

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-519065

(P2021-519065A)

(43) 公表日 令和3年8月10日(2021.8.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 1 3 0 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35 Z N A	4 C 0 8 1
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/113 1 2 0 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-551357 (P2020-551357)
 (86) (22) 出願日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年11月24日 (2020. 11. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/023759
 (87) 国際公開番号 W02019/183605
 (87) 国際公開日 令和1年9月26日 (2019. 9. 26)
 (31) 優先権主張番号 62/799, 843
 (32) 優先日 平成31年2月1日 (2019. 2. 1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/647, 595
 (32) 優先日 平成30年3月23日 (2018. 3. 23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 507088266
 ユニバーシティ オブ マサチューセッツ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 0 8、ボストン、ワン ビーコン ス
 トリート、3 1 ス フロア
 One Beacon Street, 3
 1st Floor, Boston, Ma
 ssachusetts 02108
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 シム, ジューヒョク
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 1 5 8 1、ウェストボロウ、コーニング
 フェアバンクス ウェイ 1 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨障害を処置するための遺伝子治療法

(57) 【要約】

いくつかの側面において、本開示は、対象における骨量を調整する(例として、増加させる、および/または減少させる)ための組成物および方法に関する。いくつかの側面において、本開示は、あるタイプの骨の細胞、例えば、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞等々の活性、分化、もしくは機能を促進する(例として、上昇させる)かまたは阻害する(例として、減少させる)導入遺伝子を発現するように構成されている単離された核酸およびrAAVベクターなどのベクターを提供する。いくつかの態様において、本開示によって記載される単離された核酸およびベクターは、増加した骨量(例として、大理石骨病)または減少した骨量(例として、骨粗鬆症)に関連する障害および疾病を処置するのに有用である。

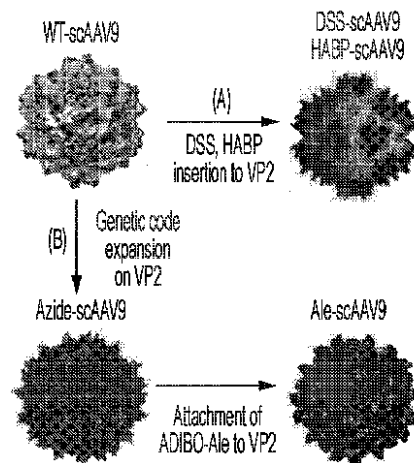


FIG. 9

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆方向末端反復(ITR)またはそのバリエーションを含む第1の領域；および

(ii) 少なくとも1つの骨代謝調整剤をコードする導入遺伝子を含む第2の領域をコードする、単離された核酸。

【請求項 2】

骨代謝調整剤が、骨形成促進剤であり、

任意に、骨形成促進剤が、骨芽細胞および/または骨細胞の機能あるいは活性を促進するタンパク質、破骨細胞の機能を阻害するタンパク質、ならびに破骨細胞の発現または活性を阻害する阻害性核酸からなる群から選択される、請求項1に記載の単離された核酸。

10

【請求項 3】

骨代謝調整剤が、骨形成阻害剤であり、

任意に骨形成阻害剤が、骨芽細胞および/または骨細胞の機能あるいは活性を阻害するタンパク質、破骨細胞の機能または活性を促進するタンパク質、ならびに骨芽細胞の発現または活性を阻害する阻害性核酸からなる群から選択される、請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項 4】

導入遺伝子が、副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH関連タンパク質(PThrP)、デグリカーゼDJ1、スクレロスチン(SOST)を標的にする阻害性核酸、sclerostin-3(SHN3)を標的にする阻害性核酸、カテプシンK(CTSK)を標的にする阻害性核酸、およびNF- κ B活性化受容体(RANK)を標的にする阻害性核酸からなる群から選択される骨形成促進剤をコードする、請求項2に記載の単離された核酸。

20

【請求項 5】

導入遺伝子が、スクレロスチン(SOST)、sclerostin-3(SHN3)、カテプシンK(CTSK)、副甲状腺ホルモン(PTH)を標的にする阻害性核酸、PTH関連タンパク質(PThrP)を標的にする阻害性核酸、およびデグリカーゼDJ1を標的にする阻害性核酸からなる群から選択される骨形成阻害剤をコードする、請求項3に記載の単離された核酸。

【請求項 6】

導入遺伝子が、dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、および人工miRNA(amiRNA)からなる群から選択される少なくとも1つの阻害性核酸をコードする、請求項1~5のいずれか一項に記載の単離された核酸。

30

【請求項 7】

阻害性核酸が、突然変異末端反復(mTR)として機能する、請求項6に記載の単離された核酸。

【請求項 8】

導入遺伝子が、配列番号1~15または55~56のいずれか1つで表される配列を含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の単離された核酸。

【請求項 9】

導入遺伝子へ作動可能に連結された少なくとも1つのプロモーターをさらに含む、請求項1~8のいずれか一項に記載の単離された核酸。

40

【請求項 10】

第2のAAV ITRまたはそのバリエーションを含む第3の領域をさらに含む、請求項1~9のいずれか一項に記載の単離された核酸。

【請求項 11】

請求項1~10のいずれか一項に記載の単離された核酸を含むベクターであって、任意にここでベクターが、プラスミドである、前記ベクター。

【請求項 12】

請求項1~10のいずれか一項に記載の単離された核酸、または請求項11に記載のベクターを含む宿主細胞。

50

【請求項 13】

(i) カプシドタンパク質；および

(ii) 請求項1~10のいずれか一項に記載の単離された核酸を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)。

【請求項 14】

カプシドタンパク質が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh39、AAV.43、AAV2/2-66、AAV2/2-84、およびAAV2/2-125から選択される血清型、または上記いずれかのバリエーションに属し、任意にここでカプシドタンパク質が、配列番号18~34のいずれか1つで表される配列を含む、請求項13に記載のrAAV。

10

【請求項 15】

カプシドタンパク質が、骨芽細胞(OBs)を形質導入し、任意にここでカプシドタンパク質が、AAV4、AAV1、AAV6、AAV6.2、およびAAV9から選択される血清型、または上記いずれかのバリエーションに属する、請求項14に記載のrAAV。

【請求項 16】

カプシドタンパク質が、破骨細胞(OCs)を形質導入し、任意にここでカプシドタンパク質が、AAV1、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV.rh39、およびAAV.rh43から選択される血清型、または上記いずれかのバリエーションに属する、請求項14に記載のrAAV。

【請求項 17】

カプシドタンパク質が、異種の骨標的化ペプチドを含む、請求項13~16のいずれか一項に記載のrAAV。

20

【請求項 18】

異種の骨標的化ペプチドが、配列番号16、17、57、58、59、60、61、62、または63で表されるアミノ酸配列を含む、請求項17に記載のrAAV。

【請求項 19】

異種の骨標的化ペプチドをコードする核酸配列が、カプシドタンパク質のVP2オープンリーディングフレーム中へ挿入されており、任意にここで核酸配列が、AAV9カプシドタンパク質をコードする核酸配列のN587とR588とに対応するコドン間に挿入されている、請求項17または18に記載のrAAV。

30

【請求項 20】

カプシドタンパク質が、1以上のアジド担持非天然アミノ酸を有するアミノ酸配列によってコードされている、請求項13~16のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項 21】

カプシドタンパク質が、1以上のアジド担持非天然アミノ酸を介して1以上のアレンドロナート(Ale)部分へ抱合されている、請求項20に記載のrAAV。

【請求項 22】

rAAVが、自己相補的AAV(scAAV)である、請求項13~21のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項 23】

異種の骨標的化ペプチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)カプシドタンパク質をコードする単離された核酸であって、任意に異種の骨標的化ペプチドが、配列番号16、17、57、58、59、60、61、62、または63で表されるアミノ酸配列を含む、前記単離された核酸。

40

【請求項 24】

1以上のアジド担持非天然アミノ酸を含む組換えAAVカプシドタンパク質であって、任意にカプシドタンパク質が、1以上のアジド担持非天然アミノ酸を介して1以上のアレンドロナート(Ale)部分へ抱合されている、前記組換えAAVカプシドタンパク質。

【請求項 25】

導入遺伝子を骨組織へ送達するための方法であって、方法が、請求項1~10のいずれか一項に記載の単離された核酸または請求項13~22のいずれか一項に記載のrAAVを対象へ投

50

与することを含む、前記方法。

【請求項26】

低下した骨密度に関連する疾患または障害を処置するための方法であって、方法が、請求項13~22のいずれか一項に記載のrAAVを、低下した骨密度に関連する疾患もしくは障害を有するかまたはこれを有すると疑われる対象へ投与することを含み、

ここで導入遺伝子が、骨形成促進剤をコードし、

任意に、ここで骨形成促進剤が、骨芽細胞および/または破骨細胞の機能あるいは活性を促進するタンパク質、破骨細胞の機能または活性を阻害するタンパク質、ならびに破骨細胞の発現または活性を阻害する阻害性核酸からなる群から選択される、前記方法。

【請求項27】

骨形成促進剤が、副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH関連タンパク質(PTHrP)、デグリカーゼDJ1、スクレロスチン(SOST)を標的にする阻害性核酸、Schnurri-3(SHN3)を標的にする阻害性核酸、カテプシンK(CTSK)を標的にする阻害性核酸、およびNF-活性化受容体(RANK)を標的にする阻害性核酸からなる群から選択される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

低下した骨密度に関連する疾患または障害が、骨粗鬆症、危機的サイズの骨欠損、廃用または傷害の結果生じる機械的障害、および乳がんまたは前立腺がんの転移などの続発性障害、1型糖尿病、ループス、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、甲状腺機能亢進症、セリアック病、喘息、多発性硬化症、および歯周炎である、請求項26または27に記載の方法。

【請求項29】

変形して肥大した(例として、上昇した)骨の密度に関連する疾患または障害を処置するための方法であって、方法が、請求項13~22のいずれか一項に記載のrAAVを、上昇した骨密度に関連する疾患または障害を有するかまたはこれを有すると疑われる対象へ投与することを含み、

ここで導入遺伝子が、骨形成阻害剤をコードしており、

任意に、ここで骨形成阻害剤が、骨芽細胞および/または骨細胞の機能あるいは活性を阻害するタンパク質、破骨細胞の機能または活性を促進するタンパク質、および骨芽細胞の発現または活性を阻害する阻害性核酸からなる群から選択される、前記方法。

【請求項30】

骨形成阻害剤が、スクレロスチン(SOST)、schnurri-3(SHN3)、カテプシンK(CTSK)、副甲状腺ホルモン(PTH)を標的にする阻害性核酸、PTH関連タンパク質(PTHrP)を標的にする阻害性核酸、デグリカーゼDJ1を標的にする阻害性核酸、およびNF-活性化受容体(RANK)を標的にする阻害性核酸からなる群から選択される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

変形して肥大した(例として、上昇した)骨密度に関連する疾患または障害が、大理石骨病、濃化異骨症、硬結性骨化症、先端巨大症、フッ素症、骨髄線維症、C型肝炎関連骨硬化症、異所性骨化、ならびに骨肉腫および骨の転移性がんなどの骨のがんである、請求項29または30に記載の方法。

【請求項32】

投与が、注射によって行われ、

任意に、注射が、全身注射(例として、静脈内注射)および局所注射(例として、筋肉内(IM)注射、膝注射、および大腿骨髄内注射)である、請求項25~31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

投与が、請求項13~22のいずれか一項に記載のrAAVを含む組織または移植片の対象中への移植によって行われる、請求項26~31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

投与が、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、および軟骨細胞からなる群から選択される細胞型の形質導入をもたらす、請求項25~33のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、35 U.S.C. § 119(e)の下、「骨障害を処置するための遺伝子治療法」と題する2018年3月23日出願の米国仮出願第62/647,595号、および「骨障害を処置するための遺伝子治療法」と題する2019年2月1日出願の米国仮出願第62/799,843号の利益を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

背景

骨代謝の欠陥は、骨量の病的な欠乏に関連する障害および骨量の病的な増加に関連する障害を包含する様々な異なる骨障害を生じさせる。骨量への影響は全身にも局所にもあり得る。例えば骨粗鬆症は、骨量の喪失によって特徴付けられる疾患であって、老化現象に関連するフレイルおよび苦痛の主な原因である。50歳を超えた推計1千万の米国人が骨粗鬆症を有し、骨粗鬆症に関する骨折は1年あたりおよそ1.5百万人に生じ、健康状態に重篤な結果をもたらす。骨粗鬆症のための現行のほとんどの治療剤は破骨細胞(OCs)による骨の再吸収を阻害し、この阻害は顎の非典型骨折および骨壊死を包含する無数の副作用を伴う。断続的な副甲状腺ホルモン(PTH)は、骨芽細胞(OB)機能を促進する同化剤であって、骨粗鬆症患者らの処置のために入手可能なものである。しかしながら、この剤は、PTH誘発骨腫瘍への懸念のせいでの使用が限定されている。加えて、新しく開発された同化剤、抗スクレロスチン抗体は、増強されたWntシグナリングを通してOB分化を促進する。しかしながら、炎症性関節炎という状況下の抗スクレロスチン抗体は、TNF依存性炎症という状況下では骨破壊を増大して脳卒中のリスクを上げることが観察された。同様に、カテプシンKの小分子インヒビター(例として、オダナカチブ)は、脳卒中の発生が上がったことに起因してFDAの審査からもれた。

【発明の概要】

【0003】

概要

本開示の側面は、骨形成および/または代謝を調整する(例として増加または減少させる)ための組成物および方法に関する。本開示は、骨代謝を調整する1以上の導入遺伝子をコードする組換えアデノ随伴ウイルス(rAAVs)に、一部基づく。よって、いくつかの態様において、本開示によって記載されるrAAVsは、調節不全の骨代謝(例として、減少した骨密度、上昇した骨密度等々)に関連する疾患または障害を処置するのに有用である。

【0004】

結果的に、いくつかの側面において、本開示は、第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆方向末端反復(ITR)またはそのパリアントを含む第1の領域;および、少なくとも1つの骨代謝調整剤をコードする導入遺伝子を含む第2の領域をコードする単離された核酸を提供する。

【0005】

いくつかの態様において、骨代謝調整剤は、骨形成促進剤である。いくつかの態様において、骨形成促進剤は、OBおよび/または骨細胞(osteocyte)(OCY)分化あるいは活性を促進するタンパク質、OC分化または活性を阻害するタンパク質、ならびにOC分化または活性を阻害する阻害性核酸からなる群から選択される。

【0006】

いくつかの態様において、骨代謝調整剤は、骨形成阻害剤である。いくつかの態様において、骨形成阻害剤は、OBおよび/またはOCY分化あるいは活性を阻害するタンパク質、OC分化または活性を促進するタンパク質、ならびにOB発現または活性を阻害する阻害性核酸からなる群から選択される。

【0007】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、導入遺伝子は、副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH関連タンパク質(PTHrP)、デグリカーゼ(deglycase)DJ1、スクレロスチン(SOST)を標的にする阻害性核酸、schnurri-3(SHN3)を標的にする阻害性核酸、およびカテプシンK(CTSK)を標的にする阻害性核酸からなる群から選択される骨形成促進剤をコードする。

【0008】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、スクレロスチン(SOST)、schnurri-3(SHN3)、カテプシンK(CTSK)、副甲状腺ホルモン(PTH)を標的にする阻害性核酸、PTH関連タンパク質(PTHrP)を標的にする阻害性核酸、およびデグリカーゼDJ1を標的にする阻害性核酸からなる群から選択される骨形成阻害剤をコードする。

【0009】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、および人工miRNA(amiRNA)からなる群から選択される少なくとも1つの阻害性核酸をコードする。

いくつかの態様において、阻害性核酸は、突然変異末端反復(mTR)として機能する。

【0010】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、#配列番号1~15のいずれか1つで表される配列を含む。いくつかの態様において、導入遺伝子は、配列番号1~15のいずれか1つで表される配列またはその相補体を標的にする(例として、これとハイブリダイズするかまたはこれへ結合する)。

【0011】

いくつかの態様において、本開示によって記載される単離された核酸は、導入遺伝子へ作動可能に(operably)連結された少なくとも1のプロモーターをさらに含む。

いくつかの態様において、本開示によって記載される単離された核酸は、第2のAAV ITRまたはそのバリエーションを含む第3の領域をさらに含む。

【0012】

いくつかの側面において、本開示は、本開示によって記載されるとおりの単離された核酸を含むベクターを提供する。いくつかの態様において、ベクターは、プラスミドである。

いくつかの側面において、本開示は、本開示によって記載されるとおりの単離された核酸またはベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、宿主細胞は、細菌性細胞、酵母細胞、昆虫(例として、Sf9)細胞、または哺乳動物の細胞である。

【0013】

本開示は、骨の細胞(bone cells)、たとえばOBs、OCYs、OCs等々への増大した指向性によって特徴付けられるrAAVsに、一部基づく。いくつかの態様において、本開示によって記載されるrAAVsは、異種の骨標的化ペプチドを含むか、または骨標的化成分へ抱合されている。

【0014】

結果的に、いくつかの側面において、本開示は、異種の骨標的化ペプチドを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)カプシドタンパク質をコードする単離された核酸を提供する。いくつかの態様において、異種の骨標的化ペプチドは、OCsを標的にする(例として、OBsと比べて、特異的にまたは優先的にOCsを標的にする)。いくつかの態様において、異種の骨標的化ペプチドは、OBsを標的にする(例として、OCsと比べて、特異的にまたは優先的にOBsを標的にする)。いくつかの態様において、異種の骨標的化ペプチドは、配列番号16、17、57、58、59、60、61、62、および63で表されるアミノ酸配列を含む。

【0015】

いくつかの側面において、本開示は、1以上のアジド担持(-bearing)非天然アミノ酸を含むrAAVカプシドタンパク質を提供する。いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、1以上のアジド担持非天然アミノ酸を介して1以上のアレンドロナート(Ale)部分へ抱合されている。

いくつかの側面において、本開示は、カプシドタンパク質；および本開示によって記載されるとおりの単離された核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を提供する。

10

20

30

40

50

【0016】

いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh39、AAV.43、AAV2/2-66、AAV2/2-84、およびAAV2/2-125から選択される血清型、または上記配列番号18~34いずれかのバリエーションに属する。

【0017】

いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、OBsおよび/またはOCYsを形質導入する。いくつかの態様において、カプシドタンパク質(例として、OBsおよび/またはOCYsを形質導入するカプシドタンパク質)は、AAV4、AAV1、AAV6、AAV6.2、およびAAV9から選択される血清型、または上記いずれかのバリエーションに属する。

10

【0018】

いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、OCsを形質導入する。いくつかの態様において、カプシドタンパク質(例として、OCsを形質導入するカプシドタンパク質)は、AAV1、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV.rh39、およびAAV.rh43から選択される血清型、または上記いずれかのバリエーションに属する。

【0019】

いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、異種の骨標的化ペプチド、例えば、配列番号16、17、57、58、59、60、61、62、および63で表されるアミノ酸配列を含む異種の骨標的化ペプチドを含む。いくつかの態様において、異種の骨標的化ペプチドは、OCsを標的にする(例として、OBsと比べて、特異的にまたは優先的にOCsを標的にする)。いくつかの態様において、異種の骨標的化ペプチドは、OBsを標的にする(例として、OCsと比べて、特異的にまたは優先的にOBsを標的にする)。

20

【0020】

いくつかの態様において、異種の骨標的化ペプチドをコードする核酸配列は、カプシドタンパク質のVP2オープンリーディングフレーム中へ挿入されている。いくつかの態様において、核酸配列は、AAV2カプシドタンパク質をコードする核酸配列のN587とR588とに対応するコドン間またはN末端に挿入されている。いくつかの態様において、核酸配列は、AAV9カプシドタンパク質をコードする核酸配列のQ588とA589とに対応するコドン間またはN末端に挿入されている。

【0021】

いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、1以上のアジド担持非天然アミノ酸を有するアミノ酸配列によってコードされている。いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、1以上のアジド担持非天然アミノ酸を介して1以上のアレンドロナート(Ale)部分へ抱合されている。

30

【0022】

いくつかの態様において、rAAVは、自己相補的AAV(scAAV)である。

いくつかの側面において、本開示は、導入遺伝子を骨組織へ送達するための方法を提供し、方法は、本開示によって記載されるとおりの単離された核酸、組成物、またはrAAVを対象へ投与することを含む。

【0023】

いくつかの側面において、本開示は、低下した骨密度に関連する疾患または障害を処置するための方法を提供し、方法が、本明細書に記載のとおり低下した骨密度に関連する疾患もしくは障害を有するかまたはこれを有すると疑われるを対象へ投与することを含み、ここでrAAVの導入遺伝子は骨形成促進剤をコードしている。いくつかの態様において、骨形成促進剤は、OBおよび/またはOCY分化あるいは活性を促進するタンパク質、OC分化または活性を阻害するタンパク質、ならびにOC分化または活性を阻害する阻害性核酸からなる群から選択される。

40

【0024】

いくつかの態様において、骨形成促進剤は、副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH関連タンパク質(PTHrP)、デグリカーゼDJ1、スクレロスチン(SOST)を標的にする阻害性核酸、Schnurri

50

-3(SHN3)を標的にする阻害性核酸、およびカテプシンK(CTSK)を標的にする阻害性核酸からなる群から選択される。

【0025】

いくつかの態様において、低下した骨密度に関連する疾患または障害は、骨粗鬆症、危機的サイズの(critical sized-)骨欠損、廃用または傷害の結果生じる機械的障害、および乳がんまたは前立腺がんの転移などの続発性障害、1型糖尿病、ループス、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、甲状腺機能亢進症、セリアック病、喘息、歯周炎、および多発性硬化症からなる群から選択される。

【0026】

いくつかの側面において、本開示は、上昇した骨密度に関連する疾患または障害、例えば、大理石骨病、骨肉腫、および異所性骨化からなる群から選択される疾患を処置するための方法を提供し、方法が、本明細書に記載のとおりrAAVを、上昇した骨密度に関連する疾患または障害を有するかまたはこれを有すると疑われる対象へ投与することを含み、ここでrAAVの導入遺伝子は骨形成阻害剤をコードしている。いくつかの態様において、骨形成阻害剤は、OBおよび/またはOCY分化あるいは活性を阻害するタンパク質、OC分化または活性を促進するタンパク質、ならびにOC分化または活性を阻害する阻害性核酸からなる群から選択される。

10

【0027】

いくつかの態様において、骨形成阻害剤は、スクレロスチン(SOST)、schnurri-3(SHN3)、カテプシンK(CTSK)、副甲状腺ホルモン(PTH)を標的にする阻害性核酸、PTH関連タンパク質(PTHrP)を標的にする阻害性核酸、およびデグリカーゼDJ1を標的にする阻害性核酸からなる群から選択される。

20

【0028】

いくつかの態様において、低下した骨密度に関連する疾患または障害は、大理石骨病、濃化異骨症、硬結性骨化症、先端巨大症、フッ素症、骨髄線維症、C型肝炎関連骨硬化症、および骨肉腫および骨の転移性がんなどの骨のがんからなる群から選択される。

【0029】

本開示によって記載される方法のいくつかの態様において、投与は、注射によって行われる。いくつかの態様において、注射は、全身注射(例として、尾静脈注射)、局所注射(例として、筋肉内(IM)注射、膝注射、または大腿骨髄内注射)である。

30

【0030】

いくつかの態様において、投与は、本開示によって記載されるとおりのrAAVを含む組織または移植片(graft)の対象中への移植(implantation)によって行われる。

いくつかの態様において、投与は、OB、OCY、OC、および軟骨細胞からなる群から選択される細胞型の形質導入をもたらす。

【図面の簡単な説明】

【0031】

図面の簡単な記載

【図1】図1は、マウス初代OB前駆体をin vitroで形質導入するscAAV血清型の同定を示す。マウスOB前駆体は出生から3~5日後での新生仔の頭蓋冠から単離され、増幅のため成長培地において培養された。細胞は、GFPタンパク質をコードする14の異なるscAAV血清型とともに2日間インキュベートされ、それらの形質導入効率は、落射蛍光顕微鏡法を使用しGFP発現によって分析された。

40

【0032】

【図2】図2は、マウスATDC5軟骨細胞株をin vitroで形質導入するscAAV血清型の同定を示す。マウス軟骨細胞前駆細胞株ATDC5は、GFPタンパク質をコードする14の異なるscAAV血清型とともに2日間インキュベートされ、それらの形質導入効率は、落射蛍光顕微鏡法を使用しGFP発現によって分析された。

【0033】

【図3】図3は、マウス初代OCsをin vitroで形質導入し得るscAAV血清型の同定を示す。

50

骨髄由来単球 (BM-MOs) は、2月齢マウス (C57BL/6J) の長骨から単離され、マウスmM-CSF (40 ng/ml) の添加によって増幅された。BM-MOsは、マウスM-CSF (40ng/ml) およびマウスRankリガンド (10ng/ml) の存在下、GFPタンパク質をコードする15の異なるscAAV血清型とともに6日間インキュベートされ、それらの形質導入効率は、落射蛍光顕微鏡法を使用しGFP発現によって分析された。

【 0 0 3 4 】

【 図 4 】 図4は、マウスRaw264.7 OC株を *in vitro* で形質導入し得るscAAV血清型の同定を示す。マウスRankリガンド (5ng/ml) での処置から2日後、Raw264.7細胞は、マウスRankリガンド (5ng/ml) の存在下、GFPタンパク質をコードする17の異なるscAAV血清型とともに6日間インキュベートされた。それらの形質導入効率は、落射蛍光顕微鏡法を使用しGFP発現によって分析された。

10

【 0 0 3 5 】

【 図 5 】 図5は、マウスにおける、GFPを発現するAAV形質導入組織の光学画像を示す。PBSまたは $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのGFPをコードするscAAV血清型 (scAAV4、5、6.2、および9) の単回用量が2月齢マウス (C57BL/6J) の両膝関節中へ注射され、4週間後にマウスは安楽死させられ、膝関節中のGFP発現がIVIS-100光学結像系 (全身、上) によって監視された。右後肢が解剖されて筋肉が除去された後GFP発現がIVIS-100光学結像系によって監視された (後肢、下)。

【 0 0 3 6 】

【 図 6 】 図6A~6Bは、関節軟骨中の軟骨細胞および/または骨表面上のOBsおよび/またはOCsを形質導入し得るscAAV血清型の同定を示す。 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのGFPをコードするscAAV血清型 (scAAV4、5、6.2、および9) の単回用量が2月齢マウス (C57BL/6J) の両膝関節中へ注射され、4週間後に組織学のため膝関節 (図6A) および大腿骨 (図6B) の凍結切片が作製された (frozen-sectioned)。AC: 関節軟骨、CB: 皮質骨、BM: 骨髄、バー: 50 μ m。

20

【 0 0 3 7 】

【 図 7 】 図7は、リポソームが、マウスにおけるscAAV9形質導入の骨細胞への選択性を、筋肉へのその感染力を低下させることによって増強し得ることを示す。 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9血清型がPBSまたはX-tremeGENE (リポソーム、Roche) と1:1比率にて混合された。インキュベーションから1時間後、混合物の単回用量が2月齢マウス (C57BL/6J) の膝関節中へ注射された。1週間後にマウスは安楽死させられ、膝関節中のGFP発現がIVIS-100光学結像系によって監視された (左)。組織学のため大腿骨の凍結切片が作製された (右)。CB: 皮質骨、M: 筋肉。

30

【 0 0 3 8 】

【 図 8 】 図8は、GFPをコードするscAAV9血清型がマウス骨表面上のOBs、およびOCs、およびOCysを形質導入し得ることを示す。 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9血清型がPBSまたはX-tremeGENE (リポソーム) と1:1比率にて混合された。インキュベーションから後1時間、混合物の単回用量が2月齢マウス (C57BL/6J) の膝関節中へ注射された。 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9血清型の1単回用量が2月齢マウス (C57BL/6J) の膝関節中へ注射され、4週間後に組織学のため大腿骨の凍結切片が作製され、GFP発現が共焦点顕微鏡によって見られた。高倍率の (High-powered) 写真は、GFPをコードするscAAV9血清型とX-tremeGENEとの混合物で処置された大腿骨における、scAAV9が形質導入されたOBs、OCs、およびOCysを示す (下)。位相差顕微鏡によって見られたGFP発現が皮質骨中で観察された (左)。GP: 成長板、TB: 骨梁、CB: 皮質骨、BM: 骨髄; バー: 50 μ m。

40

【 0 0 3 9 】

【 図 9 】 図9は、骨集積 (bone-seeking) AAVベクターの開発を示す。(A) 骨標的化ペプチド、DSS ((AspSerSer)₆) もしくはHABP)、または (C EPRR EVA EL EPRR EVA EL) が、遺伝子操作を介してVP2カプシドタンパク質中へ挿入される。(B) WT AAVベクターがアジド担持アミノ酸で部位特異的に標識され、次いで骨集積分子 (ADIBO-A1e) と付着された。

50

【 0 0 4 0 】

【図 1 0】図10は、骨標的化ペプチド(ボックス; (AspSerSer)₆、DSS)をもつVP2カプシドタンパク質を描く図表を示す。DSSは、遺伝子操作を介してVP2カプシドタンパク質のQ588とA589との間の中へまたはN末端に挿入される。

【 0 0 4 1 】

【図 1 1 A - B】図11A~11Cは、OBsにおけるDSS-scAAV9sの *in vitro*での特徴付けを示す。マウスOB前駆体は、scAAV9-WT(WT)または2つのDSS-scAAV9s(DSS-588、DSS-Nter)とともに2日間インキュベートされた。それらの形質導入効率が、抗GFPでのウェスタンブロッティング(図11A)および落射蛍光(図11B、左)を使用しGFP発現によって分析された。Hsp90がロード対照 (loading control)として使用された。代替的に、形質導入されたOBsはOB分化条件下6日間培養され、OB分化がアルカリホスファターゼ(ALK)染色によって(図11B、右)、およびOB遺伝子発現がRT-PCRによって査定された(Hprtに対して正規化された、図11C)。

10

【図 1 1 C】代替的に、形質導入されたOBsはOB分化条件下6日間培養され、OB分化がアルカリホスファターゼ(ALK)染色によって(図11B、右)、およびOB遺伝子発現がRT-PCRによって査定された(Hprtに対して正規化された、図11C)。N.S.: 有意ではない。

【 0 0 4 2 】

【図 1 2 A】図12A~12Cは、OCsにおけるDSS-scAAV9sの *in vitro*での特徴付けを示す。マウスRankリガンド(5ng/ml)での処置から2日後、Raw264.7はscAAV9-WT(WT)または2つのDSS-scAAV9s(DSS-588、DSS-Nter)で処置された。形質導入から2日後、それらの形質導入効率が抗GFP抗体でのウェスタンブロッティング(図12A)を使用し、落射蛍光を使用し(図12B、左)GFP発現によって分析された。

20

【図 1 2 B - C】形質導入されたOCsがRankリガンドの存在下で培養され、3日後にOC分化がTRAP染色(図12B、右)によって、OC遺伝子発現がRT-PCR(Hprtに対して正規化された、図12C)によって査定された。N.S.: 有意ではない。

【 0 0 4 3 】

【図 1 3】図13は、DSS-scAAV9(Nter)がマウス骨表面上のOBs、OCs、およびOCYsを形質導入し得ることを示す。 $10^{11} \sim 10^{12}/\text{ml}$ ゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9-WT(WT)または2つのDSS-scAAV9s(DSS-588、DSS-Nter)がX-tremeGENE(リボソーム)と1:1比率にて混合された。インキュベーションから1時間後、混合物の単回用量が2月齢マウス(C57BL/6J)の膝関節中へ注射された。1週後に組織学のため大腿骨の凍結切片が作製され、GFP発現が共焦点顕微鏡によって見られた。高倍率の写真は、GFPをコードするscAAV9血清型とX-tremeGENEとの混合物で処置された大腿骨における、scAAV9が形質導入されたOBs、OCs、およびOCYsを示す(下)。GP: 成長板、CB: 皮質骨、BM: 骨髄; GFP: 緑色、DAPI: 青色。

30

【 0 0 4 4 】

【図 1 4】図14は、成熟OBsにおけるSHN3の一過的な欠失が成体マウス骨量を増加させることを示す。1月齢メスShn3-fl/fl(WT)またはShn3-fl/fl;OCN/ERT-cre(CKO)マウスがタモキシフェン(50mg/kg)で5日間処置され、6週間後に骨量がマイクロCT分析によって測定された。骨梁の3D再構成体(左)が表示され、定量パラメータが右パネル: 骨体積/総体積(BV/TV)に表示される。*: P、0.005。

40

【 0 0 4 5 】

【図 1 5】図15は、SHN3欠失がマウスのエストロゲン欠乏症誘発骨喪失を防止することを示す。3月齢メスマウスは卵巣摘出(OVX)手術を受けたか、または偽手術(偽)を受け、2月後に手術骨量がマイクロCT分析によって測定された。骨梁の(左上)および中央骨幹皮質骨の(左下)3D再構成体が表示される。定量パラメータは右パネル: 骨体積/総体積(BV/TV)に表示される。*: P、0.005、N.S.: 有意ではない。

【 0 0 4 6 】

【図 1 6 A - B】図16A~16Dは、OBsにおけるscAAV9-mSHN3iの *in vitro*での特徴付けを示す。マウス初代頭蓋冠OBsがscAAV9をコードする-対照ベクター(対照)または2つのマウス-SHN3 shRNAsi(Sh-SHN3-1、-2)で処置された。形質導入から3日後、それらの形質導入効率

50

(図13A)およびノックダウン効率(図13B)が夫々、落射蛍光を使用するGFP発現によって、およびRT-PCRを使用するSHN3 mRNAレベルによって分析された。

【図16C-D】(図13Cおよび13D)形質導入されたOBsがOB分化条件下で培養され、RT-PCRおよびアリザリンレッド染色が培養第6日および15日に実施された。* : P、0.05、** : P、0.005。

【0047】

【図17】図17A~17Bは、scAAV9-mSHN3iのin vivoでの特徴付けを示す。 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9(対照、Sh-SHN3-1)がX-tremeGENE(リポソーム)と1:1比率にて混合された。インキュベーションから1時間後、混合物の単回用量が2月齢マウス(C57BL/6J)の膝関節中へ注射された。1週後に組織学のため大腿骨の凍結切片が作製され、GFP発現が共焦点顕微鏡によって見られた。高倍率の写真は大腿骨においてGFPを発現するOBsおよびOCsを示し、このことは対照-scAAV9ベクターと同様、Sh-SHN3-1 scAAV9ベクターが骨中のOBsおよびOCsを形質導入し得ることを実証する(図17A)。大腿骨が機械的消化および酵素消化(タイプ2コラゲナーゼおよびディスパーゼ)で処理されてBMSCsが分離した。GFPを発現する細胞がさらにFACSソート(sorting)を使用しBMSCsから単離されて、SHN3 mRNAレベルを測定するRT-PCR分析のために使用された(図17B)。CB : 皮質骨、BM : 骨髄、TB : 骨梁。

10

【0048】

【図18A-B】図18A~18Dは、OCsにおけるscAAV9-mCTSKiのin vitroでの特徴付けを示す。マウスRankリガンド(5ng/ml)での処置から2日後、Raw264.7がscAAV9-対照(対照)または2つのscAAV9-mCTSKi(Sh-CTSK-1、-2)で処置された。形質導入から2日後、それらの形質導入効率(図18A)およびノックダウン効率(図18B)が夫々、落射蛍光を使用するGFP発現によって、およびRT-PCRを使用するCTSK mRNAレベルによって分析された。

20

【図18C-D】図18C~18Dは、形質導入されたOBsがRankリガンドの存在下で培養され、3日後にOC分化がTRAP活性(図18C、上)および染色(図18C、下)によって、およびOC遺伝子発現がRT-PCR(Hprtに対して正規化された、図18D)によって査定されたことを示す。* : P、0.05、** : P、0.005。

【0049】

【図19】図19A~19Bは、scAAV9-mCTSKiのin vivoでの特徴付けを示す。 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9(対照、Sh-CTSK-1)がX-tremeGENE(リポソーム)と1:1比率にて混合された。インキュベーションから1時間後、混合物の単回用量が2月齢マウス(C57BL/6J)の膝関節中へ注射された。1週間後に組織学のため大腿骨の凍結切片が作製され、GFP発現が共焦点顕微鏡によって見られた。高倍率の写真は大腿骨においてscAAV9が形質導入されたOBsおよびOCsを示す(図19A)。凍結切片が作製された大腿骨が抗CTSK抗体で染色されて、GFPを発現するOCsにおけるCTSK発現を査定した。IgG抗体が陰性対照として使用された。高倍率の写真はscAAV9-mCTSKiで形質導入されたGFPを発現するOCsにおけるCTSKの低下した発現を示す(図19B)。GP : 成長板、CB : 皮質骨、BM : 骨髄、TB : 骨梁 ; GFP : 緑色、DAPI : 青色、CTSK : 赤色。

30

【0050】

【図20】図20は、骨標的化scAAV9媒介遺伝子サイレンシングのストラテジーを示す。OB遺伝子(SHN3i、SOSTi)またはOC遺伝子(CTSKi)に特異的なShRNAsが、BT-scAAV9血清型(DSSまたはHABP-scAAV9、Ale-scAAV9)中へクローニングされる。これらのscAAV9血清型が局所送達のためマウスの髓内大腿骨中へ注射される。OBsもしくは骨細胞におけるSHN3またはSOSTの発現をサイレンシングするために、あるいは骨表面上のOCsにおけるCTSK発現をサイレンシングするために、これらが全身送達のためマウス中へIPまたはIV注射される。

40

【0051】

【図21】図21は、全身産生のためのAAV媒介遺伝子添加を示す。ヒトPTH(1~84aa)、ヒトPTHrP(1~140aa)、またはマウスDJ-1 cDNAがscAAV9ベクター中へクローニングされ、これらが全身発現のためマウス筋肉内に注射される。

【0052】

50

【図22A - B】図22A~22Gは、骨細胞を*in vitro*および*in vivo*で形質導入するscAAVベクターを示す。図22Aおよび22Bは、頭蓋冠骨芽細胞(COB)、骨髄由来破骨細胞前駆体(BM-OC)、または軟骨形成細胞(ATDC5)が、同じCB-Egfp導入遺伝子とともにパッケージングされたPBSまたは14の異なるAAVカプシドで処置されたことを示す。2日後にEGFP発現が抗GFP抗体での免疫プロットングによって査定された。抗Hsp90抗体がロード対照として使用された。EGFPタンパク質の免疫プロット定量化が、Image Jソフトウェアによって内在性Hsp90タンパク質レベルのパーセンテージとして測定された。

【図22C - G】図22Cは、 1×10^{11} ゲノムコピーのscAAVの単回用量が2月齢オスマウス膝関節中へ関節内(i.a.)注射され、後肢のEGFP発現がIVIS-100光学結像によって監視されたことを示す。図22Dは、大腿骨の低温切片が作製され(cryo-sectioned)、EGFP発現が蛍光顕微鏡法によって査定されたことを示す。図22Eおよび22Fは、EGFP発現骨芽細胞(OB)、骨細胞(OC)および成熟破骨細胞(OC)の高倍率画像を示す。図22Gにおいて、低温切片が作製された大腿骨もまた、抗Bglap抗体で免疫染色されて成熟破骨細胞が同定された。TB、骨梁; BM、骨髄; GP、成長板; CB、皮質骨。スケールバー: 500 μm (図22D); 100 μm (図22E); 75 μm (左)および25 μm (中央、右)(図22F); および25 μm (図22G)。

【0053】

【図23A - D】図23A~23Kは、骨芽細胞におけるShn3の誘導欠失が成体マウスにおいて骨発生(bone accrual)を増大させることを示す。図23A~23Dにおいて、 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9-Egfpの単回用量が2月齢オスマウス中へ静脈内(i.v.)注射された。図23Aは、注射から2週間してIVIS-100光学結像によって監視された個々の組織におけるEGFP発現を示す。y軸、放射効率($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}/\mu\text{W/cm}^2$)。図23Bおよび23Cは、低温切片が作製された心臓および肝臓(23B)および大腿骨(23C、右に高倍率)におけるEGFP発現を示す。図23Dは、抗EGFP抗体での組織溶解物の免疫プロットである。

【図23E - H】図23E~23Gにおいて、2月齢メスOcn-Ert; Rosa^{mT/mG}およびShn3^{Ocn-Ert}; Rosa^{mT/mG}マウスが100mg/kg タモキシフェンで5日連続して処置された。図23Eにおいて、2月後に大腿骨の低温切片が作製されて、EGFPを発現する骨芽細胞が同定された。図23Fおよび23Gは、マイクロCT(図23F)および相対的な定量化(図23G)によって査定された代表的な大腿骨骨梁量の3D構築体を示す。骨梁体積/総体積(Tb.BV/TV)、骨梁幅(trabecular thickness)(Tb.Th)、立方ミリメートルあたりの骨梁数(trabecular number)(Tb.N)、および骨梁間隔(trabecular space)(Tb.Sp)(n=6/群)。図23H~23Kにおいて、 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9-EgfpまたはscAAV9-Creの単回用量が3月齢オスShn3^{f1/f1}; Rosa^{mT/mG}マウス中へi.v.注射された。図23Hは、処置から2月後にHprt発現に対して正規化された、脛骨RNA中のCreおよびShn3 mRNAレベルを示す。

【図23I - K】図23Iは、EGFPを発現する細胞を同定するための、低温切片が作製された大腿骨に対する蛍光顕微鏡法を示し(図23I)、大腿骨の骨梁量がマイクロCTによって査定された。図23Jは代表的な3D再構成体を示し、図23Kは相対的な定量化を示す。骨梁量(Trabecular bone volume)/総体積(Tb.BV/TV)、骨梁幅(Tb.Th)、立方ミリメートルあたりの骨梁数(Tb.N)、および連続密度(consecutive density)(Conn.Dn)(n=6/群)。スケールバー: 50 μm (23B); 500 μm (左)、75 μm (右)(23C); 25 μm (23E); 1mm(23Fおよび23J); 250 μm (23I)。値は平均 \pm 標準偏差を表す: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; および***, $P < 0.001$ 、独立(unpaired)両側(2tailed)スチューデントt検定による(23G、23H、および23K)。

【0054】

【図24A - B】図24A~24Kは、組織的に(systematically)送達されたAAV9によるSHN3のサイレンシングが骨形成を促進することを示す。図24Aは、CMVエンハンサー/ニワトリ α -アクチンプロモーター(CB)、amiR-ctrlまたはamiR-shn3、Egfpレポーター遺伝子(EGFP)、 β -グロビンポリA配列(PA)、および逆方向末端反復(ITR)を含有するscAAV9構築物の図表を示す。図24B~24Dにおいて、amiR-ctrlまたはamiR-shn3をコードするscAAV9の2月齢オスマウスの膝関節中への関節内(i.a.)注射から2週間後、EGFP発現が、低温切片が作製された大腿骨のIVIS 100光学結像(図24B)および蛍光顕微鏡法(図24C)によって査定された。

【図24C - D】図24B~24Dにおいて、amiR-ctrlまたはamiR-shn3をコードするscAAV9の

2月齢オスマウスの膝関節中への関節内(i.a.)注射から2週間後、EGFP発現が、低温切片が作製された大腿骨のIVIS 100光学結像(図24B)および蛍光顕微鏡法(図24C)によって査定された。図24Dにおいて、EGFPタンパク質(上)およびhprtに対して正規化されたshn3 mRNAs(下)のレベルが、大腿骨から蛍光活性セルソート(FACS)でソートされたEGFPを発現する細胞において査定された。

【図24E-H】図24E~24Fにおいて、amiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つscAAV9の2月齢メスマウスの膝関節中へのi.a.注射から2月後、大腿骨の骨梁量がマイクロCTによって査定された。代表的な3D再構成体(図24E)および相対的な定量化(図24F)が表示される(n=6/群)。図24G~24Kにおいて、amiR-ctrlまたはamiR-shn3をコードする 4×10^{11} ゲノムコピーのAAV9の単回用量が3月齢メスマウス中へi.v.注射された。2月後にshn3 mRNAレベルが脛骨RNAにおいて測定されhprtに対して正規化された(図24G、n=8/群)。大腿骨の骨梁量がマイクロCTによって測定された。代表的な3D再構成体(図24H)および相対的な定量化(図24I)が表示される(n=8/群)。

【図24I-K】代表的な3D再構成体(図24H)および相対的な定量化(図24I)が表示される(n=8/群)。代表的なカルセイン/アリザリンレッド標識化(図24J)ならびにBFR/BS、MAR、およびOb.S/BSの相対的な組織形態計測的定量化が表示される(図24K)。矢印はカルセインとアリザリンレッドとの標識化間の距離を指し示す。BFR/BS、骨形成速度/骨表面；MAR、骨石灰化添加速度(mineral apposition rate)；Ob.S/BS、骨芽細胞表面/骨表面。GP、成長板；BM、骨髄；TB、骨梁。スケールバー：250 μ m、(図24C)；1mm(図24Eおよび24H)；50 μ m(図24J)。値は平均 \pm SDを表す；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ ；および****、 $P < 0.0001$ 、独立両側学生t検定による(図24F、24G、24I、および24K)。

【0055】

【図25A-E】図25A~25Jは、全身的に送達されたAAV9によるShn3のサイレンシングが閉経後骨粗鬆症のマウスモデルにおける骨喪失を防止することを示す。図25A~25Bは、偽手術またはOVX手術が3月齢メスShn3^{+/+}およびShn3^{-/-}マウスに実施されたこと、2月後に大腿骨の骨梁量がマイクロCTによって査定されたことを示す。代表的な大腿骨の画像(図25A)および相対的なBV/TV(図25B)が表示される(n=6/群)。図25Cは当該研究および処置方法の図表を示す。偽手術またはOVX手術が3月齢メスマウスに実施され、6週後にamiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つ 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9の単回用量がi.v.注射された。注射から7週後、大腿骨の低温切片が作製されてEGFPを発現する細胞が同定された(図25D)。脛骨中のshn3 mRNAレベルがhprtに対して正規化された後に表示される(n=8~12/群)(図25E)。

【図25F-I】大腿骨の骨梁量がマイクロCTによって査定された。代表的な3D再構成体(図25F)および相対的な定量化(図25G)が表示される(n=7~8/群)。カルセイン/アリザリンレッド標識化の代表的な画像(図25H)ならびにBFR/BSおよびMARの相対的な組織形態計測的定量化(図25I)。矢印はカルセインとアリザリンレッドとの標識化間の距離を指し示す。

【図25J】曲げ剛性、曲げモーメント、見掛けの曲げ弾性率、および見掛けの曲げ応力を包含する、大腿骨の生体力学特性が定量された(n=5~9/群)(図25J)。スケールバー：1mm、(25Aおよび25F)；250 μ m、(図25D)；および50 μ m、(図25H)。値は平均 \pm SDを表す；N.S.、有意ではない；*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ ；および****、 $P < 0.0001$ 、独立両側学生t検定による(図25B)、ならびに一元配置(one-way)ANOVA検定(図25E、25G、25I、および25J)。

【0056】

【図26A-B】図26A~26M：骨ホーミング(bone-homing)AAV9.DSS-Nterカプシドは、Shn3のサイレンシングを媒介することで閉経後骨粗鬆症のマウスモデルにおける骨喪失を防止する。図26Aは、論理的に設計された骨特異的AAVカプシドのための構築物の図表である。骨標的化ペプチドモチーフ(DSS、赤色)が、Q588とA589との間のAAV9カプシド(DSS-588)中へ、またはAAV9-VP2のN末端にて(DSS-Nter)挿入された。cap：カプシドタンパク質。図26Bおよび26Cは、異なる濃度のscAAV9、scAAV9.DSS-587、またはscAAV9.DSS-Nterでの感染から2日後、COBsが骨原性条件下6日間培養されたことを示す。

【図26C-D】EGFP発現が抗EGFP抗体での免疫プロットティング(図26B)または蛍光顕微

鏡法(図26C)によって査定された。ALP活性がファスト青染色によって査定された(図26C)。図26D~26Hは、 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9またはscAAV9.DSS-Nterの単回用量が2月齢オスマウス中へi.v.注射されたことを示す。個々の組織におけるEGFP発現が、注射から2週間してIVIS-100光学結像によって監視された(図26D)。

【図26E-H】免疫プロットは、組織溶解物中のEGFP発現(図26E)およびImage Jソフトウェアによる相対的な定量化(図26F、n=3/群)を示す。蛍光顕微鏡法が、低温切片が作製された大腿骨に実施されてEGFPを発現する細胞が同定され(図26G)、大腿骨の骨表面あたりのEGFPを発現する細胞数がImage Jソフトウェアによって定量化された(図26H、n=5/群)。

【図26I-L】(図26I~26M)は、偽手術またはOVX手術が3月齢女性メスマウスに実施されたことを示す。6週後に、amiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つ 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9.DSS-Nterの単回用量がi.v.注射された。注射から7週後、脛骨中のshn3 mRNAレベルが査定された(図26I、n=10/群)。大腿骨および腰椎の骨梁量がマイクロCTによって査定された。

【図26M】定量化(図26Jおよび26M)および代表的な3D再構成体(図26Kおよび26L)が表示される(n=6~8/群)。GP、成長板；BM、骨髄；TB、骨梁。スケールバー：100 μ m、(図26Cおよび26G)；1mm、(図26Kおよび26L)。値は平均 \pm SDを表す：N.S.、有意ではない；*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ ；および****、 $P < 0.0001$ 、独立両側スチューデントt検定による(図26Fおよび26H)、ならびに一元配置ANOVA検定(図26I、26J、および26M)。

【0057】

【図27】図27A~27Cは、骨芽細胞、破骨細胞、および軟骨細胞をin vitroで形質導入するscAAV血清型の同定を示す。頭蓋冠骨芽細胞(COBs、図27A)、骨髄由来破骨細胞前駆体(BM-OPC、図27B)、または軟骨形成細胞株(ATDC5、図27C)がPBSまたは14の異なるAAV血清型で処置された。2日後にEGFP発現が蛍光顕微鏡法によって監視された。スケールバー：100 μ m。

【0058】

【図28】図28A~28Bは、骨および軟骨を形質導入するscAAV血清型の同定を示す。PBSまたは 1×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9-EGFPの単回用量が2月齢オスマウスの膝関節中へ関節内(i.a.)注射された。膝関節(図28A)および大腿骨(図28B)の低温切片が作製されたことで、EGFPを発現する細胞が同定された。DAPIが核を染色するために使用された。AC、関節軟骨；M、筋肉；CB、皮質骨；BM、骨髄。スケールバー：100 μ m、パネル(図28A；250 μ m、図28B)。

【0059】

【図29A】図29A~29Dは、マウスにおいて組織的に送達されるscAAV9の組織分布を示す。図29Aおよび29Bは、PBSまたは 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9-EGFPの単回用量が2月齢オスマウス中へ静脈内(i.v.)注射され、EGFP発現が注射から2週間してIVIS-100光学結像によって監視されたことを示す。

【図29B-D】全身のEGFP発現(図29A)および図28Aに示される解剖された組織のEGFP発現の定量化が表示される(図29B)。PBS注射が陰性対照として使用された。図29Cおよび29Dは、PBS-またはrAAV9-EGFP-注射マウスから解剖された組織の低温切片が作製されたことで、EGFPを発現する細胞の位置が特定された(locate)ことを示す。スケールバー：100 μ m、図29C；500 μ m、図29D。

【0060】

【図30】図30は、大腿骨において組織的に送達されるscAAV9の分布を示す。 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9-EGFPの単回用量が2月齢オスマウス中へi.v.注射され、EGFP発現が注射から2週間して、低温切片が作製された大腿骨において査定された。L、靭帯；GP、成長板；AC、関節軟骨；BM、骨髄；CB、皮質骨；P、膝蓋骨；M、筋肉。スケールバー：100 μ m。

【0061】

【図3 1 A - B】図31A~31Eは、Shn3^{fl/fl}骨芽細胞におけるscAAV9-Creのin vitroでの特徴付けを示す。図31Aは、CMVエンハンサー/ニワトリ β -アクチンプロモーター(CB)、EGFPレポーター遺伝子(EGFP)、またはCreリコンビナーゼ(Cre)、 β -グロビンポリA配列(PA)、および逆方向末端反復(ITR)を含有するrAAV9構築物の図表を示す。図31Bは、COBsがscAAV9-EGFPまたはscAAV9-Creで2日間感染させられ、細胞が溶解されて、指し示される抗体で免疫プロットされたことを示す。

【図3 1 C - E】図31C~31Eは、scAAV9-EGFPまたはscAAV9-Creでの処置から2日後、COBsが骨原性条件下6日間培養され、Shn3のmRNAレベル(図31C)および骨原性遺伝子(図31D)がRT-PCRによって測定されたことを示す。培養21日後、骨石灰化(mineralization)がアリザリンレッド染色によって査定された(図31E)。値は平均 \pm SDを表す：***、 $P < 0.001$ 、独立両側スチューデントt検定による(図31Cおよび31D)。

【0062】

【図3 2 A - B】図32A~32Cは、骨芽細胞においてamiR-shn3を持つscAAV9のin vitroでの特徴付けを示す。amiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つscAAV9での処置から2日後、COBsが骨原性条件下で培養された。

【図3 2 C】EGFP発現(図32A)、Shn3のmRNAレベルおよび骨原性遺伝子(図32B)、ならびに骨石灰化(図32C)が夫々、蛍光顕微鏡法、RT-PCR、およびアリザリンレッド染色によって査定された。スケールバー：100 μ m、(図32A)。値は平均 \pm SDを表す：*、 $P < 0.05$ ；***、 $P < 0.001$ ；および****、 $P < 0.0001$ 、独立両側スチューデントt検定による(図32Bおよび32C)。

【0063】

【図3 3 A - B】図33A~33Fは、amiR-shn3を持ち組織的に送達されるscAAV9で処置されたマウスの特徴付けを示す。amiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つ 4×10^{11} ゲノムコピー-scAAV9の単回用量が3月齢メスマウス中へi.v.注射された。処置から2月後、動的な(dynamic)組織形態計測のためマウスがカルセインおよびアリザリンレッドで標識された。非標識マウスが、IVIS-100光学結像を使用してEGFP発現を監視するために使用された。全身のEGFP発現(図33A)および解剖された組織(図33B)表示される。

【図3 3 C - F】大腿骨の低温切片が作製されたことで、EGFPを発現する骨芽細胞系列細胞が同定された(図33C)。amiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つscAAV9で処置された5月齢メスマウス(n=6~7)からの大腿骨のTRAP染色縦断面(図33D)および組織形態計測的分析(図33E)。骨周囲長あたりの破骨細胞数(N.Oc/B.Pm)。血清CTXレベルがELISAによって査定された(n=6)(図33F)。スケールバー：100 μ m、図33C；50mm、図33D。値は平均 \pm SDを表す；N.S.、有意ではない、独立両側スチューデントt検定による(図33Eおよび33F)。

【0064】

【図3 4】図34A~34Cは、閉経後骨粗鬆症のマウスモデルにおいて組織的に送達されたscAAV9-amiR-shn3の治療効果を示す。偽手術またはOVX手術が3月齢女性メスマウスに実施され、6週後にamiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つ 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9の単回用量がi.v.注射された。注射から7週後、動的な組織形態計測のためマウスがカルセインおよびアリザリンレッドで標識された。フォン・コッサ(図34A)またはTRAP(図34B)による染色が、amiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つscAAV9で処置された5月齢メスOVXマウスからの大腿骨の縦断面において実施された。血清CTXレベルがELISAによって査定された(n=7)(図34C)。スケールバー：1mm、(図34A)；50mm、(図34B)。値は平均 \pm SDを表す；NS、有意ではない、***、 $P < 0.001$ および****、 $P < 0.0001$ 、独立両側スチューデントt検定による(図34C)。

【0065】

【図3 5 A - B】図35A~35Cは、scAAV9.DSSベクターのin vitroまたはin vivoでの特徴付けを示す。(図35A) 1×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9-Egfp、scAAV9.DSS-588-Egfp、またはrAAV9.DSS-Nter-Egfpの単回用量が2月齢オスマウスの膝関節中へi.a.注射され、大腿骨の低温切片が作製されたことで、注射から2週間してEGFPを発現する細胞が同定された。GP、成長板；CB、皮質骨；BM、骨髄。スケールバー：500 μ m、図35A。

【図3 5 C】図35Bおよび35Cは、scAAV9-Egfp、scAAV9.DSS-588-Egfp、またはscAAV9.DSS

10

20

30

40

50

-Nter-Egfpでの感染から2日後、COBsが骨原性条件下6日間培養されたことを示す。骨芽細胞分化がALP活性(図35B)および骨原性遺伝子発現(図35C)によって査定された。値は平均±SDを表す：N.S、非有意ではない、一元配置ANOVA検定による(図35Bおよび35C)。

【0066】

【図36A-B】図36A~36Eは、マウスにおいて組織的に送達されたscAAV9.DSS-Nterの組織分布を示す。PBSまたは 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9、scAAV9.DSS-588、またはscAAV9.DSS-Nterの単回用量が2月齢オスマウス中へi.v.注射され、EGFP発現が注射から2週間して、IVIS-100光学結像を使用し監視された。

【図36C-E】全身のEGFP発現(図36A)および解剖された組織のEGFP発現の定量化(図36B)が表示される。心臓(図36C)、肝臓(図36D)、および腰椎(図36E)の低温切片が作製されたことでEGFPを発現する細胞が同定された。GP、成長板；BM、骨髄。スケールバー：100 μm、(図36C、36D、および36E)。値は平均±SDを表す：*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ および***、 $P < 0.001$ 、一元配置ANOVA検定による(図36B)。

10

【0067】

【図37A-B】図37A~37Cは、閉経後骨粗鬆症のマウスモデルにおいて、amiR-shn3を持ち組織的に送達されたscAAV9.DSS-Nterの治療効果を示す。偽手術またはOVX手術が3月齢メスマウスに実施され、6週間後にPBSまたはamiR-ctrlもしくはamiR-shn3を持つ 4×10^{11} ゲノムコピーのscAAV9.DSS-Nterの単回用量がi.v.注射された。注射から7週間後、EGFP発現がIVIS-100光学結像によって監視された(図37A)。低温切片が作製された大腿骨中のEGFPを発現する細胞が蛍光顕微鏡法によって同定された(図37B)。

20

【図37C】腰椎の骨梁量がマイクロCTによって査定され、定量化が表示される($n=7 \sim 8$ /群)(図37C)。立方ミリメートルあたりの骨梁数(Tb.N)、骨梁幅(Tb.Th)、および骨梁間隔(Tb.Sp)。TB、骨梁；BM、骨髄。スケールバー：100mm、パネルb。値は平均±SDを表す：N.S.、有意ではない；*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ 、一元配置ANOVA検定による(図37C)。

【発明を実施するための形態】

【0068】

詳細な記載

本開示の側面は、対象へ送達されたとき、例えば、骨形成を促進もしくは阻害することによって、および/または骨再吸収を促進もしくは阻害することによって、骨代謝を調整するのに有効な組成物(例として、単離された核酸、rAAVs等々)に関する。結果的に、本開示によって記載される方法および組成物は、いくつかの態様において、骨粗鬆症、炎症誘発骨喪失、乳房または前立腺のがん転移によって誘発される骨喪失、大理石骨病、骨肉腫、および異所性骨化などの、調節不全の骨代謝に関連する疾患および障害の処置にとって有用である。

30

【0069】

単離された核酸

導入遺伝子(例として阻害性RNA、たとえばshRNA、miRNA等々)を対象へ送達するための組成物および方法が、本開示において提供されている。組成物は、典型的には、骨代謝を調整することが可能な導入遺伝子(例として、タンパク質、阻害性核酸等々)をコードする単離された核酸を含む。例えば、いくつかの態様において、導入遺伝子は、骨形成の促進または阻害に関連する標的タンパク質などの標的タンパク質の発現を低下させる。

40

【0070】

「骨代謝」は一般に、骨形成および/または骨再吸収を伴う生物学的プロセスを指す。いくつかの態様において、骨代謝は、骨芽細胞(OBs)および分化した骨細胞によって産生されるとおりの新しい骨、および/または破骨細胞(OCs)によって再吸収されつつある成熟した骨組織の形成を伴う。OBsは、最終分化して結局は骨細胞になる骨髄由来間葉細胞から生じる。OB(および骨細胞)の機能または活性は、これらに限定されないが、骨形成、骨石灰化(bone mineralization)、およびOC活性の調節を包含する。減少した骨量は、OBおよび/または骨細胞の機能あるいは活性の阻害が原因となることが観察されている。増加

50

した骨量は、OBおよび/または骨細胞の増大した機能あるいは活性が原因となることが観察されている。OCsは骨髄由来単球から生じ、いくつかの態様において、OBsからのシグナルによって制御されることが観察されている。OCの機能は骨再吸収を包含する。いくつかの態様において、減少した骨量は、増大したOC活性が原因であることが観察されている。いくつかの態様において、増大した骨量は、OC活性の阻害が原因となることが観察されている。

【0071】

いくつかの態様において、本開示によって記載されるとおりの単離された核酸またはrAAVは、少なくとも1つの骨代謝調整剤(例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはこれより多くの骨代謝調整剤)をコードする導入遺伝子を含む。本明細書に使用される
10
とき、「骨代謝調整剤」は、例えば、骨形成もしくは骨再吸収に關与するタンパク質、細胞等々の発現、活性、および/または機能を増大あるいは減少させることによって、骨形成もしくは骨沈着の誘発または阻害のいずれかをする分子(核酸、または核酸、例として導入遺伝子によってコードされるタンパク質)を指す。一般に、骨代謝調整剤は、ペプチド、タンパク質、または干渉核酸(例として、dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、人工miRNA等々)であり得る。いくつかの態様において、骨代謝調整剤は、骨形成誘発剤である。いくつかの態様において、骨代謝調整剤は、骨形成阻害剤である。

【0072】

「骨形成誘発剤」は、OBおよび/または骨細胞(OCY)の分化または活性の促進、および/またはOC活性の阻害のいずれかによって、骨合成を促進する分子を指す。いくつかの態様
20
において、骨形成誘発剤は、核酸(例として、RNAiオリゴヌクレオチドまたはmiRNAオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド)、あるいはOBおよび/または骨細胞の機能または活性(例として、骨形成、骨石灰化、破骨細胞の活性または機能の調節等々)を促進する核酸(例として、導入遺伝子)によってコードされるタンパク質である。いくつかの態様において、OBおよび/または骨細胞の活性あるいは機能を促進する骨形成誘発剤の例は、これらに限定されないが、副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH関連タンパク質(PTHrP)、デグリカーゼDJ1を包含する。いくつかの態様において、骨形成誘発剤は、スクレロスタチン(SOST)、schnurri-3(SHN3)、カテプシンK(CTSK)等々を標的にする阻害性核酸などの、OCの分化または活性を阻害する阻害性核酸である。

【0073】

「骨形成阻害剤」は、OBおよび/または骨細胞の分化または活性を阻害するか、および/またはOCの分化、活性、もしくは機能を増大させる分子を指す。いくつかの態様において
30
、骨形成阻害剤は、核酸(例として、RNAiオリゴヌクレオチドまたはmiRNAオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド)、あるいはOBおよび/または骨細胞の分化または活性を阻害する核酸(例として、導入遺伝子)によってコードされるタンパク質である。いくつかの態様において、OBおよび/または骨細胞の活性あるいは機能を阻害する骨形成阻害剤の例は、これらに限定されないが、MAPKインヒビター、および炎症促進性サイトカイン(例として、腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)等々)を包含する。いくつかの態様において、骨形成阻害剤は、OBおよび/または骨細胞の分化あるいは活性を阻害する阻害性核酸である。
40

【0074】

いくつかの態様において、単離された核酸は、1以上の(例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはこれより多くの)阻害性核酸、例えばdsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、人工マイクロRNA(ami-RNA)等々)をコードする。一般に、阻害性核酸は、骨代謝に關連する遺伝子産物(例として、タンパク質)(例として、PTH、PTHrP、DJ1、SOST、SHN3、CTSK等々)をコードする遺伝子の少なくとも2つの(例として、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはこれより多くの)連続的な塩基へ特異的に結合する(例として、これとハイブリダイズする)。本明細書に使用される
40
とき「連続的な塩基」は、共有結合的に(例として、1以上のホスホジエステル結合等々によって)互いに対し(例として核酸分子の一環として)結合した2以上のヌクレオチ
50

ド塩基を指す。いくつかの態様において、少なくとも1つの阻害性核酸は、骨代謝に関連する遺伝子産物(例として、タンパク質)(例として、PTH、PTHrP、DJ1、SOST、SHN3、CTSK、RANK等々)をコードする遺伝子の2以上の(例として、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはこれより多くの)連続的なヌクレオチド塩基と約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、または約100%同一である。

【0075】

「マイクロRNA」または「miRNA」は、転写のまたは翻訳後の遺伝子サイレンシングを媒介することが可能な小さいノンコーディングRNA分子である。典型的には、miRNAは、ヘアピンまたはステムループ(例として、自己相補性(self-complementarity)、一本鎖の主鎖を有する)二重鎖構造体として転写されるが、酵素的に(例として、Drosha、DGCR8、Pasha等々によって)処理されてpre-miRNAになる一次miRNA(pri-miRNA)と称される。pri-miRNAの長さは変動し得る。いくつかの態様において、pri-miRNAは、約100塩基対から約5000塩基対まで(例として、約100、約200、約500、約1000、約1200、約1500、約1800、または約2000塩基対)の長さに及ぶ。いくつかの態様において、pri-miRNAは、200塩基対の長さを超える(例として、2500、5000、7000、9000、またはこれより多くの塩基対の長さ)。

10

【0076】

Pre-miRNAは、またヘアピンもしくはステムループ二重鎖構造体によっても特徴付けられるが、長さもまた変動し得る。いくつかの態様において、pre-miRNAはサイズが、約40塩基対の長さから約500塩基対の長さまでに及ぶ。いくつかの態様において、pre-miRNAはサイズが、約50塩基対から100塩基対までの長さに及ぶ。いくつかの態様において、pre-miRNAはサイズが、約50塩基対から約90塩基対までの長さに及ぶ(例として、約50、約52、約54、約56、約58、約60、約62、約64、約66、約68、約70、約72、約74、約76、約78、約80、約82、約84、約86、約88、または約90塩基対の長さ)。

20

【0077】

一般に、pre-miRNAは細胞質中へ搬出されて、Dicerによって酵素的に処理されることで最初に不完全なmiRNA/miRNA*二重鎖が、次いで一本鎖の成熟miRNA分子が産生され、これは続いてRNA誘導サイレンシング複合体(RISC)中へロードされる。典型的には、成熟miRNA分子はサイズが、約19塩基対から約30塩基対までの長さに及ぶ。いくつかの態様において、成熟miRNA分子は、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または30塩基対の長さである。

30

【0078】

いくつかの側面において、本開示は、1以上の人工miRNAsをコードする単離された核酸およびベクター(例として、rAAVベクター)を提供する。本明細書に使用されるとき「人工miRNA」または「amiRNA」は、内在性pri-miRNAまたはpre-miRNA(例として、機能的に成熟したmiRNAを産生することが可能な前駆体miRNAであるmiRNA主鎖)を指し、ここでmiRNAおよびmiRNA*(例として、miRNA二重鎖のパッセンジャー鎖)配列は、例えばEamens et al. (2014), Methods Mol. Biol. 1062: 211-224によって記載されるとおり、標的化遺伝子の高効率RNAサイレンシングに向かう、対応するamiRNA/amiRNA*配列に置き換えられている。例えば、いくつかの態様において、人工miRNAは、miR-155 pri-miRNA主鎖を含むが、前記人工miRNA中へは、内在性miR-155成熟miRNAをコードする配列の代わりに、骨代謝を調整するmiRNA(例として、骨形成阻害剤)をコードする配列が挿入されている。いくつかの態様において、本開示によって記載されるとおりのmiRNA(例として、人工miRNA)は、miR-155主鎖配列、miR-30主鎖配列、mir-64主鎖配列、またはmiR-122主鎖配列を含む。

40

【0079】

いくつかの態様において、本開示は、Schnurri-3タンパク質をコードするSHN3遺伝子(GeneID: 59269)を標的にする人工マイクロRNAをコードする導入遺伝子を含む単離された核酸を提供する。Schnurri-3(SHN3)タンパク質は、NK-タンパク質の発現、および免疫グロブリンおよびT細胞受容体抗体の組換えを調節する転写因子である。いくつかの態様において、SHN3遺伝子は、NCBI受託番号NM_001127714.2またはNM_024503.5によって表さ

50

れる。いくつかの態様において、SHN3タンパク質は、NCBI受託番号NP_001121186.1またはNP_078779.2によって表される。

【0080】

いくつかの側面において、本開示は、SHN3発現(例として、SHN3遺伝子からの1以上の遺伝子産物)を低下させるのに使用される人工マイクロRNA、例えば、配列番号69におけるヌクレオチド配列によってコードされるmRNAまたは配列番号70で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするmRNAをコードする導入遺伝子を含む単離された核酸に関する。

【0081】

いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、SHN3遺伝子の少なくとも6個の連続的なヌクレオチドを標的にする(例として、これへ結合するか、または人工マイクロRNAはこれと相補性のある領域を含む)。いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、SHN3遺伝子の6個と30個との間の連続的なヌクレオチドを標的にする(例として、これへ結合するか、または人工マイクロRNAはこれと相補性のある領域を含む)。いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、SHN3遺伝子の12~24個の間の連続的なヌクレオチドを標的にする。いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、SHN3遺伝子の9~27個の間の連続的なヌクレオチドを標的にする。いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、SHN3遺伝子の少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個の連続的なヌクレオチドを標的にする。

【0082】

いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、6~50個の間のヌクレオチドの長さである。いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、8~24個の間のヌクレオチドの長さである。いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、12~36個の間のヌクレオチドの長さである。いくつかの態様において、人工マイクロRNAは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個のヌクレオチドの長さである。

【0083】

いくつかの態様において、単離された阻害性核酸は、50%と99%との間(例として、50%と99%との間(両端含む)のいずれの整数)で標的遺伝子の発現を減少させる。いくつかの側面において、単離された阻害性核酸は、75%と90%との間で標的遺伝子の発現を減少させる。いくつかの側面において、単離された阻害性核酸は、80%と99%との間で標的遺伝子の発現を減少させる。いくつかの態様において、単離された阻害性核酸は、50%と99%との間(例として、50%と99%との間(両端含む)のいずれの整数)でSHN3遺伝子の発現を減少させる。いくつかの態様において、単離された阻害性核酸は、75%と90%との間でSHN3遺伝子の発現を減少させる。いくつかの側面において、単離された阻害性核酸は、80%と99%との間でSHN3遺伝子の発現を減少させる。

【0084】

導入遺伝子を含む領域(例として、第2の領域、第3の領域、第4の領域等々)は、単離された核酸のいずれの好適な場所にて位置付けられていてもよい。領域は、例えばイントロン、5'または3'非翻訳領域等々を包含する、核酸のいずれの非翻訳部分に位置付けられていてもよい。

【0085】

いくつかのケースにおいて、タンパク質をコードする核酸配列(例として、タンパク質コード配列)の最初のコドンの上流領域(例として、第2の領域、第3の領域、第4の領域等々)に位置付けるのが所望されることもある。例えば、領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと、最初のコドンの2000ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと、最初のコドンの1000ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと、最初のコドンの500ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。領域は、

10

20

30

40

50

タンパク質コード配列の最初のコドンと、最初のコドンの250ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。領域は、タンパク質コード配列の最初のコドンと、最初のコドンの150ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。

【0086】

いくつかのケースにおいて(例として、導入遺伝子がタンパク質コード配列を欠くとき)、導入遺伝子のポリAテールの上流領域(例として、第2の領域、第3の領域、第4の領域等々)に位置付けられていることが所望されることもある。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と、最初の塩基の2000ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と、最初の塩基の1000ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と、最初の塩基の500ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と、最初の塩基の250ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と、最初の塩基の150ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と、最初の塩基の100ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と、最初の塩基の50ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。例えば、領域は、ポリAテールの最初の塩基と、最初の塩基の20ヌクレオチド上流との間に位置付けられていてもよい。いくつかの態様において、領域は、プロモーター配列の最後のヌクレオチド塩基と、ポリAテール配列の最初のヌクレオチド塩基との間に位置付けられている。

10

20

【0087】

いくつかのケースにおいて、領域は、導入遺伝子のポリAテールの最後の塩基の下流に位置付けられていてもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と、最後の塩基から2000ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と、最後の塩基から1000ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と、最後の塩基から500ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と、最後の塩基から250ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。領域は、ポリAテールの最後の塩基と、最後の塩基から150ヌクレオチド下流の位置との間にあってもよい。

【0088】

導入遺伝子が1より多くのmiRNAをコードするケースにおいて、各miRNAが導入遺伝子内のいずれの好適な場所に位置付けられていてもよいことは解されるはずである。例えば、第1のmiRNAをコードする核酸は、導入遺伝子のイントロン中に位置付けられていてもよく、第2のmiRNAをコードする核酸配列は、別の非翻訳領域中(例として、タンパク質コード配列の最後のコドンと、導入遺伝子のポリAテールの最初の塩基との間)に位置付けられていてもよい。

30

【0089】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、1以上の発現制御配列(例として、プロモーター等々)をコードする核酸配列をさらに含む。発現制御配列は、適切な転写開始、終止、プロモーター、およびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアダニル化(ポリA)シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定させる配列；翻訳効率を増強する配列(すなわち、コザックコンセンサス配列)；タンパク質安定性を増強する配列；ならびに所望されるとき、コードされた産物の分泌を増強する配列を包含する。ネイティブ、構成的、誘導、および/または組織特異的であるプロモーターを包含する数々の発現制御配列は、当該技術分野において知られており、利用されてもよい。

40

【0090】

「プロモーター」は、細胞の合成装置(synthetic machinery)または導入された合成装置によって認識され、遺伝子の特定の転写を開始させるのに要するDNA配列を指す。句「作動可能に(operatively)位置付けられている」、「制御下」、または「転写制御下」は、プロモーターが、RNAポリメラーゼ開始および遺伝子発現を制御する核酸に関して正確

50

な場所および配向にあることを意味する。

【0091】

タンパク質をコードする核酸につき、ポリアデニル化配列は一般に、導入遺伝子配列の後か3' AAV ITR配列の前に挿入されている。本開示において有用なrAAV構築物はまた、イントロンも含有していてもよく、望ましくはプロモーター/エンハンサー配列と導入遺伝子との間に置かれている。実行可能なあるイントロン配列はSV-40に由来し、SV-40 ITR配列と称される。使用されてもよい別のベクター要素は、配列内リボソーム進入部位(IRES)である。IRES配列は、単一の遺伝子転写産物から1より多くのポリペプチドを産生するために使用される。IRES配列は、1より多くのポリペプチド鎖を含有するタンパク質を産生するために使用されるであろう。これらのおよび他の一般的なベクター要素の選択は従来どおりであり、多くのかかる配列は入手可能である[例として、例えば3.18 3.26および16.17 16.27頁のSambrook et al.およびこれに引用されている参考文献ならびに Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989を参照]。いくつかの態様において、口蹄疫ウイルス2A配列は、ポリタンパク質に包含される；これは、ポリタンパク質の切断を媒介することが示されている小さいペプチド(およそ18アミノ酸の長さ)である(Ryan, M D et al., *EMBO*, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., *J Virology*, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 864-873; およびHalpin, C et al., *The Plant Journal*, 1999; 4: 453-459)。2A配列の切断活性はこれまでに、プラスミドおよび遺伝子治療ベクターを包含する人工系において実証されている(AAVおよびレトロウイルス)(Ryan, M D et al., *EMBO*, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., *J Virology*, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 864-873; およびHalpin, C et al., *The Plant Journal*, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., *Gene Therapy*, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., *Human Gene Therapy*, 2000; 11: 1921-1931.; およびKlump, H et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 811-817)。

10

20

30

40

50

【0092】

構成的プロモーターの例は、限定せずに、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター(任意にRSVエンハンサーとともに)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(任意にCMVエンハンサーとともに)[例として、Boshart et al., *Cell*, 41:521-530 (1985)を参照]、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 α -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、およびEF1 α プロモーター[Invitrogen]を包含する。いくつかの態様において、プロモーターは、増強されたニワトリ α -アクチンプロモーターである。いくつかの態様において、プロモーターは、U6プロモーターである。

【0093】

誘導プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にさせ、外部から(exogenously)供給される化合物、温度などの環境因子、もしくは特定の生理学的状態の存在、例として急性期、具体的な細胞の分化状態によって、または複製している細胞のみにおいて、調節され得る。誘導プロモーターおよび誘導系は、限定せずに、Invitrogen、Clontech、およびAriadを包含する様々な商業的供給源から入手可能である。多くの他の系は記載されており、当業者によって容易に選択され得る。外部から供給されるプロモーターによって調節される誘導プロモーターの例は、亜鉛誘導ヒツジメタロチオネイン(MT)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系(WO 98/10088); エクジソン昆虫プロモーター(No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996))、テトラサイクリン抑制(-repressible)系(Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992))、テトラサイクリン誘導系(Gossen et al., *Science*, 268:1766-1769 (1995)、またHarvey et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)も参照)、RU486誘導系(Wang et al., *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997)およびWang et al., *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997))、ならびにラパマイシン誘導系(Magari et al., *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997))を包含する。これに関

連して有用なこともある誘導プロモーターのさらに他のタイプは、特定の生理学的状態、例として、温度、急性期、具体的な細胞の分化状態によって、または複製している細胞のみにおいて、調節されるものである。

【0094】

別の態様において、導入遺伝子のためにネイティブプロモーターが使用されるであろう。ネイティブプロモーターは、導入遺伝子の発現がネイティブな発現を模倣することが所望されるときに好ましいこともある。ネイティブプロモーターは、導入遺伝子の発現が、時間的もしくは発生的に、または組織特異的なやり方で、または特定の転写刺激に依って、調節されなければならないときに、使用されてもよい。さらなる態様において、エンハンサー要素、ポリアデニル化部位、またはコザックコンセンサス配列などの他のネイティブな発現制御要素もまた、ネイティブな発現を模倣するために使用されてもよい。

10

【0095】

いくつかの態様において、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能を付与する。いくつかのケースにおいて、組織特異的調節配列は、組織特異的なやり方で転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。かかる組織特異的調節配列(例として、プロモーター、エンハンサー等々)は、当該技術分野において周知である。例示の組織特異的調節配列は、これらに限定されないが、以下の組織特異的プロモーター：肝臓特異的チロキシン結合グロブリン(TBG)プロモーター、インスリンプロモーター、グルカゴンプロモーター、ソマトスタチンプロモーター、膵臓ポリペプチド(PPY)プロモーター、シナプシン-1(Syn)プロモーター、クレアチンキナーゼ(MCK)プロモーター、哺乳類デスミン(DES)プロモーター、ミオシン重鎖(α -MHC)プロモーター、または心臓トロポニンT(CTnT)プロモーターを包含する。他の例示のプロモーターは、数ある中でも、ベータ-アクチンプロモーター、B型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996); アルファ-フェトプロテイン(AFP)プロモーター、(Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996))、骨オステオカルシンプロモーター(Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); 骨シアロタンパク質プロモーター(Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996))、CD2プロモーター(Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998)); 免疫グロブリン重鎖プロモーター; T細胞受容体-鎖プロモーター、ニューロンの、たとえばニューロン特異的なエノラーゼ(NSE)プロモーター(Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993))、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター(Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991))、およびニューロン特異的vgf遺伝子プロモーター(Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995))を包含し、これらは当業者にとって明らかなものであろう。

20

30

【0096】

いくつかの態様において、組織特異的プロモーターは、骨組織特異的プロモーターである。骨組織特異的プロモーターの例は、これらに限定されないが、osterix、オステオカルシン、タイプ1コラーゲン 1、DMP1、カテプシンK、Rank等々の、プロモーターを包含する。

【0097】

本開示の側面は、1より多くのプロモーター(例として、2、3、4、5、またはこれより多くのプロモーター)を含む単離された核酸に関する。例えば、タンパク質をコードする第1の領域および阻害性RNA(例として、miRNA)をコードする第2の領域を含む導入遺伝子を有する構築物という文脈において、第1のプロモーター配列(例として、タンパク質コード領域へ作動可能に連結された第1のプロモーター配列)を使用してタンパク質コード領域の発現を推進すること、および第2のプロモーター配列(例として、阻害性RNAをコードする領域へ作動可能に連結された第2のプロモーター配列)をもつ阻害性RNAをコードする領域の発現を推進することが所望されることもある。一般に、第1のプロモーター配列および第2のプロモーター配列は、同じプロモーター配列または異なるプロモーター配列であり得る。いくつかの態様において、第1のプロモーター配列(例として、タンパク質コード領域の発現を推進するプロモーター)は、RNAポリメラーゼIII(polIII)プロモーター配列である

40

50

。polIIIプロモーター配列の非限定例は、U6およびH1プロモーター配列を包含する。いくつかの態様において、第2のプロモーター配列(例として、阻害性RNAの発現を推進するプロモーター配列)は、RNAポリメラーゼII(polIII)プロモーター配列である。polIIプロモーター配列の非限定例は、T7、T3、SP6、RSV、およびサイトメガロウイルスプロモーター配列を包含する。いくつかの態様において、polIIIプロモーター配列は、阻害性RNA(例として、miRNA)をコードする領域の発現を推進する。いくつかの態様において、polIIプロモーター配列は、タンパク質コード領域の発現を推進する。

【0098】

組換えAAVs(rAAVs)

本開示の単離された核酸は、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(rAAVベクター)であってもよい。いくつかの態様において、本開示によって記載されるとおりの単離された核酸は、第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)逆方向末端反復(ITR)またはそのバリエーションを含む領域(例として、第1の領域)を含む。単離された核酸(例として、組換えAAVベクター)は、カプシドタンパク質中へパッケージングされて、対象へ投与されても、および/または選択された標的細胞へ送達されてもよい。「組換えAAV(rAAV)ベクター」は典型的には、最小限、導入遺伝子およびその調節配列、ならびに5'および3' AAV逆方向末端反復(ITRs)から構成される。導入遺伝子は、本明細書のどこかに開示されるとおり、1以上のタンパク質、および/または対象の内在性mRNAを標的にする核酸を含む1以上の阻害性核酸(例として、shRNA、miRNAs等々)をコードする1以上の領域を含んでいてもよい。導入遺伝子はまた、本開示のどこかに記載されるとおり、例えばタンパク質および/または発現制御配列(例として、ポリAテール)をコードする領域も含んでいてもよい。

【0099】

一般に、ITR配列は約145bpの長さである。好ましくは、実質的にITRsをコードする配列全体が分子に使用されるものの、これらの配列のある程度の微修飾は容認できる。これらのITR配列を修飾する能力は、当該技術分野の技能の範囲内である。(例として、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); およびK. Fisher et al., J Virol., 70:520-532 (1996)などのテキストを参照)。本発明に採用されるかかる分子の例は、導入遺伝子を含有する「シス作用性」プラスミドであって、ここで選択された導入遺伝子配列および関連する調節要素は、5'および3' AAV ITR配列の脇に配置されている。AAV ITR配列は、現在同定されている哺乳類AAVタイプを包含する、いずれの知られているAAVから得られたものであってもよい。いくつかの態様において、単離された核酸(例として、rAAVベクター)は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAVrh10、AAVrh39、AAVrh43、AAV2/2-66、AAV2/2-84、AAV2/2-125、およびそれらのバリエーションから選択される血清型を有する少なくとも1つのITRを含む。いくつかの態様において、単離された核酸は、AAV2 ITRをコードする領域(例として、第1の領域)を含む。

【0100】

いくつかの態様において、単離された核酸は、第2のAAV ITRを含む領域(例として、第2の領域、第3の領域、第4の領域等々)をさらに含む。いくつかの態様において、第2のAAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAVrh10、AAVrh39、AAVrh43、AAV2/2-66、AAV2/2-84、AAV2/2-125、およびそれらのバリエーションから選択される血清型を有する。いくつかの態様において、第2のITRは、機能的な末端分解部位(terminal resolution site)(TRS)を欠く突然変異ITRである。用語「末端分解部位を欠く」は、ITRの末端分解部位(TRS)の機能を抑止する突然変異(例として、非同義突然変異などのセンス突然変異、もしくはミスセンス突然変異)を含むAAV ITRか、または機能的TRSをコードする核酸配列を欠くトランケート型AAV ITR(例として、TRS ITR)を指し得る。いずれの具体的な理論によっても拘束されることは望まないが、機能的TRSを欠くITRを含むrAAVベクターは、例えばMcCarthy (2008) Molecular Therapy 16(10):1648-1656によって記載されるとおり、自己相補的rAAVベクターを産生する。

【0101】

10

20

30

40

50

本明細書に使用されるとき、用語「自己相補的AAVベクター」(scAAV)は、AAVのITRsの1つから末端分解部位(TR)の不在によって生成された二本鎖ベクターゲノムを含有するベクターを指す。TRの不在は、TRが存在しないベクター末端にて複製の開始を防止する。一般に、scAAVベクターは、各末端にて野生型(wt)AAV TRをもつ一本鎖の逆方向反復ゲノム、および中央部において突然変異TR(mTR)を生成する。本発明は、RNAヘアピン構造をコードするDNAフラグメント(例としてshRNA、miRNA、およびAmiRNA)が、ウイルスゲノム複製の最中、突然変異逆方向末端反復(mTR)と同様の機能を果たし、自己相補的AAVベクターゲノムを生成し得るという認識に、一部基づく。例えば、いくつかの態様において、本開示は、2つの末端の各々にて逆方向末端反復(ITRs)をもつ一本鎖の自己相補的核酸、およびヘアピン形成RNAをコードする配列(例として、shRNA、miRNA、ami-RNA等々)と作動可能に連結されたプロモーターを含む中央部分を含むrAAV(例として自己相補的AAV; scAAV)ベクターを提供する。いくつかの態様において、ヘアピン形成RNAをコードする配列(例として、shRNA、miRNA、ami-RNA等々)は、通常、突然変異ITRによって占められる自己相補的核酸の位置にて置換されている。

【0102】

「組換えAAV(rAAV)ベクター」は典型的には、最小限、導入遺伝子およびその調節配列、ならびに5'および3' AAV逆方向末端反復(ITRs)から構成される。それが、カプシドタンパク質中へパッケージングされて選択された標的細胞へ送達される、この組換えAAVベクターである。いくつかの態様において、導入遺伝子は、関心のあるポリペプチド、タンパク質、機能的RNA分子(例として、miRNA、miRNAインヒビター)、または他の遺伝子産物をコードするベクター配列に対して異種の核酸配列である。核酸コード配列は、標的組織の細胞における導入遺伝子の転写、翻訳、および/または発現を容認するやり方で、調節性構成要素へ作動可能に連結されている。

【0103】

本開示は、単一のシス作用性野生型ITRを含むベクターを提供する。いくつかの態様において、ITRは、5' ITRである。いくつかの態様において、ITRは、3' ITRである。一般に、ITR配列は、約145bpの長さである。好ましくは、実質的にITR(単数または複数)をコードする配列全体が分子に使用されるものの、これらの配列のある程度の微修飾は容認できる。ITR配列を修飾する能力は、当該技術分野の技能の範囲内である。(例として、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); およびK. Fisher et al., J Virol., 70:520-532 (1996)などのテキストを参照)。例えば、ITRは、その末端分解部位(TR)にて突然変異されていてもよく、これが、TRが突然変異したベクター末端にて複製を阻害して自己相補的AAVの形成をもたらす。本開示に採用されるかかる分子の別の例は、導入遺伝子を含有する「シス作用性」プラスミドであって、ここで選択された導入遺伝子配列および関連する調節要素は、5' AAV ITR配列および3'ヘアピン形成RNA配列の脇に配置されている。AAV ITR配列は、現在同定されている哺乳類AAVタイプを包含する、いずれの知られているAAVから得られたものであってもよい。いくつかの態様において、ITR配列は、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、および/またはAAVrh10 ITR配列である。

【0104】

いくつかの態様において、本開示のrAAVsは、偽型rAAVsである。例えば、Yというタンパク質とともにカプシドで包まれた血清型XのITRsを含有する偽型AAVベクターは、AAVX/Yとして設計される(例としてAAV2/1は、AAV2のITRsおよびAAV1のカプシドを有する)。いくつかの態様において、偽型rAAVsは、あるAAV血清型からのカプシドタンパク質の組織特異的標的能を、別のAAV血清型からのウイルスDNAと組み合わせて、これによって導入遺伝子の標的組織への標的化送達を可能にさせるのに有用なこともある。

【0105】

所望のカプシドタンパク質を有する組換えAAVsを得るための方法は、当該技術分野において周知である。(例えば、US 2003/0138772を参照、この内容はその全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる)。典型的には、方法は、AAVカプシドタンパク質をコ

ードする核酸配列；機能的rep遺伝子；AAV逆方向末端反復(ITRs)および導入遺伝子から構成される組換えAAVベクター；ならびに組換えAAVベクターのAAVカプシドタンパク質中へのパッケージングを容認するのに十分なヘルパー機能を含む宿主細胞を培養することを伴う。いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、AAVのcap遺伝子によってコードされる構造タンパク質である。AAVsは、3つのカプシドタンパク質、ピリオンタンパク質1~3(VP1、VP2、およびVP3と名付けられる)を含み、これらすべてが選択的スプライシングを介して単一のcap遺伝子から転写される。いくつかの態様において、VP1、VP2、およびVP3の分子量は夫々、約87kDa、約72kDa、および約62kDaである。いくつかの態様において、翻訳の際、カプシドタンパク質は、ウイルスゲノムの周囲に球状の60-merタンパク質シェルを形成する。いくつかの態様において、カプシドタンパク質の機能は、ウイルスゲノムを保護し、ゲノムを送達し、および宿主と相互作用することである。いくつかの側面において、カプシドタンパク質は、ウイルスゲノムを組織特異的なやり方で宿主へ送達する。

10

【0106】

いくつかの態様において、AAVカプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAVrh10、AAVrh39、AAVrh43、AAV2/2-66、AAV2/2-84、AAV2/2-125からなる群から選択されるAAV血清型に属する。いくつかの態様において、AAVカプシドタンパク質は、非ヒト霊長目の動物に由来する血清型、例えばscAAV.rh8、AAV.rh39、またはAAV.rh43血清型に属する。いくつかの態様において、AAVカプシドタンパク質は、AAV9血清型に属する。

20

【0107】

本開示は、骨組織への増大した指向性を有するカプシドタンパク質を含むrAAVsに、一部基づく。いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、骨標的化ペプチドへ結び付けられている(grafted)。異種の骨標的化ペプチドは、OCsを標的にする(例として、OBsと比べて、特異的にまたは優先的にOCsを標的にする)こともあり、またはOBsを標的にする(例として、OCsと比べて、特異的にまたは優先的にOBsを標的にする)こともある。いくつかの態様において、骨標的化ペプチドは、(AspSerSer)₆ペプチドであって、これはまたDS S₆ペプチド(例として配列番号16)とも称されることがある。追加の骨標的化ペプチドは、HABP-19ペプチド(C EPRR EVA EL EPRR EVA EL；配列番号17)であって、これはまたHABPペプチドとも称されることがある。いくつかの態様において、骨標的化ペプチドは、8~14アスパラギン酸残基を含む(Asp)₈₋₁₄ペプチド(例として、配列番号57~63で表されるとおり)である。骨標的化ペプチドのさらなる例は、これらに限定されないが、Ouyang et al. (2009) Lett. Organic Chem 6(4) : 272-277によって記載されるものを包含する。いくつかの態様において、骨標的化ペプチドは、配列番号16、17、57、58、59、60、61、62、および63で表される配列を含む。

30

【0108】

本明細書に使用されるとき、「結び付けること(grafting)」は、ある分子を別の分子と結び合わせる(joining)か、または一体化させること(uniting)を指す。いくつかの態様において、結び付けるという用語は、少なくとも2つの分子の一方が、少なくとも2つの分子のもう一方の内に挿入されるような、少なくとも2つの分子の結び合わせまたは一体化を指す。いくつかの態様において、結び付けるという用語は、少なくとも2つの分子の一方が、少なくとも2つの分子のもう一方へ付加されるような、少なくとも2つのポリマー分子の結び合わせまたは一体化を指す。いくつかの態様において、結び付けるという用語は、一方のポリマー分子(例として、核酸、ポリペプチド)の、もう一方のポリマー分子(例として、核酸、ポリペプチド)との結び合わせまたは一体化を指す。いくつかの態様において、結び付けるという用語は、少なくとも2つの分子の一方が、少なくとも2つの核酸分子のもう一方へ付加されるような、少なくとも2つの核酸分子の結び合わせまたは一体化を指す。

40

【0109】

いくつかの態様において、結び付けるという用語は、少なくとも2つの核酸分子の一方

50

が、少なくとも2つの核酸分子のもう一方の内に挿入されるような、少なくとも2つの核酸分子の結び合わせまたは一体化を指す。例えば、標的化ペプチドはVP2 AAVカプシドタンパク質をコードする核酸のある遺伝子座へ結び付けられていてもよいことが観察されている。いくつかの態様において、標的化ペプチド(例として骨標的化ペプチド)は、AAV2またはAAV9 VP2カプシドタンパク質のQ588とA589および/またはN587とR588をコードするコドン間の位置に対応する位置にて挿入されている。いくつかの態様において、標的化ペプチドは、VP3カプシドタンパク質のN587とR588をコードするコドン間の位置(またはAAV2もしくはAAV9におけるかかるアミノ酸位置に対応する位置)にて挿入されている。いくつかの態様において、標的化ペプチドは、VP1カプシドタンパク質のS452とG453をコードするコドン間の位置にて挿入されている。見込みのある他の位置はN587とR588であり得る。

10

【0110】

いくつかの態様において、結び付けることを通して形成された核酸(結び付けられた核酸)は、キメラタンパク質をコードする。いくつかの態様において、結び付けられた核酸は、一方のポリペプチドがもう一方のポリペプチド中へ有効に挿入され(例として、N末端の前またはC末端の後に直接抱合されない)、これによって2つのポリペプチドの連続した融合が生み出されるように、キメラタンパク質をコードする。いくつかの態様において、結び付けられた核酸は、一方のポリペプチドがもう一方のポリペプチドへ有効に付加され(例として、N末端の前またはC末端の後に直接抱合される)、これによって2つのポリペプチドの連続した融合が生み出されるように、キメラタンパク質をコードする。いくつかの態様において、結び付けるという用語は、少なくとも2つのポリペプチドまたはそれらのフラグメントの一方が、少なくとも2つのポリペプチドまたはそれらのフラグメントのもう一方の内に挿入されているような、少なくとも2つのポリペプチドもしくはそれらのフラグメントの結び合わせまたは一体化を指す。いくつかの態様において、結び付けるという用語は、少なくとも2つのポリペプチドまたはそれらのフラグメントの一方が、少なくとも2つのポリペプチドまたはそれらのフラグメントのもう一方へ付加されているような、少なくとも2つのポリペプチドもしくはそれらのフラグメントの結び合わせまたは一体化を指す。

20

【0111】

いくつかの態様において、本開示は、1以上の骨標的化部分へ抱合されたアデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質に関する。「骨標的化成分」は、一般に、rAAVの骨または骨組織への輸送(trafficking)を容易にする小分子、ペプチド、核酸等々を指す。例えば、いくつかの態様において、骨標的化成分は、骨の細胞(例として、OB、OC、骨細胞等々)上の受容体へ結合するペプチドまたは小分子である。骨標的化部分の例は、これらに限定されないが、アレンドロナート(ALE)、環状のアルギニン-グリシン-アスパラギン酸-チロシン-リシン(CRGCyK)、Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp(D-Asp8)などのポリペプチド、およびCH6などのアダプターを包含する。骨標的化成分は、カプシドタンパク質へ直接抱合されていてもよく、またはカプシドタンパク質へリンカー分子(例として、アミノ酸リンカー、PEGリンカー等々)を介して抱合されていてもよい。

30

【0112】

いくつかの態様において、リンカーは、グリシンに富むリンカーである。いくつかの態様において、リンカーは、少なくとも2つのグリシン残基を含む。いくつかの態様において、リンカーは、GGGGS(配列番号64)を含む。いくつかの態様において、リンカーは、 $[G]_n$ (配列番号65)、 $[G]_nS$ (配列番号66)、 $[GS]_n$ (配列番号67)、および $[GGSG]_n$ (配列番号68)からなる群から選択される式を含み、ここでGは、グリシンであり、およびここでnは、1を超える(例として、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25またはこれより大きい)整数である。いくつかの態様において、nは、2~10、2~20、5~10、5~15、または5~25の範囲にある整数である。結果的に、いくつかの態様において、異種の標的化ペプチドは、リンカーへ抱合されている。

40

【0113】

いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、ADIBO-タグ付けされた骨標的化成分

50

と(例として、カプシドタンパク質-骨標的成分抱合体を形成する「クリックケミストリー」を介して)反応することが可能な1以上のアジド担持非天然アミノ酸を含む。非天然のアジド担持アミノ酸を含むカプシドタンパク質は、例えばZhang et al. (2016) *Biomaterials* 80:134-145によって記載されており、ペプチド抱合のためのADIBOをベースとしたクリックケミストリーの使用は、例えばPrim et al. (2013) *Molecules* 18(8):9833-49によって記載されている。

【0114】

AAVカプシド中にrAAVベクターをパッケージングするために宿主細胞において培養されるべき構成要素は、宿主細胞へtransで提供されてもよい。代替的に、要される構成要素(例として、組換えAAVベクター、rep配列、cap配列、および/またはヘルパー機能)のいずれか1以上が、要される構成要素の1以上を含有するために当業者に知られている方法を使用して改変された安定した宿主細胞によって提供されてもよい。最も好適には、安定したかかる宿主細胞は、要される構成要素(単数または複数)を、誘導プロモーターの制御下に含有するであろう。しかしながら、要される構成要素(単数または複数)は、構成的プロモーターの制御下にあってもよい。好適な誘導および構成的プロモーターの例は、導入遺伝子とともに使用するのが好適な調節要素の考察において、本明細書に提供されている。さらに別の代替手段において、選択される安定した宿主細胞は、選択される構成要素(単数または複数)を、構成的プロモーターの制御下に、および他の選択される構成要素(単数または複数)を、1以上の誘導プロモーターの制御下に含有していてもよい。例えば、293細胞(これは、E1ヘルパー機能を構成的プロモーターの制御下に含有する)に由来するが、repおよび/またはcapタンパク質を誘導プロモーターの制御下に含有する、安定した宿主細胞が生成されてもよい。さらに他の安定した宿主細胞も、当業者によって生成されてよい。

10

20

【0115】

本開示のrAAVを産生するのに要される組換えAAVベクター、rep配列、cap配列、およびヘルパー機能は、いずれの適切な遺伝要素(ベクター)を使用して、パッケージングする宿主細胞へ送達されてもよい。選択される遺伝要素は、本明細書に記載の方法を包含するいずれの好適な方法によっても送達されてよい。本開示のいずれの態様をも構築するために使用される方法は、核酸操作の技能をもつ者らに知られており、遺伝子工学、組換え工学、および合成技法を包含する。例として、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照。同様に、rAAVビリオンを生成する方法は周知であり、好適な方法の選択は本開示に制限はない。例として、K. Fisher et al., *J. Virol.*, 70:520-532 (1993)および米国特許第5,478,745号を参照。

30

【0116】

いくつかの態様において、組換えAAVsは、三重トランスフェクション方法(米国特許第6,001,650等に詳細が記載されている)を使用して産生されてもよい。典型的には、組換えAAVsは、宿主細胞に、AAV粒子中へパッケージングされるための組換えAAVベクター(導入遺伝子を含む)、AAVヘルパー機能ベクター、および補助機能ベクターをトランスフェクトすることによって産生される。AAVヘルパー機能ベクターは、産生能のあるAAVの複製およびカプシド形成のためにtransで機能する「AAVヘルパー機能」配列(すなわち、repおよびcap)をコードしている。好ましくは、AAVヘルパー機能ベクターは、いずれの検出可能な野生型AAVビリオン(すなわち、機能的なrepおよびcap遺伝子を含むAAVビリオン)も生成せず効率的なAAVベクター産生を支持する。本開示との使用に好適なベクターの非限定例は、米国特許第6,001,650号に記載のpHLP19、および米国特許第6,156,303号に記載のpRep6cap6ベクターを包含する(両者とも全体が参照されることにより本明細書に組み込まれる)。補助機能ベクターは、AAV由来にしないウイルスの機能および/またはAAVが複製のために依存する細胞の機能(すなわち「補助機能」)のためのヌクレオチド配列をコードしている。補助機能は、AAV複製に要されるそれらの機能を包含し、限定せずに、AAV遺伝子転写の活性化、時期(stage)特異的AAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、cap発現産物の

40

50

合成、およびAAVカプシド集合に關与するそれらの部分も包含する。ウイルスをベースとした補助機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス タイプ-1以外)、およびワクシニアウイルスなどの、知られているヘルパーウイルスのいずれにも由来し得る。

【0117】

いくつかの側面において、本開示は、トランスフェクトされた宿主細胞を提供する。用語「トランスフェクション」は、細胞による外来DNAの取り込みを指すために使用され、細胞は外来性のDNAが細胞膜の内側に導入されたときに「トランスフェクトされている」。数多のトランスフェクション技法は一般に、当該技術分野において知られている。例として、Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456、Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York、Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier、およびChu et al. (1981) *Gene* 13:197を参照。かかる技法は、ヌクレオチド組込み型ベクターおよび他の核酸分子などの1以上の外来性の核酸を、好適な宿主細胞中へ導入するために使用され得る。

10

【0118】

「宿主細胞」は、関心のある物質を内包しているか、または内包することが可能ないずれの細胞をも指す。しばしば宿主細胞は、哺乳動物の細胞である。いくつかの態様において、宿主細胞は、細菌性細胞、酵母細胞、昆虫細胞(Sf9)、または哺乳類の動物(例として、ヒト、齧歯類の動物、非ヒト霊長目の動物等々)の細胞である。宿主細胞は、AAVヘルパー構築物、AAVミニ遺伝子プラスミド、補助機能ベクター、または組換えAAVsの産生に關連する他のトランスファーDNAのレシピエントとして使用されてもよい。用語は、トランスフェクトされた元の細胞の子孫を包含する。よって、「宿主細胞」は、本明細書に使用されるとき、外来性のDNA配列がトランスフェクトされた細胞を指すこともある。単一の親細胞の子孫が、自然発生的、偶発的、または意図的な突然変異に起因し、形態学において、またはゲノムのもしくは全(total)DNA相補体において、元の親と必ずしも完全に同一ではないこともあることは理解される。

20

【0119】

本明細書に使用されるとき、用語「細胞株」は、*in vitro*で連続的または持続的に成長および分裂することが可能な細胞の集団を指す。しばしば、細胞株は、単一の前駆細胞に由来するクローン集団である。自発的または誘発的な変化が、かかるクローン集団の保管または輸送(transfer)の最中、核型において生じ得ることは、当該技術分野においてさらに知られている。したがって、言及される細胞株に由来する細胞は、祖先細胞または培養物と正確に同一でなくてもよく、言及される細胞株は、かかるバリエーションを包含する。

30

【0120】

本明細書に使用されるとき、用語「組換え細胞」は、生物学的に活性なポリペプチドの転写またはRNAなどの生物学的に活性な核酸の産生に繋がるDNAセグメントなどの外来性のDNAセグメントが導入された細胞を指す。

【0121】

いくつかの側面において、本開示は、カプシドタンパク質と、AAV ITRをコードする第1の領域および導入遺伝子を含む第2の領域を含む単離された核酸とを含む組換えAAVを提供するが、ここで導入遺伝子は、人工マイクロRNAをコードする。人工マイクロRNAは、細胞(例として骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、軟骨細胞)または対象における標的遺伝子の発現を減少させることもある。いくつかの態様において、rAAVは、細胞または対象におけるSHN3の発現を減少させる人工マイクロRNAを含む。

40

【0122】

rAAVは、rAAVの骨細胞(例として、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、軟骨細胞)への標的化を増加させる少なくとも1つの修飾を含んでもよい。rAAVの骨の細胞への標的化を増加させる修飾の非限定例は、異種の骨標的化ペプチド(例として、配列番号16、17、57、58、59、60、61、62、または63のいずれか1つで表されるとおりの)、AAVカプシド血清型(例として、AAV1、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh39、AAVrh4

50

3)を包含する。

【0123】

細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示のrAAVsを使用して、50%と99%との間(例として、50%と99%との間のいずれの整数(両端含む))まで減少することもある。細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示のrAAVsを使用して、75%と90%との間まで減少することもある。細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示のrAAVsを使用して、80%と99%との間まで減少することもある。

【0124】

所望のAAVカプシド中に組換えベクターをパッケージングして本開示のrAAVsをするための上記方法は限定することを意図しておらず、他の好適な方法も当業者には明らかである。

【0125】

投与様式(Modes)および組成物

本開示のrAAVsは、組成物において、当該技術分野において知られているいずれの適切な方法に従っても対象へ送達され得る。例えば、rAAVは、好ましくは生理学的に相溶性のある担体に(例として、組成物に)懸濁されており、対象へ、例として、ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、モルモット、ハムスター、ニワトリ、シチメンチョウ、または非ヒト霊長目の動物(例として、マカク)などの宿主動物へ投与されてもよい。いくつかの態様において、宿主動物は、ヒトを包含しない。

【0126】

哺乳類の動物対象へのrAAVsの送達は、例えば、筋肉内注射によってもよく、または哺乳類の動物対象の血流中への投与によってもよい。血流中への投与は、静脈、動脈、またはいずれの他の脈管(vascular conduit)中への注射によってもよい。いくつかの態様において、rAAVsは、外科術分野において周知の技法である分離式肢灌流を用いて血流中へ投与され、方法は本質的に、当業者にrAAVビリオンの投与に先立ち体循環から肢を分離することを可能にする。米国特許第6,177,403号に記載の分離式肢灌流技法の変形(variant)もまた、筋肉細胞または組織中への形質導入を増強する可能性があるところ、分離された肢の脈管構造中へビリオンを投与するために当業者によって採用され得る。その上、ある場合には、対象の骨(例として、骨組織)へビリオンを送達することが所望されることもある。「骨組織」とは、脊椎動物のすべての骨の細胞および組織、および/または関節(例として、軟骨、体軸の(axial)および体肢の骨等々)を意図する。よって、用語は、これらに限定されないが、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、軟骨細胞等を包含する。組換えAAVsは、注射によって骨中へ、例として、当該技術分野において知られている手術手技を使用し、針、カテーテル、または関連デバイスで、滑液嚢内注射、膝注射、大腿骨髄内注射等々を介して、骨中へ直接送達されてもよい。いくつかの態様において、本開示に記載のとおりrAAVは、静脈内注射によって投与される。いくつかの態様において、rAAVは、筋肉内注射によって投与される。

【0127】

本開示の側面は、カプシドタンパク質をコードする核酸および導入遺伝子を含む組換えAAVを含む組成物に関し、ここで導入遺伝子は、1以上の骨代謝調整剤をコードする核酸配列を含む。いくつかの態様において、核酸は、1以上のAAV ITRsをさらに含む。いくつかの態様において、rAAVは、配列番号1~15のいずれか1つで表される配列(もしくはその相補的な配列)、またはこの一部を含むrAAVベクターを含む。いくつかの態様において、組成物は、薬学的に許容し得る担体をさらに含む。

【0128】

いくつかの態様において、組成物は、カプシドタンパク質およびAAV ITRをコードする第1の領域と導入遺伝子を含む第2の領域とを含む、核酸を含む組換えAAVを含み、ここで導入遺伝子は、SHN3を標的にする人工マイクロRNAをコードする。いくつかの態様において、組換えAAVは、配列番号3で表されるとおりの配列を含む。いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、配列番号16~17または57~63で表されるとおりの異種の骨標的化

10

20

30

40

50

ペプチドをさらに含む。

【0129】

本開示の側面は、細胞におけるSHN3発現を減少する方法を提供する。細胞は、単細胞または細胞の集団(例として、培養物)であってもよい。細胞は、in vivoでの(例として、対象中の)のものであっても、またはin vitroでの(例として、培養物中の)のものであってもよい。対象は、哺乳動物、任意にヒト、マウス、ラット、非ヒト霊長目の動物、ブタ、イヌ、ネコ、ニワトリ、またはウシであってもよい。

【0130】

細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示の単離された核酸、rAAVs、または組成物を使用して、50%と99%との間(例として、50%と99%との間(両端含む)のいずれの整数)まで減少してもよい。細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示の単離された核酸、rAAVs、または組成物を使用して、75%と90%との間まで減少してもよい。細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示の単離された核酸、rAAVs、または組成物を使用して、80%と99%との間まで減少してもよい。

10

【0131】

本開示の組成物は、rAAVを単独で、または1以上の他のウイルス(例として、1以上の異なる導入遺伝子を有する第2のrAAV)と組み合わせて含んでもよい。いくつかの態様において、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはこれより多くの異なるrAAVsを含み、それら各々が1以上の異なる導入遺伝子を有する。

【0132】

好適な担体は、rAAVが向けられる適応症の観点から、当業者によって容易に選択されてもよい。例えば、ある好適な担体は、様々な緩衝溶液とともに製剤化されていてもよい生理食塩水(例として、リン酸緩衝生理食塩水)を包含する。例示の他の担体は、滅菌生理食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、落花生油、ゴマ油、および水を包含する。担体の選択は、本開示に制限されない。

20

【0133】

任意に、本開示の組成物は、rAAVおよび担体(単数または複数)に加えて、防腐剤などの従来他の医薬成分、または化学的安定剤を包含してもよい。好適な例示の防腐剤は、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルパニリン、グリセリン、フェノール、およびパラクロロフェノールを包含する。好適な化学的安定剤は、ゼラチンおよびアルブミンを包含する。

30

【0134】

rAAVsは、所望される組織の細胞をトランスフェクトするのに、かつ十分なレベルの遺伝子輸送および発現を過度な弊害もなく提供するのに十分な量で投与される。従来のかつ薬学的に許容し得る投与ルートは、これらに限定されないが、選択される器官への直接送達(例として、肝臓への門脈内送達)、経口の、吸入(鼻腔内送達および気管内送達を包含する)、眼内の、静脈内の、筋肉内の、皮下の、皮内の、腫瘍内の、および他の非経口の投与ルートを包含する。投与ルートは、所望されるなら、組み合わせられてもよい。

【0135】

具体的な「治療効果」を獲得するのに要されるrAAVビリオンの用量、例として、ゲノムコピー/体重1キログラムあたり(GC/kg)の用量単位(units of dose)は、これらに限定されないが、rAAVビリオン投与ルート、治療効果を獲得するのに要される遺伝子またはRNAの発現レベル、処置されている特定の疾患または障害、および遺伝子またはRNA産物の安定性を包含する数因子に基づき変動するであろう。当業者は、具体的な疾患または障害を有する患者を処置するためのrAAVビリオン用量の範囲を、先述の因子ならびに当該技術分野において周知の他の因子に基づき容易に決定し得る。

40

【0136】

rAAVの「有効量」は、動物を感染させるのに、所望される組織(例として、骨組織)を標的にするのに十分な量である。有効量は、主に、対象の種、年齢(age)、重量、健康状態

50

、および標的にされるべき組織などの因子に依存するであろう、よって動物および組織により変動することもある。例えば、有効量のrAAVは一般に、約 $10^9 \sim 10^{16}$ ゲノムコピーを含有する溶液の約1mlから約100mlまでの範囲にある。いくつかのケースにおいて、約 $10^{11} \sim 10^{13}$ rAAVゲノムコピーの間の投薬量が適切である。ある態様において、 10^{12} または 10^{13} rAAVゲノムコピーは、骨組織を標的にするのに有効である。

【0137】

いくつかの態様において、rAAVの用量は、1暦日あたりわずか一度(例として、24時間周期)対象へ投与される。いくつかの態様において、rAAVの用量は、2、3、4、5、6、または7暦日あたりわずか一度対象へ投与される。いくつかの態様において、rAAVの用量は、1暦週(例として、7暦日)あたりわずか一度対象へ投与される。いくつかの態様において、rAAVの用量は、わずかに隔週で(例として、2暦週周期に一度)対象へ投与される。いくつかの態様において、rAAVの用量は、1暦月あたりにわずか一度(例として、30暦日に一度)対象へ投与される。いくつかの態様において、rAAVの用量は、6暦月あたりわずか一度対象へ投与される。いくつかの態様において、rAAVの用量は、1暦年(例として、365日または閏年では366日)あたりにわずか一度対象へ投与される。

【0138】

いくつかの態様において、rAAV組成物は、具体的に高rAAV濃度で存在する(例として、 $\sim 10^{13}$ GC/mlまたはこれより多くの)組成物中、AAV粒子の凝集を低減するよう製剤化されている。rAAVsの凝集を低減させるための方法は当該技術分野において周知であって、界面活性剤、pH調整薬(adjustment)、塩濃度調整薬等々の添加を包含する。(例として、Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178を参照、この内容は参照により本明細書に組み込まれる。)

【0139】

薬学的に許容し得る賦形剤および担体溶液の製剤は当業者に周知であり、本明細書に記載の具体的な組成物を様々な処置計画に使用するための好適な投薬および処置計画の開発も同様である。

【0140】

典型的には、これらの製剤は、少なくとも約0.1%の活性化化合物またはこれより多く含有していてもよいが、活性成分(単数または複数)のパーセンテージは、もちろん変動してもよく、便宜上、製剤全体の重量もしくは体積の約1%または2%と約70%との間、あるいは80%以上であってもよい。当然ながら、治療的に有用な各組成物中、その量の活性化化合物は、好適な投薬量が化合物の所定単位用量で得られるような形で、調製されることもある。可溶性、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与ルート、製品の貯蔵寿命、ならびに他の薬理的考察(pharmacological considerations)などの因子が、かかる医薬製剤を調製する当業者によって企図されるであろうし、そのため様々な投薬量および処置計画が所望されてもよい。

【0141】

ある状況においては、好適に製剤化された本明細書に開示の医薬組成物中のrAAVベースの治療的構築物を、皮下に、臍臓内に、鼻腔内に、非経口的に、静脈内に、筋肉内に、髄腔内に、大腿骨髄内に、もしくは経口的に、腹腔内に、それとも吸入によって、送達することが所望されるであろう。いくつかの態様において、米国特許第5,543,158号；第5,641,515号、および第5,399,363号(各々具体的にその全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる)に記載のとおり投与モダリティ(modalities)が、rAAVsを送達するために使用されてもよい。いくつかの態様において、好ましい投与様式は、門脈静脈注射による。

【0142】

注射剤の使用に好適な医薬形態は、滅菌注射剤溶液または分散体の即時調製のための、滅菌水性溶液または分散体および滅菌粉末を包含する。分散体はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物においても、ならびに油においても、調製されてよい。保管および使用の通常の条件下、これらの調製物は、微生物の成長を防

止する防腐剤を含有している。多くのケースにおいて、前記形態は、滅菌されており、注射針が容易に通過し得る(easy syringability exists)程度に流動性がある。それは製造および保管の条件下で安定していなければならない、かつ細菌および菌類などの微生物の汚染作用(contaminating action)に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例として、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等)、それらの好適な混合物、および/または植物油を含有する、溶媒あるいは分散媒体であり得る。固有の流動性が、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散体のケースに要される粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持されていてもよい。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされ得る。多くのケースにおいて、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを包含するのが好ましいであろう。注射剤組成物の持続的な吸収は、組成物中、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

10

20

30

40

50

【0143】

注射剤水性溶液の投与につき、例えば、溶液は、必要ならば、好適に緩衝されていてもよく、液体希釈剤とともに、十分な生理食塩水またはグルコースで最初に等張にされてもよい。これらの具体的な水性溶液は、静脈内の、筋肉内の、皮下の、および腹腔内の投与にとくに好適である。この文脈において採用され得る滅菌水性媒体は当業者に知られているであろう。例えば、ある投薬量は1mlの等張NaCl溶液に溶解されてもよく、1000mlの皮下注入液へ加えられるか、または注入予定部位にて注射されるかのいずれかであってもよい、(例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences"15th Edition、1035~1038頁および1570~1580頁を参照)。投薬量におけるいくつかのバリエーションは、宿主の状態に応じて必然的に生じる。投与を担当する人は、いずれの事象においても、個々の宿主にとって適切な用量を決定するのである。

【0144】

滅菌注射剤溶液は、活性rAAVを要される量で、本明細書に列挙される様々な他の成分とともに、適切な溶媒に組み込むこと、要求に応じ、これに続く濾過滅菌によって調製される。一般に、分散体は、様々な滅菌活性成分を、基本的な分散媒体と上に列挙されるものから要される他の成分とを含有する滅菌ビヒクル中へ組み込むことによって調製される。滅菌注射剤溶液の調製のための滅菌粉末のケースにおいて、調製の好ましい方法は、いずれの追加の所望成分をプラスして、これまでに滅菌濾過されたそれらの溶液から活性成分の粉末を生産する真空乾燥および凍結乾燥の技法である。

【0145】

本明細書に開示のrAAV組成物はまた、中性の形態または塩形態でも製剤化されてよい。薬学的に許容し得る塩は、酸付加塩(タンパク質の遊離のアミノ基で形成される)を包含し、これは例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等などの有機酸で形成される。遊離のカルボキシル基で形成される塩はまた、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基にも由来し得る。製剤化の際、溶液は、投薬製剤に適合するやり方で、かつ治療的に有効な量で施されるであろう。製剤は、注射剤溶液、薬物放出カプセル等などの様々な剤形に容易に施される。

【0146】

本明細書に使用されるとき、「担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散培地、ビヒクル、コーティング剤、希釈剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤(buffers)、担体溶液、懸濁液、コロイド等を包含する。医薬活性物質のためのかかる媒体および剤の使用は、当該技術分野において周知である。補助活性成分もまた、組成物中へ組み込まれ得る。句「薬学的に許容し得る」は、宿主へ投与されたとき、アレルギー反応または同様の有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。

【0147】

送達ビヒクル、たとえば、リポソーム、ナノカプセル、マイクロ粒子、ミク로스フェア、脂質粒子、ベシクル等は、本開示の組成物の、好適な宿主細胞中への導入のために使用されてもよい。とりわけ、rAAVベクターに送達される導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、ベシクル、ナノスフェア、もしくはナノ粒子、または同種のもののいずれかにカプセル化されて送達されるために製剤化されてもよい。

【0148】

かかる製剤は、本明細書に開示の核酸またはrAAV構築物の薬学的に許容し得る製剤の導入にとって好ましいこともある。リポソームの形成および使用は一般に当業者に知られている。近年、血清安定性および血液循環半減期(circulation half-times)が改善されたりリポソームが開発された(米国特許第5,741,516号)。さらに、リポソームおよびリポソーム様調製物の潜在的な薬物担体としての様々な方法が記載されている(米国特許第5,567,434号；第5,552,157号；第5,565,213号；第5,738,868号および第5,795,587号)。

10

【0149】

他の手順によるトランスフェクションに通常耐性がある数多の細胞型をもつリポソームが首尾よく使用されている。加えて、リポソームは、ウイルスベースの送達系には典型的なDNA長の制約がない。リポソームは、様々な培養細胞株および動物中へ、遺伝子、薬物、放射線治療剤、ウイルス、転写因子、およびアロステリックエフェクターを導入するのに有効に使用されている。加えて、リポソーム媒介薬物送達の有効性を検証して、いくつかの成功した臨床試験が完了している。

20

【0150】

リポソームは、水性媒体に分散して多重膜同心円二重層ベシクル(また多重膜ベシクル(MLVs)とも称される)を自発的に形成するホスホ脂質から形成される。MLVsは一般に、25nmから4 μ mまでの直径を有する。MLVsの超音波処理は、コア中に水性溶液を包含し直径が200~500Åの範囲にある単層小ベシクル(SUVs)の形成をもたらす。

【0151】

代替的に、rAAVのナノカプセル製剤が使用されてもよい。ナノカプセルは一般に、安定しかつ再現性のある形で物質を封入し得る。細胞内へのポリマーの過負荷に起因する副作用を回避するために、かかる超微細粒子(ほぼ0.1 μ mのサイズ)が、*in vivo*で分解されることが出来るポリマーを使用して設計されているはずである。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキル-シアノアクリラートナノ粒子が、使用のために企図される。

30

【0152】

上に記載の送達方法に加えて、以下の技法もまた、rAAV組成物を宿主へ送達する代替方法として企図される。ソノフォレーシス(すなわち、超音波)が使用され、循環系中へのおよび循環系を通した薬物浸透率およびその効き目を増強するためのデバイスとして米国特許第5,656,016号に記載されている。企図される他の薬物送達代替手段は、骨内注射(米国特許第5,779,708号)、マイクロチップデバイス(米国特許第5,797,898号)、眼科製剤(Bourlais et al., 1998)、経皮マトリックス(米国特許第5,770,219号および第5,783,208号)、およびフィードバック制御送達(米国特許第5,697,899号)である。

40

【0153】

治療方法

有効量の導入遺伝子(例として、1以上の骨代謝調整剤をコードする単離された核酸またはrAAV)を対象へ送達するための方法は、本開示によって提供される。いくつかの態様において、方法は、骨形成を促進または阻害することが可能な干渉RNAをコードする単離された核酸の有効量を対象へ投与するステップを含む。いくつかの態様において、方法は、骨再吸収を促進または阻害することが可能な干渉RNAをコードする単離された核酸の有効量を対象へ投与するステップを含む。よって、いくつかの態様において、本明細書に記載の単離された核酸、rAAVs、および組成物は、調節不全の骨代謝に関連する疾患もしくは障害を有するかまたはこれを有すると疑われる対象を処置するのに有用である。

【0154】

50

本明細書に使用されるとき、「調節不全の骨代謝に関連する疾患または障害」は、1) 健常な個体(例として、骨沈着と骨再吸収との間の不均衡によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に増大した骨沈着(例として、形成)、または2) 健常な個体(例として、骨沈着と骨再吸収との間の不均衡によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に減少した骨沈着(例として、形成)、または3) 健常な個体(例として、骨沈着と骨再吸収との間の不均衡によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に増大した骨再吸収(例として、崩壊(breakdown))、または4) 健常な個体(例として、骨沈着と骨再吸収との間の不均衡によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に減少した骨再吸収(例として、崩壊)のいずれかをもたらす、骨沈着と骨再吸収との間の不均衡によって特徴付けられる疾病を指す。

10

【0155】

「低下した骨密度に関連する疾患」は、1) 健常な個体(例として、減少した骨密度によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に減少した骨沈着(例として、形成)、または2) 健常な個体(例として、減少した骨密度によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に増大した骨再吸収(例として、崩壊)のいずれかの結果生じる、増大した骨の間隙率(porosity)によって特徴付けられる疾病を指す。増大した骨の間隙率に関連する疾患は、1) 健常な個体(例として、減少した骨密度によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に減少したOBおよび/または骨細胞の分化、機能、あるいは活性、および/または2) 健常な個体(例として、減少した骨密度によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に増大したOCの分化、機能、または活性のいずれかから生じてもよい。「間隙率」は一般に、骨組織によって占められていない骨画分の体積を指す。

20

【0156】

「上昇した骨密度に関連する疾患」は、1) 健常な個体(例として、上昇した骨密度によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に増大した骨沈着(例として、形成)、または2) 健常な個体(例として、上昇した骨密度によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に減少した骨再吸収(例として、崩壊)のいずれかの結果生じる、減少した骨の間隙率によって特徴付けられる疾病を指す。減少した骨の間隙率に関連する疾患は、1) 健常な個体(例として、上昇した骨密度によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に増大したOBおよび/または骨細胞の分化、機能、あるいは活性、および/または2) 健常な個体(例として、上昇した骨密度によって特徴付けられる疾患を有さない対象)と比べて、異常に減少したOCの分化、機能、または活性のいずれかから生じてもよい。

30

【0157】

本開示の側面は、調節不全の骨代謝に関連する疾患または障害を処置する方法を提供する。調節不全の骨代謝は、低下した骨密度(例として、骨粗鬆症、危機的サイズの骨欠損、廃用または傷害の結果生じる機械的障害)に関連する疾患であってもよい。調節不全の骨代謝は、上昇した骨密度(例として、大理石骨病、濃化異骨症、硬結性骨化症、先端巨大症、フッ素症、骨髄線維症、C型肝炎関連骨硬化症、異所性骨化)に関連する疾患であってもよい。

40

【0158】

いくつかの態様において、調節不全の骨代謝に関連する疾患または障害を処置する方法は、導入遺伝子を含む組換えAAV(rAAV)を、これを必要とする対象へ投与することを含む。rAAVは、骨細胞(例として、破骨細胞および骨芽細胞)へのその標的化を促進する修飾を含んでいてもよい。骨の細胞へのその標的化を促進するrAAVsの非限定的な修飾は、配列番号16~17または57~63の異種の骨標的化ペプチド、骨特異的プロモーター、および他の組織と比べて骨への標的化が増大したAAV血清型を包含する。いくつかの態様において、調節不全の骨代謝を処置する方法は、配列番号16~17または57~63にあるおりの異種の骨標的化ペプチドを含むrAAVを、これを必要とする対象へ投与することを含む。

【0159】

50

いくつかの態様において、異種の骨標的化ペプチドを含むrAAVは、骨代謝の調節異常に関連する標的遺伝子を上方調節または下方調節する導入遺伝子を含む。いくつかの態様において、導入遺伝子は、低下した骨密度(例として、骨粗鬆症、危機的サイズの骨欠損、廃用または傷害の結果生じる機械的障害)に関連する障害において減少していた標的遺伝子の発現を上方調節する。いくつかの態様において、導入遺伝子は、低下した骨密度に関連する障害において増大していた標的遺伝子の発現を下方調節する。いくつかの態様において、導入遺伝子は、低下した骨密度(例として、骨粗鬆症、危機的サイズの骨欠損、廃用または傷害の結果生じる機械的障害)に関連する障害において減少していた標的遺伝子の発現を上方調節する。いくつかの態様において、導入遺伝子は、低下した骨密度に関連する障害において増大していた標的遺伝子の発現を下方調節する。

10

【0160】

本開示の側面は、カプシドタンパク質および阻害性核酸をコードする単離された核酸を含むrAAVを対象へ投与することを含む、骨代謝の調節異常によって特徴付けられる障害の疾患に関連する疾患または障害を処置するための方法を提供する。rAAVは、阻害性核酸(例として、siRNA、shRNA、miRNA、またはamiRNA)を含んでいてもよい。阻害性核酸は、骨代謝の調節異常によって特徴付けられる疾患もしくは障害に関連する標的遺伝子の発現を減少または増加させてもよい。

【0161】

いくつかの態様において、本開示は、低下した骨密度に関連する疾患または障害を処置する方法を提供する。方法は、低下した骨密度に関連する遺伝子を標的にする導入遺伝子を含むrAAVまたは単離された核酸を、これを必要とする対象へ投与することを含む。いくつかの態様において、rAAVまたは単離された核酸は、低下した骨密度に関連する遺伝子を標的にする人工マイクロRNAをコードする導入遺伝子を含む。いくつかの態様において、標的遺伝子は、SHN3、PTH、PTHrP、DJ1、SOST、CTSK、またはRANKである。

20

【0162】

本開示の側面は、rAAVまたは単離された核酸を投与することを含む、低下した骨密度に関連する疾患または障害を処置する方法を提供する。いくつかの態様において、rAAVまたは単離された核酸は、配列番号3で表されるとおりの配列またはその相補体を含む。いくつかの態様において、rAAVは、配列番号18~34のいずれか1つで表されるとおりの配列を含むカプシドタンパク質を含む。いくつかの態様において、rAAVは、配列番号16~17および57~63のいずれか1つで表されるとおりの配列を含む異種の骨標的化ペプチドを含む。

30

【0163】

細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示の方法を使用して、50%と99%との間(例として、50%と99%との間(両端含む)のいずれの整数)まで減少させられてもよい。細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示の方法を使用して、75%と90%との間まで減少させられてもよい。細胞または対象におけるSHN3の発現は、本開示の方法を使用して、80%と99%との間まで減少させられてもよい。

【0164】

いくつかの態様において、物質の「有効量」は、所望される効果を生み出すのに(例として、骨細胞または骨組織を形質導入するのに)十分な量である。いくつかの態様において、単離された核酸の有効量は、対象の標的組織の十分な数の標的細胞をトランスフェクトする(またはrAAV媒介送達という状況下においては感染する)のに十分な量である。いくつかの態様において、標的組織は、骨組織(例として、OBs、OCs、骨細胞、軟骨細胞等々などの骨の細胞および骨組織細胞)である。いくつかの態様において、単離された核酸の有効量(例として、これはrAAVを介して送達されてもよい)は、例として、OBsおよび/または骨細胞の活性あるいは機能を増大させること、OBsおよび/または骨細胞の活性を阻害すること、OCsの活性または機能活性を増大させること、OCsの活性または機能を阻害すること等々により、対象における治療上の利益を有するのに十分な量であってもよい。有効量は、例えば、対象の種、年齢、重量、健康状態、および標的にされるべき組織などの様々な因子に依存するであろうし、よって本開示のどこかに記載されるとおり対象および組織

40

50

により変動することもある。

【0165】

本発明の例示の態様が、以下の例によってより詳細に記載されるであろう。これらの態様は本発明の例示であって、当業者が認識するであろう前記例示は例示の態様に制限されない。

【0166】

例

例1

骨形成のいくつかの主要調節因子を骨粗鬆症への治療標的として同定した。実例として、天然に存在する骨形成のインヒビター、スクレロスチン(SOST)またはアダプタータンパク質schnurri-3(SHN3、またHIVEP3ともいう)の抑制は、向上したOB活性に起因する進行性の骨量増加をもたらす。主にOBsにおいて機能するSHN3およびSOSTとは違って、カテプシンK(CTSK)はOCs中に高発現されており、その阻害は、OC活性を遮断することによって骨量を増加させる。最後に、PTH、PTH関連タンパク質(PTHrP)、またはDJ-1を包含する骨同化因子(bone anabolic factors)での処置は、骨形成を促進する。本例において、骨標的化アデノ随伴ウイルス(AAV)媒介の遺伝子サイレンシングまたは遺伝子付加を使用してこれらの候補遺伝子の発現を操り得る遺伝子治療法を記載する。いくつかの態様において、治療法(例として、本開示によって記載される組成物)は、骨のリモデリングおよび再生活性への弊害を制限しつつ、OB機能および骨形成を促進することによってか、またはOC活性および骨破壊を抑制することによって、骨喪失を防止する。

10

20

【0167】

骨標的化アデノ随伴ウイルス(BT-AAVs)を使用する遺伝子治療法の開発

形質導入の高い効率、持続する導入遺伝子発現、およびlack of post-感染後の免疫原性および病原性の欠如によって、AAVsは、遺伝子治療に使用するのに極めて魅力的なウイルスベクターとなる。今日まで、AAVベクターは世界中130を超える臨床試験および2,000名の患者らにおいて評価されている。しかしながら、非特異的な細胞標的化、起こり得る既存の免疫、および他の律速事象によって、より多くの天然のAAV血清型の同定、ならびにベクター工学によるAAV血清型の特性および機能の改善が余儀なくされる。ここで、OBsおよび/またはOCsをin vitroおよびin vivoで形質導入し得るAAV血清型を同定した。

30

【0168】

OBs、OCs、および軟骨細胞を形質導入するAAV血清型の同定

この目的に向けて(To this end)、増強された緑色蛍光タンパク質(GFP)レポーター遺伝子を、17のAAVカプシド(scAAV1、scAAV2、scAAV3、scAAV4、scAAV5、scAAV6、scAAV6.2、scAAV7、scAAV8、scAAV9、scAAVrh8、scAAVrh10、scAAVrh39、scAAVrh43、scAAV2/2-66、scAAV2/2-84、scAAV2/2-125)中へパッケージングした。これらの精製されたAAV血清型ベクターの、間葉系幹細胞(MSCs)起源マウスOB-もしくは軟骨細胞-系列細胞または骨髄単球(BM-MO)起源マウスOCsを形質導入する能力を、落射蛍光顕微鏡法を使用しGFP発現を監視することによって査定した。最初に、OB-または軟骨細胞-系列細胞へのそれらの形質導入能を試験するため、マウスMSCsおよび軟骨細胞の前駆株(ATDC5)を夫々、CyagenおよびATCCから購入した。加えて、マウスOB前駆体(pre-OB)を、3つの異なる類遺伝子背景(C57BL/6 J、BALB/cJ、129S1/SvImJ)のマウス新生仔の頭蓋冠から、出生から3~5日後に単離し、骨原性媒体中6日間培養して成熟OBs(mOB)へ分化させた。 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーの17の精製AAV血清型の単回用量を、これらの細胞とともに2日間インキュベートし、GFP発現を落射蛍光顕微鏡法(表1)およびEGFPに対する免疫プロットティング(図22)によって分析した。

40

【0169】

表1: マウスMSC-系列細胞をin vitroで形質導入し得るscAAV血清型の同定。

【表 1 - 1】

	AAV 血清型	力価	Pre-OB (B6)	Pre-OB (129)	Pre-OB (Balbc)	mOB (129)	mOB (Balbc)	MSC	ATDC5
1	scAAV1.CB6-eGFP	1.8 x 10 ¹³ GC/mL	+	+	++	+	++	+	+
2	scAAV2.CB6-eGFP	1.5 x 10 ¹² GC/mL	-	-	-	-	-	-	-
3	scAAV3.CB6-eGFP	6 x 10 ¹³ GC/mL	-	-	-	-	-	-	-
4	scAAV4.CB6-eGFP	6.5 x 10 ¹² GC/mL	+++	++	++	++	++	+	-
5	scAAV5.CB6-eGFP	1.4 x 10 ¹³ GC/mL	+	+	++	+	++	++	++
6	scAAV6.CB6-eGFP	8 x 10 ¹² GC/mL	++	+	++	+	++	+	++
7	scAAV6.2.CB6-eGFP	8 x 10 ¹² GC/mL	++	+	+	++	++	+	++
8	scAAV7.CB6-eGFP	1.5 x 10 ¹³ GC/mL	+	-	+	-	+/-	+	-
9	scAAV8.CB6-eGFP	7 x 10 ¹² GC/mL	-	+	-	-	+/-	-	+
10	scAAV9.CB6-eGFP	1.5 x 10 ¹³ GC/mL	++	-	-	+/-	+/-	-	-
11	scAAVrh8.CB6-eGFP	8 x 10 ¹² GC/mL	-	-	-	-	-	-	-
12	scAAV10.CB6-eGFP	8 x 10 ¹² GC/mL	-	-	-	-	+/-	-	-
13	scAAVrh39.CB6-eGFP	1 x 10 ¹³ GC/mL	+	-	-	+/-	+/-	-	-
14	scAAVrh43.CB6-eGFP	6 x 10 ¹² GC/mL	-	-	-	-	-	-	+/-
15	scAAV2/2-	1 x 10 ¹³	ND	-	-	-	-	ND	+/-

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	66.CB6-eGFP	GC/mL							
16	scAAV2/2-84.CB6-eGFP	4×10^{12} GC/mL	ND	-	-	-	-	ND	+/-
17	scAAV2/2-125.CB6-eGFP	5×10^{12} GC/mL	ND	-	-	-	-	ND	+/-

【 0 1 7 0 】

10

17のAAV血清型のうち、scAAV4が、3つの異なるマウス背景のマウスOB-系列細胞を形質導入するのに最も有効であり、scAAV1、scAAV5、scAAV6、およびscAAV6.2(scAAV6の改変バージョン)は、3つの異なるマウス背景のマウスOBおよび軟骨細胞-系列細胞の両方を形質導入し、scAAV9は、C57B6/J背景のpre-OBsのみを形質導入した(図1および図2における代表的な画像)。

【 0 1 7 1 】

次に、精製AAV血清型の、マウスOC前駆体を形質導入する能力を調査した。マウス初代OC前駆体(BM-MO、骨髄由来単球)を2月齢マウス(C57BL/6J)の長骨から単離し、マウスM-CSF(40ng/ml、R&D systems)の添加によって増幅させた。BM-MOsを、マウスM-CSF(40ng/ml)およびマウスRankリガンド(10ng/ml、R&D systems)の存在下6日間培養して成熟OCsへ分化させた(図3)。加えて、マウスOC前駆体株(Raw264.7)を、マウスRankリガンド(10ng/ml)とともに培養して4日後に成熟OCsへ分化させた(図4)。 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーの17の精製AAV血清型の単回用量をこれらの細胞とともに2日間インキュベートし、GFP発現を落射蛍光顕微鏡法によって分析した(表2)。

20

【 0 1 7 2 】

表2：マウスOCsをin vitroで形質導入するscAAV血清型の同定。

【表 2 - 1】

	AAV 血清型	力価	BM-MO (B6)	BM-OC (B6)	Raw-OC
1	scAAV1.CB6-eGFP	1.8×10^{13} GC/mL	-	+	++
2	scAAV2.CB6-eGFP	1.5×10^{12} GC/mL	-	+	-
3	scAAV3.CB6-eGFP	6×10^{13} GC/mL	-	-	-
4	scAAV4.CB6-eGFP	6.5×10^{12} GC/mL	-	+	-
5	scAAV5.CB6-eGFP	1.4×10^{13} GC/mL	-	+	++
6	scAAV6.CB6-eGFP	8×10^{12} GC/mL	-	+	++

30

40

【表 2 - 2】

7	scAAV6.2.CB6-eGFP	8 x 10 ¹² GC/mL	-	+	++
8	scAAV7.CB6-eGFP	1.5 x 10 ¹³ GC/mL	-	+	++
9	scAAV8.CB6-eGFP	7 x 10 ¹² GC/mL	-	-	++
10	scAAV9.CB6-eGFP	1.5 x 10 ¹³ GC/mL	-	++	++
11	scAAVrh8.CB6-eGFP	8 x 10 ¹² GC/mL	-	-	-
12	scAAV10.CB6-eGFP	8 x 10 ¹² GC/mL	-	-	++
13	scAAVrh39.CB6-eGFP	1 x 10 ¹³ GC/mL	-	-	++
14	scAAVrh43.CB6-eGFP	6 x 10 ¹² GC/mL	-	-	++
15	scAAV2/2-66.CB6-eGFP	1 x 10 ¹³ GC/mL	-	-	-
16	scAAV2/2-84.CB6-eGFP	4 x 10 ¹² GC/mL	-	-	-
17	scAAV2/2-125.CB6-eGFP	5 x 10 ¹² GC/mL	-	-	-

10

20

【 0 1 7 3 】

17のAAV血清型のうち、scAAV1、5、6、6.2、7、および9は、マウス初代OCsおよびRaw264.7 OC株の両方を形質導入するのに有効であった一方、scAAV8および10、scAAVrh39および43は、Raw264.7 OC株しか形質導入しなかった(図3および4における代表的な画像)。

【 0 1 7 4 】

AAVカプシドの関節軟骨および骨への指向性を検査するため、8つのscAAV-Egfpベクターをin vitroでのスクリーニング(scAAV1、scAAV4、scAAV5、scAAV6、scAAV7、scAAV9、scAAVrh.10、およびscAAVrh.39)から選択した。関節軟骨上の軟骨細胞および/または骨表面上のOBsおよび/またはOCsを形質導入するそれらの能力を試験するため、10¹² ~ 10¹³/mlゲノムコピーの、8つの選択されたGFPをコードするAAV血清型の単回用量を、2月齢マウス(C57BL/6J)の両膝関節中へ注射し、4週後にマウスを安楽死させ、関節軟骨および/または骨へのAAV形質導入をUMMS光学結像設備でのIVIS-100光学結像系によって監視した(図5)。陰性対照としてマウスにPBSを注射した。大多数のカプシドにつき関節軟骨(図28)または成長板(図22)におけるEGFPの発現はほとんどない~ない。この相違は、scAAVベクターの軟骨細胞へのアクセス可能性が乏しいことに起因し得るが、前記軟骨細胞は無血管微小環境のこれら構造体に包埋されている。代替的に、ベクターは単に、成体マウスにおいて初代軟骨細胞のより低い感染力を呈している場合もある。GFPタンパク質は膝関節および後肢において高発現されており、それらの発現は局所注射エリアに制限されていた(図5、上、図28)。とりわけ、GFP発現は筋肉除去後でさえも、骨および膝関節から検出された(図5、下)。関節軟骨中の軟骨細胞における、および/または骨表面のOBsおよび/またはOCsにおけるGFP発現を確認するため、膝関節および大腿骨の凍結切片に対し組織学を実施した。図6Aに見られるとおり、関節軟骨におけるGFPタンパク質の無発現または小発現が、scAAV1、scAAV4、scAAV5、scAAV6、scAAV7、scAAV9、scAAVrh.10、およびscAAVrh.39が注射された膝関節から検出された。scAAV9が注射された膝関節において、GFP発現が軟骨細胞の小集団から検出された。軟骨細胞前駆体株ATDC5を使用したin vitroデータとは対照的に、これらの結果は、あるscAAV血清型が、関節軟骨中の軟骨細胞をin vivoで形質導入するのに有効ではないことを指し示している。

30

40

【 0 1 7 5 】

これに反して、GFPタンパク質は、scAAV9が膝関節中へ注射されたとき、皮質骨に存在

50

するOBsおよび骨細胞において高発現した。処置マウスの全身および個々の器官の画像は、EGFP発現が肝臓および後肢において最も高かったことを示した(図23および29)。心臓および大腿骨における発現は穏やかであった一方、肺、腎臓、および脾臓における発現は検出されなかった。心臓、肝臓、および大腿骨におけるEGFPの発現を、蛍光顕微鏡法によって、および免疫プロット分析によって(図23)さらに確認した。観察されたとおり、EGFPタンパク質は、皮質および骨梁中の骨内膜の骨芽細胞および骨細胞において主に発現していたが、靭帯、関節軟骨、成長板、骨膜の骨芽細胞、骨髄、および膝蓋骨においては発現していなかった(図23および30)。これらの結果は、全身的に送達されたscAAV9ベクターが、骨内膜の骨に存在する骨芽細胞系列細胞を標的にすることを実証する。

【0176】

scAAV9に加えて、骨膜の細胞におけるGFP高発現および皮質骨中の骨細胞におけるGFP低発現がscAAV5の処置において観察された。骨膜の細胞の小集団は、scAAV4が注射されたときGFPタンパク質を発現したが、scAAV6.2の処置においてはGFP発現が検出されなかった(図6B)。よって、これらの結果は、scAAV9血清型が、マウスにおける骨表面上のOBsおよびOCsを形質導入するのに最も有効であることを指し示している。scAAV9の骨組織への形質導入の効き目を増大させるため、scAAV9をPBSまたはX-tremeGene 9 DNAトランスフェクション試薬(Roche)(極度に細胞毒性が低い脂質のブレンド)とともに製剤化し、マウスの膝関節中へ注射した(図7および8)。X-tremeGene 9(リポソーム)と製剤化されたとき、GFPタンパク質は、成長板下および骨梁表面上(骨端)の活発なOBsおよびOCs、ならびに最終分化したOBs、皮質骨中の骨細胞(骨幹)において、高発現していた。しかしながら、GFP発現は筋肉において著しく低下していたが、このことはX-tremeGene 9製剤がscAAV9のin vivoでの指向性を変更することを指し示している。

【0177】

カプシドタンパク質の遺伝的または化学的改変を介する骨標的化-scAAV9(BT-scAA9)血清型の開発

骨粗鬆症におけるAAV媒介遺伝子治療を最大限生かす(maximize)ため、scAAV9血清型には、OBsおよびOCsが存在する骨表面上にホーミングし蓄積することが所望される。骨標的化ペプチド、((AspSerSer)₆、DSS)は、骨原性siRNA-カプセル化リポソームを骨形成表面へ向かわせるのに有効であることが観察された。追加の骨標的化ペプチド、HABP-19(C E PRR EVA EL EPRR EVA EL; 配列番号17)は、培養物中ならびにマウス中の骨ヒドロキシアパタイトへ選択的に結合することが報告されている。HABP-19は、OBsから分泌される最も豊富な非コラーゲンタンパク質、オステオカルシンの生物模倣体(biomimic)である。

(Gla残基)-カルボキシル化グルタミン酸(Glu)は、ビタミンK依存性 -カルボキシル化によるGluに由来する。

【0178】

本例は、改変されたscAAV9血清型を骨へ向かわせるために、AAVカプシド中へ骨標的化ペプチドを挿入することを記載する(図9A、DSS-scAAV9、HABP-scAAV9)。(AspSerSer)₆(配列番号16)をコードするDNA配列を、標準的なクローニング方法を使用して、カプシドタンパク質VP2オープンリーディングフレーム(ORF)中グルタミン587とアラニン588(DSS-587)との間、グルタミン588とアルギニン589(DSS-588)との間へ、またはVP2-ORF(DSS-Nter)のN末端に挿入する(図10および26)。加えて、化学反応(図9B)を介して確認された骨集積分子へ抱合されたAAVカプシドを産生する。細胞表面上のアジド部分への骨集積分子(ADIBO-Ale)の付着が、骨フラグメントへ結合する非骨細胞(例として、Jurkat T白血病株)の能力を有意に増強したことが観察された。

【0179】

DSS挿入がscAAV9の感染力に影響を及ぼすか検査するため、原型的なAAV9、AAV9.DSS-587、またはAAV9.DSS-Nterカプシド中へパッケージングされたベクターをCOBs中へ感染させてEGFP発現を免疫プロットングによって、または蛍光顕微鏡法によって査定した(図29)。scAAV9と比較して、scAAV9.-DSS-Nterは、感染力において、より低いMOI(10⁹GC/mL)にて穏やかな低下を示したが一方、EGFP発現はscAAV9.DSS-587で処置されたCOBsからはほと

10

20

30

40

50

んど検出されなかった(図29)。同様に、i.a.注射を介してマウスを処置したとき、scAAV9、およびscAAV9.DSS-Nterは前述同様、大腿骨を強く形質導入した(図35)。対照的に、導入遺伝子発現をほとんど~まったく生じさせなかった。加えて、骨原性遺伝子のアルカリホスファターゼ(ALP)活性および発現は、scAAV9およびscAAV9.DSSベクターで処置されたC OBsにおいて同等であったが、このことは骨芽細胞分化に対してscAAVsによる弊害がないことを指し示している(図29および35)。

【0180】

改変されたscAAV9血清型(A1e-scAAV9)は、カプシドタンパク質上の骨標的化分子で装飾されており、これを試験する。アジド担持アミノ酸をAAVカプシドタンパク質上に創出するために、VP3カプシドタンパク質中のアスパラギン587をアンバーコドン(TAG)へ変化させるか、またはこのアンバーコドンをアスパラギン587とアルギニン588との間に挿入する。これらの突然変異体VP3プラスミドと一緒に、pヘルパー(pHelper)、pAAV-GFP、およびpPyIRS/tRNACUAを1:1:1:2のモル比にて、DNAトランスフェクション試薬を使用しAAV-293パッケージング細胞中へ過剰的にトランスフェクトした。6時間後に培地を、1mM N-2-アジドエチルオキシカルボニル-L-リシン(NAEK)を含有する新たな培地に置き換え、72時間後にアジド担持アミノ酸をもつscAAV9血清型(アジド-scAAV9)をトランスフェクトされた細胞から回収する。pPyIRS/tRNACUAプラスミドから発現された直交性のアンバーサプレッサアミノアシル-tRNAシンテターゼ/tRNA-CUAの対を、NAEKの存在下アンバーコドンの部位にてアジド担持非天然アミノ酸を合成する。

【0181】

アジド部分を含有するVP3突然変異体の発現を、抗VP3抗体での免疫プロットングによって確認する。一旦確認したら、アジド-scAAV9血清型のOBsまたはOCsを形質導入する能力をGFP発現の監視によって査定する。初代マウスOBsを、GFPをコードするアジド-scAAV9血清型で処置し、GFP発現を落射蛍光顕微鏡法によって査定する。加えて、これらのscAAV9血清型を、M-CSFおよびRankリガンドの存在下でのマウスBM-MO(OC前駆体)の感染のために使用する。それらの形質導入効率を、GFPをコードするWT-scAAV9血清型と比較する。

【0182】

次に、骨標的化scAAV9血清型(A1e-scAAV9)を、クリックケミストリーを介して、アジド-scAAV9血清型のVP3カプシドタンパク質中のアジド担持アミノ酸へ骨集積分子(ADIBO-A1e)を架橋させることによって産生する。アジド-scAAV9血清型を異なる濃度のADIBO-A1e(FutureChem)とともに室温にてインキュベートし、2時間後に未結合ADIBO-A1eを、透析を使用して除去する。A1e-scAAV9血清型の初代OBsまたはOCsを形質導入する能力を、GFP発現を監視することによって検査する。

【0183】

骨細胞および組織へのDSS-scAAV9形質導入の確証

ペプチドをAAVカプシド中へ非効率的にまたは非適切に融合したとき、AAVの形質導入効率が著しく低下し得ることがこれまでに報告されている。scAAV9のOBsおよびOCsを形質導入する能力に対するDSSペプチド挿入の効果を試験するため、マウスOBおよびOC前駆体を異なる用量のGFPをコードするscAAV9s(WT-、DSS-588、DSS-Nter)で処置した。2日後にGFP発現を、抗GFP抗体を使用するウェスタンプロットングによって、および落射蛍光顕微鏡法によって分析した。図11および12(AおよびB-左)に見られるとおり、GFPタンパク質の発現は、DSS-588で処置されたときOBsとOCsとの両方からほとんどまたはまったく検出されなかった。これに反して、WT-scAAV9と比較して、DSS-Nter scAAV9の処置は、OBsおよびOCsにおいてGFP発現が減少したこと、およびその発現が用量依存的なやり方で増加したことを示した。OBs(図11B-右および11C)とOCs(図12B-右および12C)との分化は、これらのscAAV9の処置において正常であるが、このことはscAAV9形質導入がOBおよびOCの機能に影響を及ぼさないことを実証する。

【0184】

次に、DSS-scAAV9ベクターの骨細胞をin vivoで形質導入する能力を調査した。GFPをコードするscAAV9ベクター(WT-、DSS-588、DSS-Nter)をX-tremeGene 9とともに製剤化し、1

10

20

30

40

50

$0^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのこれらscAAV9ベクターの単回用量を2月齢マウス(C57BL/6J)の膝関節中へ注射し、1週後に組織学を大腿骨の凍結切片に対し実施し、OBs、OCs、および/または骨細胞におけるGFP発現を、共焦点顕微鏡法を使用して査定した(図13)。PBS注射はGFPを発現しない対照として働く。in vitroでの実験(図11および12)と同様、GFP発現はDSS-588 scAAV9で処置された大腿骨においてほとんどまたはまったく観察されなかった。GFPを発現する細胞の集団はWT-scAAV9と比較して低減したが、DSS-Nter scAAVは、OBs、OCs、および骨細胞を包含する骨の細胞のすべてを成功裏に形質導入した。

【0185】

AAVカプシドをin vivoでの骨標的化活性につき試験した。前述同様、scAAV9またはscAAV9-DSS-Nterを2月齢マウス中へi.v.注射し、注射から2週間して組織分布をEGFP発現によって査定した。同レベルのEGFPタンパク質が、scAAV9またはscAAV9-DSS-Nterのいずれかで全身的に処置されたマウスの全身において観察された一方(図36)、scAAV9-DSS-Nterが注射されたマウスは、心臓および肝臓の夫々において、scAAV9によって達成されるEGFP発現レベルの~55%および~75%を生じさせた(図26および図36)。重要なことには、大腿骨および腰椎における発現は、処置群間で相対的に同等であった(図26および36)。注目すべきことに、scAAV9-DSS-Nterで処置された大腿骨は、scAAV9で処置された大腿骨と比較して、EGFPを発現する細胞数が増加したことを示した(図26)。これらの結果は、骨標的化ペプチドモチーフ(DSS)と融合された改変VP2カプシドタンパク質が、非骨格組織への脱標的化(detargeting)送達によってscAAV9の骨ホーミング特異性を改善し、次に骨へのその指向性を増大させることを実証した。

【0186】

in vivoでの特定の骨形質導入のためのBT-scAAV9血清型の全身送達の確認

BT-scAAV9血清型のin vivoでの骨へのホーミングする能力を検査するため、 1×10^{10} ゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9ベクター(WT-、DSS-またはHABP、Ale)の単回用量を、マウス中へ局所投与または全身投与する。局所投与につき、これらのscAAV9血清型を2月齢マウス(C57BL/6J)の膝関節中へ注射し、1週後または4週後に骨上のOBs、OCs、および/または骨細胞へのAAV送達をIVIS-100光学結像系によって監視する。加えて、組織学を大腿骨の凍結切片に実施して、これらのscAAV9血清型によって形質導入されたGFPを発現するOBs、OCs、および/または骨細胞を検出する。PBS注射は非GFPを発現しない対照として働く。全身投与につき、GFPをコードするWT-、DSS-、HABP-またはAle-scAAV9血清型を、

【0187】

マウスSchnurri-3(SHN3)、スクレロスチン(SOST)、またはカテプシンK(CTSK)に特異的なshRNAsをコードするscAAV9ベクターの生成

硬結性骨化症は、骨量が多い希少な遺伝性障害であって、スクレロスチンをコードする遺伝子、SOST遺伝子における機能喪失型突然変異に関連することが観察されている。スクレロスチンは、骨細胞、最終分化骨芽細胞から分泌され、骨形成を阻害し、骨再吸収を増強する。モノクローナルヒト抗スクレロスチン抗体での処置は、骨形成の促進および骨再吸収の阻害によって、骨粗鬆症のヒト患者および動物モデルにおける骨喪失を回復させる。しかしながら、脳卒中が増加するリスクのせいでFDAの承認は目下あり得そうにない。骨芽細胞分化を阻害するスクレロスチンとは違って、リソソームのシステインプロテアーゼ、カテプシンK(CTSK)は、骨再吸収にとって重要な成熟破骨細胞において高発現されている。骨量が多い希少な遺伝性障害、濃化異骨症は、ヒトのCTSK遺伝子中の突然変異を不活化することから生じる。CTSKの小分子インヒビターでの処置は、骨再生活性への弊害を制限しつつ骨再吸収を抑制することによって、骨粗鬆症のヒト患者および動物モデルにおける骨喪失を防止する。しかしながら、それは近年、脳卒中の発生が上がったことに起因してFDAの審査からもれた。

【0188】

骨芽細胞分化の新規サプレッサーとしてのSchnurri-3(SHN3)。誘導loxP:Cre系を使用するOBsにおけるSHN3の一過的な欠失によって、マウスの骨量の有意な増加が結果として生じたが、このことは、SHN3発現の下方調節が、骨粗鬆症における低骨量を回復させる魅力的な治療的アプローチを提供することを指し示している(図14)。同じく、SHN3の阻害は、骨形成の促進によって、骨粗鬆症のマウスモデルにおける骨喪失を防止する(図15)。しかしながら、スクレロスチンおよびCTSKとは違って、SHN3欠損症は、骨に特異的であって、非骨格組織における表現型には関連しない。よってそれ以降、例1に記載の骨標的化scAAV9ベクターを、OBsおよび/またはOCsにおけるマウスSHN3、SOST、あるいはCTSKをin vitroおよびin vivoでサイレンシングするベクターとして使用した。

【0189】

上記遺伝子(例として、SHN3、CTSK)を標的にする2つのshRNAヘアピンを、機能的な自己相補的AAVベクター(例として、mTRs)に要される突然変異の逆方向末端反復(mTRs)の代用とするために採用した。修飾shRNA-mTR配列は配列(Sequence)のセクションにおいて記載する。これらの修飾shRNA-mTRsを、制限酵素部位PstIおよびBglIIにてpAAVscCB6-EGFPベクター中へクローニングしてscAAV9カプシドへパッケージングした。

【0190】

マウスschnurri-3(SHN3)およびマウスカテプシンK(CTSK)に特異的な2つのshRNAヘアピンを発現する精製scAAV9ベクター(scAAV9-mSHN3iおよびscAAV9-mCTSKi)を産生した。in vitroでの特徴付けにつき、scAAV9-mSHN3iおよびscAAV9-mCTSKiの感染力、ノックダウン効率、ならびに機能活性をOBsおよびOCsの夫々において試験した。最初に、 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーの2つのscAAV9-mSHN3is(Sh-SHN3-1、-2)またはscAAV-ベクター対照の単回用量をマウス初代OB前駆体に処置した。形質導入から2日後、GFP発現を落射蛍光顕微鏡法によって監視し、ノックダウン効率を、RT-PCRを使用してSHN3 mRNAレベルを測定することによって査定した。OB分化を、OB培養の第6日および15日の夫々に、OB分化遺伝子(例として、骨シアロタンパク質(BSP)およびosterix(OSX))の発現とアリザリンレッド染色による骨石灰化活性とを測定することによって査定した(図16A~16D)。OBsへのscAAV9-mSHN3isの形質導入の有効性はscAAV9-対照と同程度であった。scAAV9-mSHN3i(Sh-SHN3-1)はSHN3 mRNAレベルを50%まで減少させることができた(図16A~16B)。SHN3ノックダウンは、骨石灰化活性およびOB分化遺伝子の発現を増大させた(図16C~16D)。

【0191】

次に、scAAV9-mSHN3iベクターのin vivoでの形質導入およびノックダウンの効き目を検査した(図17)。GFPをコードするscAAV9ベクター(Sh-SHN3-1)をX-tremeGene 9とともに製剤化し、 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのこのscAAV9ベクターの単回用量を2月齢マウス(C57BL/6J)の膝関節中へ注射した。1週後に大腿骨の凍結切片への組織学を実施し、OBsおよび骨細胞におけるGFP発現を、共焦点顕微鏡法を使用して査定した。PBS注射はGFPを発現しない対照として働く。対照scAAV9と同様に、OBsおよび骨細胞におけるGFP発現がscAAV9-mSHN3iベクターで処置された大腿骨において観察された(図17A)。代替的に、GFPを発現する細胞を、FACSソーティングを使用して大腿骨から単離し、SHN3 mRNAレベルをRT-PCRによって査定し、scAAV9-Sh-SHN3-1ベクターの形質導入によってSHN3 mRNAレベルが50%低下したことを実証した(図17B)。

【0192】

加えて、scAAV9-mCTSKiの感染力、ノックダウン効率、および機能活性もまた、マウスOCsにおいて調査した。OC前駆体を得るため、マウス単球株Raw264.7をRankリガンド(5ng/ml)で2日間処置した。続いて、これらのOC前駆体を $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーの2つのscAAV9-mCTSKis(Sh-CTSK-1、-2)またはscAAV-ベクター対照(対照)の単回用量で2日間処置した。形質導入効率を、落射蛍光顕微鏡法を使用するGFP発現によって査定し(図18A~18D)、ノックダウン効率を、RT-PCRを使用してCTSK mRNAレベルを測定することによって査定した(図18B)。加えて、OC分化を、TRAP酵素活性、TRAP染色OCsの多核細胞化、およびOC分化遺伝子(例として、樹状細胞-特異的膜貫通型タンパク質(DC-STAMP)およびTRAP)の発現を測定することによって査定した(図18Cおよび18D)。scAAV9-mCTSKisのOC前駆体への形質導

10

20

30

40

50

入の有効性はscAAV9-対照と同程度であった。scAAV9-mCTSKi (Sh-CTSK-1)はCTSK mRNAレベルを70%まで減少させることができた(図18A~18B)。CTSKノックダウンは結果として、OC分化度を軽度減少させた(図18C~18D)。scAAV9-mCTSKiベクターのOCsをin vivoで形質導入する能力を検査するため、 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9ベクター(Sh-CTSK-1)とX-tremeGene 9との製剤の単回用量を、2月齢マウス(C57BL/6J)の膝関節中へ注射した。GFP発現およびCTSK発現の免疫蛍光分析によって、対照-scAAV9とscAAV9-mCTSKiベクターとの両方とも骨表面上のOCsをin vivoで形質導入し得ることが確認された(図19A)。scAAV9-mCTSKiベクターで形質導入されたときのみ、CTSK発現がGFPを発現するOCsにおいて著しく低下した(図19B)。

【0193】

マウススクレロスチン(SOST)shRNAsに特異的な2つのshRNAヘアピンをコードするpAAVscCB6ベクター(scAAV9-mSOSTi)のノックダウン効率が、スクレロスチンが高発現するGFP-DM P1発現骨細胞株において確認された。生成された時点で、 $10^{12} \sim 10^{13}$ /mlゲノムコピーの2つのscAAV9-mCTSKiまたはscAAV9-ベクター対照(対照)の単回用量を、スクレロスチンを高発現するマウス骨細胞株中へ注射する。形質導入から2日後、GFP発現をウェスタンブロッティングによって査定し、ノックダウン効率を、RT-PCRを使用しSOST mRNAレベルを測定することによって査定した。

【0194】

BT-AAV媒介遺伝子サイレンシングを使用する骨粗鬆症のための遺伝子治療法の開発

本例は、マウスSHN3、SOST、CTSK(SHN3i、SOSTi、CTSKi)に特異的なshRNAヘアピンをコードするscAAV9血清型の機能的な効き目を試験することについて記載する。shRNAヘアピンを、GFPをコードするAAVベクター中へクローニングして、BT-AAVカプシド中へパッケージングする(DSS-scAAV9、Ale-scAAV9)(図20)。陰性対照としての対照ShRNA(Cont-i)をAAVベクター中へクローニングする。cont-i、SHN3i、またはSOSTiをコードするBT-AAV血清型を初代マウスOBs中へ形質導入して3日後にSOSTまたはSHN3のノックダウン効率を定量的PCRによって査定した。マウス初代OC前駆体を、cont-iまたはCTSKiをコードするBT-AAV血清型によって形質導入してM-CSFおよびRANKリガンドの存在下で培養する。形質導入から3日後、CTSKのノックダウン効率を定量的PCRによって分析し、6日後にCSTKサイレンシングのOC分化を阻害する能力を査定する。

【0195】

これら遺伝子治療法の、骨粗鬆症マウスモデルの骨喪失を防止する能力を検査するため、偽手術またはOVX手術から4週後、4月齢メスマウス(C57BL/6J、n=12マウス/群)に、 1×10^{12} ゲノムコピーのこれらのBT-scAAV9血清型の単回用量をIV注射またはIP注射する。代替的に、22月齢メスマウス(C57BL/6J、n=12マウス/群)にIV注射またはIP注射する。陰性対照として、GFPをコードするscAAV9ベクターを対照shRNA(Cont-i)とともに、これらのマウス中へ投与する。処置から2月後、in vivoでのOBsおよびOCsの数、骨形成速度、およびOC再吸収活性を査定するために、マウスをカルセインおよびアリザリンレッドで標識して動的な組織形態計測へ供する。GFPを発現するscAAV9形質導入細胞を探すために、IVIS-100光学結像を全身において実施する。GFPを発現する組織を凍結切片上への組織学のためさらに処理する。さらにまた、GFPタンパク質を発現するscAAV9形質導入OBsおよび/またはOCsを、FACSソーティングを使用して長骨から単離し、SOST、SHN3、またはCTSK mRNAレベルを定量的PCRによって査定する。骨格分析につき、長骨および椎骨のマイクロCTを実施して骨量および構造を分析する。

【0196】

加えて、組織切片を、OC分化のマーカーとして酒石酸抵抗性(tartrate-resistant)酸ホスファターゼ(TRAP)で染色し、OB分化のマーカーとしてのI型コラーゲン 1(Col1)およびRunx2につき免疫組織化学(IHC)を行う。この分析は、OB分化遺伝子の発現を測定する骨RNAの定量的PCR分析を伴う。最後に、骨粗鬆症のヒト患者に見られるような全身性のOBおよびOC活性を、ELISAを使用して、I型コラーゲンC末テロペプチド(CTX)、タイプ1プロコラーゲンN末プロペプチドの(P1NP)、および骨特異的アルカリホスファターゼ(BSAP)を包含

10

20

30

40

50

する血清骨代謝回転マーカーのレベルを測定することによって分析する。

【0197】

例2：AAV媒介遺伝子付加を使用する骨粗鬆症のための新規遺伝子治療法の開発

皮下注射を介する組換えPTHペプチド(1~34aa)または組換えPTHrPペプチド(1~36aa)の断続的な処置は、いくつかの態様において、骨粗鬆症のヒト患者および動物モデルにおいてOB活性を増大させ骨形成を促進する。これらのペプチド(テリパラチド、アバロパラチド)はFDAに承認され、目下、骨粗鬆症のヒト患者に使用されている。いくつかの態様において、分泌性因子DJ-1は、OBsと内皮細胞との間のクロストークのメディエーターとして機能する。DJ-1での処置は、いくつかの態様において、OC分化を抑制しながら、ヒトMSCsにおいてOB分化を、およびヒト内皮細胞において血管新生を促進する。

10

【0198】

本例は、分泌性骨原性因子をコードするscAAV9血清型の、筋肉内(IM)注射(これを通して、注射された筋肉が生物ポンプ(bio-pump)として働く)を介する動物への送達を記載し、前記送達は、血液循環においてこれらの因子の安定した高発現を提供して骨粗鬆症の状況(setting)における骨形成を促進する(図21)。この目的に向けて、ヒトPTH(1~84aa)、ヒトPTHrP(1~140aa)、またはマウスDJ-1(1~190aa)をコードするcDNAsを、タンパク質分泌のための従来のシグナルペプチドを含有するpAAVscCB6-EGFPベクター中へ制限酵素部位Age1およびHind3ベクターにてクローニングして、筋肉指向性の(muscle tropic)AAVカプシド中へパッケージングする(PTH-scAAV9、PTHrP-scAAV9、DJ-1-scAAV9)。これらのcDNA配列を配列(Sequence)に記載する。

20

【0199】

AAV形質導入細胞におけるこれら分泌性骨原性因子のin vitroでの産生を確認するため、scAAV9血清型を、マウス筋芽細胞細胞株(C2C12)を形質導入するのに使用し、培養から3日後に上清を回収し、分泌因子のレベルをELISAによって測定する。代替的に、細胞を溶解して細胞内タンパク質を免疫ブロッティングによって査定する。それらの分泌が確認された時点で、これらの骨原性因子を骨原性培養条件下でマウス初代OBsとともにインキュベートし、それら骨原性の潜在力を査定する。陰性対照として、GFPをコードするscAAV9血清型を使用する。

【0200】

次に、分泌性骨原性因子のAAV媒介遺伝子付加が、骨粗鬆症の状況において骨喪失を防止するかどうかを調査する。偽手術またはOVX手術を4月齢メスマウス(C57BL/6J、n=12マウス/群)に行い、手術から4週後、PTH、PTHrP、またはDJ-1を発現する 1×10^{10} ゲノムコピーのGFPをコードするscAAV9血清型(PTH-scAAV9、PTHrP-scAAV9、DJ-1-scAAV9)の単回用量を、IM注射を介して後肢の四頭筋中へ投与する。陰性対照として、GFPをコードするscAAV9ベクター対照をこれらのマウス中へ投与する。代替的に、これらのAAV血清型を22月齢メスマウス(C57BL/6J、n=12マウス/群)中へIM注射する。処置から2月後、in vivoでのOBおよびOC活性を査定するため、マウスをカルセインおよびアリザリンレッドで標識して動的な組織形態計測へ供する。骨格分析につき、マイクロCT、TRAP染色(OC分化)、ならびにCol1およびRunx2についてのIHC(OB分化)を、長骨および椎骨において実施する。最後に、CTX(骨再吸収)、P1NPおよびBSAP(骨形成)、ならびにカルシウムおよびリン(骨石灰化ホメオスタシス)の血清レベルを、ELISAまたは比色分析によって測定する。この分析は、OB分化遺伝子の発現を測定する骨RNAのqPCR分析を伴う。最後に、導入遺伝子(PTH、PTHrP、またはDJ-1)の血清レベルをELISAによって測定する。

30

40

【0201】

例3：骨芽細胞におけるShn3の誘導欠失は成体マウスの骨形成を促進する

骨形成に対するSHN3の短期間阻害の効果を検査するため、誘導性の骨芽細胞特異的Shn3-ノックアウトマウスを、Shn3^{f/f}マウスと、成熟骨芽細胞中タモキシフェン誘発Creリコンビナーゼを発現するオステオカルシン-CreERTマウスとを交配させることによって生成した(Shn3^{Ocn-Ert})。これらのマウスを、Creレポーター-Rosa^{mT/mG}マウスとさらに交配させることで、Creを発現する細胞(Shn3^{Ocn-Ert}; Rosa^{mT/mG})を可視化させた。Shn3^{Ocn-}

50

Er^t; Rosa^{mT/mG}マウスのタモキシフェンでの処置により、Shn3の骨芽細胞特異的欠失を包含する、骨梁および皮質骨の表面にて成熟骨芽細胞におけるGFPの発現がもたらされた(図23)。結果的に、これらのマウスは、タモキシフェンで処置された対照マウスと比較して、骨梁量が有意に増加したことを示した(図23)。これらの結果は、成熟骨芽細胞におけるShn3の誘導欠失が、成体マウスにおいて骨量を増加させるのに充分であることを指し示す。

【0202】

Shn3^{f1/f1}マウスにおけるCre-組換えのための進行役(facilitator)として働く、CreをコードするscAAV9ベクター(scAAV9-Cre、図30)を生成した。Shn3^{f1/f1}マウスを、Shn3^{f1/f1}マウスから単離されたCOBsの培養物においてscAAV9-Creで最初に処置し(図30)、予想どおりShn3^{f1/f1} COBsにおけるscAAV9媒介Cre発現は、Shn3の欠失および増強された骨芽細胞分化を結果として生じさせた(図31)。次に、scAAV9-Creを、2月齢Shn3^{f1/f1};Rosa^{mT/mG}マウス中へi.v.投与を介して注射した。注射から2月後、大腿骨中のCre mRNAの発現(図31)および骨表面上に存在する骨芽細胞系列細胞中のEGFPタンパク質のCre媒介発現(図30)を夫々、RT-PCRおよび蛍光顕微鏡法によって確認させた。scAAV9-EGFPで処置された大腿骨と比較して、scAAV9-Creで処置された大腿骨は、shn3 mRNAレベルの有意な増加(図31)および相対的な骨梁量の増加(図31)を示した。これらの結果は、Shn3^{f1/f1}マウスにおいて全身的に送達されたscAAV9-Creが、骨芽細胞系列細胞を標的にし、Shn3欠失を媒介して骨量を増加させることを示す。重要なことには、これらの結果は、骨生理学を劇的に変更する、骨芽細胞系列細胞へのscAAV9媒介導入遺伝子送達の効能を実証する。

【0203】

例4: amiR-shn3導入遺伝子を持つscAAV9によるShn3のサイレンシングはin vivoでの骨形成を促進する

miRNA骨格(scaffolds)中へ設計されたsiRNAカセット、人工マイクロRNAs(amiRs)は、in vivoでの標的メッセージ分解を効率的に促進することを示す。加えて、かかる設計は、発現カセットに、p0IIIプロモーターによって推進されるようにさせて、scAAVベクターでの遺伝子ロックダウンを制御する能力を高める。人工マイクロRNAカセットを、shn3(amiR-shn3)または対照(amiR-ctrl)を標的にするよう改変した。この設計において、amiRを、CBプロモーターとEgfpレポーター遺伝子との間のイントロンに(intronically)挿入し(図24)、これにより確実に(positively)形質導入された細胞または組織の視覚追跡が可能になる。次いで試験カセットをAAV9カプシド中へパッケージングさせた。scAAV9-amiR-shn3またはscAAV9-amiR-ctrlでの処置は、in vitroで確実に形質導入されたCOBsをもたらし(図32)。amiR-ctrlで処置されたCOBsと比較して、scAAV9-amiR-shn3での処置により、~50%低下したshn3 mRNAレベルと、ibsp発現および骨石灰化の相対的な増加とがもたらされた(図32)。

【0204】

amiRsの、in vivoでの骨同化活性を増強する能力を検査するため、scAAV9-amiR-shn3ベクターを、2月齢マウスの膝関節中へi.a.投与を介して注射した。処置を受けてから2カ月、後肢および大腿骨におけるEGFP発現を夫々、IVIS光学結像(図24)および蛍光顕微鏡法(図24)によって検査した。重要なことに、大腿骨から単離されFACSでソーティングされたEGFPを発現する細胞は、~50%低下したshn3 mRNAレベルを示した(図24)。amiR-ctrlで処置された大腿骨と比較して、amiR-shn3で処置された大腿骨は、相対的な骨梁量の有意な増加を示した(図24)。これらの結果は、scAAV9-amiR-shn3の局所送達が、骨芽細胞系列細胞のSHN3発現をロックダウンするのに有効であること、次に骨量をin vivoで増加させることを実証する。

【0205】

scAAV9-amiR-shn3の能力はin vivoでの骨同化活性を促進し得たが、これを受けて、次いで全身送達を検査した。3月齢マウス中へのi.v.投与から2月後、EGFP発現を、期待されるとおり、主として後肢、肝臓、および大腿骨から検出した(図33)。scAAV9-amiR-shn3によって形質導入された大腿骨は、~50%低下したshn3 mRNAレベル(図24)と、骨梁量およ

び皮質骨の骨石灰化密度の有意な増加(図24)とを表した。同じく、in vivoでの骨芽細胞活性は、より大きくなった骨形成速度(BFR)、骨石灰化添加速度(MAR)、および骨表面あたりの骨芽細胞表面(Ob.S/BS)(図24)によって示されるとおり、これらのマウスにおいて増大した。しかしながら、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)陽性破骨細胞数および骨再吸収マーカーC末テロペプチドI型コラーゲン(CTX)の血清レベルは、これらのマウスにおいて変化しなかった(図33)。これらの結果は、全身送達されたAAV9-amiR-shn3が、in vivoでの破骨細胞の数および機能に何の変更もなく、骨芽細胞系列細胞中のshn3発現を低下させ、骨芽細胞活性を向上させ、および骨量を増加させたことを実証する。よって、scAAV9-amiR-shn3ベクターは、強力な骨同化剤としての骨粗鬆症の処置に有用なこともある。

【0206】

10

例4: Shn3のscAAV9媒介サイレンシングは閉経後骨粗鬆症における骨喪失に対抗する

Wntアンタゴニストの阻害は、骨粗鬆症の患者における治療的介入のための新しいアプローチとして認識されている。先の研究は、Wntシグナリングの攪乱(perturbation)を介して、SHN3を骨芽細胞分化のインヒビターとして同定した。卵巣摘出(OVX)マウスは、閉経後の骨粗鬆症のために確立されたモデルである。Shn3の阻害が、骨粗鬆症のための治療としての骨形成を促進する魅力的な標的であり得ることをさらに確立するため、SHN3(Shn3^{-/-})を欠く3月齢メスマウスを卵巣摘出術へ供し、骨量を手術から2月してマイクロCTによって査定した。OVX手術がWTマウスの骨梁量における有意な低下を誘発した一方、OVX誘発骨喪失は、骨梁量が偽-Shn3^{-/-}マウスとOVX-Shn3^{-/-}マウスとの間で同等であったことから、Shn3欠失によって完全に防止された(図25)。よって、Shn3を標的にすることは、閉経後骨粗鬆症において骨喪失を防止する治療可能性を有する。

20

【0207】

閉経後骨粗鬆症におけるscAAV9-amiR-shn3の治療効果を試験するため、偽手術またはOVX手術を3月齢野生型メスマウスに行い、ベクターを手術から6週してi.v.注射した(図25)。7週後に、処置された大腿骨は効率的な形質導入を示し、shn3の~50%ノックダウンに繋がった(図25)。予想どおり、amiR-ctrlを発現するOVXマウスは偽マウスと比べて、骨梁量の有意な増加を示した。しかしながら、scAAV9-amiR-shn3で処置したとき、骨喪失は、より大きな骨梁のBV/TV、幅、および連結密度(connectivity density)によって示されるとおり(図25および図34)、OVXマウス的大腿骨において完全に回復した。同じく、大腿骨のBFRおよびMARも、amiR-ctrlを発現するOVXマウスと比べてこれらのマウスにおいて増加していたが、このことはin vivoでの増強された骨芽細胞活性を実証する(図25)。注目すべきことに、scAAV9-amiR-shn3によるshn3サイレンシングは、TRAP陽性破骨細胞数としての、破骨細胞のin vivoでの機能を変更せず、骨再吸収活性は、amiR-ctrlとamiR-shn3とを発現するOVXマウス間で同等である(図34)。最終的に、生物力学的試験により、大腿骨の強度および剛性が、scAAV9-amiR-shn3で処置されたマウスのOVX誘発骨喪失から大幅に保護されたことが示されたが(図25)、このことは、shn3のscAAV9媒介サイレンシングが骨粗鬆症のマウスにおいて臨床的に有意なエンドポイントを改善することを指し示す。まとめると、これらの結果は、全身送達されたscAAV9-amiR-shn3がOVX誘発骨粗鬆症の発病後に、骨形成を促進して、臨床的に関係のある骨の機械的特性を増強することを実証する。

30

40

【0208】

例5: AAV9カプシド上への骨標的化ペプチドモチーフの結び付けは骨特異的形質導入を改善する

新しいAAV9.DSS-Nter骨指向性(bone-tropic)カプシドの、治療用amiR-shn3導入遺伝子(scAAV9.DSS-Nter-amiR-shn3)のOVXマウスへの送達能を検査した。偽手術またはOVX手術を3月齢メスマウスに行い、scAAV9.DSS-Nter-amiR-shn3を手術から6週してi.v.注射した。注射から7週後、動物は動物後肢切片のいたる所で(図37)および大腿骨の骨芽細胞系列細胞において(図37)強いEGFP発現を呈するが、このことは確固たる形質導入であることを指し示す。shn3 mRNAsのレベルは、amiR-ctrlを発現する偽またはOVX大腿骨(図27)と比べて、amiR-shn3を発現するOVX大腿骨において著しく低下した。amiR-ctrlを発現するOVXマウ

50

すが、偽マウスと比べて、骨梁量の有意な低下を示した一方、骨喪失は、より大きな骨梁のBV/TV、幅、数、および連結密度によって示されるとおり、scAAV9.DSS-Nter-amiR-shn3で処置されたOVXマウスの大腿骨(図27)および腰椎(図27、図37)において完全に回復した。まとめると、これらの結果は、骨指向性AAV9.DSS-NterカプシドによるamiR-shn3の送達閉経後骨粗鬆症における骨喪失に対抗し得ることを実証する。

【0209】

例6：骨粗鬆症のヒト患者および動物モデルにおける骨喪失の阻害

NF- (RANK、TNFRSF11A)リガンドの受容体活性化に対するヒト化された生物学的抗体(biologic antibody)は、破骨細胞分化に要されるRANKシグナリングを阻害するRANKリガンド(RANKL)とRANKとの間の相互作用に干渉する。よって、その処置は、破骨細胞媒介骨再吸収を抑制することによって、骨粗鬆症をもつヒト患者および動物モデルにおける骨喪失を防止する。

10

【0210】

新しいAAV9.DSS-Nter骨指向性カプシドの治療用amiR-33-mRANKi導入遺伝子(scAAV9.DSS-Nter-amiR-mRANKi 1/2)の送達能を、破骨細胞前駆体におけるRANKをサイレンシングしこれによって骨粗鬆症のヒト患者および動物モデルにおける骨喪失を阻害することによる破骨細胞分化の抑制について検査する。

【0211】

方法

scAAVベクター設計および産生

20

amiR-33-ctrlおよびamiR-33-shn3のDNA配列をgBlocksとして合成し、pAAVsc-CB6-Egfpプラスミドのイントロン領域中、制限酵素部位(PstIおよびBglII)にてクローニングした。pAAVsc-CB6-Creベクターを、EgfpレポーターをCreリコンビナーゼに置き換えることによって生成した。構築物を配列決定によって確認した。先の研究により、トランスジェニックマウスにおけるshRNA標的化マウスShn3のドキシサイクリン誘導発現はshn3 mRNAレベルの減少および骨量の相対的増加をもたらしたことが指し示された。同じ標的化配列を、amiR-33-shn3カセットを生成するのに使用した。pAAV-amiR-ctrlおよびpAAV-amiR-shn3構築物をAAV9カプシド中へパッケージングした。加えて、pAAVsc-CB6-Egfp構築物をAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9-HR、AAVrh8、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh43カプシド中へパッケージングした。scAAV産生をHEK293細胞の一過的トランスフェクションによって実施し、CsCl沈降によって精製し、これまでに記載されたとおりのEgfpプライマー/プローブセットを使用するQX200 ddPCR系(Bio-Rad)上の液滴デジタル式PCR(ddPCR)によって力価測定した(titered)。ddPCRのためのgBlocksおよびオリゴヌクレオチドの配列を表3に挙げる。

30

【0212】

表3：プライマー、プローブ、およびgblocksの配列

【表 3】

遺伝子	フォワード	配列番号	リバース	配列番号
マウス <i>Shn3</i>	AGAGGCCATTCAGAC GAGTGT	35	CTGCGGAAGCTGAG AGATGT	36
マウス <i>Alp</i>	CACAATATCAAGGAT ATCGACGTGA	37	ACATCAGTTCTGTTC TTCGGGTACA	38
マウス <i>Runx2</i>	TACAAACCATAACCA GTCCCTGTTT	39	AGTGCTCTAACCACA GTCCATGCA	40
マウス <i>Bsp</i>	CAGGGAGGCAGTGAC TCTTC	41	AGTGTGGAAAGTGT GGCGTT	42
マウス <i>Osx</i>	ATGGCGTCCTCTCTGC TTGA	43	GAAGGGTGGGTAGT CATTG	44
マウス <i>Ocn</i>	GCAGCACAGGTCCTA AATAG	45	GGCAATAAGGTAG TGAACAG	46
マウス <i>Coll1a1</i>	CTGTCCCAACCCCA AAG	47	ACGTATTCTTCCGGG CAGAA	48
マウス <i>Hprt</i>	CTGGTGAAAAGGACC TCTCGAAG	49	CCAGTTTCACTAATG ACACAAACG	50
EGFP	AGCAAAGACCCCAAC GAGAA	51	GGCGGCGGTCACGA A	52
EGFP- プローブ	6FAM-CGCGATCACATGGTCTCTGCTGG-TAMRA			53
amiR- 33-ctrl (<i>amiR- ctrl</i>)	TTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCAGATCTAGGGCTCTGCGTTT GCTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCACTG ACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCTGGCGG GCAGCTGTGTACAACTACTTGAGAGCAGGTGTTCTGGCAA TACCTGCCTGCTCTGTAATAGTTTGTACACGGAGGCCTGCC TACTGCCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCA CCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGAATAAGGACAG TGTCACCCCTGCAGGGGATCCGTTGGTGGTCAAATCA			54

10

20

【0213】

骨標的化scAAV9ベクターの生成

骨標的化ペプチドモチーフをコードするDNA配列DSS(AspSerSer)₆(配列番号16)をコドン-最適化した。Q588-DSS-A589カプシド(DSS-588)を生成するため、AAV2 rep遺伝子およびAAV9 cap遺伝子(pAAV2/9)を発現するプラスミドを、AAV9 cap遺伝子中へQ588とおよびA589とのコドン間にDSS配列を挿入するために改変した(pAAV2/9.Q588-DSS-A589)。このプラスミドをscAAV産生に使用した。DSS-Nterカプシドを生成するため、対のプラスミドを使用した。最初に、VP1およびVP3のみが発現されるよう、pAAV2/9中のVP2の開始コドンを突然変異させた(ACG ACC)(pAAV2/9.noVP2)。別のプラスミドにおいて、DSS配列をAAV9 VP2 ORFのN末端と融合した。コザック配列およびATG開始コドンを、CMVプロモーターによって推進される最適な発現を可能にさせるDSS配列の上流側すぐ隣に置いた[pcDNA.DSS-VP2(AAV9)]。プラスミドpAAV2/9.noVP2およびpcDNA.DSS-VP2(AAV9)をscAAV産生に使用した。

30

40

【0214】

細胞

軟骨形成ATDC5細胞をSigmaから購入し、2%FBS、2mM L-グルタミン、および1%ペニシリン/ストレプトマイシンで補充されたDMEM/Ham's F12培地中で培養した。加えて、初代骨前駆体(COB)を、コラゲナーゼII型(50mg/ml、Worthington、LS004176)およびディスパーゼII(100mg/ml、Roche、10165859001)を使用して5日齢野生型新生仔(C57BL/6J)の頭蓋冠から単離し、10%FBS(Gibco)、2mM L-グルタミン(Corning)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Corning)、および1%非必須アミノ酸(Corning)を含有するMEM培地(Gibco)中に維持した。COBsをアスコルビン酸(200uM、Sigma、A8960)およびβ-グリセロロホスファート(10mM、Sigma、G9422)で分化させた。最終的に、骨髄細胞を2月齢マウス(C57BL/6J)

50

の大腿骨および脛骨から流し出し(flushed)、ペトリ皿中、10%FBSおよび20ng/mlのM-CSF (R&D systems)をもつMEM培地中で培養することで骨髄由来破骨細胞前駆体(BM-OCP)を得た。12時間後に非接着性細胞を組織培養ディッシュ中へ再播種し、同じ培地中3日間培養した。次いでBM-OCPsはRAMKL(20ng/ml ; R&D systems)およびM-CSF(20ng/ml ; R&D systems)の存在下6日間で分化し破骨細胞になった。

【0215】

マウス

Shn3^{+/+}マウスおよびShn3^{fl/fl}マウスを、これまでに記載されたとおりに生成し、BALB/cJおよびC57BL/6J夫々の背景で維持した。成熟骨芽細胞においてタモキシフェン誘発Creリコンビナーゼ発現するオステオカルシン-ERT/CreマウスをShn3^{fl/fl}マウスと交配させてShn3^{fl/fl};Ocn-ERT/Creマウスを得た。Creを発現する細胞を標識するため、Shn3^{fl/fl};Ocn-ERT/CreマウスをRosa^{mT/mG}Creレポーターマウスとさらに交配させた。出生後のERT/Creの活性化につき、トウモロコシ油(Sigma)中100mg/kgタモキシフェン(Sigma)を1日に一度、連続5日間、2月齢メスマウスへ腹腔内注射した。

10

【0216】

マウス遺伝子型をテール(tail)ゲノムDNA上PCRによって決定した。プライマー配列は請求に応じて入手可能である。すべての実験において対照には同腹仔を使用し分析した。

【0217】

マイクロCT分析

マイクロCTを骨梁および皮質骨の微小構造の定性的および定量的査定のために使用し、分析下の動物の遺伝子型を知らない調査員らによって実施した。指示マウスから切除された大腿骨を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、マイクロCT 35(Scanco Medical)を使用し7μmの空間分解能で走査した。大腿遠位の骨梁分析につき、成長板の近位280μmから始まる上部2.1mm領域の等高線に合わせた。大腿骨の皮質骨分析につき、長さ0.6mmの中央骨幹領域を使用した。L4脊椎分節のマイクロCTスキャンを、等方性ボクセルサイズ12μmを使用して実施した。3D再構成画像は、輪郭で形成された(contoured)2D画像から、二値化画像の距離変換に基づく方法によって得た。代替的に、Inveonマルチモダリティ3D可視化プログラムを使用して、マイクロCTモダリティの静的または動的な複数ボリュームの融合3D視界を生成した(Siemens Medical Solutions USA, Inc)。提示されたすべての画像は、夫々の遺伝子型の代表である(n>5)。

20

30

【0218】

組織学、組織形態計測、および免疫蛍光

組織学的分析につき、大腿骨および椎骨を、rAAVsベクターで処置されたマウスから解剖し、10%中性緩衝ホルマリン中2日間固定し、5%テトラナトリウムEDTAによって2~4週間脱灰した。組織をエタノール系に通過させることによって脱水し、キシレン中で二度澄ませ、パラフィン中に包埋し、冠状のプレート(coronal plate)に沿って前から後へ6μmの幅にて切片を作製した。脱灰された大腿骨の切片を、ヘマトキシリンおよびエオジン(H&E)または酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)で染色した。

【0219】

動的な組織形態計測的分析につき、2%重炭酸ナトリウム溶液に溶解された25mg/kgカルセイン(Sigma, C0875)および50mg/kgアリザリン-3-メチルイミノ二酢酸(Sigma, A3882)をマウス中へ6日間隔にて皮下注射した。10%中性緩衝ホルマリン中2日間固定された後、未脱灰の大腿骨試料をメチルメタクリレート中に包埋し、近位骨幹端の縦断切片を作製し(5μm)、類骨査定にはMcNealのトリクロームで、骨芽細胞にはトルイジンブルーで、破骨細胞にはTRAPで染色した。関心のある領域を定義し、骨形成速度/骨表面(BFR/BS)、骨石灰化添加速度(MAR)、骨表面(BS)、骨芽細胞表面(Ob.S/BS)、および破骨細胞表面(Oc.S/BS)を、半自動分析系へ接続されたNikon Optiphot 2を使用して測定する(骨計測)。測定値を2つの切片/試料(~25μmの差で分離された)に対して採り、正規化に先立ち合計してASBMR標準に従って単一の測定値/試料を得た。この方法論は広範な品質管理および確認を経ており、結果を2名の異なる研究者らによって盲検式に(in a blinded fashion)査定した。

40

50

【0220】

免疫蛍光につき、rAAVで処置されたマウスから解剖された新たな大腿骨および椎骨を回収し、即時に氷冷4%パラホルムアルデヒド溶液中2日間固定した。半脱灰を5日間0.5M EDTA(pH 7.4)中4 にて絶えず振盪させながら行い(寿命(age) 1週間)、20%スクロースリン酸緩衝液の混合物での浸潤を1日、25%スクロースリン酸緩衝液の混合物での浸潤を翌日も続けた。すべての試料を25%スクロース溶液とOCTコンパウンド(Sakura)との50/50混合物中に包埋し、クリオスタット(Leica)を使用し切断し12um幅の矢状切片にした。免疫蛍光染色および分析を、これまでに記載されたとおりに実施した。手短に言えば、0.2% Triton X-100での10min間の処置後、切片を室温にて30min間5%ロバ血清でブロッキングし、終夜4 にて抗BGLAP抗体(sc-365797、Santa Cruz、1:150)とともにインキュベートした。一次抗体をロバ抗ラットIgG Alexa-594(1:500、分子プローブ)で可視化した。核をDAPIで対比染色する。Olympus IX81共焦点顕微鏡またはLeica TCS SP5 II Zeiss LSM-880共焦点顕微鏡を画像試料に対して使用した。

10

【0221】

生体力学分析

大腿骨を、Center for Skeltal Research Imageing and Biomechanical Testing Coreにて電気力学的試験機(Electroforce 3230、Bose Corporation、Eden Prairie、MN)を使用する三点曲げにおいて機械的に試験した。折り曲げ具は8mmの底部径間長を有していた。試験を、速度0.05mm/secでの変位制御移動における負荷点で、力と変位とのデータを60Hzにて収集しつつ実施した。骨のすべてを、支持体上に載っておりかつ張力が負荷されている頭蓋表面で試験する最中、同じ配向に位置付けた。曲げ剛性(EI、N-mm²)、見掛けの弾性率(Eapp、MPa)、極限モーメント(Mult、N-mm)、見掛けの極限応力(σ_{app} 、MPa)、骨折するまでの仕事量(work to fracture)(Wfrac、mJ)、および見掛けの靱性(Uapp、mJ/m³)を、前記試験からの力と変位とのデータおよびマイクロCTで測定された中央骨幹幾何学的形状に基づき算出した。骨折するまでの仕事量は、大腿骨の骨折を引き起こすのに要するエネルギーであって、リーマン和の方法を使用し力-変位曲線下面積を見出すことによって算出した。曲げ剛性は、力-変位曲線の線形部を使用して算出した。最小の慣性モーメント(Imin)を、見掛けの弾性率を算出するときに使用した。

20

【0222】

ELISA分析

CTX1 ELISA(Abclonal MC0850)分析を、製造業者の指示に従いキットを使用することによって実施した。

30

【0223】

骨芽細胞分化分析

アルカリホスファターゼ(ALP)染色につき、骨芽細胞を10%中性ホルマリン緩衝液で固定し、ファストブルー(Sigma、FBS25)およびナフトール(Naphthol) AS-MX(Sigma、855)を含有する溶液で染色した。代替的に、骨芽細胞を細胞増殖のための10倍希釈アラマブルー溶液(Invitrogen、DAL1100)でインキュベートした。続いて、細胞を洗浄して、6.5mM Na₂CO₃、18.5mM NaHCO₃、2mM MgCl₂、およびホスファターゼ基質(Sigma、S0942)を含有する溶液でインキュベートし、ALP活性をルミノメーター(Biorad)によって測定した。

40

【0224】

成熟骨芽細胞における細胞外マトリックスの骨石灰化を査定するため、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で二度洗浄し、70%EtOH中15min間室温にて固定した。固定された細胞を蒸留水で二度洗浄し、次いで2%アリザリンレッド溶液(Sigma、A5533)で5min間染色した。次いで細胞を蒸留水で3回洗浄し、カルシウム堆積物の存在について検査した。骨石灰化を酢酸抽出方法によって定量した。

【0225】

定量的RT-PCR分析

全RNAを、QIAzol(QIAGEN)を使用して細胞から精製し、cDNAを、Applied BiosystemsからのHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitを使用して合成した。定量的RT-PCR

50

を、CFX接続RT-PCR検出系(Bio-Rad)とともにSYBR(登録商標) Green PCR Master Mix(Bio-Rad)を使用し実施した。骨組織中のShn3 mRNAレベルを測定するため、骨髄の除去後に脛骨を液体窒素中30sec間急速凍結させ(snap-frozen)、順に1mlのQIAzol中1min間ホモジナイズした。

【0226】

代替的に、rAAV9で処置されたマウスから解剖された大腿骨および脛骨を、10mM HEPES(pH 7.2)(CellGro)を含有するHanks Balanced Salt Solution(Life Technologies)中で粉砕し、緩やかな攪拌下15min間37℃にて2.5mg/mL コラゲナーゼA(Roche)および1ユニット/mL ディスパーゼII(Roche)で酵素的に消化した。その結果得られた細胞懸濁液を濾過し(40μm)、0.5%BSA(フラクシオンV)および2mM EDTAを含有するPBS(pH 7.2)を使用して洗浄した。洗浄後、細胞を、2mM EDTAおよび1μg/mL 4-6,ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)(生/死排除)をもつPBS(pH 7.2)に再懸濁し、EGFPを発現する細胞を、FACS Aria II SORPセルソーター(Becton Dickinson)を使用し、DAPI⁺細胞およびダブレットを排除しつつソーティングした。全RNAを、QIAzolを使用し細胞から精製した。PCRに使用されるプライマーを表3に記載する。

【0227】

免疫プロットティング分析

細胞をTNT溶解緩衝液(50mM Tris-HCl(pH 7.4)、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mM EDTA、1mM EGTA、50mM NaF、1mM Na₃VO₄、1mM PMSF、およびプロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma))中で溶解し、細胞溶解物からのタンパク質量を、DCタンパク質アッセイ(Bio-Rad)を使用して測定した。等量のタンパク質をSDS-PAGEへ供し、Immunobilon-P 膜(Millipore)へ移し、抗GFP抗体(JL-8、632381、Takara、1:1000)、抗Creリコンビナーゼ抗体(ab24607、Abcam、1:1000)、抗Hsp90抗体(675402、Biolegend、1:1000)で免疫プロットし、ECL(Thermo Fisher scientific)で現像した。抗HSP90抗体での免疫プロットティングをローディング対照として使用した。代替的に、解剖された大腿骨および軟組織をRIPA溶解緩衝液(89900、Thermo Fisher scientific)中でホモジナイズし、組織溶解物を免疫プロットティング分析へ供した。

【0228】

骨芽細胞、破骨細胞、または軟骨細胞をin vitroで形質導入するrAAV血清型のスクリーニング

ATDC5細胞または初代COBsを24ウェルプレート中1×10⁴細胞/ウェルの密度にて播種し、24hrs後にこれらを、3つの異なる力価にて(10⁹~10¹¹/mLゲノムコピー)、CB-Egfpレポーター導入遺伝子をパッケージングするrAAV1、rAAV2、rAAV3、rAAV4、rAAV5、rAAV6、rAAV6.2、rAAV7、rAAV8、rAAV9、rAAVrh8、rAAVrh10、rAAVrh39、またはrAAVrh43ベクターとともにインキュベートした。48hrs後に細胞をPBSで洗浄し、EGFP発現をEVOS FL結像系(Thermo Fisher scientific)によって監視した。代替的に、細胞をTNT溶解緩衝液中で溶解し、EGFP発現を抗EGFP抗体での免疫プロットティングによって査定し、Image Jソフトウェアを使用して定量した。最後に、初代骨髄単球を24-ウェルプレート中5×10⁵細胞/ウェルの密度にて播種し、10ng/mlのRAMKLおよび20ng/mlのM-CSFの存在下2日間培養して破骨細胞前駆体へ分化させた。rAAV-Egfpベクターでの処置から3日後、EGFP発現をEVOS FL結像系によって、および抗EGFP抗体での免疫プロットティングによって査定した。

【0229】

rAAVベクターのin vivoでのスクリーニングにつき、10μlのrAAV-Egfpベクター(1×10¹¹GC; 5×10¹²GC/kg)を2月齢オスマウス(Jackson Laboratory)の膝関節中へ関節内(i.a.)注射した。注射から2週後、大腿骨および膝関節をIVIS-100光学結像または凍結切片のために解剖した。

【0230】

Cre-リコンビナーゼまたはamiR-shn3のrAAV9媒介送達の骨形成に対する効果

局所送達につき、amiR-ctrlまたはamiR-shn3を持つ10μlのrAAV9(1×10¹¹GC; 5×10¹²GC/kg)を2月齢オスマウスの膝関節中へi.a.注射した。注射から2月後、大腿骨をマイクロC

10

20

30

40

50

T分析のために解剖した。

【 0 2 3 1 】

全身送達につき、Egfp、Cre、amiR-ctrl、またはamiR-shn3を持つ200 μ lのrAAV9(4×10^{11} GC ; 2×10^{13} GC/kg)をマウス中へ静脈内(i.v.)注射し、2月後にマウスを、動的な組織形態計測的分析のために6日間隔にてカルセインおよびアリザリン-3-メチルイミノ二酢酸を皮下注射した。非標識マウスを、IVIS-100光学結像または凍結切片を使用しEGFP発現を監視するために使用した。

【 0 2 3 2 】

閉経後骨粗鬆症のマウスモデルにおいて組織的に送達されたrAAV9-amiR-shn3の治療効果

閉経後骨粗鬆症のマウスモデルを、3月齢メスマウス(Jackson Laboratory)を麻酔して両側の卵巣を摘出すること(OVX)によって生成した。手術から6週後、偽マウスまたはOVXマウスに、amiR-ctrlもしくはamiR-shn3を持つ200 μ lのrAAV9またはrAAV9.DSS-Nter(4×10^{11} GC ; 2×10^{13} GC/kg)をi.v.注射した。マウスを無作為にrAAV9またはrAAV9.DSS-Nterの6群に分けた：偽+rAAV9-amiR-ctrl、OVX+rAAV9-amiR-ctrl、OVX+rAAV9-amiR-shn3、偽+rAAV9.DSS-Nter-amiR-ctrl、OVX+rAAV9.DSS-Nter-amiR-ctrl、OVX+rAAV9.DSS-Nter-amiR-shn3。注射から7週後、マウスを、動的な組織形態計測的分析のために6日間隔にてカルセインおよびアリザリン-3-メチルイミノ二酢酸を皮下注射した。非標識マウスを、IVIS-100光学結像または凍結切片を使用しEGFP発現を監視するために使用した。

【 0 2 3 3 】

統計的方法

すべてのデータを平均 \pm s.e.m.として提示した。試料サイズを、測定されたパラメータにおける30%の差異が、期待平均値の10~20%のシグマの推定値から生物学的に有意であると見なされるであろうと仮定して算出した。アルファおよびベータを夫々、.05および0.8の標準値に設定した。いかなる動物も試料も分析から排除せず、適用可能であれば動物を処置・対・対照の群へ無作為に分けた。関係のあるデータの分析につき、関係があるなら、シャピロ・ウィルク正規性検定を、群の正常な分布をチェックするために最初に実施した。正規性検定に合格した場合に両側独立スチューデントt検定を、正規性検定に合格しなかった場合にマン・ホイットニー検定を、2群間の比較のために使用した。3群または4群の比較につき、一元配置ANOVAを、正規性検定に合格した場合に使用し、これに続きすべての対の群についてテューキーの多重比較検定を使用した。正規性検定に合格しなかった場合にはクラスカル・ワリス検定を実施し、これに続きダン(Dunn)の多重比較検定を実施した。GraphPad PRISMソフトウェア(v6.0a、La Jolla、CA)を統計分析に使用した。P < 0.05を統計的に有意であると見なした。*、P < 0.05 ; **、P < 0.01 ; ***、P < 0.001 ; および****、P < 0.0001。

【 0 2 3 4 】

配列 (Sequence)

> 配列番号1 ; amiR-33-mSHN3i-1 : tttgtcttttatttcagggtcccAGATCTAGGGCTCTGCGTTTGCTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCTGGGCCACTGACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCTGGCGGGCAGCTGTGTACAACTACTTGAGAGCAGGTGTTCTGGCAATACCTGCCTGCTCTGTAATAGTTTGTACACGGAGGCCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCACCGCTGAGGGCTACCTAACCATCGTGGGAATAAGGACAGTGTCACCCCTGCAGgggatccggtgggtggcgcaaatca

【 0 2 3 5 】

> 配列番号2 ; amiR-33-mSHN3i-2 : tttgtcttttatttcagggtcccAGATCTAGGGCTCTGCGTTTGCTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCTGGGCCACTGACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCTGGCGGGCAGCTGTGACTACAGGTACTCACAAGCTCTGTTCTGGCAATACCTGGAGCTTGTCTGCACCTGTAGTCACGGAGGCCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCACCGCTGAGGGCTACCTAACCATCGTGGGAATAAGGACAGTGTCACCCCTGCAGgggatccggtgggtggcgcaaatca

【 0 2 3 6 】

> 配列番号3 ; amiR-33-hSHN3i-1 :

GtcttttatttcagggtcccagatcttAGGGCTCTGCGTTTGCTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCTGGGCCACT

GACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAGCTGTGtttccatggtaagttcaaggcTGTTCTGG
 CAATACCTGGCCTTGAAGATGCCATGGAAACACGGAGGCCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTA
 AGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGGACAGTGTACCCccctgcaggggatccggtggtggtg
 caaat

【 0 2 3 7 】

> 配列番号4 ; amiR-33-mCTSKi-1 : tttgtcttttattttcaggtcccAGATCTAGGGCTCTGCGTTTGTCCAG
 GTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCACTGACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAGC
 TGTGTTTCATCATAGTACACACCTCTGTTCTGGCAATACCTGGAGGTGTGATCCATGATGAAACACGGAGGCCTGCCCTG
 ACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGGACAG
 TGTACCCCTGCAGgggatccggtggtggtgcaaatca

10

【 0 2 3 8 】

> 配列番号5 ; amiR-33-mCTSKi-2 : tttgtcttttattttcaggtcccAGATCTAGGGCTCTGCGTTTGTCCAG
 GTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCACTGACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAGC
 TGTGTTACTGTAGGATCGAGAGGGATGTTCTGGCAATACCTGTCCCTCTCCTTACTACAGTAACACGGAGGCCTGCCCTG
 ACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGG

【 0 2 3 9 】

> 配列番号6 ; amiR-33-hCTSK-1 :
 GtcttttattttcaggtcccagatcttAGGGCTCTGCGTTTGTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCACT
 GACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAGCTGTGatfatcgctattgcagctttcTGTTCTGG
 CAATACCTGGAAAGCTGGTACAGCGATAATCACGGAGGCCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTA
 AGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGGACAGTGTACCC ccctgcaggggatccggtggtggt
 gcaaat

20

【 0 2 4 0 】

> 配列番号7 ; amiR-33-hCTSK-2 :
 GtcttttattttcaggtcccagatcttAGGGCTCTGCGTTTGTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCACT
 GACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAGCTGTGtcagattatcgctattgcagcTGTTCTGG
 CAATACCTGGCTGCAATTCCAATAATCTGACACGGAGGCCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTA
 AGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGGACAGTGTACCC ccctgcaggggatccggtggtggt
 gcaaat

30

【 0 2 4 1 】

> 配列番号8 ; amiR-33-mSOSTi-1 : tttgtcttttattttcaggtcccAGATCTAGGGCTCTGCGTTTGTCCA
 GGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCACTGACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAG
 CTGTGAcaagtaggcagatgaggcacTGTCTGGCAATACCTGGTGCCTCAAGTACCTACTTGTACAGGAGGCCTGCCCT
 GACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGGACA
 GTGTCACCCCTGCAGgggatccggtggtggtgcaaatca

【 0 2 4 2 】

> 配列番号9 ; amiR-33-mSOSTi-2 : tttgtcttttattttcaggtcccAGATCTAGGGCTCTGCGTTTGTCCA
 GGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCACTGACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAG
 CTGTGtgacctctgtggcatcattccTGTTCTGGCAATACCTGGGAATGATCGCGCAGAGGTCACACGGAGGCCTGCCCT
 GACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGGACA
 GTGTCACCCCTGCAGgggatccggtggtggtgcaaatca

40

【 0 2 4 3 】

> 配列番号10 ; amiR-33-hSosT-1 :
 GtcttttattttcaggtcccagatcttAGGGCTCTGCGTTTGTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCACT
 GACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAGCTGTGatggtctgtgtgtctccagcTGTTCTGG
 CAATACCTGGCTGGAGATGAGCAAGACCATCACGGAGGCCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTA
 AGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGGACAGTGTACCCccctgcaggggatccggtggtggtg
 caaat

【 0 2 4 4 】

> 配列番号11 ; amiR-33-hSosT-2 :

50

GtcttttatttcagggtcccagatcttAGGGCTCTGCGTTTGGCTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGCCTGGGCCACT
 GACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCTGCACACCTCCTGGCGGGCAGCTGTGACGtCt t tGGtCtCAAAGGGGTGTTCTGG
 CAATACCTGCCCTTTGTCATCAAAGACGTACGAGGCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTA
 AGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATCGTGGGGAATAAGGACAGTGTACCCcctgcaggggatccggtgggtg
 caaat

【 0 2 4 5 】

> 配列番号12 ; ヒトPTH(1 ~ 84aa) : ggaattgtaccgcgcccgatccAccggtGCCACCATGATACCTGCAA
 AAGACATGGCTAAAGTTATGATTGTCATGTTGGCAATTTGTTTTCTTACAAAATCGGATGGGAAATCTGTTAAGAAGAGA
 TCTGTGAGTAAAACAGCTTATGCATAACCTGGGAAAACATCTGAACTCGATGGAGAGAGTAGAATGGCTGCGTAAGAA
 GCTGCAGGATGTGCACAATTTTGTGCCCTTGGAGCTCCTTAGCTCCCAGAGATGCTGGTCCCAGAGGCCCGGAAAAA
 AGGAAGACAATGTCTTGGTTGAGAGCCATGAAAAAAGCTTGGAGAGGCAGACAAAGCTGATGTGAATGTATTAATACTAAA
 GCTAAATCCCAGTGAagcttatcgataccgtcgactagagctc

10

【 0 2 4 6 】

> 配列番号13 ; ヒトPTHrP(1 ~ 140aa) :
 ggaattgtaccgcgcccgatccAccggtGCCACCATGCAGCGGAGACTGGTTCAGCAGTGGAGCGTCGCGGTGTTCTCTG
 CTGAGCTACGCGGTGCCCTCCTGCGGGCGCTCGGTGGAGGGTCTCAGCCGCCCTCAAAAAGAGCTGTGTCTGAACATCA
 GCTCCTCCATGACAAGGGGAAGTCCATCCAAGATTTACGGCGACGATTCTTCTTACCATCTGATCGCAGAAATCCACA
 CAGCTGAAATCAGAGCTACCTCGGAGGTGTCCCCTAACTCCAAGCCCTCTCCCAACACAAAAGAACCACCCCGTCCGATTT
 GGGTCTGATGATGAGGGCAGATACCTAACTCAGGAACTAACAAGGTGGAGACGTACAAAAGAGCAGCCGCTCAAGACACC
 TGGGAAGAAAAAGAAAGGCAAGCCCGGAAAACGCAAGGAGCAGGAAAAAGAAAAAACGGCGAACTCGCTCTGCCTGGTTAG
 ACTCTGGAGTGACTGGGAGTGGGCTAGAAGGGGACCACCTGTCTGACACCTCCACAACGTCGCTGGAGCTCGATTACCGG
 TAAagcttatcgataccgtcgactagagctc

20

【 0 2 4 7 】

> 配列番号14 ; マウスDJ-1(1 ~ 190aa) :
 ggaattgtaccgcgcccgatccaccggtcGCCACCATGGGATGGAGCTGTATTATCCTGTTTTCTCGTCGCTACTGCCAC
 CGGAGCTCATTCCGCTTCCAAAAGAGCTCTGGTTCATCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTGATTCTGTGG
 ATGTCATGCGGCGAGCCGGATCAAAGTCACTGTTGCAGGCTTGGCTGGGAAGGACCCCGTGCAGTGTAGCCGTGATGTA
 ATGATTTGTCCAGATACCAGTCTGGAAGATGCAAAAACGCAGGGACCATAACGATGTGGTGGTTCTTCCAGGAGGAAATCT
 GGGTGCACAGAATTTATCTGAGTCGCCTATGGTGAAGGAGATCCTCAAGGAGCAGGAGAGCAGGAAGGGCCTCATAGCTG
 CCATCTGTGCAGGTCCTACGGCTCTGTTGGCTCACGAAGTAGGTTTTGGATGCAAGGTCACAACACACCCACTGGCTAAG
 GACAAAATGATGAATGGCAGTCACTACAGCTACTCAGAGAGCCGCGTGGAGAAGGACGGCCTGATCCTCACCAGCCGCGG
 GCCGGGACCAGCTTTGAGTTTGCCTAGCCATTGTGGAGGCACTCGTGGGAAAAGACATGGCCAACCAAGTGAAGGCAC
 CGTTGTTCTCAAAGACTAGTAAaagcttatcgataccgtcgactagagctcgctg

30

【 0 2 4 8 】

> 配列番号15 ; ヒトDJ-1(1 ~ 190aa) :
 ggaattgtaccgcgcccgatccaccggtcGCCACCATGGGATGGAGCTGTATTATCCTGTTTTCTCGTCGCTACTGCCAC
 CGGAGCTCATTCCGCTTCCAAAAGAGCTCTGGTTCATCCTGGCTAAAGGAGCAGAGGAAATGGAGACGGTCATCCCTGTAG
 ATGTCATGAGGCGAGCTGGGATTAAGGTCACCGTTGCAGGCCTGGCTGGAAAAGACCCAGTACAGTGTAGCCGTGATGTG
 GTCATTTGTCTGATGCCAGCCTTGAAGATGCAAAAAAGAGGGACCATATGATGTGGTGGTTCTACCAGGAGGTAATCT
 GGGCGCACAGAATTTATCTGAGTCTGCTGCTGTGAAGGAGATACTGAAGGAGCAGGAAAACCGGAAGGGCCTGATAGCCG
 CCATCTGTGCAGGTCCTACTGCTCTGTTGGCTCATGAAATAGGTTTTGGAAAGTAAAGTTACAACACACCCCTCTTGCTAAA
 GACAAAATGATGAATGGAGGTCATTACACCTACTCTGAGAATCGTGTGGAAAAGACGGCCTGATTCTTACAAGCCGGGG
 GCCTGGGACCAGCTTCGAGTTTGCCTTGCAATTTGTTGAAGCCCTGAATGGCAAGGAGGTGGCGGCTCAAGTGAAGGCTC
 CACTTGTCTTAAAGACTAGTAAaagcttatcgataccgtcgactagagctcgctg

40

【 0 2 4 9 】

> 配列番号16 ; (AspSerSer)₆骨標的化ペプチド :
 DSSDSSDSSDSSDSSDSS

【 0 2 5 0 】

> 配列番号17 ; HABP-19、骨標的化ペプチド :
 C EPRR EVA EL EPRR EVA EL、

50

(Gla残基)： -カルボキシル化グルタミン酸(Glu)は、ビタミンK依存性 -カルボキシル化によるGluに由来する。

【 0 2 5 1 】

> 配列番号18：AAV-カプシド1；

MAADGYLPDWLEDNLSEG I REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
 QQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSG I G
 KTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPATPAAVGPTTASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGFPRKRLNFKLFN I Q
 VKEVTTNDGVTT I ANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP
 SQMLRTGNNFTFSYTFEEVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYYLNRTQNSGSAQNKDLLFSRGSPPAGMSVQPKNWLP
 GPCYRQQRVSKTKTDNNSNFTWTGASKYNLNGRES I INPGTAMASHKDDDEKFFPMSGVM I FGKESAGASNTALDNVM I
 TDEEE I KATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMWWQDRDVYLGQP I WAK I PHTDGHFHPSPMLGGFGL
 KNPPPQ I L I KNTPVPANPPAEFSATKFASF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGL
 YTEPRP I GTRYLTRPL

10

【 0 2 5 2 】

> 配列番号19：AAV-カプシド2；

MAADGYLPDWLEDTLSEG I RQWWWLKPGRPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYD
 RQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTG
 KAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSLGNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWWMGDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGFPRKRLNFKLFN I QV
 KEVTQNDGTTT I ANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPS
 QMLRTGNNFTFSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASD I RDQSRNWLP
 PCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNDRDSL VNP GPAMASHKDDDEKFFPQSGVL I FGKQGSSEKTNVD I EKVM I T
 DEEE I RTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMWWQDRDVYLGQP I WAK I PHTDGHFHPSPMLGGFGLK
 HPPPQ I L I KNTPVPANPSTTFSAAKFASF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENSKRWNPE I QYTSNYNKSVDFTVDNNGV
 SEPRPETTRYLTRNL

20

【 0 2 5 3 】

> 配列番号20：AAV-カプシド3B；

MAADGYLPDWLEDNLSEG I REWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYD
 QQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKR I LEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVG
 KSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWL GDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGFPRKRLNFKLFN I QV
 KEVTQNDGTTT I ANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPS
 QMLRTGNNFQFSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLSQAGPQMSLSLQARNWLP
 GPCYRQQRVSKTANDNNSNFPWTAASKYHLNDRDSL VNP GPAMASHKDDDEKFFPMHGNI I FGKEGTTASNAELDNVM I
 TDEEE I RTTNPVATEQYGTVANLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMWWQDRDVYLGQP I WAK I PHTDGHFHPSPMLGGFGL
 KHPPPQ I M I KNTPVPANPPTTFSPAFAF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENSKRWNPE I QYTSNYNKSVDFTVDNNGV
 YSEPRP I GTRYLTRNL

30

【 0 2 5 4 】

> 配列番号21：AAV-カプシド4；

MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQ
 QLKAGDNPYLKYNHADADEFQQLQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEQAGETAPGKKRPL I ESPQQPDSSTG I GK
 KGKQPAKKKLVFEDETGAGDGPPEGSTSGAMSDDSEMRAAAGAAVEGGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRT
 WVLPPTYNNHLYKRLGESLQSNYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGMRPKAMRVK I FN I QVKEVTTSNGE
 TTVANNLTSTVQ I FADSSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQQTDRNAFYCLEYFPSQMLRTG
 NNFE I TYSFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPL I DQYLWGLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSNFKKNWLPGPS I KQ
 QGFSKTANQNYK I PATGSDSL I KYETHSTLDGRWSALTPGPPMATAGPADSKFSNSQL I FAGPKQNGNTATVPGTL I FTS
 EEELAATNATDMDWGNLPGGDQSNLPTVDRLTALGAVPGMWWQNRD I YYQGP I WAK I PHTDGHFHPSPMLGGFGLKH
 PPPQ I F I KNTPVPANPATTFSSSTPVNSF I TQYSTGQVSQ I DWE I QKERSKRWNPEVQFTSNYQQNSLLWAPDAAGKYT
 EPRA I GTRYLTHHL

40

50

【 0 2 5 5 】

> 配列番号22 : AAV- カブシド5 :

MSFVDHPPDWLEEVGEGREFLGLLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNGLDRGEPVNRADDEVAREHD I SYNE
QLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNL GKAVFQAKKRVL EPFGLVEEGAKTAPTGKR I DDHFPKRKKARTEEDS
KPSTSSDAEAGPSGSQQLQ I PAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMDRVTTKSTRTWLPL
SYNNHQYRE I KSGSV DGSNANAYFGYSTPWGYDFNRFHSHWSPRDWQRL I NNYWGRFRPRSLRVK I FN I QVKEVTVDST
TT I ANNL TSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQPVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGN
NFEFTYNFEEVPPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSG
VNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTM I FNSQPANPGTTATYLEGNML I TSESETQPVNR
VAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQE I VPGSVWMERDVYLQGP I WAK I PETGAHFHPSAMGGFGLKHPPMML I KN
TPVPGN I TSFSDVPVSSF I TQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNP E I QYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRP I GTRYL
TRPL

10

【 0 2 5 6 】

> 配列番号23 : AAV- カブシド6 :

MAADGYLPDWLEDNLSEG I REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
QQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVL EPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSG I G
KTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPATPAAVGPPTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREV I
TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSASTGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRL I NNNWGRFRPKRLNFKLFN I Q
VKEVTTNDGVTT I ANNL TSTVQVFSSEYQLPYVVGSAHQGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP
SQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLNRTQNSGSAQNKDLLFSRGPAGMSVQPKNWLP
GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRES I I NPGTAMASHKDDKDKFFPMSGVM I FGKESAGASNTALDNVM I
TDEEE I KATNPVATERFGTVAVNLQSSSDPATGDVHVMGALPGMWWQDRDVYLQGP I WAK I PHTDGHFHPSPLMGGFGL
KHPPPQ I L I KNTPVPANPPAEFSATKFASF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGL
YTEPRP I GTRYLTRPL

20

【 0 2 5 7 】

> 配列番号24 : AAV- カブシド6.2 ;

MAADGYLPDWLEDNLSEG I REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
QQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVL EPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSG I G
KTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPATPAAVGPPTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREV I
TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSASTGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRL I NNNWGRFRPKRLNFKLFN I Q
VKEVTTNDGVTT I ANNL TSTVQVFSSEYQLPYVVGSAHQGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP
SQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLNRTQNSGSAQNKDLLFSRGPAGMSVQPKNWLP
GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRES I I NPGTAMASHKDDKDKFFPMSGVM I FGKESAGASNTALDNVM I
TDEEE I KATNPVATERFGTVAVNLQSSSDPATGDVHVMGALPGMWWQDRDVYLQGP I WAK I PHTDGHFHPSPLMGGFGL
KHPPPQ I L I KNTPVPANPPAEFSATKFASF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGL
YTEPRP I GTRYLTRPL

30

【 0 2 5 8 】

> 配列番号25 : AAV- カブシド7 :

MAADGYLPDWLEDNLSEG I REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
QQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVL EPLGLVEEGAKTAPAKKRVPVEPSPQRSPTSSTG I
GKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPAAAPSSVGSVTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREV I
TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSETAGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRL I NNNWGRFRPKKLRFLFN I
QVKEVTTNDGVTT I ANNL TST I QVFSSEYQLPYVVGSAHQGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNNGSQSVGRSSFYCLEYF
PSQMLRTGNNFEFSYSFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAEQAKNW
LPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDDEDRFFPSSGVL I FGKTGATNKTTLENVL
MTNEEE I RPTNPVATEEY I VSSNLQAANTAAQTQVNNQ GALPGMWWQNRDVYLQGP I WAK I PHTDGNFHPSPLMGGFGL
LKHPPPQ I L I KNTPVPANPPAEVFTPAKFASF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENS KRWNPE I QYTSNFEKQTGVDFAVDSQG
VYSEPRP I GTRYLTRNL

40

【 0 2 5 9 】

> 配列番号26 : AAV- カブシド8 :

50

MAADGYLPDWLEDNLSEG IREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
 QQLQAGDNPYLRYNHADAIEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTG I
 GKKKGQPPARKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
 I TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRL I NNNWGFPRKRLSFKLFN
 I QVKEVTQNEGTKT I ANNL TST I QVFTDSEYQLPYVVLGSAHQGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY
 FPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNW
 LPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPG I AMATHKDDEERFFPSNG I L I FGKQNAARDNADYSDV
 MLTSEEE I KTTNPVATEEY I VADNLQQQNTAPQ I GTVNSQGALPGMWWQNRDVYLQGP I WAK I PHTDGNFHPSPLMGGF
 GLKHPPPQ I L I KNTVPVADPPTTFNQSKLNSF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENSKRWNPE I QYTSNYYKSTSVDFAVNTE
 GVYSEPRP I GTRYLTRNL

10

【 0 2 6 0 】

> 配列番号27 : AAV- カブシド9 :

MAADGYLPDWLEDNLSEG IREWWALKPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
 QQLKAGDNPYLRYNHADAIEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAG I G
 KSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQP I GEPPAAPSGVGS LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRL I NNNWGFPRKRLNFKLFN I
 QVKEVTDNNGVKT I ANNL TSTVQVFTDSDYQLPYVVLGSAHEGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYF
 PSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLSKT I NGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNY I P
 GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSL I FGKQGTGRDNVDADKVM I
 TNEEE I KTTNPVATESYGVVATNHQSAQAQAQTGWVQNG I L PGMWWQDRDVYLQGP I WAK I PHTDGNFHPSPLMGGFGM
 KHPPPQ I L I KNTVPVADPPTAFNKDKLNSF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENSKRWNPE I QYTSNYYKSNNEFAVNTEGV
 YSEPRP I GTRYLTRNL

20

【 0 2 6 1 】

> 配列番号28 : AAV- カブシド rh8 :

MAADGYLPDWLEDNLSEG IREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
 QQLKAGDNPYLRYNHADAIEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSG I G
 KTGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPAAAPSGLGPNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRL I NNNWGFPRKRLNFKLFN I
 QVKEVTTNEGTKT I ANNL TSTVQVFTDSEYQLPYVVLGSAHQGCLPPFPADVFMV PQYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYF
 PSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLVRTQTTGTGGTQTLAFSQAGPSSMANQARNWVP
 GPCYRQQRVSTTTNQNNSNFAWTGAAKFKLNGRDSLMPGVAMASHKDDDDRFFPSSGVL I FGKQGAGNDGVDYSQVL I
 TDEEE I KATNPVATEEYGAVA I NNQAANTQAQTGLVHNQGV I PGMWWQNRDVYLQGP I WAK I PHTDGNFHPSPLMGGFGL
 KHPPPQ I L I KNTVPVADPPLTFNQAKLNSF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENSKRWNPE I QYTSNYYKSTNVDFAVNTEGV
 YSEPRP I GTRYLTRNL

30

【 0 2 6 2 】

> 配列番号29 : AAV- カブシド rh10 :

MAADGYLPDWLEDNLSEG IREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
 QQLKAGDNPYLRYNHADAIEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTG I
 GKKKGQPPAKKRLNFGQTGDSESVDPQP I GEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
 I TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRL I NNNWGFPRKRLNFKLFN
 I QVKEVTQNEGTKT I ANNL TST I QVFTDSEYQLPYVVLGSAHQGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY
 FPSQMLRTGNNFEFSYQFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLSQAGPNNMSAQAKNW
 LPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSV
 MLTSEEE I KTTNPVATEEQYGVVADNLQQQNAAP I VGAVNSQGALPGMWWQNRDVYLQGP I WAK I PHTDGNFHPSPLMGGF
 GLKHPPPQ I L I KNTVPVADPPTTFNQAKLASF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENSKRWNPE I QYTSNYYKSTNVDFAVNTD
 GTYSEPRP I GTRYLTRNL

40

【 0 2 6 3 】

> 配列番号30 : AAV- カブシド rh39 :

MAADGYLPDWLEDNLSEG IREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
 QQLKAGDNPYLRYNHADAIEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTG I

50

GKKGQQPAKKRLNFGQTDSESVDPDPQ I GEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
 I TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGFRPKRLSFKLFN
 I QVKEVTQNEGTKT I ANNL TST I QVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY
 FPSQMLRTGNNFEFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLSRTQSTGGTQGTQQLLFSQAGPANMSAQAKNW
 LPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDDEERFFPSSGVLMFGKQAGARDNVDYSSV
 MLTSEEE I KTTNPVATEQYGVVADNLQQTNTGP I VGNVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGP I WAK I PHTDGNFHPSPLMGGF
 GLKHPPPQ I L I KNTPVPADPPTTFSQAKLASF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENS KRWNPE I QYTSNYYKSTNVDFAVNTE
 GTYSEPRP I GTRYLTRNL

【 0 2 6 4 】

> 配列番号31 : AAV- カブシド rh43 :

10

MAADGYLPDWLEDNLSEG I REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
 QQLEAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSG I G
 KKGQQPARKRLNFGQTDSESVDPDPQLGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGFRPKRLSFKLFN I
 QVKEVTQNEGTKT I ANNL TST I QVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFM I PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYF
 PSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWL
 PGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPG I AMATHKDDDEERFFPSNG I L I FGKQNAARDNADYSDVM
 LTSEEE I KTTNPVATEEYGI VADNLQQQTAPQ I GTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGP I WAK I PHTDGNFHPSPLMGGFG
 LKHPPPQ I L I KNTPVPADPPTTFNQSKLNSF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENS KRWNPE I QYTSNYYKSTSVDFAVNTEG
 VYSEPRP I GTRYLTRNL

20

【 0 2 6 5 】

> 配列番号32 : AAV- カブシド2/2-66 :

MAADGYLPDWLEDTLSEG I RQWWWLKPGRPPPKPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYD
 RQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTG
 KAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPDPQLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMMGDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGFRPKRLNFKLFN I QV
 KEVTQNDGTTT I ANNL TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPS
 QMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLSKTNAPSGTTTMSRLQFSQAGASD I RDQSRNWLPG
 PCYRQQRVSKTAADNNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDDEEKYFPQSGVL I FGKQDSGKTNVD I EKVM I T
 DEEE I RTTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATTDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP I WAK I PHTDGHFHPSPLMGGFGLK
 HPPPQ I L I KNTPVPANPSTTFSAAKFAF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENS KRWNPE I QYTSNYYKSVNVDFTVDTNGVY
 SEPRP I GTRYLTRNL

30

【 0 2 6 6 】

> 配列番号33 : AAV- カブシド2/2-84 :

MAADGYLPDWLEDTLSEG I RQWWWLKPGRPPPKPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYD
 RQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTG
 KAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPDPQLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMMGDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGFRPKRLNFKLFN I QV
 KEVTQNDGTTT I ANNL TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPS
 QMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYLSKTNAPSGTTTMSRLQFSQAGASD I RDQSRNWLPG
 PCYRQQRVSKTAADNNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDDEEKYFPQSGVL I FGKQDSGKTNVD I EKVM I T
 DEEE I RTTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATTDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP I WAK I PHTDGHFHPSPLMGGFGLK
 HPPPQ I L I KNTPVPANPSTTFSAAKFAF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENS KRWNPE I QYTSNYYKSVNVDFTVDTNGVY
 SEPRP I GTRYLTRNL

40

【 0 2 6 7 】

> 配列番号34 : AAV- カブシド2/2-125 :

MAADGYLPDWLEDTLSEG I RQWWWLKPGRPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYD
 RQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLARAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTG
 KSGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPDPQLGQPPAAPSGLGTNTMASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMMGDRV I
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQ I SSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRL I NNNWGFRPKRLNFKLFN I QV

50

KEVTQNDGTTT I ANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQTVGRSSFYCLEYFPS
 QMLRTGNNTFSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPL I DQYLYYLSRTNTPSGTTTTQSRLRFSQAGASD I RDQSRNWLPG
 PCYRQQRVSKTAADNNSDYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGTAMASHKDDEEKYFPQSGVL I FGKQDSGKTNVD I ERVMI T
 DEEE I RTTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATS DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP I WAK I PHTDGHFHPSPLMGGFGLK
 HPPPQ I L I KNTPVPANPSTTFSAAKFASF I TQYSTGQVSVE I EWELQKENS KRWNPE I QYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVY
 SEPRP I GTRYL TRNL

【 0 2 6 8 】

> 配列番号69 ; ヒトSchnurri-3ヌクレオチド配列 :

CTCACAACCAGCCGACTCTCCATTATCCAGCTGCCTAGTTTGGTGCCTTCAATGTACATGGCTATTCCGTGTGCATATGT
 GTGTATACAAACACGCATGCATGCCTGGATGGACATACGTATGCACAGGTTATTTTTTAAGGACAATTCTTTCAATAAGG 10
 TCTTTACCCCTTACTTGAAACAGGTGTTTCATGAAAAAATGCACAAAATCCTGCCTGGCCGGAATAATTCATGAAGAAGG
 GGCTGGATCCGTGGGTCAGAGAACACAGGACCAGTTTGCATCCCAAGGCCGAAGGATTCGAGGCACAAAACCCAGCAGCC
 TCAACCTAGTTCATGGAGGAGCCTCGCGGGGTCCTGGCCAAGCAAGCCC GCCCTCTGGTGGGAAGAGCGGCGCCTAGGT
 GGAGGTGGCTGCCGTAGGAGTGGACATGAATGCTGGCTTTTCAGAGAGAACAGCGTTTCAGTTTTTGGTCATCGGAAGTGG
 TGCCTTCAGCACAGAAGAAGAGCGTGATTTCTCCTCCAAGGCCGTTGATCTCCAACCCAGA ACTAAAGGGGAGAAGAGCC
 ACCCCAGCATCCAGCGTGGCATCTCTTGTCAGGACCAGGGATGACTGGCCATGGACACAGATGTCTCCAACCTTCA
 ACCGTTTGCATAGCACACGGGGACTCGTGGGGGCCACCTGCCACTGCCAGCTGAAACAATACAATGGCAATACTGACAT
 CCTTCATGACGTTTTCCCGACAGACATT CAGGCAGAAAAGTGCTGGTGCCTTTTTCTGTCTGCAAAGTAGAGGGCCATGCCT
 CACCAATAGAATAGCGTGGGCCCTGATGACCTGCTCCGAGTCCACTCACAGCCAGTGACACTTGCAAAAACTCCCAAAG
 CCGTCTTGGGTTTGGCTCCACAGCTCTTGACCAATGTGGCCAAAAGCTGGACACCTCCTTGGGACTGGGATTATTCAT 20
 AAATGCAGCCCGCCCTGACTCTCCCTGAATAGCATCTGAAGTCTTTGTGAAGTGCATGGATCCTGAACAAAAGTGTCAAGG
 GCACCAAGAAGGCTGAGGGAAAGTCCCCGGAAGCGGCTGACCAAAGGAGAGGCCATT CAGACCAGTGTTCCTCCAGCGTC
 CCATACCCAGGCAGCGGCACAGCTGCCACCCAAGAGAGCCCCGCCAAGAGCTCTTAGCCCCGAGCCCTTCCCGGGCCC
 CTCATCAGTTCTTAGGGAAGGCTCTCAGGAGAAAACGGGCCAGCAGCAGAAGCCCCCAAAGGCCCCCATCGAAGCAT
 CCGTCCACATCTCACAGCTTCCGCAGCACCTCTGACACCAGCATT CATGTGCGCTGGCAAACCTGAGCATCTCCTGGAG
 GGGTCCACATGGCAACTGGTTGACCCCATGAGACCTGGACCCTCTGGCTCCTTCGTGGCCCCTGGGCTCCATCCTCAGAG
 CCAGCTCCTTCCCTCCACGCTTCCATCATTCCCCCGAGGACCTTCTGGAGTCCCCAAAGTCTTCGTGCCTCGTCCTT
 CCCAGGTCTCCTTGAAGCCACAGAAGAGGCACACAAGAAGGAGAGGAAGCCCCAGAAGCCAGGCAAGTACATCTGCCAG
 TACTGCAGCCGGCCCTGTGCCAAGCCAGCGTGCTCCAGAAGCACATT CGCTCACACACAGGTGAGAGGCCCTACCCCTG
 CGGCCCTGTGGCTTCTCCTTCAAGACCAAGAGTAATCTCTACAAGCACAGGAAGTCCCATGCCACCCGCATCAAAGCAG 30
 GCCTGGCCTCAGGCATGGGTGGCGAGATGTACCCACATGGGCTGGAGATGGAGCGGATCCCTGGGGAAGAGTTTGAGGAG
 CCCACTGAGGGAGAAAGCACAGATTCTGAAGAGGAGACTAGTGCCACCTCTGGTCAACCTGCAGAGCTCTCCCAAGACC
 CAAGCAGCCCTTCTCTCCAGCGGGCTATACAGCTCTGGGAGCCACAGTTCCAGCCACGAACGCTGTTCCCTGTCCCAGT
 CCAGCACAGCCAGTCACTCGAAGACCCCTCCATTTGTGGAACCTCATCTGAGCACCCCTGAGCCATAAACCTGAA
 GACACCCACACGATTAAGCAGAAGCTGGCCCTCCGCTTAAGCGAGAGGAAGAAGGTGATCGATGAGCAGGCGTTTTCTGAG
 CCCAGGCAGCAAAGGGAGTACTGAGTCTGGGTATTTCTCTCGCTCCGAGAGTG CAGAGCAGGTCAGCCCCCAAACA
 CCAACGCCAAGTCTACGCTGAGATCATCTTTGGCAAGTGTGGGCGAATAGGACAGCGGACCGCCATGCTGACAGCCACC
 TCCACCCAGCCCTCCTGCCCTGTCCACCGAAGACAAGCCAGCCTGGTGCCTTTGTCTGTACCCCGGACGCAGGTGAT
 CGAGCACATCACGAAGCTCATCACCATCAACGAGGCCGTGGTGGACACCAGCGAGATCGACAGCGTGAAGCCAAGGCGGA
 GCTCACTGTCCAGGCGCAGCAGCATGGAGTCCCCAAAATCCAGCCTCTACCGGAGCCCTGT CATCCCACAGTGAGAAA 40
 ACCAAGCCTGAACAACTACTGCTGAGCCTCCAGCACCCGCCAGTACCGCCCCCTGTGCCTCTCCTGAGAAGCCACTC
 AATGCCTTCTGCCGCTGCACTATCAGCACCCCCACCACCCCTTCCGAGGTAGCTACTCCTTCGATGACCATATCACCG
 ACTCCGAAGCCCTGAGCCACAGCAGTACGTGTTTACCTCCACCCCGGATGCTGAAGCGCCAGCCGGCAATCGAATTA
 CCTTTGGGAGGGGAATACAGTTCTGAGGAGCCTGGCCCAAGCAGCAAAGACACAGCCTCCAAGCCCTCGGACGAAGTGA
 ACCCAAGGAAAGCGAGCTTACCAAAAAGACCAAGAAGGGTTTGA AAAACAAAAGGGGTGATCTACGAATGTAACATATGTG
 GTGCTCGGTACAAGAAAAGGGATAACTACGAAGCCACAAAAAATACTACTGCTCAGAGCTTCAGATCGAAAAGCCCATC
 TCTGCAGGACCCACACATCTCCAGAAGCTGAAAAGAGT CAGATTGAGCATGAGCCGTGGTCCCAAATGATGCATTACAA
 ACTGGGAACCACCTGGA ACTCACTCACTGAGGAAGAGGAGGAAAGAGAAGGCCTTGGGGACGAGGAAGAGCCACCTG
 CCTTTGAGTCCACAAAAGT CAGTTTGGCAGCCCCGGGCCATCTGATGCTGCTCGGAACCTTCCCTGGAGTCCACCAAG
 TCACCAGCAGAACCAAGTAAATCAGTGCCCTCCTTGGAGGGACCCACGGGCTTCCAGCCAAGGACTCCCAAGCCAGGGTC 50

10
20
30
40
50

CGTTTCAGAATCAGGGAAGGAGAGGAGAACAACGTCCAAAGAAATTTCTGTCATCCAGCACACCAGCTCCTTTGAGAAAT
CTGATTCTCTCGAGCAGCCGAGTGGCTTGAAGGGGAAGACAAACCTCTGGCCAGTTCCCATCACCCCCACCTGCCCA
CACGGACGCTCTGCTCACTCCCTGCAGCCTAAGTTGGTCCGCCAGCCCAACATTCAGGTTCTGAGATCCTAGTAACTGA
GGAGCCTGACCGGCCGGACACAGAGCCAGAGCCGCCCCCTAAGGAACCTGAGAAGACTGAGGAGTTCCAATGGCCCCAGC
GCAGCCAGACACTTGCCAGCTCCCAGCTGAGAAGCTGCCACCCAAAAAGAAGAGTTGCGCCTGGCAGAGATGGCCCAA
TCATCAGGGGAGTCCAGCTTCGAGTCTCTGTGCCCTGTCTCGCAGCCGAGCCAGGAAAGCAATGTCTCTTTGAGTGG
GTCCAGCCGCTCAGCCTCGTTTGAGAGGGATGACCATGGGAAAAGCCGAGGCCCCAGTCCCTCATCTGACATGCGCCCA
AACCCCTGGGCACCCACATGTTGACTGTCCCCAGCCACCACCCACATGCCCGAGAGATGCGGAGGTGAGCCTCAGAGCAG
AGCCCCAACGTTTCCATTCTGCCACATGACCGAGACACGCAGCAAATCCTTTGACTATGGCAGCTTGTCTTGACAGG
CCTTCTGCTCCAGCCCAGTGGCTCCACCAGCGCGGGTGGCCCCGCCAGAGAGAAGAAAATGCTTCTTGGTGAGACAGG
CCTCTCTGAGCAGGCCTCCAGAATCTGAGTTGGAGTTGCCCCCAAGGGAAGACAGGAGAGCGAAGAACCACAGCCCTCA
TCCAGTAAACCCTCTGCCAAAAGCTCATTGTCCAGATTTCTCTGCGGCCACCTCACATGGTGGACCCCCGGGAGGCAA
GGGCCAGGGCAGGACAGGCCCCATTGGGGCCCACTGTGCCCTACACAGAAGCACTGCAAGTGTTCACCACCCCGTTG
CCCAGACACCCCTGCATGAGAAGCCATACCTGCCCCACCAGTCTCCCTTTTCTCCTTCCAGCATCTCGTGCAGCATGAG
CCAGGACAGTCTCCAGAATTTCTTCCACCCAGGCCATGTCCAGCCTCTGTCTCACCATACTCCATGCCCCCACTTCC
TCCCTCCTTATTTCAAGCCCCACCGCTTCTCTCCAGCCTACTGTTCTGCACCCAGGCCAACTCCATCTCCCCAGCTCA
TGCTCACCAGCCAACATCCCCTTCAGGCAGCCCCCTTCTTCTCCCATGCCATACCCGACCTCCTCAGCACTGTCT
TCTGGGTTTTTCTGCTCTGCAATCCCAGTTTGCACCTTCAGCTCCCTGGTGATGTGGAAAAGCCATCTGCCCCAGATCAA
AACAGCCTGGCCCCACTGGCAACAGGAAGTGTGGCTCTCCCCAGCACAGAGTACAGCAGTGACATCCGGCTACCCC
CTGTGGCTCCCCAGCCAGCTCCTCAGCACCTACATCAGCTCCTCCACTGGCCCTGCCTGCCTGTCCAGACACCATGGTG
TCCCTGGTTGTGCCCTGTCCGTGTTCCAGACCAATATGCCGTCTATGGGAGCGCAATGTACACCACCCTTTCCAGATCTT
GGTACCCAGTCCCAAGGCAGCTCAGCAACTGTGGCACTTCCCAAGTTTGAAGAACCCCATCAAAGGGGACGACTGTAT
GTGGTGCAGATGTGCATGAGGTTGGGCCCGGCCCTTCTGGGTTAAGTGAAGAGCAAAGCAGAGCTTTCCCAACTCCATAC
CTGAGAGTGCTGTGACATTACCTGAAAGAAAAGGCACTTCCCTGTATCAGAGAGTATCTTGAGCCTGGAGGGGAGTTC
ATCAACAGCAGGGGGAAGCAAACGTGTCTTTTACCAGCTGGCAGCCTTGAACCTACCATGGAAAACCCAGCAGCAAAAA
GAGTGAAGGAGGAGGAGGCTTCCAAGGCAGATGAAAACTTGAGCTGGTAAAACCATGCAGTGTGGTCTTACCAGCACCG
AGGATGGGAAGAGGCCAGAGAAAATCCCACTTAGGCAACCAGGGCCAAGGCAGGAGGGAGCTAGAAATGCTGTCCAGCCTG
TCCTCAGATCCATCTGACACAAAGGAAATTCCTCCCTCCCTCACCCTGCATTGTCCCATGGGACAGCCCCAGGCTCAGA
AGCTTTGAAGGAATATCCCAGCCATCTGGCAAACCTCACCGAAGAGGGTTGACCCCACTGAGCGTGAAGAAAAGAAGATT
CCAAGGAACAACCTGATCTCCCTCCTTGGCACCTCCGAGCTCTCTGCCCTGTGCAGAAAAGTCTCCAGACCAGCCAAG
TCACAAGAAGGTACGGACTCAAAGAAGGTACTGCAGTTCCCAGCCTCCACACAACCACTAATGTCAGTTGGTGTATTT
AAACTACATTAAGCCAAATCACATCCAGCATGCAGATAGGAGGTCTCTGTTTACGCTGGTTGGTGCATAAGTTTGTACA
ACCCAACTTCCGGGGTTTTCCACTAAAGCTGCTTTGTCCCTCCTGAGGTCTAAGCAGAAAAGTGAGCAAAGAGACATAC
ACCATGGCCACAGCTCCGCATCTGAGGCAGGAAGGCTTGTGCCATCCAGCTCCCGCAAGCCCCGCATGACAGAGTTCA
CCTCCCTTCACTGGTTTTCCCGGAAGGCCAGAAAGATCTAGCTAGAGTGAGAAAGGAAGAGAGGAGAGGGGAGCCGG
AGGAGGATGCTCCTGCCCTCCAGAGAGGGGAGCCGGCGAGGATCAAAATCTTGAAGGAGGGTACAAATCAAACGAAGAG
TATGTATATGTGCGAGGCCCGGCCGAGGGAAAATATGTTTGTGAGGAGTGTGGAATTCGCTGCAAGAAGCCAGCATGCT
GAAGAAAACATCCGCACCCACACTGACGTCCGGCCCTATGTGTGCAAGCACTGTCACTTTTGTCTTTTAAAACCAAAGGGA
ATCTGACTAAGCACATGAAGTCGAAGGCCACAGCAAAAAAGTGCCAAGAGACAGGGGTGCTGGAGGAGCTGGAAGCCGAA
GAAGGAACCAGTGACGACCTGTTCCAGGACTCGGAAGGACGAGAGGGTTCCAGAGGCTGTGGAGGAGCACCAGTTTTTCGGA
CCTGGAGGACTCGGACTCAGACTCAGACCTGGACGAAGACGAGGATGAGGATGAGGAGGAGAGCCAGGATGAGCTGTCCA
GACCATCCTCAGAGGGGCCCCCGCCTGGCCACCACATGCACTGCGGGCAGACTCCTCACCCATCCTGGGCCCTCAGCCC
CCAGATGCCCCGCTCTGGCACGGAGGCTACACGAGGCAGCTCGGTCTCGGAAGCTGAGCGCCTGACAGCCAGCAGCTG
CTCCATGTCCAGCCAGAGCATGCCGGGCCCTCCCTGGCTGGGACCGGCCCTCTGGGCTCTGTGGAGAAAAGACACAGGCT
CAGCCTTGAGCTACAAGCCTGTGTCCCAAGAAGACCGTGGTCCCAAGCAAAGAAGCAGGCAGCCGTCCACCACTAGCC
CGCAAACACTCGCTAACCAAAAACGACTCATCTCCCAGCGATGCTCCCCGGCCCCGAGAACCACAGGCCTCAGCCCCAAG
CCCACCTGGCCTGCACGTGGACCCAGGAAGGGCATGGGCGCTCTCCCTTGTGGTCTCCAAGACTTCAGCTGTCTCCTC
TCACCCTCTGCCCTTGGGAAGAGAAGTGGCCCTCGAGCACATGTGCTCTCAAACCTCAGAGGTACCACCGACCCAGGC
CTCCCAGATACTCGCCACCAGGAGATGGTCTCCAGGTGAGGCCGAGTACCACCCAGGTCAGCGCCGCCAGGGAAGTG
GGCCTTGGCTGGGCCGGCAGCCCTCAGCGGGGAGCATGGCCAGGCTTGGGGCTGGACCCACGGGTTCCTTCCCGC

10

20

30

40

50

CCGCGCCTCTACCTCACAAGCTCCTCAGCAGAAGCCCAGAGACCTGCGCCTCCCCGTGGAAGGCCGAGTCCCGAAGTCCC
 TCCTGCTCACCCGGCCCTGCTCATCCTCTCTCCTCCCGACCTTCTCCGCCCTCCATGACTTCCACGGCCACATCCTGGC
 CCGGACAGAGGAGAACATCTTCAGCCACCTGCCTCTGCACTCCCAGCACTTGACCCGTGCCCATGTCCCTTGATTCCCA
 TCGGTGGGATCCAGATGGTGCAGGCCCGGCCAGGAGCCCACCCACCCCTGCTGCCAGGGCCACCCGAGCCTGGGTGAGT
 GGTTCTCCGGGGTGGCAGCGACCTGACAGGGGCCCGGAGGCCAGGAGCGAGGCCGCTGGAGTCCCCTGAGAGCTC
 GTCAGCCTCCGTGTGCCTGTGGCTAAGGTCTCCAAATTCACACTCTCCTCAGAGCTGGAGGGCGGGGACTACCCCAAGG
 AGAGGGAGAGGACCGGCGAGGCCCGGCCAGGCCTCCTGACTGGACACCCCATGGGACCGGGGCACCTGCAGAGCCCACA
 CCCACGCACAGCCCTGCACCCACCCGACACCTTGCCCCGGCCGCCCCAGGGACGCCGGGCAGCGCAGTCTGGAGCCC
 CCGCTTGGGTCCCGCGTGCACCGACCAACCCCGAGCCTTCTGCCACCCCGCCGCTGGACCGCAGCAGCTCTGTGGGCTG
 CCTGGCAGAGGCTCTGCCCGCTTCCAGCCCGGACGAGGAACCTCTCCGGGAACCCAGGACCAGGCAGGACTCCCCCA
 AGCCCTCAGGAAGTGGGAGGCCAGGGCACATCCACATCAGCCTGAGGACAGGGTTCCCCCAACGCTTAGCCTCTCTCC
 AACTGCTTCAGCATCTGGCTTCCAGTGTCCAGCAACAGACGTTTCCAGCCACTTTCCTCGAATCATCCCCTTCTCAGC
 CCCATCTGTCCCTCCGTCCAGGAGCTCTCACGGCCCCATCTGTTGTACCTTCCCATGTATGCAGTTACCTGTGCCTTTTT
 CTACACCTTTTGTGCTTAAAAAGAAAACAAAACAAATCACATACATACATTTAAAAAACAACAACCCACGAGGAGT
 CTGAGGCTGTGAATAGTTTATGGTTTTGGGAAAAGGCTGATGGTGAAGCCTCTGACCCTCCCGCTGTGGTTGGCAGCC
 ACCACCCAGAGGCTGGCAGAGGGAAAGGGGTACACTGAGGGAGAAAGGAAAAGGAAACTTCAAACAATATAGAATTAA
 ATGTAAGGAAGCACTCCTGTGTACAGATGCGATCAAGGTTCTGTTTATTGCCACTTACCCCCCTGCCAGCTCGTA
 GCCACCCCTCTCTGCCAGCAGAAAGGCCAGTGTCCCCAGGCAGAGGGGCACAAACACAGGCAGGTGACCCACCCAGGC
 CCCAGCAGGCAGGCCAGAAAACTAATCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAGAAAATAAAATGATACT
 TTTCTAGGATTTCAACACAAAATAATAGGTGCAGGTAGAAGGAGGAGGGCTGGCTCCCAAGGGCTCCTGGATACTCTG
 GTAGTCTGAGTCATGGGCCATCCTGGCACTCCACAGGTGGCAGGCCACCCACCCACGCACCCCACTCCAGACACCT
 CCTTCTGCACCCACCCCTGGCCCCCTGGGCTGGGGAAGGAGCCCTGACTGTCCGTCCCTGGCTCCCAAGCCCCTGACCG
 AGGCCTCACTCTCCTGTTGCCCTCTGTTCTAAAACCACCAAAACCACCCACAAAGGCAGAAAGTGGCAGGGCCCGAGCCC
 TAGCGCCGTTCTGAGACTGGGTTTTGGTTTTGTTTCATCTTGGTCCCTGGGGTACAAGGGAGCCTGTTCCCTCATG
 GCTGGTTTTTCCAGTTCTCCACAGCAGAGGTTTGCGGGAACTGTTTCAGGACCACTTTGCCACAGGACCGTTTTCCCC
 CGTCCCTGCCCTGTCTCCACTACCCCAAGGAAATACCCACAACCTGTGGCTGGTGGATACGGCCTGGACCTGTTTGTGT
 CTTACACCTCTTTTTTAAAAAGAGAGAGGATGGTGTTTGATACTTACCCAGCCACCACAGATTCTTTTTGACCTAGAGGA
 TTTTTGAATTGCTCTAACTCGTTGGAATTTCTCAAAGCAATCAGTGTGAGCCAGTGCCTCTTCCCTTACCCACATCTCTAC
 TTTCAAGAAAGTGCCTGCATTTCTGGGGCAAACCTCTACTTTGTAAGAAAATAATAGGACCAGAAATTTAAATCCCA
 AATTGAACTATGGAACCTGAACTCTAGCGTGTTCGCCCAACTGGGAGAGGTGAGCTTTTTTCCAGTGTTCAGAACTGA
 TTTTCTTTACTTTCTACAAGGGAGGGCAGCACAGGGACTACGGTTGAGGCCGTGAAGGCTGGGTTTTGATGCCACCCTAT
 ACAGAGCAGGGACCTCTCTGGCTAATCCCCAGTCTCAGCCAGGCTGTGTGAATCAAGTGCCTGCCCCAGGGCTCTTGAG
 CTATTGAAGCTGCTTGGGTACAGGACACAGTAGGTGGGAGGGTTAAGACCCTTCTGTGAGTTCCTGTGCGGGGCTGTA
 CTTGCCTCTTCCAATTCGTGGCCTTTCCCTGCTTGGTCCCTACTAGACAGACAAAACCAGCCACAGTCCAGCCTGCAGCCA
 GACCACCTTGTTCACCTATTCTCCTTTGCCTCAGAGCTAAGACAAAATGAGACAGAAGGCAGGGCTCCCTGGGAGTCCA
 CTGTGCTCCAGGGTTCTGGGGAATCAGGGTTAGCCAGCAGCTCCTGGCTGCTTCCCTCAGAGACTAGGGCTCTCATCCTC
 C

10

20

30

CCAAGAGAAGCAGCAAGCCCAGCCTGGACCACACTGTCCATATTGCTGGACAGTGGCCTGACAGAAAGTGA CTCTCCAA
 GTCCCAGGAGGCCAGGGCTTTTCTCATCCTTGCCCTTTCAGCCCTAACCCATGGGACTGCCACGGATTGGAGACTTCAAG
 GGCTGAGGTCTGGGAGCTGCATAAAGGGCATTGCTTCAGCCAGGTTAGAAATCTGCCTGGGCAAGCTCTTCTGCCCA
 GACCTACAAAGCAGCAGACCGGGGGCTCTGGTGGACTAGCCCTGACATTGGTGGGGGGCCCCACACCACTCCACCCAC
 CCTGCCTTCCAGCTCTCCTGGGCATTTTTCTCCCTGTACTCAAACAGCCTACCCACCCAAAGTTTTCTCCCTGGGCAGCC
 TAGCAATGAACAGTGCAGCCGGCAGGGCAGAGGCCCGGCAGTACCCGGGCCGTCAGGCTCAGGCAGAGAAGCCACAGGG
 GCCAGGAGTCACTGGAGACTATTTCTAAATGATGGGGTAAATGCACAAATAGAATCTACCAAAGGGCTGCCTCCACAT
 TGATGCCGTGCCAGAGGGACAGAACCAATGCCACCAGCCTGGGTATATGTCACTGGGCACAGCTCTAACCCCTCCTCC
 GGACTCTAGTCCCCTCCTCTGCGCACAGAGCCCCAGCCACAGGTACACCTTCATGATTTGGAGAAAGACGCTCGCCC
 CATGCACGCCCTCCTCTGGGCCTTCTGCCCTGCTCCAGTCACTTCCAAGCTTCTGTGTTGCTGTGATGTTATTGTGCC
 TGTTGAGGGAAGCAGCAGAGGAGGCAGTGGCTGACTTGGCACAGATGCCTGCTACGTGCTCTGTTGAAATGCGCGGGGTG
 GCCATTCCTCGGTACAGACTAGTCTGGTCCCTGGGTGTGGGCAGTGGGGGAGGAACCAACTGGTCGAGGTTTTAGAGCC
 AAACCTTGCTTTGGTTGGTGAGTCTTGCCCCCAGGCCTGCGCTCCACGATGCCTTTACCCCTTGGAATCTCAGGGC

40

50

CATCCTGGGTAGTAACCCCACTCCTCTCTGCTCCCGCCCGCACCTGTGGCTCTCACTCTGGGCTCAACCCCTGCAACCCT
 CCAGGAGCCCGACAGCAGCCAGCTGCCTGCACTGTGCGCTCCGTAAGCTCCAACCTCCAGACCCAGAAGTCCCTCTGCTT
 CCCTCTGTTGAAAAAGCCTAAAAGAAATTAGCTTCCAGATTCTCTAGCCCCTGCTCCATTCCCACCCAGTCCCTTCTGAA
 GAGGAATGAGCAATACATCTGAGCTGGATTTCTCTCTAGTCCTTTCTCCAGACAAATCCTTCTTAAAGCAAAAAGTCCCTGG
 CTGAGCACCTGTCTTGGGGACCGATCTGCCGTGTGACCAGGGGAAGAAAGTTCCCGAAAGCCTGTTCCACCAATTCTGC
 TTCTGTGTTGTGAATCCAGTCTGCTTTCCATTAGAAAAACCGCTTCGGCACTTATGGTCACTTTAATAAATCTAGTATGTA
 AAAAAAGAAAAGAAAAGAAAACAGAAAAAAGAAAACGTGCAGGCAAATGTAAAATAACAATGCTCTCTGTAAGATAAATA
 TTTGCCTTTTTTTCTAAAAGGTGTACGTATTCTGTATGTGAAATTGTCTGTAGAAAAGTTTCTATGTTCTTAAATGGCAAT
 ACATTCAAAAATTGACTGTAGATATGTACAGCAACCCGCACTGGGATGGGGTAGTTTTGCCTGTAATTTTTATTTAAACT
 CCAGTTTCCACACTTGTCTTGTCAATGTTGGTATGGTATATATCAGTGCAAAAAGAAAAACAAAACAGAAAACAAAACAAAA
 AAAAAAACAAAAATCCACGCAGGTCTAAAGCACAGAGTCTGACGTACAAAAGAAAAATGCTCAGTATTGATGTGTGTG
 ACCTTTGTTGTAATTACATCTGACTGTGAATGAGAAGTTTTTACAAGTATAATAATTGCCTTTATTACAGCTCTGGCT
 GAGTGTTACGCCTGAGGATATTTTTTAAAAAAGAAATTAGCATGTTGGAATAAATTTGAAAATCCCAACATAAAAAA
 A

10

【 0 2 6 9 】

> 配列番号70 ; ヒト Schnurri-3アミノ酸配列 :

MDPEQSVKGTKKAEGSPRKRLTKGEA IQTSVSSSVYPYPGSGTAATQESPAQELLAPQPFPGPSSVLREGSQEKTGQQQKP
 PKRPP I EASVH I SQLPQHPLTPAFMSPGKPEHLLLEGSTWQLVDPMPRPGSPGSFVAPGLHPQSLLPSHAS I I PPEDLPGV
 PKVFVPRPSQVSLKPTTEEAHKKERKPKQKPKY I CQYCSRPAKPSVLQKH I RSHTGERPYPCGPGCFSFKTKSNLYKHKR
 SHAHR I KAGLASGMGGEMYPHGLEMER I PGEEFEEPTEGESTDSEETSATSGHPAELSPRPKQPLLSSGLYSSGSHSSS
 HERCSLSQSSTAQSLEDPPPFVEPSSEHPLSHKPEDTHT I KQKLALRLSERKKV I DEQAFLLSPGSKGSTESGYFSRSESA
 EQQVSPNTNAKSYAE I I FGKCGR I GQRTAMLTATSTQPLLPLSTEDKPSLVPLSVPRQTQV I EHI TKL I TI I NEAVDTSE
 I DSVKPRRSSLSRRSSMESPKSSLYREPLSSHSEKTKPEQSLLSLQHPPSTAPPVPLLRSRSHMPSAACT I STPHHPFRGS
 YSFDDH I TDSEALSHSSHVFTSHPRMLKRQPA I ELPLGGEYSSEEPGPSSKDTASKPSDEVEPKESELTKKTKKGLKTKG
 V I YECN I CGARYKKRDNYEAHKKYCYSELQ I AKP I SAGTHTSPEAEKSQ I EHEPWSQMMHYKLGTTLELTPLRKRREKS
 LGDEEEPPAFESTKSQFGSPGPSDAARNLPLESTKSPAEPSKSVPSLEGPTGFQPRTPKPGSGSESGKERRTTSKE I SV I
 QHTSSFEKSDSLEQPSGLEGEDKPLAQFPSPPPAPHGRSAHSLQPKLVRQPN I QVPE I LVTEEPDRPDTEPEPPPKEPEK
 TEEFQWPQRSQTLAQLPAEKLPPKKRRLRAEMAQSSGESSFESSVPLSRSPSQESNVLSLGSRRSASFERRDDHGKAEAP
 SPSSDMRPKPLGTHMLTVPSHHPHAREMRRSASEQSPNVSHSAHMTETRSKSFYDGSLSLTGSPAPAPVAPPARVAPPER
 RKCFLVRQASLSRPESELEVAPKGRQESEEPQSSSKPSAKSSLSQ I SSAATSHGGPPGGKPGQDRPPLGPTVPYTEA
 LQVFHHPVAQTPLHEKPYLPPPVSLSFSQHLVQHEPGQSPEFFSTQAMSSLLSSPYSMPPPLPPSLFQAPPLPLQPTVLHP
 GQLHLPQLMPHPAN I PFRQPPSFLPMPYPTSSALSSGFFLPLQSQFALQLPGDVESHLPQ I KTS LAPLATGSAGLSPSTE
 YSSD I RLPPVAPPASSSAPTSAPPLALPACPD TMVSLVVPVRVQTNMPSYGSAMYTTLSQ I LVTSQSGSSATVALPKFEE
 PPSKGTTVCGADVHEVGPGPSGLSEEQSRAFPPTPYLRVPVTLPERKGTSLSSSE I LSLEGSSTAGGSKRVLSPAGSLEL
 TMETQQKRVKEEEASKADEKLELVKPCSVVLTSTEDGKRPEKSHLGNQGGRRRELEMLSSLSSDPSDTKE I PPLPHPAL
 SHGTAPGSEALKEYPQPSGKPHRRGLTPLSVKKEDSKEQPDPLSLAPPSSLPLSETSSRPAKSQEGTDSKKVLQFPSLHT
 TTNVSWCYLNY I KPNH I QHADRRSSVYAGWC I SLYNPNLPGVSTKAALSLLRSKQKVSKEYTYTMATAPHPEAGRLVPSSS
 RKPRMTEVHLPVSLVSPGQKDLARVEKEEERRGEPEEDAPASQRGEPAR I K I FEGGYKSNEEYVYVRGRGRGKYVCEECG
 I RCKKPSMLKKH I RTHTDVRYVYCKHCHFAFKTKGNLTKHMKSKAHSKCKQETGVLEELEAEEGTSDDLFQDSEGREGE
 AVEEHQFSDLEDSDSDSLDEDEDEDEEESQDEL SRPSSEAPPPGPPHALRADSSP I LGPQPPDAPASGTEATRGSVSE
 AERLTASSCSMSSQSMPGLPWLGPAPLGSVEKDTGSALSYPVSPRRPWSPSKEAGSRPPLARKHSLTKNDSSPQRCSA
 REPQASAPSPGLHVDPRGMGALPCGSPRLQLSPLTLCPGLRELAPRAHVLSKLEGTTPGLPRYSPTRRRWSPGQAESP
 PRSAPPKQWALAGPGSPSAGEHGPGLDPRVLFPAPLPHKLLSRSPETCASPWKAESRSPSCSPGPAHPLSSRPFSAL
 HDFHGH I LARTEEN I FSHLPLHSQHLTRAPCPL I P I GG I QMVQARPGAHP TLLPGPTAAWVSGFSGGSDLTGAREAQER
 GRWSPTESSASVSPVAKVSKFTLSSELEGGDYPKERERTGGGPGRPPDWTPHGTGAPAEPTPTHSPCTPPDTPRPPQG
 RRAAQSWSPRLES PRAPTNPPEPSATPPPLDRSSSVGCLAEASARFPARTRNLSGEPTRTRQDSPKPSGSGEPRAHHPQPEDR
 VPPNA

20

30

40

【 0 2 7 0 】

> 配列番号55 ; amiR-33-mRANKi-1 :

AGGGCTCTGCGTTTGCTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCCACTGACAGCCCTGGTGCCCTGGCCGGCT

50

GCACACCTCCTGGCGGGCAGCTGTGAATGGTCCACATTTTCAGGGACTGTTCTGGCAATACCTGGTCCCTGATTTATGGAC
 CATTACGGGAGGCCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAAC
 CATCGTGGGGAATAAGGACAGTGTACCC

【 0 2 7 1 】

> 配列番号56 ; amiR-33-mRANKi-2 :

AGGGCTCTGCGTTTGTCCAGGTAGTCCGCTGCTCCCTTGGGCCTGGGCCCACTGACAGCCCTGGTGCCTCTGGCCGGCT
 GCACACCTCCTGGCGGGCAGCTGTGACAAATTAGCTGTGACGCTGTTCTGGCAATACCTGGCGCTGACTGCAAATTTGT
 CACGGAGGCCTGCCCTGACTGCCACGGTGCCGTGGCCAAAGAGGATCTAAGGGCACCGCTGAGGGCCTACCTAACCATC
 GTGGGGAATAAGGACAGTGTACCC

【 0 2 7 2 】

> 配列番号57 ; 骨吸収ペプチド(8-mer) :

DDDDDDDD

【 0 2 7 3 】

> 配列番号58 ; 骨吸収ペプチド(9-mer) :

DDDDDDDDD

【 0 2 7 4 】

> 配列番号59 ; 骨吸収ペプチド(10-mer) :

DDDDDDDDDD

【 0 2 7 5 】

> 配列番号60 ; 骨吸収ペプチド(11-mer) :

DDDDDDDDDDD

【 0 2 7 6 】

> 配列番号61 ; 骨吸収ペプチド(12-mer) :

DDDDDDDDDDDD

【 0 2 7 7 】

> 配列番号62 ; 骨吸収ペプチド(13-mer) :

DDDDDDDDDDDDD

【 0 2 7 8 】

> 配列番号63 ; 骨吸収ペプチド(14-mer) :

DDDDDDDDDDDDDD

10

20

30

【 図 1 】

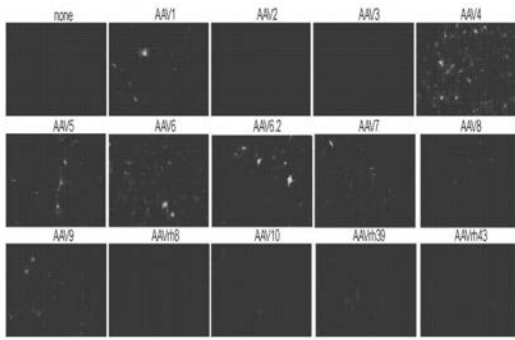


図 1

【 図 2 】

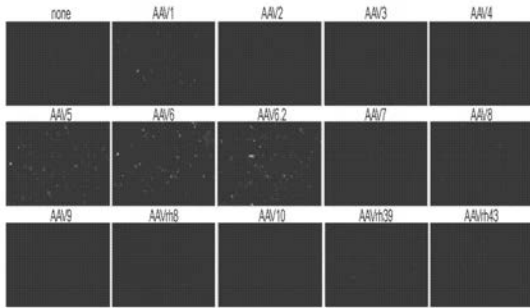


図 2

【 図 3 】

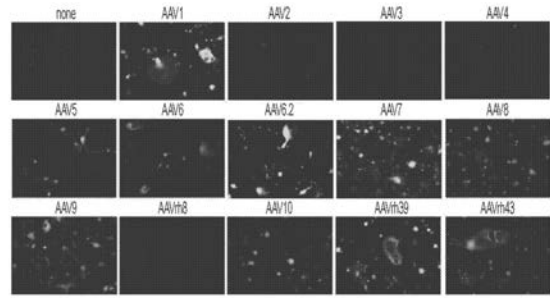


図 3

【 図 4 】

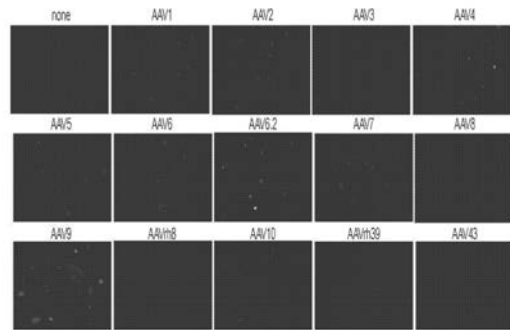


図 4

【 図 5 】

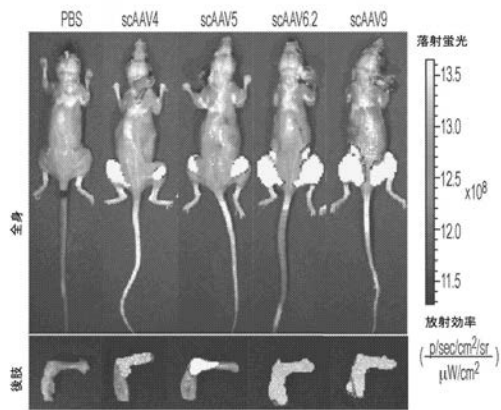


図 5

【 図 6 】

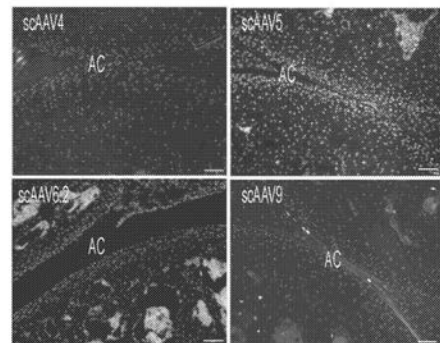


図 6A

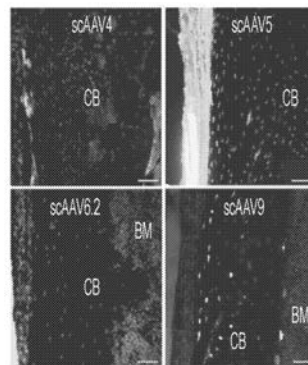


図 6B

【 図 7 】

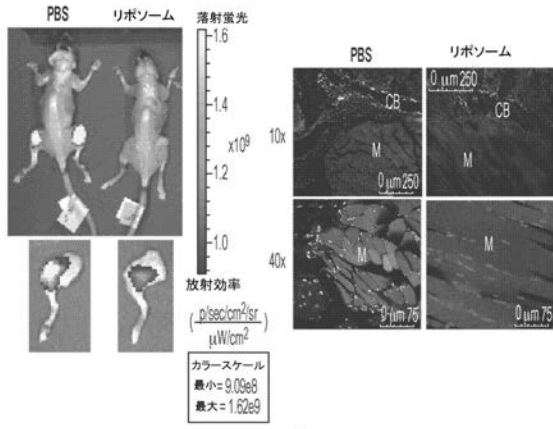


図 7

【 図 8 】

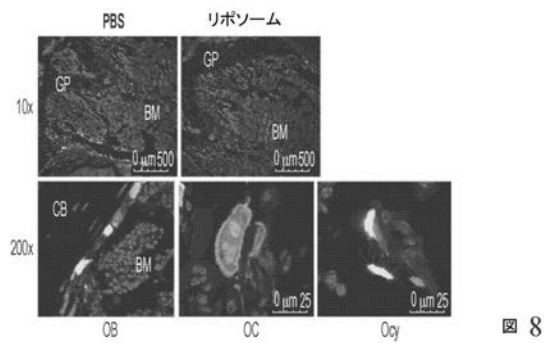


図 8

【 図 1 1 A - B 】

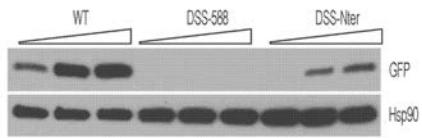


図 11A

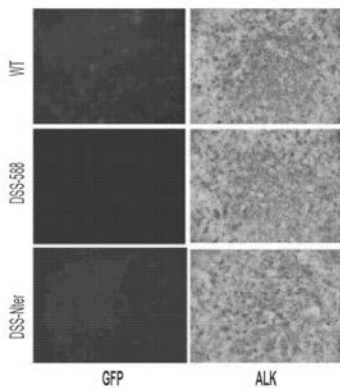


図 11B

【 図 9 】

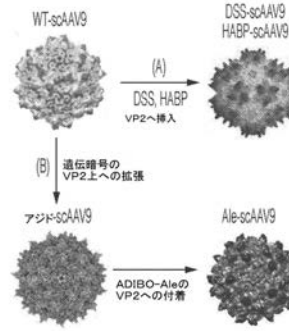


図 9

【 図 1 0 】

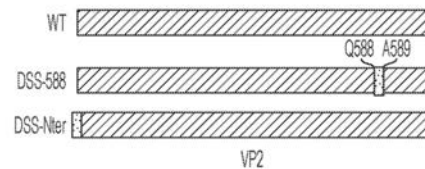


図 10

【 図 1 1 C 】

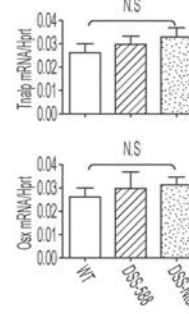


図 11C

【 図 1 2 A 】

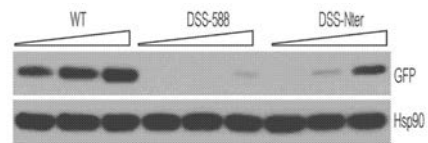


図 12A

【 図 1 2 B - C 】

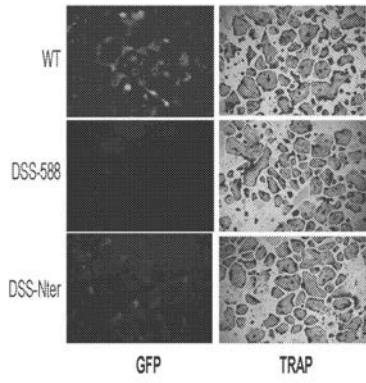


図 12B

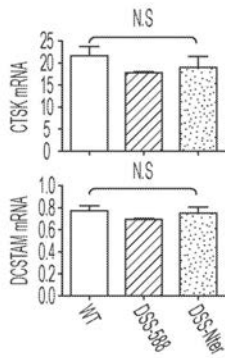


図 12C

【 図 1 3 】

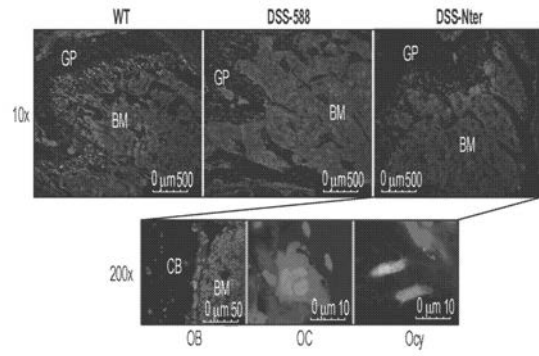


図 13

【 図 1 4 】

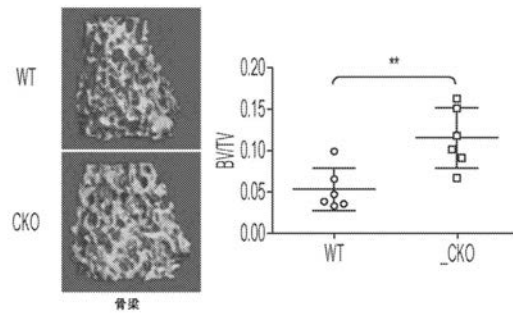


図 14

【 図 1 5 】

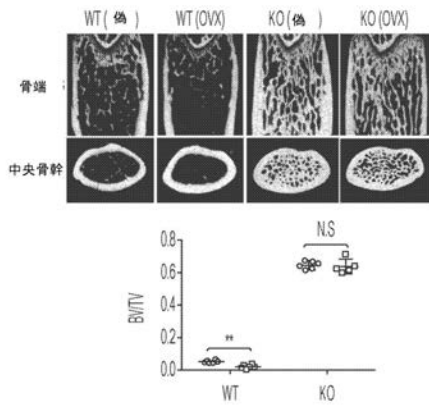


図 15

【 図 1 6 A - B 】

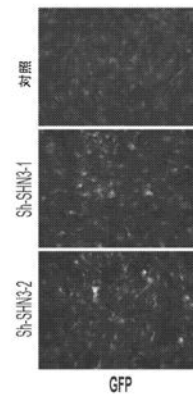


図 16A

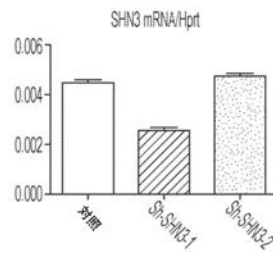


図 16B

【 図 16 C - D 】

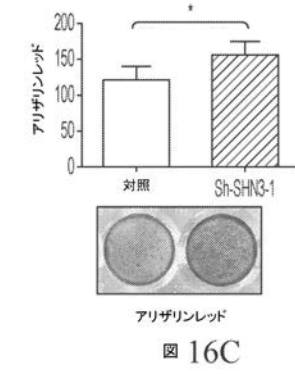


図 16C

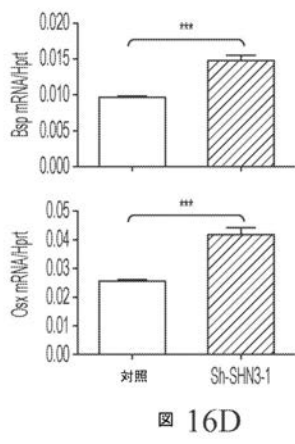


図 16D

【 図 17 】

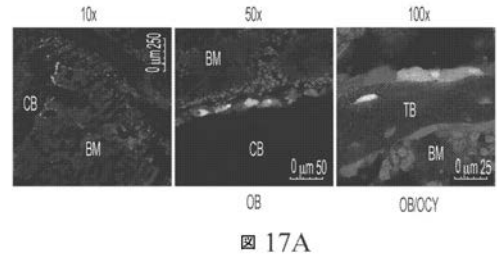


図 17A

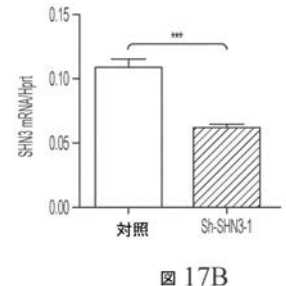


図 17B

【 図 18 A - B 】

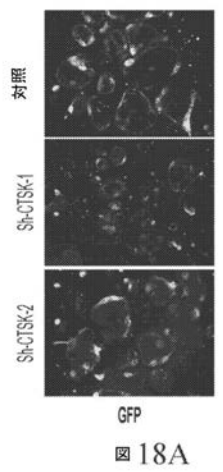


図 18A

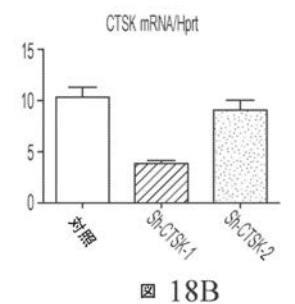


図 18B

【 図 18 C - D 】

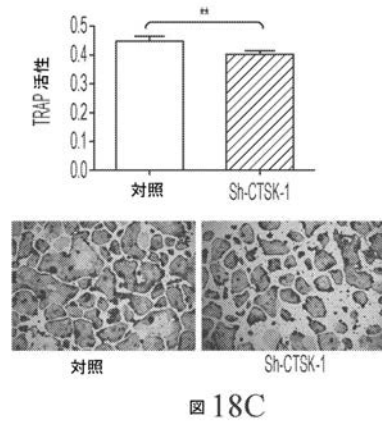


図 18C

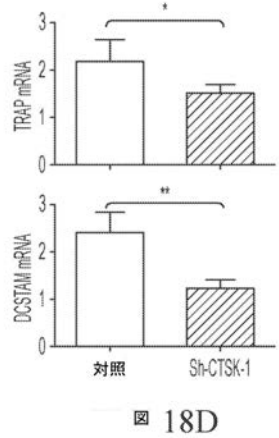


図 18D

【 図 19 】

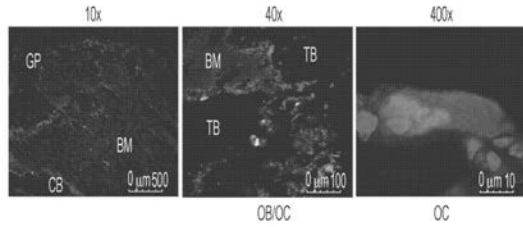


図 19A

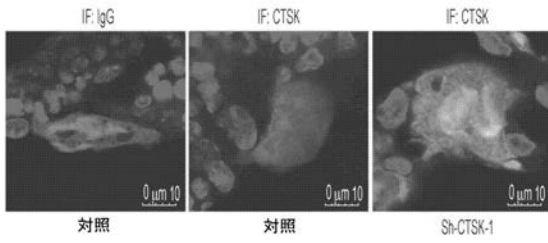


図 19B

【 図 20 】

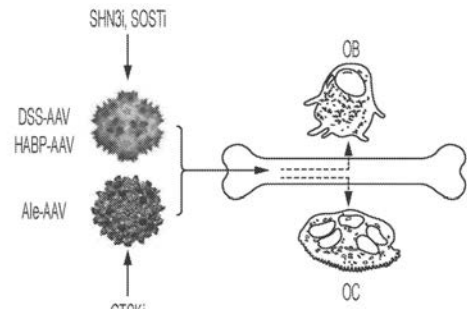


図 20

【 図 21 】

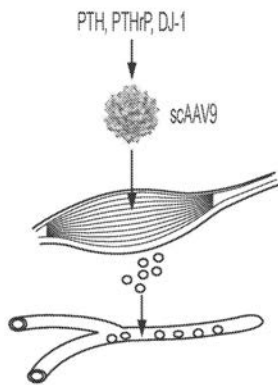


図 21

【 図 22 A - B 】

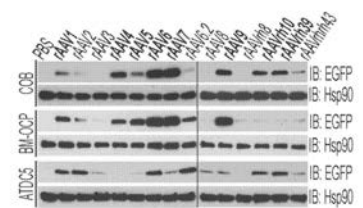


図 22A

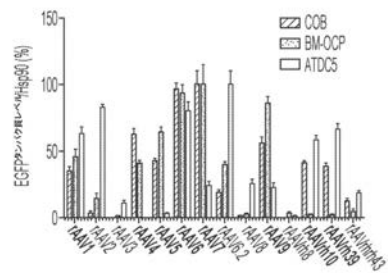


図 22B

【 図 2 2 C - G 】

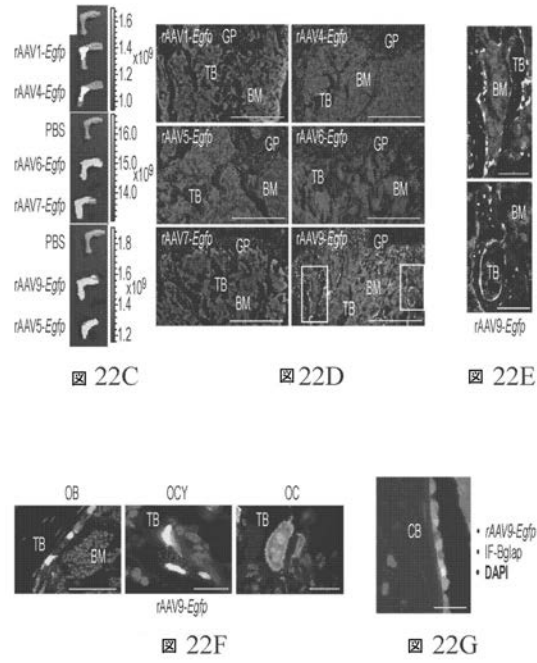


図 22C

図 22D

図 22E

図 22F

図 22G

【 図 2 3 A - D 】

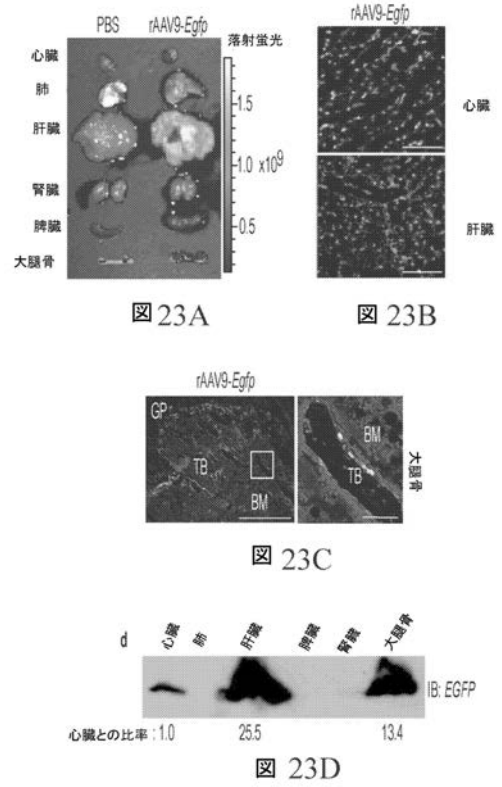


図 23A

図 23B

図 23C

図 23D

【 図 2 3 E - H 】

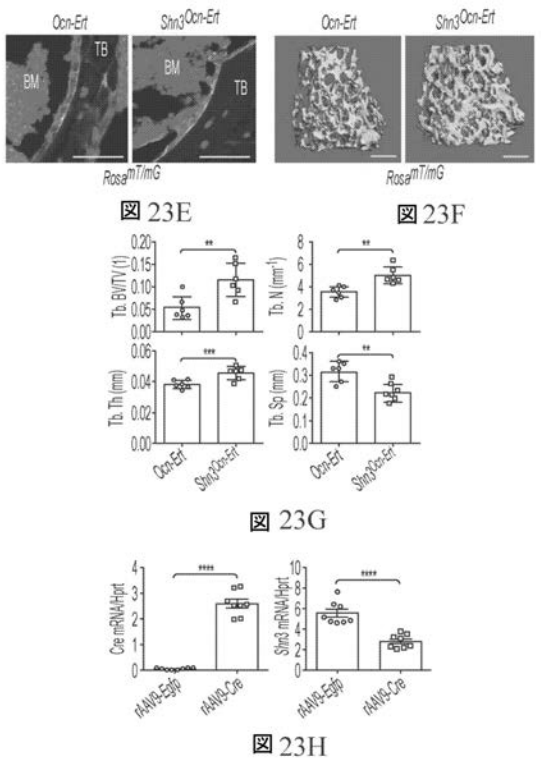


図 23E

図 23F

図 23G

図 23H

【 図 2 3 I - K 】

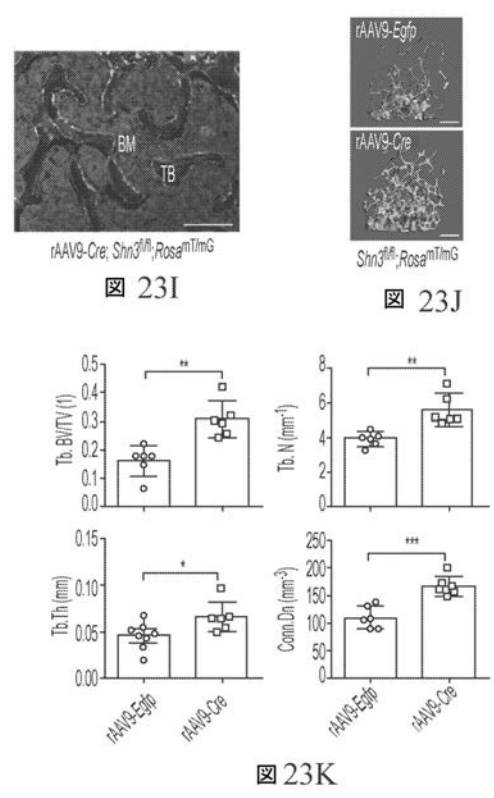
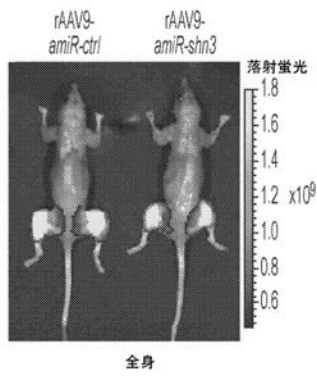
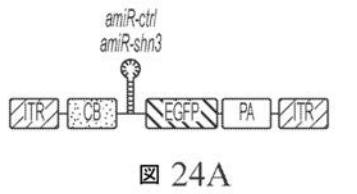


図 23I

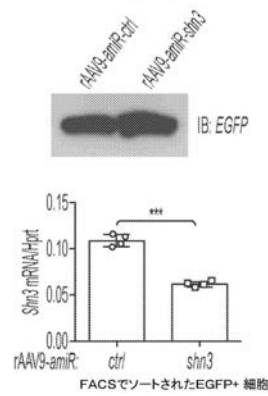
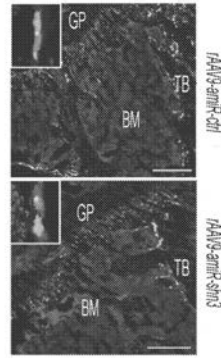
図 23J

図 23K

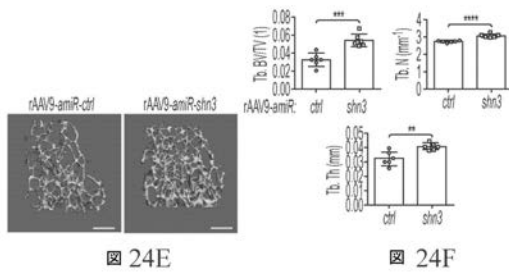
【 図 2 4 A - B 】



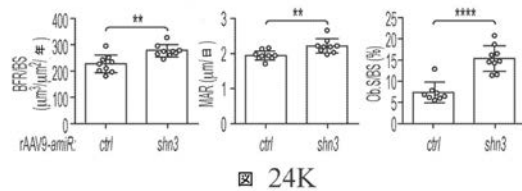
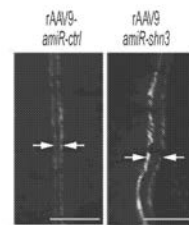
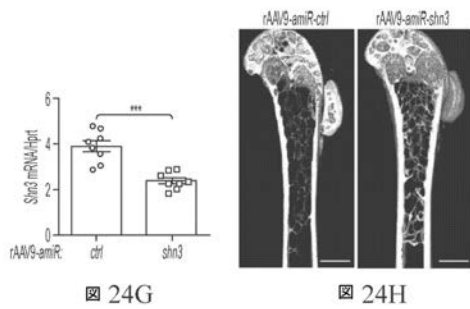
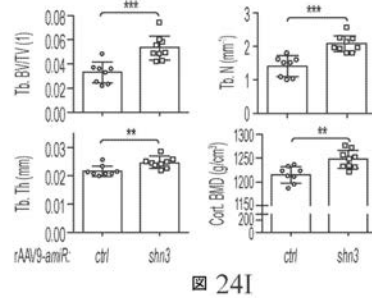
【 図 2 4 C - D 】



【 図 2 4 E - H 】



【 図 2 4 I - K 】



【 図 2 5 A - E 】

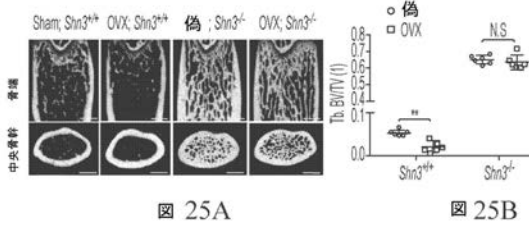


図 25A

図 25B

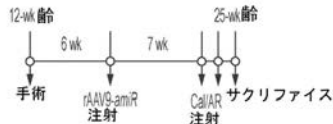


図 25C

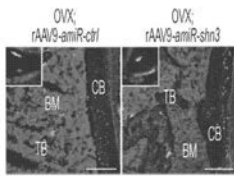


図 25D

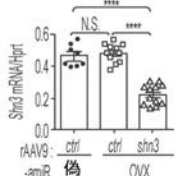


図 25E

【 図 2 5 F - I 】

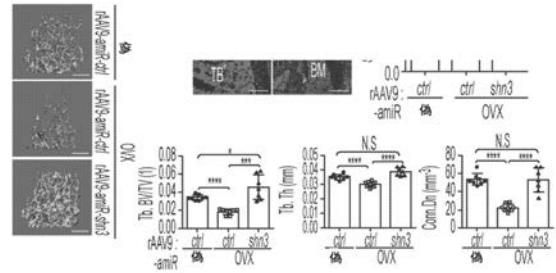


図 25F

図 25G

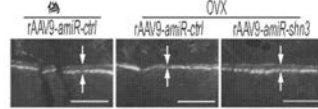


図 25H

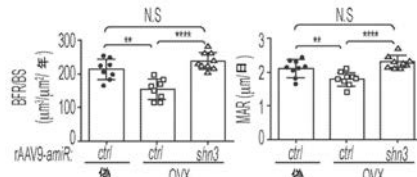


図 25I

【 図 2 5 J 】

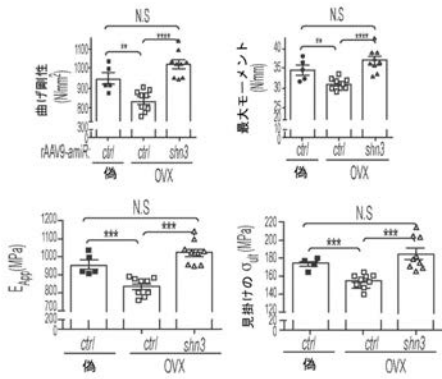


図 25J

【 図 2 6 C - D 】

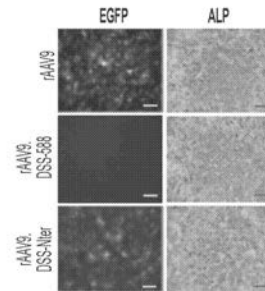


図 26C

【 図 2 6 A - B 】

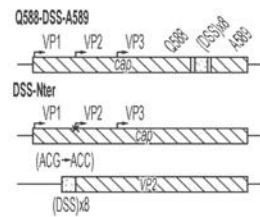


図 26A

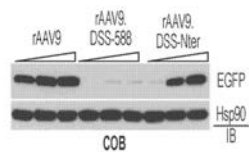


図 26B

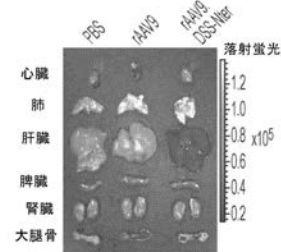


図 26D

【 図 2 6 E - H 】

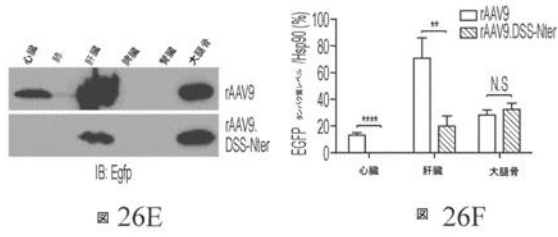


図 26E

図 26F

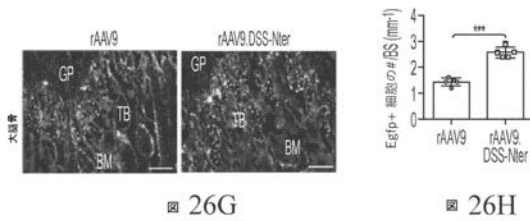


図 26G

図 26H

【 図 2 6 I - L 】

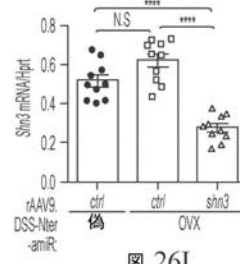


図 26I

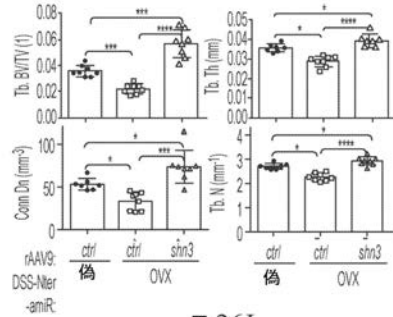


図 26J

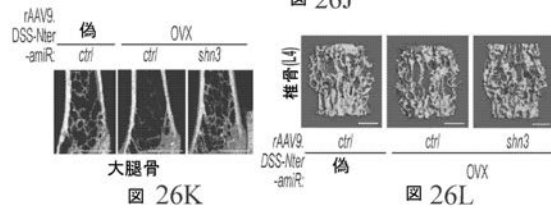


図 26K

図 26L

【 図 2 6 M 】

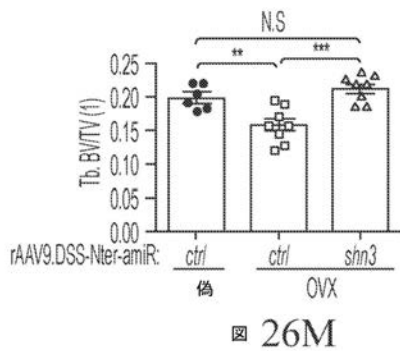


図 26M

【 図 2 7 】

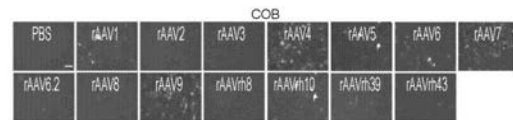


図 27A

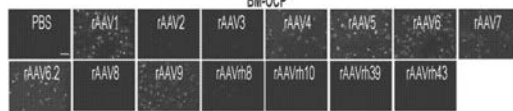


図 27B

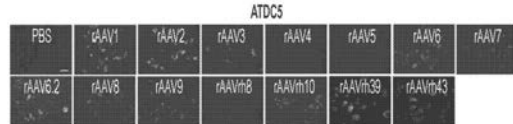


図 27C

【 図 2 8 】

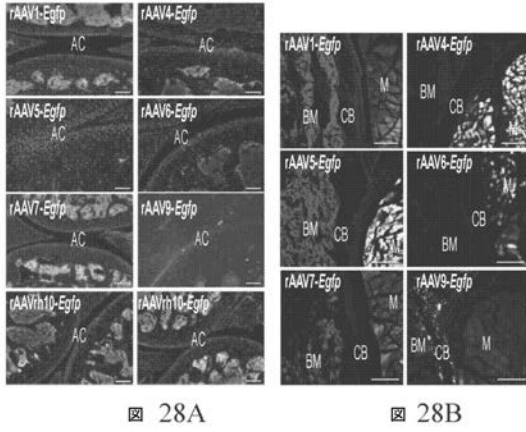


図 28A

図 28B

【 図 2 9 A 】

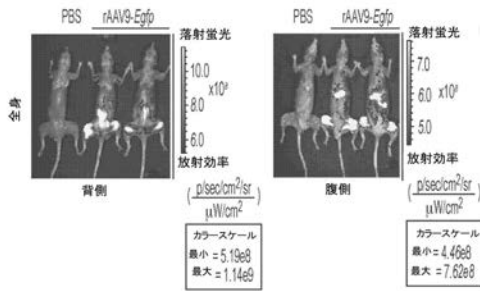


図 29A

【 図 2 9 B - D 】

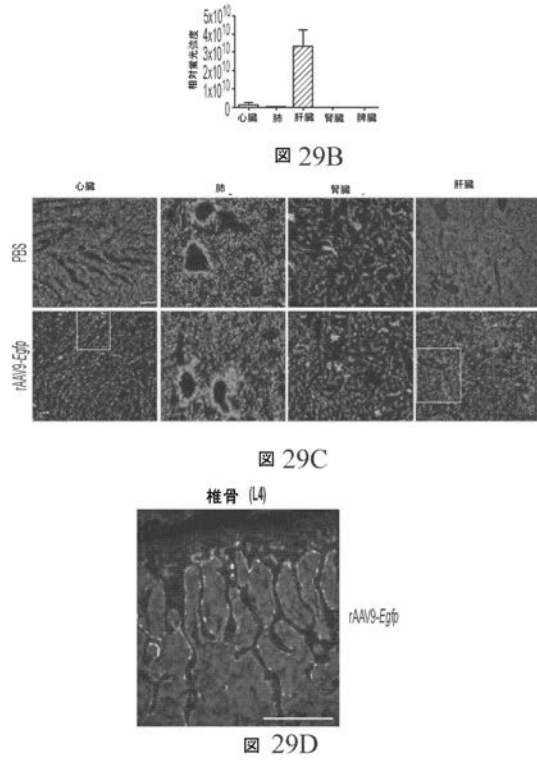


図 29B

図 29C

図 29D

【 図 3 0 】

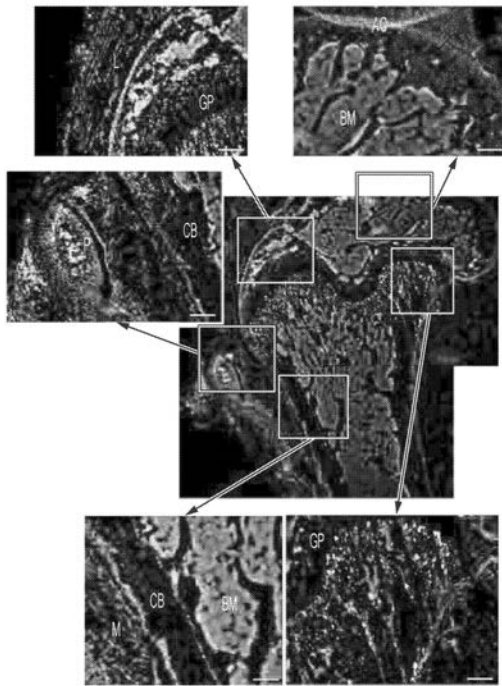


図 30

【 図 3 1 A - B 】



図 31A

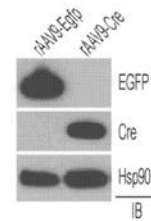
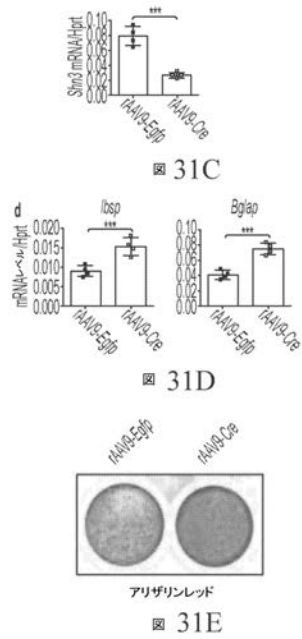
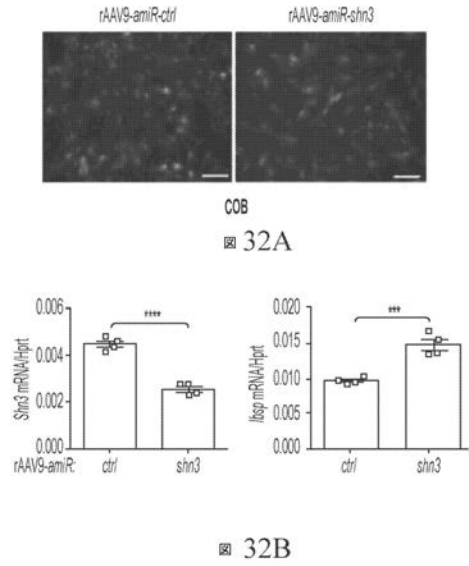


図 31B

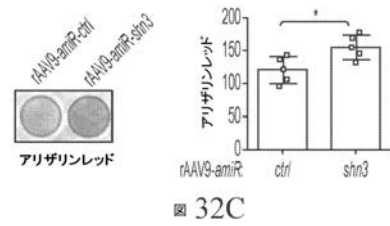
【 図 3 1 C - E 】



【 図 3 2 A - B 】



【 図 3 2 C 】



【 図 3 3 A - B 】

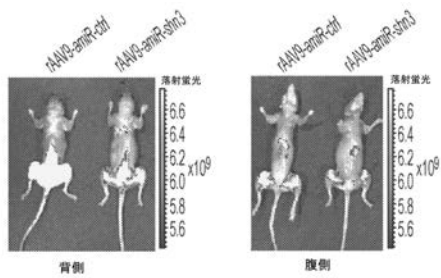


図 33A

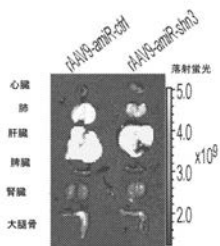


図 33B

【 図 3 3 C - F 】

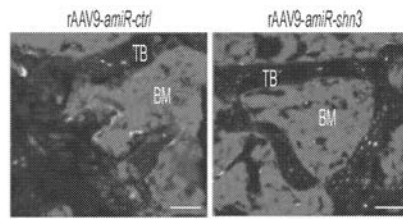


図 33C

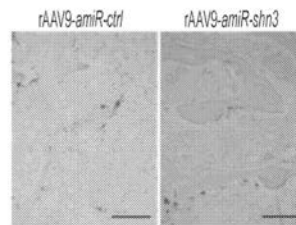


図 33D

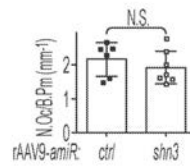


図 33E

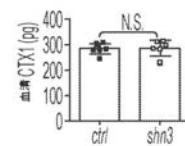


図 33F

【 図 3 4 】

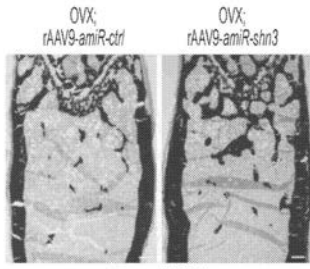


図 34A

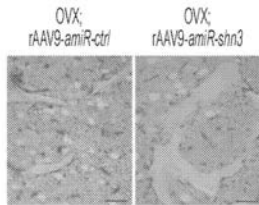


図 34B

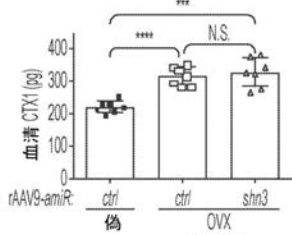
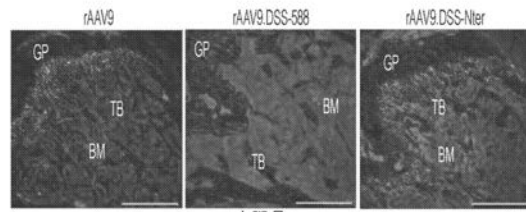


図 34C

【 図 3 5 A - B 】



大腿骨

図 35A

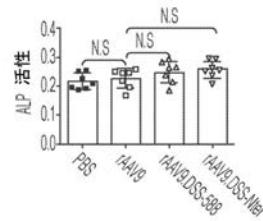


図 35B

【 図 3 5 C 】

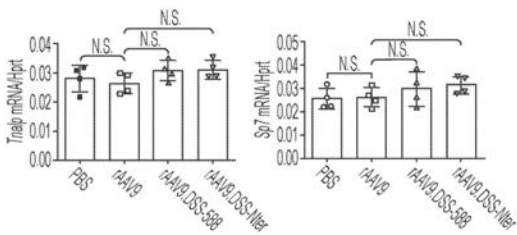
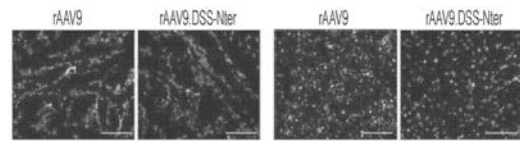


図 35C

【 図 3 6 C - E 】



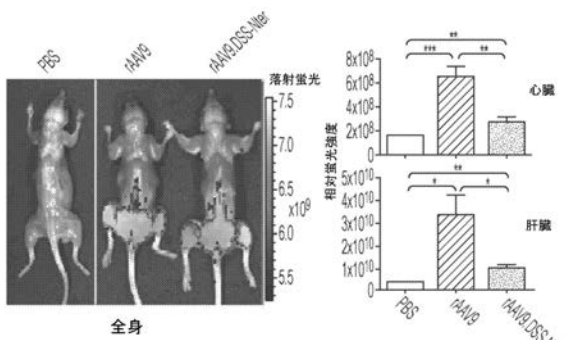
心臟

肝臓

図 36C

図 36D

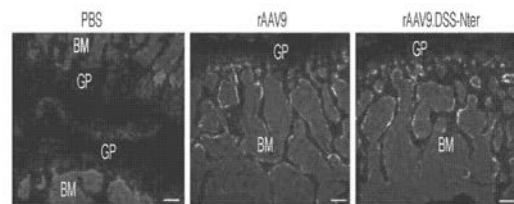
【 図 3 6 A - B 】



全身

図 36A

図 36B



椎骨 (L4)

図 36E

【 図 3 7 A - B 】

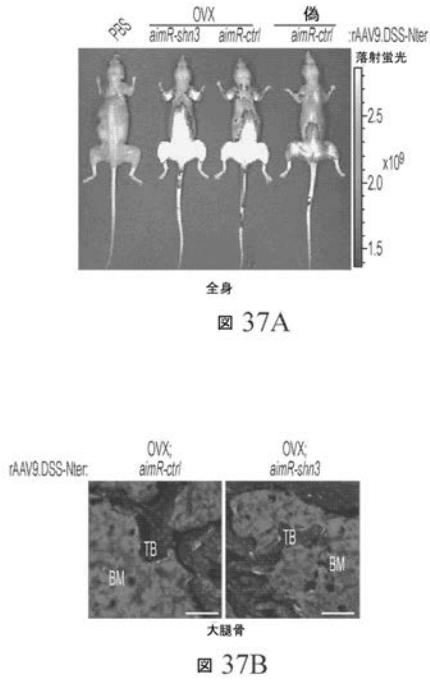


図 37A

図 37B

【 図 3 7 C 】

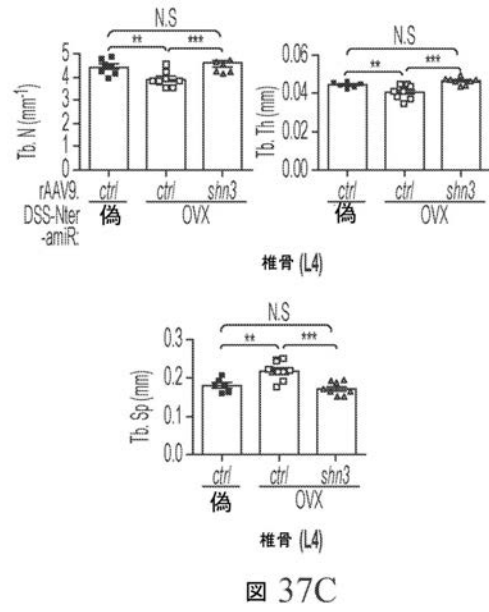


図 37C

【 配 列 表 】

2021519065000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/23759

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - A61P 19/08, 19/10; C12N 15/861, 15/63, 15/113 (2019.01)		
CPC - A61P 19/08, 19/10; C12N 15/861, 15/63, 15/113		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0256917 A1 (THE UNITED STATES GOVERNMENT AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS) 11 September 2014; abstract; paragraphs [0008], [0119], [0258]	1-2, 4 ----- 3, 5, 6/1-5, 7/6/1-5
Y	(KRAUSE, C et al.) Distinct Modes of Inhibition by Sclerostin on Bone Morphogenetic Protein and Wnt Signaling Pathways. The Journal of Biological Chemistry. 15 October 2010; Vol. 285, No. 53; pages 41614-41626; page 41614, column 1, paragraph 1; page 41615, column 1, paragraphs 2-3; page 41615, column 2, paragraph 3; DOI: 10.1074/jbc.M110.153890	3, 5, 6/1-5, 7/6/1-5
Y	(XIE, J et al.) Short DNA Hairpins Compromise Recombinant Adeno-Associated Virus Genome Homogeneity. Molecular Therapy. 24 April 2017; Vol. 25, No. 6; pages 1363-1374; abstract; page 1363, column 2, paragraph 3; DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.028	7/6/1-5
Y	US 2015/0176027 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 25 June 2015; paragraphs [0041], [0054]	23
Y	WO 2014/005314 A1 (ZHANG, GE et al.) 9 January 2014; page 4, paragraph 4	23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"D"	document cited by the applicant in the international application	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 July 2019 (23.07.2019)	02 AUG 2019	
Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer	
Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Shane Thomas	
	Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/23759

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: 8-22, 25-34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***-Please see supplemental page-***-

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-7, 23; SEQ ID NO: 16 (bone-targeting peptide)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/23759

-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-7, 23 and SEQ ID NO: 16 (bone-targeting peptide) are directed toward an isolated nucleic acid encoding a recombinant adeno-associated virus (rAAV) capsid protein comprising a heterologous bone-targeting peptide and a bone metabolism-modulating agent.

The isolated nucleic acid will be searched to the extent it encodes a peptide encompassing SEQ ID NO: 16 (first exemplary bone-targeting peptide). Applicant is invited to elect additional encoded peptide(s), with specified SEQ ID NO: for each, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional peptide sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-7 and 23 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 16 (bone-targeting peptide). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 17 (bone-targeting peptide).

Group II, Claim 24 is directed toward recombinant AAV capsid protein comprising one or more azide-bearing unnatural amino acids conjugated to one or more alendronate (Ale) moiety.

The inventions listed as Groups I+, II+ and III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include a bone metabolism modulating agent, not present in Group II; the special technical features of Group II include a capsid protein conjugated to an alendronate moiety, not present in any of Groups I+.

Groups I+ and II share the technical features including: a recombinant AAV capsid protein. Groups I+ share the technical features including: an isolated nucleic acid encoding: (i) a first region comprising a first adeno-associated virus (AAV) inverted terminal repeat (ITR), or a variant thereof; and, (ii) a second region comprising a transgene encoding at least one bone metabolism modulating agent; and an isolated nucleic acid encoding a recombinant adeno-associated virus (rAAV) capsid protein comprising a heterologous bone-targeting peptide.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2014/0256917 A1 to The United States of America, as Represented by the Department of Veterans Affairs et al. (hereinafter 'USA') in view of US 2011/0311487 A1 to Tomatsu et al. (hereinafter 'Tomatsu').

USA discloses a recombinant AAV capsid protein (a recombinant AAV capsid protein; paragraph [0123]); an isolated nucleic acid encoding: (i) a first region comprising a first adeno-associated virus (AAV) inverted terminal repeat (ITR) (an isolated nucleic acid encoding: (i) a first region comprising a first adeno-associated virus (AAV) inverted terminal repeat (ITR); abstract, paragraphs [0008], [0010], [0123]); and, (ii) a second region comprising a transgene encoding at least one bone metabolism modulating agent (a second region comprising a transgene encoding at least one bone metabolism modulating agent; paragraph [0008]).

USA does not disclose an isolated nucleic acid encoding a recombinant adeno-associated virus (rAAV) capsid protein comprising a heterologous bone-targeting peptide.

Tomatsu discloses an isolated nucleic acid encoding (an AAV vector encoding a capsid protein (an isolated nucleic acid encoding); paragraph [0022]) a recombinant adeno-associated virus (rAAV) capsid protein comprising a heterologous bone-targeting peptide (a recombinant adeno-associated virus (rAAV) capsid protein comprising a heterologous bone-targeting peptide; abstract, paragraphs [0018], [0022]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of USA to have included the use of a bone-targeting peptide in the AAV structure, such as attached to the capsid, as disclosed by Tomatsu, in order to more effectively deliver the bone-modulating agent disclosed by USA to target cells in the bone.

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the USA and Tomatsu references, unity of invention is lacking.-

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 35/32 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 K 35/32	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 L 27/36 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 0
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	1 1 0
A 6 1 L 27/40 (2006.01)	A 6 1 L 27/36	3 1 1
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	A 6 1 L 27/38	1 1 1
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	A 6 1 L 27/38	2 0 0
	A 6 1 L 27/38	3 0 0
	A 6 1 L 27/40	
	C 0 7 K 14/015	
	C 1 2 N 5/077	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

(72)発明者 ガオ, グワンピン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 5 8 1、ウェストボロウ、エドワード ダン ウェイ

4

- (72)発明者 シー, ジュン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01545、シュルーズベリー、シュルーズベリー グリーン ドライブ 48 ジェイ
- (72)発明者 キム, ジョン, ミン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01605、ウースター、プランテーション ストリート 509、アパートメント 117
- (72)発明者 ワン, ダン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01007、ベルチャータウン、ドッグウッド ドライブ 6
- (72)発明者 ヤン, ヨン - スク
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01581、ウェストボロウ、コーニング フェアバンク ス ウェイ 13

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
 AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA23 CA24 CA44
 4C081 AB01 CD34
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA17 MA66 NA14 ZA01
 ZA59 ZA66 ZA67 ZA81 ZA96 ZA97 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26
 ZC35 ZC54
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB46 BB63 BC83 CA04 CA08 CA12 MA17
 MA66 MA67 NA14 ZA01 ZA59 ZA66 ZA67 ZA81 ZA96 ZA97
 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZC35 ZC54
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 DA50 EA20 FA74