

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7344595号  
(P7344595)

(45)発行日 令和5年9月14日(2023.9.14)

(24)登録日 令和5年9月6日(2023.9.6)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	Z N A	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01		
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10		
請求項の数 26 (全108頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2022-11418(P2022-11418)	(73)特許権者	507371168
(22)出願日	令和4年1月28日(2022.1.28)		ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ
(62)分割の表示	特願2019-214352(P2019-214352)		ファンデーション インコーポレーティ
	の分割		ッド
原出願日	平成26年5月21日(2014.5.21)		アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビ
(65)公開番号	特開2022-68181(P2022-68181A)		ル グリントー ホール 2 2 3
(43)公開日	令和4年5月9日(2022.5.9)	(74)代理人	100106518
審査請求日	令和4年2月25日(2022.2.25)		弁理士 松谷 道子
(31)優先権主張番号	13/899,481	(74)代理人	100122301
(32)優先日	平成25年5月21日(2013.5.21)		弁理士 富田 憲史
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生
		(74)代理人	100170520
			弁理士 笹倉 真奈美
		(72)発明者	アルン・スリバスタバ
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 キャプシド修飾 r A A V 3 ベクター組成物およびヒト肝がんの遺伝子治療における使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非天然 A A V キャプシドタンパク質をコードする核酸分子であって、  
A A V キャプシドタンパク質が、1つ以上の以下の組み合わせに対応するアミノ酸置換：  
配列番号 3 に示す野生型 A A V 3 キャプシドタンパク質の  
( a ) Y 7 0 5 F、Y 7 3 1 F、および T 4 9 2 V ;  
( b ) Y 7 0 5 F、Y 7 3 1 F、S 6 6 3 V、および T 4 9 2 V ; または  
( c ) Y 7 0 5 F、Y 7 3 1 F、S 6 6 3 V、T 4 9 2 V、および K 5 3 3 R、を含む、  
核酸分子。

【請求項 2】

A A V キャプシドタンパク質が、配列番号 3 に示す野生型 A A V 3 キャプシドタンパク質の Y 7 0 5 F、Y 7 3 1 F、および T 4 9 2 V に対応するアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

A A V キャプシドタンパク質が、配列番号 3 に示す野生型 A A V 3 キャプシドタンパク質の Y 7 0 5 F、Y 7 3 1 F、S 6 6 3 V、および T 4 9 2 V に対応するアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

A A V キャプシドタンパク質が、配列番号 3 に示す野生型 A A V 3 キャプシドタンパク質の Y 7 0 5 F、Y 7 3 1 F、S 6 6 3 V、T 4 9 2 V、および K 5 3 3 R に対応するア

ミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

AAV キャプシドタンパク質が、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、または AAV 10 血清型キャプシドタンパク質である、請求項 1 - 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

AAV キャプシドタンパク質が、AAV 3 血清型キャプシドタンパク質である、請求項 1 - 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

AAV キャプシドタンパク質が、AAV 6 血清型キャプシドタンパク質である、請求項 1 - 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

10

【請求項 8】

AAV キャプシドタンパク質が、AAV 8 血清型キャプシドタンパク質である、請求項 1 - 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記 AAV キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子の形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する前記アミノ酸置換を含まない AAV キャプシドタンパク質を含む rAAV 粒子の形質導入効率より 2 ~ 50 倍高い、請求項 1 - 8 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 10】

20

前記 AAV キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子の形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する前記アミノ酸置換を含まない AAV キャプシドタンパク質を含む rAAV 粒子の形質導入効率より 6 ~ 40 倍高い、請求項 1 - 9 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 11】

前記 AAV キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子の形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する前記アミノ酸置換を含まない AAV キャプシドタンパク質を含む rAAV 粒子の形質導入効率より 8 ~ 30 倍高い、請求項 1 - 10 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 12】

30

請求項 1 - 11 のいずれか一項に記載の核酸分子によりコードされる AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 13】

1 つ以上の以下の組み合わせ：

配列番号 3 に示す野生型 AAV 3 キャプシドタンパク質の

(a) Y705F、Y731F、および T492V；

(b) Y705F、Y731F、S663V、および T492V；または

(c) Y705F、Y731F、S663V、T492V、および K533R、

に対応するアミノ酸置換を含む、非天然 AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 14】

40

AAV キャプシドタンパク質が、配列番号 3 に示す野生型 AAV 3 キャプシドタンパク質の Y705F、Y731F、および T492V に対応するアミノ酸置換を含む、請求項 13 に記載の AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 15】

AAV キャプシドタンパク質が、配列番号 3 に示す野生型 AAV 3 キャプシドタンパク質の Y705F、Y731F、S663V、および T492V に対応するアミノ酸置換を含む、請求項 13 に記載の AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 16】

AAV キャプシドタンパク質が、配列番号 3 に示す野生型 AAV 3 キャプシドタンパク質の Y705F、Y731F、S663V、T492V、および K533R に対応するア

50

ミノ酸置換を含む、請求項 1.3 に記載の AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 17】

AAV キャプシドタンパク質が、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、または AAV 10 血清型キャプシドタンパク質である、請求項 1.3 - 1.6 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 18】

AAV キャプシドタンパク質が、AAV 3 血清型キャプシドタンパク質である、請求項 1.3 - 1.6 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 19】

AAV キャプシドタンパク質が、AAV 6 血清型キャプシドタンパク質である、請求項 1.3 - 1.6 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質。

10

【請求項 20】

AAV キャプシドタンパク質が、AAV 8 血清型キャプシドタンパク質である、請求項 1.3 - 1.6 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 21】

前記 AAV キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子の形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する前記アミノ酸置換を含まない AAV キャプシドタンパク質を含む rAAV 粒子の形質導入効率より 2 ~ 50 倍高い、請求項 1.3 - 2.0 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 22】

前記 AAV キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子の形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する前記アミノ酸置換を含まない AAV キャプシドタンパク質を含む rAAV 粒子の形質導入効率より 6 ~ 40 倍高い、請求項 1.3 - 2.1 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質。

20

【請求項 23】

前記 AAV キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子の形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する前記アミノ酸置換を含まない AAV キャプシドタンパク質を含む rAAV 粒子の形質導入効率より 8 ~ 30 倍高い、請求項 1.3 - 2.2 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 24】

請求項 1 - 8 のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項 1.2 - 2.3 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質、および医薬上許容される緩衝剤、希釈剤、または賦形剤を含む組成物。

30

【請求項 25】

哺乳動物の疾患、傷害、障害、外傷または機能不全の 1 以上の症状を診断し、防止し、処置し、または改善するための医薬の製造における、請求項 2.4 に記載の組成物の使用。

【請求項 26】

請求項 1 - 1.1 のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項 1.2 - 2.3 のいずれか一項に記載の AAV キャプシドタンパク質を含む哺乳動物宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

発明の背景

関連出願の相互参照

本国際特許出願は、米国仮特許出願第 60/910,798 号 (出願日 2007 年 4 月 9 日) (失効; 代理人整理番号 36689.266) に基づく優先権を主張する PCT 国際特許出願番号 PCT/US 2008/059647 (出願日 2008 年 4 月 8 日) の米国国内段階出願 (国内移行; 代理人整理番号 36689.272) である米国特許出願第 12/595,196 号 (出願日 2009 年 12 月 31 日) (現在は米国特許第 8,445,267 号; 代理人整理番号 36689.305) の一部継続出願である米国特許出願第 13/899,481 号 (出願日 2013 年 5 月 21 日) (係属中; 代理人整理番号 36689.

50

331) に基づく優先権を主張する。前述した出願のそれぞれの内容は明示的引用によりそのまま本明細書に組み込まれる。

【0002】

#### 連邦支援の研究または開発に関する陳述

本発明は、米国国立衛生研究所によって付与された助成金番号R01-HL-097088およびR21-EB-015684の下に、米国政府の支援を受けてなされた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

#### 共同研究契約当事者の名称

該当なし。

【0004】

#### 発明の分野

本発明は概して分子生物学およびウイルス学の分野に関し、具体的には遺伝子送達媒体の開発に関する。さまざまな診断レジメンおよび/または治療レジメンにおいて使用するために、さまざまな核酸、例えば治療用のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびリボザイムコンストラクトをコードするものなどを、選ばれた宿主細胞に送達するのに有用な、改良されたrAAVベクター組成物も開示する。ウイルスに基づくさまざまな遺伝子治療において、特にヒトの疾患、障害、機能不全、外傷、または傷害を診断し、防止し、処置し、かつ/またはその症状を改善するために、これらの修飾rAAV系ベクターコンストラクトを調製し、使用方法も提供する。本発明は、形質導入効率が増加しており、かつ/または選ばれた哺乳動物宿主細胞のウイルス感染力が改良されている、変異型rAAV系ウイルスベクター送達システムも提供する。特に本発明は、改良されたrAAVベクターを提供し、そしてまた、ウイルスキャプシドタンパク質の1つ以上の表面露出残基にアミノ酸置換を持つ粒子を有する改良されたrAAVビリオンを提供する。

【背景技術】

【0005】

#### 関連技術の説明

遺伝子治療の分野における大きな進歩は、治療用遺伝物質を送達するためにウイルスを使用することによって達成された。アデノ随伴ウイルス(AAV)は、その低い免疫原性と非分裂細胞に効果的に形質導入する能力とにより、遺伝子治療のための非常に効果的なウイルスベクターとして、かなりの注目を集めてきた。AAVはさまざまな細胞タイプおよび組織タイプに感染することが示されており、このウイルス系をヒト遺伝子治療における使用に適合させるために、この十年間に大きな進展があった。

【0006】

組換えAAV(rAAV)DNAは、その正常な「野生型」の形態では、約4600ヌクレオチド(nt)長の一本鎖分子として、ウイルスキャプシド中にパッケージングされる。ウイルスによる細胞の感染後は、細胞の分子機構が、その一本のDNA鎖を二本鎖型に転化する。含まれている1つまたは複数の遺伝子をRNAに転写する細胞のポリペプチドにとっては、二本鎖DNA型だけが有用である。

【0007】

AAVは、1)野生型ウイルスがヒトのどの病的状態とも関連しない、2)組換え型はネイティブのウイルスコード配列を含有しない、そして3)多くの応用において持続的トランスジェニック発現が観察されているなど、遺伝子送達媒体としてのその使用に有利な性質を、数多く有している。

【0008】

組換えアデノ随伴ウイルス2(AAV)ベクターの形質導入効率は、インビトロおよびインビボで、細胞および組織が異なると著しく変動し、そのことが、潜在的遺伝子治療レジメンにおけるそれらの多くの有用性を制限してきた。AAVのライフサイクルにおける根本的ステップを解明するために、系統的な研究が行われてきた。例えば、上皮成長因子受容体タンパク質チロシンキナーゼ(EGFR-PTK)によってチロシン残基がリン酸化された細

10

20

30

40

50

胞タンパク質FKBP52は、AAVの第二鎖DNA合成を阻害し、結果として、インビトロでもインビボでも導入遺伝子発現を阻害することが記録されている。また、EGFR-PTKシグナリングが、FKBP52が媒介するAAVベクターの第二鎖DNA合成だけでなく、ユビキチン/プロテアソーム経路が媒介する細胞内輸送を調整することも実証されている。これらの研究では、EGFR-PTKシグナリングの阻害が、AAVキャプシドタンパク質のユビキチン化の減少につながり、それが、結果として、プロテアソームが媒介するAAVベクターの分解を制限することによって核移行を容易にしていたことから、EGFR-PTKが媒介するAAVキャプシド上のチロシン残基のリン酸化が関係すると考えられた。先行技術に欠けているものは、選ばれた哺乳動物細胞に感染させるための、特にヒト細胞への標的遺伝子送達のための、強化された形質導入効率を有する改良されたrAAVウイルスベクターである。

10

【発明の概要】

【0009】

発明の要約

本発明は、1つ以上のポリペプチドの不足に起因する1つ以上の疾患、障害または機能不全を防止し、処置し、かつ/または改善するための医薬の調製に有用な、1つ以上の治療作用物質をコードする改良された新規rAAV系遺伝子コンストラクトを提供することによって、先行技術に固有の制約および不足を克服する。特に本発明は、哺乳動物のさまざまな疾患、障害、機能不全、外傷、傷害などの診断、防止、処置、および/またはその症状の改善に使用するための、1つ以上の選ばれた分子、例えば1つ以上の診断用または治療作用物質（例えばタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、抗原結合フラグメント、siRNA、RNAi、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、ならびにそれらの変種および/または活性フラグメントを含む）をコードする、VP3キャプシドタンパク質修飾rAAV系遺伝子コンストラクトを提供する。

20

【0010】

本発明は、野生型と比較して1つ以上の表面露出アミノ酸残基（例えば、限定するわけではないが、リジン、セリン、スレオニン、および/またはチロシン残基など）の修飾を含む変異型AAV VP3キャプシドタンパク質を提供する。本発明の変異型AAVキャプシドタンパク質を含む感染性rAAVビリオン、ならびに本発明の変異体AAVキャプシドタンパク質をコードする核酸分子およびrAAVベクター、ならびに選ばれた哺乳動物細胞の集団に送達するための1つ以上の選ばれた診断用および/または治療作用物質をコードする核酸も提供する。

30

すなわち、本願発明は、以下を提供する：

[項1]

(a) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質のY252、Y272、Y444、Y701、Y705、およびY731に対応する1つ以上の位置にある非チロシンアミノ酸残基、

(b) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質のS459またはS663に対応する1つ以上の位置のそれぞれにある非セリンアミノ酸残基、

(c) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質のT251またはT492に対応する1つ以上の位置のそれぞれにある非スレオニンアミノ酸残基、

(d) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質のK528、K533、またはK545に対応する1つ以上の位置のそれぞれにある非リジンアミノ酸残基、

40

(e) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質の、(i) 位置Y701またはY705にある非チロシンアミノ酸残基、および(ii) 位置Y705またはY731にある非チロシンアミノ酸残基、または位置S663にある非セリンアミノ酸残基、

(f) (a)、(b)、(c)、および(d)に列挙した、それぞれ非ネイティブアミノ酸による、3つ以上のアミノ酸置換の組み合わせ、

(g) (a)、(b)、(c)、および(d)に列挙した、それぞれ非ネイティブアミノ酸による、4つ以上のアミノ酸置換の組み合わせ、または

(h) (a)、(b)、(c)、および(d)に列挙した、それぞれ非ネイティブアミノ酸による、5つ以上のアミノ酸置換の組み合わせ

50

を含む、あるいはそれぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10に示すAAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAV10からなる群より選択される他の野生型ベクター血清型のいずれか一つにおいて、前記アミノ酸置換のそれぞれが、それに対応する等価なアミノ酸位置にある、修飾キャプシドタンパク質を含むrAAV3ベクター、

[ 項 2 ]

非セリンアミノ酸残基が、フェニルアラニン (F)、バリン (V)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、アラニン (A)、ロイシン (L)、アスパラギン酸 (D)、アスパラギン (N)、グルタミン酸 (E)、アルギニン (R)、およびイソロイシン (I) からなる群より選択されるか、または非チロシン、非リジン、もしくは非スレオニンアミノ酸残基が、

10

[ 項 3 ]

3つ以上のアミノ酸置換の組み合わせが、次に挙げる酸残基の組み合わせ:

配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質の

(a) Y701F、Y705F、およびY731F、

(b) Y705F、Y731F、およびS663V、

(c) Y705F、Y731F、およびT492V、

20

(d) Y705F、Y731F、K533R、

(e) S663V、T492V、およびK533R、

(f) Y705F、Y731F、S663V、およびT492V、もしくは

(g) Y705F、Y731F、S663V、T492V、およびK533R、

または、それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、もしくは配列番号10にそれぞれ示す対応する野生型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、またはAAV10キャプシドタンパク質のいずれか一つにおける等価な表面露出アミノ酸残基、またはそれらの任意の組み合わせ

の1つ以上に非ネイティブアミノ酸置換を含む、項1または項2に記載のrAAV3ベクター、

30

[ 項 4 ]

前記ベクターを含むピリオンの形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する無修飾のrAAV3ベクターを含むピリオンの形質導入効率より約2～約50倍高い、前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

[ 項 5 ]

前記ベクターを含むピリオンの形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する無修飾のrAAV3ベクターを含むピリオンの形質導入効率より約6～約40倍高い、前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

[ 項 6 ]

前記ベクターを含むピリオンの形質導入効率が、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する無修飾のrAAV3ベクターを含むピリオンの形質導入効率より約8～約30倍高い、前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

40

[ 項 7 ]

前記ベクターを含むピリオンが、哺乳動物細胞中に導入された時に、対応する無修飾のrAAV3ベクターを含むピリオンよりユビキチン化を受けにくい、前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

[ 項 8 ]

前記ベクターを含む適切な宿主細胞において診断剤、治療剤、または化学療法剤をコードする核酸セグメントを発現させる能力を有するプロモーターに作動的に連結された前記核酸セグメントをさらに含む、前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

50

## [ 項 9 ]

前記核酸セグメントが、前記核酸セグメントに作動的に連結されたエンハンサー、転写後調節配列、ポリアデニル化シグナル、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、項8に記載のrAAV3ベクター、

## [ 項 1 0 ]

前記核酸セグメントに作動的に連結された少なくとも1つの第1哺乳類イントロン配列をさらに含む、前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

## [ 項 1 1 ]

前記プロモーターが、異種プロモーター、組織特異的プロモーター、細胞特異的プロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせである、項8に記載のrAAV3ベクター、

10

## [ 項 1 2 ]

前記プロモーターが、肝臓特異的プロモーター、腫瘍細胞特異的プロモーター、またはそれらの組み合わせである、項10に記載のrAAV3ベクター、

## [ 項 1 3 ]

前記核酸セグメントが、ポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、siRNA、RNAi、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、抗体、抗原結合フラグメント、またはそれらの任意の組み合わせを発現し、またはコードする、項8に記載のrAAV3ベクター、

## [ 項 1 4 ]

前記少なくとも1つの第1核酸セグメントが化学療法剤をコードする、前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

20

## [ 項 1 5 ]

前記診断剤、治療剤または化学療法剤が、アゴニスト、アンタゴニスト、抗アポトーシス因子、阻害因子、受容体、サイトカイン、細胞毒、赤血球新生因子、糖タンパク質、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、ホルモン受容体、インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン受容体、神経成長因子、向神経活性ペプチド、向神経活性ペプチド受容体、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害因子、タンパク質デカルボキシラーゼ、プロテインキナーゼ、タンパク質キナーゼ阻害因子、酵素、受容体結合タンパク質、輸送タンパク質またはその阻害因子、セロトニン受容体またはその取り込み阻害因子、セルピン、セルピン受容体、腫瘍抑制因子、細胞毒性因子、細胞分裂阻害因子、抗炎症因子、またはそれらの任意の組み合わせである、項8～14のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

30

## [ 項 1 6 ]

アデノ随伴ウイルス粒子内または感染性rAAV3ビリオン内に含まれている、前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

## [ 項 1 7 ]

前記項のいずれか一項に記載のrAAV3ベクターをコードする単離された核酸セグメント、

## [ 項 1 8 ]

項1～16のいずれか一項に記載のrAAV3ベクターを含むビリオンまたはウイルス粒子、

40

## [ 項 1 9 ]

項1～16のいずれか一項に記載のrAAV3ベクターを含む複数の感染性ウイルス粒子、

## [ 項 2 0 ]

項1～16のいずれか一項に記載のrAAV3ベクターを含む単離された哺乳動物宿主細胞、

## [ 項 2 1 ]

幹細胞、造血細胞、血液細胞、神経細胞、網膜細胞、上皮細胞、内皮細胞、膵臓細胞、がん細胞、筋細胞、血管細胞、横隔膜細胞、胃細胞、肝臓細胞、腫瘍細胞、またはCD34<sup>+</sup>細胞である、項20に記載の単離された哺乳動物宿主細胞、

## [ 項 2 2 ]

(1)(a) 項1～16のいずれか一項に記載のrAAV3ベクター、

50

(b) (a) のベクターをコードする核酸セグメント、または  
 (c) (b) の核酸セグメントを含む複数のビリオンもしくは感染性ウイルス粒子と、  
 (11) 医薬上許容される緩衝剤、希釈剤、または賦形剤と

を含む組成物、

[ 項 2 3 ]

限定するわけではないがHCCなどの肝がんを含む、哺乳動物の疾患、傷害、障害、外傷または機能不全を診断し、防止し、処置し、またはその1つ以上の症状を改善するためのキットに含まれる、項22に記載の組成物、

[ 項 2 4 ]

脂質、リボソーム、脂質複合体、エトソーム、ニオソーム、ナノ粒子、マイクロ粒子、  
 リポスフェア、ナノカプセル、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、項22または  
 項23に記載の組成物、

10

[ 項 2 5 ]

治療または予防に使用するための、項22～24のいずれか一項に記載の組成物、

[ 項 2 6 ]

ヒトがんの治療または予防に使用するための、項22～25のいずれか一項に記載の組成物、

[ 項 2 7 ]

(1) (a) 項1～16のいずれか一項に記載のrAAVベクター、または

(b) 項18または項19に記載のビリオンまたは複数の感染性ウイルス粒子  
 からなる群より選択される構成要素と、

20

(2) ヒトにおける肝がんの診断、防止、処置、またはその1つ以上の症状の改善における  
 前記構成要素の使用に関する指示

とを含むキット、

[ 項 2 8 ]

哺乳動物のがんを診断し、防止し、処置し、またはその1つ以上の症状を改善するための  
 医薬の製造における、項22に記載の組成物の使用、

[ 項 2 9 ]

ヒト肝がんを処置しまたはその1つ以上の症状を改善するための医薬の製造における、  
 項28に記載の使用、

30

[ 項 3 0 ]

診断有効量または治療有効量の選ばれた生物学的分子を、それを必要とする哺乳動物に  
 与えるための方法であって、それを必要とする哺乳動物の細胞、組織または器官に、診断  
 有効量または治療有効量の前記選ばれた生物学的分子を前記哺乳動物に与えるのに有効な  
 量の項1～16のいずれか一項に記載のrAAV3ベクターを、診断有効量または治療有効量  
 の前記選ばれた生物学的分子を前記哺乳動物に与えるのに有効な時間にわたって与えること  
 を含む方法、

[ 項 3 1 ]

哺乳動物におけるHCCを含む肝がんを診断し、防止し、処置し、またはその少なくとも  
 1つ以上の症状を改善するための方法であって、それを必要とする哺乳動物に、項1～16  
 のいずれか一項に記載のrAAV3ベクターを、前記哺乳動物における前記肝がんを診断し、  
 防止し、処置し、または前記1つ以上の症状を改善するのに十分な量で、かつ十分な時間  
 にわたって投与することを含む方法、

40

[ 項 3 2 ]

前記哺乳動物がヒトである、項31に記載の方法、

[ 項 3 3 ]

HCCを有すると診断されたヒト、またはHCCを有するヒト、またはHCCを有すると疑わ  
 れるヒトにおける肝臓細胞または肝腫瘍細胞の集団に形質導入するための方法であって、  
 前記ヒトに、有効量の項1～16のいずれか一項に記載のrAAV3ベクターを含む組成物を、  
 肝臓細胞または肝腫瘍細胞の集団に形質導入するのに有効な時間にわたって投与すること

50



を含む方法。

【0011】

有利なことに、本明細書に開示する新規rAAVベクター、発現コンストラクト、ならびにそれらを含む感染性ビリオンおよびウイルス粒子は、好ましくは、関心対象のさまざまな細胞、組織および器官の1つ以上への形質導入に関して、野生型の無修飾発現コンストラクトと比較して、またそれらを含む対応するrAAVベクターおよびビリオンと比較して、改良された効率を有する。

【0012】

ここに提供する改良されたrAAVベクターは、1つ以上の選ばれた宿主細胞に、従来の野生型（すなわち「無修飾」）rAAVベクターより高い効率で（そして多くの場合、はるかに高い効率で）形質導入する。本発明者らは、種々のAAV血清型からのさまざまなAAVキャプシドタンパク質上のさまざまな表面露出アミノ酸残基を個別に、かつ/または2個、3個、4個、もしくは5個、さらには6個以上組み合わせて、部位指定変異誘発に付すことを伴う広範な解析と詳細な実験とを行うことによって、改良された形質導入効率を有する単一変異型または多重変異型rAAVベクターの大きなコレクションを開発した。本発明者らは、いくつかの異なるAAV血清型で、1つ以上のビリオン表面提示アミノ酸残基の置換が、その変異体を調製する際の出発点とした対応する非置換ベクターよりも高効率の形質導入能力を有する改良されたウイルスベクターをもたらすことを実証した。

10

【0013】

これら新しいキャプシド変異体rAAVウイルスベクターの開発は、従来の遺伝子治療レジメンに必要なウイルス粒子の数を劇的に低減する。本明細書に記載する表面露出アミノ酸修飾rAAVベクターは、さまざまな哺乳動物細胞に対して改良された形質導入効率を有することに加えて、哺乳動物の遺伝子治療レジメンに現在使用されている旧来のウイルスベクターよりも安定であり、免疫原性が低く、はるかに安いコストで生産することができる。

20

【0014】

特定の一実施形態において、本発明は、(a) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質のY252、Y272、Y444、Y701、Y705、およびY731に対応する1つ以上の位置に非チロシンアミノ酸残基、(b) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質のS459またはS663に対応する1つ以上の位置のそれぞれに非セリンアミノ酸残基、(c) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質のT251またはT492に対応する1つ以上の位置のそれぞれに非スレオニンアミノ酸残基、(d) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質K528、K533、またはK545に対応する1つ以上の位置のそれぞれに非リジンアミノ酸残基、(e) 配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質の、(i) 位置Y701またはY705に非チロシンアミノ酸残基、および(ii) 位置Y705またはY731に非チロシンアミノ酸残基、または位置S663に非セリンアミノ酸残基、(f) (a)、(b)、(c)、および(d)に列挙した、それぞれ非ネイティブアミノ酸による、3つ以上のアミノ酸置換の組み合わせ、(g) (a)、(b)、(c)、および(d)に列挙した、それぞれ非ネイティブアミノ酸による、4つ以上のアミノ酸置換の組み合わせ、または(h) (a)、(b)、(c)、および(d)に列挙した、それぞれ非ネイティブアミノ酸による、5つ以上のアミノ酸置換の組み合わせを含む、あるいはそれぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10に示すAAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAV10からなる群より選択される他の野生型ベクター血清型のいずれか一つにおいて、前記アミノ酸置換のそれぞれが、それに対応する等価なアミノ酸位置にある、修飾rAAV VP3キャプシドタンパク質を提供する。

30

40

【0015】

限定するわけではないが、本発明の例示的多重変異型タンパク質として、AAV3キャプシド上の3つ以上の異なる表面露出アミノ酸残基のそれぞれにおける非ネイティブアミノ酸置換の組み合わせが挙げられる。限定するわけではないが、これらの多重変異体ベクターは、配列番号3に示す野生型AAV3キャプシドタンパク質の表示のアミノ酸残基に、また

50

はそれぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号10に示す対応する野生型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、またはAAV10キャプシドタンパク質のいずれか一つにおける等価な表面露出アミノ酸残基に、

- (a) Y701F、Y705F、およびY731F；
- (b) Y705F、Y731F、およびS663V；
- (c) Y705F、Y731F、およびT492V；
- (d) Y705F、Y731F、K533R；
- (e) S663V、T492V、およびK533R；
- (f) Y705F、Y731F、S663V、およびT492V；ならびに
- (g) Y705F、Y731F、S663V、T492V、およびK533R置換を含むか、またはそれらを任意の組み合わせで含む。

10

【0016】

本発明の実施において、置換非ネイティブアミノ酸としては、対応する野生型タンパク質中の特定残基に通常は存在しない1つ以上のアミノ酸の置換を挙げることができ、好ましくは、フェニルアラニン(F)、バリン(V)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、アラニン(A)、ロイシン(L)、アスパラギン酸(D)、アスパラギン(N)、グルタミン酸(E)、アルギニン(R)、セリン(S)、およびイソロイシン(I)からなる群より選択される1つ以上の非ネイティブアミノ酸置換を挙げることができる。

【0017】

本発明は、本明細書に開示するキャプシドタンパク質変異型変種の1つ以上をコードする単離精製されたポリヌクレオチド、ならびに1つ以上のそれらポリヌクレオチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターも提供する。好ましくは、本発明のベクターコンストラクトはさらに、少なくとも1つの核酸セグメントであって、当該ベクターを含む適切な宿主細胞内で前記核酸セグメントを発現する能力を有するプロモーターに作動的に連結された診断用または治療用分子をコードする前記核酸セグメントを含む。本発明の実施において、前記修飾AAV VP3キャプシドタンパク質を含むビリオンの形質導入効率は、対応する無修飾の野生型タンパク質よりも高く、したがって好ましくは、選ばれた哺乳動物宿主細胞において、対応する無修飾のキャプシドタンパク質を含むビリオンより、少なくとも2倍、少なくとも約4倍、少なくとも約6倍、少なくとも約8倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約12倍またはそれ以上高い、哺乳動物細胞における形質導入効率を有するであろう。一定の実施形態では、ここに提供するrAAVベクターの形質導入効率が、対応する無修飾のキャプシドタンパク質を含むビリオンより、少なくとも約15倍高いか、少なくとも約20倍高いか、少なくとも約25倍高いか、少なくとも約30倍高いか、少なくとも約40倍、45倍、もしくは50倍またはそれ以上高いであろう。さらにまた、1つ以上の修飾AAV VP3キャプシドタンパク質を含む本発明の感染性ビリオンは、好ましくは、哺乳動物細胞中に導入した時に、対応する無修飾のキャプシドタンパク質を含むビリオンよりも、ユビキチン化を受けにくい。

20

30

【0018】

本発明は、核酸セグメントが、選ばれた関心対象のポリヌクレオチドをコードする核酸セグメントに作動的に連結されたプロモーター、エンハンサー、転写後調節配列、ポリアデニル化シグナル、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、rAAVベクターにも関係する。

40

【0019】

好ましくは、プロモーターは異種プロモーター、組織特異的プロモーター、細胞特異的プロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0020】

一定の実施形態では、本明細書に記載する新規rAAV発現ベクター中にクローニングされた核酸セグメントが、1つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、si

50

RNA、RNAi、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、抗体、抗原結合フラグメント、またはそれらの任意の組み合わせを発現またはコードするであろう。

【0021】

本明細書において示すように、本発明において有用な治療用作用物質としては、1つ以上のアゴニスト、アンタゴニスト、抗アポトーシス因子、阻害因子、受容体、サイトカイン、細胞毒、赤血球新生因子、糖タンパク質、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、ホルモン受容体、インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン受容体、神経成長因子、向神経活性ペプチド、向神経活性ペプチド受容体、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害因子、タンパク質デカルボキシラーゼ、プロテインキナーゼ、プロテインキナーゼ阻害因子、酵素、受容体結合タンパク質、輸送タンパク質またはその1つ以上の阻害因子、セロトニン受容体、またはその1つ以上の取り込み阻害因子、セルピン、セルピン受容体、腫瘍抑制因子、診断用分子、化学療法剤、細胞毒、またはそれらの任意の組み合わせを挙げることができる。

10

【0022】

本発明者らは、特に、1つ以上の哺乳動物肝がんの遺伝子治療の方法における図41に記載のrAAV3ベクターの使用を考えているが、キャプシド変異型ベクターを調製して、それを、例えばAAV血清型1 (AAV1)、AAV血清型2 (AAV2)、AAV血清型4 (AAV4)、AAV血清型5 (AAV5)、AAV血清型6 (AAV6)、AAV血清型7 (AAV7)、AAV血清型8 (AAV8)、AAV血清型9 (AAV9)、AAV血清型10 (AAV10)、AAV血清型11 (AAV11)、またはAAV血清型12 (AAV12)を含む、任意の既知AAV血清型のピリオン内にパッケージングすることができる。

20

【0023】

本発明はさらに、上記キャプシド変異型rAAVベクターの集団および複数の上記キャプシド変異型rAAVベクター、ならびにそれらをコードする1つ以上の核酸セグメントを含むピリオン、感染性ウイルス粒子、および哺乳動物宿主細胞を提供する。

【0024】

好ましくは、哺乳動物宿主細胞は、例えば血液細胞、幹細胞、造血細胞、CD34<sup>+</sup>細胞、肝臓細胞、がん細胞、血管細胞、膵臓細胞、神経細胞、眼細胞または網膜細胞、上皮細胞または内皮細胞、樹状細胞、線維芽細胞を含むヒト宿主細胞、または哺乳動物起源の他の任意の細胞、例えば限定するわけではないが、ウイルスに基づく遺伝子治療が考えられる、肝(すなわち肝臓)細胞、肺細胞、心臓細胞、膵臓細胞、腸細胞、横隔膜細胞、腎(すなわち腎臓)細胞、神経細胞、血液細胞、骨髄細胞、または1つ以上の選ばれた任意の哺乳動物組織であるだろう。

30

【0025】

本発明はさらに、本発明のタンパク質、核酸セグメント、ウイルスベクター、宿主細胞、またはウイルス粒子の1つ以上を、1つ以上の医薬上許容される緩衝剤、希釈剤、または賦形剤と共に含む組成物および製剤を提供する。そのような組成物は、哺乳動物の疾患、傷害、障害、外傷または機能不全を診断し、防止し、処置し、またはその1つ以上の症状を改善するための1つ以上の診断キットまたは治療キットに含まれていてもよい。

40

【0026】

本発明はさらに、診断有効量または治療有効量の選ばれた生物学的分子を、それを必要とする哺乳動物に与えるための方法であって、それを必要とする哺乳動物の細胞、組織または器官に、診断有効量または治療有効量の前記選ばれた生物学的分子を前記哺乳動物に与えるのに有効な量のrAAVベクターを、診断有効量または治療有効量の前記選ばれた生物学的分子を前記哺乳動物に与えるのに有効な時間にわたって与えることを含む方法を包含する。

【0027】

本発明はさらに、哺乳動物における疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、または外傷を診断し、防止し、処置し、またはその少なくとも1つ以上の症状を改善するための方

50

法を提供する。包括的かつ一般的意味において、本方法は、少なくとも、本開示のrAAVベクターの1つ以上を、それを必要とする哺乳動物に、前記哺乳動物における疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、または外傷を診断し、防止し、処置し、またはその前記少なくとも1つ以上の症状を改善するのに十分な量で、かつ十分な時間にわたって、投与するステップを含む。rAAV3系ベクターの場合であれば、上記異常状態として、好ましくは、哺乳動物の肝臓の1つ以上の疾患または機能不全、例えばHCCが挙げられ、rAAV8系ベクターの場合であれば、上記異常状態として、好ましくは、哺乳動物の眼の1つ以上の疾患または機能不全が挙げられ、あるいはrAAV6ベクターの場合であれば、幹細胞、血液細胞、造血細胞、またはCD35<sup>+</sup>細胞の1つ以上の疾患、例えば鎌形血球症、 $\beta$ -サラセミアなどが挙げられる。

10

**【0028】**

本発明は、哺乳動物細胞の集団に形質導入する方法も提供する。包括的かつ一般的意味において、本方法は、少なくとも、前記集団の1つ以上の細胞中に、有効量の本明細書に開示するrAAVベクターの1つ以上を含む組成物を導入するステップを含む。

**【0029】**

さらにもう一つの実施形態において、本発明は、本明細書に記載するVP3変異体キャプシドタンパク質の1つ以上をコードする単離された核酸セグメントも提供し、また本明細書において記載し試験した、改良されたベクター配列の1つ以上を含む組換えベクター、ウイルス粒子、感染性ピリオン、および単離された宿主細胞も提供する。

**【0030】**

加えて本発明は、1つ以上の追加成分と共に製剤化された、または1つ以上の使用説明書が用意された、本開示のベクターまたはAAV組成物の1つ以上を含む組成物ならびに治療用および/または診断用キットを提供する。

20

**【0031】**

本発明は、さまざまな方法で、例えばエクサイチャー、インビトロおよびインビボでの応用、方法、診断手法、および/または遺伝子治療レジメンなどにおいて、本開示の改良されたrAAVキャプシド変異型ベクターを作製するための方法、ならびにそれを使用する方法も実証する。本明細書に記載する改良されたベクターの多くはプロテアソーム分解に対して耐性でもあるので、それらはインビボで著しく増加した形質導入効率を有し、そのことが、これらを、ウイルスベクターに基づくヒト遺伝子治療レジメンに、そして特に、選ばれた哺乳動物細胞にインビボおよび/またはインビトロで1つ以上の遺伝子コンストラクトを送達するのに、とりわけよく適したものにしている。

30

**【0032】**

一態様において、本発明は、1つ以上の有益な産物または治療用産物をコードする遺伝物質を哺乳動物の細胞および組織に送達するための方法において有用な、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、ピリオン、ウイルス粒子を含む組成物、およびその医薬製剤を提供する。特に、本発明の組成物および方法は、1つ以上の哺乳動物疾患の処置、防止、および/またはその症状の改善にそれらを使用することにより、当技術分野に著しい進歩をもたらす。ヒト遺伝子治療は、とりわけ、数多くの多様な疾患、障害、および機能不全の処置に使用するための改良された新しいウイルスベクターコンストラクトの提供によ

40

**【0033】**

もう一つの態様において、本発明は、修飾rAAVベクターであって、前記ベクターコンストラクトが送達される哺乳動物における1つ以上の障害を防止し、処置し、かつ/または改善するための1つ以上の哺乳動物治療用作用物質をコードするものに関係する。

**【0034】**

特に本発明は、哺乳動物の疾患、機能不全、傷害、および/または障害の処置、予防、および/またはその1つ以上の症状の改善において使用するための1つ以上の哺乳動物治療用作用物質(限定するわけではないが、例えばタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、酵素、抗体、抗原結合フラグメント、ならびにその変種、および/または活性フラグメントを含

50

む)をコードするrAAV系発現コンストラクトを提供する。

【0035】

一実施形態において、本発明は、rAAVキャプシドタンパク質中の1つ以上の表面露出アミノ酸残基に非ネイティブアミノ酸への少なくとも1つの第1アミノ酸置換を含む、少なくとも1つの第1キャプシドタンパク質を含むrAAVベクターであって、前記ベクターがさらに、少なくとも1つの第1核酸セグメントであって、前記発現ベクターコンストラクトを含有する宿主細胞中で前記セグメントを発現させる能力を有するプロモーターに作動的に連結された少なくとも1つの第1診断用または治療用物質をコードするものをも含む、前記rAAVベクターを提供する。

【0036】

本発明の表面露出アミノ酸修飾rAAVベクターは、場合によっては、さらに、それぞれが核酸セグメントに作動的に連結された1つ以上のエンハンサー配列を含んでもよい。限定するわけではないが、例示的エンハンサー配列として、CMVエンハンサー、合成エンハンサー、肝臓特異的エンハンサー、血管特異的エンハンサー、脳特異的エンハンサー、神経細胞特異的エンハンサー、肺特異的エンハンサー、筋特異的エンハンサー、腎臓特異的エンハンサー、膵臓特異的エンハンサー、および鳥細胞特異的エンハンサーからなる群より選択される1つ以上が挙げられる。

【0037】

限定するわけではないが、本発明の実施において有用な例示的プロモーターとして、1つ以上の異種プロモーター、組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、または誘導性プロモーター、例えば限定するわけではないが、CMVプロモーター、 $\alpha$ -アクチンプロモーター、インスリンプロモーター、エノラーゼプロモーター、BDNFプロモーター、NGFプロモーター、EGFプロモーター、成長因子プロモーター、軸索特異的プロモーター、樹状突起特異的プロモーター、脳特異的プロモーター、海馬特異的プロモーター、腎臓特異的プロモーター、エラフィンプロモーター、サイトカインプロモーター、インターフェロンプロモーター、成長因子プロモーター、 $\gamma$ -アンチトリプシンプロモーター、脳細胞特異的プロモーター、神経細胞特異的プロモーター、中枢神経系細胞特異的プロモーター、末梢神経系細胞特異的プロモーター、インターロイキンプロモーター、セルピンプロモーター、ハイブリッドCMVプロモーター、ハイブリッド $\alpha$ -アクチンプロモーター、EF1プロモーター、U1aプロモーター、U1bプロモーター、Tet誘導性プロモーター、VP16-LexAプロモーター、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるプロモーターが挙げられる。例示の実施形態では、プロモーターが、哺乳類または鳥類の $\alpha$ -アクチンプロモーターを含みうる。

【0038】

第1核酸セグメントは、さらに、1つ以上の転写後調節配列または1つ以上のポリアデニル化シグナル、例えば限定するわけではないが、マーモット肝炎ウイルス転写後調節要素、ポリアデニル化シグナル配列、またはそれらの任意の組み合わせも含みうる。

【0039】

限定するわけではないが、本ベクターコンストラクトによって宿主細胞に送達することができる例示的な診断用または治療用作用物質としては、ポリペプチド、ペプチド、抗体、抗原結合フラグメント、リボザイム、ペプチド核酸、siRNA、RNAi、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される作用物質が挙げられる。

【0040】

例示の実施形態では、本発明の改良されたrAAVベクターが、好ましくは、分子マーカー、アドレナリン作動性アゴニスト、抗アポトーシス因子、アポトーシス阻害因子、サイトカイン受容体、サイトカイン、細胞毒、赤血球新生因子、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、糖タンパク質、成長因子、成長因子受容体、ホルモン、ホルモン受容体、インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン受容体、キナーゼ、キナーゼ阻害因子、神経成長因子、ネトリン、向神経活性ペプチド、向神経活性ペプチド受容体、神経原性因子

10

20

30

40

50

、神経原性因子受容体、ニューロピリン、神経栄養因子、ニューロトロフィン、ニューロトロフィン受容体、N-メチル-D-アスパラギン酸アンタゴニスト、プレキシン、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害因子、タンパク質デカルボキシラーゼ、プロテインキナーゼ、プロテインキナーゼ阻害因子、タンパク質分解タンパク質、タンパク質分解タンパク質阻害因子、セマフォリン、セマフォリン受容体、セロトニン輸送タンパク質、セロトニン取り込み阻害因子、セロトニン受容体、セルピン、セルピン受容体、腫瘍抑制因子、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの診断用または治療用のタンパク質またはポリペプチドをコードするであろう。

【0041】

一定の応用において、本発明のキャプシド修飾rAAVベクターは、BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-SCF、GM-CSF、ゴナドトロピン、IFN、IFG-1、M-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、TGF-B2、TNF、VEGF、プロラクチン、ソマトトロピン、XIAP1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-10(I87A)、ウイルスIL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるポリペプチドをコードする1つ以上の核酸セグメントを含みうる。

10

【0042】

もう一つの実施形態において、本発明は、細胞における1つ以上の内因性生物学的プロセスの活性を改変し、阻害し、低減し、防止し、排除し、または減損する1つ以上の治療作用物質をコードする少なくとも1つの第1核酸セグメントを含む、遺伝子修飾され、形質導入効率が改良された、rAAVベクターに関する。特定の実施形態では、上述の治療作用物質が、1つ以上の代謝プロセス、機能不全、障害、または疾患の効果を選択的に阻害し、または低減するものでありうる。一定の実施形態において、欠陥は、処置が望まれる哺乳動物の傷害または外傷によって引き起こされうる。別の実施形態では、欠陥が、内因性生体化合物の過剰発現によって引き起こされ、さらに別の実施形態では、欠陥が、1つ以上の内因性生体化合物の過少発現、さらには欠如によって引き起こされうる。

20

【0043】

上述のベクターを使用する意図が、ベクターをトランスフェクトされた特定の細胞に、1つ以上の外因性タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、リボザイム、siRNA、および/またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにある場合は、ベクターを含む細胞中でポリヌクレオチドを発現させてコードされている治療作用物質、例えばペプチド、タンパク質、ポリペプチド、抗体、リボザイム、siRNA、およびアンチセンスオリゴ-またはポリ-ヌクレオチドなどを生産する少なくとも1つの第1異種プロモーターの下流に作動的に配置されて該異種プロモーターの制御を受ける少なくとも1つの第1外因性ポリヌクレオチドをベクター中に組み入れることによって、本明細書に開示する修飾AAVベクターを使用することができる。

30

【0044】

本発明の遺伝子修飾rAAVベクターおよび発現系は、さらに場合によっては、修飾rAAVベクターによって発現される関心対象のヌクレオチド配列の転写を改変し、改良し、調節し、かつ/または前記転写に影響を及ぼす、1つ以上のエンハンサー、1つ以上の調節要素、1つ以上の転写要素、またはそれらの任意の組み合わせを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、第2の異なる核酸セグメントも含みうる。

40

【0045】

例えば本発明のrAAVベクターは、さらに、CMVエンハンサー、合成エンハンサー、細胞特異的エンハンサー、組織特異的エンハンサー、またはそれらの任意の組み合わせを含む、またはそれらから本質的になる、またはそれらからなる第2核酸セグメントを含みうる。第2核酸セグメントは、さらに、1つ以上のイントロン配列、1つ以上の転写後調節要素、またはそれらの任意の組み合わせを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなることもできる。

【0046】

50

本発明の改良されたベクターおよび発現系は、場合によっては、さらに、1つ以上の選ばれた遺伝要素、関心対象の遺伝子、または治療用もしくは診断用コンストラクトをrAAVベクター中にベクター内の選ばれた位置で挿入（クローニング）することが容易になるように、1つ以上のポリリンカー、制限部位、および/またはマルチクローニング領域を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、ポリヌクレオチドも含みうる。

【0047】

本発明のさらなる態様では、本明細書に開示する改良されたキャプシド修飾rAAVベクターによって適切な宿主細胞中に送達されうる外因性ポリヌクレオチドが、好ましくは、哺乳動物起源のものであり、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ、エピン（epine）、ヤギ、またはオオカミ（lupine）由来の1つ以上のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドは、特に好ましい。

10

【0048】

本開示のキャプシド修飾ウイルスベクターによって宿主細胞中に送達されうる外因性ポリヌクレオチドは、一定の実施形態では、1つ以上のタンパク質、1つ以上のポリペプチド、1つ以上のペプチド、1つ以上の酵素、または1つ以上の抗体（またはその抗原結合フラグメント）をコードするか、あるいは、1つ以上のsiRNA、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、PNA分子、またはそれらの任意の組み合わせを発現しうる。複合遺伝子治療（combinational gene therapy）が望ましい場合は、単一のrAAV発現系から2つ以上の異なる分子を生産するか、あるいは、治療用作用物質をコードする1つ以上の異なるポリヌクレオチドをそれぞれが含む2つ以上のユニークなrAAV発現系を、選ばれた宿主細胞にトランスフェクトすることができる。

20

【0049】

別の実施形態において、本発明は、感染性アデノ随伴ウイルス粒子内またはビリオン内に含まれるキャプシド修飾rAAVベクター、ならびに複数の前記ビリオンまたは感染性粒子も提供する。前記ベクターおよびビリオンは、1つ以上の希釈剤、緩衝剤、生理溶液または医薬媒体内に含まれるか、1つ以上の診断レジメン、治療レジメンおよび/または予防レジメンにおいて哺乳動物に投与するために製剤化することができる。本発明のベクター、ウイルス粒子、ビリオン、および複数のそれらは、選ばれた畜産動物、外来動物（exotics）、家畜、および伴侶動物（ペットなどを含む）、ならびに非ヒト霊長類、動物標本その他の捕獲標本などへの獣医学的投与のために、許容される賦形剤製剤に入れて提供することもできる。

30

【0050】

本発明は、本開示のキャプシドタンパク質修飾rAAV発現ベクターの少なくとも1つを含む宿主細胞、またはそのような発現ベクターを含む1つ以上のウイルス粒子もしくはビリオンにも関係する。前記宿主細胞はとりわけ哺乳動物宿主細胞であって、ヒト宿主細胞はとりわけ好ましく、単離されているか、細胞培養内または組織培養内に存在しうる。遺伝子修飾動物モデルの場合、形質転換宿主細胞は、非ヒト動物そのものの体内にも含まれうる。

【0051】

一定の実施形態では、本開示のrAAVベクターの1つ以上を含む、組換え非ヒト宿主細胞、および/または単離された組換えヒト宿主細胞の作出も、例えば本明細書に記載するrAAVベクターの大量生産のための手段などといった、さまざまな診断プロトコールおよび実験プロトコールに有用であると考えられる。特に、そのようなウイルス生産方法は、既存の方法、特に遺伝子治療ツールとして役立つためには力価が極めて高いウイルスストックを必要とするものとの対比で、改良であると考えられる。本発明の非常に重要な利点の一つは、哺乳動物形質導入プロトコールにおいて低力価のウイルス粒子を利用しても、トランスフェクション率を適切なレベルに保つことができる点であるだろうと、本発明者らは考える。

40

【0052】

キャプシドが修飾され形質導入効率が改良された本開示のrAAVベクター、発現系、感染

50

性AAV粒子、または宿主細胞の1つ以上を含む組成物、特に、1つ以上の哺乳動物の疾患、障害、機能不全、または外傷の治療において使用するための、そしてまた、1つ以上の哺乳動物の疾患、障害、機能不全、または外傷を処置するための医薬の製造において使用するための、少なくとも1つの医薬上許容される第1賦形剤をさらに含む組成物も、本発明の一部を形成する。そのような医薬組成物は、場合によっては、1つ以上の希釈剤、緩衝剤、リポソーム、脂質、脂質複合体をさらに含んでもよく、あるいは本チロシン修飾rAAVベクターが、マイクロスフェアまたはナノ粒子内に含まれていてもよい。

【0053】

筋肉内注射、静脈内注射、またはヒトもしくは他の哺乳動物の器官もしくは組織または複数の細胞もしくは組織への直接注射に適した医薬製剤は、とりわけ好ましいが、本明細書に開示する組成物は、例えば身体の1つ以上の器官、組織、または細胞タイプへの直接注射に適した製剤など、哺乳動物の体の離散した区域への投与にも役立つであろう。限定するわけではないが、そのような注射部位としては、脳、関節または関節包、滑膜または滑膜下組織、腱、靭帯、軟骨、骨、関節周囲の筋肉または哺乳動物の関節の関節窩、ならびに心臓、肝臓、肺、脾臓、腸、脳、膀胱、腎臓などの器官、または患者の体内の他の部位への直接投与、例えば腹腔内、胸郭内、血管内、または脳室内送達によるウイルスベクターの導入などが挙げられる。

10

【0054】

本発明の別の態様は、キャプシドが修飾され形質導入効率が改良された本明細書に開示するrAAVベクターの1つ以上を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、組換えアデノ随伴ウイルスピリオン粒子、組成物、および宿主細胞、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、関節内注射、または選ばれた哺乳動物の1つ以上の細胞、組織、もしくは器官への直接注射などといった適切な手段による哺乳動物への投与が意図されているベクターの医薬製剤に関する。典型的には、後述の医薬上許容される賦形剤を使って、そのような組成物を製剤化することができ、それらの組成物は、治療を行うことが望まれる選ばれた器官、組織、および細胞への投与が容易になるように、1つ以上のリポソーム、脂質、脂質複合体、マイクロスフェアまたはナノ粒子製剤を含みうる。

20

【0055】

本発明は、本開示のキャプシド修飾rAAVベクターの1つ以上（ならびにそのようなベクターを含む1つ以上のピリオン、ウイルス粒子、形質転換宿主細胞または医薬組成物）と、1つ以上の治療的、診断的、および/または予防的臨床実施形態における当該キットの使用に関する説明書とを含むキットも提供する。そのようなキットは、1つ以上の試薬、制限酵素、ペプチド、治療薬、医薬化合物、または宿主細胞もしくは動物に組成物を送達するための手段（例えばシリンジ、注射剤など）を、さらに含みうる。例示的なキットとして、疾患、欠損、機能不全、および/または傷害の症状を処置し、防止し、または改善するためのものが挙げられ、あるいは例示的キットは、市販のために、または例えばウイルス学者、医療従事者などを含む他者が使用するために、ウイルスベクターそのものを大規模生産するための構成要素を含みうる。

30

【0056】

本発明のもう一つの重要な態様は、動物における、特に脊椎動物哺乳類における疾患、機能不全、障害、異常状態、欠損、傷害、または外傷を診断し、防止し、処置し、またはその少なくとも1つ以上の症状を改善するための医薬の調製における本明細書に記載する本開示のrAAVベクター、ピリオン、発現系、組成物、および宿主細胞の使用方法に関する。そのような方法は、一般に、それを必要とする哺乳動物に、本開示のベクター、ピリオン、ウイルス粒子、宿主細胞、組成物、または複数のそれらの1つ以上を、罹患動物における上述の疾患、機能不全、障害、異常状態、欠損、傷害、または外傷を診断し、防止し、処置し、またはその1つ以上の症状を軽減するのに十分な量でかつ十分な時間にわたって、投与することを伴う。本方法は、上述の状態を有すると疑われる動物の予防的処置、または上述の状態を発症するリスクがある動物への、診断後の、または症状の発生前の、上述の組成物の投与も包含しうる。

40

50



## 【0057】

上述のように、外因性ポリヌクレオチドは、好ましくは、1つ以上のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、リボザイム、もしくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはそれらの組合せをコードするであろう。実際には、外因性ポリヌクレオチドは、所望に応じて、2つ以上の上述の分子、または複数の上述の分子をコードしうる。複合遺伝子治療が望まれる場合は、2つ以上の異なる分子を単一のrAAV発現系から生産させるか、あるいは選ばれた宿主細胞に、それぞれが少なくとも2つの異なる上述の分子をコードするユニークな異種ポリヌクレオチドを与える、2つ以上のユニークなrAAV発現系をトランスフェクトすることができる。

## 【0058】

本開示のrAAVベクター、発現系、感染性AAV粒子、宿主細胞の1つ以上を含む組成物、とりわけ、医薬の製造および上述のrAAVベクターの治療的投与を伴う方法において使用するための少なくとも1つの医薬上許容される第1賦形剤をさらに含む組成物も、本発明の一部を形成する。そのような医薬組成物は、場合によっては、リポソーム、脂質、脂質複合体をさらに含むか、あるいはrAAVベクターが、マイクロスフェアまたはナノ粒子内に含まれうる。筋肉内注射、静脈内注射、またはヒトの器官もしくは組織への直接注射に適した医薬製剤はとりわけ好ましい。

## 【0059】

本発明のもう一つの重要な態様は、哺乳動物におけるさまざまなポリペプチド欠損を処置し、またはその症状を改善するための医薬の調製における、本明細書に記載する本開示のベクター、ビリオン、発現系、組成物、および宿主細胞の使用方法に関する。上述の方法は一般に、本開示のベクター、ビリオン、宿主細胞、または組成物の1つ以上を、罹患哺乳動物における上述の欠損を処置し、またはその症状を改善するのに十分な量で、かつ十分な時間にわたって、それを必要とする哺乳動物またはヒトに投与することを伴う。本方法は、上述の状態を有すると疑われる動物の予防的処置、または上述の状態を発症するリスクがある動物への、診断後の、または症状の発生前の、上述の組成物の投与も包含しうる。

## 【0060】

図面の簡単な説明

本発明の原理の理解を増進するために、以下、図面に図解した実施形態または実施例に言及し、それを具体的な言葉を使って説明する。ただし、それが本発明の範囲の限定を意図していないことは、理解されるであろう。本発明が関係する技術分野の当業者であれば通常思いつくであろうとおり、記載する実施形態の任意の改変およびさらなる変更、ならびに本明細書に記載する発明の原理のさらなる任意の応用が考えられる。

## 【0061】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の一定の態様を実証するために掲載される。本発明は以下の説明を添付の図面と一緒に参照することによって、よりよく理解することができ、図面中の類似する符号は類似する要素を指定している。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0062】

【図1】図1A、図1B、および図1Cは、インビトロでのHeLa細胞におけるAAVベクター媒介EGFP発現に対するNF- $\kappa$ B経路阻害因子および活性化因子の効果を示す。細胞を、さまざまな濃度の阻害因子および活性化因子で12時間にわたって前処理し、1細胞あたり $2 \times 10^3$  AAV-EGFP vgで形質導入した。図1Aは、導入遺伝子発現が感染の48時間後に蛍光顕微鏡によって検出されたことを示す。代表的な画像を示している。図1Bは、図1Aからのデータの定量的解析を示す。5つの視野からの画像を記載のとおり解析した。 $^*P < 0.001$ 。図1Cは、NF- $\kappa$ B調整因子の存在下にscAAVベクターで形質導入したHeLa細胞抽出物のウェスタンブロット分析である。AAVばく露に応答して生じるNF- $\kappa$ Bシグナリングを検出するために、抗p65抗体および抗I $\kappa$ B抗体[古典的経路]、抗p100/p52抗体[非標準経路]を使用して、試料を分析した。これらの結果は2回の独立した実験を代表している。

10

20

30

40

50

【図2】図2Aおよび図2Bは、NF- $\kappa$ B調整因子の存在下での初代ヒト単球由来樹状細胞のAAV-EGFPベクター媒介形質導入を示す。図2Aは、形質導入の48時間後にフローサイトメトリーによって導入遺伝子発現が検出されたことを示す。図2Bは、NF- $\kappa$ B調整因子の存在下に擬形質導入するかまたは2,000vg/細胞のscAAVベクターで形質導入した、樹状細胞からの核抽出物における、NF- $\kappa$ B活性化の古典的経路および非標準経路の構成要素に関するウェスタンブロット分析である。

【図3】図3Aおよび図3Bは、インビボでのマウスにおけるAAVベクター誘発性先天性免疫およびNF- $\kappa$ B応答を示す。先天性免疫メディエーター（図3A）またはNF- $\kappa$ B活性化（図3B）の遺伝子発現プロファイリングを、記述したように行った。Bay11ありのAAVベクター（斜線付きまたは白色のバー）とBay11なしのAAVベクター（黒または灰色のバー）とを比較した2時間時点における遺伝子発現の倍率変化に関するデータを示す。最小閾倍率増加（水平の黒い線）は、二重CT（duplicate CT）の変動性（GAPDHとの比較、2<sup>ΔΔ</sup>CT（変動性））を測定することによって、2.5（図3A）または3.0（図3B）とした。

10

【図4】図4Aおよび図4Bは、各 $1 \times 10^{11}$ vgのWT-scAAV-EGFPまたはTM-scAAV-EGFPベクター/匹を尾静脈から注射した10日後のマウス肝細胞における導入遺伝子発現を画像解析している。図4Aは代表的画像を示す。オリジナルの倍率： $\times 400$ 。図4Bは、図4Aのデータからの定量的解析を示す。5つの視野からの画像を図1Aの説明で述べたように定量的に解析した。

【図5】図5は、AAVゲノムが逆方向末端反復（ITR）内にNF- $\kappa$ B応答性転写因子に対する推定結合部位を含有することを示している。AAV-ITR内の推定NF- $\kappa$ B応答性転写因子結合部位は、ウェブベースのTRANSFACデータベースを使って、インシリコ解析によって同定された。p300、TFIIB、およびSpII転写因子に対する結合部位を、それぞれ緑、赤、および青の下線付きフォントで表示している。枠で囲んだ配列はITR内の20ヌクレオチド一本鎖D配列を表す。

20

【図6】図6A、図6B、図6C、図6D、および図6Eは、インビトロでのHeLa細胞におけるAAV2-EGFPベクターからの導入遺伝子発現に対するNF- $\kappa$ B活性化因子および阻害因子の効果を示す。細胞を、12時間にわたって、擬似処理するか、阻害因子および活性化因子のさまざまな組合せで前処理した。洗浄した細胞に、 $2 \times 10^3$ vg/細胞のscAAV2-EGFP（図6A）、ssAAV2-EGFP（図6B）、またはTM-scAAV2-EGFP（図6C）を感染させた。感染の48時間後に蛍光顕微鏡法によって導入遺伝子発現を検出した。代表的画像を示す；NF- $\kappa$ B調整因子の存在下にscAAVベクターで形質導入したHeLa細胞からの細胞質抽出物（図6D）および核抽出物（図6E）のウェスタンブロット分析。NF- $\kappa$ Bシグナリングを検出するために抗p100/p52抗体を使って試料を分析した。適当な対照として抗GAPDH抗体およびラミンB抗体を使用した。これらの結果は2回の独立した実験を代表している。

30

【図7】図7は、Bay11の事前投与ありおよびなし（それぞれn=3）で、擬似注射した後（n=2）またはscAAVベクターを注射した後の、マウスからの肝臓ホモジネートのウェスタンブロット分析を示す。AAVばく露に反応して生じるNF- $\kappa$ Bシグナリングを検出するために抗p52抗体を使用することによって、試料を分析した。抗 $\alpha$ -アクチン抗体をローディング対照として使用した。

【図8】図8A、図8B、図8C、図8D、図8E、および図8Fは、PBS前処置後またはBay11前処置後にWT-AAVまたはTM-AAVベクターを注射した動物の肝臓試料から収集した全mRNAからのさまざまなサイトカイン/ケモカインの遺伝子発現の倍率変化を示す。図8A：IL-1；図8B：IL-6；図8C：TNF- $\alpha$ ；図8D：IL-12、図8E：KC、および図8F：RANTES。値は2.6超および0.38未満で有意であり、これは、特異的遺伝子発現を測定するために使用した96ウェルプレートでの変動性を決定することによって算出した。

40

【図9】図9は、NF- $\kappa$ B阻害因子の非存在下または存在下でのAAVベクターに対する体液性応答を表す。Bay11の事前投与ありおよびなし（それぞれn=4）で、scAAVベクターを注射した後、10日目のマウスからの末梢血において、抗AAV2 IgG2aレベルを決定した。

【図10】図10は、HeLa細胞から調製した全細胞抽出物と、<sup>32</sup>P標識一本鎖D[+]-配列ブ

50

ローブ（レーン1）とを使って行った、電気泳動移動度シフトアッセイを図解しており、このプローブは宿主細胞タンパク質（レーン3、楔形）と相互作用した。適当な対照として一本鎖D[-]-配列（レーン2）プローブを使用した。このプローブも細胞タンパク質FKBP52（レーン4、矢印）と相互作用した。ビオチン標識ssD[+]配列プローブを使用した後、ストレプトアビジンビーズで選択し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画する、結合アッセイも行った。関連タンパク質バンドを銀染色によって可視化し、ゲルから切り出し、質量分析にかけたところ、ユニークなペプチドの一つが、NF- $\kappa$ B抑制因子（NRF）との間にホモロジーを有することがわかった。

【図11】図11Aおよび図11Bは、T47D細胞およびT47D+hHGFR細胞におけるAAV3媒介導入遺伝子発現の分析を示す。図11Aは、等価な数のT47D細胞およびT47D+hHGFR細胞に、同一条件下で、表示したさまざまな感染多重度（MOI）のscAAV3-CBAp-EGFPベクターを感染させたことを示す。感染の72時間後に蛍光顕微鏡法によって導入遺伝子発現を決定した。図11Bは、5 $\mu$ g/mLのhHGFの非存在下または存在下で、T47D+hHGFR細胞に、2,000vg/細胞のscAAV3ベクターで形質導入したことを示す。感染の72時間後に蛍光顕微鏡法によって導入遺伝子発現を決定した。

10

【図12】図12A、図12Bおよび図12Cは、AAV3媒介導入遺伝子発現に対するBMS-777607の効果を示す。図12Aは、2,000vg/細胞のscAAV3-CBAp-EGFPベクターを感染させた、擬似処理した、またはさまざまな濃度のBMS-777607で処理した、T47D+hHGFR細胞を示す。感染の72時間後に蛍光顕微鏡法によって導入遺伝子発現を決定した。図12Bは、T47D細胞およびT47D+hHGFR細胞に、1 $\mu$ MのBMS-777607の非存在下または存在下で、10,000vg/細胞のscAAV3-CBAp-EGFPベクターを感染させたことを図解している。図12Cは、T47D細胞およびT47D+hHGFR細胞を、2時間にわたって、擬似処理するか、BMS-777607で前処理したことを示す。全細胞溶解物を調製し、表示するさまざまな一次抗体を使って、ウェスタンブロットで分析した。 $\alpha$ -アクチンをローディング対照として使用した。

20

【図13】図13Aおよび図13Bは、さまざまなAAV血清型媒介導入遺伝子発現に対するBMS-777607の効果を示す。図13Aでは、擬似処理するか1 $\mu$ MのBMS-777607で処理したT47D+hHGFR細胞に、2,000vg/細胞のscAAV2-、scAAV3-またはscAAV4-CBAp-EGFPベクターを感染させた。図13Bでは、擬似処理するか1 $\mu$ MのBMS-777607で処理したT47D+hHGFR細胞に、2,000vg/細胞のscAAV5-、scAAV7-、scAAV8-またはscAAV9-CBAp-EGFPベクターを感染させた。感染の72時間後に蛍光顕微鏡法で導入遺伝子発現を決定した。

30

【図14】図14A、図14B、図14Cおよび図14Dは、MG132による処理ありまたは処理なしでのHuh7細胞およびHep293TT細胞におけるAAV3媒介形質導入効率の比較分析を示す。図14Aでは、擬似処理するか5 $\mu$ MのMG132で処理したHeLa細胞に、scAAV2-CBAp-EGFPベクターを感染させた。図14Bでは、擬似処理するかさまざまな濃度のMG132で処理したHuh7細胞およびHep293TT細胞に、scAAV3-WT-CBAp-EGFPベクターを感染させた。図14Cでは、擬似処理するか200 $\mu$ MのTyr23で処理したHeLa細胞に、scAAV2-CBAp-EGFPベクターを感染させた。図14Dでは、擬似処理するかTyr23で処理したHep293TT細胞に、scAAV3-CBAp-EGFPベクターを感染させた。形質導入の72時間後に導入遺伝子発現を決定した。

40

【図15】図15A、図15Bおよび図15Cは、AAV3キャプシド上の表面露出チロシン残基の部位指定変異解析を示す。同一条件下で、Huh7細胞に、WTまたはF501Y scAAV3-CBAp-EGFPベクターで形質導入し、形質導入の72時間後に導入遺伝子発現を決定した。WT scAAV3媒介導入遺伝子発現の形質導入効率（図15A）ならびにHuh7細胞（図15B）およびHep293TT細胞（図15C）におけるさまざまなY-F scAAV3媒介導入遺伝子発現の形質導入効率を示す。形質導入の72時間後に導入遺伝子発現を決定した。

【図16】図16A、図16B、および図16Cは、WT AAV3ベクターならびに単一、二重および三重チロシン変異体AAV3ベクターの形質導入効率を図解している。図16Aでは、同一条件下で、Huh7細胞に、WT scAAV3-CBAp-EGFPベクターまたは表示したさまざま

50

なY-F変異体scAAV3-CBAp-EGFPベクターで形質導入した。形質導入の72時間後に導入遺伝子発現を決定した。図16Bでは、5 µg/mLのhHGFの非存在下または存在下で、Huh7細胞に、5,000vg/細胞のWT scAAV3ベクターまたはY-F変異型scAAV3ベクターで形質導入した。図16Cは、感染の72時間後に蛍光顕微鏡法で導入遺伝子発現を決定したことを示す。

【図17】図17A、図17B、図17Cおよび図17Dは、直接腫瘍内注射後のインビボでのAAV3ベクターの形質導入効率を示す。NSGマウス中のHuh7由来腫瘍（図17A）およびHep293TT由来腫瘍（図17B）におけるWT-AAV3ベクターの形質導入効率を示す。NSGマウス中のHep293TT由来腫瘍におけるWT-AAV3ベクター（図17C）とY705+731F-AAV3ベクター（図17D）の形質導入効率も示す。各マウスセットからの2つの代表的腫瘍切片のEGFP蛍光（緑色）およびDAPI染色（青色）を示す。

10

【図18】図18A、図18Bおよび図18Cは、尾静脈注射後のNSGマウス中のHep293TT由来腫瘍におけるWT-AAV3ベクターおよびY705+731F-AAV3ベクターの形質導入効率を図解している。PBS（図18A）、WT-AAV3ベクター（図18B）、またはY705+731F-AAV3ベクター（図18C）を注射した各マウスセットからの3つの代表的腫瘍切片における腫瘍のEGFP蛍光（緑色）およびDAPI染色（青色）を示す。

【図19】図19Aおよび図19Bは、HEK293細胞におけるssAAVおよびscAAV媒介EGFP発現に対するさまざまなキナーゼ阻害因子の効果を示す。細胞を感染前に1時間にわたって阻害因子で前処理してから、 $1 \times 10^3$ vg/細胞で形質導入した。図19Aでは、感染の48時間後に蛍光顕微鏡法によって導入遺伝子発現を検出した。図19Bでは、3つの視野からの画像を、記述するように解析した。WT AAV2に対して\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

20

【図20】図20Aおよび図20Bは、個々の部位指定scAAV2キャプシド変異体によるHEK293細胞の形質導入後のEGFP発現の分析を示す。AAV2キャプシド中の15個の表面露出セリン（S）のそれぞれをバリン（V）で置換した後、導入遺伝子発現を媒介するその効率について評価した。図20Aは、 $1 \times 10^3$ vg/細胞のMOIでの感染の48時間後のEGFP発現解析を示す。図20Bは、セリン変異体AAV2ベクターのそれぞれの形質導入効率の定量化を示す。WT AAV2に対して\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

【図21】図21および図21BはAAV2の構造を図解している。図21Aは、リボン表示のAAV2 VP3の三量体を正二十面体三回回転軸から見下ろした図（左）および90°回転させた図（右）であり、VP単量体が青色、紫色および淡青色に彩色されていて、セリン残基458、492、および662の場所が、それぞれ黄色、緑色および赤色の球で示されている。正二十面体2回回転軸、3回回転軸、および5回回転軸のおよその位置が、それぞれ黒い楕円計、三角形、および五角形で図示されている。図21Bでは、AAV2のキャプシド表面が青色で示されており、セリン残基458、492、および662は、類似の図で先に示したとおりの色で強調されている。S458残基とS492残基は、2回回転軸を取り囲む凹みに面する突出部の外表面上に互いに隣接して位置する。S662は、正二十面体5回回転軸を取り囲む凹みの底にあるHIループ（白色）（コア8ストランドベータパレルの-Hストランドと-Iストランドの間）上に位置する。正二十面体5回回転軸にチャンネルを形成する5回対称関連DEループ（-Dストランドと-Eストランドの間）は、茶色で示されている。正二十面体2回（2F）、3回（3F）、および5回（5F）回転軸のおよその位置が、開いた矢印で示されている。

30

40

【図22】図22Aおよび図22Bは、scAAV2キャプシド中の位置662における異なるアミノ酸によるセリン置換の、導入遺伝子発現の媒介における効果の評価を要約している。異なるアミノ酸を使って次に挙げる8つのセリン変異体、すなわちS662 バリン（V）、S662 アラニン（A）、S662 アスパラギン（N）、S662 アスパラギン酸（D）、S662 ヒスチジン（H）、S662 イソロイシン（I）、S662 ロイシン（L）、およびS662 フェニルアラニン（F）を生成させ、293細胞におけるそれらの形質導入効率を解析した。図22Aは、 $1 \times 10^3$ vg/細胞のMOIでの293細胞の感染の48時間後のEGFP発現解析を示す。図22Bは、セリン変異体AAV2ベクターのそれぞれの形質導入効率の定量化を示す。WT AAV2に対して、\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

50

【図23】図23Aおよび図23Bは、さまざまな細胞タイプにおけるscAAV2-S662Vベクターの形質導入効率とp38 MAPK活性との相関関係の解析を示す。図23Aは、HEK293、HeLa、NIH3T3、H2.35およびmoDCにおけるWT-AAV2ベクターおよびS662V-AAV2ベクターの形質導入効率の定量化を図解している。図23Bは、異なる細胞株からの溶解物のp-p38 MAPK発現レベルに関するウェスタンブロット分析である。総p38 MAPKレベルおよびGAPDHレベルを測定し、ローディング対照として使用した。WT AAV2に対して\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

【図24】図24A、図24B、および図24Cは、単球由来樹状細胞(moDC)におけるscAAV2ベクター媒介導入遺伝子発現を図解している。図24Aは、EGFP発現に対するJNK阻害因子およびp38 MAPK阻害因子ならびに位置662のセリン残基の部位指定置換の効果を図解している。図24Bは、感染および成熟の開始の48時間後における図24Aからのデータの定量化を要約している。図24Cは、scAAV2-S662Vベクターを $5 \times 10^4$ vg/細胞のMOIで感染させたmoDCにおけるCD80、CD83、CD86などの共刺激マーカーの発現の解析である。本明細書に記載するように生成させた、サイトカインで刺激したiDC(未成熟樹状細胞)およびmDC(成熟樹状細胞)を、それぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。代表的な一例を示す。WT AAV2に対して\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

【図25】図25は、K562細胞に対するhTERT特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)殺活性の解析を図解している。短縮型ヒトテロメラーゼ(hTERT)をコードするscAAV2-S662VベクターによるmoDCの形質導入後に、CTLを生成させた。scAAV2-S662V-EGFPベクター形質導入moDCを使って非特異的CTLを生成させた。緑色蛍光膜色素3,3-ジオクタデシルオキサカルボシアニン(DiOC18(3))で予備染色して、 $1 \times 10^5$ 個のターゲットK562細胞を、終夜、さまざまな比率のCTL(80:1、50:1、20:1、10:1、5:1)と共培養した。膜透過性核酸対比染色(ヨウ化プロピジウム)を加えて、形質膜が損なわれている細胞を標識した。殺された二重染色陽性細胞の百分率をフローサイトメトリーによって分析した。

【図26】図26Aおよび図26Bは、HEK293細胞に個々の部位指定AAV2キャプシド変異体で形質導入した後のEGFP発現の解析を示す。AAV2キャプシド中の17個の表面露出スレオニン(T)残基のそれぞれをバリン(V)で置換し、導入遺伝子発現を媒介するその効率について評価した。図26Aには、感染の48時間後におけるEGFP発現解析が示されている(MOIは $1 \times 10^3$ vg/細胞)。図26Bは、スレオニン変異体scAAV2ベクターのそれぞれの形質導入効率の定量化を示している。WT AAV2に対して\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

【図27】図27Aおよび図27Bは、多重部位指定AAV2キャプシド変異体を感染させたHEK293細胞におけるEGFP発現の解析を示す。いくつかの最も効率の良いスレオニン変異を単一のAAV2キャプシド上で組み合わせて二重および三重変異体を生産し、各ベクターの効率を評価した。図27Aは、 $1 \times 10^3$ vg/細胞のMOIでの感染の48時間後におけるEGFP発現解析を図解している。図27Bは、スレオニン変異体AAV2ベクターのそれぞれの形質導入効率の定量化を示している。WT AAV2に対して\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

【図28】図28Aおよび図28Bは、キャプシド最適化AAV2ベクターで形質導入されたH2.35細胞におけるEGFP発現の評価を示している。最も効率のよいチロシン、セリンおよびスレオニン変異を単一のAAV2キャプシド上で組み合わせることで、数個の最適化されたAAV2変異体を生産した。不死化マウス肝細胞で各ベクターの効率を見積もった。図28Aは、 $1 \times 10^3$ vg/細胞のMOIによる感染の48時間後におけるEGFP発現解析を示す。図28Bは、最適化されたscAAV2ベクターのそれぞれについての形質導入効率の定量化を要約している。WT AAV2に対して\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

【図29】図29Aおよび図29Bは、キャプシド最適化AAV2ベクターによって媒介されるH2.35細胞におけるEGFP発現の動態を図解している。図29Aは、 $1 \times 10^3$ vg/細胞のMOIでの感染の16時間後、24時間後および48時間後におけるEGFP発現解析を示す。図29Bは、最適化scAAV2ベクターのそれぞれの形質導入効率の定量化からの結果を図解している。WT AAV2に対して\* $P < 0.005$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

【図30】図30Aおよび図30Bは、核へのAAV多重変異体ベクターの細胞内輸送の解析を

10

20

30

40

50

示す。感染の16時間後（図30A）および48時間後（図30B）における細胞内でのベクターゲノム分布を評価するために、AAV2-WT、AAV2-Y444F+Y500F+Y730FまたはAAV2-Y444F+Y500F+Y730F+T491V多重変異体を感染させたH2.35細胞の核画分と細胞質画分とを分離し、qPCR解析を行った。核ではWTに対して $^{*}P < 0.001$ を有意とみなした。

【図31】図31Aおよび図31Bは、多重部位指定AAV2キャプシド変異体を尾静脈注射した後のルシフェラーゼ遺伝子発現のインビボイメージングを示す。C57BL/6マウスにルシフェラーゼ遺伝子を保因する最も効率のよいいくつかの変異体scAAVベクターを、 $1 \times 10^{10}$ vg/匹の量で注射した。ルシフェラーゼ活性の差を分析するために、ライブイメージを撮像した。視覚的出力は、放出光子数/秒/cm<sup>2</sup>を、最大が赤、最小が青である偽色彩像（図31A）および相対シグナル強度（図31B）として表している。 $^{*}P < 0.005$ を有意と見なした。

【図32】図32Aおよび図32Bは、AAV2キャプシド表面を図解している。図32Aは、AAV2のキャプシド表面（灰色）を示し、変異させた17個の表面スレオニン残基が青色（251、329、330、454、503、581、592、597、660、671、701、713、716）、緑色（455）、黄色（491）、茶色（550）、およびピンク色（659）で示されている。T329、T330、T713およびT716の表面での場所が矢印で示されている。5回対称関連DEループ（DストランドとEストランドの間）は橙色に彩色されている。HIループ（HストランドとIストランドの間）は白色であり、このループ中に位置するS662は赤色である。図32A中の白い破線の三角形は、5回回転軸と2つの3回回転軸とに囲まれたウイルスの非対称ユニットを図示しており、3回軸同士の間には2回回転軸がある。破線の楕円は、変異させた時に形質導入に影響を及ぼすスレオニン残基のおよそのフットプリント（2/60）を描いている。図32Bは、ウイルスの非対称ユニット内のAAV2キャプシド表面残基の「ロードマップ（roadmap）」投影図を示す。AAV2表面スレオニンおよびS662によって覆われる区域は、図32Aと同様に彩色されている。チロシン三重変異体残基444、500、および730中の残基を、紫色の網掛けで示している。破線の楕円は図23Aで述べたとおりである。破線の長方形（青色）は、ヘパリン硫酸受容体結合において重要であることがAAV2およびAAV6について以前に決定された残基を示す（Wu et al., 2006 ; Opie et al., 2003）。

【図33-1】図33A、図33B、および図33Cは、血清型AAV1～AAV10からの野生型キャプシドのアミノ酸アラインメントを図解している。図33Aは、野生型AAV1～10血清型キャプシド（配列番号1～配列番号10）のアミノ酸アラインメントを示す。図33Bは、野生型AAV1～AAV10血清型キャプシドのアミノ酸アラインメント、ならびにAAV1～AAV10キャプシドの間で保存されている表面露出セリンおよびスレオニン残基を示し（保存された表面露出残基がボールド体で示されている）、図33Cは、野生型AAV1～AAV12キャプシド中の保存された表面露出チロシン残基、ならびにアミノ酸修飾の実施形態を示す。AAV1～AAV12の間で保存されているチロシン残基はボールド体で示されている。

【図33-2】同上

【図33-3】同上

【図33-4】同上

【図33-5】同上

【図33-6】同上

【図34】図34は、WT AAV2ベクターと比較した、さまざまなセリン/バリン変異型AAV2ベクターのパッケージング効率および形質導入効率、ならびに野生型AAV1～AAV10キャプシドのアミノ酸アラインメントを示す。

【図35】図35は、さまざまなアミノ酸で置き換えられたセリン変異体ベクターのパッケージング効率および形質導入効率が、WT AAV2ベクターと比較して示されている。

【図36-1】図36A、図36B、図36C、図36D、および図36Eは、インビボでのマウス異種移植片モデル中のヒトHCC腫瘍におけるrAAV3ベクターおよびrAAV8ベクターの形質導入効率を示す。雌および雄Huh7腫瘍保持NSGマウスを使用して、 $1 \times 10^{11}$ vg/マウ

スのrAAV3-CBAp-FLucベクターまたはrAAV8-CBAp-FLucベクターのいずれかを尾静脈注射した。各群n = 4。図36Aは、ベクター投与の3日後のマウス全身バイオルミネセンス像の代表的画像を示す。図36Bは、ベクター投与の3日後におけるマウスの全身バイオルミネセンス像からの導入遺伝子発現データの定量的解析を図解している。図36Cは、Huh7腫瘍保持雄NSGマウスを使って、rAAV3-CBAp-FLucベクターまたはrAAV8-CBAp-FLucベクターのどちらかを、 $1 \times 10^{11}$ vg/マウスの低用量(L)または $1 \times 10^{12}$ vg/マウスの高用量(H)で直接腫瘍内注射したことを示す。各群n = 4。ベクター投与の7日後における低用量の代表的画像を示す。図36Dは、rAAV3ベクターまたはrAAV8ベクターを注射したマウスからの、ベクター投与の3日後または7日後における、腫瘍中および肝臓中の導入遺伝子発現に関する定量的データを呈示している。図36Eは、高用量のrAAV3ベクターまたはrAAV8ベクターを注射したマウスからの肝臓組織試料中に、ベクター投与の7日後に残存しているベクターゲノムコピー数を示す。

10

【図36-2】同上

【図37-1】図37A、図37B、図37C、図37D、図37E、および図37Fは、インビトロのヒト肝がん細胞におけるWT rAAV3ベクターおよびキャプシド修飾rAAV3ベクターの形質導入効率を示す。図37Aは、CBAp-FLuc発現カセットを保因する5,000vg/細胞の表示のウイルスベクターで、Huh7細胞に形質導入したことを示す。図37BはHepG2細胞に、また図37CはHep293TT細胞に、CBAp-EGFP発現カセットを保因する5,000vg/細胞の表示のウイルスベクターで形質導入したことを示す。図37Dは、低用量(100ng/mL)または高用量(100μg/mL)の可溶性ヘパリンの非存在下または存在下に、CBAp-EGFP発現カセットを保因する5,000vg/細胞の表示のウイルスベクターで、Huh7細胞に形質導入したことを示す。図37Eは、5μg/mL hHGFの存在下または非存在下に、CBAp-EGFP発現カセットを保因する5,000vg/細胞の表示のウイルスベクターで、Huh7細胞に形質導入したことを示す。図37Fは、CBAp-EGFP発現カセットを保因する5,000vg/細胞の表示のウイルスベクターで、ヒトT47D細胞またはT47D+hHGFR細胞に形質導入したことを示す。導入遺伝子発現レベルはいずれも、形質導入の48時間後に決定した。

20

【図37-2】同上

【図38】図38A、図38B、図38C、および図38Dは、インビボでの例示的rAAV3キャプシド変異型ベクターの形質導入効率を示す。図38Aは、ヒトHuh7またはHep293TT肝腫瘍保持NSGマウスを使って、CBAp-FLuc発現カセットを保因する表示の変異体ウイルスベクターを、 $5 \times 10^{10}$ vg/マウスで、尾静脈注射したことを示す。各群n = 4。3日目に、マウス全身バイオルミネセンス像を得た後、成長中の腫瘍と正常肝臓をどちらも切離した。代表的な像を示す。図38Bは、Huh7由来腫瘍およびHep293TT由来腫瘍におけるFLuc発現を示す定量的データを示す。Huh7腫瘍(図38C)および正常肝臓(図38D)中のベクターゲノムコピー数を示す。

30

【図39】図39A、図39Bおよび図39Cは、本発明の例示的実施形態を示す。図39Aは、TCS遺伝子を発現する最適化rAAV3ベクターによるマウス異種移植片モデルにおけるヒト肝腫瘍形成の抑制を示す。図39Bおよび図39Cは、Huh7-FLuc腫瘍保持マウスを使って、表示のウイルスベクターを $5 \times 10^{10}$ vg/マウスで0日目に尾静脈注射し、腫瘍成長を11日目まで経時的に監視した結果を示す。図39Bは、8日目における両群からのマウスの代表的全身バイオルミネセンス像を図示している。図39Cは、rAAV3-TCSベクター注射マウスおよびrAAV3-EGFPベクター注射マウスにおいて分光光度測定法によって11日目に測定されたASTおよびALTの血清中活性を要約している。データを平均±SDとして表す(n = 5/群)。

40

【図40-1】図40A、図40Bおよび図40Cは、本発明の一態様において有用な例示的ベクターコンストラクトおよびポリヌクレオチド配列を示す。図40Aは、これらの研究で使用したrAAVベクターの模式的構造を示す。HP:ヘアピン;D:AAV逆方向末端反復(ITR)中のD配列;CBAp:CMVエンハンサー/ニワトリ-アクチンプロモーター;FLuc:ホタルルシフェラーゼ;hGH(A)n:ヒト成長ホルモンポリA配列;HP-:末端分割部位(terminal resolution site)(trs)を持たないヘアピン構造;EGFP:強化緑色蛍光タンパ

50

ク質；AFpp：ヒト  $\beta$ -フェトプロテインプロモーター；TCS：トリコサンチン（Tricosanthin）。図40Bは、元のTCS遺伝子のヌクレオチド配列を示す。開始コドン（ATG）および停止コドン（TAG）をそれぞれ緑色および赤色のフォントで示す。図40Cは、FLAGタグ付きTCS遺伝子のヌクレオチド配列を示す。化学合成したTCS遺伝子のクローニングに使用したEcoRI制限酵素部位およびXhoI制限酵素部位をそれぞれボールドイタリックフォントで示し、停止コドン（TAA）を含有するFLAGタグ配列に下線を付す。

【図40-2】同上

【図41】図41は、ヒトHCC細胞株Huh7におけるさまざまな単一、二重、および多重変異体scAAV3-CBAp-EGFPベクターの形質導入効率を示す。

【0063】

#### 配列の簡単な説明

配列番号1は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型1（AAV1）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0064】

配列番号2は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型2（AAV2）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0065】

配列番号3は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型3（AAV3）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0066】

配列番号4は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型4（AAV4）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0067】

配列番号5は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型5（AAV5）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0068】

配列番号6は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型6（AAV6）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0069】

配列番号7は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型7（AAV7）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0070】

配列番号8は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型8（AAV8）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0071】

配列番号9は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型9（AAV9）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0072】

配列番号10は、野生型アデノ随伴ウイルス血清型10（AAV10）のキャプシドタンパク質のアミノ酸配列である。

【0073】

配列番号11は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

【0074】

配列番号12は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

【0075】

配列番号13は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

【0076】

配列番号14は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

【0077】

配列番号15は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

10

20

30

40

50



【0078】

配列番号16は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

【0079】

配列番号17は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

【0080】

配列番号18は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

【0081】

配列番号19は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

【0082】

配列番号20は、本発明において有用なオリゴヌクレオチドプライマー配列である。

10

【0083】

配列番号21は、本発明において有用なポリヌクレオチドプライマー配列である。

【0084】

配列番号22は、NF-kB応答性転写因子に対する推定結合部位を含有する核酸配列である（図5参照）。

【0085】

配列番号23は、一本鎖核酸配列プローブである（図10参照）。

【0086】

配列番号24は、二本鎖核酸配列プローブである（図10参照）。

【0087】

配列番号25は、一本鎖核酸配列プローブである（図10参照）。

20

【0088】

配列番号26は、TCS遺伝子の核酸配列である（図40B参照）。

【0089】

配列番号27は、FLAGタグ付きTCS遺伝子の核酸配列である（図40C参照）。

【発明を実施するための形態】

【0090】

例示的实施形態の説明

本発明の例示的实施形態を以下に説明する。明解な説明にするために、実際の実施態様の全ての特徴を、本明細書に記載することはしない。そのような実際の実施形態を開発する際にはいつでも、実施態様ごとに異なるであろう開発者の具体的目標、例えばシステム関連および業務関連の制約の遵守などを達成するために、数多くの実施態様特異的な決定を行わなければならないことは、当然、理解されるであろう。さらにまた、そのような開発努力は、複雑で時間を要するかもしれないが、本開示の恩恵を受ける当業者にとっては、日常的作業になるだろうと理解されるであろう。

30

【0091】

組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、数多くの前臨床動物モデルでインビボ遺伝子導入に使用されて成功を収めており、また多種多様な治療用遺伝子の長期発現に使用されて成功を収めている（Daya and Berns, 2008; Niemeyer et al., 2009; Owen et al., 2002; Keen-Rhinehart et al., 2005; Scallan et al., 2003; Song et al., 2004）。AAVベクターは、免疫特権部位にターゲティングした時には、すなわちレーバー先天性黒内障のための眼送達では、ヒトにおいて長期の臨床的利益も生じた（Bainbridge et al., 2008; Maguire et al., 2008; Cideciyan et al., 2008）。このベクターの主な利点は、限局的炎症応答しか引き出さず、そしていくつかの例では、導入遺伝子産物に対する免疫寛容さえ指示する、比較的低いその免疫プロファイルである（LoDuca et al., 2009）。それでもなお、非免疫特権器官にターゲティングした場合のヒトにおける治療効率は、ウイルスキャプシドに対する抗体応答およびCD8<sup>+</sup> T細胞応答ゆえに限られており、また動物モデルでは、導入遺伝子産物に対する適応応答も報告されている（Manno et al., 2006; Mingozzi et al., 2007; Muruve et al., 2008; Vandenberghe and Wilson, 2007; Mingozzi and High, 2007）。これらの結果から、AAVベクター媒介遺

40

50

伝子導入によって免疫応答は依然として懸念事項であることが示唆された。

#### 【0092】

マウスモデルからの前臨床データ (Snyder et al., 1999) に基づき、AAVは、これらのモデルではこれらの抗原の事前ばく露がなく、またベクターに対するさまざまな寛容誘導機序が存在することから、免疫原性はごくわずかであると、長年にわたってみなされてきた (Dobrzynski et al., 2004 ; Cao et al., 2007) 。その最もよい実例は、血友病Bのマウスモデルおよびイヌモデルにおける遺伝子導入研究であり、これらの研究は、注目すべき治療効率 (5 ~ 25% のF.IXレベル) と長期 (2 ~ 8年) にわたる安定なF.IX発現を示した (Snyder et al., 1999) 。血友病Bを持つ被験者の肝臓にヒトF.IX遺伝子を送達するためにAAVを使用した最初の臨床試験では、高用量のベクター ( $2 \times 10^{12}$  vg/kg体重) で治療レベル (約11.8%) のF.IX発現が観察された (Manno et al., 2006) 。

10

#### 【0093】

しかし、遺伝子導入の4 ~ 6週間後には、AAVキャプシド特異的T細胞応答が観察され、それと同時に、肝臓トランスアミナーゼの上昇およびF.IX導入遺伝子発現のベースラインレベルへの降下が起こった。このCD8<sup>+</sup> T細胞媒介性免疫応答は、どの前臨床動物モデルでも観察されていなかったため、予想外であった (Mingozzi et al., 2007) 。この研究および他のいくつかの研究により、宿主の炎症応答および先天性免疫応答が、形質導入された肝細胞の細胞傷害性Tリンパ球媒介性排除に関係づけられた (Zhu et al., 2009 ; Li et al., 2009 ; Madsen et al., 2009) 。その後、AAVベクターに対する宿主免疫応答を回避するために多大な努力がなされてきた。これらには、AAV1 (Brantly et al., 2009 ; Cohn et al., 2007) またはAAV8 (Nathwani et al., 2006) などの代替天然AAV血清型の使用、シャッフルキャプシド (shuffled capsid) の使用 (Gray et al., 2010) 、または表面露出チロシン変異体AAV2ベクターの使用 (Markusic et al., 2010) が含まれる。加えて、免疫応答に関連するリスクに対抗するための戦略には、宿主組織において標的発現する導入遺伝子コンストラクトの使用 (Wang et al., 2010) や、一過性免疫抑制プロトコルの開発 (Jiang et al., 2006) などがあった。

20

#### 【0094】

上述の戦略はAAV遺伝子導入の安全性を徐々に改良してきたが、ヒトでの効力はまだ不明である。例えば、シクロスポリンおよびMMFによる免疫抑制は、リポタンパク質リパーゼ欠損を持つ患者における筋指向的遺伝子導入に際して、低AAV1ベクター用量 ( $3 \times 10^{11}$  vg/kg) では有効であったが、高用量 ( $1 \times 10^{12}$  vg/kg) では、キャプシドに対するIFN CD8<sup>+</sup> T細胞応答を防止することができなかった (Ross et al., 2006) 。これらのデータは、AAV感染に対する応答における最初の「危険シグナル」を同定するために、ウイルス-宿主細胞相互作用の生物学に関するさらなる研究を継続することの重要性を強調している。炎症応答および先天性免疫応答に関連するタンパク質の潜在的活性および選択性がAAVによる形質導入時に宿主細胞においてどのように調節されるかを理解することが、キャプシドおよび/または導入遺伝子産物に対する宿主免疫応答の障害に対処するための手掛かりになるかもしれないと推論された。他のウイルスベクターと比較して、AAVベクターは、DCなどのプロフェッショナルAPCに形質導入する効率がよくないが、NF- $\kappa$ Bを活性化する追加シグナルは、これらの細胞における導入遺伝子発現の増加につながり、その結果、導入遺伝子産物に対する適応応答のリスクを増加させるであろう。

30

40

#### 【0095】

AAV血清型2に基づく組換えベクターは、現在、いくつかの遺伝子治療臨床試験に使用されており (Daya and Berns, 2008) 、最近、レーバー先天性黒内障の処置において注目すべき効力を示した (Bainbridge et al., 2008 ; Cideciyan et al., 2008 ; Maguire et al., 2008) 。しかし、母集団における高い血清反応陽性率 (約80 ~ 90%) から、AAV2ベクターに対する体液性免疫に関連する懸念が生じた (Boutin et al., 2008 ; Mendell et al., 2010 ; Manno et al., 2006) 。多くの新規AAV血清型が発見されたことにより、この潜在的問題を回避するためのAAVベクターの開発が促された (Muramatsu et al., 1996 ; Chiorini et al., 1997 ; Chiorini et al., 1999 ; Rutledge et al., 1998 ; G

50

ao et al., 2002 ; Gao et al., 2004 )。

【 0 0 9 6 】

例えば、組換えAAV8ベクターは最近、肝がんのマウスモデルにおいて治療上役立つと報告された (Kato et al., 2006)。しかし、いくつかのグループは、AAV2ベクターを使ってマウスモデル中のヒト肝がん細胞を標的とするために、さまざまな戦略を記載している (Su et al., 1996 ; Peng et al., 2000 ; Su et al., 2000 ; Ma et al., 2005 ; Wang et al., 2005 ; Tse et al., 2008 ; Zhang et al., 2008 ; Malecki et al., 2009 ; Wang et al., 2010)。ヒト肝がん細胞を標的とするのに最も効率のよいAAV血清型を同定するために、3つの異なるヒト肝がん細胞株が、AAV3ベクターによって極めて効率よく形質導入されることが示された (Glushakova et al., 2009)。続いて、ヒト肝細胞成長因子受容体 (hHGFR) が、AAV3感染に関する細胞補助受容体であると同定された (Ling et al., 2010)。AAV3媒介形質導入におけるhHGFRの正確な役割、特にhHGFRの細胞内ドメインに関連するチロシンキナーゼ活性の役割は、最初は不明なままであった。実施例5のデータ (下記参照) により、AAV3-hHGFR相互作用の、より詳細な説明が得られ、ヒト肝がん細胞を標的とする際に使用するための最適化されたキャプシド変異型AAV3ベクターの開発が例証された。

10

【 0 0 9 7 】

rAAVキャプシドタンパク質

4.7kbの一本鎖DNAゲノムを保護する能力を有する無エンベロープT-1正二十面体格子への、60個の個別キャプシドタンパク質サブユニットの超分子アセンブリは、ヘルパー依存性ヒトパルボウイルスであるアデノ随伴ウイルス2 (AAV2) のライフサイクルにおいて、極めて重要なステップである。成熟した直径20nmのAAV2粒子は、比率が1 : 1 : 18の、VP1、VP2、およびVP3と呼ばれる3つの構造タンパク質 (分子量はそれぞれ87、73、および62kDa) から構成される。その対称性とこれらの分子量推定値とによれば、粒子を構成する60個のキャプシドタンパク質のうち、3つがVP1タンパク質であり、3つがVP2タンパク質であり、54個がVP3タンパク質である。3種類の構造タンパク質を使用することにより、AAV血清型はパルボウイルスではユニークなものになっている。というのも、他の既知のパルボウイルスは全て、そのゲノムを、2種類のキャプシドタンパク質だけから構成される正二十面体粒子内にパッケージングするからである。これら60個のキャプシドタンパク質の逆平行 ストランドバレル状配置が、分解に対して著しく耐性で明確な指向性を持つ粒子をもたらす。キャプシドタンパク質の1つ以上において1つ以上のチロシン残基を修飾すると、従来のプロトコールより低い用量かつ低いコストで優れたトランスフェクションが達成されることを、本発明者らは示した。キャプシドの表面上の1つ以上のチロシン残基を部位特異的に修飾することにより、本発明者らは形質導入効率の有意な改良を達成した。

20

30

【 0 0 9 8 】

改良されたキャプシド修飾rAAVベクターの使用

本発明は、哺乳動物の疾患、傷害、障害、外傷または機能不全を診断し、防止し、処置し、またはその1つ以上の症状を改善するためのキットに含まれた本開示のチロシン修飾rAAVベクターの1つ以上を含む組成物を提供する。そのようなキットは、診断、予防、および/または治療に役立ち、とりわけ、がん、糖尿病、自己免疫疾患、腎臓疾患、心血管疾患、膵臓疾患、腸疾患、肝疾患、神経学的疾患、神経筋障害、神経運動欠損、神経骨格障害、神経学的身体障害、感覚神経機能不全、卒中、虚血、摂食障害、 $\alpha$ -アンチトリプシン (AAT) 欠損、バットン病、アルツハイマー病、鎌形血球症、 $\beta$ -サラセミア、ハンチントン病、パーキンソン病、骨格疾患、外傷、肺疾患、またはそれらの任意の組み合わせを処置し、防止し、かつ/またはその1つ以上の症状を改善するのに役立つ。

40

【 0 0 9 9 】

本発明は、疾患、障害、機能不全、傷害または外傷を処置し、防止し、またはその症状を改善するための、例えば限定するわけではないが、疾患、障害または機能不全を処置し、防止し、かつ/または予防するための、および/またはそのような疾患、障害または機能

50

不全の1つ以上の症状を改善するための、医薬の製造における、本明細書に開示する組成物の使用も提供する。限定するわけではないが、rAAVウイルスに基づく遺伝子治療がとりわけ有用であるだろう例示的状态としては、がん、糖尿病、鎌形血球症、 $\beta$ -サラセミア、自己免疫疾患、腎臓疾患、心血管疾患、膵臓疾患、眼の疾患、腸疾患、肝疾患、神経学的疾患、神経筋障害、神経運動欠損、神経骨格障害、神経学的身体障害、感覚神経機能不全、卒中、 $\alpha$ -アンチトリプシン(AAT)欠損、バットン病、虚血、摂食障害、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、骨格疾患、肺疾患、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

#### 【0100】

本発明は、哺乳動物における上述のような疾患、傷害、障害、または機能不全を処置し、またはその症状を改善するための方法も提供する。そのような方法は、一般に、少なくとも、本明細書に開示するチロシン修飾rAAVベクターの1つ以上を、それを必要とする哺乳動物に、前記哺乳動物における上述のような疾患、傷害、障害、または機能不全を処置し、またはその症状を改善するのに十分な量でかつ十分な時間にわたって、投与するステップを伴う。

10

#### 【0101】

そのような処置レジメンは、ヒト治療では、とりわけ、1つ以上の組成物の筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、髄腔内投与、腹腔内投与によるか、または医療を受ける哺乳動物の器官または組織への直接注射によることが考えられる。

#### 【0102】

本発明は、治療有効量の本発明のrAAV組成物を、それを必要とする哺乳動物に、rAAVベクター内に含まれる1つ以上の核酸セグメントによってコードされている、治療有効量の所望の治療用作用物質を患者に与えるのに有効な量でかつ有効な時間にわたって提供するための方法も提供する。好ましくは、前記治療用作用物質は、ポリペプチド、ペプチド、抗体、抗原結合フラグメント、リボザイム、ペプチド核酸、siRNA、RNAi、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、診断マーカー、診断用分子、レポーター分子、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

20

#### 【0103】

##### AAVベクター組成物

本方法論の重要な一側面は、本明細書に記載する改良されたrAAVベクターでは、高レベルの従来型非表面キャプシド修飾rAAVベクターを使って得られるものと同じ形質導入効率を達成するのに、送達されるウイルス粒子の力価が低くてもよいという事実である。この目的を達成するためのAAV組成物の量と前記組成物の投与時間は、本教示の恩恵を受ける当業者の理解の範囲内にあるだろう。実際、本発明者らは、本開示の組成物の治療有効量の投与は、単回投与によって、例えばそのような処置を受けている患者に治療上の利益を与えるのに十分な数の感染性粒子の単回注射によって、達成しうると考えている。あるいは、状況によっては、AAVベクター組成物を、そのような組成物の投与を監督する開業医による決定などに応じて、比較的短期間の間に、または比較的長期間にわたって、複数回投与または継続的に投与することが望ましいであろう。例えば、哺乳動物に投与される感染性粒子の数は、処置されるその特定疾患または特定障害の治療を達成するための必要などに応じて、単回投与として（または2回以上の投与などに分割して）与えられるおよそ $10^7$ 個、 $10^8$ 個、 $10^9$ 個、 $10^{10}$ 個、 $10^{11}$ 個、 $10^{12}$ 個、 $10^{13}$ 個、またはそれ以上の感染性粒子/mLとすることができる。実際には、一定の実施形態では、特定のレジメンまたは治療方法の所望の効果が達成されるように、2つ以上の異なるrAAVベクター系組成物を単独で、または1つ以上の他の診断剤、薬物、生物活性剤などと組み合わせて投与することが望ましいであろう。rAAVベクターを用いる遺伝子治療に基づく大半のレジメンでは、本明細書に記載する修飾キャプシドrAAVベクターを使用すれば、等価な野生型のまたは対応する「無修飾」rAAVベクターの使用と比較して、必要とされる感染性粒子の力価は低くなるであろうと、本発明者らは考えている。

30

40

#### 【0104】

50

本明細書において使用する「改変 (engineered)」細胞および「組換え」細胞という用語は、外因性ポリヌクレオチドセグメント (生物学的活性分子の転写につながるDNAセグメントなど) が導入されている細胞を指す。それゆえに、改変細胞は、組換え法で導入された外因性DNAセグメントを含有しない天然細胞とは区別することができる。それゆえに、改変細胞は、人の手によって導入された少なくとも1つ以上の異種ポリヌクレオチドセグメントを含む細胞である。

#### 【0105】

本発明に従って治療用作用物質を発現させるために、治療用作用物質をコードする核酸セグメントを1つ以上のプロモーターの制御下に含むチロシン修飾rAAV発現ベクターを調製することができる。配列をプロモーターの「制御下」に置くには、転写読み枠の転写開始部位の5'末端を、一般に、選んだプロモーターの約1ヌクレオチド~約50ヌクレオチド「下流」(すなわち3'側)に配置する。この「上流」プロモーターはDNAの転写を刺激し、コードされているポリペプチドの発現を促進する。それがこの文脈における「組換え発現」の意味である。とりわけ好ましい組換えベクターコンストラクトは、rAAVベクターを含むものである。そのようなベクターを本明細書において詳述する。

10

#### 【0106】

ベクターがトランスフェクトされた特定細胞に1つ以上の外因性タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、リボザイム、および/またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために、そのようなベクターの使用を考える場合は、本明細書に開示するキャプシド修飾rAAVベクターを使用して、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを、選択された宿主細胞に送達することができる。

20

#### 【0107】

##### 医薬組成物

本発明の遺伝子コンストラクトはさまざまな組成物中に調製することができ、ヒトまたは動物対象に投与するために、適当な医薬媒体中に製剤化することもできる。本発明のrAAV分子およびそれらを含む組成物は、さまざまな障害、とりわけ関節の疾患、障害、および機能不全、例えば変形性関節症、関節リウマチ、および関連障害などを処置し、制御し、その症状を改善するための、新しい有用な治療薬を提供する。

#### 【0108】

本発明は、本開示のキャプシド修飾rAAVベクター、発現系、ビリオン、ウイルス粒子、哺乳動物細胞、またはそれらの組み合わせの1つ以上を含む組成物も提供する。一定の実施形態において、本発明は、細胞または動物に、単独で、または1つ以上の他の治療モダリティと組み合わせて、とりわけヒトの細胞、組織、および人を冒す疾患を治療する目的で投与するための、本明細書に開示する1つ以上のキャプシド修飾rAAVベクターの医薬製剤を提供する。医薬上許容される賦形剤および担体溶液の製剤は当業者には周知であり、例えば経口、非経口、静脈内、鼻腔内、関節内、筋肉内投与および製剤を含むさまざまな処置レジメンで本明細書に記載する特定組成物を使用するための適切な投薬レジメンおよび処置レジメンの開発も同様である。

30

#### 【0109】

##### 例示的定義

本発明によれば、ポリヌクレオチド、核酸セグメント、核酸配列などには、DNA (限定するわけではないがゲノムDNAまたはゲノム外DNAを含む)、遺伝子、ペプチド核酸 (PNA)、RNA (限定するわけではないが、rRNA、mRNAおよびtRNAを含む)、ヌクレオシド、および全体または一部が人の手によって自然源から得られるか、化学合成されるか、修飾されるか、他の方法で調製または合成された適切な核酸セグメントが包含されるが、それらに限定されるわけではない。

40

#### 【0110】

別段の定義がある場合を除き、本明細書において使用する技術用語および科学用語は全て、本発明が属する技術分野の通常の知識を有する者が一般に理解しているものと同じ意味を有する。本明細書に記載するものと類似するまたは等価な方法および組成物はいずれ

50

も本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および組成物を本明細書に記載する。本発明のために、以下の用語を次のとおり定義する。

【0111】

特許法の慣例に従い、請求項を含む本願において使用する場合、単語「1つの」「ある」(「a」および「an」)は、「1つ以上の」(「one or more」)を表す。

【0112】

本明細書において使用する用語「約」および「およそ」は交換可能であり、一般に、与えられた数字を含む数字の範囲、ならびに説明された数字の範囲内の全ての数字を指すと理解すべきである(例えば別段の定義がある場合を除き、「約5~15」は「約5~約15」を意味する)。さらにまた、本明細書における数値範囲はいずれも、その範囲内の各整数を包含すると理解すべきである。

10

【0113】

本明細書において使用する用語「担体」は、関連する動物に投与するための医薬上許容される、任意の溶媒、分散媒、コーティング、希釈剤、緩衝剤、等張化剤、溶液、懸濁液、コロイド、不活性物質など、またはそれらの組み合わせを包含するものとする。化学化合物全般、特に化学療法剤のための1つ以上の送達媒体の使用は、医薬技術分野の通常の知識を有するものには周知である。従来のものである媒質または作用物質は、それらが活性化合物と不適合でない限り、診断用、予防用、および治療用組成物におけるその使用が考えられる。1つ以上の補助活性成分も、本開示の化学療法用組成物の1つ以上に組み入れるか、本開示の化学療法用組成物の1つ以上と関連して投与することができる。

20

【0114】

本明細書において使用する用語「DNAセグメント」とは、特定種の全ゲノムDNAを含まない単離されたDNA分子を指す。それゆえに、本明細書に開示する組成物の一つを使って生物学的試料から得られるDNAセグメントは、それらの取得源である特定種の全ゲノムDNAから単離された、またはそのような全ゲノムDNAから精製された、1つ以上のDNAセグメントを指す。DNAセグメントおよびそのようなセグメントのより小さいフラグメントは、組換えベクター、例えばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどと共に、用語「DNAセグメント」に包含される。

【0115】

本明細書において使用する用語「有効量」は、疾患または状態を処置または改善することができる量、または他の形で意図した治療効果を生じさせることができる量を指す。本明細書において使用する用語「例えば」(「for example」または「e.g.」)は、例示のために使用されるに過ぎず、限定を意図しておらず、それらが本明細書に明示的に列挙された事項だけを指しているとみなしてはならない。

30

【0116】

本明細書にいう「異種」は、予め決定され言及された遺伝子配列との関連において定義される。例えば、構造遺伝子配列に関して、異種プロモーターとは、言及した構造遺伝子に天然には隣接して存在しないが、実験室操作によって配置されたプロモーターであると定義される。同様に、異種遺伝子または異種核酸セグメントとは、言及したプロモーターおよび/またはエンハンサー要素に天然には隣接して存在しない遺伝子またはセグメントと定義される。

40

【0117】

本明細書において使用する用語「ホモロジー」とは、2つ以上のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の間の相補性の程度を指す。第1の核酸配列または第1のアミノ酸配列が第2の核酸配列または第2のアミノ酸配列と全く同じ一次配列を有する場合は、「同一性」という単語を「相同性」という単語の代わりに使用してもよい。配列ホモロジーおよび配列同一性は、当技術分野において既知のアルゴリズムおよびコンピュータプログラムを使って2つ以上の配列を解析することによって決定することができる。そのような方法を使って、与えられた配列がもう一つの選択された配列と同一であるかどうかまたは相同であるかどうかを評価することができる。

50

## 【0118】

本明細書にいう「相同な」とは、ポリヌクレオチドに関する場合、異なる起源から生じているにもかかわらず、本質的に同じヌクレオチド配列を有する配列を指す。典型的には、相同な核酸配列は、近縁の遺伝子に由来するか、1つ以上の実質的に類似するゲノム配列を保持する生物に由来する。対照的に「類似する」ポリヌクレオチドとは、異なる種または異なる生物からのポリヌクレオチドと同じ機能を有するが、類似する機能を果たすまたは類似する生物学的活性を保持する1つ以上のタンパク質またはポリペプチドをコードする著しく異なる一次ヌクレオチド配列を有しうるものである。類似するポリヌクレオチドは、多くの場合、（例えば遺伝学的にまたは系統的に）近縁でない2つ以上の生物に由来するものでありうる。

10

## 【0119】

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列に関して「同一な」または「同一性」百分率という用語は、後述の配列比較アルゴリズム（または当業者が利用することのできる他のアルゴリズム）の一つを使ってまたは目視検査によって測定される最大の一致が得られるように比較し整列した場合に、同じであるか、または指定した百分率のアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。

## 【0120】

本明細書において使用する「処置の必要がある」という表現は、患者が処置を必要としている（または1つ以上の形で利益を得るであろう）という、医師または獣医師などといった介護者が下す判断を指す。そのような判断は、介護者の専門的知識の範囲内にあるさまざまな因子に基づいて下すことができ、本明細書に記載するような1つ以上の化合物または医薬組成物によって処置することができる疾患状態の結果として患者が不健康であるという知識を含みうる。

20

## 【0121】

本明細書において使用する用語「核酸」は、次に挙げる1つ以上のタイプを包含する：ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含有するもの）、ポリリボヌクレオチド（D-リボースを含有するもの）、およびプリン塩基もしくはピリミジン塩基、または修飾プリン塩基もしくは修飾ピリミジン塩基（塩基脱落部位を含む）のN-グリコシドである他の任意のタイプのポリヌクレオチド。本明細書において使用する用語「核酸」には、共有結合された（典型的にはサブユニット間のホスホジエステル結合によって、ただし場合によってはホスホロチオエート、メチルホスホネートなどによって共有結合された）リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのポリマーも包含される。「核酸」には、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、ならびに一本鎖RNAおよび二本鎖RNAが包含される。限定するわけではないが、例示的核酸として、gDNA、hnRNA、mRNA、rRNA、tRNA、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、核小体低分子RNA（snORNA）、核内低分子RNA（snRNA）、および小分子RNA（small temporal RNA）（stRNA）など、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

30

## 【0122】

ある物体に適用される「天然の」という用語は、本明細書において使用する場合、ある物体が自然界に見出されうるという事実を指す。例えば、自然界の供給源から単離することができ、実験室において人の手で意図的に修飾されていない生物（ウイルスを含む）中に存在するポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列は、天然である。本明細書においては、齧歯類動物の実験室系統（古典的な遺伝学に従って選抜育種されていてもよい）は、天然の動物と見なされる。

40

## 【0123】

本明細書において使用する「作動的に連結された」という用語は、連結される核酸配列が典型的には連続しているか実質的に連続しており、2つのタンパク質コード領域を接合するために必要であれば、連続していても読み枠が合っていることを指す。しかし、エンハンサーは一般にプロモーターから数千ベース離れていても機能し、イントロン配列はさまざまな長さを持ちうるため、いくつかのポリヌクレオチド要素は、作動的に連結さ

50

れているが、連続ではないこともありうる。

【0124】

本明細書において使用する用語「患者」（互換的に「宿主」または「対象」ともいう）は、本明細書に開示する医薬組成物の1つ以上を受け取ることができる任意の宿主を指す。好ましくは対象は脊椎動物であり、これは任意の動物種（好ましくはヒトなどの哺乳動物種）を表すものとする。一定の実施形態において、「患者」は、限定するわけではないが任意の哺乳動物宿主を含む、任意の動物宿主を指す。好ましくは、この用語は任意の哺乳動物宿主を指し、限定するわけではないが、哺乳動物宿主としては、ヒトおよび非ヒト霊長類、ウシ、イヌ、ヤギ、キャビン（cavine）、カラス（corvines）、エピン（epines）、ウマ、ネコ、ヤギ、ウサギ（lapines）、ノウサギ（leporines）、オオカミ（lupines）、マウス、ヒツジ、ブタ、ラニン（ranines）、ラシン（racines）、キツネ（vulpines）などが挙げられ、畜産動物、動物標本、外来動物、ならびに伴侶動物、ペット、および獣医師の保護下にある任意の動物が含まれる。患者は、本ワクチンの接種に対して免疫応答を生じることによって応答することができる任意の年齢であることができる。特定の実施形態では、哺乳動物患者が好ましくはヒトである。

10

【0125】

「医薬上許容される」という表現は、好ましくは哺乳動物に投与した時に、特にヒトに投与した時に、アレルギー反応または類似の不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。本明細書にいう「医薬上許容される塩」とは、好ましくは、親化合物の望ましい生物学的活性を保持していて、望ましくない毒性効果を何も付与しない塩を指す。限定するわけではないが、そのような塩の例として、無機酸（例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸など）で形成される酸付加塩；および有機酸、限定するわけではないが、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パモ（エンボン）酸、アルギン酸、ナフトエ酸、ポリグルタミン酸、ナフトレンスルホン酸、ナフトレンジスルホン酸、ポリガラクトuron酸などで形成される塩；多価金属イオン、例えば亜鉛、カルシウム、ピスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウムなどとの塩；N,N'-ジベンジルエチレンジアミンまたはエチレンジアミンから形成される有機カチオンで形成される塩；およびそれらの組み合わせが挙げられる。

20

【0126】

本明細書において使用する用語「医薬上許容される塩」は、医薬上許容される塩基、無機酸または有機酸から誘導される本開示の化合物を指す。限定するわけではないが、適切な酸の例として、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフトレン-2-スルホン酸、トリフルオロ酢酸、およびベンゼンスルホン酸が挙げられる。適当な塩基から誘導される塩として、ナトリウムなどのアルカリおよびアンモニウムが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0127】

本明細書において使用する「防止する」、「防止すること」、「防止」、「抑制する」、「抑制すること」、および「抑制」という用語は、疾患状態の何らかの症状、側面または特徴が防止されるように、疾患状態の臨床症状の発生前に、化合物を単独で、または医薬組成物に含まれた状態で投与することを指す。そのような防止および抑制は、完全なものでなくても、医学的には有用であるとみなすことができる。

40

【0128】

本明細書において使用する用語「プロモーター」は、転写を調節する核酸配列の1または複数の領域を指す。

【0129】

本明細書において使用する用語「ポリペプチド」は、単数の「ポリペプチド」と複数の「ポリペプチド」を包含するものとし、2つ以上のアミノ酸の任意の1または複数の鎖を包

50



含する。したがって本明細書において使用する「ペプチド」、「ジペプチド」、「トリペプチド」、「タンパク質」、「酵素」、「アミノ酸鎖」、および「連続するアミノ酸配列」などの用語は、これらに限るわけではないが、いずれも「ポリペプチド」の定義内に包含され、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりに使用するか、これらの用語のいずれかと互換的に使用することができる。この用語はさらに、1つ以上の翻訳後修飾、例えば限定するわけではないがグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、誘導体化、タンパク質分解的切断、翻訳後プロセッシング、または1つ以上の非天然アミノ酸の組み込みによる修飾などを受けたポリペプチドを包含する。ポリヌクレオチド構造およびポリペプチド構造について、当技術分野には、従来の命名法が存在する。例えば一文字記号および三文字記号は、アミノ酸を記述するために広く使用されている：アラニン (A; Ala)、アルギニン (R; Arg)、アスパラギン (N; Asn)、アスパラギン酸 (D; Asp)、システイン (C; Cys)、グルタミン (Q; Gln)、グルタミン酸 (E; Glu)、グリシン (G; Gly)、ヒスチジン (H; His)、イソロイシン (I; Ile)、ロイシン (L; Leu)、メチオニン (M; Met)、フェニルアラニン (F; Phe)、プロリン (P; Pro)、セリン (S; Ser)、スレオニン (T; Thr)、トリプトファン (W; Trp)、チロシン (Y; Tyr)、バリン (V; Val)、およびリジン (K; Lys)。本明細書に記載するアミノ酸残基は「l」異性体型であることが好ましい。ただし、ポリペプチドの望ましい性質が保持されるのであれば、任意のl-アミノ酸残基を「d」異性体型の残基で置換してもよい。

10

#### 【0130】

「タンパク質」は「ペプチド」および「ポリペプチド」と互換的に使用され、合成法で、組換え法で、またはインビトロで生産されたペプチドおよびポリペプチドも、核酸配列を宿主動物またはヒト対象に投与した後にインビボで発現するペプチドおよびポリペプチドも包含する。用語「ポリペプチド」は、好ましくは、長さが約2~約20アミノ酸残基の短いペプチド、長さが約10~約100アミノ酸残基のオリゴペプチド、および長さが約100アミノ酸残基以上の長いポリペプチドなど、任意のアミノ酸鎖長を指すものとする。さらにまた、この用語は、酵素、すなわち少なくとも1つのアミノ酸ポリマーを含む機能的生体分子も包含するものとする。本発明のポリペプチドおよびタンパク質は、翻訳後修飾されるまたは翻訳後修飾されたポリペプチドおよびタンパク質も包含し、骨格アミノ酸鎖に付加された任意の糖その他の誘導体またはコンジュゲートも含む。

20

#### 【0131】

用語「組換え」は、その物質（例えばポリヌクレオチドまたはポリペプチド）が、ヒトの介入によって、人工的または合成的（非天然的）に改変されていることを示す。改変は、その自然環境または自然状態にある物質に対して、あるいはその自然環境または自然状態から取り出された物質に対して、行うことができる。具体的に述べると、例えばプロモーター配列は、それが人の手で工学的に改変された核酸セグメントの発現によって生産された場合は、「組換え」体である。例えば「組換え核酸」は、例えばクローニング、DNAシャフリング、または他の手法において核酸を組換えることによって、あるいは化学的変異誘発法または他の変異誘発法によって作られるものであり、「組換えポリペプチド」または「組換えタンパク質」は、組換え核酸の発現によって生産されるポリペプチドまたはタンパク質であり、「組換えウイルス」、例えば組換えAAVウイルスは、組換え核酸の発現によって生産される。

30

40

#### 【0132】

本明細書において使用する「調節要素」という用語は、転写を調節する核酸配列の1または複数の領域を指す。限定するわけではないが、例示的調節要素としては、エンハンサー、転写後要素、転写制御配列などが挙げられる。

#### 【0133】

用語「RNAセグメント」は、特定種の全細胞RNAから単離されたRNA分子を指す。それゆえに、RNAセグメントとは、他のRNAから単離または精製された1つ以上のRNAセグメント（天然由来または合成由来）を指すことができる。用語「RNAセグメント」には、RNAセグメントと、そのようなセグメントのさらに小さいフラグメントが含まれる。

50

## 【0134】

本明細書において使用する「実質的に対応する」、「実質的に相同」、または「実質的に同一」という用語は、選択された基準核酸配列またはアミノ酸配列と比較して、選択された核酸配列またはアミノ酸配列が、少なくとも約70パーセントまたは約75パーセントの配列同一性を有するという、核酸配列またはアミノ酸配列の特徴を表す。より典型的には、選択された配列と基準配列とは、少なくとも約76、77、78、79、80、81、82、83、84、さらには85パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも約86、87、88、89、90、91、92、93、94、または95パーセントの配列同一性を有するであろう。より一層好ましくは、相同性の高い配列は、多くの場合、選択された配列と、その比較対象である基準配列との間に、少なくとも約96、97、98、または99パーセントを超える配列同一性を有する。

10

## 【0135】

配列同一性のパーセンテージは比較される配列の全長にわたって計算するか、または選ばれた基準配列の合計約25パーセントくらいまでの小さな欠失または付加を除外することによって計算することができる。基準配列は、より大きな配列の部分配列、例えば遺伝子またはランキング配列の一部、または染色体の反復部分であることができる。ただし、2つ以上のポリヌクレオチド配列の配列相同性の場合、基準配列は典型的には少なくとも約18~25ヌクレオチド、より典型的には少なくとも約26~35ヌクレオチド、より一層典型的には少なくとも約40、50、60、70、80、90、さらには100ヌクレオチドくらいのヌクレオチドを含むであろう。

20

## 【0136】

相同性の高いフラグメントが望まれる場合、当業者に周知の配列比較アルゴリズムの1つ以上、例えばPearson and Lipman (1988) によって記述されたFASTAプログラム解析などによって容易に決定することができる2つの配列間のパーセント同一性の程度は、少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは約90%または95%以上であるだろう。本明細書において使用する用語「対象」は、本発明の組成物による処置を与えることができる霊長類などの哺乳動物を含む生物をいう。本開示の処置方法から利益を得ることができる哺乳動物種としては、類人猿、チンパンジー、オランウータン、ヒト、サル、イヌやネコなどの家畜、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、およびニワトリなどの畜産動物、そしてマウス、ラット、モルモット、およびハムスターなどの他の動物が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

## 【0137】

本明細書において使用する用語「構造遺伝子」は、一般に、発現して、コードされているペプチド、ポリペプチド、タンパク質、リボザイム、触媒RNA分子、またはアンチセンス分子を生産するポリヌクレオチド、例えば遺伝子をいうものとする。

## 【0138】

本明細書において使用する用語「対象」は、本発明の組成物による処置を与えることができる霊長類などの哺乳動物を含む生物をいう。本開示の処置方法から利益を得ることができる哺乳動物種としては、ヒト、非ヒト霊長類、例えば類人猿、チンパンジー、サル、およびオランウータン、イヌやネコを含む家畜、ならびにウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、およびヤギなどの畜産動物、または限定するわけではないがマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ハムスターなどを含む他の哺乳動物種が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

## 【0139】

「転写調節要素」とは、単独で、または1つ以上の他の核酸配列との組み合わせで、転写を活性化するポリヌクレオチド配列を指す。転写調節要素は、例えば、1つ以上のプロモーター、1つ以上の応答要素、1つ以上の負の調節要素、および/または1つ以上のエンハンサーを含むことができる。

## 【0140】

本明細書にいう「転写因子認識部位」および「転写因子結合部位」は、1つ以上の転写

50

因子の配列特異的相互作用（これは、多くの場合、直接的タンパク質-DNA結合の形態をとる）のための部位と同一とされるポリヌクレオチド配列または配列モチーフを指す。典型的には、転写因子結合部位は、DNAフットプリント法、ゲル移動度シフトアッセイなどによって同定することができ、かつ/または既知のコンセンサス配列モチーフに基づいて、あるいは当業者に知られている他の方法によって、予測することができる。

【0141】

「転写単位」は、少なくとも1つの第1シス作用性プロモーター配列に作動的に連結され、場合によっては構造遺伝子配列の効率のよい転写に必要な1つ以上の他のシス作用性核酸配列に作動的に連結されている、少なくとも1つの第1構造遺伝子と、プロモーターおよび/またはエンハンサー要素の制御下に作動的に置かれた構造遺伝子配列の適当な組織特異的および発生的転写に要求される少なくとも1つの第1遠位調節要素、ならびに効率のよい転写および翻訳に必要な任意の追加シス配列（例えばポリアデニル化部位、mRNA安定性制御配列など）を含む、ポリヌクレオチド配列を指す。

10

【0142】

本明細書において使用する用語「形質転換細胞」は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドがその細胞中に導入されることによって核酸コンプリメント（nucleic acid complement）が改変されている核酸宿主細胞を意味するものとする。

【0143】

本明細書において使用する用語「形質転換」は、一般に、外因性ポリヌクレオチド配列（例えばウイルスベクター、プラスミド、または組換えDNAもしくはRNA分子）を宿主細胞またはプロトプラストに導入するプロセスをいうものとし、宿主細胞またはプロトプラストにおいては、外因性ポリヌクレオチドは少なくとも1つの第1染色体に組み込まれるか、または形質転換宿主細胞内で自律的に複製することができる。トランスフェクション、エレクトロポレーション、および「裸の」核酸の取り込みはいずれも、宿主細胞を1つ以上のポリヌクレオチドで形質転換するために使用される技法の例である。

20

【0144】

本明細書において使用する「処置する」、「処置すること」、および「処置」という用語は、疾患状態の臨床症状の発生後に、疾患状態の何らかの症状、側面または特徴が低減または排除されるように、1つ以上の化合物を（単独で、または1つ以上の医薬組成物に含まれた状態で）投与することを指す。そのような処置は、完全なものでなくても、医学的には有用であるとみなすことができる。したがって「処置」、「処置する」、「処置された」または「処置すること」という用語は、治療を指すか、疾患の程度または重症度の、その1つ以上の症状の、改善または低減を指すことができ、その発症が患者を苦しめる前か後かを問わない。

30

【0145】

「単離された」または「生物学的に純粋」という表現は、ある物質がそのネイティブ状態で見出される時にその物質に通常付随している構成要素を実質的にまたは本質的に含まない物質を指す。したがって、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、好ましくは、その自然環境またはインサイチュー環境において、当該ポリヌクレオチドに通常関連する物質を含有しない。

40

【0146】

「連結」または「接合」とは、限定するわけではないが、組換え融合、共有結合、ジスルフィド結合、イオン結合、水素結合、静電結合など、1つ以上のタンパク質、ペプチド、核酸、またはポリヌクレオチドを機能的に接続するための当技術分野において既知の任意の方法を指す。

【0147】

本明細書において使用する用語「プラスミド」または「ベクター」は、遺伝物質（すなわち核酸）から構成される遺伝子コンストラクトを指す。典型的には、プラスミドまたはベクターは、細菌宿主細胞、例えば大腸菌において機能的な複製起点と、そのプラスミドを含む細菌宿主細胞を検出するための選択可能マーカーとを含有する。本発明のプラスミ

50

ドおよびベクターは、挿入されたコード配列が適切な発現細胞中で転写され翻訳されるように配置された本明細書に記載する1つ以上の遺伝要素を含みうる。加えて、プラスミドまたはベクターは、1つ以上の核酸セグメント、遺伝子、プロモーター、エンハンサー、活性化因子、マルチクローニング領域、またはそれらの任意の組み合わせ、例えば1つ以上の天然供給源および/人工的供給源から得られるまたは誘導されるセグメントを含みうる。

【0148】

用語「本質的に配列番号Xに示す配列」とは、その配列が配列番号Xの一部に実質的に対応し、配列番号Xのヌクレオチド（またはアミノ酸）と同一でないか生物学的機能等価物でないヌクレオチド（ポリペプチド配列の場合はアミノ酸）が比較的わずかであることを意味する。用語「生物学的機能等価物」は当技術分野ではよく理解されており、本明細書でもさらに詳しく定義する。したがって、ヌクレオチドの約85%～約90%、より好ましくは約91%～約95%、さらに好ましくは約96%～約99%が、ここに提供するヌクレオチド配列の1つ以上と同一であるか機能的に等価である配列は、特に、本発明の実施において有用であると考えられる。

10

【0149】

本発明にとって適切な標準的ハイブリダイゼーション条件としては、例えば、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSC、25mMリン酸ナトリウム、0.1%SDSおよび100μg/mlの変性サケ精子DNA中、42℃で16時間のハイブリダイゼーションと、それに続く、所望の量の背景シグナルを除去するための60℃の0.1×SSC、0.1%SDS溶液による1時間の一連の洗浄とが挙げられる。本発明にとって低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件としては、例えば、35%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSC、25mMリン酸ナトリウム、0.1%SDSおよび100μg/ml変性サケ精子DNAまたは大腸菌DNA中、42℃で16時間のハイブリダイゼーションと、それに続く、55℃の0.8×SSC、0.1%SDSによる一連の洗浄とが挙げられる。所望のストリンジェンシーレベルを得るために、条件を容易に調節できることは、当業者にはわかるであろう。

20

【0150】

当然、本発明は、本明細書に明記した具体的ヌクレオチド配列の少なくとも1つ以上と相補的、本質的に相補的、および/または実質的に相補的な核酸セグメントも包含する。「相補的」な核酸配列とは、標準的なワトソン・クリックの相補性規則に従って塩基対合する能力を有するものである。本明細書において使用する用語「相補的配列」とは、実質的に相補的な核酸配列を意味し、これは、上述の同一ヌクレオチド比較によって評価されるか、本明細書に開示する特異的核酸セグメントの1つ以上にすぐ上で述べたような比較的ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする能力を有することと定義される。

30

【0151】

上述のように、本発明のプロープおよびプライマーは、任意の長さを有しうる。例えば第1残基に1、第2残基に2などと、配列に数値を割り当てることにより、与えられた配列内に含まれる全てのプロープまたはプライマーを定義するアルゴリズムを、次のように提唱することができる： $n \sim n+y$ （ここで、 $n$ は1から配列の最後の数字までの整数であり、 $y$ はプロープまたはプライマーの長さから1を引いた値である。また、 $n+y$ は、配列の最後の数字を超えない）。したがって、25塩基対のプロープまたはプライマー（すなわち「25マー」）の場合、プロープまたはプライマーの集合体は、配列の全長にわたって、塩基1～25、塩基2～26、塩基3～27、塩基4～28などに対応する。同様に、35塩基対のプロープまたはプライマー（すなわち「35マー」）の場合、限定するわけではないが、例示的なプライマー配列またはプロープ配列として、配列の全長にわたって、塩基1～35、塩基2～36、塩基3～37、塩基4～38などに対応する配列が挙げられる。また、40マーの場合、そのようなプロープまたはプライマーは、第1塩基対からbp40までのヌクレオチド、配列の第2bpからbp41までのヌクレオチド、第3bpからbp42までのヌクレオチドなどに対応することができ、50マーの場合、そのようなプロープまたはプライマーは、bp1からbp50までに及ぶヌクレオチド配列、bp2からbp51までに及ぶヌクレオチド配列、bp3からb

40

50

p52までに及ぶヌクレオチド配列、bp4からbp53までに及ぶヌクレオチド配列などに対応しうる。

【0152】

与えられたターゲット配列の存在をハイブリダイゼーションアッセイで決定する際に標識ポリヌクレオチドプローブを使用する場合などといった一定の実施形態では、本発明の1つ以上の核酸セグメントを、適当な検出可能マーカ（すなわち「ラベル」）と組み合わせて使用することが有利になるであろう。オリゴヌクレオチドプローブを標識するために、例えば限定するわけではないが、蛍光リガンド、放射性リガンド、酵素リガンド、または適切なアッセイ系で検出することができる他のリガンド、例えばアビジン/ビオチンなどといった、多種多様な適当なインジケータ化合物および組成物が、当技術分野では知られている。特定の実施形態では、放射性試薬や環境にとってあまり望ましくない他の試薬の代わりに、1つ以上の蛍光ラベルまたは酵素タグ、例えばウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼを使用することもできる。酵素タグの場合は、1つ以上の相補的なまたは実質的に相補的な核酸配列を含有する試料との特異的ハイブリダイゼーションを同定するためにヒトの眼で見えるまたはシンチグラフィ、蛍光定量法、分光測光法などの分析方法で見える試料検出方法を与える目的で使用することができる、比色用、発色性、または発蛍光性インジケータ基質が知られている。2つ以上の標識プローブを同時にまたは逐次的に検出するいわゆる「多重化（multiplexing）」アッセイの場合は、第1オリゴヌクレオチドプローブを第1検出特性またはパラメータ（例えば放射および/または励起スペクトル極大）を有する第1ラベルで標識すると共に、第2オリゴヌクレオチドプローブを、第1ラベルとは異なる（すなわち別個のまたは識別できる）第2検出特性またはパラメータを有する第2ラベルで標識することが望ましいであろう。多重化アッセイの使用は、とりわけ遺伝子増幅/検出プロトコールとの関連において、分子遺伝学の当業者によく知られている。

【0153】

本明細書において使用する用語「ベクター」は、宿主細胞中で複製する能力を有し、かつ/またはそこに別の核酸セグメントを作動的に連結して、取り付けられたセグメントの複製を生じさせることができる、核酸分子（典型的にはDNAで構成されるもの）を指す。プラスミド、コスミド、またはウイルスは、例示的ベクターである。

【0154】

実施例

以下に実施例を挙げて、本発明の好ましい実施形態を実証する。以下の実施例に開示する技法は、本発明の実施に際してよく機能することを本発明者らが見出した技法に相当し、したがってその実施の好ましい形態を構成するとみなしうることは、当業者には理解されるはずである。しかし、開示する具体的実施形態には多くの変更を加えることができ、それでもなお、本発明の本旨および範囲から逸脱することなく、ほぼ同じまたは類似する結果が得られることは、この開示に照らして、当業者には理解されるはずである。

【実施例】

【0155】

実施例1 - 次世代rAAV2ベクター：チロシンの点突然変異は低用量での高効率形質導入をもたらす

本実施例では、AAV2キャプシド上の表面露出チロシン残基の変異によってユビキチン化ステップが回避され、その結果、プロテアソーム媒介分解が避けられることで、インビトロのヒト細胞およびインビボのマウス肝細胞においてこれらのベクターによる高効率形質導入がもたらされ、それが、低減したベクター用量での治療レベルのヒト凝固因子の生産につながることを実証する。チロシン変異体ベクターで観察される形質導入効率の増加は、ユビキチン化の欠如と、核への細胞内輸送の改良とによるものである。これらの研究は、AAV2のライフサイクルにおけるさまざまなステップでのAAV2キャプシドのチロシンリン酸化の役割についての知見を与えると共に、低用量で高効率の形質導入が可能な新規AAV2ベクターの開発をもたらした。

10

20

30

40

50

## 【0156】

## 材料と方法

組換えAAV2ベクター . ニワトリ  $\beta$ -アクチン (CBA) プロモーターによって駆動される強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を含有する scAAV2ベクター (scAAV2-EGFP) と、アポリポタンパク質エンハンサー/ヒト  $\beta$ -1アンチトリプシン (ApoE/hAAT) プロモーターの制御下に第IX因子 (F.IX) 遺伝子を含む ssAAV2ベクター (ssAAV2-F.IX) の高精製ストックを、公表された方法を使って作製した。

## 【0157】

AAV2キャプシド上の表面チロシンの位置特定 . AAV2の結晶構造 (PDBアクセス番号1lp3) を使って、AAV2キャプシド表面上のチロシン残基の位置を特定した。Silicon Graphics Octaneワークステーション上で基準単量体に正二十面体対称演算子を適用することにより、正二十面体2回、3回、および5回対称関連VP3単量体を生成した。次に、プログラムCOOTを使ってウイルス非対称ユニットとの関連においてチロシン残基の位置を視覚化、解析し、プログラムPyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific、米国カリフォルニア州サンカルロス) を使ってグラフィック表示した。

10

## 【0158】

表面露出チロシン残基変異体AAV2キャプシドプラスミドの構築 . プラスミドpACG-2を使って、QuikChange II (登録商標) 部位指定変異誘発 (Stratagene、米国カリフォルニア州ラホーヤ) に基づく2段階法を行った。簡単に述べると、第1段階では、各変異体について2つのPCR伸長反応を別々のチューブで行った。一方のチューブはフォワードPCRプライマーを含有し、他方はリバースプライマーを含有した。第2段階では、2つの反応を混合し、製造者の説明書に従って標準的PCR変異誘発アッセイを行った。PCRプライマーは、チロシン残基からフェニルアラニン残基への変化とスクリーニング用に新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を作り出すサイレント変化とが導入されるように設計した。全ての変異体を適当な制限酵素でスクリーニングし、使用前に配列決定した。

20

## 【0159】

全細胞溶解物 (WCL) の調製と共免疫沈降 . 擬似処理するかMG132で処理した約  $2 \times 10^6$  個のHeLa細胞を、さらに擬似感染に付すか、または  $5 \times 10^3$  粒子/細胞のWT scAAV2-EGFPもしくはY730F変異体ベクターによる37 °Cで2時間の感染に付した。免疫沈降のために、細胞を0.01%トリプシンで処理し、PBSで十分に洗浄した。0.25mgの正常マウスIgGおよび20  $\mu$ lのプロテインG-アガロースビーズと共にインキュベートすることによって、WCLから非特異的結合を取り除いた。この事前除去後に、無傷のAAV2粒子に対するキャプシド抗体 (マウスモノクローナルIgG<sub>3</sub>、クローンA20; Research Diagnostics, Inc. (米国ニュージャージー州フランダース)) 2  $\mu$ g、または正常マウスIgG (陰性対照として) 2  $\mu$ gを加えて、4 °Cで1時間インキュベートし、次にプロテインG-アガロースビーズで沈降させた。免疫沈降のために、再懸濁したペレット溶液を使って、SDS-PAGEを行った。メンブレンを、ユビキチン (Ub) に特異的なモノクローナルHRPコンジュゲート抗Ub抗体 (1:2,000希釈) (マウスモノクローナル免疫グロブリンG<sub>1</sub> [IgG<sub>1</sub>]、クローンP4D1; 米国カリフォルニア州サンタクルズ) で処理した。化学発光 (ECL-plus、Amersham Pharmacia Biotech、米国ニュージャージー州ピスカタウェイ) を使って免疫反応性バンドを可視化した。

30

40

## 【0160】

HeLa細胞からの核画分および細胞質画分の単離 . 核画分および細胞質画分をHeLa細胞から単離し、細胞質画分および核画分の単離には、擬似感染細胞または組換えwt scAAV2-EGFPもしくはY700Fベクター感染細胞を使用した。各画分の純度は > 95%と決定された。

## 【0161】

AAV2輸送のサザンブロット分析 . 低  $M_r$  DNA試料を核画分および細胞質画分から単離し、1%アガロースゲルまたは1%アルカリアガロースゲルで電気泳動した後、<sup>32</sup>P標識EGFP特異的DNAプローブを使って、サザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

## 【0162】

50

インビトロでの組換えAAV2ベクター形質導入アッセイ . 約 $1 \times 10^5$ 個のHeLa細胞を組換えAAV2ベクターによる形質導入に使用した。形質導入の48時間後に蛍光顕微鏡法を使ったEGFPイメージングによって形質導入効率を測定した。3~5個の視野からの画像を、ImageJ解析ソフトウェア (NIH、米国メリーランド州ベセスダ) によって定量的に解析した。導入遺伝子発現は、視野あたりの緑色蛍光の総面積 (ピクセル<sup>2</sup>) (平均 $\pm$ SD) として評価した。分散分析 (ANOVA) を使って試験結果と対照とを比較し、それらが統計的に有意であると決定した。

【0163】

インビボでの組換えAAV2ベクター形質導入研究 . scAAV2-EGFPベクターを、1匹あたり $1 \times 10^{10}$ ウイルス粒子の割合で、C57BL/6マウスに尾静脈から静脈内注射した。注射の2週間後に、擬似注射マウスおよび注射マウスの3つの肝葉からの肝臓切片を、スライドにマウントした。形質導入効率は、EGFPイメージングによって、上述のように測定した。sAAV2-FIXベクターを、C57BL/6マウス、BALB/cマウス、およびC3H/HeJマウスに、1匹あたり $1 \times 10^{10}$ ウイルス粒子または $1 \times 10^{11}$ ウイルス粒子の割合で、(尾静脈から) 静脈内注射するか、または門脈に注射した。後眼窩採血によって得た血漿試料をhFIX発現についてELISAで解析した。

10

【0164】

結果

表面露出チロシン残基の変異はAAV2ベクターの形質導入効率を有意に改良する . AAV2キャプシドのチロシンリン酸化がユビキチン化の増加につながり、細胞内輸送を損なう結果になること、そしてそれゆえにウイルス形質導入にとっては不利であることを実証するために、AAV2キャプシド上の表面露出チロシン残基を修飾した。AAV2構造のキャプシド表面を点検したところ、7つの表面露出チロシン残基 (Y252、Y272、Y444、Y500、Y700、Y704、およびY730) が明らかになった。それら7つのチロシン残基のそれぞれについて部位指定変異誘発を行って、それらをフェニルアラニン残基 (チロシン-フェニルアラニン、Y-F) で保存的に置換した (表1)。チロシン変異体キャプシドのそれぞれに封入されたscAAV2-EGFPゲノムがうまくパッケージングされ、表面露出チロシン残基の変異はベクター安定性の低減にはつながらなかった。

20

【0165】

(表1) 野生型 (WT) AAV2ベクターおよびチロシン修飾Y F変異体AAV2ベクターの力価

30

【表1】

AAVベクター	第1パッケージン グ力価 (vg/mL)	第2パッケージン グ力価 (vg/mL)	第3パッケージン グ力価 (vg/mL)	第4パッケージン グ力価 (vg/mL)
WT scAAV2-EGFP	$3.4 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{12}$	$3.2 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$
Y252F scAAV2-EGFP	$3.8 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$	ND	ND
Y272 scAAV2-EGFP	$7.7 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$	ND	ND
Y444F scAAV2-EGFP	$9.7 \times 10^{10}$	$4.0 \times 10^{10}$	$6.0 \times 10^9$	$5.0 \times 10^{10}$
Y500F scAAV2-EGFP	$8.8 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^9$	$4.0 \times 10^{10}$	$6.0 \times 10^{10}$
Y700F scAAV2-EGFP	$1.0 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$	ND	ND
Y704F scAAV2-EGFP	$6.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	ND	ND
Y730F scAAV2-EGFP	$1.2 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$

40

50

ND = 未実施

【0166】

インビトロのHeLa細胞で、チロシン変異体ベクターのそれぞれの形質導入効率を解析し、同一条件下でWT scAAV2-EGFPベクターと比較した。その結果から、擬似感染細胞が緑色蛍光を示さないのに対し、チロシン変異体ベクターのそれぞれの形質導入効率が、2,000ウイルス粒子/細胞において、WT scAAV2-EGFPベクターと比較して有意に高いことは明白であった。具体的に述べると、Y444F、Y500F、Y730Fベクターの形質導入効率はWTベクターより約8~11倍高かった。

【0167】

表面露出チロシン残基の変異はインビボでマウス肝細胞におけるAAV2ベクターの形質導入効率を劇的に改良した。WT scAAV2-EGFPベクターとチロシン変異体scAAV2-EGFPベクターの効率を、マウスモデルにおいて、インビボでも評価した。チロシン変異体ベクターの形質導入効率は、WTベクターと比較して有意に高く、4~29倍の範囲にあった。1 × 10<sup>10</sup>粒子のチロシン変異体ベクターを注射したマウスから心臓、肺、腎臓、脾臓、膵臓、消化管（空腸、結腸）、精巣、骨格筋、および脳などといった他の組織を収穫して解析したところ、EGFP遺伝子発現の証拠は見られなかった。したがって、表面露出チロシン残基の変異は、インビボでのこれらのベクターの尾静脈注射後の肝臓指向性を変化させないようであった。

10

【0168】

チロシン変異体ベクターの形質導入効率の増加は、ユビキチン化の欠如と核への細胞内輸送の改良とによるものである。チロシン残基におけるキャプシドタンパク質のEGFR-PTK媒介リン酸化がAAV2キャプシドのユビキチン化にとっての必要条件であり、ユビキチン化されたビリオンが核への途中で細胞質プロテアソームによって認識され分解されることで、核移行が不十分になるという仮説をさらに確認するために、次のように、一連の実験を行った。

20

【0169】

第1の研究では、アデノウイルス誘導性AAV2 repおよびcap遺伝子を保因するHeLa C12細胞に、擬似感染を行うか、またはWT、Y444FもしくはY730F scAAV2-EGFPベクターによる感染を行った。擬似感染細胞が緑色蛍光を示さず、アデノウイルスの同時感染の非存在下では約15%の細胞にWT scAAV2-EGFPベクターによる形質導入が起こったのに対し、Y444FおよびY730F scAAV2-EGFPベクターの形質導入効率は、WTベクターと比較して、それぞれ約9倍および約18倍増加した。興味深いことに、アデノウイルスの同時感染が約11倍の増加につながったのに対し、Y444FおよびY730F scAAV2-EGFPベクターの形質導入効率がアデノウイルスの同時感染によってさらに強化されることはなかった。アデノウイルスはHeLa細胞におけるAAV2ベクターの核移行を改良することができるので、これらのデータから、表面露出チロシン残基はAAV2の細胞内輸送に関与していること、そしてそれらの除去はAAV2ベクターの効率のよい核移行につながることが示唆された。

30

【0170】

第2の研究では、擬似処理するか、EGFR-PTKの特異的阻害因子であるTyr23またはプロテアソーム阻害因子であるMG132（これらはどちらもAAVベクターの形質導入効率を増加させることが知られている）で処理したHeLa細胞に、擬似感染を行うか、またはWTもしくはY730F scAAV2-EGFPベクターによる感染を行った。擬似感染細胞が緑色蛍光を示さず、擬似処理細胞では約5%の細胞にWT scAAV2-EGFPベクターによる形質導入が起こったのに対し、Tyr23またはMG132による前処理は、形質導入効率のそれぞれ約9倍および約6倍の増加につながった。Y730F scAAV2-EGFPベクターの形質導入効率はWTベクターと比較して約14倍増加したが、これがTyr23やMG132による前処理でさらに強化されることはなかった。これらのデータは、変異体ベクターのリン酸化を防止する表面露出チロシン残基の不在が、おそらくキャプシドタンパク質のユビキチン化を防止し、これらのベクターは核への途中でプロテアソームによって認識され分解されることがなくなり

40

50



、それが効率のよい核移行につながったことを強く示唆している。

【0171】

第3の研究では、擬似処理するかMG132で処理したHeLa細胞に、擬似感染を行うか、またはWT、Y730F、またはY444F scAAV2-EGFPベクターによる感染を行った。感染の4時間後にWCLを調製し、等量のタンパク質をまず抗AAV2キャプシド抗体(A20)で免疫沈降し、次に抗Ubモノクローナル抗体によるウェスタンブロット分析を行った。擬似感染細胞中にユビキチン化AAV2キャプシドタンパク質(Ub-AAV2 Cap)を検出することはできなかったのに対し、無処理細胞ではユビキチン化AAV2キャプシドタンパク質のシグナルが弱く、MG132による処理後はユビキチン化AAV2キャプシドタンパク質の有意な蓄積が起こった。興味深いことに、Y730FまたはY444Fベクターによる感染は、MG132誘発性ユビキチン化AAV2キャプシドタンパク質の蓄積の程度を、劇的に減少させた。これらの結果は、チロシン残基の変異によってベクターのプロテアソーム媒介分解が回避されることを立証している。

10

【0172】

第4の研究では、投入WT、Y444F、およびY730FベクターウイルスDNAの運命を、HeLa細胞において決定した。細胞質[C]画分および核[N]画分から単離された低 $M_r$  DNA試料のサザンブロット分析と、オートラジオグラフのデンストメトリスキャンにより、WTベクターを感染させた細胞では、投入scAAV2 DNAの約36%が核画分に存在することが明らかになった。しかし興味深いことに、核画分中の投入Y730FおよびY444F scAAV2ベクターDNAの量は、それぞれ約72%および約70%に増加した。これらの結果により、表面露出チロシン残基の変異はAAV2キャプシドのユビキチン化を防止してプロテアソーム媒介分解の減少をもたらし、それが次に、AAV2ベクターの核移行を容易にすることが、さらに証明された。

20

【0173】

チロシン変異体ベクターは、マウスにおいて10分の1の低いベクター用量で、治療レベルのヒト第IX因子タンパク質を発現する。チロシン変異体AAV2ベクターがインビボで治療用遺伝子を低いベクター用量で効率よく送達することができるかどうかを調べるのが重要であった。この目的のために、一本鎖肝細胞特異的ヒト第IX因子(h.FIX)発現カセットをY730Fベクターに封入し、このベクターの効力を3つの異なるマウス系統(BALB/c、C3H/HeJ、およびC57BL/6)で試験した。3系統の全てにおいて一貫して、尾静脈投与または門脈投与後に、Y730FベクターではWTベクターと比較して約10倍高い循環h.F.IXレベルが達成され、門脈投与の方が有効な経路であった。これらの結果から、C57BL/6マウスでは、門脈注射により、Y730Fベクターが約10分の1の低いベクター用量( $10^{10}$ 粒子/マウス)で治療レベルのヒトF.IXタンパク質(約50ng/mL)を発現することが明確に示された。C57BL/6マウスにおける肝ウイルス遺伝子導入は一般に他の2系統よりも効率が高いことに留意すべきである。

30

【0174】

ここに実証したこれらの結果は、AAV2キャプシドタンパク質のEGFR-PTK誘発性チロシンリン酸化がAAV2のユビキチン化と分解を促進し、それがウイルス核移行を損ない、形質導入効率の低下につながるという解釈と合致している。7つの表面露出チロシン残基のそれぞれの変異解析は、インビトロでもインビボでも、形質導入効率が有意に増加したAAV2ベクターを与える。具体的に述べると、Y444FおよびY730F変異体ベクターはユビキチン化ステップを迂回し、それが、有意に改良された細胞内輸送および核へのウイルスゲノム送達をもたらす。

40

【0175】

WTキャプシドタンパク質で構成されたAAV2ベクターにより、前臨床動物モデルで達成された、長期にわたる治療的発現にも関わらず、最近の遺伝子治療試験では、重症血友病Bを持つ2人の患者が、ベクター用量依存的な高トランスアミナーゼ血症を発症し、それが肝細胞由来h.F.IX発現の持続時間を<8週間に制限した。その後の解析により、ヒトにおけるAAVキャプシドに対するメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞の存在と、高トランスアミナーゼ血症の

50

時間経過を反映する、血友病B患者の一人におけるMHC I拘束性キャプシド特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答とが実証された。投入キャプシドに対するこのCD8<sup>+</sup> T細胞応答がAAV2形質導入肝細胞を排除するのだと結論された。これらのデータにより、Y730Fベクターによる効率のよい遺伝子導入には低いキャプシド抗原用量で十分であり、この低いキャプシド抗原用量では、MHC I提示の必要条件であるAAV-Y730Fのユビキチン化が、WTキャプシドと比較してはるかに少なくなることが実証された。したがって、AAV2キャプシドに対するT細胞応答（肝臓における治療用遺伝子導入の重大な障害）は、表面露出チロシン変異体AAV2ベクターを使用することによって回避されうる。

#### 【0176】

チロシン変異体ベクターの形質導入効率の劇的な増加は、インビトロでは初代ヒト神経細胞および造血幹細胞でも、またインビボではマウスのさまざまな組織および器官でも、観察された。二重、三重、および四重チロシン変異体も構築して、そのような多重変異体が生存可能であるかどうか、およびこれらのベクターの形質導入高率がさらに増強されるかどうかを調べた。わずかな例外（AAV4中のグリシンおよびAAV5中のアルギニンと等価な位置にあるY444；AAV4およびAAV5中のフェニルアラニンと等価な位置にあるY700；ならびにAAV7中のフェニルアラニンと等価な位置にあるY704）を除いて、これらのチロシン残基が、AAV血清型1～10で高度に保存されていることは注目に値する。

#### 【0177】

実施例2 - rAAVベクターによるNF- $\kappa$ B経路の活性化

ヒト転写因子データベースを使ったインシリコ解析で、アデノ随伴ウイルス（AAV-2）ゲノム中に、細胞性免疫応答および炎症応答の中心的調節因子であるNF- $\kappa$ Bに対するいくつかの結合部位の存在が実証されたので、本実施例では、AAVがそのライフサイクル中にNF- $\kappa$ Bを利用するかどうかを調べる。組換えAAVベクターで形質導入されたHeLa細胞においてNF- $\kappa$ Bの小分子調整因子を使用した。NF- $\kappa$ B活性化因子であるVP16はAAVベクター媒介導入遺伝子発現を25倍まで増強した。2つのNF- $\kappa$ B阻害因子のうち、標準NF- $\kappa$ B経路および非標準NF- $\kappa$ B経路をどちらも遮断するBay11は、導入遺伝子発現を完全に消失させ、一方、古典的NF- $\kappa$ B経路を妨害するピロリドンジチオカーバメイト（PDTC）には効果がなかった。VP16の存在下で非標準NF- $\kappa$ B経路の核p52タンパク質構成要素がウェスタンブロット分析によって多量に確認され、それがBay11によって消失したことから、AAV感染中に非標準的NF- $\kappa$ B経路の引き金が引かれることが示唆された。類似する結果がインビトロで初代ヒト樹状細胞（DC）でも観察され、ここでは、DC成熟マーカーCD83およびCD86のサイトカイン誘導性発現もBay11によって阻害された。インビボでは、正常C57BL/6マウスにおける遺伝子導入に先立つBay11の投与が、IL-1、IL-6、TNF、IL-12、KC、およびRANTESなどといった炎症誘発性サイトカインおよびケモカインのAAVベクター誘導性生産を、7分の1まで減少させた。これらの研究により、AAVベクターによる形質導入に先立つNF- $\kappa$ B阻害因子による一過性の免疫抑制は免疫応答の鈍化につながり、それはヒト遺伝子治療におけるAAVベクターの最適な使用に大いに関連することが示唆された。

#### 【0178】

最近の研究により、AAV遺伝子導入に起因する初期活性化シグナルが明確になり始めた。ある研究は、Toll様受容体9（TLR9）-ミエロイド系分化因子88（MyD88）経路によるAAV誘導性シグナリングが、形質細胞様樹状細胞（pDC）におけるI型インターフェロン応答を誘発し、それによって、マウス骨格筋への遺伝子導入時に以後のベクターおよび導入遺伝子産物に対する適応免疫応答を駆動することを見出した（Zhu et al., 2009）。これらのデータは、pDC中のエンドソームTLR9受容体によるDNAゲノムの感知を示している。AAVによるDCまたはマクロファージのインビトロパルス処理に続く炎症誘発性サイトカインの誘導を示す証拠は見出されなかった。それでも、以前の報告によって、いくつかの炎症性サイトカインの発現を誘導する、肝臓における著しく一過性ではあるが迅速なAAVベクターに対するクッパー細胞依存的先天性応答が実証されている（Zaiss and Muruve, 2008；Zaiss et al., 2008；Zaiss and Muruve, 2005；Zaiss et al., 2002）。

10

20

30

40

50

## 【0179】

興味深いことに、多くのストレス由来および病原体由来シグナルに対するキー細胞レスポンダーであり、炎症誘発性サイトカイン発現の調節因子であるNF- $\kappa$ B (Hayden and Ghosh, 2004; Hiscott et al., 2006; Li and Verma, 2002) のAAVライフサイクルにおける役割は、これまで研究されていなかった。この実施例では、AAVによるヒト細胞の感染が非標準NF- $\kappa$ B経路の活性化につながりうることを示す。加えて、NF- $\kappa$ Bの活性化は導入遺伝子発現(DCにおけるものを含む)を大いに増加させ、一方、NF- $\kappa$ Bの阻害は発現を鈍らせる。NF- $\kappa$ Bの一過性阻害による炎症性サイトカイン誘導の防止は、インビボでのAAVに対する先天性応答におけるNF- $\kappa$ Bの役割を明らかにし、重要なことに、長期導入遺伝子発現を妨害しない。

10

## 【0180】

## 結果

AAV-ITRはNF- $\kappa$ B応答性転写因子に対する結合部位を含有している。AAV2ゲノムの左逆方向末端反復(ITR)中の一本鎖D[-]-配列と特異的に相互作用する細胞タンパク質の存在は、以前に記述されている(Qing et al., 1997)。右ITR中のssD[+]-配列は左ITR中のssD[-]-配列と相補的であることから、ある推定細胞タンパク質も存在して、それが右ITR中のssD[+]-配列と相互作用するかもしれないと推論した。実際、ssD[+]-配列プローブを使った電気泳動移動度シフトアッセイで、別個の細胞タンパク質が検出され、ssD[+]-配列結合タンパク質(ssD[+]-BP)と名付けられた(Qing et al., 1997)。精製および質量分析により、ssD[+]-BPは、転写の負の調節因子である細胞NF- $\kappa$ B抑制因子に対して部分的なアミノ酸ホモロジーを有することがわかった。ヒト転写因子データベース[TRANSFAC]を使った追加のインシリコ解析により、p300、TFIIB、およびSp11などといったNF-

20

B結合補因子に対する結合部位がいくつか存在することが実証された。これらの一つは、AAVゲノムと会合することが最近示されたp300/CREB転写因子である(Dean et al., 2009)。NF- $\kappa$ Bシグナリングが細胞表面受容体/補助受容体へのAAV結合によって活性化されるかどうかはわからないが、最近の研究により、先天性免疫応答は、a) Toll様受容体9(TLR9)-ミエロイド系分化因子88(MYD88)経路、またはb)細胞表面上のCD40リガンドの活性化のいずれかによって引き金を引かれうることで、マウスモデルにおいてインビボで実証されている(Zhu et al., 2009; Mays et al., 2009)。これらのリガンドはどちらも、それらの生物学的活性化に際し、下流でNF- $\kappa$ B転写因子と相互作用することが知られている(Mineva et al., 2007; Loiarro et al., 2005)。以下のデータにより、NF- $\kappa$ BはAAVのライフサイクルに関与することが実証された。

30

## 【0181】

AAV感染はヒト細胞における非標準NF- $\kappa$ B経路を活性化する。EGFPを発現する自己相補的血清型2ベクター(scAAV-EGFP)で形質導入されるHeLa細胞において、NF- $\kappa$ Bシグナリングの小分子活性化因子および小分子阻害因子を使用した。NF- $\kappa$ B活性化因子であるVP16(Wu and Miyamoto, 2008)は、EGFP発現を約25倍増強した(図1Aおよび図1B)。試験した2つの阻害因子のうち、IKK $\alpha$ とIKK $\beta$ の両方の活性を遮断するBay11が、EGFP発現を完全に消失させたのに対し、古典的経路のIKB $\alpha$ ユビキチンリガーゼを遮断することによってIKB分解を阻害するPDTC(Cuzzocrea et al., 2002)には、EGFP発現に対する顕著な効果がなかった(図1Aおよび図1B)。さらにまた、VP16が媒介する増強された導入遺伝子発現は、Bay11によって完全に消失したが、PDTCでは消失しなかった(図6A)。同様の結果がssAAVベクター(図6B)でもチロシン三重変異体scAAVベクター(Y730+500+444F; TM-AAV)でも得られ、それらについては以前の実施例で述べた(Markusic et al., 2010)(図6C)。したがって、AAVベクターからの導入遺伝子発現はNF- $\kappa$ Bの代替(非標準)経路によって調節されると、結論された。この結論は、VP16の存在下で非標準NF- $\kappa$ B経路のサイトゾルp100構成要素および核p52タンパク質構成要素が約3倍~6倍増加することを明らかにしたウェスタンブロット分析(図6D、および図6E)によって確認された。さらにまた、AAVベクター単独(すなわち活性化因子の非存在下)での形質導入が、p100およびp52を増加させたことから(図1C)、細胞の感染は代替

40

50

NF- $\kappa$ B経路を活性化することが示された。この増加はBay11処理によって消失したが、古典的NF- $\kappa$ B経路に使用されるマーカーp65は影響を受けなかった(図1C)。

【0182】

NF- $\kappa$ B経路は初代ヒト抗原提示細胞において機能している

AAV感染後、一方、初代ヒト樹状細胞(DC)では、導入遺伝子発現はここでもNF- $\kappa$ B活性化因子によって大いに増加するものの(図2A)、AAV感染単独ではNF- $\kappa$ Bを活性化しなかった(図2B)。VP16の存在下では、scAAVベクター形質導入DCと比較して、EGFP発現に約20倍の増加が観察された。NF- $\kappa$ B経路を活性化することが知られているサイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、PGE2)で処理すると、導入遺伝子発現は約26%までさらに増加し、それはBay11による処理後に約12%まで低減した(図2A)。核画分のウェスタンブロット分析により、NF- $\kappa$ B活性化の代替経路が機能していること(p52タンパク質の蓄積)が、さらに確証された(図2B)。同様の結果が、インビボでマウス肝臓へのscAAVベクター媒介遺伝子送達後にも得られた(図7)。本発明者らは、DCにおける表現型変化を誘発するNF- $\kappa$ B調整因子の能力も試験した。2つのDC成熟マーカーCD83およびCD86のフローサイトメトリー分析により、サイトカインカクテルと一緒に使用した場合に、VP16だけでは、成熟を誘発することも共刺激分子の発現を強化することもできないことが示された。しかし、Bay11による処理はAPCのサイトカイン媒介性成熟の阻害につながったことから、NF- $\kappa$ Bの関与がさらに関係づけられた(表2)。成熟マーカー発現のこの減少は、抗原物質をプロセッシングするDCの主要機能を減損し、T-細胞の活性化および増殖を低減する。したがって、ベクター投与に先立つNF- $\kappa$ B活性化の抑制は、AAVに対する先天性免疫応答を鈍化させることになるかもしれないという仮説が立てられた。

【0183】

(表2) 初代ヒト樹状細胞の成熟のマーカーのFACS解析

【表2】

グループ	下記のマーカーを発現する細胞における発現レベルの幾何平均	
	CD83	CD86
未成熟DC	10.38	7.04
DC-成熟サブリメントなし	18.08	13.63
成熟DC+サイトカイン	20.60	26.80
DC+AAV	18.29	12.65
DC+VP16	16.48	13.70
成熟DC+AAV+サイトカイン	24.25	23.75
成熟DC+AAV+サイトカイン+VP16	19.92	21.92
成熟DC+AAV+サイトカイン+Bay11	16.88	10.11

代表的実験からのデータを示す(n=3)。

【0184】

NF- $\kappa$ B活性化の阻害はインビボでマウスにおけるAAVベクター媒介遺伝子導入前の炎症誘発性サイトカイン生産の抑制につながる。インビボ研究では、C57BL/6マウスにおいて、20mg/kg体重のBay11の単回用量を、ベクター投与の12時間前に腹腔内(i.p.)に投与した。Bay11注射群およびベクター注射群からの肝臓ホモジネートにおける先天性免疫メディエーター(図3A)またはNF- $\kappa$ Bの活性化に関する(図3B)遺伝子の転写産物レベル

を測定し、シャム注射したマウスと比較した。これらのデータから、ベクター投与の2時間後に、Bay11 + AAVベクター注射を受けたマウスでは、IL-1、IL-6、TNF、IL-12、KC、およびRANTESを含む炎症誘発性サイトカインまたはケモカインのレベルが、シャム注射およびAAVベクター注射を受けた動物と比較して有意に低下していること（図3A）、そしてそれに加えて、NF- $\kappa$ B遺伝子発現プロファイルのアップレギュレーションが防止されたこと（図3B）ことが明らかになった。これらの先天性免疫応答マーカーの同様のダウンレギュレーション傾向は、効力の高いチロシン三重変異体AAVベクター（Y730+500+444F；TM-AAV）を注射したマウスにも見られた。野生型（WT-AAV）およびTM-AAVベクターによるI型インターフェロン発現のアップレギュレーションはどちらも、Bay11による影響を受けなかった（図8A、図8B、図8C、図8D、図8E、および図8F）。Bay11の投与は、これらのマウスにおける抗AAV2抗体応答も有意に低減した（図9）。これらの結果は全体として、インビボ肝AAV遺伝子導入時に典型的に見られる一過性の炎症性サイトカイン応答が、NF- $\kappa$ B活性化によって媒介されることを意味している。

#### 【0185】

マウス肝細胞におけるAAVベクター媒介導入遺伝子発現。Bay11が形質導入の48時間後にインビトロでHeLa細胞におけるAAV媒介導入遺伝子発現を強く阻害するという観察結果（図1Aおよび図1B）（これは、インビボで長期導入遺伝子発現を達成するには逆効果であるだろう）から考えて、マウスにおけるBay11の効果を調べることが重要であった。図4Aからわかるように、Bay11を注射した動物とBay11を注射していない動物では、遺伝子導入の2週間後に分析したところ、どちらのベクターからのEGFP発現も、類似するレベルであった。TM-AAVベクターの形質導入効率は、WT-AAVベクター（図4B）より約1.2倍高く、最近公表された研究と合致した（Markusic et al., 2010）。これらのデータから、Bay11投与は、長期導入遺伝子発現を損なうことなく、先天性免疫応答のメディエーターを安全かつ効果的にダウンレギュレートすることが示唆された。

#### 【0186】

##### 材料と方法

組換えAAVベクター。野生型（WT）プラスミドまたは三重チロシン変異体（TM；Y730+500+444F）プラスミドと、ニワトリ $\beta$ -アクチン（CBA）プロモーターによって駆動される強化緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子とを含有する自己相補的（sc）AAV2ベクター（WT-scAAV2-EGFP、TM-scAAV2-EGFP）の高精製ストックを、HEK-293細胞の三重トランスフェクションによって作製した。次に、ベクターをCsCl勾配遠心分離によって精製し、ろ過滅菌し、記載されているようにスロットプロットハイブリダイゼーションによって定量した（Liu et al., 2003；Kube and Srivastava, 1997）。チロシン変異体pACG2-Y730+500+444F-Rep/Capプラスミドは最近記述されている（Markusic et al., 2010）。

#### 【0187】

インビトロでの組換えAAVベクター形質導入アッセイ。NF- $\kappa$ B調整化合物の至適濃度は、IC<sub>50</sub>から、10倍希釈系列での細胞生存性アッセイによって決定するか、以前に記述されたように使用した（Wu and Miyamoto, 2008；Kumar et al., 2008）。VP16またはBay11（最終濃度10 $\mu$ Mまたは5 $\mu$ M）およびPDTC（最終濃度50 $\mu$ Mまたは25 $\mu$ M）は単独で使用するか、活性化因子/阻害因子の組み合わせで使用した。形質導入実験では、ベクター感染の24時間前に、約1 $\times$ 10<sup>5</sup>個のHeLa細胞をこれらの化合物で前処理した。細胞に、1細胞あたり500または2,000ベクターゲノム（vg）の、EGFP導入遺伝子をコードする組換えWT-AAVまたはTM-AAVベクターを、以前に記述されたように形質導入した（Markusic et al., 2010）。7日間の培養後に、初代ヒト樹状細胞に、2000vg/細胞のAAVベクターで形質導入し、48時間インキュベートした。導入遺伝子発現は、視野あたりの緑色蛍光の総面積（ピクセル<sup>2</sup>）（平均 $\pm$ SD）として評価するか、フローサイトメトリーによって評価した。分散分析（ANOVA）を使って試験結果と対照とを比較し、それらが統計的に有意であると決定した。

#### 【0188】

10

20

30

40

50

インビボでの組換えAAVベクター形質導入研究．6週齢正常C57BL/6Jマウス（Jackson Laboratories、米国メイン州バーハーバー）の群に、NF- $\kappa$ B阻害因子Bay11の単回用量（20mg/kg）を、DMSOに希釈した200 $\mu$ Lの体積で腹腔内投与した（0日目）。DMSO担体溶媒だけを注射した動物をベースライン（擬似）群（n=75）とみなし、Bay11を注射した動物を試験群とした（n=75）。この時点で、擬似群およびBay11群からの動物をランダム化して、リン酸緩衝食塩水（PBS、pH7.4）またはWT-AAVベクターまたはTM-AAVベクターを与えた（各群n=25マウス）。1日目に、約 $1 \times 10^{11}$ ウイルスゲノム（vg）粒子のWT-AAV2-EGFPベクターもしくはTM-AAV2-EGFPベクターまたはPBSを尾静脈から静脈内注射した。AAVに対する免疫応答の調整を測定するために、PBS注射群、WT-AAVベクター注射群またはTM-AAVベクター注射群からのそれぞれ5匹を、ベクター投与後の異なる時点（2、6、10、24時間および10日目）で二酸化炭素吸入によって殺した。肝葉を収集し、横断面切片を作製し、スライドにマウントすることで、（10日目マウスからの）AAV媒介EGFP発現に対するBay11の効果を調べた。動物研究は全て施設内動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。

【0189】

RT-PCRアッセイによる先天性免疫応答の遺伝子発現解析．6週齢正常C57BL/6Jマウスの群に、NF- $\kappa$ B阻害因子Bay11の単回用量（20mg/kg）を、DMSOに希釈した200 $\mu$ Lの体積で腹腔内投与した（0日目）。1日目に、マウスに、リン酸緩衝食塩水（PBS、pH7.4）または約 $1 \times 10^{11}$ vgの野生型（WT）AAV-EGFPベクターもしくはチロシン三重変異体（TM）AAV-EGFPベクターのいずれかを、尾静脈から静脈内注射した（各群n=5マウス）。ベクター投与の2時間後に、Toll様受容体1~9、MyD88、MIP-1、IL-1、IL-12、IL-6、KC、TNF、RANTES、MCP-1、IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、およびIP-10を含む先天性免疫応答の遺伝子発現プロファイリングを行った。データは、ABI Prism 7500 Sequence Detection Systemとv1.1ソフトウェア（Applied Biosystems）を使って取り込み、解析した。ベースラインは18S rRNAおよび他の遺伝子について自動的に決定された。閾値は、全ての遺伝子について手作業で決定した。遺伝子発現を比較閾サイクル（Ct）法で測定した。パラメータ閾サイクル（Ct）は、プローブの切断によって生成するレポーター蛍光がベースラインを上回る固定された閾を通過した時のサイクル数と定義した。サイトカイン遺伝子発現は、内因性参照18S rRNA遺伝子を使って標準化し、擬似感染マウスmRNAを参照試料として使用した。相対的遺伝子発現を、処置動物と無処置動物の各群について決定し、 $> 2.6$ および $< 0.38$ の値を群間の有意なアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションとみなし、特異的遺伝子発現を測定するために使用した96ウェルプレートにおける変動性を評価することによって計算した。

【0190】

細胞、抗体および化学薬品．HeLa細胞はAmerican Type Culture Collection（米国メリーランド州ロックビル）から入手し、10%ウシ新生児血清（NCS）（Lonza, Inc.、スイス国バーゼル）と抗生物質とを補足したイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM、Invitrogen、米国カリフォルニア州カールズバッド）中で単層培養物として維持した。白血球アフェレーシス由来PBMCを無血清AIM-V培地（Lonza）に再懸濁し、半接着細胞画分を、組換えヒトIL-4（500U/mL）およびGM-CSF（800U/mL）（R&D Systems、米国ミネソタ州）を補足した無血清AIM-V培地中でインキュベートした。細胞をNF- $\kappa$ B調整因子（10mM VP16または10mM Bay11）および10ng/mL TNF $\alpha$ 、10ng/mL IL-1、10ng/mL IL-6、1mg/mL PGE2（R&D Systems）を含むサイトカインカクテルで20時間処理した。細胞を収穫し、成熟DCの典型的表現型を満たすことを保証するために特徴づけた（CD83、RPE、マウスIgG1；CD86、FITC、マウスIgG1；Invitrogen）。一次抗体と二次抗体は全てCell Signaling Technology, Inc.（米国マサチューセッツ州ダンバース）またはSanta Cruz Biotechnology, Inc（米国カリフォルニア州サンタクルズ）から購入した。NF- $\kappa$ B活性化因子 [ エトポシド（VP16）、アフィディコリン、ヒドロキシ尿素（HU） ] およびNF- $\kappa$ B阻害因子 [ Bay11-7082（Bay11）、ピロリジンジチオカーバメイト（PDTC） ] はSigma-Aldrich Co.（米国ミズーリ州セントルイス）から購入した。これ

らの化合物は製造者の説明書に従ってDMSO (Sigma-Aldrich) または滅菌DNAaseフリー-RNAaseフリー水 (Invitrogen) のいずれかに再懸濁した。

#### 【0191】

ウェスタンブロット分析。擬似処理するか、至適濃度のNF- $\kappa$ B活性化因子または阻害因子で前処理した、約 $2 \times 10^6$ 個のHeLa細胞またはDCからの細胞ペレットをホモジナイズした溶解物を、試料調製に使用した。全細胞タンパク質はRIPA溶解緩衝液 (Sigma-Aldrich) を使って単離し、細胞質タンパク質および核タンパク質は、市販のキット (NE-PER Extraction Reagent Kit、Pierce Biotech、米国イリノイ州ロックフォード) を、製造者のプロトコールに従って使用することにより、プロテアーゼ阻害因子カクテル ( Halt (商標) プロテアーゼ阻害因子カクテルキット、Pierce Biotech) の存在下で抽出した。タンパク質抽出物を還元条件下で5分間煮沸し [ 62.5mM トリス-HCl (25 でpH6.8)、2% wt./vol. SDS、10% グリセロール、50mM DTT、0.01% (wt./vol.) プロモ-フェノールブルー (Cell Signaling Technology, Inc.) を含有するSDS試料緩衝液]、さらに解析するまで-86 で保存した。等体積の試料を4-15% SDS-PAGE (Bio-Rad、米国カリフォルニア州ハーキュリーズ) にかけた。ゲルを0.2  $\mu$ m ニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad) に転写し、典型的には、一次抗体 [ p100/52、p65、阻害キナーゼ-I  $\kappa$ B、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、ラミンB (Cell Signaling Technology, Inc.)、 $\alpha$ -アクチン (Santa Cruz Biotechnology) ] の1:1000希釈液と共に、終夜インキュベートした。翌日、プロットを、1:2,000~1:5,000の適当な抗イディオタイプHRP標識IgG二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と共にインキュベートした。イムノブロット検出は、ECL plusウェスタンブロット検出キット (Amersham Biosciences、米国ニュージャージー州ピスカタウェイ) を使って行った。タンパク質バンドの強度はAdobe Photoshop CS3ソフトウェア (登録商標) で測定し、ローディング対照として使用したハウスキーピング遺伝子産物からのタンパク質レベルに対して標準化した。

#### 【0192】

本研究の根拠は、宿主細胞のNF- $\kappa$ BはAAV逆方向末端反復 (ITR) 中に存在する20bpのD配列に結合することができるという発見であり (Qing et al., 1997)、このことは、電気泳動移動度シフトアッセイと、それに続く質量分析によって確認された (図10Aおよび図10B)。この実施例で提示するデータは、AAV感染にNF- $\kappa$ Bが関与することを示す初めての証拠になる。NF- $\kappa$ Bシグナリング経路を研究するために他の研究者らが広く使用してきたさまざまな薬学的調整因子を使って (Wu and Miyamoto, 2008; Kumar et al., 2008)、AAV感染後に非標準NF- $\kappa$ B経路がアップレギュレートされることが示された。NF- $\kappa$ B転写プログラムの活性化が炎症および免疫活性化の基礎的前初期ステップであること (Li and Verma, 2002) およびNF- $\kappa$ Bシグナリングがウイルス感受性またはウイルス干渉の有力候補であること (Hiscott et al., 2006) を考えると、これは重要である。NF- $\kappa$ Bを活性化するウイルスは、インターフェロン応答 (水疱性口内炎ウイルス、麻疹ウイルス) (Hiscott et al., 2003)、Toll様受容体 (TLR) 依存的シグナリング経路 (エボラウイルス、呼吸器合胞体ウイルス) (Okumura et al., 2010; Lizundia et al., 2008)、およびTLR非依存的シグナリング経路 (サイトメガロウイルス、C型肝炎ウイルス) (Castanier et al., 2010; Gourzi et al., 2007) による先天性免疫応答に対して感受性であることが示されている。他方、多くのウイルスは、NF- $\kappa$ B経路の特異的側面を標的とする多機能ウイルスデコイタンパク質を使って、先天性免疫応答およびNF- $\kappa$ Bを攪乱する。ヒト免疫不全ウイルスI型 (HIV-1)、ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1)、ヒトヘルペスウイルス8 (HHV8) およびエプスタイン・バー・ウイルス (EBV) などのウイルスは、NF- $\kappa$ Bシグナリングの側面をそのライフサイクルおよび病原性に組み込んでいて、自らの生き残りを増進するためにNF- $\kappa$ B活性化を利用している (Hiscott et al., 2006)。

#### 【0193】

これに対して、非標準NF- $\kappa$ B活性化は先天性免疫応答および適応免疫応答にとって重要

であることが知られていることと (Gilmore, 2006)、AAVベクターは何らかのNF- $\kappa$ B様デコイタンパク質を発生させるのに必要な複雑な構造遺伝子要素を欠いていることから、NF- $\kappa$ Bの非標準経路がAAV感染後に活性化されることは理に適っている。非標準経路の活性化の亢進は、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎またはB細胞リンパ腫のような幅広い炎症性障害と関連付けられている (Dejardin, 2006)。もっぱらミエロイド系譜の細胞において発現するピリン含有タンパク質であるMonarch-1は、非標準NF- $\kappa$ B経路の活性化に必要なNF- $\kappa$ B誘導性キナーゼ (NIK) の阻害によって、炎症誘発性サイトカインおよびケモカインを抑制する (Lich et al., 2007)。NF- $\kappa$ B活性化の非標準経路の活性化は、古典的経路の活性化を遮断する変異型I $\kappa$ Bを過剰発現するDCの成熟およびT細胞プライミング活性をもたらすことが示されている (Lind et al., 2008)。NIKが欠損しているリンパ形成不全 (Aly) マウスでは、DCにおける外因性抗原に対するCD8+ T細胞のクロスプライミングが影響を受けることから、適応免疫におけるこの経路の重要性が示唆される (Lind et al., 2008)。非標準経路の構成要素が欠損しているマウスは、二次リンパ器官の発生およびホメオスタシスにも欠損を示す (Guo et al., 2008)。AAV結合が細胞表面受容体へのNF- $\kappa$ Bシグナリングを活性化するかどうかはわかっていない。最近の研究では、AAVに対する先天性免疫応答は、TLR9-MYD88経路によって、または細胞表面上のCD40リガンドの活性化によって引き金を引かれうるものが、マウスモデルにおいてインビボで実証されている (Zhu et al., 2009; Mays et al., 2009)。どちらも先天性免疫応答をマウントするために下流でNF- $\kappa$ Bシグナリングに頼っているが (Mineva et al., 2007; Loiarro et al., 2005)、CD40LなどのTNFスーパーファミリー受容体の活性化が非標準NF- $\kappa$ B経路を活性化できる点 (Qing et al., 2005) に注目することは興味深い。

#### 【 0 1 9 4 】

AAVベクターに対する免疫監視機構への最初の「危険信号」または「引き金」が代替的NF- $\kappa$ Bシグナリング経路の活性化でありうるという証拠に基づいて、AAVベクター投与時のNF- $\kappa$ Bの一過性の遮断は、宿主免疫応答を鈍化させうるのではないかと推論した。AAVによるNF- $\kappa$ Bプライミングを無効にするための考えられる戦略の一つは、AAV-ITR中のNF- $\kappa$ B応答性転写因子結合部位に対する標的変異を生じさせることである。しかし、細胞生理におけるNF- $\kappa$ Bタンパク質の多面的な機能を考えると (Hayden and Ghosh, 2004)、異なる細胞タイプでは異なるNF- $\kappa$ B応答性サイトカインプロモーター結合転写因子が機能しているかも知れないという可能性がある。あるいは、NF- $\kappa$ B経路を標的とすることによる一過性免疫抑制のためのプロトコールが、普遍的に応用可能であるかもしれない。選択的NF- $\kappa$ B阻害因子Bay11は、インビボで、AAVベクターに対する炎症および先天性免疫応答のマーカーを著しく低減することができるにもかかわらず、その導入遺伝子発現に影響を及ぼさない。Bay11は、いくつかのキー調節因子、すなわちIL-1、IL-6、TNF、IL-12、KCおよびRANTESの活性をダウンレギュレートすることができたことから、AAVベクターに対する炎症性および先天性免疫応答を選択的にダウンレギュレートするために、この薬学的調整因子を使用することの利益が示唆された。興味深いことに、非標準NF- $\kappa$ B経路の活性化にとって重要なNIKは、さまざまなウイルス感染に対する応答においてIL-1、IL-6、IL-12、TNFおよびRANTESの活性化を誘導することも知られている (DiPaolo et al., 2009; Yanagawa and Onoe, 2006; Andreakos et al., 2006; Habib et al., 2001)。加えて、送達ベクターなどの関連ターゲットに対する免疫応答につながる抗原特異的CD4+ヘルパーT細胞のプライミングに重要な活性を持つ静止プロフェッショナル抗原提示細胞DCの活性化と機能にとって、NIKが枢要であることもよく知られている (Andreakos et al., 2006; Habib et al., 2001; Martin et al., 2003; Brown and Lillicrap, 2002)。インビトロで、NIKは、NF- $\kappa$ Bを強力に活性化し、その結果として、サイトカイン (TNF、IL-6、IL-12、IL-15、およびIL-18)、ケモカイン (IL-8、RANTES、マクロファージ炎症性タンパク質-1、単球化学誘引タンパク質-1、および単球化学誘引タンパク質-3)、MHC抗原提示分子 (クラスIおよびII)、および共刺激分子 (CD80およびCD86) の発現をアップレギュレートすることによって、DC抗原提示を増加させる (Andreakos et al., 2006)。インビボで、NIKは、ベクターがコ

10

20

30

40

50



ードする抗原に対する免疫応答を強化し、それらをTヘルパー1免疫応答側へとシフトさせ、IgG2aレベル、T細胞増殖、IFN- $\gamma$  生産、および細胞傷害性Tリンパ球応答を、完全フロイントアジュバントより強力に増加させる (Andreakos et al., 2006)。この研究で使用したBay11は、非標準経路におけるNIKの基質であるIKK $\alpha$  とIKK $\beta$  の活性を防止する (Pierce et al., 1997)。これらのデータは、非標準NF- $\kappa$ B経路のターゲティングにおけるBay11の高い特異性、および免疫応答の主要調整因子の活性化を防止するその能力を示している。

#### 【0195】

NF- $\kappa$ B経路を標的とすることによる一過性免疫抑制のためのプロトコールは、免疫毒性を制限するために普遍的に応用できるかも知れない。事実、最近の報告では、プロテアソーム阻害因子ボルテゾミブ [Velcade (登録商標)] の使用によるAAVキャプシド抗原提示の減少が示された (Finn et al., 2010)。ボルテゾミブはかなりの抗骨髄腫効力を有するが (Kube and Srivastava, 1997)、その大部分はNF- $\kappa$ Bシグナリングの抑制によるものであると思われる。それゆえに、AAVベクターの安全性と治療効力をさらに強化するために、キャプシドのMHC I提示と炎症性シグナルとを同時に遮断すること、あるいは、より選択的なNF- $\kappa$ B標的療法、例えばこの研究におけるBay11、またはより新しいIKK阻害因子を使用することが可能であるだろう。

#### 【0196】

##### 実施例3 - 最適化AAV3血清型ベクターの開発

非病原性ヒトパルボウイルスであるアデノ随伴ウイルス2 (AAV2) は一本鎖DNAゲノムを含有し、種の壁を超越する広い組織指向性を有する (Muzyczka, 1992)。組換えAAV2ベクターは、さまざまなヒト疾患の潜在的遺伝子治療のための有望なベクター系として注目を集めており、いくつかの遺伝子治療臨床試験において現在使用されている (Daya and Berns, 2008)。つい最近になって、いくつかの新たなAAV血清型が単離され、特異的細胞タイプに効率よく形質導入することが示された (Muramatsu et al., 1996; Chiorini et al., 1997; Chiorini et al., 1999; Rutledge et al., 1998; Gao GP et al., 2002; Vandenberghe et al., 2004)。AAV2のライフサイクルのさまざまなステップはかなりよく理解されているが (Summerford and Samulski 1998; Qing et al., 1999; Summerford et al. 1999; Hansen et al., 2000; Hansen et al., 2001; Sanlioglu et al., 2000; Douar et al., 2001; Zhao et al., 2006; Thomas et al. 2004; Zhong et al. 2004; Ferrari et al., 1996; Fisher et al. 1996; Qing et al., 2004; Zhong et al., 2004; Zhong et al., 2004; Zhong et al., 2008; McCarty et al., 2004; Bainbridge et al., 2008)、他の血清型については、それほどわかっていない。

#### 【0197】

よく使用される10種類のAAV血清型のうち、AAV3は、細胞と組織に形質導入する能力が不十分であると報告されている (Zincarelli et al.; Zincarelli et al., 2008)。しかし、最近の研究で、AAV3ベクターは樹立ヒト肝芽腫 (HB) およびヒト肝細胞癌 (HCC) 細胞株ならびに初代ヒト肝細胞に極めて効率よく形質導入することが明らかになった (Glushakova et al., 2009)。その後、AAV3感染は肝細胞成長因子 (HGF)、HGF受容体 (HGFR) 特異的siRNA、および抗HGFR抗体によって強く阻害されることが立証され、それにより、AAV3はウイルス進入の細胞受容体/補助受容体としてHGFRを利用することが示唆された (Ling et al., 2010)。

#### 【0198】

ユビキチン-プロテアソーム経路は、AAVベクターの細胞内輸送において決定的な役割を果たす (Douar et al., 2001; Zhong et al., 2007; Duan et al., 2000)。無傷のAAV2キャプシドは、上皮成長因子受容体タンパク質チロシンキナーゼ (EGFR-PTK) によりチロシン残基でリン酸化されうる。そして、AAVキャプシドのこのチロシンリン酸化は、ウイルス細胞内輸送および導入遺伝子発現に負の影響を及ぼす。これらの知見から、チロシンリン酸化はAAVキャプシドのユビキチン化と、それに続くプロテアソーム媒介分解の

シグナルであることが示唆された (Duan et al., 2000 ; Zhong et al., 2008)。このことから、表面露出チロシン残基 (Y) をフェニルアラニン (F) に変異させることで、ベクターは、リン酸化、ユビキチン化およびプロテアソーム媒介分解を免れることができるかもしれないという仮説が立てられた。事実、AAV2ベクター中の表面露出チロシン残基の変異は、インビトロのHeLa細胞でも、インビボの Maus 肝細胞でも、低用量での高効率形質導入につながった (Zhong et al., 2008)。単一および多重チロシン変異体AAV2ベクターを使って、いくつかの異なる Maus 系統で、治療レベルのヒト第IX因子の発現が得られている (Zhong et al., 2008 ; Markusic et al., 2010)。さらなる研究により、AAV血清型6、8および9における同様のY F変異が導入遺伝子発現の増強につながることを確認されている (Petrus-Silva et al., 2009 ; Qiao et al., 2010 ; Taylor and Ussher, 2010)。AAV2中の7つの表面露出チロシン残基のうちの6つは、AAV3にも保存されているが、AAV3媒介形質導入におけるそれらの関与は評価されていない。

#### 【0199】

この実施例では、(i) 内因性hHGFRの発現が検出できないレベルであるヒト乳がん細胞株T47D細胞 (Abella et al., 2005) では、hHGFRの安定トランスフェクションと過剰発現後に、AAV3ベクター媒介形質導入が劇的に増加すること、(ii) hHGFRに関連するチロシンキナーゼ活性がAAV3ベクターの形質導入効率に負の影響を及ぼすこと、(iii) プロテアソーム阻害因子の使用がAAV3ベクター媒介形質導入を有意に改良すること、(iv) AAV3キャプシド上の3つの表面露出チロシン残基の部位指定変異誘発が形質導入効率の改良につながることを、(v) 2つのチロシン変異の特定の組合せが導入遺伝子発現の程度をさらに改良すること、および (vi) AAV3ベクターが、 Maus 異種移植片モデルにおいて、インビボで、腫瘍内投与後にも全身性投与後にも、ヒトHB腫瘍およびHCC腫瘍に効率よく形質導入することを実証する。これらの最適化AAV3ベクターは、遺伝子治療のための、特にヒトにおける肝がんの治療のための、改良されたツールになる。

#### 【0200】

##### 材料と方法

細胞株および培養物 . ヒト子宮頸がん (HeLa) 細胞株および肝細胞癌 (Huh7) 細胞株は、American Type Culture Collection (米国バージニア州マナッサス) から購入し、10% 熱非働化ウシ胎児血清 (FBS, Sigma-Aldrich, 米国ミズーリ州セントルイス)、1% ペニシリンおよびストレプトマイシン (P/S, Lonza, 米国メリーランド州ウォークーズビル) を補足した完全DMEM培地 (Mediatech, Inc., 米国バージニア州マナッサス) 中で維持した。新たに樹立されたヒト肝芽腫 (Hep293TT) 細胞株 (Chen et al., 2009) は、15% 熱非働化FBS (Sigma-Aldrich)、1% ペニシリンおよびストレプトマイシン (P/S, Lonza, メリーランド州ウォークーズビル) を補足した完全RPMI培地1640 (Invitrogen, 米国カリフォルニア州カマリロ) 中に維持した。細胞を、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の湿潤雰囲気下で付着培養物として成長させ、室温において2~5分間、トリプシン-ヴェルセン混合物 (Lonza) による処理後に継代し、洗浄し、完全培地に再懸濁した。ヒト乳がん細胞株T47D、およびhHGFR発現プラスミドを安定にトランスフェクトしたT47D細胞 (T47D+hHGFR) は、10% 熱非働化ウシ胎児血清 (FBS, Sigma-Aldrich, 米国ミズーリ州セントルイス)、1% ペニシリンおよびストレプトマイシン (Lonza) を補足した、600 μg/mLのG418を含む、または含まない、完全DMEM培地 (Mediatech, Inc.) 中に維持した。

#### 【0201】

組換えAAVプラスミドおよびベクター . 組換えAAV3パッケージングプラスミドおよび組換えAAV2-CBAp-EGFPベクタープラスミドは、それぞれ、ノースカロライナ大学チャペルヒル校 (ノースカロライナ州チャペルヒル) のR. Jude Samulski博士とXiao Xiao博士の厚意によって提供された。ニワトリ  $\beta$ -アクリンプロモーター (CBAp) によって駆動される強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を含む scAAV2 および scAAV3 ベクターの高精製ストックは、以前に記述されているように (Wu et al., 2007 ; Kube and Srivastava, 1997)、リン酸カルシウム三重プラスミドトランスフェクションプロトコル

ルによってパッケージングした。組換えベクターストックの物理的粒子力価は、定量的DNAスロット-プロット分析 (Kube and Srivastava, 1997) によって決定した。

【0202】

表面露出チロシン残基変異体AAV3キャプシドプラスミドの構築 . プラスミドpAAV3を使って、以前に記述されているように (Glushakova et al., 2009 ; Ling et al., 2010) 、QuikChange II (登録商標) 部位指定変異誘発 (Stratagene、カリフォルニア州ラホーヤ) に基づく2段階法を行った。簡単に述べると、第1段階では、各変異体について2つのPCR伸長反応を別々のチューブで行った。一方のチューブはフォワードPCRプライマーを含有し、他方はリバースプライマーを含有した (表3)。

【0203】

第2段階では、2つの反応を混合し、製造者の説明書に従って標準的PCR変異誘発アッセイを行った。PCRプライマーは、チロシン残基からフェニルアラニン残基への変化とスクリーニング用に新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を作り出すサイレント変化とが導入されるように設計した (表3) 。全ての変異体を適当な制限酵素でスクリーニングし、使用前に配列決定した。

【0204】

(表3) 部位指定変異誘発に使用したプライマーのヌクレオチド配列

【表3】

変異体	プライマー配列 (5'→3')
Y252F	ACCAGAACCTGGGCTCTGCCCACTTTCACAACAACCATCTCTACAAG (配列番号 11) <i>Apal</i> Tyr→Phe
Y272F	CAATCAGGAGCTTCGAAACGACAACCACTTCTTTGGCTACAGCACC (配列番号 12) <i>+BstBI</i> Tyr→Phe
Y444F	CCTATC GATCAGTATCTGTACTTCCTGAACAGAACGCAAGGAACA (配列番号 13) <i>+Cfal</i> Tyr→Phe
F501Y	GCTAACGACAACAACAACAGTAACTATCCATGGACAGCGGCCAGCAAAA (配列番号 14) Phe→Tyr <i>+NcoI</i>
Y701F	TGGAATCCAGAGATTCAGTTCACGTCCTCAACTACAACAAGTCTGTT (配列番号 15) Tyr→Phe <i>+BmgBI</i>
Y705F	GAGATTCAGTACACGTCCTCAACTCAACAAGTCTGTTAATGTGGAC (配列番号 16) <i>+AflIII</i> Tyr→Phe
Y731F	GTGAACCTCGCCCTATTGGAACCCGGTITCTCACACGAAACTTG (配列番号 17) Tyr→Phe

コドントリプレットをボード体で示す。赤色のフォントはチロシン残基からフェニルアラニン残基への変異を表し、緑色のフォントは所望のクローンを同定するために使用した制限酵素部位 (下線部) を排除/作出するためのサイレント変異を表す。

【0205】

AAVベクター形質導入アッセイ . Huh7細胞またはHeLa細胞を完全DMEM培地に入れて、96ウェルプレートに1ウェルあたり5,000細胞の濃度で播種した。AAV感染は、血清フリーかつ抗生物質フリーDMEM培地中で行った。Hep293TT細胞は、完全RPMI培地中、96ウェルプレートに1ウェルあたり10,000細胞の濃度で播種した。感染は、血清フリーかつ抗生物質フリーRPMI培地中で行った。形質導入の72時間後に直接蛍光イメージングによってEGFPの発現を解析した。

【0206】

ウェスタンプロット分析 . 細胞を収穫し、放射免疫沈降アッセイ (RIPA) 溶解緩衝液 (プロテアーゼ阻害因子カクテル、1mM NaFおよび1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>を含む50mMトリス-HCl

、pH8.0、150mM NaCl、0.1% SDS、1% NP-40、0.25% デオキシコール酸ナトリウムおよび1mM EDTA) 中で破碎した。ブラッドフォード試薬 (Bio-Rad) を使って総タンパク質濃度を測定し、等量 (50  $\mu$ g) の全細胞溶解物をSDS-PAGEで分割した。電気泳動後に試料をニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad) に電気転写し、関連する一次抗体で4において終夜プローブし、セイヨウワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体 (Jackson ImmunoResearch、米国ペンシルバニア州ウェストグローブ) と共にインキュベートし、強化化学発光基質 (Amersham) で検出した。ホスホ-c-Met (Y1234/1235)、総c-Met、ホスホ-Akt (S473) およびホスホ-ERK (T202/Y204) に対する抗体はCell Signalingから購入し、抗  $\alpha$ -アクチン (AC-74) 抗体はSigma-Aldrichから入手した。

【0207】

マウス異種移植片モデルにおける組換えAAV3ベクター形質導入研究 . 6週齢のNSGマウス (Jackson Laboratories) の群に、 $5 \times 10^6$  個のHep293TT細胞またはHuh7細胞を皮下注射した。注射の4週間後に、表示した数のAAV3ベクターゲノム (vg) を腫瘍内に投与するか、尾静脈から投与した。ベクター投与の4日後に、腫瘍を切除し、横断切片を作製し、蛍光顕微鏡を使ってEGFP発現について評価した。細胞核を可視化するために切片をDAPIでも染色した。動物研究は全て、承認された施設内ガイドラインに従って行った。

【0208】

統計的解析 . 結果を平均  $\pm$  標準偏差 (SD) として表す。群間の差は、スチューデントのT検定の群分けされた対応のない両側分布 (grouped-unpaired two-tailed distribution of Student's t-test) を使って同定した。P値 < 0.05を統計的に有意とみなした。

【0209】

結果

AAV3の感染力にはヒトHGFRが必要である . AAV3は、細胞補助受容体としてヒト肝細胞成長因子受容体 (HGFR) を利用する (Ling et al., 2010) 。この知見を疑いの余地なく確証するために、hHGFRの発現量が検出不能なレベルであるヒト乳がん細胞株T47D (Abella et al., 2005) と、hHGFR発現プラスミドを安定にトランスフェクトしたT47D細胞 (T47D+hHGFR) (Abella et al., 2005) とを使用した。樹立細胞株T47D+hHGFRにおけるhHGFRタンパク質の発現は、ウェスタンブロット分析によって確認した (図12C参照) 。同一条件下で、等しい数のT47D細胞およびT47D+hHGFR細胞に、さまざまな感染多重度 (MOI) の自己相補的 (sc) AAV3-CBAp-EGFPベクターで形質導入し、導入遺伝子発現を形質導入の72時間後に決定した。図11Aに示すこれらの結果は、AAV3ベクターの形質導入効率が、hHGFRを発現する細胞では、hHGFRを発現しない細胞より約8~13倍高いことを証明している。T47D+hHGFR細胞のAAV3ベクター媒介形質導入は、5  $\mu$ g/mLのhHGFの存在下では、完全に遮断することができた (図11B) 。総合すると、これらのデータは、AAV3ベクターによる形質導入が成功するには、hHGFRの細胞表面発現が必要であることの決定的証拠になる。

【0210】

HGFRタンパク質チロシンキナーゼ活性の阻害はAAV3ベクターの形質導入効率を強化する . HGFRの細胞外ドメインだけでなく、タンパク質チロシンキナーゼ活性を含んでいるHGFRの細胞内ドメインも、AAV3感染に関与するかどうかを調べるために、さらなる研究を行った。そのリガンドHGFの結合は、受容体の二量体化と、細胞内ドメイン中の複数のチロシン残基の分子間リン酸基転移反応とをもたらす (Nguyen et al., 1997) 。T47D+hHGFR細胞を、一連の濃度の特異的HGFRキナーゼ阻害因子BMS-77760707 (BMS) (Schroeder et al., 2009 ; Dai and Siemann, 2010) で、2時間処理した。次に、細胞に2,000vg/細胞のscAAV3ベクターを感染させた。これらの結果を図12Aに示す。BMS-777607処理が、AAV3形質導入効率の約2倍の増加につながったことは明白である。BMS-777607を最高濃度の10  $\mu$ Mで使用した場合は、それより低濃度の1  $\mu$ Mの場合と比較して、p値が高いが、この変化はおそらく薬物毒性によるものである。以前の研究では、BMS-777607処理は 1  $\mu$ Mの用量では細胞成長に対して有意な効果を持たないと報告されている。しかし、10  $\mu$ Mという用量は、細胞増殖に有意な低減をもたらしたことから

10

20

30

40

50

、この濃度は細胞にとって毒性であることが示唆された (Dai and Siemann, 2010)。次の実験では、この薬物の考えうる非特異性を全て除外するために、親T47D細胞を対照として含めた。両細胞タイプを1  $\mu$ M BMS-777607で2時間処理した後、10,000vg/細胞のscAAV3ベクターを感染させた。図12Bに示す結果は、BMS-777607処理がT47D+hHGFR細胞におけるAAV3の感染力を有意に強化するのに対し、hHGFRの発現を欠くT47D細胞では効果がないことを示した。

#### 【0211】

HGFRキナーゼの阻害が、下流シグナリング経路に關与する特異的細胞タンパク質のリン酸化状態の変化につながったかどうかを調べるために、T47D溶解物とT47D+hHGFR溶解物の両方において、2時間の薬物インキュベーション期間後に、HGFRタンパク質の総レベルおよびリン酸化レベルを決定した。リン酸化特異的抗体を使って、HGFRキナーゼの下流にあるシグナリング経路ERK1/2およびAktの活性化を解析した。図12Cに示すこれらの結果から、以前に公表された報告のとおり (Abella et al., 2005)、T47D細胞ではhHGFRの発現がほとんどないが、T47D+hHGFR細胞では総HGFRとリン酸化HGFRのどちらについても発現レベルが有意に高いことが確認された。BMS-777607によるT47D+hHGFR細胞の処理は、HGFRのリン酸化を完全に遮断したが、総HGFRには影響がなかった。加えて、BMS-777607処理には、リン酸化AKTおよびリン酸化ERK1/2の発現に対する効果もなかった。これらの結果は、BMS-777607処理によるAAV3ベクター感染力の強化がHGFRキナーゼの阻害によるものであることを示唆している。

#### 【0212】

今までに、hHGFRを補助受容体として使用することが報告されたのは、AAV2だけである (Yan et al., 2002)。他のAAV血清型に関するhHGFRおよびhHGFRキナーゼ阻害因子の役割はわかっていない。HGFRにもAAV2ベクターにも依存しないBMS-777607による形質導入の非特異的強化の可能性を排除するために、BMS-777607による細胞の処理後に、形質導入効率を比較した。図13に示すこれらの結果は、AAV2ベクターおよびAAV3ベクターはT47D+hHGFR細胞に効率よく形質導入することができるが、他の血清型 (AAV4~AAV9) はこれらの細胞を極めて低い効率でしか形質導入できないことを示している。この結果は、これらのAAV血清型のライフサイクルにはhHGFRが關与していないことを示唆している。BMS-777607による細胞の処理は、AAV2ベクターとAAV3ベクターのどちらの形質導入効率も有意に増加させたが、他のAAV血清型の形質導入効率を増加させなかったことから、BMS-777607処理の効果はAAV血清型特異的であることが示唆された。

#### 【0213】

プロテアソーム阻害因子はAAV3ベクターの形質導入効率を増加させる。以前の研究により、MG132などのプロテアソーム阻害因子は、細胞内輸送を助長することによってAAV2ベクターの形質導入効率を有意に強化しうることが示されている (Zhong et al., 2007; Yan et al., 2002)。MG132がターゲット細胞におけるAAV3輸送も改良できるかどうかを評価するために、確立されたヒト肝細胞癌細胞株Huh7 (Nakabayashi et al., 1982) および最近樹立されたヒト肝芽腫細胞株Hep293TT (Chen et al., 2009) を擬似処理するか、または一連の濃度のMG132で処理した。2時間の処理後に、細胞にscAAV3-E GFPベクターを感染させた。5  $\mu$ M MG132で処理し、scAAV2ベクターで形質導入したHeLa細胞を、陽性対照として含めた。形質導入の72時間後に、蛍光顕微鏡法によって、導入遺伝子発現を決定した。これらのデータを図14Aおよび図14Bに示す。図からわかるように、MG132による前処理はHeLa細胞におけるscAAV2ベクターの形質導入効率を有意に増加させたが、これは以前の結果 (Zhong et al., 2008) と合致している。興味深いことに、Huh7細胞とHep293TT細胞のどちらにおいても、scAAV3ベクターの形質導入効率の用量依存的増加がMG132処理後に起こったことから、AAV3ベクターもユビキチン化を受けた後にプロテアソーム媒介分解を起こすことが示唆される。

#### 【0214】

以前の研究では、EGFR-PTKの特異的阻害因子であるチルフォスチン23 (Tyr23) (May et al., 1998) によるEGFR-PTKシグナリングの阻害が、Ub/プロテアソーム経路を調

整し、それが結果として、細胞内輸送とAAV2ベクターが媒介する導入遺伝子発現とを助長することも示されている (Zhong et al., 2007)。Hep293TT細胞を擬似処理するか、Tyr23で2時間処理し、scAAV3ベクターで形質導入した。Tyr23で前処理し、scAAV2ベクターで形質導入したHeLa細胞を、適当な対照として含めた。形質導入の72時間後に導入遺伝子発現を決定した。図14Cおよび図14Dに示すこれらの結果は、Tyr23処理が、scAAV2ベクターとscAAV3ベクターの両方の形質導入効率の有意な増加につながったことを示している。MG132またはTyr23のどちらかの存在下または非存在下でも内在化したウイルスDNAの量に有意差はなかったため、導入遺伝子発現の増加はベクターの進入には依存しなかった。これらの結果から、AAV3ベクターのライフサイクルにおける宿主細胞Ub/プロテアソーム分子装置の関与も、さらに確認される。

10

## 【0215】

scAAV3ベクターの形質導入効率は表面露出Tyr残基の部位指定変異誘発によって有意に改良される。前記の実施例において、本発明者らは、AAV2キャプシド上には、EGFR-PTKによってリン酸化されて、AAV2ベクターの形質導入効率に負の影響を及ぼす7つの表面露出チロシン残基 (Y252、Y272、Y444、Y500、Y700、Y704およびY730) が存在することを実証した (Zhong et al., 2008)。AAV2キャプシドとAAV3キャプシドのアミノ酸配列のアラインメントにより、7つのチロシン残基のうちの6つ (Y252、Y272、Y444、Y701、Y705およびY731) は、AAV3キャプシド中に保存されていることが示された (表4)。

## 【0216】

(表4) AAVキャプシド上の表面露出Tyr残基およびそれらをフェニルアラニン残基に変換するための部位指定変異誘発

20

## 【表4】

AAV2	AAV3
Y252	Y252→F
Y272	Y272→F
Y444	Y444→F
Y500	F501
Y700	Y701→F
Y704	Y705→F
Y730	Y731→F

30

AAV2キャプシド上およびAAV3キャプシド上の表面露出チロシン (Y) を示す；矢印はAAV3キャプシド上のY残基からフェニルアラニン (F) 残基への部位指定変異を表す。

## 【0217】

一つのチロシン残基、すなわちAAV2中のY500は、AAV3ではF501として存在する。いくつかのAAV血清型においてYからFへの変異は、ユビキチン化およびプロテアソーム媒介分解を免れることによって導入遺伝子発現を強化することが示されているので (Zhong et al., 2008 ; Petrs-Silva et al., 2009 ; Qiao et al., 2010 ; Taylor and Ussher et al., 2010)、F501を変異させてチロシン残基に戻すとAAV3ベクターの形質導入効率は低減するであろうと推論した。このフェニルアラニン残基がチロシン残基で置換された変異体AAV3ベクター (F501Y) を作製することによって、この仮説を検証した。Huh7細胞を使用し、同一条件下で、変異体ベクターの形質導入効率を、その野生型 (WT) AAV3対応物と比較した。図15Aからわかるように、F501Y変異体ベクターによって媒介される導入遺伝子発現の程度は、WT AAV3ベクターと比較して約50%低減した。

40

## 【0218】

50

AAV3キャプシド上のチロシン変異は、EGFR-PTK媒介リン酸化の減少につながり、それが次にユビキチン化を低減させ、プロテアソーム媒介分解を損なうことで、導入遺伝子発現の増加をもたらすであろうという仮説をさらに検証するために、AAV3キャプシド上の6つの表面露出チロシン残基の全てを修飾してフェニルアラニン残基で置換した（チロシン-フェニルアラニン、Y-F）。scAAV2-CBAp-EGFPゲノムをキャプシドで封入する各単一チロシン変異体ベクターを、うまくパッケージングすることができた。各変異体についてベクター力価を定量的DNAスロットプロットとqPCRの両方で決定したところ、パッケージング効率に有意差は観察されなかった。Huh7細胞（図15B）とHep293TT細胞（図15C）の両方において、同一条件下で、各チロシン変異体ベクターの形質導入効率を分析し、WT scAAV3-CBAp-EGFPベクターと比較した。これらの結果から、これらのチロシン変異体ベクターのうちの3つ（Y701F、Y705FおよびY731F）の形質導入効率がWT scAAV3ベクターと比較して有意に高いことは明らかである。具体的に述べると、Y731Fベクターの形質導入効率は、WTベクターより約8倍高く、その後Y705Fベクター（約3倍）およびY701Fベクター（約2倍）が続く。

#### 【0219】

表面露出チロシン残基の多重変異によってAAV3ベクターの形質導入効率はさらに改良される。Y-F変異体AAV2ベクターに関する先の実施例では、表面露出チロシン残基の最も効率のよい単一変異の特定の組合せが、AAV2ベクターの形質導入効率をさらに増強することが観察された（Markusic et al., 2010）。AAV3ベクターでも同様の強化が達成されるかどうかを調べるために、次の二重および三重変異体AAV3ベクターを構築した：Y701+731F、Y705+731F、およびY701+705+731F。これらの変異体ベクターのそれぞれは、パッケージングされて、定量的DNAスロットプロットとqPCRの両方で決定したところ、類似する力価を与えた。これら多重変異体の形質導入効率を、WTおよびY731F単一変異体AAV3ベクターと、Huh7細胞中、同一条件下で比較した。これらの結果を図16Aに示す。図からわかるように、Y731F変異が、先に観察されたようにAAV3ベクターの形質導入効率を有意に増加させたのに対し、二重変異体では1つだけ（Y705+731F）が導入遺伝子発現のさらなる有意な増加につながった。興味深いことに、二重変異体（Y701+731F）ベクターと三重変異体（Y701+705+731F）ベクターの形質導入効率は、どちらも、WT AAV3ベクターと類似するレベルまで低減した。次に、ヒト肝がん細胞で最も成績のよい単一および多重チロシン変異体を、T47D細胞およびT74D+hHGFR細胞の形質導入について評価した（図16B）。ヒト肝がん細胞と同様に、チロシン変異体rAAV3ベクターは、hHGFR発現を伴うまたは伴わないどちらの細胞タイプでも、高効率形質導入につながった。

#### 【0220】

Y-F変異体ベクターに観察された形質導入効率の強化が、1つ以上のさらなる推定細胞受容体/補助受容体機能の関与によるものである可能性を調べるために、WT、Y731F、およびY705+731F変異体scAAV3-CBAp-EGFPベクターを使って、5 µg/ml hHGFの非存在下または存在下に、同一条件下で、Huh7細胞に形質導入した。これらの結果を図16Cに示す。図から明白であるように、hHGFの存在は、3つ全てのAAV3ベクターの形質導入効率および導入遺伝子発現を劇的に阻害した。これは、チロシン変異体ベクターもウイルス進入のための細胞受容体/補助受容体としてhHGFRを利用するという解釈と合致する。

#### 【0221】

マウス異種移植片モデルにおいてAAV3ベクターはヒト肝腫瘍に形質導入する。AAV3ベクターがインビボで異種移植片マウスモデル中のヒトHB腫瘍およびヒトHCC腫瘍に形質導入できることを実証するために、約 $5 \times 10^6$ 個のHCC（Huh7）細胞またはHB（Hep293TT）細胞を、NOD/Scidガンマ（NSG）マウスに皮下注射した。4週間後に、どちらの動物群でも腫瘍が明確に視認および触知可能になった時に、約 $2 \times 10^{10}$ vgのscAAV3-CBAp-EGFPベクターを腫瘍中に直接注射した。ベクター注射の4日後に、腫瘍を切除し、薄片を蛍光顕微鏡下で調べた。これらの結果から、AAV3ベクターはインビボでヒトHCC腫瘍（図17A）とヒトHB腫瘍（図17B）のどちらにも形質導入するのにも有効であることが示さ

れた。インビトロデータと合致して、AAV3ベクターの形質導入効率は、Huh7細胞由来腫瘍の場合より、Hep293TT細胞由来腫瘍の場合の方が高かった。

【0222】

最適化チロシン変異体AAV3ベクターはマウス異種移植片中のヒト肝腫瘍への形質導入において高効率である。次に、最も成績のよい二重チロシン変異体AAV3ベクターを、さらにインビボで、異種移植片ヒト肝腫瘍遺伝子導入について評価した。1組目の研究では、約 $5 \times 10^{10}$ vgの野生型(WT) scAAV3-CBAp-EGFPベクターまたはY705+731F-AAV3-CBAp-EGFPベクターのいずれかを、ヒトHB(Hep293TT)腫瘍を保持するNSGマウスにおいて、腫瘍内に注射した。ベクター注射の4日後に、腫瘍を切除し、薄切片を蛍光顕微鏡下で調べた(図17C)。図からわかるように、WT-AAV3ベクターを注射した腫瘍は、検出可能なレベルのEGFP発現を呈した。二重チロシン変異体AAV3ベクターの形質導入効率は、インビトロデータと合致して、WT AAV3ベクターより有意に高かった。

10

【0223】

2組目の研究では、約 $5 \times 10^{11}$ vgのWT-scAAV3-CBAp-EGFPベクターまたはY705+731F-scAAV3-CBAp-EGFPベクターのいずれかを、ヒトHB(Hep293TT)腫瘍を保持するNSGマウスにおいて、尾静脈から注射した。リン酸緩衝食塩水(PBS)注射を適当な対照として使用した。PBSを注射したマウスの腫瘍では導入遺伝子発現が殆ど起こらなかったが(図18A)、AAV3ベクターの全身送達後は、直接的腫瘍ターゲティングが達成された。最適化チロシン変異体AAV3ベクターの形質導入効率(図18C)は、ここでも、WT AAV3ベクターの形質導入効率(図18B)より有意に高かった。これらのデータは、観察されたチロシン変異体AAV3ベクターの形質導入効率の増加が、ウイルス投与経路に依存しなかったことを示唆している。

20

【0224】

HGFRは膜貫通受容体チロシンキナーゼであり、そのリガンドHGFの結合は、受容体の二量体化と、細胞内ドメイン中の複数のチロシン残基の分子間リン酸基転移反応ともをもたらす(Liu et al., 2008)。AAV3キャプシドがhHGFRの細胞外ドメインと相互作用することは明白であるのに対し、hHGFRへのAAV3の結合が、その活性化と下流ターゲットタンパク質のリン酸化の引き金も引くかどうかは、あまり明白ではない。事実、hHGFR-PTK活性の抑制が、AAV3ベクター媒介導入遺伝子発現のある程度の増加につながることを、データは実証している。この関連において、AAV3ベクターの形質導入効率が、つい最近樹立されたヒト肝芽腫(HB)細胞株Hep293TTでは、30年近く前に樹立されたHB細胞株Huh6と比較して有意に高いことに注目することは興味深い。2つの細胞株の間には微妙な相違が存在するかもしれないが、Hep293TT細胞におけるhHGFRのチロシンキナーゼドメインにはそれを不活性にする特異的に変異が同定されており、Huh6細胞における形質導入効率を増強するhHGFR特異的キナーゼ阻害因子BMS-777607は、Hep293TT細胞におけるAAV3形質導入効率にはほとんど効果を持たない。

30

【0225】

AAV2(hFGFR1)とAAV3(hHGFR)とは2つの異なる細胞成長因子受容体を補助受容体として利用するにも関わらず、これら2つの血清型は、一定の受容体進入後細胞内輸送経路を共有しているようである。例えばどちらのキャプシドも、おそらくは後期エンドソームにおいて、EGFR-PTKによってチロシン残基がリン酸化され、次にユビキチン化されて、それがプロテアソーム媒介分解につながる(Zhong et al., 2008)。しかし、AAV2中の7つの表面露出チロシンのうちの6つは、AAV3に保存されているものの、対応するY-F変異体の挙動のパターンは多少異なっている。例えば、Y730F(AAV2の場合)とY731F(AAV3の場合)は最も効率のよい単一変異体であり、その後、Y444F(AAV2の場合)およびY705F(AAV3の場合)が続き、Y444F(AAV3の場合)の形質導入効率は不変のままである。同様に、Y730+444F二重変異体(AAV2の場合)の形質導入効率はY730Fのそれと有意に異ならないが、Y705+731F二重変異体(AAV3の場合)の形質導入効率はY731Fより有意に高い。さらにまた、Y730+500+444F三重変異体(AAV2の場合)は最も高効率であり、Y731+501+705F三重変異体(AAV3の場合)は最も高効率であって

40

50



、Y501残基はWT AAV3キャプシドにおいて既に変異している。興味深いことに、WT AAV3ベクターでさえ、腫瘍内注射後に、インビボで、マウス異種移植片モデルにおいて、ヒト肝腫瘍をかなりよく形質導入することができた。しかし、チロシン変異体ベクターがインビボでの遺伝子導入効率の向上をもたらすという証拠は、実証された。

#### 【0226】

ヒト肝がん、とりわけ肝細胞癌（HCC）は、最も悪性度の高い悪性腫瘍の一つである。HCCの場合、生存の大きな障害は、HCC切除後の再発である（Tang, 2005）。したがって、腫瘍を完全に排除するには、ターゲット細胞の100%の形質導入が望ましい。以前の研究では、ハチ毒由来の毒性ペプチドであるメリチンが、インビトロでもインビボでも、Rac1依存性経路の抑制（Liu et al., 2008）とミトコンドリア膜タンパク質7A6のアップレギュレーション（Zhang et al., 2007）とによって、HCC細胞の生存能と運動性を阻害することが観察された。メリチンは、可能性としてCaMKII/TAK1/JNK/p38シグナリング経路を活性化することによって、HCC細胞のアポトーシスを誘発することが示されている（Wang et al., 2009）。

#### 【0227】

インビトロとインビボの両方で肝がん細胞の特異的の死滅を達成するために肝がん細胞特異的プロモーターによって駆動されるメリチン遺伝子を含有する組換えアデノウイルスベクターを使用した以前の研究に基づき（Ling et al., 2005）、この実施例は、初代肝がんおよび転移肝がんの両方を選択的に標的とするために使用することができる肝がん細胞特異的プロモーターの制御下にある最適化チロシン変異体AAV3-メリチンベクターを提供する。

#### 【0228】

実施例4 - キャプシド修飾組換えAAV2ベクターによるヒト単球由来樹状細胞の高効率形質導入

樹状細胞（DC）は、適応免疫応答の調節において決定的な役割を果たす抗原提示細胞（APC）である。DCはユニークなAPCであり、DCの最も重要な機能は抗原を提示することであるため、またDCだけが休止ナイーブTリンパ球における一次免疫応答を誘発する能力を有することから、「プロフェッショナル」APCと呼ばれてきた（Banchereau and Steinman, 1998）。天然の抗腫瘍免疫応答を患者に検出することはできるが、この応答は腫瘍成長を制御することができない。これに対し、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）およびインターロイキン4（IL-4）の存在下にエクスビボで生成する単球由来DC（moDC）は、抗原の内因性発現後に抗原特異的T細胞を刺激する能力を有する（Chapuis et al., 1997；den Brok et al., 2005）。そのため、遺伝子改変DCが広く研究され、がん患者におけるDCの効力を評価する第I相および第II相臨床試験が数多く開始されている（Figdor et al., 2004；Palucka et al., 2011）。しかし、現在のDCローディングの方法は、細胞生存力、抗原提示の寿命に関する不確定性、および患者の副作用による制約の点で、不十分である（Palucka et al., 2011）。

#### 【0229】

バイオテクノロジーの技法でウイルスゲノムを操作できることは、数多くの腫瘍関連抗原（TAA）が最近同定されたことと合わせて、患者において防御的抗腫瘍免疫応答を誘発することを期待して組換えウイルスを使ってTAAを発現させることへの関心をかき立ててきた（Liu, 2010；Robert-Guroff, 2007）。遺伝子送達のためのさまざまな方法のなかでは、ヒトパルボウイルスであるアデノ随伴ウイルス血清型2（AAV2）に基づくベクターは、主にこのウイルスの非病原性と長期にわたる持続的治療用遺伝子発現を媒介する能力とから、多くの注目を集めてきた（Daya and Berns, 2008；Mueller and Flotte, 2008；Srivastava, 2008）。よく使用される異なる血清型のAAVベクターによるDCの異なるサブセットの形質導入の成功が実証され、AAV系抗腫瘍ワクチンの潜在的利点が議論されてきた（Pannazhagan et al., 2001；Veron et al., 2007；Mahadevan et al., 2007；Shin et al., 2008；Taylor and Ussher, 2010）。しかし、組換えAAVベクターによるDCへの遺伝子導入を、特異性と形質導入効率に関してさらに改良すれば、抗腫瘍ワ

クチンとして使用した場合にかなりのインパクトが得られることは、間違いない。

#### 【0230】

細胞上皮成長因子受容体タンパク質チロシンキナーゼ (EGFR-PTK) は、主として表面チロシン残基におけるキャプシドのリン酸化により、組換えAAV2ベクターによる核移行とその後の導入遺伝子発現に、負の影響を及ぼす (Zhong et al., 2007)。これらの研究は、さまざまな細胞および組織に、野生型 (WT) ベクターと比較して低い用量かつ高い効率で形質導入する、表面露出チロシン残基に点変異を含有する次世代組換えAAV2ベクターの開発をもたらした (Zhong et al., 2008)。しかし、そのような単一または多重チロシン変異体AAVベクターは、単球由来DC (moDC) の形質導入効率を、2倍以上増加させることができなかった。これは、おそらくHeLa細胞または肝細胞と比較して、EGFR-PTKの発現レベルおよび/または活性レベルが低いことによるのであろう (Taylor and Ussher, 2010)。

10

#### 【0231】

セリン/スレオニンプロテインキナーゼは、免疫細胞を含む多くの細胞タイプの分化、転写調節、および発生などといった多種多様な細胞プロセスに関与している。そのようなキナーゼは、ウイルスキャプシド上の表面露出セリン残基および/または表面露出スレオニン残基をリン酸化することによって、組換えAAVベクター媒介遺伝子導入の効率を負に調節し、ベクターをプロテアソーム媒介分解の標的にすることもできる。本実施例では、(i) AAV2キャプシド上の15個の表面露出セリン (S) 残基を部位指定変異誘発によってバリリン (V) 残基にすることが、WT AAV2ベクターと比較して、S458V、S492V、およびS662V変異体ベクターの形質導入効率の改良につながることで、(ii) S662V変異体ベクターが、従来のAAVベクターによる形質導入を容易には適用できない細胞タイプであるヒト単球由来樹状細胞 (moDC) を効率よく形質導入すること、(iii) S662V変異体によるmoDCの高効率形質導入が、これらの細胞における表現型変化を何も誘発しないこと、および(iv) DCに形質導入するために使用した短縮型ヒトテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子をコードする組換えS662Vベクターが迅速で特異的なT細胞クローン増殖とロバスタなCTLの生成をもたらす、それが、K562細胞の特異的細胞溶解につながることで証明された。

20

#### 【0232】

##### 材料と方法

**細胞および抗体** . HEK293細胞、HeLa細胞およびNIH3T3細胞はAmerican Type Culture Collectionから入手し、10%FBS (Sigma) および抗生物質 (Lonza) を補足したDMEM (Invitrogen) 中に単層培養物として維持した。白血球アフェレーシス由来末梢血単核球 (PBMC) (AllCells) をFicoll-Paque (GEHealthCare) で精製し、無血清AIM-V培地 (Lonza) に再懸濁し、半接着細胞画分を組換えヒトIL-4 (500U/mL) およびGM-CSF (800U/mL) (R&D Systems) と共に7日間インキュベートした。10ng/mL TNF- $\alpha$ 、10ng/mL IL-1、10ng/mL IL-6、および1mg/mL PGE2 (R&D Systems) を含むサイトカイン混合物で、48時間にわたって、細胞成熟を開始させた。EGFP発現に先だって、細胞が成熟樹状細胞 (mDC) の典型的表現型を満たすことを保証するために、細胞を共刺激分子発現について特徴づけた (CD80、RPE、マウスIgG1 ; CD83、RPE、マウスIgG1 ; CD86、FITC、マウスIgG1 ; Invitrogen) (Jayandharan et al., 2011)。

30

40

#### 【0233】

**部位指定変異誘発** . Turbo Pfuポリメラーゼ (Stratagene) を使って、以前に記述されたプラスミドpACG2 (Wang and Malcolm, 1999) で、2段階PCRを行った。簡単に述べると、第1段階では、2つのPCR伸長反応を、フォワードPCRプライマーおよびリバースPCRプライマーについて3サイクルずつ別々のチューブで行った。第2段階では、2つの反応を混合し、PCR反応をさらに15サイクル行い、次にDpnI消化を1時間行った。プライマーは、変異させた各残基について、セリン (TCAまたはAGC) からバリリン (GTAまたはGTC) への変化が導入されるように設計した。

#### 【0234】

**組換えAAVベクターの生産** . ニワトリ  $\gamma$ -アクチンプロモーターによって駆動されるEGFP

50

遺伝子を含む組換えAAV2ベクターは、以前に記述されているように作製した (Zologukhin et al., 2002)。簡単に述べると、ポリエチレンイミン (PEI、線状、MW25,000、Polysciences, Inc.) を使って、HEK293細胞のトランスフェクションを行った。トランスフェクションの72時間後に、細胞を収穫し、イオジキサノール (Sigma) 勾配遠心分離およびイオン交換カラムクロマトグラフィー (HiTrap Sp Hp 5mL, GE Healthcare) によって精製した。次に、遠心式スピン濃縮器 (Apollo、150kDaカットオフ、容量20 mL、CLP) を使ってウイルスを濃縮し、乳酸加リンゲルへの緩衝液交換を3サイクル行った (Cheng et al., 2011)。10  $\mu$ Lの精製ウイルスを、37  $^{\circ}$ Cにおいて2時間、DNAse I (Invitrogen) で処理し、次にプロテイナーゼK (Invitrogen) で、56  $^{\circ}$ Cにおいてさらに2時間処理した。反応混合物をフェノール/クロロホルム処理とそれに続くクロロホルム処理によって精製した。パッケージングされたDNAを、20  $\mu$ gのグリコーゲン (Invitrogen) の存在下、エタノールで沈殿させた。DNAse I抵抗性AAV粒子の力価は、CBAプロモーターに特異的な以下のプライマー対:

フォワード: 5'-TCCCATAGTAACGCCAATAGG-3' (配列番号18)、

リバース: 5'-CTTGGCATATGATACACTTGATG-3' (配列番号19)

と、SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen) とを使って、RT-PCRによって決定した (Aslanidi et al., 2009)。

#### 【0235】

インピトロでの組換えAAVベクター形質導入アッセイ. HEK293細胞または単球由来樹状細胞 (moDC) に、それぞれ1,000vg/細胞または2,000vg/細胞のAAV2ベクターで形質導入し、48時間インキュベートした。あるいは細胞を、形質導入の1時間前に、50  $\mu$ Mの選択的セリン/スレオニンキナーゼ阻害因子2-(2-ヒドロキシエチルアミノ)-6-アミノヘキシルカルバミン酸tert-ブチルエステル-9-イソプロピルプリン (CaMK-II用)、アントラ[1,9-cd]ピラゾール-6(2H)-オン、1,9-ピラゾロアントロン (JNK用)、および4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)1H-イミダゾール (MAPK用) (CK59、JNK阻害因子2、PD98059、Calbiochem) で処理した。導入遺伝子発現は、以前に記述されているように (Markusic et al., 2011; Jayandharan et al., 2011)、視野あたりの緑色蛍光の総面積 (ピクセル<sup>2</sup>) (平均  $\pm$  SD) として評価した。分散分析を使って試験結果と対照とを比較し、それらは統計的に有意であると決定された。

#### 【0236】

ウェスタンブロット分析. ウェスタンブロット分析は以前に記述されているように行った (Akache et al., 2006)。細胞を遠心分離によって収穫し、PBSで洗浄し、50mMトリスHCl、pH7.5、120mM NaCl、1%Nonidet P-40、10%グリセロール、10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)、1mM EDTA、および1mM EGTAを含む溶解緩衝液にプロテアーゼ阻害因子およびホスファターゼ阻害因子混合物 (Set 2および3、Calbiochem) を補足したものに再懸濁した。その懸濁液を氷上で1時間インキュベートし、4  $^{\circ}$ C、14,000rpmで30分間の遠心分離によって清澄化した。タンパク質濃度に関する標準化後に、12%ポリアクリルアミド/SDS電気泳動を使って試料を分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写し、一次抗体抗p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) ウサギmAb、総p38 MAPKウサギmAbおよびGAPDHウサギmAb (1:1000、Cell Signaling) を加え、次に二次セイヨウワサビペルオキシダーゼ連結抗体 (1:1000、Cell Signaling) を加えることによってプローブした。

#### 【0237】

特異的細胞傷害性Tリンパ球の生成および細胞傷害性アッセイ. 単球由来樹状細胞 (moDC) を上述のように生成させた。未成熟DCに、2つのオーバーラップORF - hTERT838-2229とhTERT2042-3454に分離されたヒテロメラーゼcDNAをコードするAAV2-S662Vベクターを、それぞれ2,000vg/細胞のMOIで感染させた。次に、細胞に、成熟を誘発するサプリメントによる刺激を受けさせた。48時間後に、hTERTを発現する成熟DCを回収し、PBMCと20:1の比で混合した。CTLを、組換えヒトIL-15 (20IU/mL) およびIL-7 (20ng/mL) を含むAIM-V培地において、25cm<sup>2</sup>フラスコ中、20  $\times$  10<sup>6</sup>細胞の密度

10

20

30

40

50

で培養した。新しいサイトカインを2日ごとに加えた。プライミングの7日後に、細胞を収穫し、死滅アッセイ (Heiser et al., 2002) に使用した。死滅曲線を作成し、以前に記述されているように (Mattis et al., 1997)、生細胞/死細胞比のFACS分析によって、特異的細胞溶解を決定した。ヒト不死化骨髄性白血病細胞株K562をターゲットとして使用した。

【0238】

統計的解析．結果を平均±S.D.として表す。群間の差は、スチューデントのT検定の群分けされた対応のない両側分布を使って同定した。P値<0.05を統計的に有意とみなした。

【0239】

結果

特異的細胞セリン/スレオニンキナーゼの阻害はrAAV2ベクターの形質導入効率を増加させる。以前の研究で、細胞上皮成長因子受容体タンパク質チロシンキナーゼ (EGFR-PTK) 活性の阻害および7つの表面露出チロシン残基の部位指定変異誘発は、これらの残基のリン酸化を防止し、よってベクターのコピキチン化とそれに続くプロテアソーム媒介分解を免れることによって、AAV2ベクターの形質導入効率を有意に増加させることが示された (Zhong et al., 2008)。しかし、AAV2キャプシドは15個の表面露出セリン残基も含有し、それらは、さまざまな細胞タイプおよび組織において広く発現している細胞セリン/スレオニンキナーゼによって、潜在的にリン酸化されうる。そのようなキナーゼ活性の阻害によって表面露出セリン残基のリン酸化を防止し、よってAAV2ベクターの細胞内輸送および核移行を改良することができるという仮説を検証するために、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (CamK-II)、c-Jun N末端キナーゼ (JNK)、およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (p38 MAPK) を含む細胞セリン/スレオニンキナーゼの市販の特異的阻害因子をいくつか使用した。HEK293細胞を、2-(2-ヒドロキシエチルアミノ)-6-アミノヘキシルカルバミン酸tert-ブチルエステル-9-イソプロピルプリン (CamK-II用)、アントラ[1,9-cd]ピラゾール-6(2H)-オン、1,9-ピラゾロアントロン (JNK用)、および4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)1H-イミダゾール (p38 MAPK用) などの特異的阻害因子により、さまざまな濃度で、1時間、前処理した。次に細胞に、1細胞あたり1,000ベクターゲノム (vg) の一本鎖 (ss) または自己相補的 (sc) AAV2ベクターで、形質導入した。これらの結果は、50 μMの至適濃度で、全ての阻害因子が、ssAAV2ベクターおよびscAAV2ベクターの形質導入効率を有意に増加させ、p38 MAPK阻害因子が最も効果的であることを示した (図19Aおよび図19B)。この観察結果は、形質導入効率の増加が、ウイルス第二鎖DNA合成の改良によるのではなく、おそらくはベクターキャプシドのリン酸化の防止によるものであることを (証明しているとまではいえないものの) 示唆している。

【0240】

AAV2ベクターが媒介する導入遺伝子発現はAAV2キャプシド上の表面露出セリン残基の部位指定変異誘発によって改良される。AAV2キャプシドは、3つのキャプシドVPのウイルスタンパク質3 (VP3) 共通領域中に50個のセリン (S) 残基を含有し、そのうちの15個 (S261、S264、S267、S276、S384、S458、S468、S492、S498、S578、S658、S662、S668、S707、S721) が表面に露出している (Xie et al., 2002)。それら15個のS残基のそれぞれを、記述のとおり (Zhong et al., 2008)、部位指定変異誘発によってバリン (V) で置換した。大半の変異体はWT AAV2ベクターと同等の力価で生成させることができたが、例外として、S261V、S276V、およびS658Vは、約10分の1の低い力価で生産され、S267VおよびS668Vは、検出可能なレベルのDNase I耐性ベクター粒子を生産しなかった。S468V変異体とS384V変異体の力価は、WT AAV2ベクターより約3~5倍高かった。S-V変異体ベクターのそれぞれを、HEK293細胞における形質導入効率について評価した。図20に示すこれらの結果は、15個の変異体のうち、S662V変異体はそのWT対応物より約20倍効率よくHEK293細胞に形質導入したことを示している。S458V変異体ベクターとS492V変異体ベクターの形質導入効率は、それぞれ約4倍および約2倍、増加した。AAV2キャプシド上のこれら3つの重要な表面露出セリン残基の位置を図2

10

20

30

40

50

1Aおよび図21Bに示す。二重変異体(S458+662VおよびS492+662V)でも三重変異体(S458+492+662V)でも、形質導入効率のさらなる増加は観察されなかったことから、一部のチロシン変異体とは異なり、セリン残基における複数の変異の組み合わせは相加的でも相乗的でもないことが示された。興味深いことに、WT AAV2ベクターより高い力価で生産されたS468V変異体およびS384V変異体の形質導入効率は、同じ感染多重度(MOI)で、変化がないか(S468V)、または約10分の1に低減した(S384V)。これらのデータを図34に要約する。

【0241】

異なるアミノ酸によるS662の置換はAAV2キャプシドアセンブリおよびAAV2ベクター媒介導入遺伝子発現に多様な効果を有する。位置662におけるS→V置換に加えて、次の7つの変異体：S662 アラニン(A)、S662 アスパラギン(N)、S662 アスパラギン酸(D)、S662 ヒスチジン(H)、S662 イソロイシン(I)、S662 ロイシン(L)、およびS662 フェニルアラニン(F)も作製し、293細胞におけるそれらの形質導入効率を評価した。図22に示し図35に要約するこれらの結果は、VによるSの置換が、ベクター力価を変化させずに、最も効率のよい変異体の生産につながったことを実証している。N、I、L、またはFによるSの置き換えは、パッケージング効率を約10分の1に減少させ、形質導入効率には有意な効果がなかったが、DまたはHによる置換は形質導入効率を、それぞれ約8倍および約4倍増加させ、ベクター力価には影響がなかった。興味深いことに、SからAへの置換は、WT AAV2ベクターと比較して、ウイルス力価を約5倍まで増加させ、導入遺伝子発現を約3倍強化した。位置662におけるセリン変異体に観察された力価および感染力の変動性は、AAV2のパッケージング効率と生物学的活性の両方の調整にこれらのアミノ酸のそれぞれが果たす決定的な役割を示唆している。

【0242】

S662Vベクターの形質導入効率はp38 MAPK活性と相関する。ここまでのS662Vベクター媒介導入遺伝子発現データは全て293細胞を使って得られたので、次の細胞タイプを包含するように、これらの研究を拡張した：(i) NIH3T3(マウス胚線維芽細胞)、(ii) H2.35(マウス胎児肝細胞)、(iii) HeLa(ヒト子宮頸がん細胞)、および(iv) 初代ヒト単球由来樹状細胞(moDC)。これらの細胞タイプに、WT scAAV2-EGFPまたはS662V scAAV2-EGFPベクターを、同一条件下に、1細胞あたり2,000のMOIで、形質導入した。EGFP遺伝子発現を、HeLa細胞、293細胞およびmoDCについては、感染の48時間後(48 hrs p.i.)に評価し、H2.35細胞およびNIH3T3細胞については、感染の5日後(5 days p.i.)に評価した。これらの結果を図23Aに示す。図からわかるように、WTベクターとS662V変異体ベクターの間で形質導入効率の絶対差は約3倍(H2.35細胞の場合)から約20倍(293細胞の場合)の範囲にわたるが、試験した各細胞タイプにおいて、変異体ベクターの方が一貫して高効率であった。細胞p38 MAPKの阻害因子による細胞の前処理が形質導入効率の増加に最も効果的であったので(図19Aおよび図19B)、本発明者らは、WTと変異体ベクターの形質導入効率に観察された差が、細胞p38 MAPKの発現および/または活性のレベルの変動によるものかどうかを調べた。各細胞タイプから調製した細胞溶解物を、総p38 MAPKレベルとホスホ-p38 MAPKレベルをどちらも検出するために特異的抗体でプローブしたウェスタンブロットで分析した。GAPDHをローディング対照として使用した。図23Bに示すこれらの結果は、p38 MAPKタンパク質レベルは類似していたが、リン酸化のレベルによって決定されるキナーゼ活性は細胞タイプが異なると有意に相違したことから、S662V変異体ベクターの形質導入効率がp38 MAPK活性とおおよそ相関したことを示している。p38 MAPK活性とS662V変異体ベクターの効率の間のこれらのおよその相関関係は、おそらく、AAV感染に関する細胞感受性の相違、すなわち一次感染後に細胞に進入するウイルス粒子の総数によって、説明することができるだろう。AAVのライフサイクルのなかで正確にはどのステップがp38 MAPK媒介リン酸化によって調整されるのかは、依然として不明である。他のセリン/スレオニンキナーゼがS662VベクターとWTベクターによる形質導入の効率の差の一因になることも考えられる。しかし興味深いことに、WT-AAV2ベクターによる形質導入は、293細胞またはmoDCでは、p38 M

10

20

30

40

50

APKのリン酸化のアップレギュレーションにつながらなかったことから、AAVはmoDCにおけるロバストな表現型変化を誘発しないという以前の報告がさらに裏付けられる (Markusic et al., 2011)。

#### 【0243】

初代ヒトmoDCのS662Vベクター媒介形質導入は表現型片かにつながらない . MAPKファミリーメンバーはAPCの発生および成熟において重要な役割を果たす。健康ドナー白血球アフェレーシスから単離したmoDCを上述のように50 μMの選択的キナーゼ阻害因子で処理した後、WT scAAV2-EGFPベクターで形質導入した。感染の2時間後に、成熟を誘発するために、細胞をサプリメント (TNF-、IL-1、IL-6、PGE2) で処理した。感染の48時間後にEGFP導入遺伝子発現を蛍光顕微鏡法によって評価した。JNKおよびp38 MAPKの特異的阻害因子によるmoDCの前処理はEGFP発現レベルをそれぞれ約2倍および約3倍増加させ、S662V変異体ベクターでは形質導入効率が約5倍強化された (図24)。これらのキナーゼの阻害は樹状細胞の成熟を防止すると以前に報告されているので (Beisleve et al., 2005; Nakahara et al., 2006; Nakahara et al., 2004; Harley, 2008)、DCにおける表現型変化を誘発するS662V変異体の能力も評価した。moDCを、1細胞あたり50,000vgまでの一連のMOIで感染させ、感染の48時間後に収穫し、蛍光活性化細胞選別 (FACS) によって表面共刺激分子のアップレギュレーションについて分析した。CD80、CD83およびCD86などのDC成熟マーカーのフローサイトメトリー分析により、WT AAV2ベクターと同様に、S662V変異体ベクターも、moDCの成熟を誘発しないことが示された (図24C)。この観察結果は、以前に記述されたAAVベクターの低い免疫原性を裏付けている (Shin et al., 2008; Jayandharan et al., 2011)。

#### 【0244】

AAV2-S662Vベクターで形質導入したmoDCによるhTERT特異的CTLの生成 . moDCにおけるセリン変異体AAV2ベクター媒介導入遺伝子発現は、WT-AAV2ベクターと比較して有意に改良されたので、細胞傷害性Tリンパ球の生成を刺激しターゲット細胞の特異的死滅を達成するS662V負荷moDCの能力を調べた。ヒトテロメラーゼはほとんどのがん細胞に共通して発現するユニークな抗がんターゲットと認識されていることから (Harley, 2008; Beatty and Vonderheide, 2008)、短縮型ヒトテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子をニワトリ  $\gamma$ -アクチンプロモーターの制御下にクローニングし、そのDNAをAAV2 S662V変異体にパッケージングした。最大25%のCD8陽性細胞を含む非接着性末梢血単核球 (PBMC) を、moDC/S662Vベクターによって送達されたhTERTで1回刺激した。細胞性細胞傷害の二色蛍光アッセイに不死化骨髄性白血病細胞株K562を使用し、次にエフェクター対ターゲット細胞比を低減して、死滅曲線を作成した。図25に示すこれらの実験の結果は、hTERTを負荷されたmoDCが、GFPを発現するmoDCと比較して、特異的T細胞クローンの増殖および殺活性を効果的に刺激できることを示唆している。したがって、効果的な免疫療法には迅速かつ強力なエフェクター応答を生成させる免疫化戦略が不可欠であることから、これらの結果は、ワクチン接種研究のためのAAVに基づく送達方法の効力を裏付けている。

#### 【0245】

##### 考察

遺伝子改変樹状細胞が特異的抗腫瘍細胞傷害性T細胞応答を刺激する可能性はいくつかの臨床治験で証明されているが、治療用抗原の負荷、発現の制御、および抗原提示のための信頼できる方法は、今までのところまだ開発されていない (O' Neill and Bhardwaj, 2007; Tacke et al., 2007)。10年近く前に従来のssAAVベクターで樹状細胞に形質導入しようとした最初の試み以来 (Pannazhagan et al., 2001)、これらのベクターの形質導入効率の増加には著しい進歩があった。例えば、自己相補的AAV (scAAV) ベクターの開発によって、ウイルス第二鎖DNA合成の大きな律速ステップは回避され、それが樹状細胞のさまざまなサブセットにおける導入遺伝子発現レベルを劇的に増加させた (Shin et al., 2008; Aldrich et al., 2006; Wang et al., 2003)。樹状細胞へのAAVベクターに基づく抗原送達は、いくつかのがんモデルに利用されて成功を収めている (Mahadevan

et al., 2007 ; Eisold et al., 2007 ; Yu et al., 2008 ) 。

【 0 2 4 6 】

AAVの構造ウイルス構成要素および調節ウイルス構成要素に固有のフレキシビリティは、迅速な分子進化と血清学的に異なる数多くの血清型の形成を促進する ( Gao et al., 2003 ; Vandenberghe et al., 2009 ; Wu et al., 2006 ) 。いくつかの研究により、AAVのそのような柔軟性を利用して、異なる細胞および組織指向性を有する新しいベクターを生成させることが示されている ( Wu et al., 2000 ; Girod et al., 1999 ) 。他の研究では、ウイルスクャプシド上の単一アミノ酸の置換が、ウイルスの力価、細胞受容体との相互作用、組織指向性、およびエンドソームから核小体への輸送に強い影響を及ぼしうる

10

【 0 2 4 7 】

AAV2血清型ベクターでのデータにより、チロシンからフェニルアラニンへの単一置換 ( Y F ) は、キャプシドリン酸化とそれに続くユビキチン化およびプロテアソームによる分解を防止することによって、エンドソームから核小体へのウイルス輸送を劇的に改良することが示されている ( Zhong et al., 2008 ) 。これらの研究は、異なる細胞タイプおよび組織において増加した形質導入効率を持ついくつかのベクターの作製につながった。そのようなベクターを使って、血友病Bの表現型矯正のためのマウス肝細胞へのF.IX遺伝子導入が改良された ( Markusic et al., 2011 ) 。これらのチロシン変異体AAVベクターは、眼疾患の潜在的処置のためのマウス網膜の高効率形質導入にもつながった ( Petrs-Zilva et al., 2009 ) 。AAV6血清型は樹状細胞ではAAV2よりも高い形質導入効率を示したが ( Veron et al., 2007 ; Taylor and Ussher, 2010 ) 、これらの研究はAAV2に焦点が絞られていた。なぜなら、これらのベクターの方が基礎研究でも臨床現場でも幅広く研究されていたからであるが、本明細書に記載するようにAAV6ベクターを同様の戦略で開発することもできる。

20

【 0 2 4 8 】

AAV2キャプシド上の表面露出チロシン残基のリン酸化がこれらのベクターの形質導入効率に負の影響を与え、これらの残基をリン酸化することが知られている細胞EGFR-PTKの特異的阻害因子の使用によって、これらのベクターの形質導入効率を劇的に増強しうることは、十二分に明らかになっている ( Zhong et al., 2008 ) 。本実施例では、AAV2ベクターのライフサイクルにおけるセリン残基のリン酸化の役割を、より詳しく描写した。

30

【 0 2 4 9 】

実際、ssAAVベクターとscAAVベクターの形質導入効率はどちらも、JNKおよびp38 MAPKの特異的阻害因子による細胞の前処理で増強することができたことから、AAV2キャプシド上の1つ以上の表面露出セリンおよび/またはスレオニン残基は宿主細胞内でリン酸化されること、およびこの修飾が核へのキャプシド輸送にとって有害であることが暗示される。

40

【 0 2 5 0 】

次に、15個の表面露出セリン残基のそれぞれを個別に変異させたが、これらの変異のうち、異なる細胞タイプにおける形質導入効率の増加につながったのは3つだけで、その範囲は約2倍～約20倍であった。しかし、チロシン変異体とは異なり ( Markusic et al., 2011 ) 、複数の変異を組み合わせても、インビトロで二重変異体 ( S458+662VおよびS492+662V ) AAV2ベクターまたは三重変異体 ( S458+492+662V ) AAV2ベクターの形質導入効率は増強されなかった。これに関連して、保存されたコア バレルのHストランドとIストランドの間に位置して残基S662を含有するHIループを特徴づけたDiPrimio et al.の報告 ( DiPrimio et al., 2008 ) において、部位指定変異誘発とペプチド置換がどちらも、このキャプシド領域がAAVキャプシドアセンブリおよびウイルスゲノムパッケ

50

ージングに決定的な役割を果たすことを示したことは、注目に値する（図22Aおよび図22B）（Xie et al., 2002）。これらの研究ではS662残基が特異的に標的とされたわけではないが、これらの変異体の大半の形質導入効率は変化しないか、最大で27分の1まで低減した。正二十面体5回対称関連VP間の相互作用を形成し、この軸を取り囲む凹みの底にあるHILループは、AAV2によるヘパリン結合後に正二十面体5回回転軸に位置するチャンネルを開口するコンフォメーション再配置を起こすとも提唱された（Levy et al., 2009）。残基S458および492は、2回回転軸の凹みに直面する（正二十面体3回回転軸を取り囲む）突出部の外表面上で、互いに隣接して位置する（対称関連VPに由来する）。S458A、S492AおよびS492Tに隣接する残基の以前の変異は、キャプシドアセンブリに対して効果がなく、形質導入効率に対する効果ももたらさなかったことから（Lochrie et al., 2006）、AAVのパッケージング効率および生物学的活性にこれら特定のアミノ酸が果たす決定的な役割が確認される。これらのデータのさらなる構造解析により、次に挙げる事実が明らかになった：収率が低い3つの変異体については、それらの残基の側鎖が同じVP単量体の主鎖原子と相互作用し、力価が低いS267Vは同じ単量体からのD269と相互作用する。HILループ中に位置し、キャプシドアセンブリに関与することが示されたもう一つのキャプシド変異体S668Vの場合（DiPrimio et al., 2008）、この置換では相互作用の明白な破壊は観察されなかった。興味深いことに、これらの残基はいずれも、アセンブリ表現型とは無関係に、界面位置にあるが、458と492だけがVP間相互作用に関与する。他の残基は、もし関与があったとしても、VP内相互作用に関与するだけである。したがって、キャプシド収率なしまたは低キャプシド収率の変異体における変化は、アラニンに変化させた場合に、そのVPのミスフォールディングをもたらすか、アセンブリに必要な多量体形成の抑止をもたらすことが考えられる。

#### 【0251】

腫瘍免疫療法の場合は、T細胞活性化の時間ならびにCD8 T細胞応答の強度および寿命が、治療アウトカムを決定する決定的因子である。したがって本発明者らは、セリン変異体AAV2ベクターによるmoDCの形質導入効率の増加が、T細胞のプライミングの向上と相関するかどうかを、さらに評価した。ヒトテロメラーゼを特異的ターゲットとして使用した。というのも、これは、数多くの研究および臨床試験において、多くのがん患者に幅広く発現する拒絶抗原の魅力的な候補であることが示されているからである（Harley, 2008; Beatty and Vonderheide, 2008）。これらの結果は、AAV2キャプシドの修飾が、より特異的かつ効果的な遺伝子送達用ベクターの生産という点で有益であるかもしれないことを示唆している。

#### 【0252】

主な障害の一つであるベクター由来エピトープおよび導入遺伝子由来エピトープに対する細胞免疫応答における免疫競合（immuno-competition）の誘発を、おそらく、複製欠損および組換えAAV2によって発現されるウイルスタンパク質の欠失によって克服することができるだけでなく、修飾ウイルス粒子のキャプシドは宿主プロテアソームによって分解される量が少なく、したがって提供される提示の材料が少ないという事実によっても克服することができるであろうという点も、重要である。

#### 【0253】

##### 実施例5 - rAAV2ベクターのキャプシドの最適化

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、現在、いくつかの第I/II相臨床試験において、治療用遺伝子の持続的発現を達成する目的で、さまざまな組織を標的とするための送達媒体として使用されている（Daya and Berns 2008; Mueller and Flotte 2008; Srivastava 2008; Asokan et al., 2012; Flotte et al., 2012）。しかし、治療上の利益を得るには、高いベクター用量が必要である。十分量のベクターという要件は、生産上の難題になると共に、ベクターに対する宿主免疫を開始させるリスクも生じる（High and Aubourg, 2011; Mendell et al., 2012, Mingozzi and High, 2011）。より具体的に述べると、血友病Bの潜在的遺伝子治療に関する臨床試験ではまずAAV2血清型に基づく組換えベクターが使用されたが、この試験では、低ベクター用量では治療レベルのヒト第I

10

20

30

40

50



X因子 (hF.IX) の発現が達成されず、高ベクター用量では、AAV2キャプシドに対する細胞傷害性T細胞 (CTL) 応答ゆえに、hF.IXの治療レベルの発現が短寿命であった (Manno et al., 2006; Mingozzi and High, 2007; Mingozzi et al., 2007)。

#### 【0254】

AAV8血清型に基づく組換えベクターによるさらに最近の治療では、治療レベルのhF.IXの発現が達成されたが、AAV8キャプシドタンパク質に対する免疫応答が観察された (Aslanidi et al., 2012)。したがって、低用量で 사용할 ことができる形質導入効率の高い新規AAVベクターを開発することは重要である。細胞上皮成長因子受容体タンパク質チロシンキナーゼ (EGFR-PTK) は、主としてチロシン残基におけるAAV2キャプシドのリン酸化によって、組換えAAV2ベクターからの導入遺伝子発現に負の影響を及ぼし、チロシンリン酸化キャプシドは続いて宿主プロテアソーム分子装置によって分解される (Zhong et al., 2008; Markusic et al., 2010)。JNKおよびp38 MAPKセリン/スレオニンキナーゼの選択的阻害因子も、AAV2ベクターの形質導入効率を改良したことから、一定の表面露出セリンおよび/またはスレオニン残基のリン酸化もこれらのベクターの形質導入効率を減少させるかもしれないことが示唆された。これらの研究は、WTベクターより有意に高い効率でさまざまな細胞タイプに形質導入することが示されたチロシンおよびセリン変異体AAV2ベクターの開発につながった (Aslanidi et al., 2012; Zhong et al., 2008; Markusic et al., 2010; Petrs-Silva et al., 2009)。チロシン残基およびセリン残基に加えて、部位指定変異誘発による表面露出スレオニン残基の排除も、低ベクター用量での形質導入効率の増加につながった。この実施例では、17個の表面露出スレオニン残基のそれぞれを部位指定変異誘発によってバリン (V) 残基で置換したところ、これらの変異体のうちの4つ、すなわちT455V、T491V、T550V、T659Vは、ヒトHEK293細胞において形質導入効率を約2~4倍増加させることが示された。チロシン三重変異体 (Y730F+500+444F) ベクターは、WTと比べて、最も効率よくマウス肝細胞に形質導入したので (Aslanidi et al., 2012; Zhong et al., 2008; Markusic et al., 2010; Petrs-Silva et al., 2009)、次に、これらの変異を最も成績のよい単一セリン変異体 (S662V) および単一スレオニン変異体 (T491V) と組み合わせることで、次のベクターを作製した：2つの四重変異体 (Y444+500+730F+S662V; Y730+500+444F+T491V) および1つの五重変異体 (Y444+500+730F+S662V+T491V)。四重変異体 (Y444+500+730F+T491V) ベクターは、インビトロでマウス肝細胞細胞株に、またインビボで初代マウス肝細胞に、低い用量で効率よく形質導入を生じさせたことから、ヒト遺伝子治療全般、特に血友病におけるこれらのベクターの使用が示唆された。

#### 【0255】

##### 材料と方法

細胞 . ヒト胎児腎臓細胞株HEK293細胞およびマウス肝細胞細胞株H2.35細胞は、American Type Culture Collection (米国バージニア州マナッサス) から入手し、10%ウシ胎児血清 (FBS; Sigma) および抗生物質 (Lonza) を補足したDMEM (Invitrogen) において、単層培養物として維持した。

#### 【0256】

組換えベクターの生産 . ニワトリ  $\gamma$ -アクチンプロモーター (CBA) によって駆動されるEGFP遺伝子 (scAAV2-GFP) またはホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Fluc) (ssAAV2-Fluc) のいずれかを含有する組換えAAV2ベクターを、以前に記述されたように作製した (Aslanidi et al., 2012; Aslanidi et al., 2009; Zolotukhin et al., 2002; Kohlbrenner et al., 2005)。簡単に述べると、ポリエチレンイミン (PEI、線状、MW25,000、Polysciences, Inc.) を使って、HEK293細胞のトランスフェクションを行った。トランスフェクションの72時間後に、細胞を収穫し、ベクターをイオジキサノール (Sigma) 勾配遠心分離とイオン交換カラムクロマトグラフィー (HiTrap Sp Hp 5mL, GE Healthcare) によって精製した。次に、遠心式スピン濃縮器 (Apollo、150kDaカットオフ、容量20mL、CLP) を使ってウイルスを濃縮し、乳酸加リンゲルへの緩衝液交換を3サイクル行った。ゲノム力価を決定するために、10  $\mu$ lの精製ウイルスをDNase I (Invitrogen)

と共に37℃で2時間インキュベートした後、プロテイナーゼK (Invitrogen) と共に55℃でさらに2時間インキュベートした。反応混合物をフェノール/クロロホルム抽出とそれに続くクロロホルム抽出によって精製した。パッケージングされたDNAを、20 µgのグリコーゲン (Invitrogen) の存在下に、エタノールで終夜 (O/N) 沈殿させた。DNase I耐性AAV2粒子の力価は、CBAプロモーターに特異的な以下のプライマー対:

フォワード: 5'-TCCCATAGTAACGCCAATAGG-3' (配列番号20)、

リバース: 5'-CTTGGCATATGATACACTTGATG-3' (配列番号21)

と、SYBR GreenER PCR Master Mix (Invitrogen) とを使って、qPCRによって決定した (Aslanidi et al., 2012; Aslanidi et al., 2009)。

#### 【0257】

部位指定変異誘発. Turbo Pfuポリメラーゼ (Stratagene) を使って、以前に記述されたプラスミドpACG2 (Aslanidi et al., 2012; Wang and Malcolm, 1999) で、2段階PCRを行った。簡単に述べると、第1段階では、2つのPCR伸長反応を、フォワードPCRプライマーおよびリバースPCRプライマーについて3サイクルずつ別々のチューブで行った。第2段階では、2つの反応を混合し、PCR反応をさらに15サイクル行い、次にDpnI消化を1時間行った。プライマーは、変異させた各残基について、スレオニン (ACA) からバリン (GTA) への変化が導入されるように設計した。

#### 【0258】

インピトロでの組換えAAVベクター形質導入アッセイ. ヒトHEK293には $1 \times 10^3$ vg/細胞、マウス肝細胞H2.35細胞には $2 \times 10^3$ vg/細胞のWT scAAV2-GFPベクターおよび変異体scAAV2-GFPベクターで、それぞれ形質導入し、48時間インキュベートした。導入遺伝子発現は、以前に記述されているように (Aslanidi et al., 2012; Zhong et al., 2008; Markusic et al., 2010)、視野あたりの緑色蛍光の総面積 (ピクセル<sup>2</sup>) (平均 ± SD) として評価した。分散分析を使って試験結果と対照とを比較し、それらは統計的に有意であると決定された。

#### 【0259】

細胞質画分および核画分におけるベクターゲノム分布の分析. およそ $1 \times 10^6$ 個のH2.35細胞に、WT scAAV2-GFPベクターまたは変異体scAAV2-GFPベクターのどちらかを、 $1 \times 10^4$ vg/細胞のMOIで感染させた。吸着しているウイルス粒子および吸着していないウイルス粒子をいずれも除去するためのトリプシン処理によって、さまざまな時点で細胞を収集した後、PBSで十分に洗浄した。核画分と細胞質画分とを、Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagentsキット (Thermo Scientific) で、製造者の説明に従って分離した。ウイルスゲノムを抽出し、上述のCBA特異的プライマーを使ったqPCR分析によって検出した。細胞質画分と核画分の間のウイルスゲノム量の差は、次の規則によって決定した: ウイルスで処理した細胞からの各試料に関する $C_T$ 値を、擬似処理細胞からの対応する $C_T$ に対して標準化した ( $C_T$ ). 各一对の試料セットについて、パッケージングされたゲノムの存在の倍率変化を、 $\text{倍率変化} = 2^{-(C_T\text{-細胞質} - C_T\text{-核})}$ として計算した。3回の独立した実験からのデータを、核画分および細胞質画分におけるパッケージングされたゲノムの総量のパーセンテージとして表した。

#### 【0260】

インピボバイオルミネセンスイメージング. 動物実験は全て施設の方針に従って行い、全ての手順は、全米研究評議会の実験動物の管理と使用に関する指針の原則に従って実施した。苦痛を最小限に抑えるためにあらゆる努力をした。10週齢のC57BL/6雄マウス (Jackson Laboratory、メイン州バーハーバー) に、 $1 \times 10^{10}$ vg/匹のWT ssAAV2-Flucベクターおよび変異体ssAAV2-Flucベクターを静脈内注射した (n = 3)。注射の2週間後に、Xenogen IVIS Lumina System (Caliper Life Sciences) を使って、ルシフェラーゼ活性を分析した。簡単に述べると、マウスを2%イソフルオラン (isoflurane) で麻酔し、ルシフェリン基質 (甲虫ルシフェリン、Caliper Life Sciences) を150 µg/g体重の用量で腹腔内注射した。マウスを遮光性チャンバーに入れ、基質注射の5分後に画像を収集した。画像をLiving Image 3.2ソフトウェア (Caliper Life Sciences) によって解

10

20

30

40

50

析することで、相対シグナル強度を決定した。

【0261】

AAV2キャプシド上の変異体残基の位置の可視化．AAV2 VP3結晶構造の原子座標（残基217～735、VP1ナンバリング）（Protein Data Bank（PDB）アクセス番号1lp3；[Xie et al., 2002]）をダウンロードし、VIPERdbのオリゴマージェネレーターアプリケーション（Oligomer generator application）を使って完全なキャプシドモデルを生成するために使用した（Carrillo-Trip et al., 2009）。これにより、マトリックス乗算（matrix multiplication）によってT=1正二十面体キャプシドを作出するための60個のVP3コピーが生成する。その構造をプログラムCOOTで視覚化し（Xie et al., 2002）、コンピュータプログラムPyMOL（Schrodinger, LLC）およびRIVEM（Xiao and Rossman, 2007）のいずれかを使って図を作成した。

10

【0262】

統計的解析．結果を平均±S.D.として表す。群間の差は、スチューデントのt検定の群分けされた対応のない両側分布を使って同定した。P値<0.05を統計的に有意とみなした。

【0263】

結果

AAV2キャプシド上の表面露出スレオニン残基の部位指定変異誘発．AAV2キャプシドは45個のスレオニン（T）残基を、3つのキャプシドVP、すなわちVP1、VP2、VP3のキャプシドウイルスタンパク質3（VP3）共通領域中に含有している。これらのうちの17個（251、329、330、454、455、503、550、592、581、597、491、671、659、660、701、713、716）は表面に露出している（Xie et al., 2002）。これら17残基のそれぞれを、以前に記述されているように（Aslanidi et al., 2012；Zhong et al., 2008）、部位指定変異誘発によってバリン（V）で置換した。大半の変異体はWT AAV2ベクターと同等の力価で生成させることができたが、例外として、T329VおよびT330Vは約10分の1の低い力価で生産され、T713VおよびT716Vは、検出可能なレベルのDNase I耐性ベクター粒子を生産しなかった。これらT-V変異体ベクターのそれぞれを、HEK293細胞における形質導入効率について評価した。図26Aおよび図26Bに示すこれらの結果は、これら17個の変異体のうち、T491V変異体はそのWT対応物より約4倍効率よくHEK293細胞に形質導入したことを示している。T455V、T550V、T659V変異体ベクターの形質導入効率は、約2倍増加した。これらのデータは、AAV2キャプシド上の特異的チロシン、セリン、およびスレオニン残基の細胞キナーゼによるリン酸化が、これらのベクターの形質導入効率の重要な決定要因であることを示した。

20

30

【0264】

表面露出スレオニン残基の多重変異によってAAV2ベクターの形質導入効率はさらに改良される．スレオニン変異体AAV2ベクターの形質導入効率をさらに強化することができるかどうかを評価するために、次の多重変異体ベクターを作製した：3つの二重変異体（T455+491V；T550+491V；T659+491V）、2つの三重変異体（T455+491+550V；T491+550+659V）、および1つの四重変異体（T455+491+550+659V）。各多重変異体ベクターはWT AAV2ベクターと同等のゲノム力価をパッケージングした。並べて比較すると、多重変異体ベクターのそれぞれは、WT AAV2ベクターおよび単一スレオニン変異体AAV2ベクターより効率よくHEK293に形質導入することがわかった（図27Aおよび図27B）。最も成績のよいベクターは三重変異体（T491+550+659V）であると同定され、その形質導入効率はWTベクターより約10倍高く、最もよい単一変異体（T491V）ベクターより約3倍高かった。これらのデータにより、単一ウイルスキャプシド上でいくつかのスレオニン変異を組み合わせると、形質導入効率を増強する相乗的効果が得られることが確認された。

40

【0265】

最適化スレオニン変異体AAV2ベクターはインピトロでマウス肝細胞に効率よく形質導入する．先の実施例で述べたチロシン三重変異体（Y444+550+730F）ベクターは、表面チロシンからフェニルアラニンへの変化を最大7つまで含有するベクターの比較で、マウス

50

肝細胞に形質導入する効率がよいことが示された (Markusic et al. 2010 ; Jayandharan et al., 2011)。したがって、最も成績のよい単一セリン (S662V) 変異および単一スレオニン (T491V) 変異をこの三重チロシン変異体と組み合わせることで、これらのベクターの形質導入効率をさらに増加させて、より一層改良された発現ベクターを本明細書に記載する方法で生産することができるかどうかを評価することは、興味深いことであった。

#### 【0266】

この目的を果たすために、いくつかの多重変異体を次のように作製した：2つの四重変異体ベクター (Y444+500+730F+T491V ; Y444+500+730F+S662V)、および1つの五重変異体ベクター (Y444+500+730F+T491V+S662V)。これらの変異体の形質転換効率をH2.35細胞においてWT AAV2ベクターおよびチロシン三重変異体AAV2ベクターと比較したところ、Y444+500+730F+T491V変異体からの発現レベルは、チロシン三重変異体AAV2ベクターより約2~3倍高く、WT AAV2ベクターより約24倍高いことが示された (図28Aおよび図28B)。興味深いことに、S662V変異とチロシン三重変異体ベクターまたはチロシン-スレオニン四重変異体ベクターとの組合せは、形質導入効率に負の影響を及ぼした。他のいくつかのスレオニン変異、例えばT550VおよびT659Vも、Y444+500+730F+T491V四重変異体AAV2ベクターの形質導入効率を増強しなかった。さらなる研究によって、これらの表面露出Y、SおよびT残基間の複雑な相互作用ならびにそれらのリン酸化状態のより良い理解が得られることは、間違いない。

#### 【0267】

多重変異体はAAV2ベクターの細胞内輸送および核移行を強化する。AAV2キャプシド上の表面露出チロシン残基のリン酸化を防止すると、チロシン変異体ベクターの細胞内輸送が改良され、核に移行するウイルスゲノムの数が増加する (Zhong et al., 2008 ; Zhong et al., 2008)。この実施例では、T491V変異体がこれらのベクターの核移行をさらに増加させることによってこの形質導入効率を増強する能力を持つことから、チロシン三重変異体ベクターへのT491V変異体の付加を選定した。この目的を達成するために、Y444+500+730F+T491V四重変異体によって媒介されるH2.35細胞における導入遺伝子発現の動態を評価し、Y444+500+730F三重変異体およびWT AAV2ベクターと比較した。これらの結果を図29Aおよび図29Bに示す。図からわかるように、チロシン-スレオニン四重変異体ベクターからのEGFP発現は試験した各時点で約2~3倍高く、感染の16時間後には早くも検出することができた。これらの結果から、四重変異体ベクターからの導入遺伝子発現の早期開始が、これらのベクターのより効率的な核移行によるのだろうということが示唆された。この可能性を実験的に検証するために、WT AAV2ベクターおよび2つの変異体AAV2ベクターを感染させたH2.35細胞の細胞質画分および核画分中のベクターゲノムを、qPCR分析を使って、異なる時点で定量した。2つの細胞画分中のベクターゲノム比を図30Aおよび図30Bに示す。核画分には、感染の16時間後に、WT AAV2ベクターからのゲノムの約20%および三重変異体ベクターからのゲノムの約45%が検出されたのに対し、同じ時点で四重変異体からのベクターゲノムの70%超が検出された。同様に、感染の48時間後に、核画分にはWT AAV2ベクターからのゲノムの約45%しか検出されず、三重変異体ベクターからのゲノムの約80%および四重変異体からのベクターゲノムの約90%が、同じ時点で核画分に検出された。したがって、これらのデータにより、スレオニン (T491V) 変異をチロシン三重変異体 (Y444+500+730F) ベクターと組み合わせることが、これらのベクターの核移行のある程度の改良につながり、それがより速い遺伝子発現の開始および観察された形質導入効率の改良と相関したという仮説が確証された。

#### 【0268】

最適化AAV2ベクターはインビボでマウス肝細胞に形質導入する効率が非常に高い。最適化AAV2ベクターの形質導入効率をマウスモデルにおいてインビボで評価した。一本鎖ホタルルシフェラーゼ (Fluc) AAV2ゲノムを持つ多重変異体ベクターのそれぞれをパッケージングし、約 $1 \times 10^{10}$ vgの各ベクターを、C57BL/6マウスに静脈内注射した (各群n=3)。注射の2週間後にバイオルミネセンスイメージングで評価したFluc遺伝子の発現レベ

10

20

30

40

50

ルにより、Y444+500+730F+T491V四重変異体ベクターからの発現は、チロシン三重変異体ベクターからの発現より約3倍高いことがわかった。各群からの代表的な一匹と、これらのデータの定量化を、図31Aおよび図31Bに提示する。インビトロで得られたデータと合致して、S662V変異の付加は、チロシン三重変異体ベクターの形質導入効率にもチロシン-スレオニン四重変異体ベクターの形質導入効率にも負の効果を持っていた。本発明の例示的単一および多重変異キャプシドタンパク質として、表5に示すものが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【0269】

(表5) AAV2キャプシド上の表面露出チロシン(Y)、セリン(S)、およびスレオニン(T)残基の例示的変異の要約

10

【表5 - 1】

単一変異	二重変異	三重変異	多重変異
Y252F	Y252F+Y730F	Y444+500+730F	Y272+444+500+730F
Y272F	Y272F+Y730F	Y730F+S662V+T491V	Y272+444+500+730F
Y444F	Y444F+Y730F	S458+492+662V	Y272+444+500+730F
Y500F	Y500F+Y730F	T455+550+491V	Y272+444+500+700+730F
Y700F	Y700F+Y730F	T550+659+491V	Y272+444+500+704+730F
Y704F	Y704F+Y730F		Y252+272+444+500+704+730F
Y730F	Y444F+T550F		Y272+444+500+700+704+730F
S261V	S458V+S492V		Y252+272+444+500+700+704+730F
S264V	S458V+S662V		Y444+500+730F+T491V
S267V	S492V+S662V		Y444+500+730F+S458V
S276V	T455+T491V		Y444+500+730F+S662V+T491V
S384V	T550+T491V		Y444+500+730F+T550+T491V
S458V	T659+T491V		Y444+500+730F+T659+T491V
S468V	T671+T491V		
S492V	Y730F+T491V		
S498V	S662V+T491V		
S578V	Y730F+S662V		
S658V			
S662V			
S662A			
S662D			
S662F			
S662H			
S662N			
S662L			
S662I			
S668V			
S707V			
S721V			
T251V			
T329V			
T330V			
T454V			
T455V			
T491V			
T503V			
T550V			

20

30

40

50

## 【表 5 - 2】

---

T592V  
T597V  
T581V  
T671V  
T659V  
T660V  
T701V  
T713V  
T716V

---

10

最初の文字は野生型AAV2キャプシド中のアミノ酸に対応し、数字は変異させたVP3アミノ酸位置であり、最後の文字は変異体アミノ酸である。

## 【0270】

## 考察

組換えAAV系ベクターは、さまざまな遺伝障害の潜在的処置としての遺伝子補充療法にとって、魅力的な送達媒体である。AAVベクターは多くの動物モデルに使用されて成功を収めており、近年、いくつかの臨床治験でも効力が示されているが、AAVのライフサイクルにおけるいくつかのステップは、依然として、遺伝子治療におけるこれらのベクターの有効性を制限しているようである。これらのステップには、細胞内輸送、核移行、脱外被、およびウイルス第二鎖DNA合成などが含まれる (Ding et al., 2005 ; Harbison et al., 2005 ; Nonnenmacher and Weber, 2012)。

20

## 【0271】

AAVの構造構成要素および調節構成要素の単純な編成と固有の柔軟性は、ウイルスキャプシドを操作するユニークな機会と、特有の特徴を有するカスタマイズされた組換えベクターを開発するためのゲノムを提供する。過去10年間に著しい進歩があつて、組換えAAVベクターの特異性と形質導入効率が改良された。例えば、ウイルスの逆方向末端反復 (ITR) 配列中の特異的変異は、ウイルス第二鎖DNA合成の律速ステップを克服し、さまざまなタイプの細胞および組織において導入遺伝子発現レベルを劇的に増加させる、自己相補的AAV (scAAV) ベクターの開発につながった (McCarty et al., 2003 ; Wang et al., 2003)。キャプシド構造解析に関するさらなる研究を、キャプシド遺伝子での変異誘発研究から生じる豊富な情報と組み合わせることで、これらのベクターのベクターキャプシド形成、組織指向性、および細胞内輸送に決定的な役割を果たす特定領域の同定につながった (Lochire et al., 2006 ; Muzyczka and Warrington, 2005 ; Wu et al., 2006 ; Gao et al., 2003 ; Vandenberghe et al., 2009 ; Wu et al., 2006)。

30

## 【0272】

前記の実施例では、AAV2キャプシド上の表面に露出している特異的チロシン (Y) およびセリン (S) 残基の置換が、インピトロでもインピボでも、おそらくはリン酸化とそれに続くユビキチン化およびプロテアソーム媒介分解を防止することによって、これらのベクターの形質導入効率を有意に増加させることが示された。AAV2キャプシド上の表面に露出している特定スレオニン (T) 残基もリン酸化を受けると予想されるので、この実施例では、17個の表面露出T残基のそれぞれを体系的に変異誘発し、形質導入効率を最大4倍まで増加させようとする単一変異体ベクターをいくつか同定した。複数のT変異を単一キャプシド上で組み合わせることにより、HEK293細胞において形質導入効率をWT AAV2ベクターと比較してさらに最大約10倍まで増強する修飾が同定された。

40

## 【0273】

AAV2キャプシド上の特定T残基の変異は、以前に、2つのグループが独立して報告している。例えばLochire et al., 2006は、抗体に結合する表面領域を同定するための巧みな努力の一環として位置330、454、455、491、503、および550のT残基を標的にし、DiPrimio et al. (2008) は、キャプシドアセンブリおよびゲノムパッケージングにとって

50

決定的な領域を同定しようとして位置659のT残基を標的にした。どちらの研究でも、T残基は、アラニン(A)、セリン(S)、またはリジン(K)残基のいずれかで置換されるか、ペプチド置換によって置換された。しかし、どの変異体ベクターの形質導入効率にも増加は観察されなかった。これに対し、本実施例では、表面露出T残基をバリン残基で置換した。これにより、AAVベクターの生物学的活性の調整において特定アミノ酸タイプが果たす決定的な役割に関する最近の観察が、さらに確証される(Aslanidi et al., 2012; Li et al., 2012)。

#### 【0274】

最も効率のよいスレオニン変異(T491V)を以前に報告された三重変異(Y444+500+730F)(Markusic et al. 2010)と組み合わせてY-T四重変異体(Y444+500+730F+T491V)ベクターを作製したところ、このベクターの形質導入効率は、インビトロでもインビボでも、マウス肝細胞においてチロシン三重変異体ベクターより約2~3倍高かった。しかし、最も効率のよいS変異(S662V)(Aslanidi et al., 2012)とチロシン三重変異との組合せは、Y-S四重変異体(Y444+500+730F+S662V)ベクターおよびY-S-T五重変異体(Y444+500+730F+S662V+T491V)ベクターの形質導入効率に負の影響を及ぼした。他のいくつかの組合せはWT AAV2ベクターより大きい形質導入効率を示したが、類似の組み合わせ(四重、五重または六重チロシン変異体; および三重および四重スレオニン変異体)も、最も成績のよいYST変異の組み合わせも、三重チロシン変異体ベクターからの発現レベルには達しなかった。試験した変異の組み合わせが多数であることから、ここでは、形質導入効率を三重チロシン変異体ベクター以上に有意に増加させた変異だけを、詳しく特徴づけた。

#### 【0275】

17個のAAV2表面露出スレオニン残基はキャプシド全体に散在している。変異のうち4つ(T329V、T330V、T713V、およびT716V)は、アセンブリおよびベクター生産に著しい欠陥をもたらし、それらをさらに特徴づけることができなかった。残基329および330は、AAV2 VP3構造のコア $\alpha$ -バレルのDストランドとEストランドの間にある $\alpha$ -表面ループ(DEループ)中に位置する(Xie et al., 2002)。正二十面体5回対称関連VP3からのこれらのループの5つが、キャプシドの内表面と外表面をつなぐチャンネルを、この軸の位置に組み立てている(図32A)。以前の研究で観察されたように(Bleker et al., 2006)、これらの変異体の力価は、ゲノムパッケージングにおけるチャンネルの役割と合致して、有意に低減した。残基713および716は、正二十面体2回回転軸にある凹みと5回回転軸を取り囲む凹みの間の壁(wall)/隆起(raised)キャプシド領域上に位置する(図32Aおよび図32B)。それらの側鎖は対称性関連VP3単量体との極性相互作用に参加し、変異はキャプシドアセンブリの欠陥をもたらす可能性が高い。正二十面体2回回転軸に位置する残基のキャプシドアセンブリにおける役割は、アセンブリ活性化タンパク質(assembly-activating protein)(AAP)との相互作用を媒介するAAV2残基がこのキャプシド領域に位置することに気付いた最近の報告と合致している(Naumer et al., 2012)。

#### 【0276】

バリンまたはアラニンに変異させた場合に形質導入表現型の増加を示した残基T455、T491、T550、およびT659は、正二十面体3回回転軸を取り囲む突出部上(T455、T491、およびT550)またはAAV2キャプシドの正二十面体5回回転軸にあるチャンネルを取り囲む凹みに存在するH $\alpha$ -バレルのHとIの間(T659)上に位置する。2つのVP3単量体から組み立てられるキャプシド上の顕著な特徴である突出部上の残基は、それぞれ突出部の上(455)、2回軸の凹みに面した側面(491)、および5回軸を取り囲む凹みに面した側面(550)近くに位置する。このAAV領域は配列および構造に最も多くの可変性を含み、残基659を除いて、他の3つのスレオニン残基は、VP3可変領域(VR)を画定する位置にある(Govindasamy et al., 2006)。T659と共に、これらの残基は、突出部の上に正二十面体5回回転軸を取り囲む凹みに向かって伸びるフットプリントをキャプシド表面上に形成する(図32Aおよび図32B)。これらの表面露出は、宿主分子(これにはキナーゼが含まれる)と相互作用する潜在能力と合致している。興味深いこと

に、このフットプリントには、三重チロシン変異体中の残基Y444、Y500、およびY730が隣接している、T491はキャプシド表面アミノ酸の描写においてチロシン残基Y730に近接している（図32B）。キャプシドの正二十面体軸にある凹みに位置するこの残基は、7つの表面露出チロシンをフェニルアラニン残基に変異させた場合に、WT AAV2と比較して最も高い形質導入の増加を示した（Zhong et al. 2008）。重要なことに、相同なAAV8をエンドサイトーシス経路において輸送中に直面する条件で調べたところ、2回軸キャプシド領域はpH媒介構造転移を起こすことが観察されている（Nam et al., 2011）。AAV2の変異は、変化した受容体結合機序によって、形質導入効率を改良することが考えられる。AAV2およびAAV6とヘパラン硫酸受容体との相互作用を媒介する残基、それぞれR585およびR588、ならびにK531（AAV2ではE530に構造的に等価）は、このフット（foot）に近く（図26B）、VRV中の残基491および500は、AAV8においてLamR受容体への結合と関係づけられているAAV2キャプシドの表面上の2つの大きな領域の一つに位置する（Akache et al., 2006）。VRV中のアミノ酸は、AAV9キャプシドがそのグリカン受容体ガラクトースに結合する際にも関与する。

#### 【0277】

S662V変異を含有する変異体の形質導入効率表現型の減少は、潜在的リン酸化が排除されるように変異させた場合に形質導入を強化する残基によって描写されたフットプリント内というこの残基の位置を考えると、説明が困難である（図32Aおよび図32B）。加えて、この残基のバリンへの変異はWT AAV2との比較で形質導入を改良したことも示されている（Aslanidi et al., 2012）。残基S662は、T659のように、隣接する5回対称関連V P3単量体の上に伸びるHIループ内に位置し、おそらく五量体サブユニットの安定化に関与するのであろう。しかし、セリン側鎖はどのサブユニット間相互作用またはサブユニット内相互作用にも関わっておらず、HIループはキャプシドアセンブリおよびゲノムパッケージングの決定要因であると報告されているが（DiPrimio et al., 2008）、これは単一アミノ酸置換を許容する（Aslanidi et al., 2012）。したがってその効果はおそらく三重チロシン変異体残基とT491とを含むフットプリントを利用するキャプシド相互作用の消失によるのであろう。重要なことに、HIループを構成する近隣アミノ酸における変異（例えばセリン（mut45subSer14）またはFLAG エピトープ（mut45SubFLAG10）で置換されたアミノ酸残基664）の表現型は、非感染性であるか、ウイルスキャプシドにアセンブリされなかった（Wu et al., 2000）。しかし、同じ位置にHAを挿入すると、部分的に欠損しているが、依然としてヘパリンに結合するキャプシドが生産された（Wu et al., 2000）。

#### 【0278】

感染の48時間後に、核には、WT AAV2ベクターによって送達されたベクターゲノムの約45%しか存在しなかったのに対し、同じ時点でY-T四重変異体ベクターによって送達されたベクターゲノムの>90%が存在した。これは、変異体の改良された輸送動態を示し、これはプロテアソームへの方向転換の低減と合致するであろう。チロシン三重変異体ベクターと比較して、これらのベクターの形質導入効率のある程度（約2~3倍）の増加も、核ベクターゲノム送達の約10%の増加（すなわち約80%と比較して約90%）と合致する。

#### 【0279】

表面チロシン、セリン、およびスレオニン修飾のさまざまな組合せは、最大増強を達成するための最適な組合せがあることを、明確に示した。これらの研究では、感染時のAAV相互作用における、また形質導入を強化するための、特異的残基タイプの必要条件も浮き彫りになった。単一変化として形質導入効率の有意な増加を示さなかった個々の変異は、単一キャプシド中で組み合わせれば、より優れたベクターを形成することができる可能性がある。

#### 【0280】

（表6）AAV血清型におけるチロシン残基の比較

（表面露出残基をそのアミノ酸位置の後の「\*」で示す）

10

20

30

40

50



【表 6 - 1】

AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAV10	AAV11	AAV12
Y6	Y6	Y6	Y5	NA	Y6	Y6	Y6	Y6	Y6	Y6	Y6
Y50	Y50	Y50	Y49	Y49	Y50	Y50	Y50	Y50	Y50	Y50	Y50
Y52	Y52	Y52	Y51	Y51	Y52	Y52	Y52	Y52	Y52	Y52	Y52
Y79	Y79	Y79	Y78	Y78	Y79	Y79	Y79	Y79	Y79	Y79	Y79
Y90	Y90	Y90	Y89	Y89	Y90	Y90	Y90	Y90	Y90	Y90	Y90
Y93	Y93	Y93	Y92	Y92	Y93	Y93	Y93	Y93	Y93	Y93	Y93
Y252*	Y252*	Y252*	Y246*	Y242*	Y252*	Y253*	Y253*	Y252*	Y253*	Y246*	Y255*
Y257	Y257	Y257	Y251	Y247	Y257	Y258	Y258	Y257	Y258	Y251	Y260
Y273*	Y272*	Y272*	Y263*	Y263*	Y273*	Y274*	Y275*	Y274*	Y275*	Y263*	Y272*
Y276	Y275	Y275	NA	Y266	Y276	Y277	Y278	Y277	Y278	NA	NA
Y282	Y281	Y281	Y272	Y272	Y282	Y283	Y284	Y283	Y284	Y272	Y281
NA	NA	NA	NA	Y294	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Y349	Y348	Y348	Y339	Y339	Y349	Y350	Y351	Y350	Y351	Y339	Y348
Y353	Y352	Y352	Y343	Y343	Y353	Y354	Y355	Y354	Y355	Y343	Y352
Y376	Y375	Y375	Y366	Y366	Y376	Y377	Y378	Y377	Y378	Y366	Y375
Y378	Y377	Y377	Y368	Y368	Y378	Y379	Y380	Y379	Y380	Y368	Y377
Y394	Y393	Y393	Y387	NA	Y394	Y395	Y396	Y395	Y396	Y386	Y395
Y398	Y397	Y397	Y391	Y390	Y398	Y399	Y400	Y399	Y400	Y390	Y399
Y414	Y413	Y413	Y407	Y406	Y414	Y415	Y416	Y415	Y416	Y406	Y415
Y425	Y424	Y424	Y418	NA	Y425	Y426	Y427	Y426	Y427	Y417	Y426
Y442*	Y441*	Y441*	Y435*	Y434*	Y442*	Y443*	Y444*	Y443*	Y444*	Y434*	Y443*
NA	NA	NA	NA	Y436	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Y444*	Y443*	Y443*	NA	NA	Y444*	Y445*	Y446*	Y445*	Y446*	NA	NA
Y445*	Y444*	Y444*	NA	NA	Y445*	Y446*	Y447*	Y446*	Y447*	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y465
NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y466	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y457	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y475
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y467	Y476
NA	NA	NA	NA	Y461	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y478	NA	NA	NA
Y484	Y483	Y484	NA	NA	Y484	NA	Y486	Y484	Y486	NA	NA

10

20

【表 6 - 2】

NA	NA	NA	Y491*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y490*	Y499*
NA	Y500*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	Y504*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y503*	Y512*
Y509	Y508	Y509	NA	NA	Y509	Y511	Y511	NA	Y511	Y507	NA
NA	NA	NA	NA	Y502	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y521*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y542*	NA	NA	Y557*	NA	Y557*	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y563*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	Y576	Y577	NA	NA	NA	Y578	Y579	Y577	Y579	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y585*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Y613*	Y612*	Y613*	Y611*	Y602*	Y613*	Y614*	Y615*	Y613*	Y615*	Y610*	Y619*
NA	NA	NA	Y612	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y611	Y620
Y674*	Y673*	Y674*	Y672*	Y662*	Y674*	Y675*	Y676*	Y674*	Y676*	Y671*	Y680*
Y701	Y700-S	Y701	NA	Y689*	Y701*	Y702*	Y703*	Y701*	Y703*	NA	NA
*		*									
Y705*	Y704*	Y705*	Y703*	Y693*	Y705*	NA	Y707*	Y705*	Y707*	Y702*	Y711*
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y708	Y706	Y708	NA	NA
Y721	Y720	Y721	Y719	Y709	Y721	Y722	Y723	Y721	Y723	Y717	Y727
Y731*	Y730*	Y731*	Y729*	Y719*	Y731*	Y732*	Y733*	Y731*	Y733*	Y728*	NA

30

40

【 0 2 8 1】

(表7) AAV血清型中のリジン残基の比較

(表面露出残基をそのアミノ酸位置の後の「\*」で示す)

50

【表 7 - 1】

AAV 1	AAV 2	AAV 3	AAV 4	AAV 5	AAV 6	AAV 7	AAV 8	AAV 9	AAV 10	AAV 11	AAV 12
NA	K24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K26	K26	K26	NA	NA	K26	K26	K26	K26	K26	K26	K26
K31	NA	NA	K30	K30	K31	K31	K31	NA	K31	K31	NA
K33	K33	K33	K32	K32	K33	K33	K33	K33	K33	K33	K33
K38	NA	NA	NA	NA	K38	K38	K38	NA	K38	K38	NA
NA	K39	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K51	K51	K51	K50	NA	K51	K51	K51	K51	K51	K51	K51
K61	K61	K61	K60	NA	K61	K61	K61	K61	K61	K61	K61
K77	K77	K77	K76	NA	K77	K77	K77	K77	K77	K77	K77
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K81
K84	NA	K84	K83	NA	K84	K84	NA	K84	K84	K84	NA
NA	K92	K92	K91	K91	NA	NA	NA	K92	NA	NA	K92
NA	NA	NA	NA	K102	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	K105	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K105	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K115	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K122	K122	K122	K121	K121	K122	K122	K122	K122	K122	K122	K122
K123	K123	K123	K122	K122	K123	K123	K123	K123	K123	K123	K123
K137	K137	K137	NA	K136	K137	K137	K137	K137	K137	K137	K137
K142	K142	K142	K141	NA	K142	K142	K142	K142	K142	K142	K142
K143	K143	K143	K142	K142	K143	K143	K143	K143	K143	K143	K142
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K148
NA	NA	NA	NA	K150	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K152	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K153	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K160
K161	K161	K161	K160	NA	K161	K162	K162	K161	K162	K160	K164
NA	NA	NA	K161	NA	NA	K163	K163	NA	K163	K161	K165
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K166
NA	NA	K164	K163	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K163	NA
NA	NA	NA	NA	K161	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K168
K168	NA	NA	K167	NA	K168	NA	NA	K168	K169	NA	NA
K169	K169	K169	K168	NA	K169	K170	K170	K169	K170	K168	NA

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

NA	NA	NA	K169	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K232 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>K258*</b>	<b>K258</b>	<b>K258*</b>	<b>K252*</b>	NA	<b>K258*</b>	<b>K259*</b>	<b>K259*</b>	<b>K258*</b>	<b>K259*</b>	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K251*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K310 I	K309	K309 I	K300 I	NA	K310 I	K311 I	K312 I	K311 I	K312 I	K300 I	K309I
NA	NA	K310 I	NA	NA	NA	K312 I	NA	NA	NA	NA	NA
K315 I	K314	K314 I	K305 I	K305 I	K315 I	K316 I	K317 I	K316 I	K317 I	K305 I	K314I
K322 I	K321	K321 I	K312 I	K312 I	K322 I	K323 I	K324 I	K323 I	K324 I	K312 I	K321I
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>K333*</b>	<b>K332*</b>	<b>K333*</b>	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K384I
NA	NA	NA	NA	K394 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	K411 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K410 I	K419I
NA	NA	NA	NA	K425 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>K449*</b>	NA	NA	NA
K459 I	NA	NA	NA	NA	K459 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K462*	NA	NA	NA
NA	NA	NA	K459 I	K451 I	NA	NA	NA	NA	NA	K458 I	K467I
NA	NA	NA	K469 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K476 I	NA	NA	K470 I	K462 I	K476 I	K478 I	K478 I	NA	K478 I	K469 I	K478I
NA	NA	NA	K479 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K478 I	K487I
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K490I
<b>K491*</b>	<b>K490</b>	<b>K491*</b>	<b>K485*</b>	NA	<b>K491*</b>	<b>K493*</b>	NA	NA	NA	<b>K484*</b>	<b>K490</b>
<b>K493*</b>	NA	NA	NA	NA	<b>K493*</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	<b>K492*</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>K491*</b>	<b>K493</b>
NA	NA	NA	<b>K503*</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>K502*</b>	<b>K511</b>
<b>K508*</b>	<b>K507</b>	<b>K508*</b>	NA	NA	<b>K508*</b>	<b>K510*</b>	<b>K510*</b>	NA	<b>K510*</b>	NA	NA
<b>K528*</b>	<b>K527</b>	<b>K528*</b>	NA	NA	<b>K528*</b>	<b>K530*</b>	<b>K530*</b>	<b>K528*</b>	<b>K530*</b>	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	<b>K531*</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>K533*</b>	<b>K532</b>	<b>K533*</b>	NA	NA	<b>K533*</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	<b>K532*</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>K545*</b>	<b>K544</b>	<b>K545*</b>	NA	NA	<b>K545*</b>	<b>K547*</b>	<b>K547*</b>	<b>K545*</b>	<b>K547*</b>	NA	NA
NA	NA	NA	<b>K544*</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	<b>K549</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>K553*</b>	NA	NA	NA	NA	NA
NA	<b>K556</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>K557*</b>	NA	NA	NA
<b>K567*-</b>	NA	NA	NA	NA	<b>K567*</b>	NA	<b>K569*</b>	<b>K567*</b>	<b>K569*</b>	NA	NA

【表 7 - 3】

K621 I	K620	K621 I	K619 I	K610 I	K621 I	K622 I	K623 I	K621 I	K623 I	K618 I	K627I
K641 I	K640	K641 I	K639 I	K630 I	K641 I	K642 I	K643 I	K641 I	K643 I	K638 I	K647I
K650 I	K649	K650 I	K648 I	K639 I	K650 I	K651 I	K652 I	K650 I	K652 I	K647 I	K656I
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K664 I	NA	NA
<b>K666*</b>	<b>K665</b>	<b>K666*</b>	NA	NA	<b>K666*</b>	<b>K667*</b>	<b>K668*</b>	<b>K666*</b>	<b>K668*</b>	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K676 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K689 I	K688	K689 I	K687 I	K677 I	K689 I	K690 I	K691 I	K689 I	K691 I	K686 I	K695I
K693 I	K692	K693 I	K691 I	K681 I	K693 I	K694 I	K695 I	K693 I	K695 I	K690 I	K699I
<b>K707*</b>	<b>K706</b>	<b>K707*</b>	NA	NA	<b>K707*</b>	<b>K708*</b>	<b>K709*</b>	<b>K707*</b>	<b>K709*</b>	NA	NA
NA	NA	NA	K718 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K717 I	NA

ボールド体の残基は表面関連リジンである = \*

キャプシドの内部に位置する残基 = I

当該血清型の場合、その位置には相同なりジンがない = NA

AAVの結晶構造では見えない残基は灰色の網掛けにする；ただし、生化学データから、これらのアミノ酸は、ウイルスのライフサイクルのあるポイントまではAAVキャプシドの内部に位置し、次にそのポイントで外面化することが示唆されている。

【 0 2 8 2】

#### 実施例 6 - AAV3ベクターによるヒト肝腫瘍形成の抑制

肝細胞癌（HCC）は固形がんのなかでは第5位であり、世界中で毎年約695,900例が死亡している（Thomas and Zhu, 2005；Jemal et al., 2011）。過去20年間に米国にお

10

20

30

40

50

けるHCCの発生率は三倍になったが、5年生存率は12%未満のままである (El-Serag, 2011)。アジアとアフリカではさらに悪く、中国における年間発生率は3000人に1人である (Chen, et al., 2013)。現在、HCCの病期分類は最適な治療の計画にとって決定的に重要だと考えられている (Bruix et al., 2005)。初期HCCを持つ患者は根治的 (治療的) 治療の恩恵を受けうる。また中期の患者は待機的処置の恩恵を受けうる。しかし、再燃は高頻度の合併症であり、処置失敗率は高い。進行HCCの患者の場合は、残念ながら、最善の対症療法が唯一の選択肢である (Verslype et al., 2009)。米国食品医薬品局によって進行HCCの治療薬として承認された医薬品が一つあるが (ソラフェニブ)、大規模第II相臨床試験では、生存率中央値 (median survival rate) が7.9ヶ月から10.7ヶ月に増加したに過ぎない (Llovet et al., 2008)。

10

## 【0283】

AAVベクターは、レーパー先天性黒内障 (Bainbridge et al., 2008; Maguire et al., 2008; Cideciyan et al., 2008; Cideciyan, 2010)、血友病B (Nathwani et al., 2011) および芳香族L-アミノ酸カルボキシラーゼ欠損症 (Hwu et al., 2012) の処置において、注目に値する効力を示している。リボタンパク質リパーゼ欠損症を処置するためのrAAV1ベクターであるグリベラ (Glybera) は、西洋諸国における最初の遺伝子治療製品である (Melchiorri et al., 2013)。2000年代初頭に、研究者らは、インビボでHCCを標的とするために、従来的一本鎖 (ss) rAAV2ベクターを使用した (Su et al., 2000)。残念ながら、ssAAV2ベクターの形質導入効率は低いので、全身性投与の場合、2mmより大きな腫瘍では形質導入が観察されなかった (Peng et al., 2000)。さらに最近になって、rAAV8ベクターを使ったマウス内因性HCCモデルにおける特異的miRNAの送達、がん細胞増殖の阻害をもたらすことが示された (Kota et al., 2009; Hsu et al., 2012)。しかしrAAV8ベクターは、マウスモデル (Zincarelli et al., 2008; Gao et al., 2002; Wang et al., 2005) および非ヒト霊長類 (Nathwani, et al., 2006; Nathwani et al., 2007) において、肝臓以外の正常組織にも広い指向性を有する。

20

## 【0284】

興味深いことに、インビボでどの正常マウス組織にも効率よく形質導入できないrAAV3ベクター (Zincarelli et al., 2008; Palomeque et al., 2007; Markakis et al., 2010; Ling et al., 2010) は、インビトロ (Ling et al., 2010; Glushakova et al., 2009) でもインビボ (Cheng et al., 2012) でも、ヒトHCC細胞に極めて効率よく形質導入することが示されることを、本発明者らは実証した。rAAV3ベクターは初代ヒト肝細胞にも形質導入するが、HCC特異的プロモーターである  $\alpha$ -フェトプロテインプロモーター (AFPp) を使用することにより、導入遺伝子発現を悪性細胞に制限することができた。その後の研究で、本発明者らは、rAAV3ベクターがヒト肝細胞成長因子受容体 (hHGFR、c-Metとも呼ばれる) を細胞補助受容体として利用することに気付いた (Ling et al., 2010)。これは、ヒト肝がんを標的とする際にrAAV3系ベクターを活用できる可能性を示している。というのも、hHGFRは大半のHCC細胞において過剰発現しているからである (You et al., 2011)。さらにまた、AAV3は他のよく使用されるAAV血清型と比較してヒトでは既存の中和抗体の出現率が低いので (van der Marel et al., 2011)、ヒト肝がんの遺伝子治療用の選択的ウイルスベクターとして開発される可能性を秘めている。本実施例では、ウイルスキャプシド上の特定表面露出チロシン (Y)、セリン (S)、およびスレオニン (T) 残基の排除によってヒト肝がん細胞におけるrAAV3媒介形質導入効率のさらなる増強を達成できることを実証する。これらの修飾に関連して、インビトロでの細胞受容体相互作用およびインビボでのウイルス指向性に、著しい変化が観察されることはなかった。さらにまた、伝統的漢方薬トリコサンチンからの新規治療用遺伝子を保因する最適化rAAV3ベクターの全身性投与によって、ヒト肝がん異種移植片モデルにおける腫瘍形成の有意な阻害が達成された。

30

40

## 【0285】

材料と方法

化学物質、プラスミドおよびプライマー。グレードI-Aヘパリンナトリウム塩はSigma-AI

50

drichから購入した。組換えhHGFはLife Technologiesから購入した。プラスミドpHelperはAgilent Technologiesから購入した。プラスミドpdsAAV-CBAp-EGFPおよびpAAV-CBAp-FLucは、ノースカロライナ大学チャペルヒル校のXiao Xiao博士から入手した。プラスミドpdsAAV-AFPp-EGFPは以前に記述されている (Glushakova et al., 2009)。TCS遺伝子 (Shaw et al., 1994) は、公表された配列 (キカラスウリ (*T. kirilowii*) トリコサンチン (TCS) mRNA、全cds; GenBank: M34858.1) に基づいてLife Technologiesによって合成され、AgeI制限部位とHindIII制限部位を使ってプラスミドpdsAAV-AFPp-EGFPにサブクローニングされた。プラスミドは全て使用前に配列決定した。

#### 【0286】

最適化rAAV3キャプシドプラスミドの構築 . 以前に記述されているように (Zhong et al., 2008; Markusic et al., 2010; Aslanidi et al., 2013)、Turbo Pfuポリメラーゼ (Stratagene) を使った2段階PCR法を実行して、rAAV3キャプシド中に部位特異的変異を導入した。簡単に述べると、第1段階では、各変異体について2つのPCR伸長反応を別々のチューブで行った。一方のチューブはフォワードPCRプライマーを含有し、他方はリバープライマーを含有した。第2段階では、2つの反応を混合し、製造者の説明書に従って標準的PCR変異誘発アッセイを行った。変異体プラスミドは全て使用前に配列決定した。

#### 【0287】

細胞株および培養 . ヒト肝細胞癌 (Huh7) 細胞は以前に記述されており (Ling et al., 2010; Cheng et al., 2012)、10%熱非働化ウシ胎児血清 (FBS、Sigma-Aldrich)、1%ペニシリンおよびストレプトマイシン (Lonza) を補足した完全ダルベッコ変法イーグル培地 (C-DMEM、Mediatech, Inc.) 中に維持した。新しく樹立されたヒト肝芽腫 (Hep293TT) 細胞株はGail E. Tomlinson博士 (テキサス大学健康科学センターサンアントニオ校) から入手し、15%熱非働化FBS (Sigma-Aldrich) および1%P/S (Lonza) を補足した完全RPMI培地1640 (Life Technologies) 中に維持した。細胞を5%CO<sub>2</sub>中、37 °Cの湿潤雰囲気下で付着培養として成長させ、室温においてトリプシン-ヴェルセン混合物 (Lonza) で2~5分間処理した後、継代し、培地で洗浄し、完全培地に再懸濁した。

#### 【0288】

rAAVベクター生産 . rAAVベクターの高精製ストックは、三重プラスミドトランスフェクションプロトコールによって作製した。簡単に述べると、HEK293細胞にポリエチレンイミン (線状、MW25000、Polysciences, Inc.) を使って3つのプラスミドを同時トランスフェクトし、トランスフェクションの6時間後に培地を置き換えた。トランスフェクションの72時間後に細胞を収穫し、3ラウンドの凍結融解にかけてから、ベンゾナーゼ (Life Technology) で消化した。ウイルスベクターをイオジキサノール (Sigma-Aldrich) 勾配超遠心分離と、それに続くHiTrap SP/Q HP (GE Healthcare) を用いるイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、リン酸緩衝食塩水 (PBS、Mediatech, Inc.) で洗浄し、150Kda分子量カットオフ (MWCO) の遠心式スピン濃縮器で濃縮した。組換えベクターストックの物理的ゲノム力価は、定量的DNAスロットプロット分析およびサザンプロット分析によって決定した。

#### 【0289】

インピトロでのrAAVベクター形質導入 . 細胞をC-DMEMに入れて、96ウェルプレートに1ウェルあたり5,000細胞または10,000細胞の割合で播種した。24時間後に、細胞を疑似処理するか、表示の化学物質で2時間処理した。次に、表示の化学物質を含むまたは表示の化学物質を含まない血清フリーかつ抗生物質フリーDMEM培地中で、rAAV感染 (MOI:  $5 \times 10^3$ ) を2時間行った後、ベクター接種物を除去するためにPBSで十分に洗浄した。導入遺伝子発現は、形質導入の72時間後に、蛍光顕微鏡法かフローサイトメトリーによって分析した。

#### 【0290】

hHGF競合アッセイ . Huh7細胞に、 $5 \times 10^3$ vg/細胞のMOIでscAAV3-CBAp-EGFPベクターによる形質導入を行った。ベクターを一連の濃度の組換えhHGFと前もって混合した

10

20

30

40

50

。形質導入の72時間後に細胞をEGFP発現レベルについて分析した。

【0291】

動物の取り扱い．動物実験は全て適当な規制当局によって承認され、指定された動物実験ガイドラインに従って行われた。6～10週齢の非肥満糖尿病/重症複合免疫不全IL2-ガンマ欠損(NSG)雄マウスを、Jackson Laboratoryから購入した。

【0292】

ヒト肝がん異種移植片モデル．6～10週齢雄NSGマウスの首の腹側、肩甲骨の間に、 $5 \times 10^6$ 個のHuh7細胞またはHep293TT細胞を皮下注射した。実験終了まで動物を滅菌ケージで飼育した。

【0293】

インビボFLucアッセイ．NSGマウスにおいて、rAAVベクターを尾静脈から静脈内注射するか、腫瘍に直接注射した。インビボFLucイメージングのために、用量が4mg/kg体重になるように基質D-ルシフェリン- $K^+$ 塩(Caliper Life Sciences)の体積を計算するために、マウスを体重測定し、麻酔した。計算された体積の5mg/mLの基質原液を、100 $\mu$ LのPBSと混合し、腹腔内に注射した。冷却電荷結合素子カメラを装備したXenogenマシン(Xenogen)を使って、インビボバイオルミネセンス像を直ちに5分間にわたって取得した。カメラ制御プログラムLiving Imageソフトウェアを使ってシグナル強度を定量し、光子数/秒/cm<sup>2</sup>/ステラジアン(p/s/cm<sup>2</sup>/sr)として表した。

【0294】

統計的解析．結果を平均 $\pm$ 標準偏差(SD)として表す。群間の差は、GraphPad Prism 6ソフトウェアにおいて、一元配置ANOVAとサイダックの多重比較検定を使って同定した。

【0295】

結果

rAAV3ベクターはインビボでヒト肝腫瘍に選択的に形質導入する．1組目の研究では、ヒトHCC腫瘍におけるrAAV3ベクターとrAAV8ベクターの形質導入効率を、マウス異種移植片モデルにおいて、インビボで比較した。雌雄両方の非肥満糖尿病(NOD)重症複合免疫不全(scid)インターロイキン2欠損(IL2<sup>-</sup>)(NSG)マウス(n=4)の腹側、肩甲骨の間に、 $5 \times 10^6$ 個のヒトHuh7細胞を皮下注射したところ、それらは腫瘍を形成した。4週間後に、マウスに擬似注射するか、またはサイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー/ニワトリ $\gamma$ -アクチンハイブリッドプロモーター(CBAp)の制御下にあるホタルルシフェラーゼ遺伝子(FLuc)を保因する $1 \times 10^{11}$ ウイルスゲノム(vg)/マウスのrAAV3ベクターまたはrAAV8ベクターを尾静脈から注射した(図40A)。ベクター投与の3日後に全身バイオルミネセンスイメージングを行った。これらの結果を図36Aに示す。図からわかるように、rAAV3ベクターを注射したマウスでは、雄雌共に、FLuc発現が腫瘍に制限され、一方、rAAV8ベクターを注射したマウスでは、FLuc発現が相対的により広範であったが主として肝臓に局在化しており、rAAV8ベクターの形質導入効率は、雄マウスの方が有意に高かった。この観察結果は以前に公表された研究と合致している(Davidoff et al., 2003)。定量的データにより、rAAV3ベクター媒介導入遺伝子発現は腫瘍に制限され、導入遺伝子発現は肝臓にはほとんど検出されないことが、さらに実証された。対称的に、rAAV8ベクター注射マウスの場合、腫瘍では低レベルの導入遺伝子発現しか起こらず、肝臓での発現の方が有意に高かった。これらの結果を確認するために、2組目の実験では、rAAV3ベクターおよびrAAV8ベクターを使って、ヒトHuh7腫瘍(n=4)を保持する雄NSGマウスに、 $1 \times 10^{11}$ vg/マウスの量で直接腫瘍内注射し、ベクター注射の3日後に全身バイオルミネセンス像を得た。図36Cからわかるように、rAAV3ベクターを注射マウスでは高レベルの導入遺伝子発現が腫瘍に局在したのに対し、rAAV8ベクターを注射したマウスでは、腫瘍に加えて、肝臓にもかなりの導入遺伝子発現が検出された。このように、rAAV8ベクターとは対称的に、rAAV3ベクターはこの実験モデルではインビボでヒト肝腫瘍指向性を有する。

【0296】

予備実験では、導入遺伝子発現の減縮も、ベクター投与の5日後に腫瘍において認めら

10

20

30

40

50

れた。これはHCC腫瘍の迅速な成長による。そこで、これらの結果をさらに確認するために、次の一組の実験では、低用量 ( $L = 1 \times 10^{11}$  vg/マウス) および高用量 ( $H = 1 \times 10^{12}$  vg/マウス) でのrAAV3ベクターおよびrAAV8ベクターの直接腫瘍内注射を行った。3日目と7日目の両日に得た全身バイオルミネセンスイメージングデータを図36Dに示す。rAAV3ベクター注射マウスでは、高用量でさえ、肝臓における異所性発現がごくわずかであるのに対し、rAAV8ベクターの腫瘍内注射は、用量依存的かつ時間依存的に、肝臓における強い導入遺伝子発現をもたらすことが明白であった。ベクター注射後の7日目に、マウスを殺し、肝臓組織試料中に残存しているウイルスゲノムコピー数を比較した。図36Eに示すこれらの結果は、多量のrAAV8ベクターゲノムが肝臓中に存在するのに対して、rAAV3ベクターゲノムの数はごくわずかであることを示し、以前の結果が確認された。これらの研究は、以前の結果 (Ling et al., 2010 ; Glushakova et al., 2009 ; Cheng et al., 2012 ; Ling et al., 2011) と共に、rAAV3ベクター媒介遺伝子治療をHCCに使用するための明確な論理的根拠になる。

【0297】

インビトロでのヒト肝がん細胞におけるrAAV3ベクター媒介導入遺伝子発現のさらなる増強は、ウイルスキャプシドの修飾によって達成することができる。rAAV3ベクターの形質導入効率をさらに強化するために、rAAV3キャプシドの部位指定変異誘発を行った。表面露出チロシン (Y) 残基のフェニルアラニン (F) 残基への変異誘発に加えて (Cheng et al., 2012)、表面露出セリン (S)、スレオニン (T)、およびリジン (K) 残基も、それぞれバリン (V) 残基およびグルタミン酸 (E) 残基またはアルギニン (R) 残基になるように変異誘発した。さまざまなAAV血清型間で保存されていて、rAAV2ベクターの形質導入効率を増強することが以前に示されている位置を優先した (Zhong et al., 2008 ; Markusic et al., 2010 ; Aslanidi et al., 2013 ; Aslanidi et al., 2012)。CBApが駆動する強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) レポーター遺伝子を保因する野生型 (WT) rAAV3ベクターと全ての変異体rAAV3ベクター (図40A) とを使用して、ヒトHCC細胞株Huh7におけるそれらの形質導入効率を、同一条件下で評価した。これらのデータを図41に要約する。2つのK変異体 (K528E ; K533E) の形質導入効率は10分の1未満に低減し、いくつかのY変異体およびT変異体 (Y272F ; Y444F ; T251V ; Y705+731F+T492V) の形質導入効率は2分の1未満に低減した。残りの変異体の形質導入効率は増加し、2倍超と10倍未満の間であった。次に、CBApが駆動するFLucレポーター遺伝子を保因する7つの最適変異体とWT rAAV3ベクターとを使って、同一条件下で、Huh7細胞への形質導入を行った。これらの結果 (図37Aに示すもの) は、WT rAAV3ベクターと比較して、Y705+731F変異体およびS663V+T492V+K533R変異体の形質導入効率が約10倍増加し、S663V+T492V変異体の形質導入効率が約15倍増加することを示した。観察されたこれらの変異体の形質導入効率の増加をさらに検証するために、CBApプロモーターが駆動するEGFPリポーター遺伝子を保因する3つの最適rAAV3ベクターを使って、同一条件下で、異なるヒトHCC細胞株HepG2への形質導入を行った。その結果 (図37Bに示すもの) により、WT rAAV3ベクターと比較して、S663V+T492V+K533R変異体およびY705+731F変異体の形質導入効率はそれぞれ約2倍および約3倍増加し、S663V+T492V変異体の形質導入効率は約5倍増加することが実証された。最適な変異体 (S633V+T492V) の形質導入効率を、さらに最近になって樹立されたヒト肝芽腫 (HB) 細胞株Hep293TTでも評価した (Cheng et al., 2012) (図37C)。このように、最適化rAAV3ベクターは、ヒト肝がんの潜在的遺伝子治療において有用であると判明しうる。

【0298】

rAAV3キャプシド上の特定アミノ酸の修飾はウイルス-細胞受容体相互作用を改変しない  
 ウイルス-受容体相互作用を担うウイルスキャプシドアミノ酸が不確かであることから、本発明者らは、WT rAAV3ベクターの受容体 (Rabinowitz et al., 2004) および補助受容体 (Ling et al., 2010) であると以前に同定された細胞ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) およびヒト肝細胞成長因子受容体 (hHGFR) が、本発明者らの最適化rAAV3ベクターによる形質導入に関与しているかどうかを調べた。以下の3組の研究を行った。

10

20

30

40

50

第1に、rAAV3-CBAp-EGFPベクターまたは2つの最適変異体ベクターによるHuh7細胞への形質導入を、低用量(100ng/mL)または高用量(100µg/mL)の可溶性ヘパリンの存在下で行った。これらの結果(図37Dに示すもの)は、Y705+731F変異体とS663V+T492V変異体がどちらもWT rAAV3ベクターと同じように働き、低用量のヘパリンがウイルスベクター媒介形質導入効率を強化するのに対して、高用量はそれを劇的に低減することを示した。第2に、5µg/mLのヒト肝細胞成長因子(hHGF)(これは、WT rAAV3ベクターの形質導入効率を有意に阻害することが以前に示されている(Ling et al., 2010))の存在下で、形質導入アッセイを行った。図37Eに示すこれらの結果により、WTウイルスベクターと変異体ウイルスベクターの形質導入効率はどちらも、有意に影響を受けることが実証された。そして第3に、WT rAAV3ベクターと2つの変異体 rAAV3ベクターを使って、内因性hHGFRの発現が検出できないレベルであるヒト乳がん細胞株T47D、およびhHGFR発現プラスミドが安定にトランスフェクトされたT47D細胞(T47D+hHGFR)への形質導入を行った。図37Fに示すこれらの結果は、WT rAAV3ベクターと変異体 rAAV3ベクターがどちらも、T47D+hHGFR細胞に親T47D細胞よりも効率よく(>5倍)形質導入することを示した。総合すると、これらのデータにより、最適化rAAV3ベクターもその形質導入にHSPGおよびhHGFRを受容体/補助受容体として利用することが確認された。

【0299】

rAAV3キャプシド上の特定アミノ酸の修飾は全身性投与後のインビボでのウイルス形質導入効率をさらに強化する。次に本発明者らはマウス異種移植片モデルにおいて2つの最適化rAAV3ベクターの形質導入効率をインビボで評価した。そのために、ヒトHuh7またはHep293TT腫瘍保持NSGマウスを使用し(n=4)、比較的 low 用量(5×10<sup>10</sup>vg/マウス)のrAAV3-Y705+731F-CBAp-FLucベクターまたはrAAV3-S663V+T492V-CBAp-FLucベクターを、尾静脈から送達した。ベクター注射の3日後に全身バイオルミネセンスイメージングを行った。図38Aに示す結果から、Huh7腫瘍とHep293TT腫瘍はどちらも効率よく最適化rAAV3ベクターの標的になること、およびどちらの腫瘍タイプにおける導入遺伝子発現も、rAAV3-Y705+731Fベクターとの比較で、rAAV3-S663V+T492Vベクターによって有意に強化されたこと(図38B)(これらは、インビボで、WT rAAV3ベクターより有意に高効率であることが以前に示されている(Cheng et al., 2012))は明らかであった。ベクター注射の3日後にマウスを殺し、肝臓および腫瘍組織を収穫した。全DNA試料を肝臓からも腫瘍組織からも単離し、qPCR分析にかけることでベクターゲノムコピー数を決定した。図38Cおよび図38Dに示すデータから、腫瘍におけるrAAV3-S663V+T492V変異体の残存ベクターゲノムがrAAV3-Y705+731F変異体の場合よりも有意に多いことは明白であった(図38C)。これはおそらく、より高効率な細胞内輸送および核進入によるものであり(Aslanidi et al., 2013)、FLuc導入遺伝子発現ともよく相関する(図38Aおよび図38B)。肝臓における2つのベクターの残存ベクターゲノムに有意差は観察されず、これは以前に報告された物に匹敵する(Zincarelli et al., 2008)。ただし、腫瘍と比較して肝臓にはほぼ5倍のベクターゲノムコピー数が存在するにもかかわらず、肝臓における導入遺伝子発現は、上記2つの最適化rAAV3ベクターのどちらでもほとんど検出されなかったことは、注目に値する。

【0300】

新規治療用遺伝子を発現する最適化rAAV3ベクターの全身性投与後のインビボでのヒト乳がん異種移植片モデルにおける腫瘍形成の抑制。ここまで述べた研究は全て、治療的価値のないレポーター遺伝子を使って行われた。そこで、十分に確立されたいくつかのアポトーシス促進および「自殺」遺伝子の使用が考えられたものの、伝統的漢方薬草キカラスウリ(Trichosanthes kirilowii)から単離されたりボソーム不活化タンパク質トリコサンチン(TCS)をコードする新しく同定された治療用遺伝子に努力を集中させた(Sha et al., 2013)。TCS遺伝子のヌクレオチド配列は20年以上前に決定されたが(Shaw et al., 1994)、TCSをコードする遺伝子の細胞への送達が行われたことは一度もなかった。AFPpの制御下にあるTCS遺伝子発現カセットを合成した(図40Aに詳述)。このTCS遺伝子発現カセットの細胞内発現はヒトHCC細胞株の成長をインビトロで有意に阻害した。

10

20

30

40

50



【 0 3 0 1 】

【 化 1 】

ATGATCAGATTCTTAGTCCTCTCTTTGCTAATTCTCACCCCTCTTCCTAACAACTCCTGCTGTGGAGGGGOGATGTT  
 AGCTTCGGTTTATCAGGTGCAACAAGCAGTTCCATATGGAGTTTTTCATTTCAAATCTGAGAAAAGCTCTTCCAAAT  
 GAAAGGAAACTGTACGATATCCCTCTGTTACGTTCCCTCTCTTCCAGGTTCTCAACGCTACGCATTGATCCATCTC  
 ACAAATTACGCCGATGAAACCATTTTCAGTGGCCATAGACGTAACGAAACGCTCTATATTATGGGATATCGCGCTGGC  
 GATACATCCTATTTTTTCAACGAGGCTTCTGCAACAGAAGCTGCAAAAATATGTATTCAAAGACGCTATGCGAAAA  
 GTTACGCTTCCATATTCTGGCAATTACGAAAGGCTTCAAACGCTGCGAGGCAAAAATAAGGGAAAAATATTCCGCTT  
 GGACTCCCTGCTTTGGACAGTGCCATTACCACTTTGTTTTACTACAACGCCAATTCTGCTGCGTCGGCACTTATG  
 GTACTCATTCAGTCGACGCTCTGAGGCTGCGAGGTATAAAATTTATTGAGCAACAAATTTGGGAAGCGTGTGACAAA  
 ACCTTCCFACCAAGTTTAGCAATTATAAGTTTGGAAAATAGTTGGTCTGCTCTCTCCAAGCAAATTCAGATAGCG  
 AGTACTAATAATGGACAGTTTGAAGTCCCTGTTGTGCTTATAAATGCTCAAAAACCAACGAGTCACGATAACCAAT  
 GTTGATGCTGGAGTTGTAACCTCCAACATCGCGTTGCTGCTGAATAGAAAACAATATGGCAGCCATGGATGACGAT  
 GTTCTATGACACAGAGCTTTGGATGTGGAAGTTATGCTATTTAG

10

( 配列番号 26 )

【 0 3 0 2 】

【 化 2 】

GAATTCATGATCAGATTCTTAGTCCTCTCTTTGCTAATTCTCACCCCTCTTCCTAACAACTCCTGCTGTGGAGGGC  
 GATGTTAGCTTCCGTTTATCAGGTGCAACAAGCAGTTCCATATGGAGTTTTTCATTTCAAATCTGAGAAAAGCTCTT  
 CCAAATGAAAGGAAACTGTACGATATCCCTCTGTTACGTTCCCTCTCTTCCAGGTTCTCAACGCTACGCATTGATC  
 CATCTCACAAATTAACCGGATGAAACCATTTTCAGTGGCCATAGACGTAACGAAACGCTCTATATTATGGGATATCGC  
 GCTGGCGATACATCCTATTTTTTCAACGAGGCTTCTGCAACAGAAGCTGCAAAAATATGTATTCAAAGACGCTATG  
 CGAAAAGTTACGCTTCCATATTCTGGCAATTACGAAAGGCTTCAAACGCTGCGAGGCAAAAATAAGGGAAAAATATT  
 CCGCTTGGACTCCCTGCTTTGGACAGTGCCATTACCACTTTGTTTTACTACAACGCCAATTCTGCTGCGTCGGCA  
 CTTATGGFACTCATTTCAGTCGACGCTCTGAGGCTGCGAGGTATAAAATTTAFTGAGCAACAAATTTGGGAAGCGTGT  
 GACAAAACCTTCTACCAAGTTTAGCAATTATAAGTTTGGAAAATAGTTGGTCTGCTCTCTCCAAGCAAATTCAG  
 ATAGCGAGFACTAATAATGGACAGTTTGAAGTCCCTGTTGTGCTTATAAATGCTCAAAAACCAACGAGTCACGATA  
 ACCAATGTTGATGCTGGAGTTGTAACCTCCAACATCGCGTTGCTGCTGAATAGAAAACAATATGGCAGCCATGGAT  
 GACGATGTTCTATGACACAGAGCTTTGGATGCTGGAAGTTATGCTATTTCTGAGGACTACAAGGATGACGATGAC  
 AAGGATTACAAAGACGACGATGATAAGGACTATAAGGATGATGACGACAAATAA

20

30

( 配列番号 27 )

【 0 3 0 3 】

次に、この新規治療用遺伝子を保因するrAAV3-S663V+T492変異体ベクターを作製した。加えて、腫瘍が触知可能になる前に早い時点で処置を開始することができるように、CBAPプロモーターの制御下にあるFLuc遺伝子が安定にトランスフェクトされている遺伝子改変ヒトHCC細胞株Huh7-FLucも作製した。これにより、全身バイオルミネセンスイメージングによって腫瘍成長をモニタリングすることも可能になった。NSGマウス (n = 10) の腹側、肩甲骨の間に、 $5 \times 10^6$ 個のHuh7-FLuc細胞を皮下注射した。異種移植の4週間後にマウスを2群に分割し、第1群には尾静脈から $5 \times 10^{10}$ vgのrAAV3-S663V+T492V-AFPp-TCSベクターを注射した(0日目)。第2のマウス群には、適当な対照として役立つように、 $5 \times 10^{10}$ vgのrAAV3-S663V+T492V-AFPp-EGFPベクターを注射した。ベクター投与後の0日目、3日目、8日目、および11日目に、マウスの全身バイオルミネセンスイメージングを行った。図39Aに示すこれらの結果は、rAAV3-S663V+T492V-AFPp-EGFPベクターを注射したマウスではHuh7-FLuc腫瘍が漸進的に成長したのに対して、rAA

40

50

V3-S663V+T492V-AFPp-TCSベクターを注射したマウスにおける腫瘍成長は11日目まで有意に阻害され ( $p < 0.05$ )、最大成長阻害は8日目であった ( $p < 0.01$ ) ことを証明している。ベクター投与後の8日目に行ったマウスの全身バイオルミネセンス像を図39Bに示す。さらにまた、11日目には、全てのマウスを 殺し、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) およびアラニントランスアミナーゼ (ALT) の血清中レベルを決定した。TCS処置群と対照群の間に有意差は観察されなかったことから、マウスにおける肝臓傷害はほとんどないことが示唆される (図39C)。

#### 【0304】

##### 考察

上述のように、ヒトにおける固形腫瘍のなかで第5位であるHCCは、世界中で毎年約695,900例の死亡につながっている。HCCの早期診断を受けた患者は外科的介入および/または化学療法による介入の恩恵を受けうるが、疾患の再燃は頻繁に起こり、処置の失敗率は高い。進行HCCと診断された患者の場合、選択肢はほとんど対症療法に限られる。米国食品医薬品局 (FDA) は進行HCC患者におけるソラフェニブの使用を承認したが、生存期間中央値は約3ヶ月しか増加しない。したがって、HCCのための新規な治療選択肢の開発が強く必要とされていることは明白であり、遺伝子治療と伝統的漢方薬 (TCM) との組合せは有望な選択肢である。TCM医薬品は、主要な補完的代替薬物療法として、既に中国ではHCCによく使用される処置になっている (Zhai et al., 2013)。最近、TCM薬草から抽出された生物活性単量体化合物が、rAAVベクターによって媒介される治療効率を有意に強化する能力を有することが報告された (Zhang et al., 2010; Mitchell et al., 2013; Wang et al., 2014; Ling et al., 2014)。ここでは、遺伝子治療をTCM投与と組み合わせる新規戦略であって、薬草から単離された治療用自殺遺伝子をrAAVベクターによってインビボの悪性細胞に全身性に送達する戦略を開発した。

#### 【0305】

HCCの組換えAAVベクター媒介遺伝子治療は過去にも試みられている。例えば従来的一本鎖 (ss) rAAV2ベクターを使ってインビボのHCCを標的にすることが報告されているが (Su et al., 2000)、これらのベクターの形質導入効率は低かった。その後の研究では (Peng et al., 2000)、2mmより大きい腫瘍には、全身性投与後に形質導入が観察されなかった。さらに最近の研究では、マウス内因性HCC腫瘍モデルにおける特異的miRNA-26AおよびmiRNA-122の送達を媒介するためにrAAV8ベクターを使用すると、腫瘍成長の阻害がもたらされることが示された (Kota et al., 2009; Hsu et al., 2012)。しかし、rAAV8ベクターは、マウスモデル (Zincarelli et al., 2008; Gao et al., 2002; Wang et al., 2005) および非ヒト霊長類 (Nathwani, et al., 2006; Nathwani et al., 2007) において肝臓以外の正常組織に対する幅広い指向性を有する。この実施例では、インビトロでのヒト肝がん細胞に対するrAAV3ベクターの注目に値する指向性を、インビボで異種移植片マウスモデル中のヒト肝腫瘍へのこれらのベクターの標的送達を達成するためにも活用できることを実証する。加えて、rAAV3キャプシド上の特定アミノ酸残基の部位指定変異誘発によって、rAAV3ベクターの形質導入効率をさらに増強することができる。さらにまた、新規治療用遺伝子を発現する最適化rAAV3ベクターは、マウス異種移植片モデルにおけるヒト肝腫瘍形成を抑制するためにも使用することができる。これらの研究が、腫瘍ターゲティングを立証するために十分に確立された腫瘍を使用し、意図的に低いベクター用量を使って行われたことは、強調されるべきである。したがって、高いベクター用量および/または腫瘍が十分に確立する前の早期の介入によって、より望ましい治療エンドポイントを達成することができる可能性は非常に高い。また、初代ヒト肝腫瘍異種移植片を使った、特に肝臓微小環境における追加研究が問題なく完了し、大動物モデルにおける安全性および効力が確認されるのを待つ間、rAAV3-S663V+T492Vベクターはヒト肝がんの潜在的遺伝子治療において有用であることが判明するかもしれないと、期待をもって推測することができる。

#### 【0306】

##### 参考文献

10

20

30

40

50

以下の参考文献は、本明細書に記載したものを補う例示的手法または他の詳細を提供する限りにおいて、引用により特に本明細書に組み込まれる。

【化 3】

- Abella, JV *et al.*, "Met/hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for E1rs phosphorylation," *Molec. Cell Biol.*, **25**:9632-9645 (2005).
- Akache, B *et al.*, "The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9," *J. Virol.*, **80**:9831-9836 (2006).
- Aldrich, WA *et al.*, "Enhanced transduction of mouse bone marrow-derived dendritic cells by repetitive infection with self-complementary adeno-associated virus 6 combined with immunostimulatory ligands," *Gene Ther.*, **13**(1):29-39 (2006).
- Andreakos, E *et al.*, "Activation of NF- $\kappa$ B by the intracellular expression of NF- $\kappa$ B-inducing kinase acts as a powerful vaccine adjuvant," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **103**(39):14459-14464 (2006).
- Aslanidi, G *et al.*, "An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **106**(13):5059-5064 (2009).
- Aslanidi, G *et al.*, "Ectopic expression of *wnt10b* decreases adiposity and improves glucose homeostasis in obese rats," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **293**(3):E726-E736 (2007).
- Aslanidi, GV *et al.*, "Optimization of the capsid of recombinant adeno-associated virus 2 (AAV2) vectors: the final threshold?" *PLoS One*, **8**:e59142 (2013).
- Aslanidi, GV *et al.*, "High-efficiency transduction of human monocyte-derived dendritic cells by capsid-modified recombinant AAV2 Vectors," *Vaccine*, **30**:3908-3917 (2012).
- Asokan, A *et al.*, "The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads," *Mol. Ther.*, **20**:699-708 (2012).
- Bainbridge, JW *et al.*, "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, **358**(21):2231-2239 (2008).
- Banchereau, J and Steinman, RM, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature*, **392**(6673):245-252 (1998).
- Beatty, GL and Vonderheide, RH, "Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines," *Exp. Rev. Vaccines*, **7**(7):881-887 (2008).
- Bleker, S *et al.*, "Impact of capsid conformation and Rep-capsid interactions on adeno-associated virus type 2 genome packaging," *J. Virol.*, **80**:810-820 (2006).
- Boislevy, F *et al.*, "Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF- $\alpha$ ," *Toxicology*, **206**(2):233-244 (2005).
- Boutin, S *et al.*, "Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors," *Hum. Gene Ther.*, **21**:704-712 (2010).
- Brantly, ML *et al.*, "Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AA1 gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **106**(38):16363-16368 (2009).
- Brown, BD and Lillierap, D, "Dangerous liaisons: the role of 'danger' signals in the immune response to gene therapy," *Blood*, **100**(4):1133-1140 (2002).
- Bruix, J *et al.*, "Management of hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, **42**:1208-1236 (2005).
- Cao, O *et al.*, "Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic *in vivo* gene transfer," *Blood*, **110**(4):1132-1140 (2007).
- Carrillo-Tripp, M *et al.*, "VIPERdb2: An enhanced and web API enabled relational database for structural virology," *Nucl. Acids Res.*, **37**:D436-D442 (2009).

10

20

30

40

50

## 【化4】

- Castanier, C *et al.*, "Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway," *EMBO Rep.*, **11(2)**:133-138 (2010).
- Chapuis, F *et al.*, "Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*," *Eur. J. Immunol.*, **27(2)**:431-441 (1997).
- Chen, TT *et al.*, "Establishment and characterization of a cancer cell line derived from an aggressive childhood liver tumor," *Ped. Blood Cancer*, **53**:1040-1047 (2009).
- Chen, WQ *et al.*, "Liver cancer incidence and mortality in China, 2009," *Chin. J. Cancer*, **32**:162-169 (2013).
- Cheng, B *et al.*, "Development of optimized AAV3 serotype vectors: mechanism of high-efficiency transduction of human liver cancer cells," *Gene Ther.*, **19(4)**:375-384 (2011). 10
- Chiorini, JA *et al.*, "Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5," *J. Virol.*, **73**:1309-1319 (1999).
- Chiorini, JA *et al.*, "Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles," *J. Virol.*, **71**:6823-6833 (1997).
- Cideciyan, AV "Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy," *Prog. Retin. Eye Res.*, **29**:398-427 (2010).
- Cideciyan, AV *et al.*, "Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **105(39)**:15112-15117 (2008).
- Cohn, EF *et al.*, "Efficient induction of immune tolerance to coagulation factor IX following direct intramuscular gene transfer," *J. Thromb. Haemost.*, **5(6)**:1227-1236 (2007). 20
- Cuzzocrea, S *et al.*, "Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation," *Br. J. Pharmacol.*, **135(2)**:496-510 (2002).
- Dai, Y and Siemann, DW, "BMS-777607, a small-molecule Met kinase inhibitor, suppresses hepatocyte growth factor-stimulated prostate cancer metastatic phenotype *in vitro*," *Molec. Cancer Therapeutics*, **9**:1554-1561 (2010).
- Davidoff, AM *et al.*, "Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway," *Blood*, **102**:480-488 (2003).
- Daya, S and Berns, KI, "Gene therapy using adeno-associated virus vectors," *Clin. Microbiol. Rev.*, **21(4)**:583-593 (2008).
- Deau, J *et al.*, "Role of cyclic AMP-dependent kinase response element-binding protein in recombinant adeno-associated virus-mediated transduction of heart muscle cells," *Hum. Gene Ther.*, **20(9)**:1005-1012 (2009). 30
- Dejardin, E, "The alternative NF- $\kappa$ B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development," *Biochem. Pharmacol.*, **72(9)**:1161-1179 (2006).
- den Brok, MH *et al.*, "Dendritic cells: tools and targets for antitumor vaccination," *Exp. Rev. Vaccines*, **4(5)**:699-710 (2005).
- Ding, W *et al.*, "Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors," *Gene Ther.*, **12**:873-880 (2005).
- DiPaolo, NC *et al.*, "Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response *in vivo*," *Immunity*, **31(1)**:110-121 (2009).
- DiPrimo, N *et al.*, "Surface loop dynamics in adeno-associated virus capsid assembly," *J. Virol.*, **82(11)**:5178-5189 (2008). 40

## 【化5】

- Dobrzynski, E *et al.*, "Induction of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell anergy and deletion by *in vivo* viral gene transfer," *Blood*, **104**(4):969-977 (2004).
- Douar, AM *et al.*, "Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation," *J. Virol.*, **75**:1824-1833 (2001).
- Duan, D *et al.*, "Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus," *J. Clin. Invest.*, **105**:1573-1587 (2000).
- Eisold, S *et al.*, "Induction of an antitumoral immune response by wild-type adeno-associated virus type 2 in an *in vivo* model of pancreatic carcinoma," *Pancreas*, **35**(1):63-72 (2007).
- El-Serag, HB, "Hepatocellular carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, **365**:1118-1127 (2011). 10
- Ennsley, P and Cowtan, K, "Coot: model-building tools for molecular graphics," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **60**:2126-2132 (2004).
- Ferrari, FK *et al.*, "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors," *J. Virol.*, **70**:3227-3234 (1996).
- Figdor, CG *et al.*, "Dendritic cell immunotherapy: mapping the way," *Nat. Med.*, **10**(5):475-480 (2004).
- Finn, JD *et al.*, "Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction," *Mol. Ther.*, **18**(1):135-142 (2010).
- Fisher, KJ *et al.*, "Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is Limited by leading-strand synthesis," *J. Virol.*, **70**:520-532 (1996).
- Flotte, TR *et al.*, "Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing  $\alpha$ 1-antitrypsin: interim results," *Hum. Gene Ther.*, **22**:1239-1247 (2012). 20
- Gao, GP *et al.*, "Novel adeno-associated viruses from Rhesus monkeys as vectors for human gene therapy," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, **99**:11854-11859 (2002).
- Gao, GP *et al.*, "Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, **100**(10):6081-6086 (2003).
- Gao, GP *et al.*, "Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues," *J. Virol.*, **78**:6381-6388 (2004).
- Gilmore, TD, "Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives," *Oncogene*, **25**(51):6680-6684 (2006).
- Girod, A *et al.*, "Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2," *Nature Med.*, **5**(12):1438 (1999). 30
- Glushakova, LG *et al.*, "AAV3-mediated transfer and expression of the pyruvate dehydrogenase E1  $\alpha$  subunit gene causes metabolic remodeling and apoptosis of human liver cancer cells," *Molec. Genet. Metabol.*, **98**:289-299 (2009).
- Gotoh, A and Ohyashiki, K, "Role of bortezomib in the treatment of multiple myeloma," *Nippon Rinsho*, **65**(12):2309-2314 (2007).
- Gourzi, P *et al.*, "Viral induction of AID is independent of the interferon and the Toll-like receptor signaling pathways but requires NF- $\kappa$ B," *J. Exp. Med.*, **204**(2):259-265 (2007).
- Govindasamy, L *et al.*, "Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4," *J. Virol.*, **80**:11556-11570 (2006).
- Gray, SJ *et al.*, "Directed evolution of a novel adeno-associated virus (AAV) vector that crosses the seizure-compromised blood-brain barrier (BBB)," *Mol. Ther.*, **18**(3):570-578 (2010). 40

## 【化6】

- Guo, F *et al.*, "Lack of nuclear factor- $\kappa$ B2/p100 causes a RelB-dependent block in early B lymphopoiesis," *Blood*, **112**(3):551-559 (2008).
- Habib, AA *et al.*, "The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-inducing kinase to activate NF- $\kappa$ B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome," *J. Biol. Chem.*, **276**(12):8865-8874 (2001).
- Hansen, J *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts," *J. Virol.*, **75**:4080-4090 (2001).
- Hansen, J *et al.*, "Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts," *J. Virol.*, **74**:992-996 (2000). 10
- Harbison, CE *et al.*, "The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus," *Trends Microbiol.*, **16**:208-214 (2008).
- Harley, CB, "Telomerase and cancer therapeutics," *Nat. Rev. Cancer*, **8**(3):167-179 (2008).
- Hayden, MS and Ghosh, S, "Signaling to NF- $\kappa$ B," *Genes Develop.*, **18**(18):2195-2224 (2004).
- Heiser, A *et al.*, "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors," *J. Clin. Invest.*, **109**(3):409-417 (2002).
- High, KA and Aubourg, P, "rAAV human trial experience," *Methods Mol. Biol.*, **807**:429-457 (2011).
- Hiscott, J *et al.*, "Convergence of the NF- $\kappa$ B and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis," *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1010**:237-248 (2003).
- Hiscott, J *et al.*, "Manipulation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway and the innate immune response by viruses," *Oncogene*, **25**(51):6844-6867 (2006). 20
- Hsu, SH *et al.*, "Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver," *J. Clin. Invest.*, **122**:2871-2883 (2012).
- Hwu, WL *et al.*, "Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency," *Sci. Transl. Med.*, **4**:134ra161 (2012).
- Jayandharan, GR *et al.*, "Activation of the NF- $\kappa$ B pathway by adeno-associated virus (AAV) vectors and its implications in immune response and gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **108**(9):3743-3748 (2011).
- Jemal, A *et al.*, "Global cancer statistics," *CA Cancer J. Clin.*, **61**:69-90 (2011).
- Jiang, H *et al.*, "Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy," *Blood*, **108**(10):3321-3328 (2006). 30
- Kashiwakura, Y *et al.*, "Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection," *J. Virol.*, **79**:609-614 (2005).
- Keen-Rhinehart, E *et al.*, "AAV-mediated leptin receptor installation improves energy balance and the reproductive status of obese female Koletsky rats," *Peptides*, **26**(12):2567-2578 (2005).
- Kohlbrenner, E *et al.*, "Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system," *Mol. Ther.*, **12**:1217-1225 (2005).
- Kota, J *et al.*, "Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model," *Cell*, **137**:1005-1017 (2009).
- Kube, DM and Srivastava, A, "Quantitative DNA slot blot analysis: inhibition of DNA binding to membranes by magnesium ions," *Nucl. Acids Res.*, **25**(16):3375-3376 (1997). 40

## 【化7】

- Kumar, N *et al.*, "NF- $\kappa$ B signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis," *J. Virol.*, **82(20)**:9880-9889 (2008).
- Levy, HC *et al.*, "Heparin binding induces conformational changes in adeno-associated virus serotype 2," *J. Struct. Biol.*, **165(3)**:146-156 (2009).
- Li, C *et al.*, "Cellular immune response to cryptic epitopes during therapeutic gene transfer," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106(26)**:10770-10774 (2009).
- Li, C *et al.*, "Single amino acid modification of adeno-associated virus capsid changes transduction and humoral immune profiles," *J. Virol.*, **86**:7752-7759 (2012).
- Li, Q and Verma, IM, "NF- $\kappa$ B regulation in the immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, **2(10)**:725-734 (2002).
- Lich, JD *et al.*, "Monarch-1 suppresses non-canonical NF-kappaB activation and p52-dependent chemokine expression in monocytes," *J. Immunol.*, **178(3)**:1256-1260 (2007).
- Lind, EF *et al.*, "Dendritic cells require the NF- $\kappa$ B2 pathway for cross-presentation of soluble antigens," *J. Immunol.*, **181(1)**:354-363 (2008).
- Ling, C *et al.*, "High-efficiency transduction of liver cancer cells by recombinant adeno-associated virus serotype 3 vectors," *J. Vis. Exp.*, **49**:Pii:2538, doi: 10.3791/2538 (2011).
- Ling, C *et al.*, "Human hepatocyte growth factor receptor is a cellular co-receptor for AAV3," *Hum. Gene Ther.*, **21**:1741-1747 (2010).
- Ling, CQ *et al.*, "The roles of traditional Chinese medicine in gene therapy," *J. Integr. Med.*, **12**:67-75 (2014).
- Ling, CQ *et al.*, "Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene on hepatocellular carcinoma," *Ann. Oncol.*, **16**:109-115 (2005).
- Lisowski, L *et al.*, "Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model," *Nature*, **506**:382-386 (2014).
- Liu, MA, "Immunologic basis of vaccine vectors," *Immunity*, **33(4)**:504-515 (2010).
- Liu, S *et al.*, "Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway," *Hepatology (Baltimore, MD)*, **47**:1964-1973 (2008).
- Liu, X *et al.*, "Targeting the e-MET signaling pathway for cancer therapy," *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **17**:997-1011 (2008).
- Liu, YL *et al.*, "Optimized production of high-titer recombinant adeno-associated virus in roller bottles," *Biotechniques*, **34(1)**:184-189 (2003).
- Lizundia, R *et al.*, "Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex," *Innate Immun.*, **14(4)**:223-231 (2008).
- Llovet, JM *et al.*, "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, **359**:378-390 (2008).
- Loehrie, MA *et al.*, "Mutations on the external surfaces of adeno-associated virus type 2 capsids that affect transduction and neutralization," *J. Virol.*, **80(2)**:821-834 (2006).
- LoDuca, PA *et al.*, "Hepatic gene transfer as a means of tolerance induction to transgene products," *Curr. Gene Ther.*, **9(2)**:104-114 (2009).
- Loiarro, M *et al.*, "Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- $\kappa$ B," *J. Biol. Chem.*, **280(16)**:15809-15814 (2005).
- Ma, H *et al.*, "Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice," *Hepatology (Baltimore, MD)*, **42**:1355-1363 (2005).

10

20

30

40

50

## 【化 8】

- Madsen, D *et al.*, "AAV-2 induces cell mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1," *J. Gen. Virol.*, **90(11)**:2622-2633 (2009).
- Maguire, AM *et al.*, "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, **358(21)**:2240-2248 (2008).
- Mah, C *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression," *J. Virol.*, **72**:9835-9843 (1998).
- Mahadevan, M *et al.*, "Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus," *Cancer Immunol. Immunother.*, **56(10)**:1615-1624 (2007).
- Malecki, M *et al.*, "Recombinant adeno-associated virus derived vectors (rAAV2) efficiently transduce ovarian and hepatocellular carcinoma cells--implications for cancer gene therapy," *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **66**:93-99 (2009).
- Manno, CS *et al.*, "Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response," *Nat. Med.*, **12(3)**:342-347 (2006).
- Markakis, EA *et al.*, "Comparative transduction efficiency of AAV vector serotypes 1-6 in the substantia nigra and striatum of the primate brain," *Mol. Ther.*, **18**:588-593 (2010).
- Markusic, DM *et al.*, "High-efficiency transduction and correction of murine hemophilia B using AAV2 vectors devoid of multiple surface-exposed tyrosines," *Mol. Ther.*, **18(12)**:2048-2056 (2010).
- Marshall, B "Gene therapy. Viral vectors still pack surprises," *Science*, **294**:1640 (2001).
- Martin, E *et al.*, "Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10," *Immunity*, **18(1)**:155-167 (2003).
- Mattis, AE *et al.*, "Analyzing cytotoxic T lymphocyte activity: a simple and reliable flow cytometry-based assay," *J. Immunol. Methods*, **204(2)**:135-142 (1997).
- Mays, LE *et al.*, "Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins," *J. Immunol.*, **182(10)**:6051-6060 (2009).
- McCarty, DM *et al.*, "Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors," *Annu. Rev. Genet.*, **38**:819-845 (2004).
- McCarty, DM *et al.*, "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*," *Gene Ther.*, **10**:2112-2118 (2003).
- Melchiorri, D *et al.*, "Regulatory evaluation of Glybera in Europe - two committees, one mission," *Nat. Rev. Drug Discov.*, **12**:719 (2013).
- Mendell, JR *et al.*, "Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy," *N. Engl. J. Med.*, **363**:1429-1437 (2010).
- Mendell, JR *et al.*, "Gene therapy for muscular dystrophy: lessons learned and path forward," *Neurosci. Lett.*, **12**:341-355 (2012).
- Mineva, ND *et al.*, "CD40 ligand-mediated activation of the *de novo* RelB NF- $\kappa$ B synthesis pathway in transformed B cells promotes rescue from apoptosis," *J. Biol. Chem.*, **282(24)**:17475-17485 (2007).
- Mingozzi, F and High, KA, "Immune responses to AAV in clinical trials," *Curr. Gene Ther.*, **7(5)**:316-324 (2007).
- Mingozzi, F and High, KA, "Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges," *Nat. Rev. Genet.*, **12**:341-355 (2011).

10

20

30

40

50



## 【化9】

- Mingozzi, F *et al.*, "CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans," *Nat. Med.*, **13(4)**:419-422 (2007).
- Mitchell, AM *et al.*, "Arsenic trioxide stabilizes accumulations of adeno-associated virus virions at the perinuclear region, increasing transduction *in vitro* and *in vivo*," *J. Virol.*, **87**:4571-4583 (2013).
- Mueller, C and Flotte, TR, "Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors," *Gene Ther.*, **15(11)**:858-863 (2008).
- Muramatsu, S *et al.*, "Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3," *Virology*, **221**:208-217 (1996).
- Muruve, DA *et al.*, "The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response," *Nature*, **452(7183)**:103-107 (2008). 10
- Muzyczka, N and Warrington, KH, "Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism," *Hum. Gene Ther.*, **16**:408-416 (2005).
- Muzyczka, N, "Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**:97-129 (1992).
- Nakabayashi, H *et al.*, "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium," *Cancer Res.*, **42**:3858-3863 (1982).
- Nakahara, T *et al.*, "Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement," *J. Dermatol. Sci.*, **42(1)**:1-11 (2006).
- Nakahara, T *et al.*, "Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells," *Int. Immunol.*, **16(12)**:1701-1709 (2004). 20
- Nam, HJ *et al.*, "Structural studies of adeno-associated virus serotype 8 capsid transitions associated with endosomal trafficking," *J. Virol.*, **85**:11791-11799 (2011).
- Nathwani, AC *et al.*, "Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B," *N. Engl. J. Med.*, **365**:2357-2365 (2011).
- Nathwani, AC *et al.*, "Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates," *Blood*, **109**:1414-1421 (2007).
- Nathwani, AC *et al.*, "Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver," *Blood*, **107(7)**:2653-2661 (2006). 30
- Naumer, M *et al.*, "Properties of the adeno-associated virus assembly-activating protein," *J. Virol.*, **86**:13038-13048 (2012).
- Nguyen, L *et al.*, "Association of the multisubstrate docking protein gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356," *J. Biol. Chem.*, **272**:20811-20819 (1997).
- Niemeyer, GP *et al.*, "Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy," *Blood*, **113(4)**:797-806 (2009).
- Nonnenmacher, M and Weber, T, "Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors," *Gene Ther.*, **19**:649-658 (2012).
- Okumura, A *et al.*, "Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1," *J. Virol.*, **84(1)**:27-33 (2010). 40

## 【化 1 0】

- O'Neill, DW and Bhardwaj, N, "Exploiting dendritic cells for active immunotherapy of cancer and chronic infections," *Mol. Biotechnol.*, **36(2)**:131-141 (2007).
- Opie, SR *et al.*, "Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding," *J. Virol.*, **77**:6995-7006 (2003).
- Owen, RT *et al.*, "Gene therapy for pyruvate dehydrogenase E1alpha deficiency using recombinant adeno-associated virus 2 (rAAV2) vectors," *Mol. Ther.*, **6(3)**:394-399 (2002).
- Palomeque, J *et al.*, "Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium *in vivo*," *Gene Ther.*, **14**:989-997 (2007).
- Palucka, K *et al.*, "Recent developments in cancer vaccines," *J. Immunol.*, **186(3)**:1325-1331 (2011). 10
- Pearson, WR and Lipman, DJ, "Improved tools for biological sequence comparison," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **85(8)**:2444-2448 (1988).
- Peng, D *et al.*, "Transduction of hepatocellular carcinoma (HCC) using recombinant adeno-associated virus (rAAV): *in vitro* and *in vivo* effects of genotoxic agents," *J. Hepatol.*, **32**:975-985 (2000).
- Petrs-Silva, H *et al.*, "High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors," *Mol. Ther.*, **17**:463-471 (2009).
- Pierce, JW *et al.*, "Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*," *J. Biol. Chem.*, **272(34)**:21096-21103 (1997).
- Ponnazhagan, S *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of human monocyte-derived dendritic cells: implications for *ex vivo* immunotherapy," *J. Virol.*, **75(19)**:9493-9501 (2001). 20
- Qiao, C *et al.*, "AAV6 capsid tyrosine-to-phenylalanine mutations improve gene transfer to skeletal muscle," *Hum. Gene Ther.*, **21**:1343-1348 (2010).
- Qing, G *et al.*, "Stabilization of basally translated NF-kappaB-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of processing of NF-kB2 p100," *J. Biol. Chem.*, **280(49)**:40578-40582 (2005).
- Qing, K *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression," *J. Virol.*, **75**:8968-8976 (2001).
- Qing, K *et al.*, "Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2," *Nature Med.*, **5**:71-77 (1999).
- Qing, K *et al.*, "Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **94(20)**:10879-10884 (1997). 30
- Rabinowitz, JE *et al.*, "Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups," *J. Virol.*, **78**:4421-4432 (2004).
- Robert-Guroff, M, "Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18(6)**:546-556 (2007).
- Ross, CJ *et al.*, "Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation," *Hum. Gene Ther.*, **17(5)**:487-499 (2006).
- Rutledge, EA *et al.*, "Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2," *J. Virol.*, **72**:309-319 (1998).
- Santlioglu, S *et al.*, "Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by Rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation," *J. Virol.*, **74**:9184-9196 (2000). 40

## 【化 1 1】

- Scallan, CD *et al.*, "Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector," *Blood*, **102**(6):2031-2037 (2003).
- Schroeder, GM *et al.*, "Discovery of N-(4-(2-amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (BMS-777607), a selective and orally efficacious inhibitor of the Met kinase superfamily," *J. Med. Chem.*, **52**:1251-1254 (2009).
- Sha, O *et al.*, "Anti-tumor action of trichosanthin, a type 1 ribosome-inactivating protein, employed in traditional Chinese medicine: a mini review," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **71**:1387-1393 (2013).
- Shaw, PC *et al.*, "Minireview: trichosanthin-- a protein with multiple pharmacological properties," *Life Sci.*, **55**:253-262 (1994).
- Shin, O *et al.*, "Effective transduction by self-complementary adeno-associated viruses of human dendritic cells with no alteration of their natural characteristics," *J. Gene Med.*, **10**(7):762-769 (2008).
- Snyder, RO *et al.*, "Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors," *Nature Med.*, **5**(1):64-70 (1999).
- Song, S *et al.*, "Recombinant adeno-associated virus-mediated alpha-1 antitrypsin gene therapy prevents type I diabetes in NOD mice," *Gene Ther.*, **11**(2):181-186 (2004).
- Srivastava, A, "Adeno-associated virus-mediated gene transfer," *J. Cell. Biochem.*, **105**(1):17-24 (2008).
- Su, H *et al.*, "Adeno-associated viral-mediated gene transfer to hepatoma: thymidine kinase/interleukin 2 is more effective in tumor killing in non-ganciclovir (GCV)-treated than in GCV-treated animals," *Mol. Ther.*, **1**:509-515 (2000).
- Su, H *et al.*, "Selective killing of AFP-positive hepatocellular carcinoma cells by adeno-associated virus transfer of the Herpes simplex virus thymidine kinase gene," *Hum. Gene Ther.*, **7**:463-470 (1996).
- Summerford, C and Samulski, RJ, "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions," *J. Virol.*, **72**:1438-1445 (1998).
- Summerford, C *et al.*, "AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection," *Nature Med.*, **5**:78-82 (1999).
- Tacken, PJ *et al.*, "Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting," *Nat. Rev. Immunol.*, **7**(10):790-802 (2007).
- Tang, ZY, "Hepatocellular carcinoma surgery--review of the past and prospects for the 21st century," *J. Surg. Oncol.*, **91**:95-96 (2005).
- Taylor, J and Ussher, JE, "Optimized transduction of human monocyte-derived dendritic cells by recombinant adeno-associated virus serotype 6 (rAAV6)," *Hum. Gene Ther.*, **21**:1675-1686 (2010).
- Thomas, CB *et al.*, "Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors," *J. Virol.*, **78**:3110-3122 (2004).
- Thomas, MB, and Zhu, AX, "Hepatocellular carcinoma: the need for progress," *J. Clin. Oncol.*, **23**:2892-2899 (2005).
- Tse, LY *et al.*, "Adeno-associated virus-mediated expression of Kallistatin suppresses local and remote hepatocellular carcinomas," *J. Gene Med.*, **10**:508-517 (2008).
- van der Marel, S *et al.*, "Neutralizing antibodies against adeno-associated viruses in inflammatory bowel disease patients: implications for gene therapy," *Inflamm. Bowel Dis.*, **17**:2436-2442 (2011).
- Vandenberghe, LH and Wilson, JM "AAV as an immunogen," *Curr. Gene Ther.*, **7**(5):325-333 (2007).

10

20

30

40

50

## 【化 1 2】

- Vandenberghe, LH *et al.*, "Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy," *Gene Ther.*, **16(3)**:311-319 (2009).
- Veron, P *et al.*, "Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2," *J. Virol.*, **81(10)**:5385-5394 (2007).
- Verslype, C *et al.*, "The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2008," *Ann. Oncol.*, **20(Suppl 7)**:vii1-vii6 (2009).
- Wang, C *et al.*, "Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I $\kappa$ B $\alpha$  kinase-NF $\kappa$ B," *J. Biol. Chem.*, **284**:3804-3813 (2009). 10
- Wang, L *et al.*, "The pleiotropic effects of natural AAV infections on liver-directed gene transfer in macaques," *Mol. Ther.*, **18(1)**:126-134 (2010).
- Wang, LN *et al.*, "Pristimerin enhances recombinant adeno-associated virus vector-mediated transgene expression in human cell lines *in vitro* and murine hepatocytes *in vivo*," *J. Integr. Med.*, **12**:20-34 (2014).
- Wang, W and Malcolm, BA, "Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange site-directed mutagenesis," *Biotechniques*, **26(4)**:680-682 (1999).
- Wang, Y *et al.*, "Potent antitumor effect of TRAIL mediated by a novel adeno-associated viral vector targeting to telomerase activity for human hepatocellular carcinoma," *J. Gene Med.*, **10**:518-526 (2008). 20
- Wang, Y *et al.*, "The efficacy of combination therapy using adeno-associated virus-TRAIL targeting to telomerase activity and cisplatin in a mice model of hepatocellular carcinoma," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **136**:1827-1837 (2010).
- Wang, Z *et al.*, "Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart," *Nat. Biotechnol.*, **23**:321-328 (2005).
- Wang, Z *et al.*, "Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*," *Gene Ther.*, **10(26)**:2105-2111 (2003).
- Wu, J *et al.*, "Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of Rep proteins in vector purity," *Hum. Gene Ther.*, **18**:171-182 (2007).
- Wu, P *et al.*, "Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism," *J. Virol.*, **74(18)**: 8635-8647 (2000). 30
- Wu, Z *et al.*, "Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy," *Mol. Ther.*, **14(3)**:316-327 (2006).
- Wu, Z *et al.*, "Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes," *J. Virol.*, **80(22)**:11393-11397 (2006).
- Wu, ZH and Miyamoto, S, "Induction of a pro-apoptotic ATM-NF- $\kappa$ B pathway and its repression by ATR in response to replication stress," *EMBO J.*, **27**:1963-1973 (2008).
- Xiao, C and Rossmann, MG, "Interpretation of electron density with stereographic roadnap projections," *J. Struct. Biol.*, **158**:182-187 (2007).
- Xiao, W *et al.*, "Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2," *J. Virol.*, **76**:11505-11517 (2002). 40

## 【化 1 3】

- Xie, Q *et al.*, "The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **99(16)**:10405-10410 (2002).
- Yan, Z *et al.*, "Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid Proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors," *J. Virol.*, **76**:2043-2053 (2002).
- Yanagawa, Y and Onoe, K, "Distinct regulation of CD40-mediated interleukin-6 and interleukin-12 productions via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB-inducing kinase in mature dendritic cells," *Immunology*, **117(4)**:526-535 (2006).
- Yu, Y *et al.*, "rAAV/Her-2/neu loading of dendritic cells for a potent cellular-mediated MHC class I restricted immune response against ovarian cancer," *Viral Immunol.*, **21(4)**:435-442 (2008). 10
- Zaiss, AK and Muruve, DA, "Immune responses to adeno-associated virus vectors," *Curr. Gene Ther.*, **5(3)**:323-331 (2005).
- Zaiss, AK and Muruve, DA, "Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge," *Gene Ther.*, **15(11)**:808-816 (2008).
- Zaiss, AK *et al.*, "Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors," *J. Virol.*, **82(6)**:2727-2740 (2008).
- Zaiss, AK *et al.*, "Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors," *J. Virol.*, **76(9)**:4580-4590 (2002).
- Zhai, XF *et al.*, "Traditional herbal medicine in preventing recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma: a multicenter randomized controlled trial," *J. Integr. Med.*, **11**:90-100 (2013). 20
- Zhang, C *et al.*, "Effects of melittin on expressions of mitochondria membrane protein 7A6c cell apoptosis-related gene products Fas and Fas ligand in hepatocarcinoma cells," *J. Chinese Integrat. Med.*, **5**:559-563 (2007).
- Zhang, FL *et al.*, "Celastrol enhances AAV1-mediated gene expression in mice adipose tissues," *Gene Ther.*, **18**:128-134 (2010).
- Zhang, Y *et al.*, "AAV-mediated TRAIL gene expression driven by hTERT promoter suppressed human hepatocellular carcinoma growth in mice," *Life Sci.*, **82**:1154-1161 (2008).
- Zhao, W *et al.*, "Role of cellular FKBP52 protein in intracellular trafficking of recombinant adeno-associated virus 2 vectors," *Virology*, **353**:283-293 (2006).
- Zhong, L *et al.*, "A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis," *Mol. Ther.*, **15(7)**:1323-1330 (2007). 30
- Zhong, L *et al.*, "Heat-shock treatment-mediated increase in transduction by recombinant adeno-associated virus 2 vectors is independent of the cellular heat-shock protein 90," *J. Biol. Chem.*, **279**:12714-12723 (2004).
- Zhong, L *et al.*, "Impaired nuclear transport and uncoating limit recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transduction of primary murine hematopoietic cells," *Hum. Gene Ther.*, **15**:1207-1218 (2004).
- Zhong, L *et al.*, "Improved transduction of primary murine hepatocytes by recombinant adeno-associated virus 2 vectors *in vivo*," *Gene Ther.*, **11**:1165-1169 (2004).
- Zhong, L *et al.*, "Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **105(22)**:7827-7832 (2008). 40

## 【化14】

- Zhong, L *et al.*, "Single-polarity recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transgene expression *in vitro* and *in vivo*: mechanism of transduction," *Mol. Ther.*, **16**:290-295 (2008).
- Zhong, L *et al.*, "Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression," *Virology*, **381**:194-202 (2008).
- Zhu, J *et al.*, "The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice," *J. Clin. Invest.*, **119**(8):2388-2398 (2009).
- Zincarelli, C *et al.*, "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection," *Mol. Ther.*, **16**:1073-1080 (2008).
- Zincarelli, C *et al.*, "Comparative cardiac gene delivery of adeno-associated virus serotypes 1-9 reveals that AAV6 mediates the most efficient transduction in mouse heart," *Clin. Translat. Sci.*, **3**:81-89 (2008).
- Zolotukhin, S *et al.*, "Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors," *Methods*, **28**(2):158-167 (2002).

10

## 【0307】

本明細書に記載する実施例および実施形態は例示のために過ぎないこと、およびそれらに照らしてさまざまな変更または改変が当業者には示唆され、本願の本旨および趣旨ならびに本願請求項の範囲に含まれることを、理解すべきである。

20

## 【0308】

参考文献は、本明細書において言及した刊行物、特許出願および特許を含めて全て、各参考文献について引用により本明細書に組み込まれることを個別に明示した場合と同様に、また各参考文献をそのまま本明細書に記載した場合と同様に、特に引用によりそのまま本明細書に組み込まれる。

## 【0309】

本明細書における値の範囲の記載は、本明細書に別段の表示がある場合を除き、その範囲に含まれる個々の値について個別に言及することを簡略化した方法として機能することを意図しているに過ぎず、個々の値は、あたかもそれが本明細書において個別に記載されているかのように、本明細書に組み込まれる。

30

## 【0310】

本明細書に記載する方法は全て、本明細書において別段の表示がある場合または文脈上明らかに矛盾する場合を除き、任意の適切な順序で実施することができる。

## 【0311】

本明細書におけるありとあらゆる実施例または例示的表現（例えば「など」）の使用は、本発明をよりよく例示しようとするものに過ぎず、別段の表示がある場合を除き、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中の表現はいずれも、それが明示的に述べられている場合を除き、何らかの要素が本発明の実施に不可欠であることを示していると解釈してはならない。

## 【0312】

1つまたは複数の要素に関して「を含む」（comprising）、「を有する」（having）、「を包含する」（including）または「を含有する」（containing）などの用語を使ってなされる本明細書における本発明の任意の態様または実施形態の説明は、別段の明示がある場合を除き、または文脈上明らかに矛盾する場合を除き、その1つまたは複数の特定要素「からなる」、「から本質的になる」、または「を実質的に含む」本発明の類似態様または類似実施形態に裏付けを提供しようとするものである（例えば、ある特定要素を含むと本明細書において記載した組成物は、別段の明示がある場合を除き、または文脈上明らかに矛盾する場合を除き、その要素からなる組成物も記載していると理解すべきである）。

40

## 【0313】

50

本明細書に開示しクレームする組成物および方法は全て、本開示に照らせば、甚だしい実験を行わずに製造し実行することができる。本発明の組成物および方法を、好ましい実施形態に関して説明したが、本発明の概念、本旨および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載した組成物および方法ならびにステップまたはステップの順序に変更を加えることは、当業者には明らかであるだろう。より具体的に述べると、本明細書に記載した薬剤の代わりに化学的および/または生理学的に関連する一定の薬剤を使用して、同じ結果または類似する結果を達成しうることは明らかであるだろう。当業者にとって明白な上述の類似する代替物および変更は全て、本願請求項によって画定される本発明の本旨、範囲および概念内にあるとみなされる。

【図面】

【図 1】

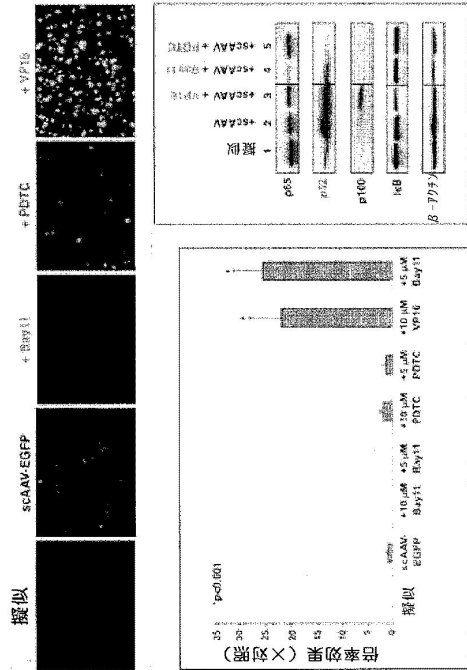


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

【図 2】

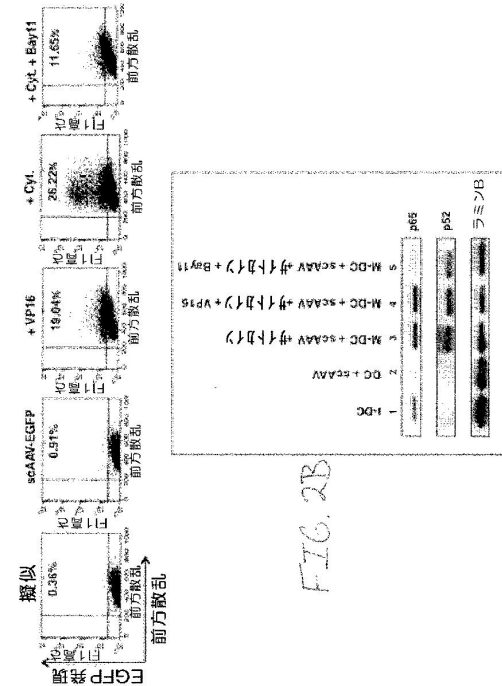


FIG. 2A

FIG. 2B

10

20

30

40

50





【 図 7 】

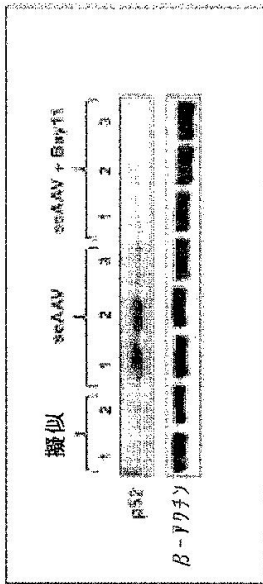


FIG. 7

【 図 9 】

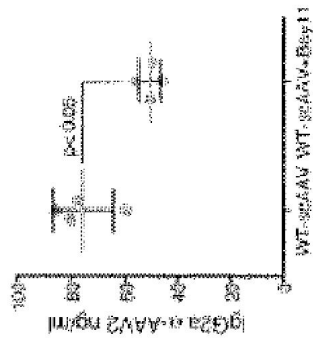
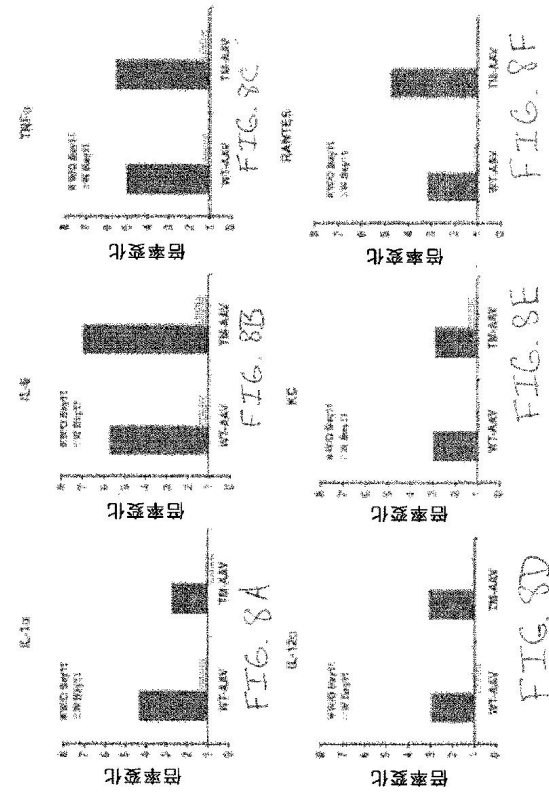
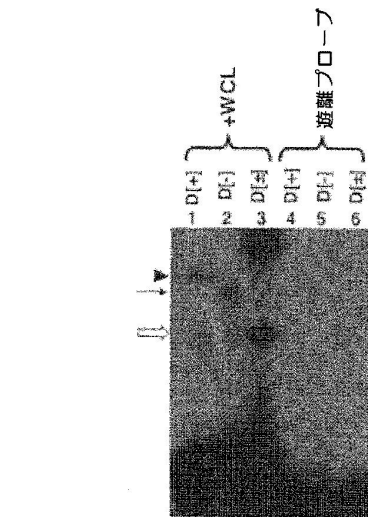


FIG. 9

【 図 8 】



【 図 10 】



- 鎖 配列
- ssD[-]: 5'-CTCCATCACTA GGGGT TCCT-3' (配列番号23)
  - dsD[+]: 5'-CTCCATCACTA GGGGT TCCT-3' (配列番号24)  
3'-GAGG TAAGT GATCCC AAGCA-5'
  - ssD[+]: 5'-GAGGTA GTGAT CCCAAGGA-3' (配列番号25)

FIG. 10

10

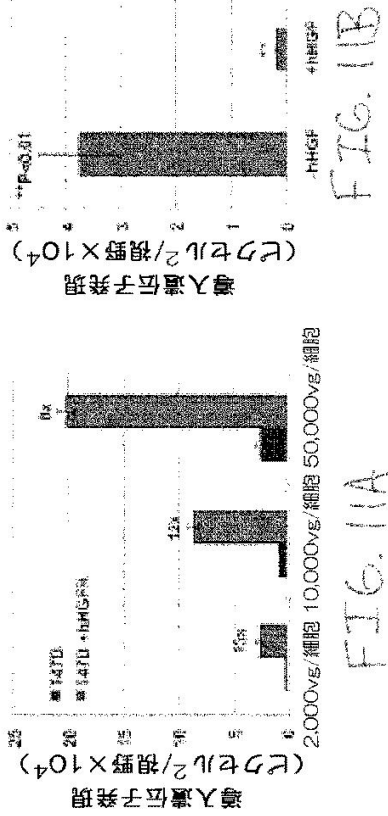
20

30

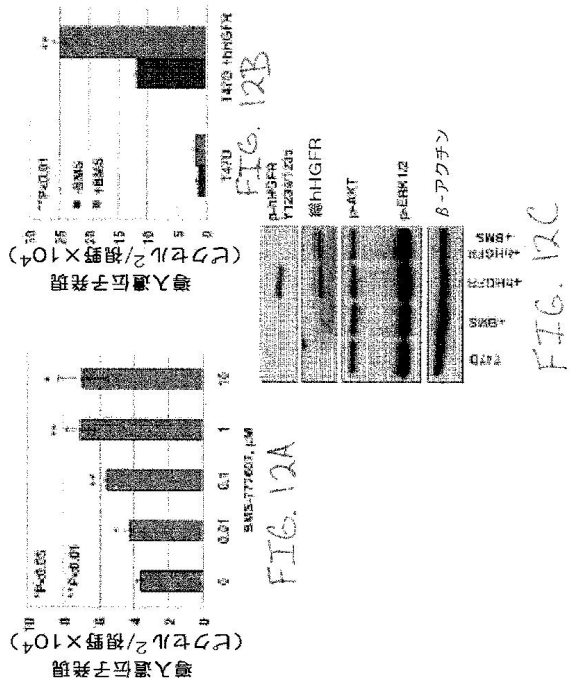
40

50

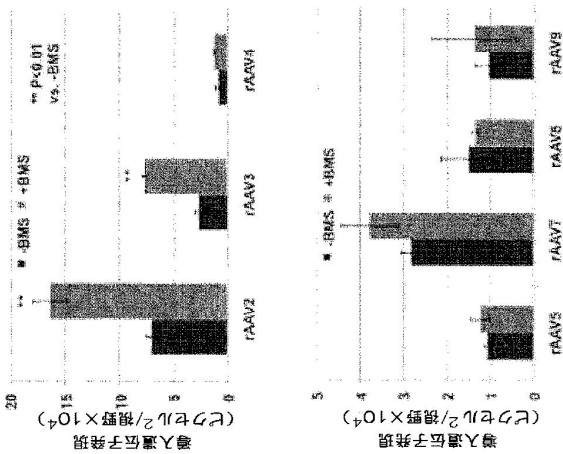
【図 1 1】



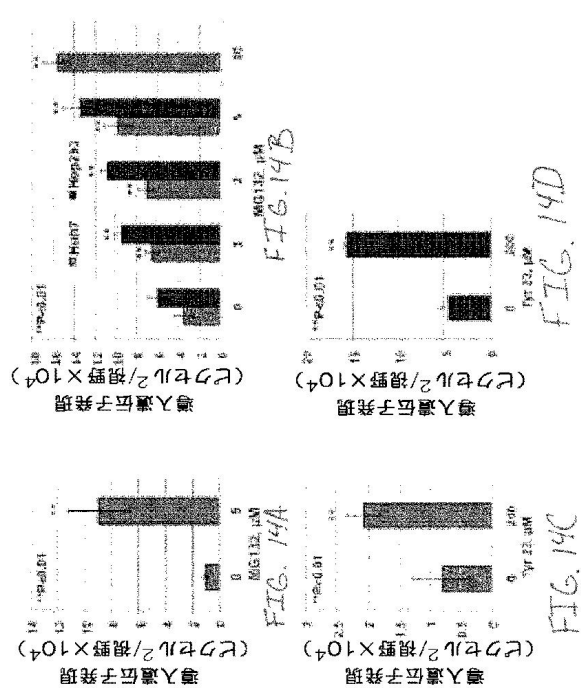
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

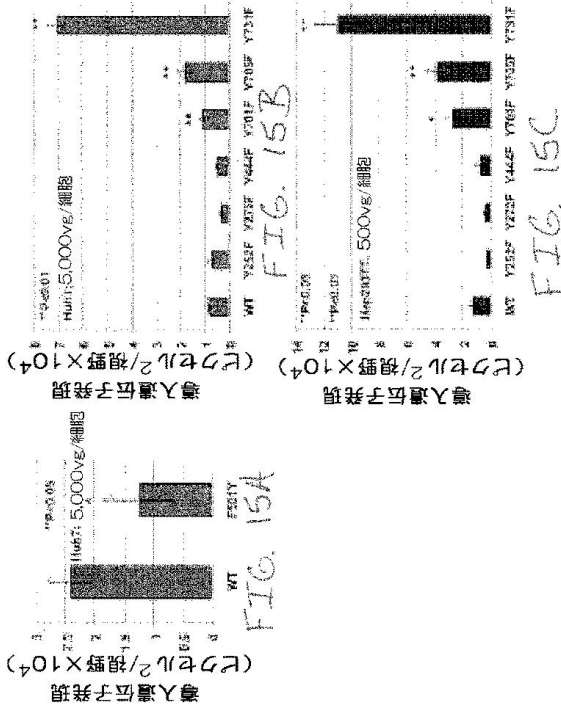
20

30

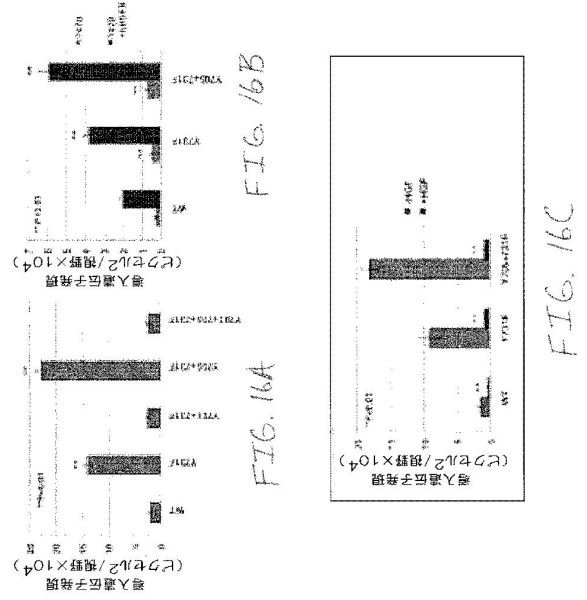
40

50

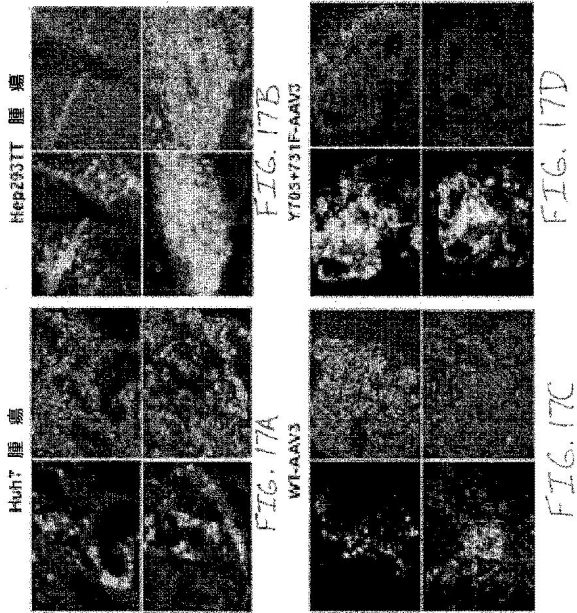
【 図 15 】



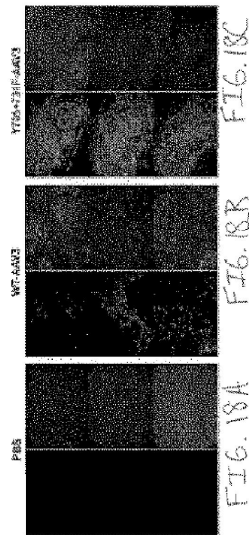
【 図 16 】



【 図 17 】



【 図 18 】



10

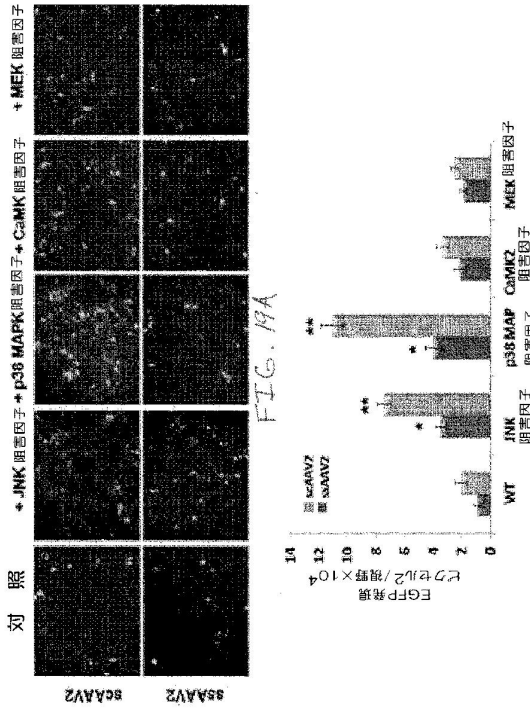
20

30

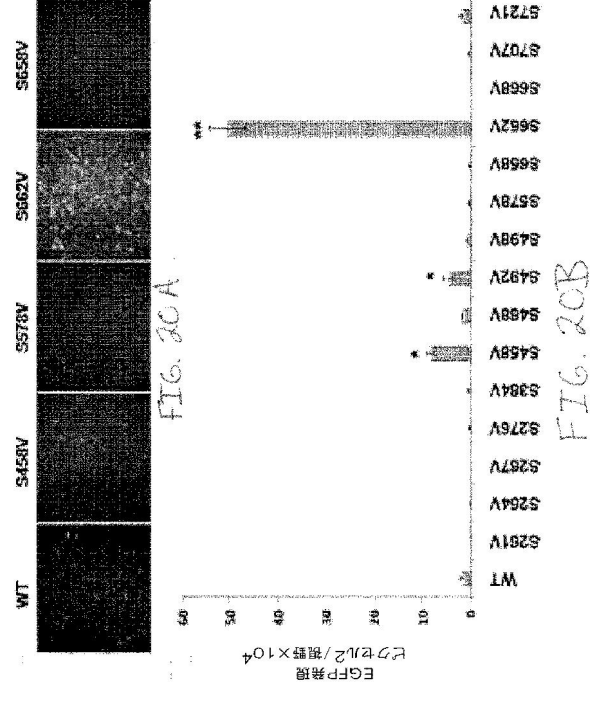
40

50

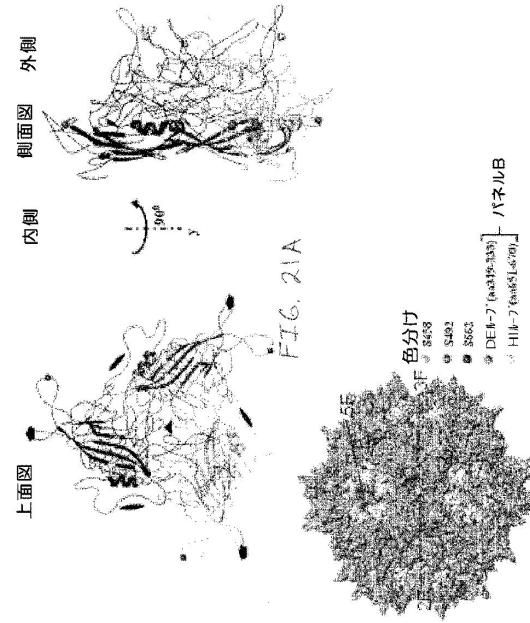
【 19 】



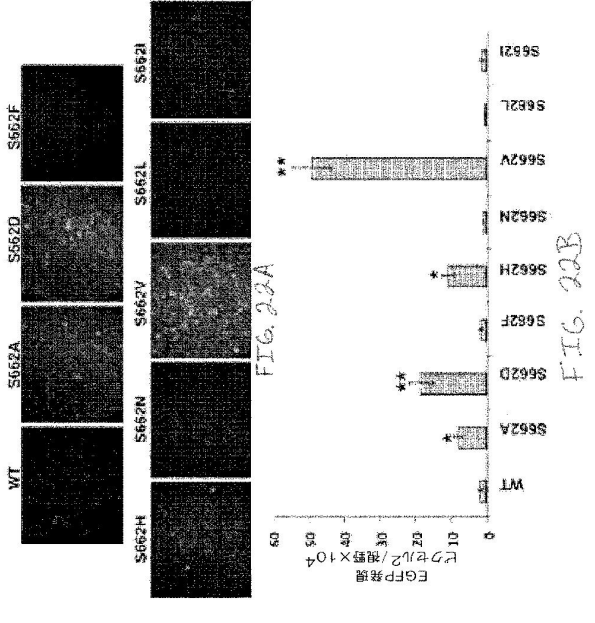
【 20 】



【 21 】



【 22 】



10

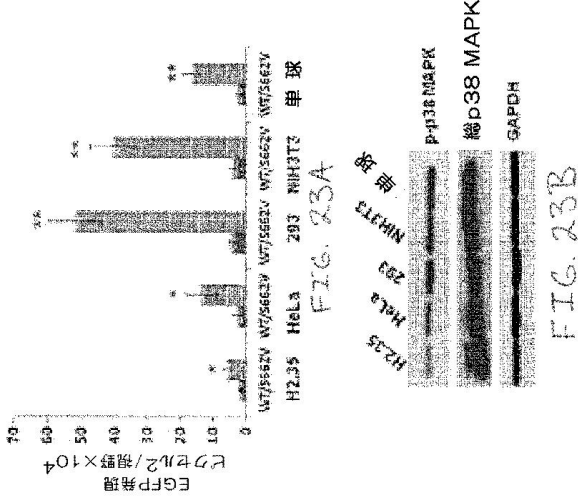
20

30

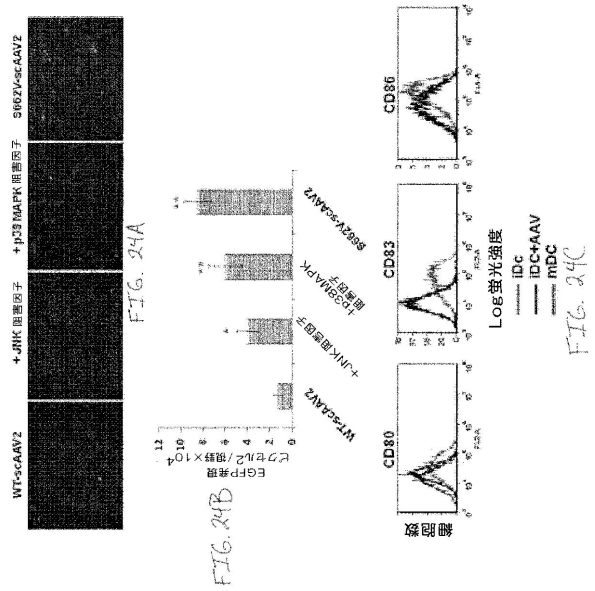
40

50

【 図 2 3 】

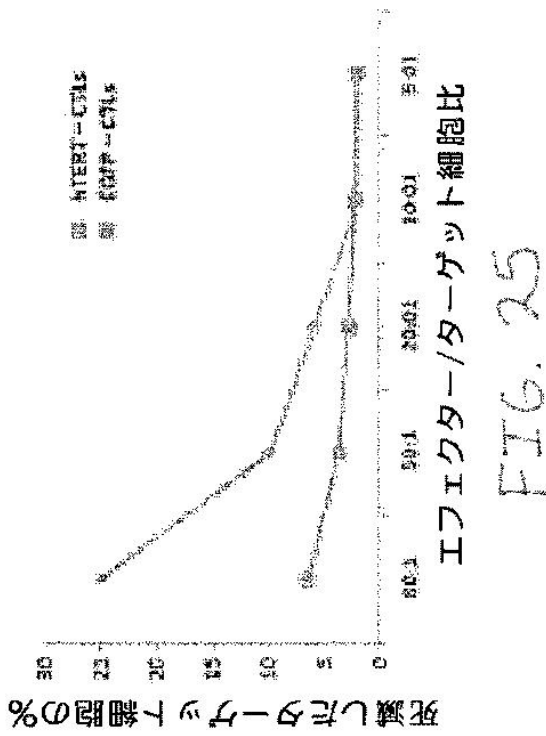


【 図 2 4 】

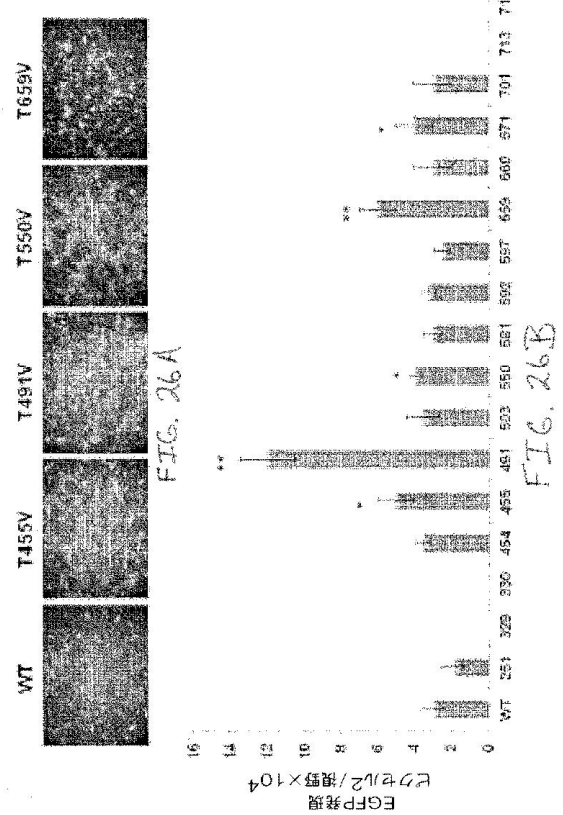


10

【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



20

30

40

50

【 27 】

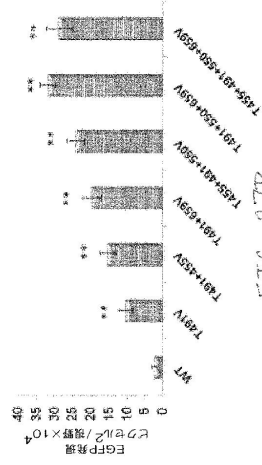
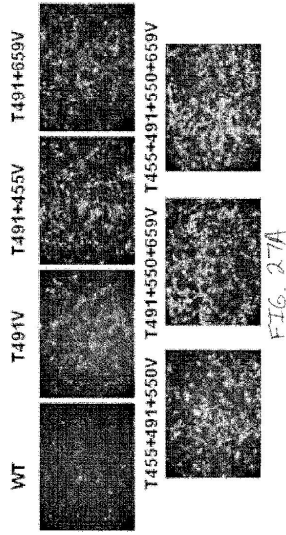


FIG. 27A

FIG. 27B

【 28 】

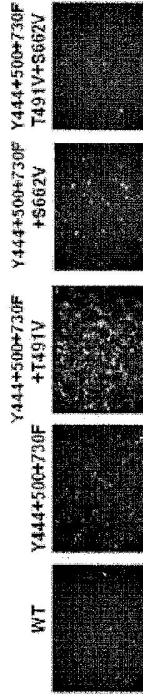


FIG. 28A

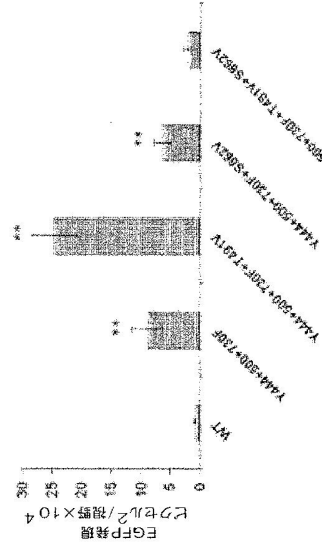


FIG. 28B

【 29 】

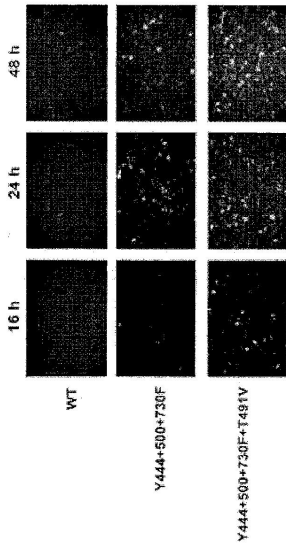


FIG. 29A

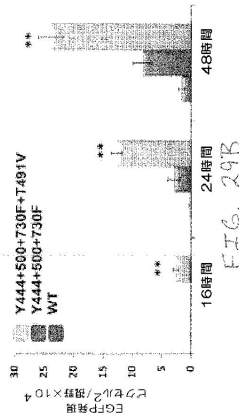


FIG. 29B

【 30 】

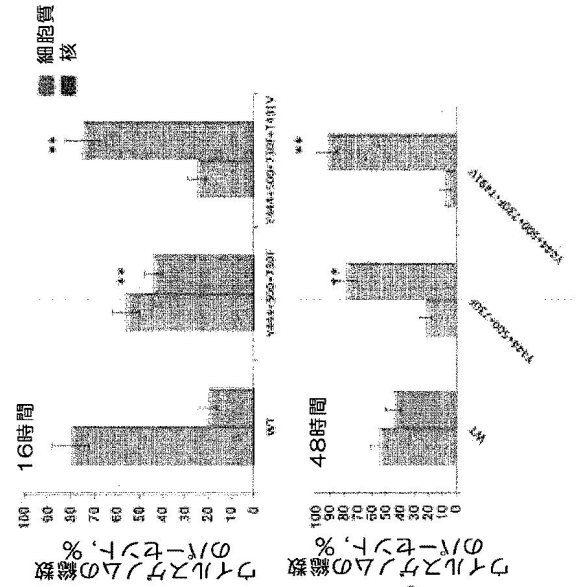


FIG. 30A

FIG. 30B

10

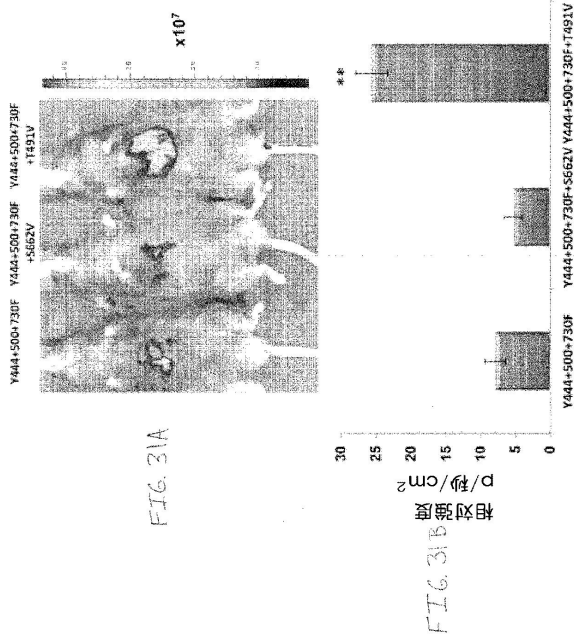
20

30

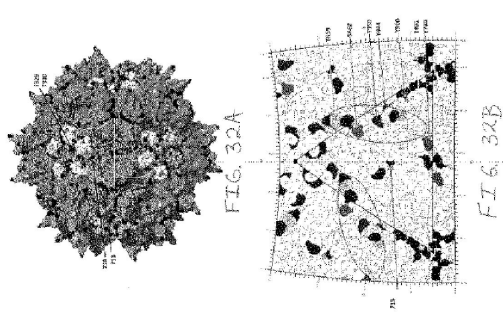
40

50

【 図 3 1 】



【 図 3 2 】



10

【 図 3 3 - 1 】

FIG. 33A  
AAV血清型キャプシドのアミノ酸アラインメント

AAV1 417 24	1	...	100
AAV2 417 24	(1)	...	
AAV3 417 24	(2)	...	
AAV4 417 24	(3)	...	
AAV5 417 24	(4)	...	
AAV6 417 24	(5)	...	
AAV7 417 24	(6)	...	
AAV8 417 24	(7)	...	
AAV9 417 24	(8)	...	
AAV10 417 24	(9)	...	
AAV11 417 24	(10)	...	
AAV12 417 24	(11)	...	
AAV13 417 24	(12)	...	
AAV14 417 24	(13)	...	
AAV15 417 24	(14)	...	
AAV16 417 24	(15)	...	
AAV17 24	(16)	...	
AAV18 417 24	(17)	...	
AAV19 417 24	(18)	...	
AAV20 417 24	(19)	...	
AAV21 417 24	(20)	...	
AAV22 417 24	(21)	...	
AAV23 417 24	(22)	...	
AAV24 417 24	(23)	...	
AAV25 417 24	(24)	...	
AAV26 417 24	(25)	...	
AAV27 24	(26)	...	
AAV28 417 24	(27)	...	
AAV29 417 24	(28)	...	
AAV30 417 24	(29)	...	
AAV31 417 24	(30)	...	
AAV32 417 24	(31)	...	
AAV33 417 24	(32)	...	
AAV34 417 24	(33)	...	
AAV35 417 24	(34)	...	
AAV36 417 24	(35)	...	
AAV37 24	(36)	...	
AAV38 417 24	(37)	...	
AAV39 417 24	(38)	...	
AAV40 417 24	(39)	...	
AAV41 417 24	(40)	...	
AAV42 417 24	(41)	...	
AAV43 417 24	(42)	...	
AAV44 417 24	(43)	...	
AAV45 417 24	(44)	...	
AAV46 417 24	(45)	...	
AAV47 24	(46)	...	
AAV48 417 24	(47)	...	
AAV49 417 24	(48)	...	
AAV50 417 24	(49)	...	
AAV51 417 24	(50)	...	
AAV52 417 24	(51)	...	
AAV53 417 24	(52)	...	
AAV54 417 24	(53)	...	
AAV55 417 24	(54)	...	
AAV56 417 24	(55)	...	
AAV57 24	(56)	...	
AAV58 417 24	(57)	...	
AAV59 417 24	(58)	...	
AAV60 417 24	(59)	...	
AAV61 417 24	(60)	...	

( 続 < )

【 図 3 3 - 2 】

FIG. 33A ( 続き )

AAV62 417 24	(61)	...	600
AAV63 417 24	(62)	...	
AAV64 417 24	(63)	...	
AAV65 417 24	(64)	...	
AAV66 417 24	(65)	...	
AAV67 417 24	(66)	...	
AAV68 417 24	(67)	...	
AAV69 417 24	(68)	...	
AAV70 417 24	(69)	...	
AAV71 417 24	(70)	...	
AAV72 417 24	(71)	...	
AAV73 417 24	(72)	...	
AAV74 417 24	(73)	...	
AAV75 417 24	(74)	...	
AAV76 417 24	(75)	...	
AAV77 417 24	(76)	...	
AAV78 417 24	(77)	...	
AAV79 417 24	(78)	...	
AAV80 417 24	(79)	...	
AAV81 417 24	(80)	...	
AAV82 417 24	(81)	...	
AAV83 417 24	(82)	...	
AAV84 417 24	(83)	...	
AAV85 417 24	(84)	...	
AAV86 417 24	(85)	...	
AAV87 417 24	(86)	...	
AAV88 417 24	(87)	...	
AAV89 417 24	(88)	...	
AAV90 417 24	(89)	...	
AAV91 417 24	(90)	...	
AAV92 417 24	(91)	...	
AAV93 417 24	(92)	...	
AAV94 417 24	(93)	...	
AAV95 417 24	(94)	...	
AAV96 417 24	(95)	...	
AAV97 417 24	(96)	...	
AAV98 417 24	(97)	...	
AAV99 417 24	(98)	...	
AAV100 417 24	(99)	...	
AAV101 417 24	(100)	...	

( 続 < )

30

40

50

FIG. 33B AAV血清型キャプシドのセリンおよびスレオニン残基アラインメント

Table with 3 columns: AAV ID (AAV1-AAV10), amino acid sequence (100-400), and alignment markers. Includes a legend for Serine (S) and Serine/Threonine (ST) positions.

FIG. 33C AAV血清型キャプシドのチロシン残基アラインメント

Table with 3 columns: AAV ID (AAV1-AAV10), amino acid sequence (100-400), and alignment markers. Includes a legend for Tyrosine (Y) positions.

(続く)

FIG. 33B (続き)

Continuation of FIG. 33B table with AAV IDs AAV1-AAV10 and amino acid sequences (400-800).

(続く)

FIG. 33C (続き)

Continuation of FIG. 33C table with AAV IDs AAV1-AAV10 and amino acid sequences (400-800).

(続く)

(続く)



【 図 3 4 】

変異体	パッケージング効率	形質導入効率
AAV2-S261V	約10分の1	—
AAV1-S261V	変化なし	—
AAV2-S261V	DNase-Ⅰ耐性粒子なし	—
AAV2-S276V	約10分の1	—
AAV1-S381V	約3倍	約10分の1
AAV2-S453V	約4倍	約4倍
AAV2-S453V	約5倍	変化なし
AAV2-S453V	変化なし	約2倍
AAV2-S453V	変化なし	約10分の1
AAV2-S453V	変化なし	約10分の1
AAV1-S652V	約10分の1	—
AAV2-S652V	変化なし	約20倍
AAV2-S652V	DNase-Ⅰ耐性粒子なし	—
AAV2-S667V	変化なし	約10分の1
AAV2-S721V	変化なし	変化なし

ベクターパッケージングアッセイおよびベクター感染カアッセイは、変異体AAVベクターのそれぞれについて少なくとも2回行った。パッケージング効率は定量PCR分析によって決定した。形質導入効率は1000vg/細胞のMOIで感染させたHEK293細胞の蛍光強度によって見積もった。  
\*試験したMOIでは蛍光が検出されなかった。

FIG. 34

【 図 3 5 】

変異体	パッケージング効率	形質導入効率
AAV2-S652V	変化なし	約20倍
AAV1-S652V	約5倍	約3倍
AAV2-S652D	変化なし	約8倍
AAV2-S652E	約10分の1	変化なし
AAV2-S652H	変化なし	約4倍
AAV2-S652I	約10分の1	変化なし
AAV2-S662L	約10分の1	変化なし
AAV2-S662I	約10分の1	変化なし

パッケージングアッセイと感染カアッセイは表1の説明で述べたように行った。  
V: バリン; A: アラニン; D: アスパラギン酸; F: フェニルアラニン  
H: ヒスチジン; N: アスパラギン; L: ロイシン; および I: イソロイシン

FIG. 35

【 図 3 6 - 1 】

FIG. 36A

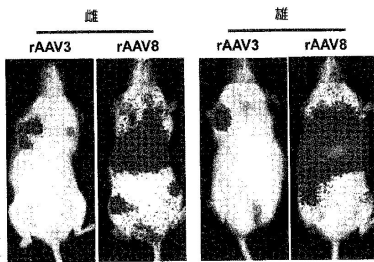


FIG. 36B

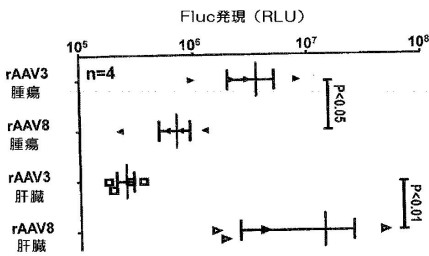
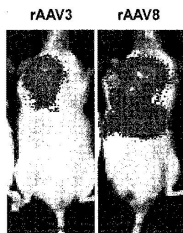


FIG. 36C



【 図 3 6 - 2 】

FIG. 36D

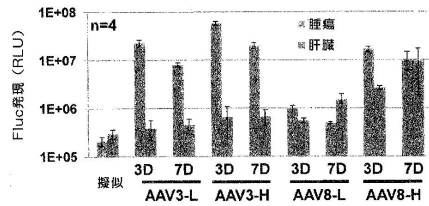
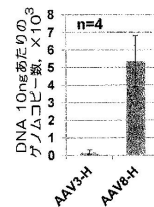


FIG. 36E



10

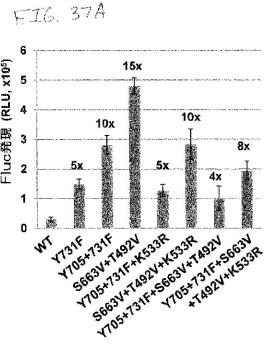
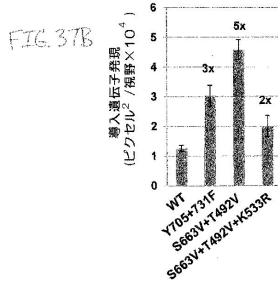
20

30

40

50

【 図 3 7 - 1 】



【 図 3 7 - 2 】

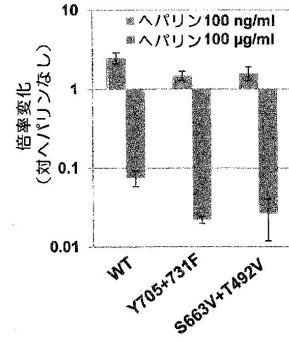
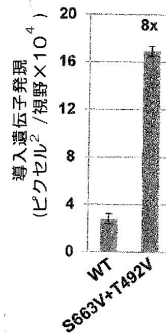


FIG. 37C

FIG. 37D

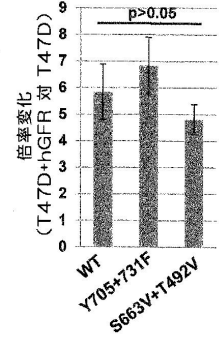
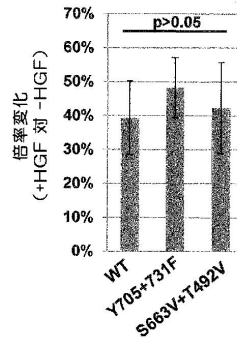


FIG. 37E

FIG. 37F

【 図 3 8 】



FIG. 38A

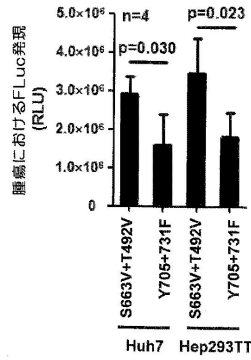


FIG. 38B

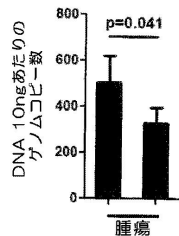


FIG. 38C

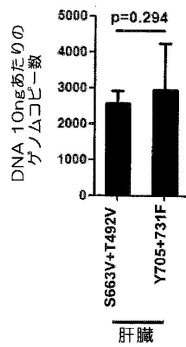


FIG. 38D

【 図 3 9 】

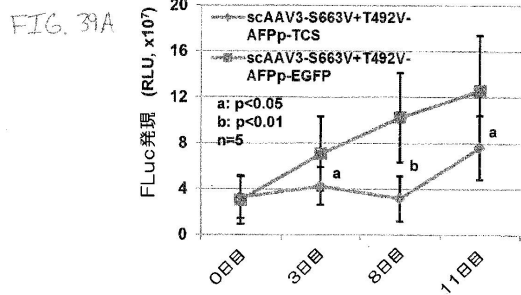


FIG. 39A



FIG. 39B

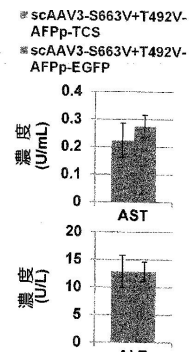


FIG. 39C

10

20

30

40

50



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

アメリカ合衆国 3 2 6 0 8 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト・ナインティセカンド・ドライブ 3 8 2 3 番

## (72)発明者

リー・ジョン

アメリカ合衆国 0 1 7 1 9 マサチューセッツ州ボックスボロー、サージェント・ロード 4 0 4 番

## (72)発明者

セルゲイ・ゾロトゥヒン

アメリカ合衆国 3 2 6 0 7 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト 9 6 ドライブ 1 1 2 2 番

## (72)発明者

ジョージ・ブイ・アスラニディ

アメリカ合衆国 3 2 6 2 6 フロリダ州ゲインズビル、ノースウエスト・シックスティナインス・テラス 2 4 1 1 番

## (72)発明者

メイビス・アグバンジェ - マッケンナ

アメリカ合衆国 3 2 6 0 7 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト・セブンティーンズ・プレイス 1 0 2 0 2 番

## (72)発明者

キム・エム・バン・ブリート

アメリカ合衆国 3 2 6 0 8 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト・フィフティセブンス・プレイス 8 1 2 4 番

## (72)発明者

チェン・リン

アメリカ合衆国 3 2 6 0 9 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト・セブンティセブンス・アベニュー 8 5 8 9 番

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 Gene Therapy, 2012, Vol. 19, pp. 375-384

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

A 6 1 K 4 8 / 0 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

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 )