前脛骨筋 2部位、各後肢) 一部の注入では、 後の注入部位の視 覚化のために炭素 粒子を含有した	60部位 2部位、前脛骨筋 2部位、各後肢) 一部の注入では、 後の注入部位の視 覚化のために炭素 粒子を含有した
注入部位当たりのベクター濃度(およその量)	250 μl中 5×10^{10}	375 μl中 1.3×10^{12}	300 μl中 1.2×10^{12}

血液試料の分析

全血凝固時間(WBCT)は、血漿中のcF.IXについてELISAのように評価した。ELISAの感度は3ng/mlまでである。cF.IXに特異的な抗体はELISAとウェスタンプロットにより測定し
50

た。活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) を測定した。凝固インヒビタースクリーニングも行なった。治療した血友病のイヌと正常なイヌから得られた血漿を等量混合し、37 で 2 時間インキュベートした。aPTT凝固時間が対照より 3 秒以上長い場合、インヒビターのスクリーニングは陽性とした（正常イヌ血漿はイミダゾール緩衝液とインキュベートし、治療前の血友病イヌ血漿は正常イヌ血漿とインキュベートした）。AAVベクターに対する中和抗体力値を評価した。

免疫蛍光染色

イヌB45から得られた生検した筋肉を、冷凍バイアル中のOptimal Cutting Temperature T M (OCT) (Tissue-Tek (登録商標)) OCT4583 Compound (Sakura Finetek, Torrance CA) 中に入れ、液体窒素で冷却した2-メチルブタン中で 7 ~ 10秒間急速凍結し、次に直ちに液体窒素に移し、以後-80 で保存した。凍結筋肉の凍結切片を、1 次抗体として 1 : 100 希釈のウサギ抗cF.IX (Affinity Biologicals) と 2 次抗体として 1 : 30 希釈のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合ブタ抗ウサギ IgG (Dako Corp.) を使用して、本明細書に記載のように染色した。凍結切片はまた、ヘマトキシリントエオシン (H & E) 染色のための使用した。

ベクター放出 (shedding)

スワブを採取し、試料を組織培養培地に再懸濁した。スワブ試料は、涙、鼻、直腸、唾液、および尿である。血清試料も採取した。Centricon-100バイアルを使用して試料を最終容量200 μl に濃縮し、Qiamp血液キット (Qiagen) を使用してDNAを抽出した。DNAを200 μl のTEで溶出し、10 μl を、最終容量50 μl 中のAmpliTaq PCRキット (Perkin Elmer) を使用してPCR増幅のために使用した。PCRプライマーは以下の通りである：上流プライマー、cF.IXのcDNA中の配列に基づく 5' -ATA GCA GCT ACA ATC CAG CTA CCA TTC TGC-3' [配列番号 5]、および下流プライマー、-グロビンスプライスアクセプターの配列から得られる 5' -TGG TAT CCC GTA GTA CAG GAA CAA ACC ACC-3' [配列番号 6]。これらのプライマーにより増幅したPCR産物は698塩基対であった。95 で 2 分間変性後、95 / 60 / 72 でそれぞれ30秒 / 30秒 / 1分を40サイクル行い、次に72 で 7 分インキュベートした。PCR産物を、臭化工チジウムの存在下でアガロースゲル電気泳動により視覚化した。

本明細書に示す実験の結果を以下に説明する。

イヌB45に 8×10^{11} のAAV-cF.IXを筋肉内 (IM) 注入すると、止血パラメータに一貫性のない影響を与えた。全血凝固時間 (WBCT) は変動しており、断続的に約20分 ~ >60分の範囲で変動した (図 8)。活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) は、3 週目の 1 つの値 (これは48秒であった) を除いて50秒より大きかった (図 9)。ELISAで評価したcF.IXのレベルは、ベクター注入の 3 週目から開始して検出閾値 (1 ~ 3 ng/ml) であった (図10)。投与の 7 週後に注入部位の筋肉生検を行い、特異的免疫蛍光染色によりcF.IXの筋肉内産生を確認した (図11)。生検前の出血は、46日と47日に正常のイヌ血漿で治療することによりうまく管理された。注入の16週後に開始して、WBCTの持続性部分的補正が観察された。

高用量のAAV-cF.IX (1×10^{13}) の筋肉内投与後に、イヌB46は止血パラメータの大幅な改善を示し、これはELISAによるcF.IXの血漿レベルの持続的増加と相關した。WBCTは、ベクター投与の 2 週後に開始して絶えず20分より低く、ベクター注入の12週後に16分の最下点に達した (図 8)。活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) は 7 週目までに43秒まで低下し、次に上昇した (図 9)。ELISAで評価した血漿cF.IX抗原濃度は、注入後最初の 9 週間にかけて増加し、約17ng/mlのレベルに達した (図10)。第10週の間、このイヌは右の肩甲骨領域で出血し、これは正常イヌ血漿を繰り返し注入することにより解消した。出血後の 3 週間のより高いcF.IX値は血漿注入による可能性がある (図10)。

イヌ B 48には最も高い筋肉内用量のAAV-cF.IX (7×10^{13}) を投与した。このイヌはベクター投与後注入部位から出血し、4 日目に正常イヌ血漿を投与した。注入後 4 週目 (血漿注入により影響されない時点) に入手できたデータは、低下したWBCT (21.5分) とイヌ第IX因子レベル (15ng/ml) を示した。このイヌはまだ試験中であり、まだプラトーレベルに達していない。本明細書に記載のように、このイヌはcF.IXに対する非阻害性抗体を一

10

20

30

40

50

時的に合成した。

イヌB45とB46は、治療前にAAVキャプシドに特異的な測定可能な中和抗体は示さなかった。各イヌで、ベクター投与後の7日目に高力価の抗AAV中和抗体($10^3 \sim 10^4$)が生じ、試験期間中持続した(B45とB46についてそれぞれ17週と8週)。

イヌB45ではcF.IXに特異的な抗体を検出するための分析(ウェスタンプロットティング、ELISA測定法、および凝固インヒビタスクリーニングを含む)は、第7、13、17および20週で陰性であった。高用量イヌB46は、ELISAで測定した時9週目までcF.IXに特異的な抗体は検出されなかった。

PCRにより検出したウイルス放出は、イヌB45から得られた1日目の血清、直腸、および唾液試料と、イヌB46の1日目の血清で陽性であった。得られた他のすべて試料は、治療前と注入後の>1日は陰性であった。

表2. 筋肉内注入を受けたイヌから得られた結果

	イヌB45	イヌB46
出血歴	46日と47日に筋肉生検後の出血を正常血漿で治療した。出血に対して血漿範囲(plasm a coverage)のウインドウが与えられる間、筋肉生検が得られた。	67、68、72、79、および80日に肩の出血を正常血漿で治療した。
WBCT(図8)	第2週に測定開始後15~20分までに部分的凝固、しかし完全な凝固は観察されなかつた。以後のWBCTは一定せず、8時点で部分的修正(18.5~28.5分)および他の8時点で不完全な凝固形成。一部は筋肉生検と出血(46日と47日目)後に正常血漿で治療のため、8回のうち2回(8週と9週目)でWBCT短縮	最初の週は>60分、2週目以降は一貫して短い。正常血漿による治療無しで最も短い時間は、8週目の16分であった。
aPTT*(図9)	第3週に48秒。他の値はすべて50秒を超えた。	7週目にまず部分的修正(43秒)が観察された。
ELISAによるイヌ第IX因子抗原レベル(図10)	第3週に検出可能。以後の抗原レベルは1~4ng/mlであった。	第1週から開始して低レベルで検出可能であり、9週目の17ng/ml血漿まで増加した。
抗体スクリーニング	ウェスタンプロット、ELISAおよび凝固インヒビタスクリーニングにより30週目まで試験した。イヌ第IX因子に対する抗体の証拠はなかった。	26週目までELISAにより検出されなかつた。
AAVキャプシドに対する中和抗体	治療前は検出されなかつた。注入後第1週に $10^3 \sim 10^4$ の力価が検出され、少なくとも17週間続いた。	治療前は検出されなかつた。第1週に高力価(10^4)が検出され、少なくとも8週間続いた。
免疫蛍光染色(図11)	7週目の生検の前脛骨筋繊維中にイヌの第IX因子産生が見	未測定。

10

20

30

40

られる†。筋肉試料のタンパク質溶解物をELISAで試験し、最高で1.8ngのイヌ第IX因子/mg組織と、最高で25μgのイヌ第IX因子/mgタンパク質が現れた。

ウイルス放出

AAV-cF.IX配列は第1日に血清中（強いシグナル）に第1日の直腸と唾液中（弱いシグナル）に検出された。治療前試料と4日目ならびに1、2、3、および5週目の試料ではシグナルは得られなかった。

正常イヌ血漿で治療後は出血は解消した。

* 正常なイヌ：13.5～17秒。未治療血友病イヌ：50～80秒。

† AAVベクターと同時に注入した炭素粒子は、連続切片のH & E染色スライドで見られた。

本実施例に示したデータは、血友病Bを有するイヌが、AAV-cF.IXの筋肉内単回投与後に持続性血漿レベルのcF.IXを合成できることを証明している。長期(>4ヶ月)の全身のcF.IXレベルは、止血パラメータの中程度の改善に関連していた。しかし治療したイヌは自発性の出血を経験し、これらのレベルが治療量以下であることを示している。イヌB46でプラトーレベルまでの延長した経時変化とこれらのイヌにおける用量応答の示唆は、イヌとマウスモデルの間の類似性を証明している。形質導入したイヌの筋肉により分泌されるF.IXは、WBCTとaPTTの短縮に基づき、生物活性がある。要約すると、血友病Bを有するこれらのイヌでのAAV-cF.IXの筋肉内投与は充分許容される。

B. AAVベクター中のcF.IXの門脈投与

この実施例に示した実験で使用した材料と方法を以下に記載する。

ウイルスベクター

通常の分子生物学的技術を使用してAAV-EF1-cF.IXを作成した。このベクターは、ヒト伸長因子1遺伝子(EF1)の2.5kb断片を含有し、これはエンハンサー、プロモーター、第1のエキソンおよび第1のイントロン、ならびにエキソン2の非コード領域の一部を含む。EF1プロモーターを含有するベクターは門脈投与後にトランスジーン発現の上昇を示すため、EF1プロモーターを選択した。EF1のこの領域は、cF.IX cDNAとヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル(hGH)の上流(1731ntのEcoRI部位まで)に位置する。全発現カセットは、AAV逆方向末端繰り返し配列(ITR)によりフランкиングされる。このベクターの機能的完全性は、293細胞中で產生されるF.IXのELISA解析により証明された。

門脈投与

全身麻酔下で血友病イヌB44の腹部を無菌手術により開き、門脈に 3×10^{12} のAAV-EF1-cF.IXの単回注入を行なった。正常イヌ血漿の静脈内投与により、このイヌを手術周辺時期の出血から保護した。イヌに鎮静剤を与え、挿管して全身麻酔を誘導し、腹部の毛を剃り、準備した。開腹後脾臓を手術フィールドに移した。脾臓静脈をさがし、静脈の小さい末端の切り目の近くでゆるく縫合した。静脈に迅速に誘導針を挿入し、次に縫合をゆるめ、門脈分岐の近くの静脈内位置に5Fカニューレを通した。止血の確保後、カテーテルバルーンをふくらませ、PBS中で希釀した約5.0mlのベクターを5分間隔で門脈中に注入した。ベクター注入後、食塩水5.0mlを注入した。バルーンをしほませ、カニューレを取り出し、静脈止血を確保した。次に脾臓を戻し、出血血管を焼灼して手術の傷を閉じた。手術に充分耐えた動物から抜管した。

10

20

30

40

50

筋肉内注入について本明細書に記載したように血液試料を分析した。

本明細書に示した実験の結果を以下に説明する。

循環F.IXの証拠はELISAによって検出されず、動物に注入後4ヶ月まで止血パラメータに及ぼす作用は明らかではなかった。

動物にベクターを投与後に急性または慢性の毒性の臨床的症状は明らかではなく、このベクターの血管内注入が充分許容され、おそらく非毒性であることを示している。インヒビターは検出されなかった。

実施例3：AAV-mF.IXの筋肉内注入後のマウス中のインヒビターの欠如

哺乳動物にAAV-hF.IXを筋肉内投与すると、その哺乳動物中でF.IXに対するインヒビターが出現するリスクが伴う。F.IX合成の通常の部位は肝臓である。異所性発現に基づくアプローチについて当然懸念されることは、生合成により、タンパク質が非機能的または免疫原性（例えば翻訳後プロセシングの変化によって）になるような変化がタンパク質中に生じるかどうかである。この可能性を試験するために、3つの株の免疫適格マウスの筋肉にAAV-マウスF.IX(mF.IX)を投与し、自己のトランスジーン産物に対する抗体が生成するかどうかを調べてマウスを評価した。マウスで抗mF.IX抗体（すなわち、インヒビター）が出現しなかったことを証明するために、2つの方法を使用した。AAV-mF.IXに対する抗体の存在は、ウェスタンプロットtingにより評価した。この方法では抗AAV-mF.IX抗体は検出されなかった。マウスでインヒビターが合成されるかどうかを評価するために凝固インヒビタースクリーニングを使用し、この試験でも、これらの動物でインヒビターが合成されないことが確認された。マウス筋肉中でmF.IXが合成されるとタンパク質が産生され、これは自己タンパク質として免疫系により観察された。すなわちこのアプローチの使用（すなわち、AAVベクターを使用する筋肉組織へのF.IXの送達）は、血友病の治療の臨床的に有効な方法である。10

この実施例に示した実験で使用される材料と方法を以下に説明する。

ウイルスベクター

AAV-mF.IX(図12)は、以下の発現カセットをフランкиングする2つのAAV逆方向末端繰り返し配列(ITS)を含有した：サイトメガロウイルス極早期エンハンサー/プロモーター(P[CMV])、CMVスプライスドナー/-グロビンスプライスアクセプター(glob)、2.7kbのマウス第IX因子cDNA、およびヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル(hGH)。mF.IX cDNA(Wuら、1990, Gene 86:275-278)は、PCRにより導入された多くのエラーを含有した。野生型配列を回復するために部位特異的突然変異誘発を使用し、これはDNA配列決定により確認された。このベクターによりコードされるmF.IXの機能的完全性は、293細胞株84-31を形質導入し、aPTT測定法でビタミンK含有調整培地を評価して試験した。形質導入した細胞から得られた上清をmF.IX欠失血漿に添加すると、凝固時間が短縮した。対照細胞から得られた上清を使用した時は、これは起きなかった。20

動物操作方法

免疫適格な5月齢の老齢な雌のCD-1マウス、5月齢の雌のC57BL/6マウス(Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA)および5週齢の雄の老齢なBALB/cマウス(The Jackson Laboratories)(各株についてn=3)をこの試験で使用した。マウスの後肢両方の前脛骨筋と四頭筋に、本明細書に記載の総用量 1×10^{11} のAAV-mF.IXを注入した。同腹子に同じ方法で 2×10^{11} のAAV-mF.IXを注入した。眼窩後出血を使用して、既に記載されている(Walterら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3056-3061)ように血漿試料を集めた。30

血漿試料のウェスタンプロット解析によるマウス抗体の検出

SDS-PAGEゲルで100ngのhF.IX(Mononine**血漿由来第IX因子、Armour)またはmF.IX(安定にトランスフェクションした293細胞から得られた組織培養培地から精製した)を分離し、次にタンパク質をHybond-ECL膜(Amersham)に移して、ウェスタンプロットを行なった。BLOTT0(5%無脂肪乾燥ミルク、10mMトリス-塩酸、pH 8.0、2 mM CaCl₂、0.05%ツイーン-20)を使用してブロッキングを2時間行なった。BLOTT0で1:200希釈した血漿試料を、膜とともに1時間インキュベートした。BLOTT0で1:1000希釈した西洋ワサビ40

50

20

30

40

50

ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス IgG (Boehringer Mannheim) を 2 次抗体とした。抗第 IX 因子を ECL 検出とフィルム現像 (Amersham) により視覚化した。このウェスタンプロットの陽性対照血漿は、ヒト第 IX 因子の遺伝子を含有するアデノウイルスベクター (Kungら、1998, Blood 91:784-790) の静脈内注入後、mF.IX と hF.IX の両方に対して抗体を産生した血友病 B マウスから得られた。

aPTT 測定法

尾静脈から出血中にクエン酸緩衝液中にマウス血漿を集めた。aPTT 測定の凝固時間測定は、50 μl の aPTT 試薬 (Organon Teknica, Durham, NC) を 50 μl のマウス血漿と混合することにより行なった。混合物を 37 ℃ で 3 分インキュベートし、50 μl の 25 mM CaCl₂ を加えた。凝固時間はフィブロメーター (BBL FibroSystem) を使用して測定した。

10

凝固インヒビタースクリーニング

ベクターを注入したマウスから得られた血漿を等量の正常プールマウス血漿と混合し、37 ℃ で 2 時間インキュベートした。アリコートを取り、aPTT 試薬と混合した。aPTT 凝固時間が対照より 3 秒以上長い場合、インヒビターのスクリーニングは陽性とした（正常イヌ血漿はイミダゾール緩衝液とインキュベートした）。

本実施例に示した実験の結果を以下に説明する。

AAV-mF.IX を注入したマウスは、注入後 18 日目と 60 日目にウェスタンプロッティング法により測定した時、いずれも mF.IX に特異的な抗体を産生しなかった（図 13、レーン 2 ~ 10）。ベクターを注入したすべてのマウスの血漿試料の aPTT による凝固時間は、注入後 60 日目に測定した時正常範囲（約 25 秒）内であった。注入マウスについてのインヒビター測定でもインヒビターの欠如が証明された。AAV-hF.IX を注入した対照マウスはすべて、注入後最初の 2 週以内に hF.IX に特異的な抗体を産生し、これらの動物の免疫適格性を証明していた。

20

これらのデータは、AAV-F.IX を注入されたマウスは F.IX に対するインヒビターを合成しなかったことを確認している。

実施例 4：骨格筋により産生されるヒト第 IX 因子の生化学的解析

F.IX 合成の自然の部位は肝細胞内である。本明細書に記載の実験アプローチは、F.IX 産生の部位として骨格筋の筋管を標的としている。ヒト F.IX は、細胞を AAV-CMV-hF.IX でトランسفエクションした後に組織培養で維持したヒト筋管の調整培地から精製される。今日までに行われた予備試験は、これらの細胞中では N-末端で筋管合成 F.IX が正しくプロセシングされており、N-カルボキシル化されていることを示している。さらに調整培地はヒト F.IX 欠損血漿に加えられる時 aPTT を修正する。

30

実施例 5：ヒトへの AAV-hF.IX 投与の臨床的プロトコールの要約

凝固因子濃縮物で治療した患者の臨床的研究は、循環凝固因子のレベルの小さな上昇が疾患の罹患率と死亡率のほとんどを防止するのに充分であることを証明した。最も包括的なデータは、スエーデンの予防研究 (Lofqvist ら、1997, J. Int. Med. 241:395-400) 中に含まれ、ここでは 1958 年以来スエーデンの多くの血友病患者は、出血に応答してではなく定期的に凝固因子を注入する処方で維持されている。遺伝子治療の目標は、正常の 1 % より大きい F.IX の一貫したレベルを維持することである。重症の血友病（特に血友病 B）を有する患者の治療法として本明細書に記載の遺伝子治療は、患者の血流中で一定且つ治療的レベルの F.IX を維持するという充分証明された利点を提供している。

40

フェーズ I 臨床試験では、最初の治験を、インヒビターの出現の履歴がなくその寿命が疾患のために縮められる重症の患者（すなわち、F.IX の循環レベルが正常の 1 % 未満である）に限定するように提唱されている。

試験中、筋肉内投与される AAV-F.IX の患者間の用量の増加の安全性が追跡される。局所的および全身的なベクターの送達に関連する毒性が評価される。本明細書に記載のプロトコールに従って、トランスジーン産物の生物学的および生理的活性を測定することにより各用量群の薬効が追跡される。注入部位での F.IX 遺伝子およびタンパク質発現の存在を検出するために、分析が行われる。

初期の試験では、少なくとも 12 名の患者が含まれる。これらの患者は、3 名ずつの群に割

50

り当てられ、各群の各患者は同じ用量のAAV-hF.IXを投与される。第1群の患者は、ラットでの毒性を決定するための試験結果に基づき総量が投与される。ラット毒性試験は、フェーズI臨床治験の開始前に、認可された動物毒性試験プロトコールに従って行われる(21 C.F.R. § 58中のFood and Drug Administration Good Laboratory Practices)。患者の出発用量は、ラットへの投与で許容できない毒性を生じる最低用量より、キログラムベースで少なくとも10倍低い。ラットに投与した最も高い用量で毒性が観察されないなら、ヒト患者の出発用量は、この最も高い用量より少なくとも10倍低い。第1群の患者で用量限定性の毒性および遺伝子発現の証拠が観察されず、かつ最後の患者の治療後少なくとも8週が経過した後、第2群の患者が第1群の患者の用量より1対数高い用量で治療される。用量限定性の毒性または発現が観察されないなら、用量限定性の毒性の不在下で発現が観察されるまでこのスケジュールが繰り返される。次に許容されない毒性の不在下で生物学的および生理的效果の証拠があるまで、半対数ずつの増分で用量が増加される。

ベクター投与前の2時間以内に患者に、患者のF.IXレベルを100%に上げると計算される用量の高度に精製した凝固F.IX濃縮物を注入する。筋肉内注入は、病院のプロトコールに従って意識的な鎮静の形で麻酔下で行われる。各注入部位に0.5mlの容量が投与される。ベクター濃度と注入部位の数は、用量に関連して変化する。低用量群では約6部位に注入され、最も高い用量群では約20部位に注入される。患者は2~3日間入院する。イヌでの研究は、注入後24時間を超えてもベクターの放出がないことを示す。しかし入院の間標準的逆隔離法が行われる。

追跡治療において患者は、ベクター注入後の約12時間目に正常の50%のレベルを達成するためにF.IX濃縮物を投与され、臨床的評価に依存して以後3~7日間24時間毎に投与される。

本明細書で引用した各々のおよびすべての特許、特許出願ならびに刊行物の開示内容は、その全体を参照することにより本明細書の一部とする。

本発明を具体的な実施形態について開示したが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、本発明の他の実施形態や変更形態が当業者には明らかであろう。添付の請求の範囲は、そのような実施形態や同等の変更形態のすべてを含むものと解するべきである。

配列番号：1

配列の長さ：11

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列

AGATCTCCAC C

11

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列

ATAAGCTGCA ATAAACAAAGT

20

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列

50

CATGGTAATA GCGATGACTA

20

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列

GCTCTGCTTA TATAGACCTC

20 10

配列番号：5

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列

ATAGCAGCTA CAATCCAGCT ACCATTCTGC

30

配列番号：6

配列の長さ：30

20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列

TGGTATCCCC TAGTACAGGA ACAAAACCACC

30

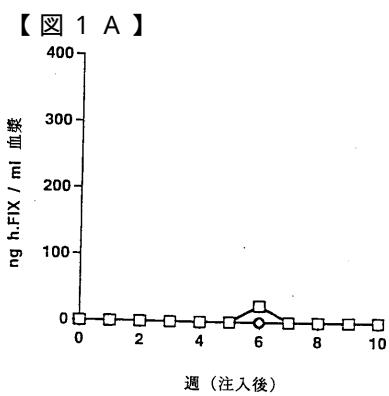


FIGURE 1A

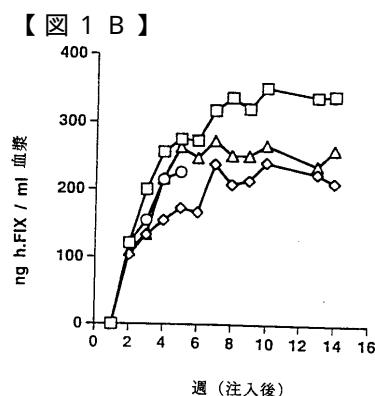


FIGURE 1B

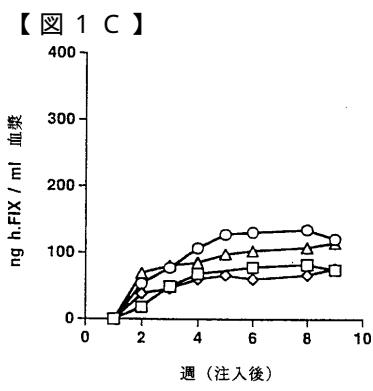


FIGURE 1C

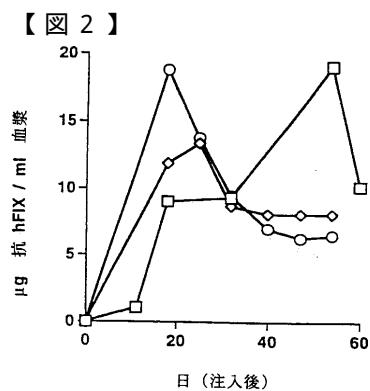
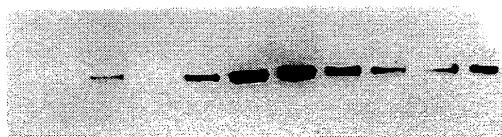


FIGURE 2

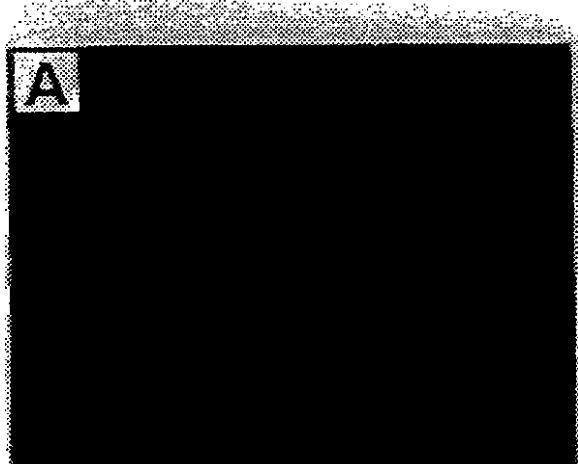
【図 3】

FIG. 3

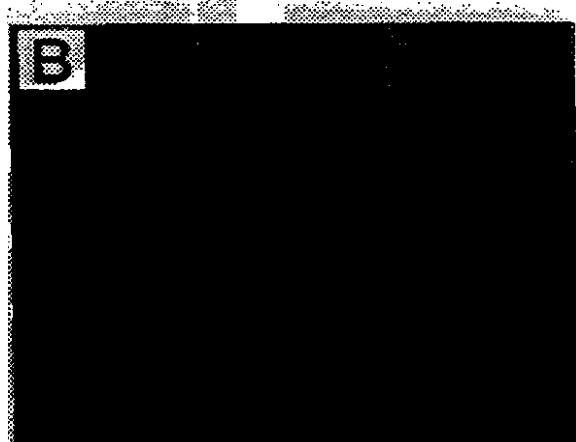
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



【図4A】
FIG.4A



【図4B】
FIG.4B



【図4C】



FIG.4C

【図4D】



FIG.4D

【図 5 A】



【図 5 B】



【図 6 A】

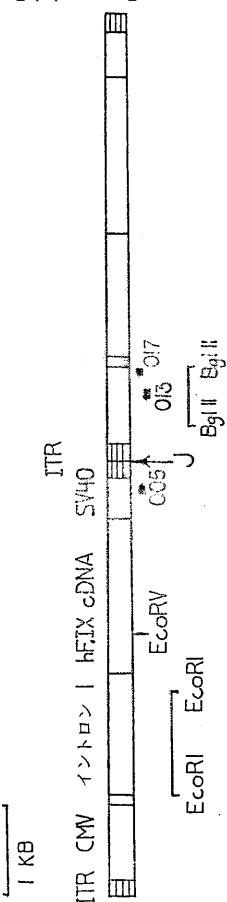


FIGURE 6A

【図 5 C】

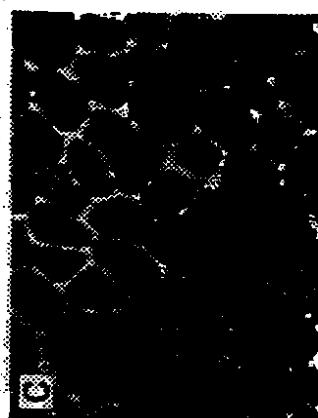
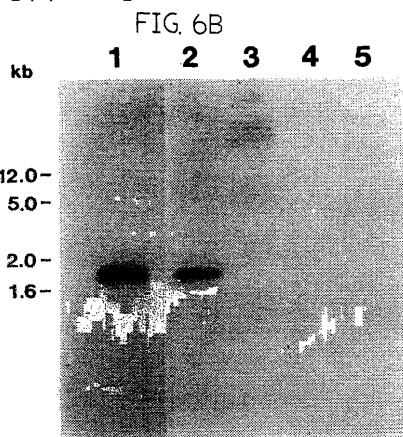
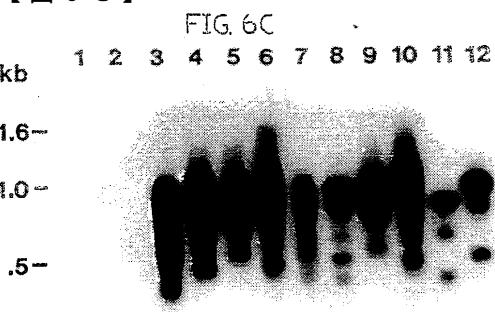


FIG.5C

【図 6 B】



【図 6 C】



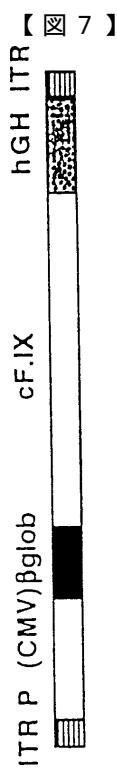
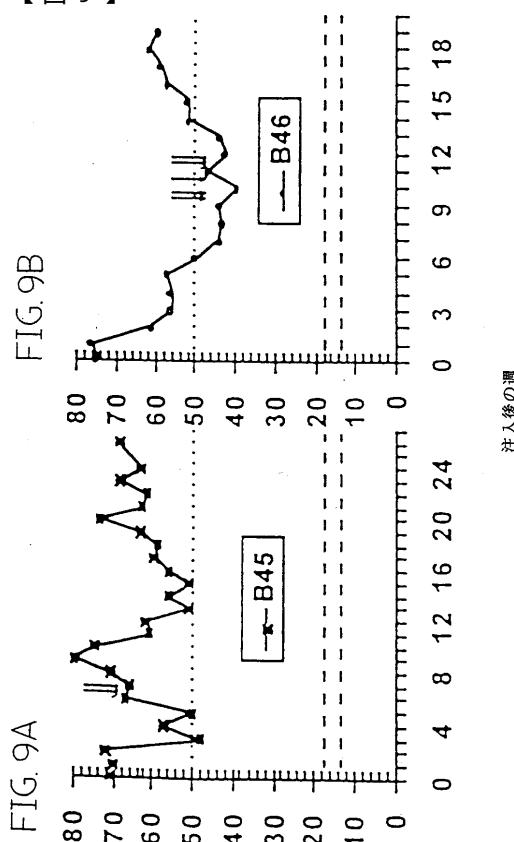
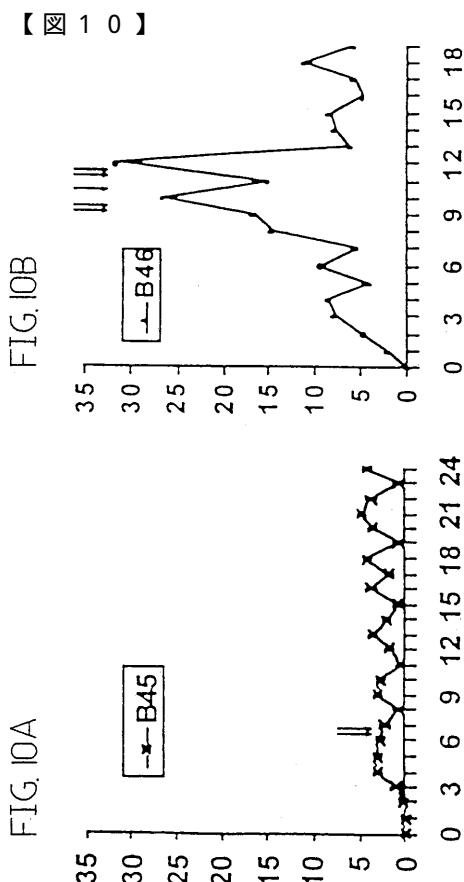


FIGURE 7

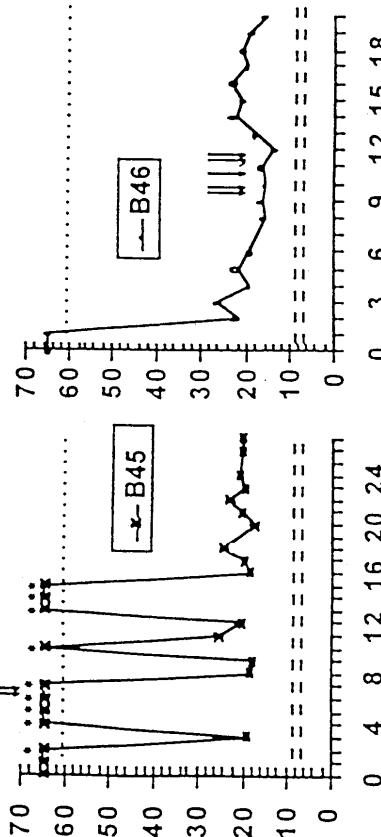


注入後の週



注入後の週

FIG. 8A



注入後の週

【図 11 A】

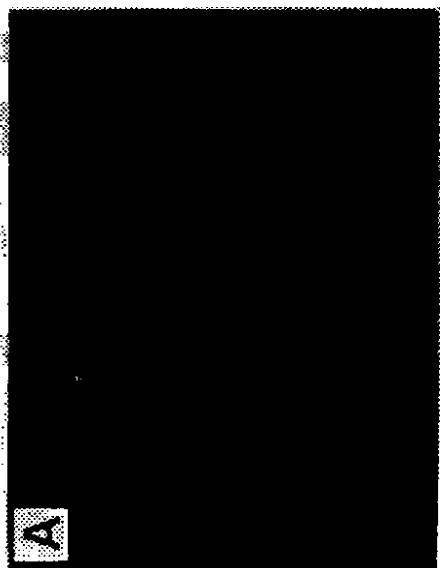


FIG. II A

【図 11 B】

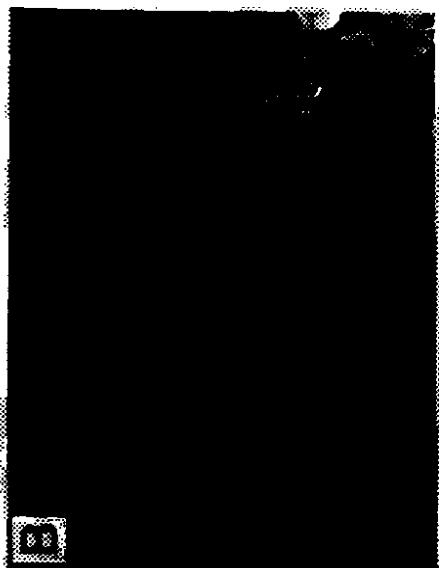


FIG. II B

【図 11 C】



FIG. II C

【図 11 D】



FIG. II D

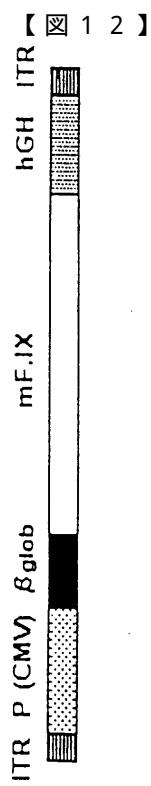
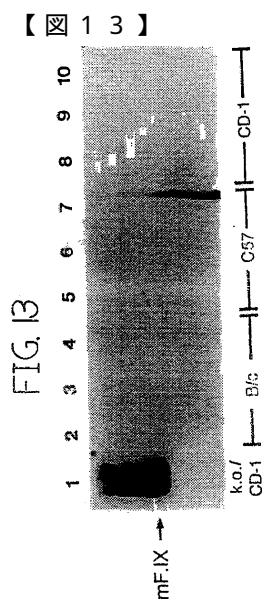


FIGURE 12



フロントページの続き

(72)発明者 ハーソグ, ローランド, ダブリュ.

アメリカ合衆国 19036 ペンシルバニア州, グレンオルデン, イースト グレンオルデン
アベニュー 100

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 國際公開第96/015777(WO, A1)

KOEBERL,D.D. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997年 2月, Vol.94, No.4, pp.1426-1231

CHEN,L. et al., Human gene therapy, 1997年 1月, Vol.8, No.2, pp.125-135

Wiener, S.M. et al., Blood, 1996年, Vol.88, No.10, Suppl.1, Pt.1-2, p.138A

KURACHI,S. et al., The Journal of biological chemistry, 1995年, Vol.270, No.10, pp.5276-5281

CHEUNG,W.F. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996年, Vol.93, No.20, pp.11068-11073

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 48/00

BIOSIS(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)

REGISTRY(STN)