

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6552511号

(P6552511)

(45) 発行日 令和1年7月31日 (2019.7.31)

(24) 登録日 令和1年7月12日 (2019.7.12)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/35 (2006.01)

C 1 2 N 15/35

C O 7 K 14/015 (2006.01)

C O 7 K 14/015 Z N A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-547984 (P2016-547984)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月10日 (2014.10.10)
 (65) 公表番号 特表2016-536011 (P2016-536011A)
 (43) 公表日 平成28年11月24日 (2016.11.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/060163
 (87) 国際公開番号 W02015/054653
 (87) 国際公開日 平成27年4月16日 (2015.4.16)
 審査請求日 平成29年10月6日 (2017.10.6)
 (31) 優先権主張番号 61/889,827
 (32) 優先日 平成25年10月11日 (2013.10.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 511140770
 マサチューセッツ アイ アンド イヤー
 インファーマリー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 1 4, ボストン, チャールズ スト
 リート 2 4 3
 (73) 特許権者 516106623
 スケペンス アイ リサーチ インスティ
 テュート
 アメリカ合衆国 O 2 1 1 4 マサチュー
 セッツ州, ボストン, スタニフォード ス
 トリート 2 0
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 祖先ウイルス配列を予測する方法およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に示される アミノ酸配列を有するアデノ随伴ウイルス (A A V) キャプシド
 ポリペプチド。

【請求項 2】

前記 A A V キャプシドポリペプチドまたは前記 A A V キャプシドポリペプチドを含むウ
 イルス粒子が、A A V 2 キャプシドポリペプチドまたは A A V 2 キャプシドポリペプチド
 を含むウイルス粒子より低い血清有病率を示し、前記 A A V キャプシドポリペプチドまた
 は前記 A A V キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子が、A A V 8 キャプシドポリペ
 プチドまたは A A V 8 キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子とほぼ同じまたはより
 低い血清有病率を示す、請求項 1 に記載の A A V キャプシドポリペプチド。

【請求項 3】

前記 A A V キャプシドポリペプチドまたは前記 A A V キャプシドポリペプチドを含むウ
 イルス粒子が、A A V 2 キャプシドポリペプチドまたは A A V 2 キャプシドポリペプチド
 を含むウイルス粒子より低い程度にヒト血清によって中和され、前記 A A V キャプシドポ
 リペプチドまたは前記 A A V キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子が、A A V 8 キ
 ャプシドポリペプチドまたは A A V 8 キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子と同程
 度またはより低い程度にヒト血清によって中和される、請求項 1 に記載の A A V キャプシ
 ドポリペプチド。

【請求項 4】

10

20

精製されている、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の A A V キャプシドポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号 2 に示される核酸配列によってコードされる、請求項 1 に記載の A A V キャプシドポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 2 に示される核酸配列を有するアデノ随伴ウイルス（A A V）キャプシドポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸分子を含むベクター。

10

【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載の A A V キャプシドポリペプチドを含む精製されたウイルス粒子。

【請求項 10】

導入遺伝子をさらに含む、請求項 9 に記載の精製されたウイルス粒子。

【請求項 11】

導入遺伝子を用いて遺伝子移入および／またはワクチン接種するための組成物であって

20

、
前記組成物は請求項 10 に記載のウイルス粒子を含み、前記ウイルス粒子が A A V 2 ウイルス粒子より低い血清有病率を示す、組成物。

【請求項 12】

前記ウイルス粒子が、A A V 8 ウイルス粒子とほぼ同じまたはより低い血清有病率を示す、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記ウイルス粒子が、A A V 2 ウイルス粒子より低い程度にヒト血清によって中和され、前記 A A V ウイルス粒子が、A A V 8 ウイルス粒子と同程度またはより低い程度にヒト血清によって中和される、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

30

請求項 1 に記載の A A V キャプシドポリペプチドに作動可能に連結した標的抗原を含むワクチンであって、前記 A A V キャプシドポリペプチドが A A V 2 キャプシドポリペプチドより低い血清有病率を示す、ワクチン。

【請求項 15】

前記 A A V キャプシドポリペプチドが、A A V 8 キャプシドポリペプチドとほぼ同じまたはより低い血清有病率を示す、請求項 14 に記載のワクチン。

【請求項 16】

前記 A A V キャプシドポリペプチドが、A A V 2 キャプシドポリペプチドより低い程度にヒト血清によって中和され、前記 A A V キャプシドポリペプチドが、A A V 8 キャプシドポリペプチドと同程度またはより低い程度にヒト血清によって中和される、請求項 14 に記載のワクチン。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、概して、ウイルスに関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子治療ベクターに対する中和または毒性免疫応答を逃れ回避することは、全ての遺伝子移入ベクタータイプを用いる場合に大きな課題である。これまでの遺伝子移入は、ヒトおよび動物内を循環するウイルスに基づくベクター、例えば、アデノウイルスおよびア

50

デノ随伴ウイルス（AAV）を用いることで最も効率的に達成される。しかしながら、対象がウイルスに自然に感染している場合は、そのウイルスに基づくベクターによるその後の治療は、細胞性および体液性免疫応答に起因して、安全リスクの増加と遺伝子移入効率の低下をもたらす。キャプシド抗原は、主に、ウイルス粒子に対する先天性免疫および／または適応免疫の原因となるが、しかしながら、ウイルス遺伝子によりコードされたポリペプチドもまた免疫原性であり得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本開示は、祖先ウイルス配列またはその一部を予測および合成する方法を記載し、さらに、このような祖先ウイルス配列を含有するウイルス粒子を記載する。本明細書に記載される方法は、アデノ随伴ウイルス（AAV）に適用された；したがって、本開示は、予測された祖先AAV配列、およびこのような祖先AAV配列を含有するAAVウイルス粒子を記載する。本開示はまた、同時代の（contemporary）配列を含有するウイルス粒子と比較して低減した、祖先配列を含有するウイルス粒子によって示された血清有病率を記載する。

【0004】

一態様において、本開示は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15および17からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアデノ随伴ウイルス（AAV）キャプシドポリペプチド、例えば、合成および／または人工のAAVキャプシドポリペプチドを含む。いくつかの実施において、AAVキャプシドポリペプチドまたはAAVキャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子は、AAV2キャプシドポリペプチドまたはAAV2キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子より低い血清有病率を示し、AAVキャプシドポリペプチドまたはAAVキャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子は、AAV8キャプシドポリペプチドまたはAAV8キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子とほぼ同じまたはより低い血清有病率を示す。いくつかの実施形態において、AAVキャプシドポリペプチドまたはAAVキャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子は、AAV2キャプシドポリペプチドまたはAAV2キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子より低い程度にヒト血清によって中和され、AAVキャプシドポリペプチドまたはAAVキャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子は、AAV8キャプシドポリペプチドまたはAAV8キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子と同程度またはより低い程度にヒト血清によって中和される。いくつかの実施形態において、AAVキャプシドポリペプチドは精製されている。本明細書において提供されるAAVキャプシドポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16および18からなる群から選択される核酸配列によってコードされ得る。

【0005】

一態様において、本開示は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16および18からなる群から選択される核酸配列を有するアデノ随伴ウイルス（AAV）キャプシドポリペプチドをコードする核酸分子、例えば、合成および／または人工の核酸分子を提供する。また、このような核酸を含むベクター、およびこのようなベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0006】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載されるAAVキャプシドポリペプチドを含む精製されたウイルス粒子を提供する。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は導入遺伝子を含む。

【0007】

他の態様において、本開示は、配列番号19、20、21、22、23、24、25および26からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%（例えば、97、98、99または100%）の配列同一性を有するアデノ随伴ウイルス（AAV）キャプシドポリペプチド、例えば、合成および／または人工のAAVキャプシドポリペプチドを提

10

20

30

40

50

供する。いくつかの実施形態において、A A V キャプシドポリペプチドまたはA A V キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子は、A A V 2 キャプシドポリペプチドまたはA A V 2 キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子より低い血清有病率を示し、A A V キャプシドポリペプチドまたはA A V キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子は、A A V 8 キャプシドポリペプチドまたはA A V 8 キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子とほぼ同じまたはより低い血清有病率を示す。いくつかの実施形態において、A A V キャプシドポリペプチドまたはA A V キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子は、A A V 2 キャプシドポリペプチドまたはA A V 2 キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子より低い程度にヒト血清によって中和され、A A V キャプシドポリペプチドまたはA A V キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子は、A A V 8 キャプシドポリペプチドまたはA A V 8 キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子と同程度またはより低い程度にヒト血清によって中和される。いくつかの実施形態において、A A V キャプシドポリペプチドは精製されている。

10

【0008】

別の態様において、本明細書に記載されるA A V キャプシドポリペプチドは、本明細書に記載される核酸配列によってコードされ得る。一つの実施において、本開示は、アデノ随伴ウイルス（A A V）キャプシドポリペプチドをコードする核酸分子を提供し、ここで、核酸分子は、本明細書に示される核酸配列と少なくとも95%（例えば、97、98、99または100%）の配列同一性を有する。本開示はまた、このような核酸分子を含むベクターを提供し、宿主細胞はこのようなベクターを含む。

20

【0009】

一態様において、本開示は、本明細書に記載されるA A V キャプシドポリペプチドの少なくとも1つを含むウイルス粒子を提供する。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は導入遺伝子を含む。

【0010】

特定の態様において、本開示は、遺伝子移入またはワクチン接種を必要とする対象に、本明細書に記載されるウイルス粒子を投与方法を提供する。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、A A V 2 ウイルス粒子より低い血清有病率を示す。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、A A V 8 ウイルス粒子とほぼ同じまたはより低い血清有病率を示す。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、A A V 2 ウイルス粒子より低い程度にヒト血清によって中和され、A A V ウイルス粒子は、A A V 8 ウイルス粒子と同程度またはより低い程度にヒト血清によって中和される。

30

【0011】

一態様において、本開示は、ワクチン接種を必要とする対象に、本明細書に記載されるA A V キャプシドポリペプチドに作動可能に連結した標的抗原を投与方法を提供する。いくつかの実施形態において、A A V キャプシドポリペプチドは、A A V 2 キャプシドポリペプチドより低い血清有病率を示す。いくつかの実施形態において、A A V キャプシドポリペプチドは、A A V 8 キャプシドポリペプチドとほぼ同じまたはより低い血清有病率を示す。いくつかの実施形態において、A A V キャプシドポリペプチドは、A A V 2 キャプシドポリペプチドより低い程度にヒト血清によって中和され、A A V キャプシドポリペプチドは、A A V 8 キャプシドポリペプチドと同程度またはより低い程度にヒト血清によって中和される。

40

【0012】

別の態様において、本開示は、祖先ウイルスまたはその一部の配列を予測するインシリコの方法を提供する。このような方法は、典型的には、複数の同時代のウイルスまたはその一部由来のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を用意すること；多重配列アラインメント（MSA）アルゴリズムを用いて配列を整列させること；進化をモデリングして複数の同時代のウイルスまたはその一部の予測される祖先系統発生を得ること；予測される祖先系統発生の系統発生的な節で、配列のそれぞれの位置での特定のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の進化の確率を概算すること；およびそれぞれの位置で概算された確率に基

50

づいて、祖先ウイルスまたはその一部の配列を予測することを含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、1つもしくは複数または全てのステップはコンピュータプロセッサを用いて行われる。いくつかの実施形態において、MSAアルゴリズムは、系統発生学的情報を用いて、アラインメントにおけるギャップが欠失または挿入の結果であるかどうかを予測する。いくつかの実施形態において、MSAアルゴリズムは確率的アラインメントキット(PRANK)である。いくつかの実施形態において、進化をモデリングするために使用されるモデルは赤池(Aikake)情報量規準(AIC)を用いて選択される。いくつかの実施形態において、予測される祖先系統発生は、ガンマ分布モデル(「+G」)と π iの頻度計算(「+F」)を伴うJTTモデルを用いて得られる。いくつかの実施形態において、進化ステップのモデリングはJTT+G+Fモデルを用いて行われる。いくつかの実施形態において、本方法は、予測される配列に基づいて、祖先ウイルスまたはその一部を合成することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、祖先ウイルスまたはその一部を祖先ウイルス粒子にアセンブルすることを含む。

10

【0014】

いくつかの実施形態において、本方法はまた、(a)複製；(b)遺伝子移入特性；(c)受容体結合；または(d)血清有病率の少なくとも1つについて祖先ウイルス粒子をスクリーニングすることを含む。いくつかの実施形態において、祖先ウイルス粒子は、複数の同時代のウイルスまたはその一部の少なくとも1つからアセンブルされるウイルス粒子より低い血清有病率を示す。いくつかの実施形態において、祖先ウイルス粒子は、複数の同時代のウイルスまたはその一部の少なくとも1つからアセンブルされるウイルス粒子より低い程度にヒト血清によって中和される。いくつかの実施形態において、複数の同時代のウイルスまたはその一部は、アデノウイルス(AV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、レトロウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルスおよび泡沫状ウイルスからなる群から選択されるファミリーに属する。

20

【0015】

このように、本開示は、同時代のウイルスまたは一部と比較して、現在のヒト集団において既存の免疫に対する感受性の低減を示す祖先ウイルスまたはその一部を提供する。一般的に、現在のヒト集団における祖先ウイルスまたはその一部によって示される既存の免疫に対する感受性の低減は、中和抗体に対する感受性の低減として反映される。

30

【0016】

別段の定義がない限り、本明細書において使用される全ての科学技術用語は、対象とする方法および組成物が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料は、対象とする方法および組成物の実施または試験に用いることができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。さらに、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定することを意図するものではない。本明細書において言及されている全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、全体として参照により組み込まれる。

40

【0017】

特許または出願ファイルは、カラーで作製された少なくとも1つの図面を含有する。カラー図面を含むこの特許または特許出願公開の写しは、要求および必要とされる手数料の支払いにより特許庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、祖先の／同時代のウイルス感染と祖先の／同時代の宿主免疫応答の間の関係を示す概略図である。

【図2】図2Aから2Dは、祖先の再構築手順の一例を示す一連の概略図である。示されたデータは、完全なデータセットから抜粋されたものであり、残基564～584(AA

50

V 2 - V P 1 の番号付け) を表す。

【図 3】図 3 A から 3 C は共に、本明細書に記載される方法を用いて産生された A A V の同時代の配列の系統樹を示す。

【図 4】図 4 A および 4 B は共に、祖先 A A V V P 1 ポリペプチドのアラインメントを示す。

【図 5 A】図 5 A および 5 B は共に、機能的な祖先 A A V V P 1 ポリペプチドおよび同時代の A A V V P 1 ポリペプチドのアラインメントを示す。

【図 5 B】図 5 A および 5 B は共に、機能的な祖先 A A V V P 1 ポリペプチドおよび同時代の A A V V P 1 ポリペプチドのアラインメントを示す。

【図 6】図 6 は、祖先 A A V V P 1 配列が転写され、同時代の A A V V P 1 配列と同様に選択的にスプライスされることを実証する電気泳動ゲルである。

【図 7】図 7 は、祖先 A A V ベクターで形質導入された H E K 2 9 3 細胞におけるルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、A n c 8 0 ライブラリーと A n c 8 0 L 6 5 間の配列比較（対角線から上は %、下は a a の相違数）を示すグラフである。

【図 9】図 9 A - D は、A n c 8 0 L 6 5 が高力価の粒子をアセンブルし、得ることができることを実証する実験結果の画像である。パネル A は、A n c 8 0 L 6 5 が A A V 2 に相当するベクター収率を生じさせることができることを示す；パネル B は、A n c 8 0 L 6 5 を含むウイルス粒子の T E M 画像である；パネル C は、A n c 8 0 L 6 5 を含むウイルス粒子が、変性条件下の S D S - P A G E ゲルに基づいて、A A V キャップ V P 1、2 および 3 タンパク質を産生し得ることを示す；パネル D は、A A V キャプシド抗体、B 1 を用いた A n c 8 0 L 6 5 のウェスタンブロットを示す。

【図 1 0】図 1 0 A - C は、A n c 8 0 L 6 5 が、読み出し（パネル A）またはルシフェラーゼ（パネル B）対 A A V 2 および／もしくは A A V 8 対照として、G F P を用いてインビトロで H E K 2 9 3 細胞上で細胞を感染させることができ、さらに、核の L a c Z 導入遺伝子をコードする A A V の I V 注射後（上段の行、パネル C：肝臓）、G F P をコードする A A V の直接的な I M 注射後（中段の行、パネル C：筋肉）および G F P をコードする A A V による網膜下注射後（下段の行、パネル C：網膜）効率的に肝臓を標的化することを実証する実験結果の画像である。

【図 1 1 A】図 1 1 A および 1 1 B は、代表的な現存の A A V のアミノ酸配列と整列させた祖先ベクターの V P 1 タンパク質のアミノ酸配列（図 1 1 A）、および代表的な現存の A A V のアミノ酸配列と整列させた祖先ベクターの V P 3 タンパク質のアミノ酸配列（図 1 1 B）を示す M A F F T を用いて生成する配列同一性マトリックスである。

【図 1 1 B】図 1 1 A および 1 1 B は、代表的な現存の A A V のアミノ酸配列と整列させた祖先ベクターの V P 1 タンパク質のアミノ酸配列（図 1 1 A）、および代表的な現存の A A V のアミノ酸配列と整列させた祖先ベクターの V P 3 タンパク質のアミノ酸配列（図 1 1 B）を示す M A F F T を用いて生成する配列同一性マトリックスである。

【図 1 2】図 1 2 は、A A V ベクターが小規模（6 ウェルディッシュ）で三連で生成されたことを実証するグラフである。粗ウイルスは、それぞれのベクターの絶対的な生成を決定するために定量 P C R によって評価された。

【図 1 3】図 1 3 は、A A V 8 の力価に対して平均され、比較されたそれぞれのベクターの力価を示す表である。

【図 1 4】図 1 4 は、それぞれのベクターの 1 . 9 E 3 G C / 細胞が H E K 2 9 3 細胞に添加された実験結果を示す写真である（A n c 1 2 6 を除く。この場合、2 . 5 E 2 - 3 . 1 E 2 G C / 細胞の M O I が達成された。）。6 0 時間後、感染力を蛍光顕微鏡を用いて評価した。

【図 1 5】図 1 5 は、図 1 4 と同じ細胞を溶解し、ルシフェラーゼ発現についてアッセイした実験結果を示すグラフである。図 1 4 のように、A n c 1 2 6 は、他のベクターで制御された力価でなかったが、むしろ 2 . 5 E 2 - 3 . 1 E 2 G S / 細胞の M O I の範囲であった。

10

20

30

40

50

【図16】図16は、AAV8の発光に対して平均され、比較された、それぞれのベクターによって形質導入された細胞の発光を示す表である。

【図17】図17は、本明細書に記載される祖先AAVベクターの相対的な生成と感染力を決定するためのインビトロ実験の概要を提供するチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

実験目的または治療目的のための遺伝子移入は、遺伝情報を標的細胞に往復させるためのベクターまたはベクターシステムを利用する。ベクターまたはベクターシステムは、遺伝子移入反応の効率、特異性、宿主応答、薬理学および寿命の主要な決定要因であると考えられる。現在、遺伝子移入を達成するための最も効率的かつ効果的な方法は、複製欠損

10

【0020】

しかしながら、血清有病率の研究は、世界的なヒト集団のかかなりの割合が、現在、遺伝子移入に使用されている大多数のウイルスに（例えば、自然感染によって）予め曝露され、したがって、既存の免疫を保有していることを示す。これらの予め曝露された個体中のウイルスベクターに対する抗体を中和することは、遺伝子移入の程度を時には有意に制限し、またはウイルスを標的から離れるように変えることが知られている。例えば、Calcedo et al. (2009, J. Infect. Dis., 199:381-90)、およびBoutin et al. (2010, Human Gene Ther., 21:704-12)を参照されたい。このように、本開示は、祖先ウイルスまた

20

【0021】

図1は、祖先および同時代のウイルス感染と祖先および同時代の宿主免疫応答の間の関係を示す概略図である。図1は、祖先AAVが、どのようにして同時代の既存の免疫に不応性であり得るかを示す。同時代の、既存のウイルス(Vc)は、免疫回避のメカニズムを介して、主に宿主免疫の進化的圧力下で祖先種(Vanc)から進化してきたことが推定される。これらの種VancおよびVcの各々は、B細胞免疫およびT細胞免疫（それぞれIancおよびIc）を含む適応免疫を誘導する能力を有する。同時代のウイルスによ

30

【0022】

本開示は、祖先ウイルスまたはその一部の配列を予測する方法を提供する。本明細書に記載の方法を用いて予測される祖先ウイルス配列の1つまたは複数が生成され、ウイルス粒子にアセンブルすることができる。本明細書において実証されるように、予測される祖先ウイルス配列からアセンブルされるウイルス粒子は、現在の同時代のウイルス粒子よりも少ない、時として有意に低い血清有病率を示し得る。したがって、本明細書に開示されている祖先ウイルス配列は、遺伝子移入のためのベクターまたはベクターシステムにお

40

【0023】

祖先ウイルス配列を予測および合成する方法

祖先ウイルス配列を予測するために、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を最初に複数の同時代のウイルスまたはその一部から集める。本明細書に記載される方法は、アデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド配列を用いて例示されが、同じ方法は、AAV由来の他の配列（例えば、ゲノム全体、rep配列、ITR配列）に適用され、または任意の他のウイルスまたはその一部に適用され得る。AAV以外のウイルスとしては、限定されないが、アデノウイルス(AV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、レトロウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、麻疹、ワクシニアウイルス、ボックス

50

ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス、泡沫状ウイルス、または既存する免疫が問題であると考えられる任意の他のウイルスが挙げられる。

【0024】

わずか2つの同時代のウイルスまたはその一部由来の配列を用いることができるが、しかしながら、同時代のウイルスまたはその一部の大多数の配列は、できるだけ多くの現在の配列多様性の状況を含むように所望されるが、さらに、大多数の配列が記載され、使用されるアルゴリズムの予測能力を増加させ得るためであることが理解される。例えば、10個以上の同時代のウイルスもしくはその一部由来の配列を用いることができ、50個以上の同時代のウイルスもしくはその一部由来の配列を用いることができ、または100個以上の同時代のウイルスまたはその一部由来の配列を用いることができる。

10

【0025】

このような配列は、例えば、限定されないが、GenBank、UniProt、EMBL、国際塩基配列データベースコラボレーション (INSDC) または欧州ヌクレオチドアーカイブを含む任意の数の公共のデータベースから取得することができる。追加的にまたは代替的に、このような配列は、特定の生物に特異的なデータベース (例えば、HIVデータベース) から取得することができる。同時代の配列は、ゲノム全体に対応し得、またはゲノムの一部のみ、例えば、限定されないが、ウイルスキャプシド、複製タンパク質またはITR配列の1つまたは複数の構成成分をコードする配列を使用することができる。

20

【0026】

次に、同時代の配列は、複数の配列アラインメント (MSA) アルゴリズムを用いて整列される。図2 (a) は複数配列のアラインメントを示す概略図である。MSAアルゴリズムは当技術分野において周知であり、一般的に、異なるサイズのデータセットと異なる入力 (例えば、核酸またはタンパク質) に適用され、および特定の手法 (例えば、動的プログラミング、プログレッシブ、ヒューリスティック) で配列を整列するように設計され、アラインメントにおける異なるスコアリングスキーム (例えば、マトリックススペースまたは整合性ベース、例えば、最小エントロピー、対の合計、類似性マトリックス、ギャップスコア) を適用する。周知のMSAアルゴリズムとしては、例えば、ClustalW (Thompson et al., 1994, Nuc. Acids Res., 22:4673-90)、Kalign (Lassmann et al., 2006, Nuc. Acids Res., 34:W596-99)、MAFFT (Katoh et al., 2005, Nuc. Acids Res., 33:511-8)、MUSCLE (Edgar, 2004, BMC Bioinform., 5:113) およびT-Coffee (Notredame et al., 2000, J. Mol. Biol., 302:205-17) が挙げられる。

30

【0027】

本明細書に記載されるように、本明細書に記載される方法において使用するためのMSAアルゴリズムを選択する場合の主な特徴の1つは、アルゴリズムがアラインメント中のギャップを処理する方法である。配列アラインメント中のギャップは、ギャップの大きさに依存するまたは独立であるペナルティ値を割り当てることができる。本方法において、本明細書に記載される方法において使用されるMSAアルゴリズムは、ギャップのバイアスされた非系統発生的処理とは対照的に、例えば、挿入および/または欠失に起因して、アラインメント中のギャップが欠失または挿入の結果であるかどうかを予測するために系統発生的情報を適用することが好ましい。アラインメント中のギャップを処理する適切な方法および進化分析は、Loytynoja and Goldman, 2008, Science, 320:1632-5に記載され、本明細書に記載される方法における使用に適した方法でアラインメント中のギャップを適用する市販のアルゴリズムは、確率的アラインメントキット (PRANK; Goldman Group Software; Loytynoja and Goldman, 2005, PNAS USA, 102:10557-62) であり、PRANKアルゴリズムのバリエーションである。

40

【0028】

次に、進化モデルは、予測された祖先系統発生を得るために、得られたアラインメント

50

に適用される（図2（b）参照）。当技術分野において利用可能な多数の進化モデルが存在し、その各々は、アミノ酸について代替率のわずかに異なるマトリックスを適用する。限定されないが、進化のモデルを適用するためのアルゴリズムとしては、Dayhoffモデル（例えば、PAM120、PAM160、PAM250；Dayhoff et al., 1978, In Atlas of Protein Sequence and Structure (ed. Dayhoff), pp. 345-52, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C.)、JTTモデル（Jones et al., 1992, Comp. Appl. Biosci., 8:275-82）、WAGモデル（Whelan and Goldman, 2001, Mol. Biol. Evol., 18:691-9）、およびBlosumモデル（例えば、Blosum45、Blosum62、Blosum80；Henikoff and Henikoff, 1992, PNAS USA, 89:10915-9）が挙げられる。

10

【0029】

さらに、構造と機能が進化モデルに課す制約はそれ自体、例えば、いくつかの位置は不変であること（「+I」；Reeves, 1992, J. Mol. Evol., 35:17-31）、いくつかの位置は異なる速度の変化を受けること（「+G」；Yang, 1993, Mol. Biol. Evol., 10:1396-1401）、および／またはヌクレオチドもしくはアミノ酸の平衡頻度がアラインメントと同じであること（「+F」；Cao et al., 1994, J. Mol. Evol., 39:519-27）を考慮することによってモデリングされ得る。

【0030】

進化の1つまたは複数のモデルの適応度は、赤池情報量規準（AIC；Akaike, 1973, In Second International Symposium on Information Theory, Petrov and Csaki, eds., pp 267-81, Budapest, Akademiai Kiado）、ベイズ情報量規準（BIC；Schwarz, 1978, Ann. Statist. 6:461-4）、またはそれらのバリエーションもしくは組合せを用いて評価することができる。さらに、AIC、BICまたはそれらのバリエーションもしくは組合せは、進化モデルにおける1つまたは複数のパラメータ（例えば、上記で検討した制約）を含むという相対的な重要性を評価するために使用され得る。

20

【0031】

以下の実施例の項で説明されるように、ProTest3（Darriba et al., 2011, Bioinformatics, 27(8):1164-5）は、最小AICに基づいて、JTT+G+FアルゴリズムがAAV進化のために最も適したモデルであったということを決定するために用いることができる。JTT+G+Fアルゴリズムはまた、AAVキャプシドポリペプチド以外の祖先ウイルス配列を予測するために用いられてもよいことが当業者に理解されるであろうが、しかしながら、また、データセットと適応度スコアに応じて、進化の異なるモデルがより適切であり得ることが当業者に理解されるであろう。

30

【0032】

進化のモデルが選択され、その適応度が決定されると、ウイルス配列またはその一部の系統樹を構築することができる。系統樹を構築することは、当技術分野において公知であり、典型的には、最大尤度法を採用し、例えば、PhyML（Guindon and Gascuel, 2003, Systematic Biology, 52:696-704）、MOLPHY（Adachi and Hasegawa, 1996, ed. Tokyo Institute of Statistical Mathematics）、BioNJ（Gascuel, 1997, Mol. Biol. Evol., 14:685-95）、またはPHYLP（Felsenstein, 1973, Systematic Biology, 22:240-9）によって実施されるものが挙げられる。当業者は、コンピュータ計算の複雑さと適応度の有益部分とのバランスがアミノ酸置換のモデルにおいて望ましいことを理解するであろう。

40

【0033】

所望により、系統樹を有意性について評価することができる。多数の統計的方法が、モデルの有意性を評価するために利用可能であり、日常的に使用され、限定されないが、ブートストラップ、ジャックナイフ、交差検定、並べ替え検定またはそれらの組合せもしくはバリエーションが挙げられる。有意性はまた、例えば、おおよその尤度比検定（aLRT；Anisimova and Gascuel, 2006, Systematic Biology, 55:539-52）を用いて評価され得る。

50

【0034】

系統発生のいずれかの系統発生的な節（例えば、内部系統発生の節）において、配列は、配列の各位置で特定のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の進化の確率を概算することによって再構築することができまる（図2（c））。系統発生的な節は、予測された祖先の系統樹内の中間進化の分岐点を指す。本明細書で使用するとき、「進化の確率」とは、考慮されないモデル、例えば、コドン使用における進化シフトとは対照的に、進化モデルに基づいて、特定の位置に特定のヌクレオチドまたはアミノ酸が存在する確率を指す。特定の位置で特定のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の進化の確率を考慮する例示的なモデルは、例えば、限定されないが、最大尤度法による系統発生的分析（PAML；Yang, 1997, Comp. Applic. BioSci., 13:555-6）または節約法を用いる系統発生的分析（PAUP；Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, MA）を含む任意の数の最大尤度法を用いて概算され得る。

10

【0035】

各位置での特定のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の概算された進化の確率に基づいて、祖先ウイルスまたはその一部の予測される配列はアセンブルされ、完全または部分的に合成の核酸またはポリペプチド配列を形成することができ。所望により、任意の残基が節に沿って所定の節で所定の状態にあった尤度を計算することができ、特定の閾値下に計算された事後確率を有する配列に沿った任意の位置を同定することができ（図2（d））。このようにして、特定の閾値未満の確率を有するそれらの位置でバリエーションを含み得る祖先足場配列を生成することができ。

20

【0036】

本明細書に記載の方法を用いて予測される祖先配列が核酸配列である場合、配列は、アミノ酸配列に効率的に翻訳され得るように最適化されたコドンであり得る。様々な生物のコドン使用頻度表は当技術分野において公知である。しかしながら、場合により、コドン使用頻度表は、祖先足場配列に対する相同性（例えば、少なくとも90%の配列同一性）を有する1つまたは複数の同時代の配列に基づいて設計することができ、本明細書に記載される祖先配列は哺乳動物（例えば、ヒト）コドン使用頻度に向けて最適されたコドンであり得る。

【0037】

祖先ウイルス配列を予測するための、本明細書に概説されているいずれかまたは全てのステップは、プロセッサまたはマイクロプロセッサを使用したコンピュータ（例えば、インシリコ）上で実行またはシミュレートすることができる。

30

【0038】

祖先アデノ随伴ウイルス（AAV）足場配列

本明細書に記載される方法は、（下記の実施例において詳細に説明される）同時代のキャプシド配列を用いてアデノ随伴ウイルス（AAV）に適用された。AAVは、治療用遺伝子移入ベクターおよび遺伝子ワクチンベヒクルとして考えられるが、ヒト集団において高い血清有病率を示す。本明細書に記載される方法を用いて、系統樹は、同時代のAAV配列によりアセンブルされ（図3A-3Cを参照）、予測された祖先足場配列は、指定された系統発生的な節で得られた（表1）。本明細書で使用时、祖先足場配列は、本明細書に記載される方法を用いて（例えば、進化可能性と進化モデリングを用いて）構築され、自然界に存在していたことが知られていない配列を意味する。本明細書で使用するとき、祖先足場配列は、典型的には、特定の位置でのヌクレオチドまたはアミノ酸残基の頻度を用いて構築されるコンセンサス配列とは異なる。

40

【0039】

【表 1】

表 1.

節	ポリペプチド (配列番号)	核酸 (配列番号)
Anc80	1	2
Anc81	3	4
Anc82	5	6
Anc83	7	8
Anc84	9	10
Anc94	11	12
Anc113	13	14
Anc126	15	16
Anc127	17	18

10

【0040】

Anc80 ポリペプチドの足場配列を配列番号 1 に示し、これは、配列番号 2 に示される Anc80 核酸の足場配列によってコードされる。Anc80 の足場配列は、2 つの残基のいずれかが推定された 11 位を含有する。したがって、Anc80 足場配列は、2048 (2^{11}) 個の異なる配列を表す。

20

【0041】

ウイルスまたはその一部の祖先配列を予測するための本明細書に記載される方法の有効性を実証するために、AAV Anc80 節での 2048 個の予測された祖先配列のライブラリーを作製し、本明細書に記載されるように、同時代のキャプシドポリペプチドでアセンブルされたウイルス粒子と比較して、低い血清有病率、いくつかの例では有意に低い血清有病率を示す生存するウイルス粒子を形成することが実証された。

【0042】

祖先ウイルス粒子を作製する方法

ウイルスまたはその一部の予測された祖先配列を取得した後、実際の核酸分子および／またはポリペプチド（単数または複数）を生成し、例えば、合成することができる。例えばインシリコで得られた配列に基づいて、人工的な核酸分子またはポリペプチドを生成する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、化学合成または組換えクローニングを含む。核酸分子またはポリペプチドを生成するためのさらなる方法は、当技術分野において公知であり、以下により詳細に検討される。

30

【0043】

祖先ポリペプチドが生成されると、または祖先核酸分子が生成され、祖先ポリペプチドを生成するように発現されると、祖先ポリペプチドは、例えば、パッケージング宿主細胞を用いて、祖先ウイルス粒子にアセンブルされ得る。ウイルス粒子の構成成分（例えば、rep 配列、cap 配列、逆方向末端反復（ITR）配列）は、本明細書に記載される 1 つまたは複数のベクターを使用してパッケージング宿主細胞に、一過性または安定に導入することができる。ウイルス粒子の構成成分の 1 つまたは複数は、本明細書に記載される予測された祖先配列に基づくことができ、一方、残りの構成成分は同時代の配列に基づくことができる。いくつかの例において、ウイルス粒子全体は、予測された祖先配列に基づくことができる。

40

【0044】

このような祖先ウイルス粒子は、通常の方法を用いて精製することができる。本明細書で使用するときに、「精製された」ウイルス粒子とは、作製された混合物中の構成成分、例えば、限定されないが、ウイルス構成成分（例えば、rep 配列、cap 配列）、パッケージング宿主細胞および部分的にまたは不完全にアセンブルされたウイルス粒子から取り除かれるウイルス成分を意味する。

50

【0045】

アセンブルされると、祖先ウイルス粒子は、例えば、複製する能力；遺伝子移入特性；受容体結合能；および／または集団（例えば、ヒト集団）における血清有病率についてスクリーニングすることができる。ウイルス粒子が複製し得るかどうかの決定は当技術分野において通常行われ、典型的には、ある量のウイルス粒子で宿主細胞を感染させ、ウイルス粒子が経時的に数が増加するかどうかを決定することを含む。また、ウイルス粒子が遺伝子移入を行うことができるかどうかの決定は当技術分野において通常行われ、典型的には、導入遺伝子（例えば、以下でより詳細に検討されるレポーター遺伝子などの検出可能な導入遺伝子）を含有するウイルス粒子で宿主細胞を感染させることを含む。ウイルスの感染およびクリアランス後、宿主細胞は導入遺伝子の存在または非存在について評価され得る。ウイルス粒子がその受容体に結合するかどうかの決定は当技術分野において通常行われ、このような方法はインビトロまたはインビボで行うことができる。

10

【0046】

ウイルス粒子の血清有病率の決定は当技術分野において通常行われ、典型的には、個体の特定の集団からの試料（例えば、血液試料）中の1つまたは複数の抗体の有病率を決定するためのイムノアッセイの使用を含む。血清有病率は、血清反応陽性である（すなわち、特定の病原体または免疫原に曝露されている）集団中の対象の割合を意味することが当技術分野において理解され、調べられた集団における個体の総数によって割った、特定の病原体または免疫原に対する抗体を産生する集団における対象の数として計算される。イムノアッセイは、当技術分野において周知であり、限定されないが、イムノブロット、ウェスタンブロット、酵素免疫アッセイ（EIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）またはラジオイムノアッセイ（RIA）が含まれる。本明細書に示されるように、祖先ウイルス粒子は、同時代のウイルス粒子（すなわち、同時代のウイルス配列またはその一部を用いてアセンブルされたウイルス粒子）よりも低い血清有病率を示す。単に一例として、Xu et al. (2007, Am. J. Obstet. Gynecol., 196:43.e1-6) ; Paul et al. (1994, J. Infect. Dis., 169:801-6) ; Sauerbrei et al. (2011, Eurosurv., 16(44):3) ; および Sakhria et al. (2013, PLoS Negl. Trop. Dis., 7:e2429) を参照されたい。それぞれは、所定の集団における特定の抗体についての血清有病率を決定した。

20

【0047】

本明細書に記載されるように、祖先ウイルス粒子は、ヒトの免疫系、例えば、患者の免疫系によって、同時代のウイルス粒子よりも低い程度に中和される。血清試料中の抗体を中和する程度を決定するためにいくつかの方法が利用可能である。例えば、中和抗体アッセイは、実験試料が、抗体を含まない対照試料と比較して50%以上の感染を中和する抗体濃度を含有する力価を測定する。また、Fisher et al. (1997, Nature Med., 3:306-12) および Manning et al. (1998, Human Gene Ther., 9:477-85) を参照されたい。

30

【0048】

本明細書において例示される祖先AAVキャプシドポリペプチドに関して、血清有病率および／または中和の程度は、例えば、AAV8キャプシドポリペプチドもしくはAAV8キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子、またはAAV2キャプシドポリペプチドもしくはAAV2キャプシドポリペプチドを含むウイルス粒子と比較することができる。一般的に、AAV8キャプシドポリペプチドまたはウイルス粒子は、低いと考えられるヒト集団において、血清有病率および結果として得られる中和を示し、一方、AAV2キャプシドポリペプチドまたはウイルス粒子は、高いと考えられるヒト集団において、血清有病率および結果として中和を示すことが当技術分野において理解される。明らかに、特定の血清有病率は、調べられる集団と使用される免疫学的方法に依存するが、AAV8は約22%から最大約38%の血清有病率を示し、一方、AAV2は約43.5%から最大約72%の血清有病率を示す。例えば、Boutin et al. 2010, "Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against AAV types 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors," Hum. Gene Ther., 21:704-12を参照されたい。さらに、Calcebo et al. 2009, J. Infect. Dis., 199:381-90

40

50

を参照されたい。

【0049】

予測されるアデノ随伴ウイルス（AAV）祖先核酸配列およびポリペプチド配列

Anc80節の予測される祖先キャプシドポリペプチドをコードするライブラリーからの多数の異なるクローンを配列決定し、代表的なAAVの予測されるキャプシドポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号19（Anc80L27）；配列番号20（Anc80L59）；配列番号21（Anc80L60）；配列番号22（Anc80L62）；配列番号23（Anc80L65）；配列番号24（Anc80L33）；配列番号25（Anc80L36）；および配列番号26（Anc80L44）に示す。当業者は、それぞれのアミノ酸配列をコードする核酸配列が容易に決定され得ることを理解する。

10

【0050】

配列番号19、20、21、22、23、24、25または26に示される配列を有する予測される祖先キャプシドポリペプチドに加えて、配列番号19、20、21、22、23、24、25または26に示される配列を有する予測される祖先キャプシドポリペプチドと少なくとも95%の配列同一性（例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性）を有するポリペプチドが提供される。同様に、祖先キャプシドポリペプチドをコードする核酸分子と少なくとも95%の配列同一性（例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性）を有する（すなわち、少なくとも95%の配列同一性を有する）核酸分子が提供される。

20

【0051】

配列同一性パーセントの計算において、2つの配列が整列され、2つの配列間のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の同一の合致数が決定される。同一の合致数は、整列された領域の長さ（すなわち、整列されたヌクレオチドまたはアミノ酸残基の数）によって割られ、パーセント配列同一性の値に到達させるために100を乗じる。整列された領域の長さは、最も短い配列の全長サイズまでの1つまたは両方の配列の一部であり得ることが理解される。また、単一の配列は、1を超える他の配列と整列させることができ、したがって、それぞれの整列された領域に対する、異なる配列同一性パーセントの値を有することができることが理解される。

【0052】

配列同一性パーセントを決定するための2つ以上の配列のアラインメントは、ワールドワイドウェブ上のncbi.nlm.nih.govで利用可能なBLAST（基礎局所的アラインメント検索ツール）プログラムに組み込まれた、Altschul et al.（1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402）によって記載されるアルゴリズムを用いて行うことができる。BLAST検索は、Altschul et al.のアルゴリズムを用いて整列された、配列（核酸またはアミノ酸）と任意の他の配列またはその一部の間の配列同一性パーセントを決定するために行うことができる。BLASTNは、核酸配列を整列させ、核酸配列間の同一性を比較するために使用されるプログラムであり、一方、BLASTPは、アミノ酸配列を整列させ、アミノ酸配列間の同一性を比較するために使用されるプログラムである。配列と別の配列の間の同一性パーセントを計算するためのBLASTプログラムを利用するとき、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータを一般的に使用する。

30

40

【0053】

代表的なアラインメントを図4Aと4Bおよび図5Aと5Bに示す。図4Aと4Bは、祖先AAV VP1キャプシドポリペプチドのアラインメントを示し、Anc80L65（配列番号23）、Anc80L27（配列番号19）、Anc80L33（配列番号24）、Anc80L36（配列番号25）、Anc80L44（配列番号26）、Anc80L59（配列番号20）、Anc80L60（配列番号21）およびAnc80L62（配列番号22）と指定される。図4Aと4Bに示されるアラインメントは、11部位のそれぞれで予測されたバリエーションと、クローニングのアーティファクトであり得る、Anc80L60（配列番号21）の609E位での1つの非同義突然変異を確認する

50

。図5Aと5Bは、祖先AAV VP1キャプシドポリペプチド（Anc80L65（配列番号23）、Anc80L27（配列番号19）、Anc80L33（配列番号24）、Anc80L36（配列番号25）、Anc80L60（配列番号21）、Anc80L62（配列番号22）、Anc80L44（S配列番号26）およびAnc80L59（配列番号20））と同時代のAAV VP1キャプシドポリペプチド（AAV8（配列番号27）、AAV9（配列番号28）、AAV6（配列番号29）、AAV1（配列番号30）、AAV2（配列番号31）、AAV3（配列番号32）、AAV3B（配列番号33）およびAAV7（配列番号34））の間のアラインメントを示す。図5Aと5Bにおけるアラインメントは、祖先AAV配列が、同時代のAAV配列と約85%～91%の配列同一性を有することを示す。

10

【0054】

また、ポリペプチドをコードする核酸分子を含有するベクターが提供される。発現ベクターを含むベクターは市販され、または組換え技術によって生成することができる。核酸分子を含有するベクターは、このような核酸分子に作動可能に連結した、発現のための1つまたは複数のエレメントを有することができ、さらに、選択可能なマーカーをコードする核酸分子（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、および／またはポリペプチド（例えば、6xHisタグ）の精製に使用され得る核酸分子を含むことができる。発現のためのエレメントには、核酸コード配列に指向し、その発現を制御する核酸配列を含む。発現エレメントの一例はプロモーター配列である。また、発現エレメントは、1つまたは複数のイントロン、エンハンサー配列、応答エレメント、または核酸分子の発現を調節する誘導可能なエレメントを含むことができる。発現エレメントは、細菌、酵母、昆虫、哺乳動物またはウイルス起源であってもよく、ベクターは、異なる起源からの発現エレメントの組合せを含有することができる。本明細書で使用するとき、作動可能に連結したとは、発現のためのエレメントが、コード配列に指向し、またはその発現を調節するような方法で、コード配列に対してベクターに配置されることを意味する。

20

【0055】

核酸分子、例えば、ベクター（例えば、発現ベクター、ウイルスベクター）中の核酸分子は、宿主細胞に導入され得る。「宿主細胞」なる用語は、核酸分子が導入された特定の細胞（単数または複数）を意味するだけでなく、このような細胞の後代または潜在的な後代もまた意味する。多数の適切な宿主細胞は当業者に公知である；宿主細胞は、原核細胞（例えば、大腸菌（E. coli））または真核細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳動物細胞）であり得る。代表的な宿主細胞としては、限定されないが、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギおよびハムスターを含む哺乳動物に由来するA549、WEHI、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10、VERO、WI38、HeLa、293細胞、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2、ならびに初代線維芽細胞、肝細胞および筋芽細胞が挙げられる。宿主細胞に核酸分子を導入する方法は当技術分野において公知であり、限定されないが、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクション、マイクロインジェクションおよびウイルス媒介核酸移入（例えば、形質導入）が含まれる。

30

40

【0056】

ポリペプチドに関して、「精製された」とは、自然にそれに付随する細胞構成成分から分離または精製されたポリペプチド（すなわち、ペプチドまたはポリペプチド）を意味する。典型的には、ポリペプチドは、乾燥重量で少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%または99%）である場合に「精製された」と考えられ、ポリペプチドと自然に会合される天然に存在する分子を含まない。化学的に合成されるポリペプチドは、本質的に、自然にそれに付随する構成成分から分離されるため、合成ポリペプチドは「精製された」と考えられるが、さらに、ポリペプチドを合成するために使用される構成成分（例えば、アミノ酸残基）から取り除くことができる。核酸分子に関して、「単離された」とは、通常、ゲノム中で関連付けられる他の核酸分子から分離

50

された核酸分子を意味する。さらに、単離された核酸分子は、組換えまたは合成の核酸分子などの遺伝子操作された核酸分子を含むことができる。

【0057】

ポリペプチドは、D E A E イオン交換、ゲルろ過および／またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどの公知の方法により天然供給源（例えば、生物学的試料）から取得（例えば、精製）され得る。精製されたポリペプチドはまた、例えば、発現ベクターに核酸分子を発現させることによって、または化学合成によって得ることができる。ポリペプチドの純度の程度は、任意の適切な方法、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動またはH P L C分析を用いて測定することができる。同様に、核酸分子は、通常行われる方法、例えば、限定されないが、組換え核酸技術（例えば、制限酵素消化およびライゲーション）またはポリメラーゼ連鎖反応（P C R；例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995参照）を用いて取得（例えば、単離）され得る。さらに、単離された核酸分子は、化学的に合成することができる。

10

【0058】

祖先ウイルスまたはその一部を使用する方法

本明細書に記載される祖先ウイルスまたはその一部、特に、同時代のウイルスまたはその一部と比較して低減した血清有病率を示すものは、多数の研究および／または治療用途において使用することができる。例えば、本明細書に記載される祖先ウイルスまたはその一部は、ヒトまたは動物の医療において、遺伝子治療（例えば、遺伝子移入のためのベクターもしくはベクターシステムにおいて）またはワクチン接種（例えば、抗原提示用）のために使用することができる。より具体的には、本明細書に記載される祖先ウイルスまたはその一部は、遺伝子付加、遺伝子増加、ポリペプチド製剤の遺伝子送達、遺伝子ワクチン接種、遺伝子サイレンシング、ゲノム編集、遺伝子治療、R N A i 送達、c D N A 送達、m R N A 送達、m i R N A 送達、m i R N A スポンジング、遺伝子免疫、光遺伝学的遺伝子治療、遺伝子組換え、D N A ワクチン接種またはD N A 免疫のために使用することができる。

20

【0059】

宿主細胞は、インビトロで（例えば、培養下で増殖中に）またはインビボで（例えば、対象において）祖先ウイルスまたはその一部により形質導入あるいは感染され得る。インビトロで祖先ウイルスまたはその一部により形質導入または感染され得る宿主細胞は本明細書に記載される；インビボで祖先ウイルスまたはその一部により形質導入または感染され得る宿主細胞としては、限定されないが、脳、肝臓、筋肉、肺、眼（例えば、網膜、網膜色素上皮）、腎臓、心臓、生殖腺（例えば、精巣、子宮、卵巣）、皮膚、鼻腔、消化器系、脾臓、脾島細胞、神経細胞、リンパ球、耳（例えば、内耳）、毛包および／または腺（例えば、甲状腺）が挙げられる。

30

【0060】

本明細書に記載される祖先ウイルスまたはその一部は、（他のウイルス配列とシスまたはトランスである）導入遺伝子を含むように修飾することができる。導入遺伝子は、例えば、レポーター遺伝子（例えば、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ（L a c Z）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光ポリペプチド（G F P）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（C A T）もしくはルシフェラーゼ、または赤血球凝集素もしくはM y cなどの抗原タグドメインを含む融合ポリペプチド）または治療遺伝子（例えば、ホルモンもしくはそれらの受容体、増殖因子またはその受容体、分化因子またはその受容体、免疫系調節因子（例えば、サイトカインおよびインターロイキン）またはその受容体、酵素、R N A（例えば、阻害性R N Aもしくは触媒R N A）または標的抗原（例えば、発癌性抗原、自己免疫抗原）をコードする遺伝子）であり得る。

40

【0061】

特定の導入遺伝子は、少なくとも部分的に、治療される特定の疾患または欠損症に依存する。単に一例として、遺伝子移入または遺伝子治療は、血友病、網膜色素変性症、嚢胞

50

性線維症、レーバー先天性黒内障、リソソーム貯蔵障害、先天性代謝異常（例えば、フェニルケトン尿症などのアミノ酸代謝の先天性異常、プロピオン酸血症などの有機酸代謝の先天性異常、中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症（MCAD）などの脂肪酸代謝の先天異常）、癌、色覚異常、コーンロッドジストロフィー、黄斑変性（例えば、加齢黄斑変性症）、リボポリペプチドリパーゼ欠損症、家族性高コレステロール血症、脊髄性筋萎縮症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、アルツハイマー病、パーキンソン病、肥満症、炎症性腸疾患、糖尿病、うっ血性心不全、高コレステロール血症、難聴、冠状動脈性心臓病、家族性腎アミロイドーシス、マルファン症候群、致死性家族性不眠症、クロイツフェルトヤコブ病、鎌状赤血球病、ハンチントン病、前頭側頭葉変性症、アッシャー症候群、乳糖不耐症、脂質蓄積障害（例えば、ニーマンピック病、C型）、バッテン病、先天性脈絡膜欠如、II型糖原病（ポンペ病）、毛細血管拡張性運動失調症（ルイパー症候群）、先天性甲状腺機能低下症、重症複合免疫不全（SCID）および／または筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療に適用することができる。

10

【0062】

また、導入遺伝子は、対象（例えば、ヒト、動物（例えば、コンパニオンアニマル、家畜、絶滅寸前の動物）の免疫に有用である免疫原であり得る。例えば、免疫原は、生物（例えば、病原生物）またはその免疫原性部分もしくはその構成成分（例えば、毒素ポリペプチドまたはその副生成物）から得ることができる。一例として、免疫原性ポリペプチドを得ることができる病原生物としては、ウイルス（例えば、ピコルナウイルス、エンテロウイルス、オルトミクソウイルス、レオウイルス、レトロウイルス）、原核生物（例えば、肺炎球菌（Pneumococci）、ブドウ球菌（Staphylococci）、リステリア菌（Listeria）、シュードモナス属（Pseudomonas））および真核生物（例えば、アメーバ症、マラリア、リーシュマニア症、線虫）が挙げられる。本明細書に記載される方法およびこのような方法によって製造される組成物は、任意の特定の導入遺伝子によって限定されるものではないことが理解される。

20

【0063】

通常、生理学的に適合した担体中に懸濁される祖先ウイルスまたはその一部を対象（例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物）に投与することができる。適切な担体としては、様々な緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）を用いて製剤化されてもよい生理食塩水、ラクトース、ショ糖、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチンおよび水が含まれる。祖先ウイルスまたはその一部は、細胞に形質導入または感染させ、過度の副作用なしに治療上の利益を提供するために、遺伝子移入および発現の十分なレベルを与えるのに十分な量で投与される。従来のおよび医薬として許容される投与経路としては、限定されないが、例えば、肝臓もしくは肺などの臓器への直接送達、経口、鼻腔内、気管内、吸入による、静脈内、筋肉内、眼内、皮下、皮内、経粘膜、または他の投与経路によるものが挙げられる。所望により、投与経路を組み合わせることができる。

30

【0064】

対象に投与される祖先ウイルスまたはその一部の用量は、主に、治療される状態、ならびに対象の年齢、体重および健康などの因子に依存する。例えば、ヒト対象に投与される祖先ウイルスまたはその一部の治療的有効量は、一般的に、祖先ウイルスの約 1×10^1 ~ 1×10^{12} のゲノムコピー（GC）（例えば、約 1×10^3 ~ 1×10^9 GC）の濃度を含有する約 0.1 ml ~ 約 10 ml の溶液の範囲にある。導入遺伝子の導入および／または発現は、DNA、RNAまたはタンパク質アッセイによって、投与後の種々の時点でモニターすることができる。いくつかの例において、導入遺伝子の発現レベルは、投薬の頻度および／または量を決定するためにモニターすることができる。また、治療目的のために記載されたものと類似する投薬計画を免疫化のために利用することができる。

40

【0065】

また、本明細書に記載される方法は、ウイルスまたはその一部の1つまたは複数の免疫原性ドメインを修飾または除去するように、前方進化をモデリングするために使用することができる。

50

【0066】

本発明によれば、当業者の技術範囲内の従来の分子生物学、微生物学、生化学および組換えDNA技術を採用してもよい。このような技術は、文献に十分に説明されている。本発明は、特許請求の範囲に記載される、対象とする方法および組成物の範囲を限定するものではない以下の実施例においてさらに説明される。

実施例

【実施例1】

【0067】

祖先配列のコンピュータ計算による予測

AAVキャプシドの75個の異なるアミノ酸配列のセットは、GenBankなどの多数の公共データベースから取得され、配列は、PRANK-MSAアルゴリズム、バージョン121002を用いて整列され、オプションは「-F」である。

【0068】

ProTest3（例えば、Darriba et al., 2011, Bioinformatics, 27(8):1164-5；ワールドワイドウェブ上のdarwin.uvigo.es/software/prottest3で利用可能である）は、様々な条件下（例えば、ProTest3に含まれるもの、すなわち、「+I」、「+F」、「+G」およびそれらの組合せ）でポリペプチド進化の様々なモデル（例えば、ProTest3に含まれるもの、すなわち、JTT、LG、WAG、VT、CpRev、RtRev、Dayhoff、DCMut、FLU、Blosum62、VT、HIVb、MtArt、MtMam）を評価するために使用された。+Gおよび+F（Yang, 1993, Mol. Biol. Evol., 10:1396-1401；およびCao et al., 1994, J. Mol. Evol., 39:519-27）を用いたJTTモデル（Jones et al., 1992, Comp. Appl. Biosci., 8:275-82）は、ProTest3において実行されるその赤池情報量規準（AIC；Hirotsugu, 1974, IEEE Transactions on Automatic Control, 19:716-23）に基づいて選択された。

【0069】

AAV進化の系統発生をPhyML（Guindon and Gascuel, 2003, Systematic Biology, 52:696-704）を用いて構築した。図3を参照されたい。系統樹は、JTT+F置換モデルを用いて作成され、4つの離散置換カテゴリと概算ガンマ形状パラメータを有した。得られた系統樹は、最近隣交換（Nearest Neighbor Interchange）（NNI）とサブツリー枝刈りおよび再移植（Subtree Pruning and Re-Grafting）（SPR）を介して改善され、「SH様」バリエーションを用いて、ブートストラップと近似尤度比テスト（aLRT；Anisimova and Gascuel, 2006, Systematic Biology, 55:539-52）を介して有意性について評価された。

【0070】

次に、上記で構築された系統樹は、系統発生内部の全ての節でAAVキャプシドの祖先状態を概算するために使用された。祖先キャプシド配列は、Lazarus（sf.netのSourceforge）に含まれる最大尤度の系統発生学的分析（PAML）ソフトウェア（Yang, 1997, Comp. Applic. BioSci., 13:555-6；ワールドワイドウェブ上のabacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.htmlで利用可能である）を介した最大尤度原理を用いて再構築された。より具体的には、Lazarus/PAML再構築は、4ガンマ分布カテゴリを用いたJTT+F置換モデルによるアミノ酸再構築を生成するように設定された。AAV5を外集団として使用した。最後に、「I」オプションは、PAML再構築がなされた後、インデルを配置するために追加された（すなわち、フィッチアルゴリズムを用いた最大節約を介して二値コード化され、配置された）。

【0071】

再構築が最大尤度法で行われたため、任意の残基を所定の節で所定の位置にあった尤度を計算することができる。これを行うために、追加のスクリプトは、特定の閾値下に計算された事後確率を有する配列に沿った全ての位置を同定するために記述された。0.3の閾値が選択され、これは、0.3を超える計算された事後確率を有する任意のアミノ酸がライブラリーの合成に含まれたことを意味する。これらの残基は、ライブラリー中の目的

10

20

30

40

50

とするバリエーションであるように選択された。

【0072】

配列を確定するために、追加の有用性は、コドンを選択するようにコード化されなければならなかった。スクリプトは、別のAAV配列（ANC80足場配列と約92%の配列同一性を有するAAVRh10）と同様のコドンを導き出し、コドン置換マトリックスに基づく配列の不一致があった場合にコドンを置換するための新規なアルゴリズムを適用するように記述された。新規なアルゴリズムを以下に示す：

前提：アミノ酸配列、Pt、対応するヌクレオチド配列を有する、Nt、この場合、NtはPtをコードする；およびタンパク質配列、Pi、この場合、PiはPtに強い相同性を示す。

スコアリングのためのBlosum62表を用いてNeedleman-WunschによりPiとPtを整列させる。Ntからの対応するコドンを用いて、タンパク質アラインメントに踏み込むことによって、新しいヌクレオチド配列、Niを生成する。

この場合、Ptにおけるアミノ酸はPiに正確に合致し、

コドン-PAMマトリックス（Schneider et al., 2005, BMC Bioinform., 6:134）からの「最良スコアリング」コドン、この場合、置換が存在する、

ギャップ、この場合、Ptにおけるアミノ酸に対して整列されたPiにギャップが存在する、および

Nt（所定のアミノ酸をコードする）において最も頻繁に生じるヌクレオチド、この場合、Ptにおけるギャップに対して整列されるPiにアミノ酸が存在する。

【0073】

さらに、2つの単一ヌクレオチド変化は、野生型AAVにおけるAAVキャプシド遺伝子内のフレームのうちコードされているアセンブリ活性化タンパク質（AAP）の転写を除去するために行われた。AAP（同時代または祖先）のコーディングは、この再構築の一部ではなかったため、AAPの発現はcap配列中に同義突然変異を作製することによって除去され、AAP配列はウイルス生成中にトランスで提供された。

【実施例2】

【0074】

祖先AAV VP1配列の発現

実験は、予測された祖先AAVキャプシド配列がウイルスベクターを作製するために使用され得るかどうかを決定するために行われた。

【0075】

多数の予測された祖先AAVキャプシド配列をクローニングした。祖先キャプシドのライブラリーは、一過性トランスフェクションにおいてウイルス粒子の形成を可能にするようにrep-cap発現プラスミドに移された。適切な発現レベルならびにVP1、VP2およびVP3のスプライシングを維持するために、ライブラリーcap遺伝子は、repコード配列におけるcapの5'に位置したHindIIIと、cap終止コドンとポリアダニル化シグナルの間で遺伝子操作されたSpeIとを切断することによってクローニングされた。結果として、より従来の「REP/CAP」構築物に祖先キャプシドをクローニングするために、継代プラスミドをHindIIIとSpeIで消化し、ゲル精製し、同様に消化されたrep/capプラスミドにライゲーションした。

【0076】

発現されたポリペプチドを10%SDSゲル上で分離した。図6に示されるように、キャプシドポリペプチドは適切に発現され、多数の祖先AAV配列（Anc80L44、Anc80L27およびAnc80L65）ならびに同時代のAAV配列のAAV2/8からVP1、VP2およびVP3にスプライシングされた。

【実施例3】

【0077】

ウイルス力価

AAVは、ウイルス粒子アセンブリに必要とされる全てのエレメントをコードするプラ

10

20

30

40

50

スミドの一過性共トランスフェクションを介してH E K 2 9 3細胞中で産生された。簡単には、H E K 2 9 3細胞を90%コンフルエントになるまで増殖させ、(a) A A V 2 I T Rによって挟まれたルシフェラーゼ導入遺伝子(C M Vプロモーターによって発現される)をコードするウイルスゲノムプラスミド、(b) A A V 2 r e pと本明細書に開示されている合成されたキャプシドタンパク質をコードするA A Vパッケージングプラスミド、(c) キャプシドを発現するA A V 2 - A A P、および(d) A A Vパッケージングとアセンブルに必要とされるアデノウイルスヘルパー遺伝子を用いてトランスフェクトした。細胞を37℃にて2日間インキュベートし、細胞および培地を採取し、回収した。

【0078】

細胞一培地懸濁液を3回連続した凍結融解サイクルによって溶解した。次に、溶解物を遠心分離によって清澄化し、徹底的なD N A消化を行う条件下で酵素、ここではB e n z o n a s e (商標)を用いて処置し、ウイルス粒子の外側に存在する任意のD N Aを消化した。A A V調製物は、対照D N Aテンプレート、この場合は、ベクターゲノムと比べて、同一のT a q M a n (商標)プライマーとプローブ結合配列を含む線状化プラスミドの線形測定範囲に含まれるように希釈された。T a q M a n (商標)P C Rは、選択したウイルスベクターゲノムにアニーリングするプライマーとプローブを用いて行われた。以下の表2に示すように、ミリリットル(m l)あたりのゲノムコピー(G C)におけるT a q M a n (商標)測定に基づいて力価を計算した。

【0079】

【表2】

表2

力価値(GC/ml)	小規模 番号1	小規模 番号2
AAV2/2	1.12×10^9	1.99×10^9
AAV2/8	4.17×10^{10}	5.91×10^{10}
Anc80L27	8.01×10^8	1.74×10^9
Anc80L44	1.52×10^9	1.43×10^9
Anc80L65	1.42×10^9	2.05×10^9
キャプシド対照なし	5.23×10^5	7.25×10^5

【0080】

祖先的に再構築されたA A Vキャプシド粒子による小規模ベクター生成結果は、A A V 2に類似したが、A A V 8に対して低減した収量を実証し、これらの両方は同時代のA A Vに基づくベクター調製物である。

【実施例4】

【0081】

インビトロのウイルス形質導入

インビトロのウイルス形質導入は、細胞を感染させる、予測された祖先A A V配列を含有するウイルスの能力を評価するために行われた。

【0082】

配列のA n c 8 0ライブラリーを使用したハイスループットベクター生成後、H E K 2 9 3細胞をそれぞれのウイルスベクターで形質導入した。A n c 8 0配列に加えて、それぞれのウイルスベクターはルシフェラーゼ導入遺伝子を含有した。ルシフェラーゼは、形質導入細胞または細胞溶解物にルシフェリン基質を添加後、96ウェルプレートリーダーで生物発光を定量することによって測定された。定量化後、4つの連結された96ウェルプレートにおけるルシフェラーゼ発現のヒートマップを作製した(各プレートにおいて対照の列を除く)。ハイスループットベクター生成のプロセスに関連した、大多数の挿入、欠失および遷移に起因して、多数のベクターは非機能的であった。本明細書の目的のために、このアッセイにおいて機能的である(すなわち、H E K 2 9 3細胞を形質導入し、導入遺伝子を発現することができる)ウイルスだけをさらに評価した。

【0083】

HEK293細胞は、2つの同時代のAAVベクター（AAV2／2およびAAV2／8）と3つの予測された祖先AAVベクター（Anc80L27、Anc80L44およびAnc80L65）を用いて、細胞あたり 1×10^4 ゲノムコピー（GC）の等しい感染の多重度（MOI）で形質導入された。各ベクターは、ルシフェラーゼをコードする導入遺伝子またはeGFPをコードする導入遺伝子のいずれかを含有した。細胞は、60時間後、AMG EvosFl光学顕微鏡のGFPチャンネルを用いて撮像された。図7は、インビトロで形質導入後のルシフェラーゼ発現を示す。祖先AAVウイルスの各々は、HEK293細胞の効率的な形質導入を実証した。

【実施例5】

10

【0084】

インビボでのレチナール形質導入

レチナール形質導入は、祖先AAVベクターがインビボでマウス網膜細胞を標的とすることができるかどうかを決定するために行われた。

【0085】

マウスの目は、 2×10^8 個のゲノムコピー（GC）の3種の異なる祖先AAV（Anc80L27、Anc80L44およびAnc80L65）と同時代のAAV（AAV2／8）で形質導入され、それらの全てはeGFPをコードする導入遺伝子を含んでいた。形質導入のために、各AAVベクターは、注射装置を用いたベクターボラスの送達を介して、光受容体と網膜色素上皮層の間に空間を生成することにより網膜下に外科的に送達された。ベクターボラスが網膜下空間に残存し、サブ網膜下の剥離が経時的に解決された。GFP発現は、Tropicamide（商標）を用いた瞳孔拡張後、動物の網膜の眼底撮影により非侵襲的にモニターされた。示された網膜の全ては、網膜への祖先AAVの、様々な程度の成功した標的化を実証した。

20

【0086】

また、網膜組織学を行い、形質導入された細胞型を同定するために蛍光顕微鏡下で可視化した。組織学は、上述したAnc80L65祖先AAVベクターで形質導入されたマウス網膜上で行われた。Anc80L65を媒介したeGFP発現は、外核層（ONL）、内部セグメント（IS）および網膜色素上皮（RPE）において明らかであり、祖先Anc80L65ベクターがマウス光受容体と網膜色素上皮細胞を標的とすることを示した。

30

【実施例6】

【0087】

中和抗体アッセイ

中和抗体アッセイは、祖先AAVウイルスが、同時代のAAVウイルスよりも抗体中和に対してより抵抗性であるか否かを評価するために行われた。中和抗体アッセイは、抗体の不存在下における対照と比較して、50%以上の感染を中和する抗体濃度（または実験試料が抗体濃度を含有する力価）を測定する。

【0088】

血清試料またはIVI G原液（200mg／ml）を連続して2倍希釈し、希釈していない試料および希釈した試料は、 10^4 のMOIで約30分間37℃にて、祖先AAVウイルス、Anc80L65、および同時代のAAVウイルス、AAV2／8と同時にインキュベートされた。各ウイルスはルシフェラーゼ導入遺伝子を含んだ。次に、混合ベクターおよび抗体試料をHEK293細胞に形質導入した。これらの実験について、使用された抗体試料は、静注用イムノグロブリン（IVI G）、1000を超える血液ドナーの血漿から抽出され、プールされたIgG（例えば、Gammagard（商標）（Baxter Healthcare；Deerfield、IL）またはGamnax（商標）（Grifols；Los Angeles、CA）として市販されている）であった。形質導入の開始から48時間後、細胞は、ルシフェラーゼを検出するために生物発光によりアッセイされた。中和抗体力価は、50%以上の中和（試料の形質導入／試料の不存在下での対照ウイルスの形質導入）が到達した試料の希釈を同定することによって決定され

40

50

た。

【実施例 7】

【0089】

Anc80 の特徴付け

本明細書に記載される方法に基づいて、最も可能の高いAnc80配列（事後確率によって決定される）が得られ、Anc80L1（配列番号35はAnc80L1キャプシドの核酸配列を示し、配列番号36はAnc80L1 VP1ポリペプチドのアミノ酸配列を示す）と指定された。Anc80確率ライブラリーは、営利企業によって、本明細書に記載される配列を用いて合成され、発現ベクターにサブクローニングされた。

【0090】

Anc80ライブラリーは、組合せアッセイにおいてベクター収率および感染力についてクローン的に評価された。このスクリーニングのうち、Anc80L65（配列番号23）、およびいくつかの他の変異体をさらに特徴付けた。

【0091】

Anc80ライブラリーとAnc80L65を配列の相違の観点から比較した（図8；対角線から上は％、下はアミノ酸の相違数）。NCBI-BLASTを用いて、Anc80L65に最も近い公的に利用可能な配列はrh10（GenBank受託番号AA088201.1）である。

【0092】

図9は、Anc80L65はAAV2に相当するベクター収率を生成したこと（パネルA）、透過型顕微鏡検査（TEM）下でウイルス粒子を生成したこと（パネルB）、変性条件下でのSDS pageに基づくAAV capとVP1、2および3タンパク質を生化学的に生成したこと（パネルC）、およびAAVキャプシド抗体、B1を用いたウェスタンブロット（パネルD）を示す。これらの実験は、以下の段落でより詳細に記載される。

【0093】

簡単には、AAV2/8、AAV2/2、AAV2/Anc80L27、AAV2/Anc80L44およびAAV2/Anc80L65ベクターは、eGFPで構成されるレポーター構築物を含有する小規模において生成され、CMVプロモーター下のホタルルシフェラーゼは小規模において生成された。次に、ウイルスのこれらの小規模製剤の力価は、定量PCRを介して得られた。これらの実験に基づいて、Anc80L27、Anc80L44およびAnc80L65ベクターは、AAV2に匹敵するウイルスレベルを生成することが見出された（図9A）。

【0094】

Anc80L65キャプシドタンパク質が、適切な大きさおよび立体構造の完全なウイルス様粒子にアセンブルされていることを確認するために、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて顕微鏡写真を得た。Anc80-L065の大規模の精製された調製物は、ポリビニルホルマール（Formvar（登録商標））被覆した銅グリッドに装填し、次に、酢酸ウラニルで染色した。顕微鏡写真は、20～25nmの直径を有する無傷な六角形の粒子を示した（図9B）。

【0095】

合成祖先キャプシド遺伝子が正常に処理（すなわち、スプライスおよび発現）されたかどうかを決定するために、AAV2/8、AAV2/2およびAAV2/Anc80L65ベクターの大規模で精製された調製物を変性条件下でSDS-PAGEゲルに装填した（1E10 GC/ウェル）。ウイルスキャプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3を表すバンドは、明らかに、各ベクター調製物に存在した（図9C）。AAVキャプシド抗体B1を用いたウェスタンブロットにより、さらに、これらのバンドが予測されたタンパク質を表すことを確認した（図9D）。

【0096】

さらに、図10は、Anc80L65が、読み出し（パネルA）またはルシフェラーゼ

10

20

30

40

50

(パネルB) 対AAV2および／またはAAV8対照として、GFPを用いて、MOI 10E4 GC／細胞でHEK293細胞においてインビトロで哺乳動物組織および細胞を感染させたことを示す。また、Anc80L65は、核のLacZ導入遺伝子をコードする指示されたAAVのIV注射後（上段の行、パネルC）、GFPをコードする指示されたAAVの直接的な筋肉内（IM）注射後（中段の行、パネルC）、およびGFPをコードする指示されたAAVによる網膜下注射後（下段の行、パネルC）に肝臓の標的に効果的であった。これらの実験は、以下の段落でより詳細に記載される。

【0097】

祖先ビリオンの感染度の相対的尺度を得るために、CMVプロモーターの制御下でeGFP配列とホタルルシフェラーゼ配列を含むニシストロン性の受容体構築物を含有するAAV2／2、AAV2／8、AAV2／Anc80L65、AAV2／Anc80L44、AAV2／Anc80L27、AAV2／Anc80L121、AAV2／Anc80L122、AAV2／Anc80L123、AAV2／Anc80L124およびAAV2／Anc80L125を生成した。次に、HEK293細胞でコンフルエントした96ウェルプレートは、1E4 GC／細胞のMOI（上記したqPCRにより取得された力価）で各ベクターによる形質導入に供された。48時間後、蛍光顕微鏡検査により、形質導入された細胞中のGRPの存在を確認した（図10A）。次に、細胞をルシフェラーゼの存在についてアッセイし（図10B）、これは、Anc80由来のベクターで形質導入された細胞におけるルシフェラーゼの発現が、AAV8（低レベルの形質導入）とAAV2（高レベルの形質導入）の間にあることを決定した。

【0098】

インビボという事情において遺伝子移入の相対的効率を評価するために、AAV2／2、AAV2／8およびAAV2／Anc80L65の精製された高力価の調製物を得た。3.9E10 GCの各ベクターは、TBGプロモーターの制御下で核のLacZをコードする導入遺伝子を封入し、一般的な麻酔後にIP注射によりC57BL／6マウス（条件あたり3匹）に注射された。注射から28日後、マウスを屠殺し、組織を回収した。肝臓は、標準的な組織学的技術により切片にされ、β-ガラクトシダーゼについて染色された。次に、切片を顕微鏡で画像化し、代表的な画像を図10Cの上段の行に示す。

【0099】

続いて、pCASIプロモーターの制御下でeGFPおよびhA1ATをコードするニシストロン性の導入遺伝子を含有する同じ血清型のベクターを得た。マウス骨格筋を形質導入するAnc80L65の能力を評価するために、1E10 GCの各ベクターは、一般的な麻酔後、C57BL／6マウス（条件あたり5匹のマウス）の骨格筋に注射された。注射から28日後、マウスを屠殺し、組織を凍結切片し、eGFPの存在を蛍光共焦点顕微鏡を用いて評価した（青色はDAPIであり、緑色のeGFPである）。代表的な画像を図10Cの中段の行に示す。これらの実験は、Anc80L65ベクターが筋肉内注射によりマウスの骨格筋を形質導入することができたことを実証した。

【0100】

今回、CMVプロモーターの制御下でeGFP導入遺伝子のみをコードする構築物をキャプシド形成する、同じ血清型のベクターを取得した。2E9粒子は、一般的な麻酔後、C57BL／6マウスに網膜下注射された。注射から28日後、マウスを屠殺し、眼を回収し、凍結切片し、およびeGFPの存在を蛍光共焦点顕微鏡を用いて評価した（青色はDAPIであり、緑色はeGFPである）。代表的な画像を図10Cの下段の行に示す。これらの実験は、Anc80L65ベクターが、AAV8ベクターに匹敵するレベルでマウス網膜に形質導入することができることを実証する。

【0101】

簡単には、CMVプロモーターの制御下でeGFPとホタルルシフェラーゼを含むバイシストロニック導入遺伝子をキャプシド形成するAAV2／8、AAV2／2、AAV2／rh32.33およびAAV2／Anc80L65ウイルスベクターの精製された高力価調製物を得た。次に、これらのベクターは、IVI Gの2倍連続希釈物（10mg、5

mg、2.5 mg など)とともにインキュベートされ、またはIVI Gなし(条件あたり1E9 GC)でインキュベートされた。インキュベーション後、ベクターを用いて、ウェルあたり1E4のMOI(ウェルあたり1希釈)でHEK293細胞を形質導入した。

【実施例8】

【0102】

追加の祖先AAVキャプシドの産生

次に、最も可能性の高い祖先AAVキャプシド配列(事後確率により決定される)は、民間の研究所(Gen9)を介して合成され、線形dsDNAとして提供された。続いて、これらのアミノ酸配列は、それらが異なる程度を確認するために、現存のAAVの配列と比較された(図11)。各々の祖先VP1タンパク質は、3.6%~9.3%で選択された代表的な現存のAAVのものと相違し(図11A)、一方、祖先VP3タンパク質は4.2~9.4%で相違する(図11B)。これらのキャプシドは、それぞれ、制限酵素消化(HindIII & SpeI)およびT4ライゲーションを介してAAV産生プラスミド(pAAベクター2/空)にサブクローニングされた。これらのクローンを制限消化およびサンガー配列決定により確認し、その後、プラスミドDNAの中規模調製物を生成した。

【0103】

次に、これらのプラスミドの各々を、eGFPとホタルルシフェラーゼの両方をコードするレポーター遺伝子を含むAAVベクターを生成させるために使用した。前述のように、これらのベクターを小規模で三連で生成した。その後、ウイルスの粗調製物を定量PCRを介して力価測定し、AAV8と比較して2.71%~183.1%のウイルス粒子を生成することを見出した(図12および13)。続いて、これらの力価を用いて、相対感染力を評価するために力価制御実験を設定した。Anc126は、その産生が有意に低下したため、力価制御されなかった。その結果、Anc126の感染力に関するデータは、この実験における他のウイルスの感染力と正確に比較することができない。他のベクターを用いて、1.9E3 GC/細胞の感染の多重度(MOI)でHEK293細胞を形質導入した。

【0104】

形質導入から60時間後、細胞は、蛍光顕微鏡検査によりGFP発現について評価された。eGFP陽性細胞は、陰性対照を除き、各条件下で検出された(図14)。これは、予測され、合成されおよびクローン化された祖先配列の各々が、生存可能な感染性ウイルス粒子を生成することができることを示す。感染力の相対的レベルという概念を得るために、ルシフェラーゼアッセイがまた、同じ細胞について行われた。結果は、祖先ベクターの各々が、AAV8と比較して28.3%~850.8%でHEK293細胞に形質導入することが可能であることを示す(図15および図16)。力価制御されなかったため、Anc126は相対的な形質導入の分析から除外されたことに留意されたい。

【0105】

まとめると、8つの新規な祖先AAVキャプシド遺伝子が、合成され、AAV8、AAV2および前述のAnc80L65ベクターと一緒に機能的ウイルスベクターの生成に用いられた。生成および感染力をインビトロで評価し、それらの知見の概要を図17に示す。

【実施例9】

【0106】

ベクター免疫予防

ベクター免疫予防において、遺伝子治療用ビヒクル(AAVなど)は、感染性物質に対する広範に中和する抗体をコードする導入遺伝子を送達するために使用される。例えば、Balazs et al. (2013, Nat. Biotechnol., 31:647-52); Limberis et al. (2013, Sci. Transl. Med., 5:187ra72); Balazs et al. (2012, Nature, 481:81-4); およびDe al et al. (2014, PNAS USA, 111:12528-32)を参照されたい。この治療の1つの利点は、宿主がそれら自体の細胞に抗体を産生することであり、これは、単一の投与が病因物質

に対する保護の寿命を付与する可能性を有することを意味する。

【実施例 10】

【0107】

ドラッグデリバリーベヒクル

LUCENTIS（登録商標）（ラニズマブ）およびAVASTIN（登録商標）（ベバシズマブ）は共に、血管内皮増殖因子A（VEGF-A）に対して同じヒト化マウスモノクローナル抗体に基づく抗血管形成剤である。ベバシズマブは全長抗体であり、ラニズマブは断片（Fab）であるが、それらは共に、VEGFを拮抗することによって、同じメカニズムを介して滲出型加齢黄斑変性症を治療するように作用する。例えば、Mao et al. (2011, Hum. Gene Ther., 22:1525-35) ; Xie et al. (2014, Gynecol. Oncol., doi: 10.1016/j.ygyno.2014.07.105) ; およびWatanabe et al. (2010, Gene Ther., 17:1042-51) を参照されたい。これらの両分子はタンパク質であるため、それらはDNAにコードされ、導入遺伝子を含むベクターを用いて形質導入された細胞において産生され、AAVベクターにパッケージングされるのに十分小さい。

10

【0108】

他の態様

対象の方法および組成物は、多数の異なる態様と併せて本明細書に記載されるが、様々な態様の前述の記載は、説明することを意図しており、対象の方法および組成物の範囲を限定しないことを理解するべきである。他の態様、利点および修飾は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

20

【0109】

開示された方法および組成物に使用できるか、それと組み合わせて使用できるか、その調製に使用できるか、またはその生成物である方法および組成物が開示される。これらの物質および他の物質は、本明細書に開示され、これらの方法および組成物の組合せ、サブセット、相互作用、群などが開示されていると理解される。すなわち、様々な個々のおよび集合的な組合せならびにこれらの組成物の並べ替えについての具体的な言及は明示的に記載されていない場合もあるが、それぞれは本明細書において具体的に意図され、記載される。例えば、対象の特定の組成物または特定の方法が開示され、検討され、多数の組成物または方法が検討される場合、組成物および方法のそれぞれおよび全ての組合せおよび並び替えは、具体的な記載に反しない限り、具体的に意図される。同様に、これらのあらゆるサブセットまたは組合せもまた、特に意図され、開示される。

30

【0110】

付録A

配列番号1：Anc80ポリペプチド

【0111】

【化1】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQPPAX1KRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPSGVGSNTMX2AGGG
APMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGX3STNDNTYFGYS
TPWGYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKX4LNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTTIANNLTSTVQVFTD
SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFX5FSYT
FEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSQTAGNRX6LQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCY
RQQRVSKTX7NQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMATHKDDDEDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNV
DLDNVMITX8EEEIKTTNPVATEX9YGT VATNLQXS10NTAPATGTVNSQGALPGMVWQX11RDVYLQGP
IWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWEL
QKENS KRWNPEIQYTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X1 = K/R; X2 = A/S; X3 = A/G; X4 = R/K; X5 = E/Q; X6 = T/E; X7 = A/T;
X8 = S/N; X9 = Q/E; X10 = S/A; X11 = N/D

【0112】

配列番号2：Anc80 DNA

50

【0113】

【化2】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGG
 ACTTGAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCT
 TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCA
 GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
 ACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGC
 AGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCAATCACCCAGGAACCAGACTCCTCTTCGGGCATCGGCAAGAAAGGCC
 AGCAGCCCGCGXXX1AAGAGACTCAACTTTGGGCAGACAGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAAC
 CACTCGGAGAACCCCCCGAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAATGXXX2GCAGGCGGTGGCGCTC
 CAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGAGTGGGTAAACGCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCAC
 ATGGCTGGGCGCAGAGTCATCACCACGACCCCGAACCTGGGCCCTCCCCACCTACAACAACACCTC
 TACAAGCAAATCTCCAGCCAATCGGGAXXX3AGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCC
 TGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACA
 ACAACTGGGGATTCCGGCCCCAAGXXX4CTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGTCAAGA
 CGAATGATGGCACCACGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGGTCTTTACGGACTCGGAATA
 CCAGCTCCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCACCGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATG
 ATTCCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCCGTGGGCCGTTTCTCTTCTACTGCC
 TGGAGTACTTTCTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTXXX5TTCAGCTACACGTTTGAGGACG
 TGCCTTTTTCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAAAGCCTGGACCGGTGATGAACCCCTCATCGACCAGTA
 CCTGTACTACCTGTCTCGGACTCAGACCACGAGTGGTACCGCAGGAAATCGGXXX6TTGCAATTTTCTCA
 GGCCGGGCTAGTAGCATGGCGAATCAGGCCAAAACTGGCTACCCGGGCCCTGCTACCGGCAGCAACGC
 GTCTCCAAGACAXXX7AATCAAAATAACAACAGCAACTTTGCCTGGACCGGTGCCACCAAGTATCATCTG
 AATGGCAGAGACTCTCTGGTAAATCCCGGTCCCGCTATGGCAACCCACAAGGACGACGAAGACAAATTTT
 TTCCGATGAGCGGAGTCTTAATATTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAATAGCAACGTGGACCTTGACAACGT
 TATGATAACCXXX8GAGGAAGAAATTAACCAACCCAGTGGCCACAGAAXXX9TACGGCACGGTGG
 CCACTAACCTGCAATCGXXX10AACACCGCTCCTGCTACAGGGACCGTCAACAGTCAAGGAGCCTTACCT
 GGCATGGTCTGGCAGXXX11CGGGACGTGTACCTGCAGGGTCTATCTGGGCCAAGATTCTCACACGGA
 CGGACACTTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAACACCCGCTCCTCAGATCCTGATT
 AAGAATACACCTGTTCCCGCGAATCCTCCAACCTTACCTCAGTCCAGCTAAGTTTGCCTGCTTCATCAGC
 AGTACAGCACCGGACAGGTGAGCTGGAAATGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGAA
 CCCAGAGATTCAATACACTTCCAACCTACAACAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTTGACACAAATGGC
 GTTTATTCTGAGCCTCGCCCCATCGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTG

10

20

XXX1 = AAG/AAA; XXX2 = GCA/AGC; XXX3 = GCA/GGC; XXX4 = AGA/AAG; XXX5 =
 GAG/CAG; XXX6 = ACG/GAG; XXX7 = GCG/ACC; XXX8 = AGT/AAC; XXX9 =
 CAG/GAG; XXX10 = TCA/GCC; XXX11 = AAC/GAC

30

【0114】

配列番号3: A n c 8 1 ポリペプチド

【0115】

【化3】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKRPVEQSPQEPDSSX1GIGKKGQXPAX2KRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPSGVGSNTMAAGGG
 APMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISX3X4QSGGSTNDNTYFG
 YSTPWGYFDFNRHFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKX5LNFKLFIQVKEVTTNDGTTTIANNLSTVQVF
 TDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNF6FS
 YTFEDVPFHSSYAHQSLSLDRMLNPLIDQYLYLSRTQTTGGTAGNX7X8LQFSQAGPSSMANQAKNWLPG
 PCYRQQRVSKTTNQNNSNFATWGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDDRFFPSSGVLIIFGKQAGNX
 9NVDX10X11NVMITX12EEEIKTTNPVATEEYGX13VATNLQXSX14NTAPQTGTVNSQGALPGMVWQNR
 DLYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPTTFX15PAKFASFITQYSTGQ
 VSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSTNVDFAVDTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X1=T/S; X2=K/R; X3=N/S; X4=S/H; X5=R/K; X6=E/Q; X7=R/Q; X8=T/E;
 X9=D/S; X10=L/Y; X11=D/S; X12=S/N; X13=V/I; X14=A/S; X15=S/T

【0116】

配列番号4: A n c 8 1 DNA

50

【0117】

【化4】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGG
 ACTTGAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCT
 TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCA
 GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
 ACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGC
 AGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCAATCACCCAGGAACCAGACTCCTCTXXX1GGCATCGGCAAGAAGGC
 CAGCAGCCCGCGXXX2AAGAGACTCAACTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTGCCCGACCTCAA
 CCACTCGGAGAACCCCCCGCAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCTC
 CAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCGGAGTGGGTAAATGCCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCAC
 ATGGCTGGGCGACAGATCATCACCACGACCCGAACCTGGGCCCTCCCCACCTACAACAACACCTC
 TACAAGCAAATCTCCXXX3XXX4CAATCGGAGGAAGACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCAC
 CCCCTGGGGGTATTTTGACTTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATC
 AACAACAACCTGGGGATTTCGGGCCAAGXXX5CTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTC
 ACGACGAATGATGGCACCACGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGGTCTTTACGGACTCGG
 AATACCAGCTCCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTT
 CATGATTCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCCGTGGGCCGTTCCTCCTTCTAC
 TGCCTGGAGTACTTTCTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTXXX6TTCAGCTACACGTTTGAG
 GACGTGCCTTTTACAGCAGCTACGCGCACAGCCAAAGCCTGGACCGGTGATGAACCCCTCATCGACC
 AGTACCTGTACTACCTGTCTCGGACTCAGACCACGGGAGGTACCGCAGGAAATXXX7XXX8TTGCAATTT
 TCTCAGGCCGGGCTAGTAGCATGGCGAATCAGGCCAAAACTGGCTACCCGGGCCCTGCTACCGGCAGC
 AACGCGTCTCCAAGACAACGAATCAAAATAACAACAGCAACTTTGCCTGGACCGGTGCCACCAAGTATCA
 TCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTAAATCCCGGTGTGCTATGGCAACCCACAAGGACGACGAAGACCGA
 TTTTTTCCGTCCAGCGGAGTCTTAATATTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAATXXX9AACGTGGACXXX10X
 XX11AACGTTATGATAACCXXX12GAGGAAGAAATTAAAACCAACCCAGTGGCCACAGAAGAGTACG
 GCXXX13GTGGCCACTAACCTGCAATCGXXX14AACACCGCTCCTCAAACAGGGACCGTCAACAGTCAAG
 GAGCCTTACCTGGCATGGTCTGGCAGAACCAGGACGTGTACCTGCAGGGTCTATCTGGGCCAAGATTCC
 TCACACGGACGGAACCTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAACACCCGCCTCCTCAG
 ATCCTGATTAAGAATACACCTGTTCCCGCAATCCTCCAACCTACCTTCXXX15CCAGCTAAGTTTGCCTC
 GTTCATCACGCAGTACAGCACCGGACAGGTACGCTGGAAATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGC
 AAACGCTGGAACCCAGAGATTCAATACACTTCCAACCTACAACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTTG
 ACACAGAAGGCGTTTATTCTGAGCCTCGCCCCATCGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTG

10

20

XXX1 = ACG/AGC; XXX2 = AAA/AAG; XXX3 = AAC/AGT; XXX4 = AGC/CAC; XXX5 =
 AGA/AAG; XXX6 = GAG/CAG; XXX7 = CGG/CAG; XXX8 = ACG/GAG; XXX9 =
 GAC/AGC; XXX10 = CTT/TAC; XXX11 = GAC/AGC; XXX12 = AGT/AAC; XXX13 =
 GTG/ATC; XXX14 = GCA/AGC; XXX15 = AGT/ACC

30

【0118】

配列番号5: A n c 8 2 ポリペプチド

【0119】

【化5】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPKYKYLGPFGNLDKGEVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKRPVEQSPQREPDSX1GIGKKGQXPAX2KRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVGSNTMAAGG
 GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDVRITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGY
 STPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTNEGKTIANNLTSTVQVFTD
 SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTF
 EDVFPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTGGTAGTQTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQ
 QRVSTTTNNNNNSFAWTGATKYHLNGRDSLVPVAMATHKDDDRFFPSSGVLI FGKQAGANDNVDYS
 NVMITX3EEEIKTTNPVATEEYGVVATNLQSANTAPQTGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPIHT
 DGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRW
 NPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X1=T/S; X2=K/R; X3=S/N

【0120】

配列番号6: A n c 8 2 DNA

50

【0121】

【化6】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGG
 ACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCT
 TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCA
 GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
 ATCACGCCGACGCCGAGTTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGC
 AGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTGTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCAGTCACCACAGCGTGAGCCCGACTCCTCCXXX1GGCATCGGCAAGAAA
 GGCCAGCAGCCCGCCXXX2AAGAGACTCAATTTTCGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCT
 CAACCTCTCGGAGAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAATGGCTGCAGGCGGTGGCG
 CACCAATGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAATTTGGCATTGCGATTTC
 CACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCAC
 CTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAGGCAGCACCAACGACAACACCTACTTTGGCTACAGCA
 CCCCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCAT
 CAACAACAATGGGGATTCCGGCCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAGTCAAAGAGGTC
 ACGACGAATGAAGACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCGTCCAGGTCTTACGGACTCGG
 AATACCAGCTGCCGTACGTCTCGGCTCTGCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCGGCGGACGTCTT
 CATGATTCCTCAGTACGCTACCTGACTCTCAACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGTTCCCTCCTTCTAC
 TGCTTGAGTACTTCCCCTCTCAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTCAATTCAGCTACACTTTCGAGG
 ACGTGCTTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGTTTGACAGGCTGATGAATCCTCTCATCGACCA
 GTACCTGTACTACCTGTCAAGAACCCAGACTACGGGAGGCACAGCGGGAACCCAGACGTTGCAGTTTTCT
 CAGGCCGGGCTAGCAGCATGGCGAATCAGGCCAAAACTGGCTGCCTGGACCCTGCTACAGACAGCAGC
 GCGTCTCCACGACAACGAATCAAAACAACAACAGCAACTTTGCCTGGACTGGTGCCACCAAGTATCATCT
 GAACGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCGTCGCCATGGCAACCCACAAGGACGACGAGGACCGCTTC
 TTCCCATCCAGCGGCGTCTCATATTTGGCAAGCAGGGAGCTGGAAATGACAACGTGGACTATAGCAACG
 TGATGATAACXXX3GAGGAAGAAATCAAGACCACCAACCCCGTGGCCACAGAAGAGTATGGCGTGGTGG
 CTACTAACCTACAGTCGGCAAACACCGCTCCTCAAACGGGGACCGTCAACAGCCAGGGAGCCTTACCTGG
 CATGGTCTGGCAGAACCAGGACGTGTACCTGCAGGGTCTATTTGGGCCAAGATTCCTCACACAGATGGC
 AACTTTCACCCGTCTCCTTTAATGGGCGGCTTTGGACTTAAACATCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAA
 AACTCCTGTTCTGCGGATCCTCCAACAACGTTCAACCAGGCCAAGCTGAATTCCTTTCATCACGCAGTA
 CAGCACCGGACAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAGCGCTGGAACCCA
 GAGATTCAGTATACTTCCAATACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTTAATACTGAGGGTGTTC
 ACTCTGAGCCTCGCCCCATTGGCACTCGTTACGTCACCCGTAATCTG

10

20

XXX1 = ACG/AGC; XXX2 = AAA/AGA; XXX-3 = AGC/AAC

30

【0122】

配列番号7: Anc83ポリペプチド

【0123】

【化7】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKRPVEQSPQREPDSX1GIGKKGQQPAX2KRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVGSNTMAAGG
 GAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRIITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGY
 STPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLX3FKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFT
 DSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFX4FSY
 TFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTGGTAGTQTLQFSQAGPSX5MANQAKNWLPGPC
 YRQQRVSTTTSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDX7RFFPSSGX7LIFGKQGAGKD
 NVDYSNVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGVVADNLQQQNTAPQX8GTVNSQALPGMVWQNRDVYLQGPWA
 KIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADPPTTFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKE
 NSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X1=T/S; X2=R/K; X3=N/S; X4=Q/E; X5=N/T/S; X6=D/E; X7=I/V; X8=I/V

【0124】

配列番号8: Anc83 DNA

【0125】

【化 8】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGG
 ACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCT
 TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCA
 GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
 ATCAGCCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGC
 AGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCAGTCACCACAGCGTGAGCCGACTCCTCCXX1GGCATCGGCAAGAAA
 GGCCAGCAGCCCGCCXX2AAGAGACTCAATTTTCGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCT
 CAACCTCTCGGAGAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAATGGCTGCAGGCGGTGGCG
 CACCAATGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGACGGAGTGGGTAGTTCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCT
 CACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCAGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCAC
 CTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAGGCAGCACCACGACAACACCTACTTTGGCTACAGCA
 CCCCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCAT
 CAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCCAAGAGACTCXX3TTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAAGAGGT
 CACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGTGTTTACGGACTCG
 GAATACCAGCTGCCGTACGTCTCTCGGCTCTGCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCGCGGCGGACGTCT
 TCATGATTCCTCAGTACGGCTACCTGACTCTCAACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGTTCCTCCTTCTA
 CTGCCTGGAGTACTTCCCTCTCAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTXX4TTCAGCTACACTTTCGA
 GGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGTTTGGACAGGCTGATGAATCCTCTCATCGAC
 CAGTACCTGTACTACCTGTCAAGAACCCAGACTACGGGAGGCACAGCGGGAACCCAGACGTTGCAGTTTT
 CTCAGGCCGGGCTAGCXX5ATGGCGAATCAGGCCAAAACTGGCTGCCTGGACCCTGCTACAGACAGC
 AGCGCTCTCCACGACAACGTGCAAAACAACAACAGCAACTTTGCCTGGACTGGTGCCACCAAGTATCA
 TCTGAACGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCGTCGCCATGGCAACCCACAAGGACGACGAGXX6CG
 CTTCTTCCCATCCAGCGGCXX7CTCATATTTGGCAAGCAGGGAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAG
 CAACGTGATGCTAACCAGCGAGGAAGAAATCAAGACCACCAACCCCGTGGCCACAGAAGAGTATGGCGTG
 GTGGCTGATAACCTACAGCAGCAAAACACCGCTCCTCAAXX8GGGACCGTCAACAGCCAGGGAGCCTTA
 CCTGGCATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGCTCCTATTTGGGCCAAGATTCTCACACAG
 ATGGCAACTTTACCCGTCTCCTTTAATGGGCGGCTTTGGACTTAAACATCCGCCTCCTCAGATCCTCAT
 CAAAAACACTCCTGTTCTGCGGATCCTCAACAACGTTCAACCAGGCCAAGCTGAATTCTTTCATCAGC
 CAGTACAGCACCAGCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAGCGCTGGA
 ACCCAGAGATTAGTATACTTCCAATACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTTAATACTGAGGG
 TGTTTACTCTGAGCCTCGCCCCATTGGCACTCGTTACCTCACCCTAATCTG

10

20

XXX1 = ACG/AGC; XXX2 = AGA/AAG; XXX3 = AAC/AGC; XXX4 = CAA/GAA; XXX-5
 = AAC/ACC/AGC; XXX-6 = GAC/GAG; XXX7 = ATC/GTC; XXX8 = ATA/GTA

30

【0 1 2 6】

配列番号 9 : A n c 8 4 ポリペプチド

【0 1 2 7】

【化 9】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLPKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKGQQPAX1KRLNFGQTGDSESVDPDPPIGEPPAAPSGVSGTMAAGGG
 APMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYS
 TPWGYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLX2FKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLSTIQVFTD
 SEYQLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTF
 EDVPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQ
 QRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDX3RFFPSSGX4LMFGKQGAGKDNVD
 YSNVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNTAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWIWAKIPH
 TDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPIILIKNTVPADPPTTFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR
 WNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X1=R/K; X2=N/S; X3=D/E; X4=I/V

【0 1 2 8】

配列番号 10 : A n c 8 4 DNA

【0 1 2 9】

【化 1 0】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGG
 ACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCT
 TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCA
 GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
 ATCACGCCGACGCCGAGTTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGC
 AGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCGTACCACAGCGTTCCCCGACTCCTCCACGGGCATCGGCAAGAAAG
 GCCAGCAGCCCGCCXXX1AAGAGACTCAATTTTCGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTC
 AACCTATCGGAGAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGC
 ACCAATGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGACGGAGTGGGTAGTTTCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCC
 ACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCACC
 TCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAGGCGACCAACGACAACACCTACTTTGGCTACAGCAC
 CCCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATC
 AACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCXXX2TTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAAGAGGTC
 ACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATCCAGGTGTTTACGGACTCGG
 AATACCAGCTGCCGTACGTCTCGGCTCTGCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCTGGCGGACGTCTT
 CATGATTCTCAGTACGGCTACCTGACTCTCAACAACGGTAGTCAGGCCGTGGGACGTTTCTCTTCTAC
 TGCCTGGAGTACTTCCCCTCTCAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTCAGCTACACTTTTCGAGG
 ACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGTTTGACAGGCTGATGAATCCTCTCATCGACCA
 GTACCTGTACTACCTGTCAAGAACCCAGTCTACGGGAGGCACAGCGGGAACCCAGCAGTTGCTGTTTTCT
 CAGGCCGGGCTTAGCAACATGTTCGGCTCAGGCCAAAACTGGCTGCCTGGACCCTGCTACAGACAGCAGC
 GCGTCTCCACGACACTGTGCAAAAACAACAGCAACTTTGCCTGGACTGGTGCCACCAAGTATCATCT
 GAACGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCGTCGCCATGGCAACCCACAAGGACGACGAGXXX3CGCTT
 CTTCCCATCCAGCGGCXXX4CTCATGTTTGGCAAGCAGGGAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAA
 CGTGATGCTAACCAGCGAGGAAGAAATCAAGACCACCAACCCCGTGGCCACAGAACAGTATGGCGTGGTG
 GCTGATAACCTACAGCAGCAAAACACCGCTCCTATTGTGGGGGCGTCAACAGCCAGGGAGCCTTACCTG
 GCATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCTTATTTGGGCCAAGATTCTCTACACAGATGG
 CAACTTTCACCCGTCTCCTTTAATGGGCGGCTTTGGACTTAAACATCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAA
 AACACTCCTGTTCTGCGGATCCTCCAACAACGTTCAACCAGGCCAAGCTGAATTCTTTCATCACGCAGT
 ACAGCACCGGACAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAAGCGCTGGAACCC
 AGAGATTAGTATACTTCCAATACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTTAATACTGAGGGTGTT
 TACTCTGAGCCTCGCCCCATTGGCACTCGTTACCTCACCCGTAATCTG

10

20

XXX-1 = AGA/AAA; XXX2 = AAC/AGC; XXX3 = GAC/GAG; XXX4 = ATC/GTC

【 0 1 3 0】

配列番号 1 1 : A n c 9 4 ポリペプチド

【 0 1 3 1】

【化 1 1】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKRRPVEPSPQSPDSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGEPAGPSGLSGTMAAGGGA
 PMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRIITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYST
 PWGYFDFNRHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSE
 YQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTFED
 VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLSQAGPX1NMSAQAKNWLPGPCYRQQ
 RVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSS
 VMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNTAPIVGAVNSQALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDG
 NFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnp
 EIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X1=S/N

【 0 1 3 2】

配列番号 1 2 : A n c 9 4 DNA

【 0 1 3 3】

【化 1 2】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGG
 ACTTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGCT
 TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGAGCCCGTCAACCGGCGGACGCA
 GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
 ACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGC
 AGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAG
 GCCAGCAGCCCGCGAAAAAGAGACTCAACTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTGCCCGACCCTCA
 ACCAATCGGAGAACCCCCCGCAGGCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCT
 CCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCA
 CATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTCCCCACCTACAACAACCACCT
 CTACAAGCAAATCTCCAACGGGACTTCGGGAGGAAGCACCACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACC
 CCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCA
 ACAACAATGGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTAC
 GCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGATTACAGTCTTTACGGACTCGGAA
 TACCAGCTCCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCA
 TGATTCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCCGTGGGCCGTTCTCTCTTCTACTG
 CCTGGAGTACTTTCTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTCAGCTACACGTTTGAGGAC
 GTGCCTTTTTCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAAAGCCTGGACCGGCTGATGAACCCCTCATCGACCAGT
 ACCTGTACTACCTGTCTCGGACTCAGTCCACGGGAGGTACCGCAGGAACCTCAGCAGTTGCTATTTTCTCA
 GGCCGGGCCTXXXAACATGTCTGGCTCAGGCCAAAACCTGGCTACCCGGGCCCTGCTACCGGCAGCAACGC
 GTCTCCACGACACTGTCGAAAATAACAACAGCAACTTTGCCTGGACCGGTGCCACCAAGTATCATCTGA
 ATGGCAGAGACTCTCTGGTAAATCCCGGTGTCGCTATGGCAACCCACAAGGACGACGAAGAGCGATTTTT
 TCCGTCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTT
 ATGCTAACAGTGAGGAAGAAATTAACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGGCCG
 ATAACCTGCAACAGCAAAACACCGCTCCTATTGTAGGGGCCGTCAACAGTCAAGGAGCCTTACCTGGCAT
 GGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCTTATCTGGGCCAAGATTCTCACACGGACGGAAAC
 TTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAACACCCGCTCCTCAGATCCTGATTAAAGAATA
 CACCTGTTCCCGCGGATCCTCCAACCTACCTTCAAGCTAAGCTGGCGTCGTTTCATCACGACGTACAG
 CACCGGACAGGTACGCGTGGAAATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGAACCCAGAG
 ATCAATACACTTCCAACCTACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTTAACACAGAAGGCACTTATT
 CTGAGCCTCGCCCCATCGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTG

10

20

XXX1 = AGT/AAT

【0 1 3 4】

配列番号 1 3 : A n c 1 1 3 ポリペプチド

【0 1 3 5】

【化 1 3】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPKYKYLGPFNGLDKGEPVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKRPVEX1SPQRSPDSSTGIGKKGQQPAX2KRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPSGVSGTMAAGG
 GAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSAGSTNDNTYFGYS
 TPWGYPDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFPRPKKLX3FKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQVFS
 SEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQSVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFESYTF
 EDVFPFHSSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYYLARTQSTTGGTAGNRELQFX4QAGPSTMAEQAKNWLPGPCY
 RQQRVSKTLDQNNNSNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDERFFPSSGVLI FGKTGAANKTTL
 ENVLMTX5EEEIKTTNPVATEEYGX6VSSNLQSX7NTAPQTQTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKI
 PHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 KRWNPEIQYTSNYDKSTNVDFAVDSEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X-1=P/Q; X-2=K/R; X-3=R/N; X-4=Y/H; X-5=N/S; X-6=V/I; X-7=A/S

【0 1 3 6】

配列番号 1 4 : A n c 1 1 3 DNA

【0 1 3 7】

【化 1 4】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACTCTCTGAGGGCATTGCGGAGTGGTGGG
 ACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCT
 TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCA
 GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
 ACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCAATTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGC
 AGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAAGAAGAGACCGGTAGAGXXX1TCACCTCAGCGTTCCCCCGACTCCTCCACGGGCATCGGCAAGAAA
 GGCCAGCAGCCCGCCXXX2AAGAGACTCAATTTGGGTGAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCCT
 CAACCTCTCGGAGAACCCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCG
 CACCAATGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTTC
 CACATGGCTGGGCGACAGAGTCATTACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCAC
 CTCTACAAGCAAATCTCCAGTCAAAGTGCAGGTAGTACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCC
 CCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAA
 CAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAAGCTGXXX3TTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTAC
 GACGAATGACGGCGTTACGACCATCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTTCAAGTATTCTCGGACTCGGAA
 TACCAGCTGCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCGGGCGGACGTCTTCA
 TGATTCTCAGTACGGCTACCTGACTCTCAACAATGGCAGTCAGTCTGTGGGACGTTCCTCCTTCTACTG
 CCTGGAGTACTTCCCCTCTCAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTAGCTACACCTTCGAGGAC
 GTGCCCTTTCCACAGCAGCTACGCACACAGCCAGAGCCTGGACCGGTGATGAATCCCTCATCGACCAGT
 ACTTGTACTACCTGGCCAGAACACAGAGTACCACAGGAGGCACAGCTGGCAATCGGGAACCTGCAGTTTXX
 X4CAGGCCGGGCTTCAACTATGGCCGAACAAGCCAAGAATTGGTTACCTGGACCTTGCTACCGGCAACA
 AAGAGTCTCCAAAACGCTGGATCAAAAACAACAACAGCAACTTTGCTTGGACTGGTGCCACCAATATCAC
 CTGAACGGCAGAACTCGTTGGTTAATCCCGGCGTCGCCATGGCAACTCACAAGGACGACGAGGACCGCT
 TTTTCCCATCCAGCGGAGTCTGATTTTTGGAAAACTGGAGCAGCTAACAAAACCTACATTGGAAAAATGT
 GTTAATGACAXXX5GAAGAAGAAATTAATACTACTAATCCTGTAGCCACGGAAGAATACGGGXXX6GTCA
 GCAGCAACTTACAATCGXXX7AATACTGCACCCAGACACAACTGTCAACAGCCAGGAGCCTTACCTG
 GCATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAGATTCTCACACGGATGG
 CAACCTTTCACCCGTCTCCTTTGATGGGCGGCTTTGGACTTAAACATCCGCCTCCTCAGATCCTGATCAAG
 AACACTCCCCTTCCCGCTAATCCTCCGGAGGTGTTTACTCCTGCCAAGTTTGCTTCGTTCATCACACAGT
 ACAGCACCGGACAAGTCAGCGTGGAAATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCC
 GGAGATTAGTACACCTCCAACCTATGATAAGTCGACTAATGTGGACTTTGCCGTTGACAGCGAGGGTGT
 TACTCTGAGCCTCGCCCTATTGGCACTCGTTACCTCACCCGTAATCTG

10

20

XXX1 = CCG/CAG; XXX2 = AAA/AGA; XXX3 = CGG/AAC; XXX4 = TAC/CAC; XXX5 =
 AAT/AGT; XXX6 = GTA/ATA; XXX7 = GCT/TCT

30

【0 1 3 8】

配列番号 1 5 : A n c 1 2 6 ポリペプチド

【0 1 3 9】

【化 1 5】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKGRPVEQSPQEPDSSSGIGKX1GQQPAX2KRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPAPPSGVGSNTMASGGG
 APMADNNEGADGVGNX3SGNWHCDSTWLGDRIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYST
 PWGYFDNFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRPKX4LNFKLFIQVKEVTNDGTTTIANNLTSTVQVFTDS
 EYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTX5FSYTF
 EDVPFHSSYAHSLDRLMNPLIDQYLYLX6RTQTTSQTAQNRELX7FSQAGPSSMX8NQAKNWLPGPC
 YRQQRVSKTANDNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDEDEKFFPMSGVLIFGKQGAGASNV
 DLDNVMITDEEEIKTTNPVATEQYGTVAATNLQSSNTAPATGTVNSQALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIP
 HTDGHFHPSPLMGFGFLKHPPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 RWNPEIQYTSNYSKX9NVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X1=S/T; X2=K/R; X3=A/S; X4=R/K; X5=T/Q; X6=S/N; X7=Q/L; X8=A/S; X9=A/T

【0 1 4 0】

配列番号 1 6 : A n c 1 2 6 DNA

【0 1 4 1】

【化 1 6】

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGG
 ACTTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGCT
 TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGATGCA
 GCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
 ACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGC
 AGTCTTCCAGGCCAAGAAGAGGGTTCTCGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGGTGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAAGAAACGTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGACTCCTCCTCGGGCATTGGCAAGXXX1GGC
 CAGCAGCCCCGCTXXX2AAGAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA
 CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAATGGCTTCAGGCGGTGGCGCAC
 CAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAATXXX3TCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCA
 CATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCACCTATAACAACCACCT
 CTACAAGCAAATCTCCAGTCAATCAGGGGCCAGCAACGACAACCACTACTTCGGCTACAGCACCCCTGG
 GGGTATTTTGTATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACA
 ATTGGGGATTCCGGCCCCAAGXXX4CTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTACGACGA
 ATGATGGCACCACGACCATCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCTTACGGACTCGGAGTACCA
 GTTGCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCGCGGCGGACGTGTTTCATGATT
 CCGCAGTACGGCTACCTAACGCTCAACAATGGCAGCCAGGACGTGGGACGGTCATCCTTTTACTGCCTGG
 AATATTTCCCATCGCAGATGCTGAGAACGGGCAATAACTTTXXX5TTCAGCTACACCTTCGAGGACGTGC
 CTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCT
 GTATTACCTGXXX6AGAACTCAGACTACGTCCGGAAGTGCCTAACAGGGAGTTGXXX7TTTAGCCAGG
 CGGGTCCATCTAGCATGXXX8AATCAGGCCAAAACCTGGCTACCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGCG
 TTTCTAAAACAGCAAATGACAACAACAACAGCAACTTTGCCTGGACTGGTGCTACAAAATATCACCTTAA
 TGGGCGTGATTCTTTAGTCAACCCTGGCCCTGCTATGGCCTCACACAAAGACGACGAAGACAAGTTCTTT
 CCCATGAGCGGTGTCTTGATTTTTTGGAAAGCAGGGCGCCGGAGCTTCAAACGTTGATTGGACAATGTCA
 TGATCACAGACGAAGAGGAAATCAAACCACTAACCCCGTGGCCACCGAACAATATGGGACTGTGGCAAC
 CAATCTCCAGAGCAGCAACACAGCCCCTGCGACCGGAAGTGTGAATTCTCAGGGAGCCTTACCTGGAATG
 GTGTGGCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTATTTGGGGCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACT
 TTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGACTTAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACAC
 GCCTGTTCTGCGAATCCTCCGACAACGTTTTTCGCCTGCAAAGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTATTCC
 ACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAA
 TACAGTATACATCTAACTATAATAATCTXXX9AACGTTGATTTCACTGTGGACACCAATGGAGTTTATA
 GTGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAACCTG

10

20

XXX1 = TCA/ACA; XXX2 = AAA/AGA; XXX3 = GCC/TCC; XXX4 = AGA/AAA; XXX5 =
 ACC/CAG; XXX6 = AGC/AAC; XXX7 = CAG/CTG; XXX8 = GCT/TCT; XXX9 =
 GCC/ACC

30

【 0 1 4 2】

配列番号 1 7 : A n c 1 2 7 ポリペプチド

【 0 1 4 3】

【化 1 7】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPQPKANQQHQDDX1RGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEAD
 AAALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTA
 PGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKSGQPAX2KRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVGSNTMASGGG
 APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTP
 WGYFDFNRHFCHFSRPDWQRLINNNWGFPRKX3LNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSE
 YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNF4FSYTFE
 DVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLX5RTQTTSGTTQQSRLX6FSQAGPSSMX7QQA8NWLPGPC
 YRQQRVSKTANDNNNSNFAWTX9ATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPMHGX10LIFGKQGTGA
 SNVDLDNVMITDEEEIRTNPVATEQYGTVATNLQSSNTAPATGTVNSQALPGMVWQDRDVYLQGPiWA
 KIPHTDGHFHSPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE
 NSKRWNPEIQYTSNYNKSXNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

X1=G/S; X2=R/K; X3=K/R; X4=T/Q; X5=S/R; X6=Q/L; X7=A/S; X8=K/R;
 X9=G/A; X10=V/N

【 0 1 4 4】

配列番号 1 8 : A n c 1 2 7 DNA

【 0 1 4 5】

50

【化 1 8】

ATGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTTTCTGAAGGCATTTCGTGAGTGGTGGG
 ATCTGAAACCTGGAGCCCCCTCAACCCAAAGCGAACCAACAACACCAGGACGACXXX1CGGGGTCTTGTGC
 TTCCGGGTTACAAATACCTCGGACCCTTTAACGGACTCGACAAAGGAGAGCCGGTCAACGAGGCGGACGC
 GGCAGCCCTCGAACACGACAAAGCTTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGTGACAACCCGTACCTCAAGTAC
 AACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTTCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTTGGCAGAG
 CAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGGTCTTGGCTCTGGTCTGGTTGAGGAAGCAGCTAAAACGGCTCC
 TGGAAAGAAGAGGCCCTGTAGAACAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCATCATCTGGTATTGGCAAATCGGGC
 CAACAGCCTGCCXXX2AAAAGACTAAATTTTCGGTCAGACTGGAGACTCAGAGTCAGTCCCAGACCCTCAA
 CCTCTCGGAGAACCACCAGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTAATACAATGGCTTCAGGCGGTGGCGCAC
 CAATGGCAGACAATAACGAGGGTGGCGATGGGTAATTCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCAC
 ATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCAGAACCTGGGCCCTGCCCCACTTACAACAACCATCTC
 TACAAGCAAATCTCCAGCCAATCAGGAGCTTCAAACGACAACCCTACTTTGGCTACAGCACCCTTGGG
 GGTAATTTTGAATTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATTAACAACAA
 CTGGGGATTCCGGCCCAAGXXX3CTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTTAAAGAGGTACGCAGAA
 CGATGGCAGCAGACTATTGCCAATAACCTTACCAGCAGCGTTCAAGTGTTTACGGACTCGGAGTATCAG
 CTCCCGTACGTGCTCGGGTTCGGCGCACCAAGGCTGTCTCCCGCCGTTTCCAGCGGACGTCTTCATGATCC
 CTCAGTATGGATACCTCACCTGAACAACGGAAGTCAAGCGGTGGGACGCTCATCTTTTACTGCCTGGA
 GTACTTCCCTTCGAGATGCTAAGGACTGGAAATAACTTCXXX4TTCAGCTATACCTTCGAGGATGTACC
 TTTTCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTTTGGATCGCTTGATGAATCCTCTTATTGATCAGTATCTG
 TACTACCTGXXX5AGAACGCAAACAACCTCTGGAACAACCCAAACAATCACGGCTGXXX6TTTAGCCAGGC
 TGGGCCCTTCGTCTATGXXX7CAGCAGGCCXXX8AATTGGCTACCTGGGCCCTGCTACCGGCAACAGAGAG
 TTTCAAAGACTGCTAACGACAACAACAACAGTAACCTTTGCTTGGACAXXX9GCCACCAAATATCATCTCA
 ATGGCCGCGACTCGCTGGTGAATCCAGGACCAGCTATGGCCAGTCACAAGGACGATGAAGAAAAATTTTT
 CCCTATGCACGGCXXX10CTAATATTTGGCAAACAAGGGACAGGGGCAAGTAACGTAGATTTAGATAATG
 TAATGATTACGGATGAAGAAGAGATTCTGACCACCAATCCTGTGGCAACAGAGCAGTATGGAACGTGGC
 AACTAACTTGCAGAGCTCAAATACAGCTCCCGCGACTGGAAGTGTCAATAGTCAGGGGGCCTTACCTGGC
 ATGGTGTGGCAAGATCGTGACGTGTACCTTCAAGGACCTATCTGGGCAAAGATTCCTCACACGGATGGAC
 ACTTTCATCCTTCTCCTCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAACATCCGCTCCTCAAATCTTGATCAAAAA
 TACTCCGGTACCGGCAAATCCTCCGACGACTTTCAGCCCGGCCAAGTTTGCTTCATTTATCACTCAGTAC
 TCCACTGGACAGGTACGCGTGGAAATTGAGTGGGAGCTACAGAAAGAAAACAGCAAACGTTGGAATCCAG
 AGATTAGTACACTTCCAACATAACAAGTCTGTTAATGTGGACTTTACTGTAGACACTAATGGTGTTTA
 TAGTGAACCTCGCCCTATTGGAACCCGGTATCTCACACGAACTTG

10

20

XXX-1 = GGT/AGT; XXX2 = AGA/AAA; XXX3 = AAA/AGA; XXX4 = ACA/CAG; XXX5
 = AGC/AGA; XXX6 = CAA/CTC; XXX7 = GCT/TCT; XXX8 = AAA/AGA; XXX9 =
 GGG/GCG; XXX10 = GTT/GAC

30

【0 1 4 6】

配列番号 19 : L 0 0 2 7 ポリペプチド

【0 1 4 7】

【化 1 9】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPSGVGSNTMAAGGGAP
 MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW
 GYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTNDGTTTIANNNLTSTVQVFTDSEYQ
 LPYVLGSAHQGCLPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFEFSYTFEDVP
 FHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTQTTSGTAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS
 KTANQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLNVNPGPAMATHKDDDEDKFFPMSGVLI FGKQGAGNSNVLDLNVMI
 TNEEEIKTTNPVATEQYGTVAATNLQSANTAPATGTVNSQALPGMVWQDRDVYLQGPWIWAKI PHTDGHFH
 PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
 YTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

【0 1 4 8】

配列番号 20 : L 0 0 5 9 ポリペプチド

【0 1 4 9】

【化 2 0】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVGSNTMAAGGGAP
MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW
GYFDFNRHFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ
LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTFEDVP
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTSGTAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS
KTANQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMATHKDDDEDKFFPMSGVLI FGKQGAGNSNVDLDNVM
TNEEEIKTTNPVATEEQYGT VATNLQSANTAPATGTVNSQGALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFH
PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
YTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

【0 1 5 0】

配列番号 2 1 : L 0 0 6 0 ポリペプチド

【0 1 5 1】

【化 2 1】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVGSNTMAAGGGAP
MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW
GYFDFNRHFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ
LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTFEDVP
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTSGTAGNRELQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS
KTTNQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMATHKDDDEDKFFPMSGVLI FGKQGAGNSNVDLDNVM
TSEEEIKTTNPVATEEYGT VATNLQSSNTAPATGTVNSQGALPGMVWQERDVYLQGP IWAKI PHTDGHFH
PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
YTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

20

【0 1 5 2】

配列番号 2 2 : L 0 0 6 2 ポリペプチド

【0 1 5 3】

【化 2 2】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVGSNTMASGGGAP
MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW
GYFDFNRHFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ
LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTFEDVP
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTSGTAGNRELQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS
KTTNQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMATHKDDDEDKFFPMSGVLI FGKQGAGNSNVDLDNVM
TSEEEIKTTNPVATEEYGT VATNLQSANTAPATGTVNSQGALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFH
PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
YTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

30

【0 1 5 4】

配列番号 2 3 : L 0 0 6 5 ポリペプチド

【0 1 5 5】

40

【化 2 3】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPAPPSGVGSNTMAAGGGAP
MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW
GYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKKLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQ
LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFQFSYTFEDVP
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSAGTNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS
KTTNQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMATHKDDKFFPMSGVLI FGKQGAGNSNVDLDNVM
TNEEEIKTTNPVATEEYGTATNLQSANTAPATGTVNSQAGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKI PHTDGHFH
PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
YTSNKNSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

【0 1 5 6】

配列番号 24 : L 0 0 3 3 ポリペプチド

【0 1 5 7】

【化 2 4】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPAPPSGVGSNTMAAGGGAP
MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW
GYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKKLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQ
LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFQFSYTFEDVP
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSAGTNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS
KTANQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMATHKDDKFFPMSGVLI FGKQGAGNSNVDLDNVM
TSEEEIKTTNPVATEEYGTATNLQSSNTAPATGTVNSQAGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKI PHTDGHFH
PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
YTSNKNSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

20

【0 1 5 8】

配列番号 25 : L 0 0 3 6 ポリペプチド

【0 1 5 9】

【化 2 5】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPAPPSGVGSNTMASGGGAP
MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW
GYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKKLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQ
LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFQFSYTFEDVP
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSAGTNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS
KTANQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMATHKDDKFFPMSGVLI FGKQGAGNSNVDLDNVM
TSEEEIKTTNPVATEEYGTATNLQSSNTAPATGTVNSQAGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKI PHTDGHFH
PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
YTSNKNSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

30

【0 1 6 0】

配列番号 26 : L 0 0 4 4 ポリペプチド

【0 1 6 1】

40

【化 2 6】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
 GKRRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPSGVGSNTMASGGGAP
 MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW
 GYFDNFNRHCHFSRWDWQRLINNNWGFRRPKKLNFKLFNIQVKEVTNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQ
 LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVP
 FHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTQTTSAGTGNRELQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS
 KTTNQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMATHKDDKFFPMSGVLI FGKQGAGNSNVDLDNVM
 TNEEEIKTTNPVATEQYGT VATNLQSANTAPATGT VNSQ GALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFH
 PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNT PVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ
 YTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

【0 1 6 2】

配列番号 2 7 : A A V 8 V P 1 ポリペプチド

【0 1 6 3】

配列番号 2 8 : A A V 9 V P 1 ポリペプチド

【0 1 6 4】

配列番号 2 9 : A A V 6 V P 1 ポリペプチド

【0 1 6 5】

配列番号 3 0 : A A V 1 V P 1 ポリペプチド

【0 1 6 6】

配列番号 3 1 : A A V 2 V P 1 ポリペプチド

【0 1 6 7】

配列番号 3 2 : A A V 3 V P 1 ポリペプチド

【0 1 6 8】

配列番号 3 3 : A A V 3 B V P 1 ポリペプチド

【0 1 6 9】

配列番号 3 4 : A A V 7 V P 1 ポリペプチド

20

【図 1】

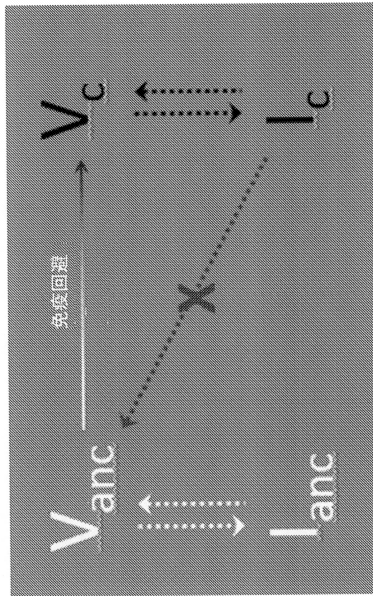


図 1

【図 2】

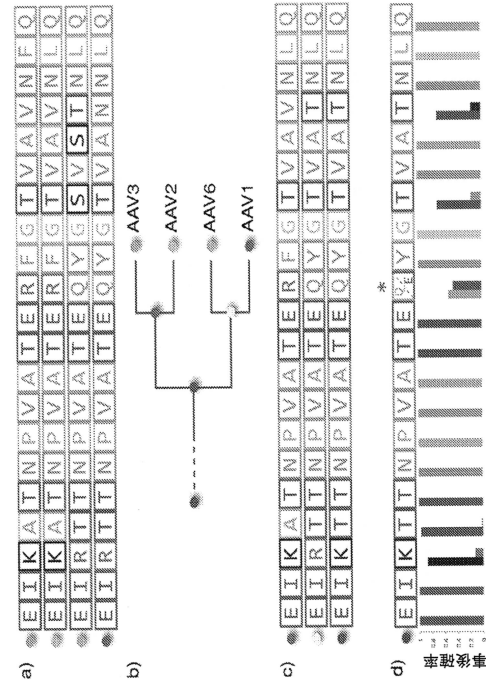


図 2

【図 3】

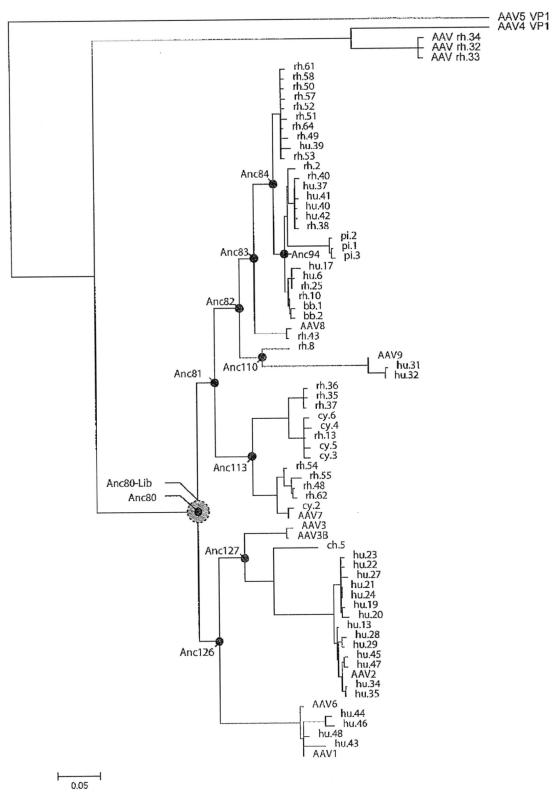


図 3

【図 4】

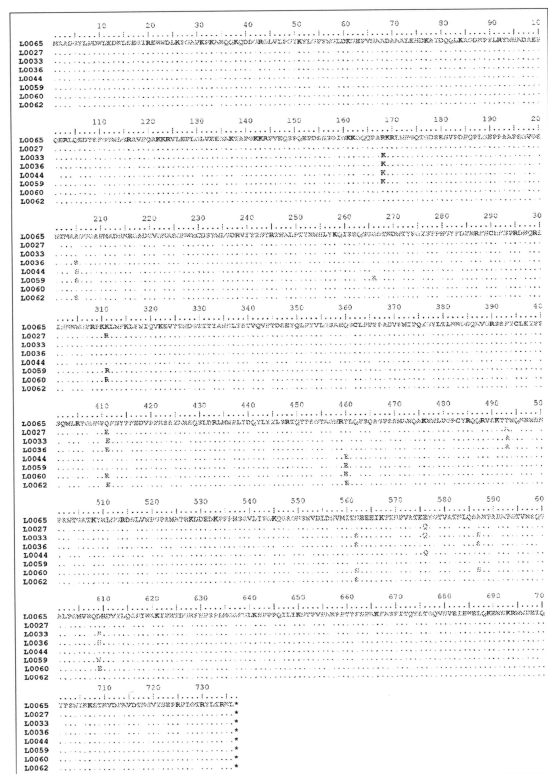


図 4

【図 5 A】

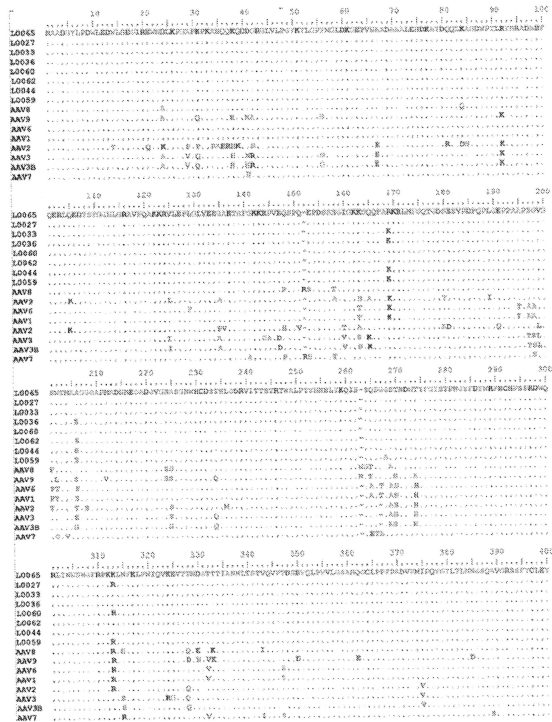


図 5A

【図 5 B】

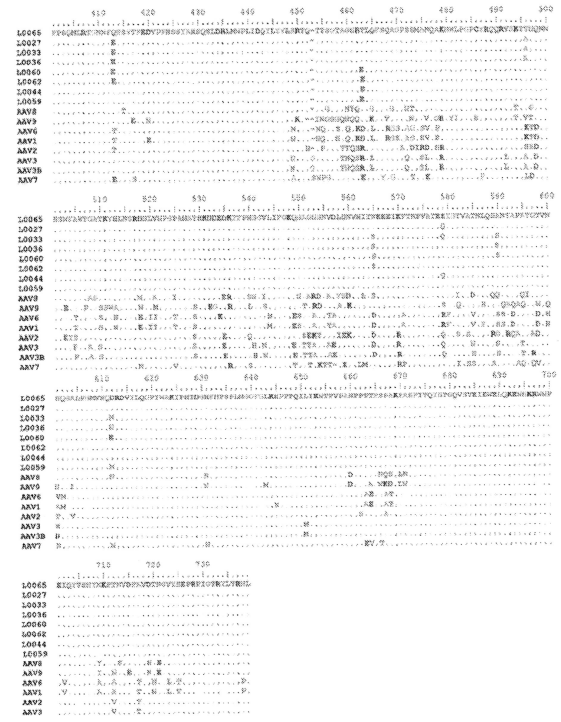


図 5B

【図 6】

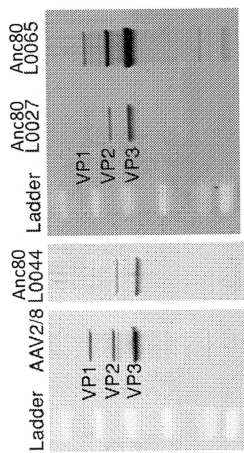


図 6

【図 7】

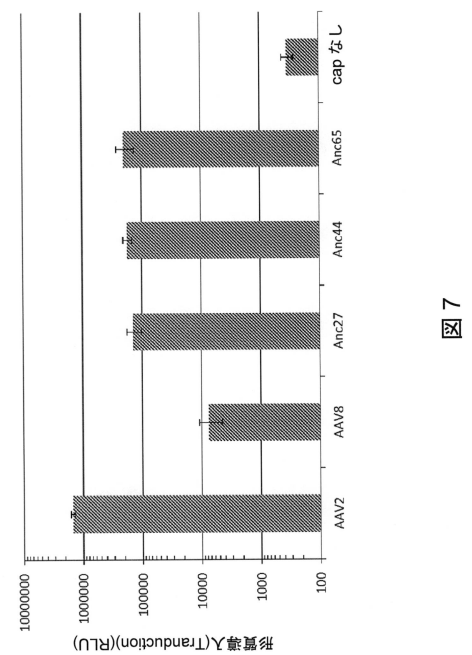


図 7

【図 1 1 B】

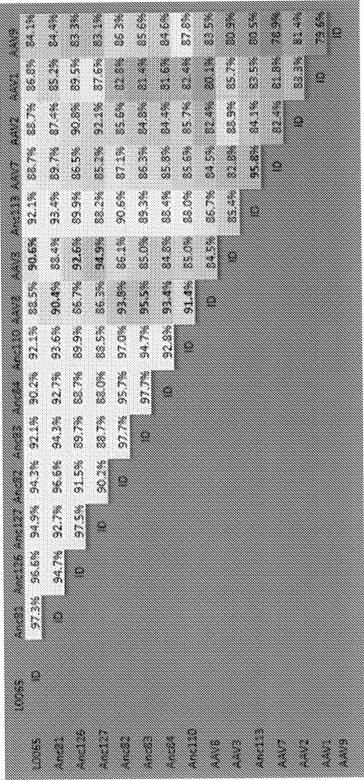


図 11B

【図 1 2】

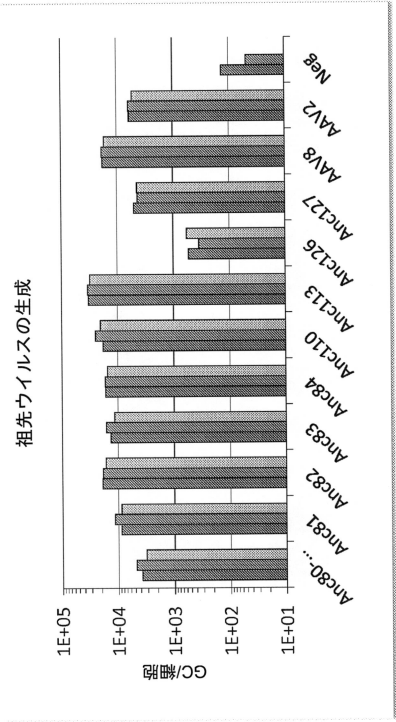


図 12

【図 1 3】

AAV8 に対するウイルス生成(%)	
Anc80-L0065	21.75%
Anc81	54.14%
Anc82	100.99%
Anc83	76.86%
Anc84	91.20%
Anc110	118.97%
Anc113	183.10%
Anc126	2.71%
Anc127	25.34%
AAV2	32.56%
Neg	0.27%

図 13

【図 1 4】

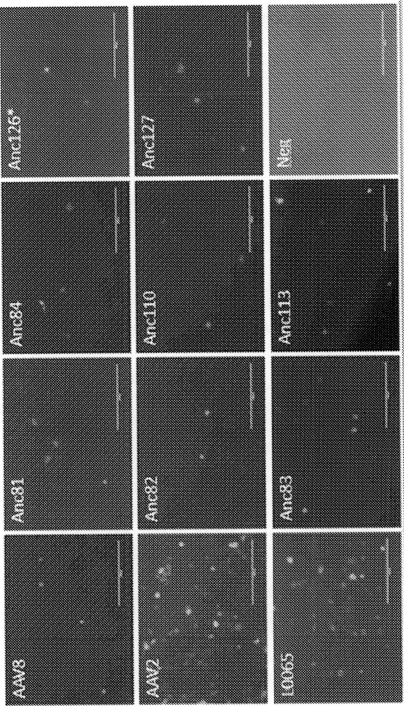


図 14

【図 1 5】

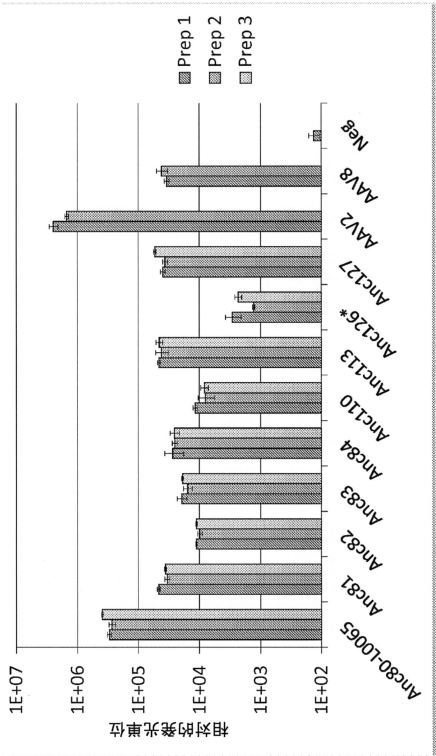


図 15

【図 1 6】

AAV8 に対するウイルス感染力(%)	
Anc80-L0065	850.83%
Anc81	102.26%
Anc82	28.31%
Anc83	47.36%
Anc84	68.78%
Anc110	24.56%
Anc113	117.12%
Anc127	113.78%
AAV2	5225.61%
Neg	0.35%

図 16

【図 1 7】

感染力 生成	AAV8	AAV2	Anc80-L0065	Anc81	Anc82	Anc83	Anc84	Anc10	Anc113	Anc126	Anc127
+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++
++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: 決定していない

図 17

【配列表】

0006552511000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N	7/02	(2006.01)	C 1 2 N 7/02
C 1 2 N	7/01	(2006.01)	C 1 2 N 7/01
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00

(74)代理人 100120134
弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 バンデンベルグ, ルク エイチ.
アメリカ合衆国 0 2 1 1 4 マサチューセッツ州, ボストン, スタニフォード ストリート 2
0

(72)発明者 ジン, エリック
アメリカ合衆国 0 2 1 1 4 マサチューセッツ州, ボストン, スタニフォード ストリート 2
0

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特表2007-507223 (JP, A)
特表2007-500518 (JP, A)
PNAS, 2005年, vol.102, no.30, p.10557-10562
Bioinformatics, 2011年, vol.27, no.8, p.1164-1165
J. Mol. Evol., 1994年, vol.39, p.519-527
Mol. Biol. Evol., 1993年, vol.10, no.6, p.1396-1401

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 9
C 0 7 K 1 4 / 0 7 5 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m
I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / W P I D S / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
S w i s s P r o t / G e n e S e q