

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-508968
(P2025-508968A)

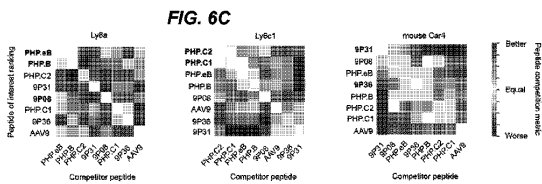
(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02	4 B 0 6 4	
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	4 B 0 6 5	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 7 6
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	4 C 0 8 4	
C 0 7 K	14/015 (2006.01)	C 0 7 K	14/015	4 C 0 8 5	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全107頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-552193(P2024-552193)		(71)出願人	305053547	
(86)(22)出願日	令和5年3月2日(2023.3.2)			カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー	
(85)翻訳文提出日	令和6年10月28日(2024.10.28)			アメリカ合衆国 9 1 1 2 5 カリフォルニア、パサデナ、 イースト カリフォルニア プールバード 1 2 0 0 エムシー 2 1 0 - 8 5	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/063571				
(87)国際公開番号	WO2023/168333		(74)代理人	100078282	
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)			弁理士 山本 秀策	
(31)優先権主張番号	63/316,298		(74)代理人	100113413	
(32)優先日	令和4年3月3日(2022.3.3)			弁理士 森下 夏樹	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(74)代理人	100181674	
(31)優先権主張番号	63/359,168			弁理士 飯田 貴敏	
(32)優先日	令和4年7月7日(2022.7.7)		(74)代理人	100181641	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士 石川 大輔	
(31)優先権主張番号	63/480,279				
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 血液脳関門を横断するための組成物および方法

(57)【要約】

本明細書では、B B B界面上の新規血液脳関門 (B B B) 通過型受容体、新規受容体に結合することができる標的化ペプチドおよびその誘導体、ならびにB B Bの透過性を増加させ、作用物質を神経系 (例えば、C N S) に送達するために受容体を使用する関連方法が開示される。いくつかの実施形態では、B B B通過型受容体は、炭酸脱水酵素I Vである。本明細書には、B B Bならびに様々な疾患および症状を処置する関連組成物および方法にわたって増加した特異性および形質導入効率を有する組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) も開示される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

前記血液脳関門の透過性を増加させる方法であって、

炭酸脱水酵素 I V に結合することができ、それによって前記血液脳関門の透過性を増加させることができる標的化ペプチドを提供することを含む、方法。

【請求項 2】

前記炭酸脱水酵素 I V の少なくとも 1 つの活性が、標的化ペプチドへの結合によって減少する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記血液脳関門の透過性を増加させる方法であって、

炭酸脱水酵素 I V 活性を低下させ、それによって前記血液脳関門の透過性を増加させることを含む、方法。

【請求項 4】

前記標的化ペプチドが、前記炭酸脱水酵素 I V の亜鉛結合部位および / または疎水性基質結合ポケットに結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記血液脳関門の前記透過性が、標的ペプチドの非存在または炭酸脱水酵素 I V 活性の減少と比較して、少なくとも 25 %、50 %、75 %、100 % またはそれを超えて増加する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ペイロードを神経系に送達する方法であって、前記方法が、

炭酸脱水酵素 I V またはその誘導体に結合することができる標的化ペプチドを提供することであって、前記標的化ペプチドが送達系の一部であり、前記送達系が、神経系に送達される前記ペイロードを含む、炭酸脱水酵素 I V またはその誘導体に結合することができる標的化ペプチドを提供することと、

前記送達系を、前記対象に投与することと
を含む、方法。

【請求項 7】

前記送達系が、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノワイヤ、デンドリマー、リポソーム、エトソームおよびアクアソーム、ポリマーソームおよびニオソーム、フォーム、ヒドロゲル、キューボソーム、量子ドット、エキソソーム、マクロファージ、ならびにそれらの組み合わせを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記送達系が、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、AAV ベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターを含み、必要に応じて、前記標的ペプチドが、AAV ベクターのカプシドタンパク質の一部である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 AAV ベクターが、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 3b、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV - DJ、ヒト分離株 hu . 31、ヒト分離株 hu . 32、アカゲザル分離株 rh . 8、アカゲザル分離株 rh . 10、およびそのバリエーションからなる群から選択されるベクターである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記非ウイルスベクターが、脂質ベースのナノ粒子、ポリマーナノ粒子、無機ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、ナノワイヤ、シリカナノ粒子、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子、脂質ポリマー粒子、ナノリポタンパク質粒子、およびそれらの組み合わせを含む、請求項 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 12】

神経系に送達される前記ペイロードが、生物学的分子、非生物学的分子、またはそれらの組み合わせであり、必要に応じて、前記生物学的分子が、核酸配列、タンパク質、ペプチド、脂質、多糖、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 5 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ペイロードが、治療用分子である、請求項 5 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

神経系に送達される前記核酸配列が、

- a) 形質導入された細胞から放出され、その細胞および/または周囲の細胞の生存もしくは機能に影響を及ぼし得る栄養因子、成長因子、または他の可溶性因子；
 - b) その遺伝子に遺伝子突然変異を持つヒトまたは動物にタンパク質機能を回復させる cDNA；
 - c) 細胞の活性または状態を制御または改変するために使用され得るタンパク質をコードする cDNA；
 - d) 細胞の状態を評価するために使用されるタンパク質または核酸をコードする cDNA；
 - e) ゲノム操作を行うための cDNA および/または関連ガイド RNA；
 - f) 相同組換えによるゲノム編集のための配列；
 - g) 治療用 RNA をコードする DNA 配列；
 - h) shRNA または人工 miRNA 送達系；あるいは
 - i) 内因性遺伝子のスプライシングに影響を及ぼす DNA 配列の 1 または複数を含む、
- 請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記炭酸脱水酵素 I V が、マウス炭酸脱水酵素 I V であり、必要に応じて、前記炭酸脱水酵素 I V が、配列番号 179 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記炭酸脱水酵素 I V が、ヒト炭酸脱水酵素 I V であり、必要に応じて、前記炭酸脱水酵素 I V が、配列番号 180 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記標的化ペプチドが、結合すると、(1) 配列番号 179 のアミノ酸配列を有する前記炭酸脱水酵素 I V における S20、G21、W22、L36、W41、P42、E90、V111、Q112、H114、H139、V141、K143、F156、L217、T218、T219、P220、N221、D223 もしくは W228 と機能的に等価な 1 もしくはそれを超える位置、または (2) 配列番号 180 のアミノ酸配列を有する前記炭酸脱水酵素 I V における S21、H22、W23、L37、W42、G43、M92、K113、Q114、H116、H141、V143、E145、Q158、L224、T225、T226、P227、T228、D231 もしくは W236 と機能的に等価な 1 もしくはそれを超える位置と相互作用することができる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記標的化ペプチドが、(1) 配列番号 70 ~ 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または (2) 配列番号 70 ~ 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、必要に応じて、前記標的化ペプチドが、配列番号 70 ~ 108 から選択されるアミノ酸配列を含み、更に必要に応じて、前記標的化ペプチドが、配列番号 70 ~ 86 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記標的化ペプチドが、(1) A K P T P L L G L L Q A Q T G (配列番号70)、A K P T P L L L L L Q A Q T G (配列番号71)、A Q P P L G G L L A Q A Q T G (配列番号72)、A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号73)、およびA Q P P L L G G L A Q A Q T G (配列番号74)からなる群から選択されるアミノ酸配列、または(2)配列番号70~74からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1~18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記標的化ペプチドが、前記A A V 9ベクターの配列番号178のA A 5 8 7 ~ 5 9 4、または配列番号178と少なくとも80%同一のアミノ酸配列におけるA A 5 8 7 ~ 5 9 4の機能的等価物における2つの隣接するアミノ酸の間に挿入される、請求項9~19のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項21】

前記標的化ペプチドが、前記A A V 9ベクターの配列番号178のA A 5 8 8 ~ 5 8 9、または配列番号178と少なくとも80%同一のアミノ酸配列におけるA A 5 8 8 ~ 5 8 9の機能的等価物の間に挿入される、請求項9~20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記A A Vベクターが、ナノ粒子、第2の分子、またはそれらの組み合わせにコンジュゲートされる、請求項9~21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記投与が全身投与であり、必要に応じて、前記投与が静脈内投与または髄腔内投与である、請求項5~22のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項24】

前記対象が哺乳動物であり、必要に応じて、前記対象がヒトである、請求項5~23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記対象が、慢性疼痛、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病(HD)、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、脊髄性筋萎縮症I型およびII型(SMA IおよびII)、フリードライヒ運動失調症(FA)、脊髄小脳失調症、多発性硬化症(MS)、慢性外傷性脳症(CTE)、HIV-1関連認知症、またはCNS内の細胞が関与するリソソーム蓄積障害の1または複数を持っているまたは発症するリスクがある対象であり、必要に応じて、前記CNS内の細胞が関与するリソソーム蓄積障害が、クラッペ病、サンドホフ病、テイ・サックス病、ゴーシェ病(I、IIまたはIII型)、ニーマン・ピック病(NPC1またはNPC2欠乏症)、ハーラー症候群、ボンベ病、またはバッテン病である、請求項5~24のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項26】

前記対象が、脳卒中、外傷性脳損傷、てんかん、または脊髄損傷に罹患している、発症するリスクがある、または罹患したことがある対象である、請求項5~24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

炭酸脱水酵素IVに対する結合特異性を有する標的化ペプチドを含む、アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質。 40

【請求項28】

前記標的化ペプチドが、前記r A A Vベクターのカプシドタンパク質の一部である、請求項27に記載のA A Vカプシドタンパク質。

【請求項29】

前記標的化ペプチドが、配列番号178のA A 5 8 7 ~ 5 9 4、または配列番号178と少なくとも80%同一のアミノ酸配列におけるA A 5 8 7 ~ 5 9 4の機能的等価物における2つの隣接するアミノ酸の間に挿入される、請求項27または28に記載のA A Vカプシドタンパク質。 50

【請求項 30】

前記標的化ペプチドが、(1) 配列番号 70 ~ 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列、(2) 配列番号 70 ~ 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 27 ~ 29 のいずれか一項に記載の AAV カプシドタンパク質。

【請求項 31】

前記 AAV が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-DJ、ヒト分離株 hu.31、ヒト分離株 hu.32、アカゲザル分離株 rh.8、アカゲザル分離株 rh.10、およびそのバリエーションからなる群から選択されるベクターである、請求項 27 ~ 30 のいずれか一項に記載の AAV カプシドタンパク質。 10

【請求項 32】

請求項 27 ~ 31 のいずれか一項に記載の AAV カプシドタンパク質を含む、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV)。

【請求項 33】

炭酸脱水酵素 IV に対する結合特異性を有する標的化ペプチドを含む AAV カプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) であって、前記標的化ペプチドのアミノ酸配列が、前記 AAV カプシドタンパク質の AA587 ~ 594 またはその機能的等価物における 2 つの隣接するアミノ酸の間に挿入される、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV)。 20

【請求項 34】

前記 2 つの隣接するアミノ酸が、AA588 および AA589 である、請求項 33 に記載の rAAV。

【請求項 35】

前記標的化ペプチドが、(1) 配列番号 70 ~ 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または (2) 配列番号 70 ~ 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 33 または 34 に記載の rAAV。

【請求項 36】

神経系への作用物質の送達を必要とする対象の神経系への作用物質の送達における使用のための組成物であって、(1) 請求項 27 ~ 31 のいずれか一項に記載の AAV カプシドタンパク質と、(2) 前記対象の前記神経系に送達される作用物質とを含む AAV を含み、必要に応じて、前記神経系が、中枢神経系 (CNS)、末梢神経系 (PNS)、またはそれらの組み合わせである、組成物。 30

【請求項 37】

前記神経系が、脳内皮細胞、ニューロン、脳内の毛細血管、脳内の細動脈、脳内の動脈、またはそれらの組み合わせである、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記組成物が、1 または複数の薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物である、請求項 36 ~ 37 のいずれか一項に記載の組成物。 40

【請求項 39】

送達される前記作用物質が、核酸、ペプチド、小分子、アプタマー、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 36 ~ 38 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 40】

抗体またはそのフラグメントであって、炭酸脱水酵素 IV に対する結合特異性を有するアミノ酸配列を含む、抗体またはそのフラグメント。

【請求項 41】

(1) 配列番号 70 ~ 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または (2) 配列番号 70 ~ 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 40 に記載の抗体またはそのフラグメント。 50

【請求項 4 2】

前記抗体またはそのフラグメントが、前記炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有する少なくとも 1 つの F a b を含む二重特異性抗体である、請求項 4 0 または 4 1 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4 3】

請求項 4 0 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の抗体またはそのフラグメントを含む抗体コンジュゲートであって、治療剤または検出可能な標識を更に含む、抗体コンジュゲート。

【請求項 4 4】

炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有する、ペプチドまたはその誘導体もしくはコンジュゲート。

10

【請求項 4 5】

請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれかに記載の抗体もしくはそのフラグメント、または請求項 4 4 記載のペプチドもしくはその誘導体またはコンジュゲートをコードする配列を含む、核酸。

【請求項 4 6】

(1) 炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有する標的化ペプチドと、(2) 作用物質と、を含む、送達系。

【請求項 4 7】

前記標的化ペプチドが、(1) 前記送達系の表面に提示されるか、または(2) 前記送達系に部分的に埋め込まれている、請求項 4 6 に記載の送達系。

20

【請求項 4 8】

前記送達系が、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノワイヤ、 dendrimer、リポソーム、エトソームおよびアクアソーム、ポリマーソームおよびニオソーム、フォーム、ヒドロゲル、キューボソーム、量子ドット、エキソソーム、マクロファージ、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 6 または 4 7 に記載の送達系。

【請求項 4 9】

前記送達系が、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを含む、請求項 4 6 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の送達系。

【請求項 5 0】

前記送達系が、脂質ベースのナノ粒子、ポリマーナノ粒子、無機ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、ナノワイヤ、シリカナノ粒子、ウイルス様粒子、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子、脂質ポリマー粒子、ナノリポタンパク質粒子、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるナノ粒子を含む、請求項 4 6 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の送達系。

30

【請求項 5 1】

炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有する標的化ペプチドを設計する方法であって、

(1) 配列番号 1 7 9 のアミノ酸配列を有する前記炭酸脱水酵素 I V における S 2 0、G 2 1、W 2 2、L 3 6、W 4 1、P 4 2、E 9 0、V 1 1 1、Q 1 1 2、H 1 1 4、H 1 3 9、V 1 4 1、K 1 4 3、F 1 5 6、L 2 1 7、T 2 1 8、T 2 1 9、P 2 2 0、N 2 2 1、D 2 2 3 もしくは W 2 2 8 と機能的に等価な 1 もしくはそれを超える位置、または (2) 配列番号 1 8 0 のアミノ酸配列を有する前記炭酸脱水酵素 I V における S 2 1、H 2 2、W 2 3、L 3 7、W 4 2、G 4 3、M 9 2、K 1 1 3、Q 1 1 4、H 1 1 6、H 1 4 1、V 1 4 3、E 1 4 5、Q 1 5 8、L 2 2 4、T 2 2 5、T 2 2 6、P 2 2 7、T 2 2 8、D 2 3 1 もしくは W 2 3 6 と機能的に等価な 1 もしくはそれを超える位置とそれぞれ相互作用することができる、1 または複数の標的化ペプチドを *in silico* で生成することを含む、方法。

40

【請求項 5 2】

前記 1 または複数の標的化ペプチドを *in silico* で生成することが、

in silico で複数の候補ペプチドを生成することと、

前記炭酸脱水酵素 I V に結合する前記複数の候補ペプチドの各々についてコンピュータ

50

支援ドッキングシミュレーションを実行することと、

(1) 配列番号 1 7 9 のアミノ酸配列を有する前記炭酸脱水酵素 I V における S 2 0 、 G 2 1 、 W 2 2 、 L 3 6 、 W 4 1 、 P 4 2 、 E 9 0 、 V 1 1 1 、 Q 1 1 2 、 H 1 1 4 、 H 1 3 9 、 V 1 4 1 、 K 1 4 3 、 F 1 5 6 、 L 2 1 7 、 T 2 1 8 、 T 2 1 9 、 P 2 2 0 、 N 2 2 1 、 D 2 2 3 もしくは W 2 2 8 と機能的に等価な 1 または複数の位置、または (2) 配列番号 1 8 0 のアミノ酸配列を有する前記炭酸脱水酵素 I V における S 2 1 、 H 2 2 、 W 2 3 、 L 3 7 、 W 4 2 、 G 4 3 、 M 9 2 、 K 1 1 3 、 Q 1 1 4 、 H 1 1 6 、 H 1 4 1 、 V 1 4 3 、 E 1 4 5 、 Q 1 5 8 、 L 2 2 4 、 T 2 2 5 、 T 2 2 6 、 P 2 2 7 、 T 2 2 8 、 D 2 3 1 もしくは W 2 3 6 と機能的に等価な 1 または複数の位置と相互作用することができる、 1 または複数の標的化ペプチドを同定するために、 1 または複数の前記複数の候補ペプチドに結合する前記炭酸脱水酵素 I V の構造を分析することと、を含む、請求項 5 1 に記載の方法。 10

【請求項 5 3】

前記炭酸脱水酵素 I V に結合する前記複数の候補ペプチドの各々についての結合スコアを得ることと、

閾値を超える結合スコアを有する 1 または複数の前記複数の候補ペプチドを、前記炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有する標的化ペプチドとして選択することとを含む、請求項 5 1 または 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

2 またはそれを超える前記複数の候補ペプチドの前記結合スコアを比較して、前記候補ペプチド配列をランク付けすることを含む、請求項 5 3 に記載の方法。 20

【請求項 5 5】

前記複数の候補ペプチド配列の各々について前記結合スコアを得ることが、(1) 候補ペプチドと前記炭酸脱水酵素 I V との前記界面における原子の総数をカウントすることと、(2) 前記候補ペプチド中の原子の総数をカウントすることとであって、前記原子が前記炭酸脱水酵素 I V と衝突している、前記候補ペプチド中の原子の総数をカウントすることと、(3) 前記候補ペプチドの結合角を得ることと、(4) 前記候補ペプチドの結合深度を得ることと、を含む、請求項 5 3 または 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

マウス種における前記血液脳関門の透過性を増加させる方法であって、L y 6 c 1 に結合することができる標的化ペプチドを提供し、それにより、前記マウス種における前記血液脳関門の透過性を増加させることを含む、方法。 30

【請求項 5 7】

前記標的化ペプチドが、(1) A Q R Y Q G D S V A Q (配列番号 7) 、 A Q W S T N A G Y A Q (配列番号 8) 、 A Q E R V G F A Q A Q (配列番号 9) 、 A Q W M T H G S A A Q (配列番号 1 0) 、および S P R Y K G D S V A Q (配列番号 5 7) からなる群から選択されるアミノ酸配列、または (2) A Q R Y Q G D S V A Q (配列番号 7) 、 A Q W S T N A G Y A Q (配列番号 8) 、 A Q E R V G F A Q A Q (配列番号 9) 、 A Q W M T H G S A A Q (配列番号 1 0) および S P R Y K G D S V A Q (配列番号 5 7) からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 5 6 に記載の方法。 40

【請求項 5 8】

前記標的化ペプチドが、S P R Y K G D S V A Q (配列番号 5 7) のアミノ酸配列、または配列番号 5 7 と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記標的化ペプチドが、配列番号 1 7 8 の A A 5 8 7 ~ 5 9 0 、または配列番号 1 7 8 と少なくとも 8 0 % 同一のアミノ酸配列における A A 5 8 7 ~ 5 9 0 の機能的等価物における 2 つの隣接するアミノ酸の間に挿入される、請求項 5 7 または 5 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2022年3月3日に出願された米国仮特許出願第63/316,298号、2022年7月7日に出願された米国仮特許出願第63/359,168号、および2023年1月17日に出願された米国仮特許出願第63/480,279号に基づく米国特許法第119条(e)項の下での利益を主張する。これらの関連出願の内容は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けたR & Dに関する声明

10

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号NS111369の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

配列表の参照

本出願は、電子形式の配列表と共に提供されている。配列表は、サイズが258キロバイトである、2023年3月2日に作成された30KJ-302459-WO-SeqListという名称のファイルとして提供される。配列表の電子形式の情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

20

背景
分野

本開示は、血液脳関門を横断するための方法および標的化ペプチドに関する。

【0005】

関連技術分野の説明

血液脳関門(BBB)は、中枢神経系(CNS)のための効果的な研究ツールおよび治療薬の開発に対する基本的なボトルネックを呈する。主に脳内皮細胞を含むこの構造は、侵襲的頭蓋内注射、技術的に困難な集束超音波、または受容体媒介トランスサイトosisによって送達される大きな分子を必要とする。BBB通過型大型分子の合理的な設計は、トランスサイトosisに関与する機構の不完全な理解によって、長い間妨げられてきたが、研究および治療のために検証されたトランスフェリン受容体等の少数の標的しかない。

30

【0006】

したがって、CNSに対する研究ツールおよび治療の効率を改善するために、BBB通過型標的、機構、分子および方法の同定が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

要旨

本明細書では、血液脳関門の透過性を増加させる方法が開示される。本方法は、いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素IVに結合することができる標的化ペプチドを提供し、それによって血液脳関門の透過性を増加させることを含む。いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素IVの少なくとも1つの活性は、標的化ペプチドへの結合によって減少する。血液脳関門の透過性を増加させる方法も提供される。本方法は、いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素IV活性を低下させ、それによって血液脳関門の透過性を増加させることを含む。本明細書に開示される方法では、標的化ペプチドは、例えば、炭酸脱水酵素IVの亜鉛結合部位および/または疎水性基質結合ポケットに結合することができる。いくつかの実施形態では、血液脳関門の透過性は、標的(target)ペプチドの非存在または炭酸脱水酵素IV活性の減少と比較して、少なくとも25%、50%、75%、100%またはそれを超えて増加する。ペイロードを神経系に送達する方法も本明細書で提供される。本方法は、いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素IVまたはその誘導体に結合する

40

50

ことができる標的化 (t a r g e t t i n g) ペプチドを提供することであって、標的化ペプチドが送達系の一部であり、送達系が、神経系に送達されるペイロードを含む、炭酸脱水酵素ⅠⅤまたはその誘導体に結合することができる標的化ペプチドを提供することと、送達系を、対象に投与することを含む。

【 0 0 0 8 】

本明細書に開示されるように、送達系は、例えば、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノワイヤ、デンドリマー、リポソーム、エトソーム (e t h o s o m e) およびアクアソーム (a q u a s o m e) 、ポリマーソームおよびニオソーム (n i o s o m e) 、フォーム、ヒドロゲル、キューボソーム (c u b o s o m e) 、量子ドット、エキソソーム、マクロファージ、ならびにそれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、送達系は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを含む。ウイルスベクターは、例えば、アデノウイルスベクター、AAVベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターを含むことができる。いくつかの実施形態では、標的ペプチドは、AAVベクターのカプシドタンパク質の一部である。AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-DJ、ヒト分離株hu.31、ヒト分離株hu.32、アカゲザル分離株rh.8、アカゲザル分離株rh.10、およびそのバリエーションから選択されるベクターである。いくつかの実施形態では、AAVベクターはAAV9である。非ウイルスベクターは、例えば、脂質ベースのナノ粒子、ポリマーナノ粒子、無機ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、ナノワイヤ、シリカナノ粒子、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子、脂質ポリマー粒子、ナノリポタンパク質粒子、およびそれらの組み合わせを含み得る。

10

20

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、神経系に送達されるペイロードは、生物学的分子、非生物学的分子、またはそれらの組み合わせである。生物学的分子は、核酸配列、タンパク質、ペプチド、脂質、多糖、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、ペイロードは治療用分子である。いくつかの実施形態では、神経系に送達される核酸配列は、a) 形質導入された細胞から放出され、その細胞および/または周囲の細胞の生存もしくはは機能に影響を及ぼし得る栄養因子、成長因子、または他の可溶性因子；b) その遺伝子に遺伝子突然変異を持つヒトまたは動物にタンパク質機能を回復させるcDNA；c) 細胞の活性または状態を制御または改変するために使用され得るタンパク質をコードするcDNA；d) 細胞の状態を評価するために使用されるタンパク質または核酸をコードするcDNA；e) ゲノム操作を行うためのcDNAおよび/または関連ガイドRNA；f) 相同組換えによるゲノム編集のための配列；g) 治療用RNAをコードするDNA配列；h) shRNAまたは人工miRNA送達系；あるいはi) 内因性遺伝子のスプライシングに影響を及ぼすDNA配列の1または複数を含む。

30

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素ⅠⅤは、マウス炭酸脱水酵素ⅠⅤである。いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素ⅠⅤは、配列番号179のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素ⅠⅤは、ヒト炭酸脱水酵素ⅠⅤである。いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素ⅠⅤは、配列番号180のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、結合すると、(1) 配列番号179のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素ⅠⅤにおけるS20、G21、W22、L36、W41、P42、E90、V111、Q112、H114、H139、V141、K143、F156、L217、T218、T219、P220、N221、D223もしくはW228と機能的に等価な1もしくはそれを超える位置、または(2) 配列番号180のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素ⅠⅤにおけるS21、H22、W23、L37、W42、G43、M92、K113、Q114、H116、H141、V143、E145、Q158、L224、T225、T226、P227、T228、D231もしくは

40

50

W 2 3 6 と機能的に等価な 1 もしくはそれを超える位置と相互作用することができる。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、(1) 配列番号 7 0 ~ 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または (2) 配列番号 7 0 ~ 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号 7 0 ~ 1 0 8 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号 7 0 ~ 8 6 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、(1) A K P T P L L G L L Q A Q T G (配列番号 7 0)、A K P T P L L L L L Q A Q T G (配列番号 7 1)、A Q P P L G G L L A Q A Q T G (配列番号 7 2)、A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号 7 3)、および A Q P P L L G G L A Q A Q T G (配列番号 7 4) からなる群から選択されるアミノ酸配列、または (2) 配列番号 7 0 ~ 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、A A V 9 ベクターの配列番号 1 7 8 の A A 5 8 7 ~ 5 9 4、または配列番号 1 7 8 と少なくとも 8 0 % 同一のアミノ酸配列における A A 5 8 7 ~ 5 9 4 の機能的等価物における 2 つの隣接するアミノ酸の間に挿入される。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、A A V 9 ベクターの配列番号 1 7 8 の A A 5 8 8 ~ 5 8 9、または配列番号 1 7 8 と少なくとも 8 0 % 同一のアミノ酸配列における A A 5 8 8 ~ 5 8 9 の機能的等価物の間に挿入される。A A V ベクターを、例えば、ナノ粒子、第 2 の分子、またはそれらの組み合わせにコンジュゲートさせることができる。

【 0 0 1 1 】

投与は、全身投与であり得る。いくつかの実施形態では、投与は、静脈内投与である。いくつかの実施形態では、投与は、髄腔内投与である。対象は、例えば、哺乳動物であり得る。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、慢性疼痛、ハンチントン病 (H D)、アルツハイマー病 (A D)、パーキンソン病 (P D)、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、脊髄性筋萎縮症 I 型および I I 型 (S M A I および I I)、フリードライヒ運動失調症 (F A)、脊髄小脳失調症、多発性硬化症 (M S)、慢性外傷性脳症 (C T E)、H I V - 1 関連認知症、または C N S 内の細胞が関与するリソソーム蓄積障害の 1 または複数を患っているか、発症するリスクがある対象である。C N S 内の細胞が関与するリソソーム蓄積障害は、例えば、クラッペ病、サンドホフ病、テイ・サックス病、ゴーシェ病 (I、I I または I I I 型)、ニーマン・ピック病 (N P C 1 または N P C 2 欠乏症)、ハーラー症候群、ポンベ病、またはバッテン病であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、脳卒中、外傷性脳損傷、てんかん、または脊髄損傷に罹患している、発症するリスクがある、または罹患したことがある対象である。

【 0 0 1 2 】

炭酸脱水酵素 I V に対する結合特異性を有する標的化ペプチドを含む A A V カプシドタンパク質が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、r A A V ベクターのカプシドタンパク質の一部である。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号 1 7 8 の A A 5 8 7 ~ 5 9 4、または配列番号 1 7 8 と少なくとも 8 0 % 同一のアミノ酸配列における A A 5 8 7 ~ 5 9 4 の機能的等価物における 2 つの隣接するアミノ酸の間に挿入される。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、(1) 配列番号 7 0 ~ 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列；(2) 配列番号 7 0 ~ 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。A A V ベクターは、例えば、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 3 b、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V - D J、ヒト分離株 h u . 3 1、ヒト分離株 h u . 3 2、アカゲザル分離株 r h . 8、アカゲザル分離株 r h . 1 0、またはそのバリエーションであり得る。いくつかの実施形態では、A A V ベクターは A A V 9 である。

【 0 0 1 3 】

本明細書では、本明細書に開示される A A V カプシドタンパク質のいずれかを含む組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) が開示される。本明細書では、炭酸脱水酵素 I V に対

する結合特異性を有する標的化ペプチドを含む A A V カプシドタンパク質を含む r A A V であって、標的化ペプチドのアミノ酸配列が、A A V カプシドタンパク質の A A 5 8 7 ~ 5 9 4 またはその機能的等価物における 2 つの隣接するアミノ酸の間に挿入される、r A A V が開示される。いくつかの実施形態では、2 つの隣接するアミノ酸は、A A 5 8 8 および A A 5 8 9 である。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、(1) 配列番号 7 0 ~ 1 7 4 から選択されるアミノ酸配列、または (2) 配列番号 7 0 ~ 1 7 4 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 4 】

本明細書では、必要とする対象の神経系への作用物質の送達における使用のための組成物を開示する。組成物は、いくつかの実施形態では、(1) 本明細書に開示される A A V カプシドタンパク質のいずれかと、(2) 対象の神経系に送達される作用物質とを含む A A V を含む。いくつかの実施形態では、神経系は、中枢神経系 (C N S)、末梢神経系 (P N S)、またはそれらの組み合わせである。神経系は、例えば、脳内皮細胞、ニューロン、脳内の毛細血管、脳内の細動脈、脳内の動脈、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、組成物は、1 または複数の薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、送達される作用物質は、核酸、ペプチド、小分子、アプタマー、またはそれらの組み合わせを含む。

【 0 0 1 5 】

本明細書では、抗体またはそのフラグメントであって、炭酸脱水酵素 I V に対する結合特異性を有するアミノ酸配列を含む、抗体またはそのフラグメントが開示される。いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、(1) 配列番号 7 0 ~ 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または (2) 配列番号 7 0 ~ 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有する少なくとも 1 つの F a b を含む二重特異性抗体である。本明細書に開示される抗体は、本明細書に開示される抗体のいずれか 1 つまたはそのフラグメントを含む抗体コンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、抗体コンジュゲートは、治療剤または検出可能な標識を更に含む。

【 0 0 1 6 】

本明細書では、炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有するペプチドまたはその誘導体もしくはコンジュゲートが開示される。本明細書では、本明細書に開示される抗体のいずれか 1 つもしくはそのフラグメント、または本明細書に開示されるペプチドのいずれかもしくはその誘導体もしくはコンジュゲートをコードする配列を含む核酸が開示される。

【 0 0 1 7 】

本明細書では、(1) 炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有する標的化ペプチドと、(2) 作用物質と、を含む、送達系が開示される。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、(1) 送達系の表面に提示されるか、または (2) 送達系に部分的に埋め込まれている。いくつかの実施形態では、送達系は、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノワイヤ、デンドリマー、リボソーム、エトソームおよびアクアソーム、ポリマーソームおよびニオソーム、フォーム、ヒドロゲル、キュボソーム、量子ドット、エキソソーム、マクロファージ、ならびにそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、送達系は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを含む。いくつかの実施形態では、送達系は、脂質ベースのナノ粒子、ポリマーナノ粒子、無機ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、ナノワイヤ、シリカナノ粒子、ウイルス様粒子、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子、脂質ポリマー粒子、ナノリポタンパク質粒子、およびそれらの組み合わせから選択されるナノ粒子を含む。

【 0 0 1 8 】

本明細書では、炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有する標的化ペプチドを設計する方法が開示される。本方法は、いくつかの実施形態では、(1) 配列番号 1 7 9 のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素 I V における S 2 0、G 2 1、W 2 2、L 3 6、W 4 1、P 4

10

20

30

40

50

2、E90、V111、Q112、H114、H139、V141、K143、F156、L217、T218、T219、P220、N221、D223もしくはW228と機能的に等価な1もしくはそれを超える位置、または(2)配列番号180のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素IVにおけるS21、H22、W23、L37、W42、G43、M92、K113、Q114、H116、H141、V143、E145、Q158、L224、T225、T226、P227、T228、D231もしくはW236と機能的に等価な1もしくはそれを超える位置とそれぞれ相互作用することができる1または複数の標的化ペプチドをインシリコで生成することを含む。いくつかの実施形態では、1または複数の標的化ペプチドをin silicoで生成することは、in silicoで複数の候補ペプチドを生成することと、炭酸脱水酵素IVに結合する複数の候補ペプチドの各々についてコンピュータ支援ドッキングシミュレーションを実行することと、(1)配列番号179のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素IVにおけるS20、G21、W22、L36、W41、P42、E90、V111、Q112、H114、H139、V141、K143、F156、L217、T218、T219、P220、N221、D223もしくはW228と機能的に等価な1または複数の位置、または(2)配列番号180のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素IVにおけるS21、H22、W23、L37、W42、G43、M92、K113、Q114、H116、H141、V143、E145、Q158、L224、T225、T226、P227、T228、D231もしくはW236と機能的に等価な1または複数の位置と相互作用することができる、1または複数の標的化ペプチドを同定するために、1または複数の複数の候補ペプチドに結合する炭酸脱水酵素IVの構造を分析することと、を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、炭酸脱水酵素IVに結合する複数の候補ペプチドの各々についての結合スコアを得ることと、閾値を超える結合スコアを有する1または複数の複数の候補ペプチドを、炭酸脱水酵素IVに対する特異性を有する標的化ペプチドとして選択することとを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、2またはそれを超える複数の候補ペプチドの結合スコアを比較して、候補ペプチド配列をランク付けすることを含む。いくつかの実施形態では、複数の候補ペプチド配列の各々について結合スコアを得ることは、(1)候補ペプチドと炭酸脱水酵素IVとの界面における原子の総数をカウントすることと、(2)候補ペプチド中の原子の総数をカウントすることとあって、原子が炭酸脱水酵素IVと衝突している、候補ペプチド中の原子の総数をカウントすることと、(3)候補ペプチドの結合角を得ることと、(4)候補ペプチドの結合深度を得ることと、を含む。

【0019】

本明細書では、マウス種において血液脳関門の透過性を増加させる方法が開示される。本方法は、いくつかの実施形態では、Ly6c1に結合することができる標的化ペプチドを提供し、それによってマウス種において血液脳関門の透過性を増加させることを含む。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、1)AQR YQGDSVAQ(配列番号7)、AQWSTNAGYAQ(配列番号8)、AQERVGF AQAQ(配列番号9)、AQWMT HGSAAQ(配列番号10)、およびSPRYK GDSVAQ(配列番号57)からなる群から選択されるアミノ酸配列、または(2)AQR YQGDSVAQ(配列番号7)、AQWSTNAGYAQ(配列番号8)、AQERVGF AQAQ(配列番号9)、AQWMT HGSAAQ(配列番号10)およびSPRYK GDSVAQ(配列番号57)からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、SPRYK GDSVAQ(配列番号57)のアミノ酸配列、または配列番号57と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号178のAA587~590、または配列番号178と少なくとも80%同一のアミノ酸配列におけるAA587~590の機能的等価物における2つの隣接するアミノ酸の間に挿入される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

図面の簡単な説明

【図 1 A】図 1 A ~ 図 1 C は、非限定的な例示的な実施形態および B B B 横断のために L y 6 a を利用しなかった操作された A A V の同定に関するデータを示す。図 1 A は、A A V - P H P . e B が、B A L B / c J マウスにおいて G P I 破壊された L y 6 a ではなく、C 5 7 B L / 6 J マウスにおいて膜局在 L y 6 a を使用して B B B を効率的に横断することができることを示す。図 1 B は、C N S 向性操作された A A V 挿入配列のクラスタリング分析を示す図である。接続線の太さは、ノード間の関連性の程度を表す。左上隅のボックス内の A A V は、P H P . e B との高い関連性を示した。ボックス外の A A V は、P H P . e B または互いにほとんど関係を示さなかった。各バリエーションの A A V 9 カプシドの位置 5 8 8 ~ 5 8 9 と 4 5 2 ~ 4 5 8 との間に挿入された A A 配列を示す。図 1 C は、

10

【図 1 B - 1】同上。

【図 1 B - 2】同上。

【図 1 C - 1】同上。

【図 1 C - 2】同上。

【図 1 C - 3】同上。

【図 1 C - 4】同上。

【図 1 C - 5】同上。

【図 1 C - 6】同上。

【図 1 C - 7】同上。

20

【0 0 2 1】

【図 2 A - 1】図 2 A ~ 図 2 C は、非限定的な例示的な実施形態およびマウス系統にわたる L y 6 a 非依存性 A A V の性能に関するデータを示す。図 2 A は、矢状脳切片から示される 1 2 9 S 1 / S v l m J (膜局在 L y 6 a)、C B A / J (G P I 破壊 L y 6 a)、D B A / 2 J (膜局在 L y 6 a)、および N O D / S h i l t J (G P I 破壊 L y 6 a) マウスの視床脳領域における A A V - P H P . e B、A A V - P H P . N、A A V - P H P . C 1 - C 4、および A A V - F による形質導入を示す図である。全ての画像は、D B A / 2 J のために最適化された株全体にわたる P H P . e B 画像の左下象限を除いて、同じ画像設定の下で取得された。示されたカプシドを使用して s s A A V : C A G - m N e o n G r e e n をパッケージングし、6 ~ 8 週齢の成体マウス (n = 2 / 群、1 × 1 0¹¹ ウイルスゲノム (v . g .) マウス 1 匹あたり i . v . 送達、発現 3 週間) に投与した。全ての画像は、全てのウイルスを新たに調製し、一貫した投与を確実にするために同じアッセイで滴定した 1 つの実験からのものであった。図 2 B は、使用した株を含むマウス系統樹を示す。図 2 C は、動物全体の視床平均画素強度を示す。各データ点は 1 匹の動物を表し、バーは平均値を示す。

30

【図 2 A - 2】同上。

【図 2 A - 3】同上。

【図 2 B】同上。

【図 2 C - 1】同上。

40

【図 2 C - 2】同上。

【0 0 2 2】

【図 3 A】図 3 A ~ 図 3 G は、非限定的な例示的な実施形態およびインビトロでの操作された A A V の感染性を増強する新規受容体に関するデータを示す。図 3 A は、C 5 7 B L / 6 J 皮質の単一細胞 R N A シーケンシングから構築された内皮細胞における S c a n p y 対平均転写物存在量で計算された内皮細胞における膜タンパク質差次的発現スコアのプロットを示す。細胞培養スクリーニングのために選択されたタンパク質は、より大きなドットによって示され (表 3)、ヒットは標識され、十字でマークされる。図 3 B は、モックトランスフェクト細胞および各潜在的受容体でトランスフェクトした細胞における低感染多重度 (M O I) での A A V 蛍光タンパク質導入遺伝子レベルを比較することによる、細

50

胞培養における潜在的受容体のスクリーニングを示す図である。図 3 C は、96 ウェルプレート中の HEK 293 T 細胞における CAG - mNeonGreen をパッケージングする AAV9 および PHP. eB の用量依存性を示す。1 ウェル当たり 1×10^9 v. g. で、Ly6a トランスフェクト HEK 293 T 細胞において、PHP. eB は AAV9 よりも著しく高い効力を有した。スケールは、感染の程度（最大：0.75、最小：0.03）およびシグナル面積当たりの総輝度（最大：0.79、最小：0.39）を示す。図 3 D は、潜在的受容体パネルでトランスフェクトされた HEK 293 T 細胞に対する操作された AAV の効力を示す。感染の程度（左、最大：0.33、最小：0.001；右、最大：0.55、最小：0.03）。シグナル面積当たりの総輝度（左、最大：0.55、最小：0.06；右、最大：0.61、最小：0.11）。図 3 E は、モックトランスフェクト（なし）または潜在的受容体でトランスフェクトした（CAG - mNeonGreen をパッケージングした AAV の 1 ウェル当たり 1×10^9 v. g. で感染させた）96 ウェルプレート中で培養し（左の 2 つのカラムは Ly6a 結合 AAV である）、形質導入の 24 時間後に画像化した HEK 細胞の代表的な画像を示す。明視野および蛍光画像のオーバーレイが提示される。スケールバー = $200 \mu\text{m}$ 。図 3 F は、Ly6a（6 つのウイルス）、Ly6c1（配列番号 293；9 ウイルス）および Car4（配列番号 179；2 ウイルス）による感染性増強を有することが見出された操作された AAV 間の位置によるアミノ酸頻度を示す。図 3 G は、Ly6 および Car ファミリー潜在的受容体でトランスフェクトした HEK 293 T 細胞に対する操作された AAV の効力を示す。感染の程度（左、最大：0.51、最小：0.03；右、最大：0.52、最小：0.05）。シグナル面積当たりの総輝度（左、最大：0.75、最小：0.13；右、最大：0.79、最小：0.34）。

10

20

【図 3 B】同上。

【図 3 C】同上。

【図 3 D】同上。

【図 3 E】同上。

【図 3 F】同上。

【図 3 G】同上。

【0023】

【図 4 A】図 4 A ~ 図 4 C は、Car4 依存性 AAV の CNS 効力における炭酸脱水酵素 IV の役割に関する非限定的な例示的实施形態およびデータを示す。図 4 A は、WT / WT および KO / KO Car4 マウスの脳における Car4 の免疫染色を示す。WT / WT 由来の拡大領域は、多様な脳領域にわたる内皮発現を実証する。図 4 B は、AAV - PHP. eB、9P31 および 9P36 を投与した WT / WT Car4 マウスの脳および肝臓全体の導入遺伝子発現アッセイからの蛍光画像を示す。ユビキタス CAG プロモーターの制御下で mNeonGreen をパッケージングした AAV - PHP. eB、9P31、および 9P36 を、動物 1 匹当たり 3×10^{11} v. g.（1 条件当たり $n = 3$ ）の用量で WT / WT Car4 マウスに静脈内投与した。投与の 3 週間後、導入遺伝子発現を脳および肝臓全体で mNeonGreen 蛍光によってアッセイした。図 4 C は、AAV - PHP. eB、9P31 および 9P36 を投与した KO / KO Car4 マウスのブラインおよび肝臓全体の導入遺伝子発現アッセイからの蛍光画像を示す。ユビキタス CAG プロモーターの制御下で mNeonGreen をパッケージングした AAV - PHP. eB、9P31、および 9P36 を、動物 1 匹当たり 3×10^{11} v. g.（1 条件当たり $n = 3$ ）の用量で KO / KO Car4 マウスに静脈内投与した。投与の 3 週間後、導入遺伝子発現を脳および肝臓全体で mNeonGreen 蛍光によってアッセイした。スケールバー = 2 mm。

30

40

【図 4 B】同上。

【図 4 C】同上。

【0024】

【図 5 A - 1】図 5 A ~ 図 5 D は、増強された Ly6c1 依存性 AAV の操作に関連する

50

非限定的な例示的实施形態およびデータを示す。図 5 A は、A A V ライブラリ設計戦略を示す。N N K コドンの位置を示す X で示されるように、P H P . C 1 ~ C 4 の走査型 3 - m e r ライブラリを構築した。A A V をプールし、6 ~ 8 週齢の C r e トランスジェニックマウスにおいて 2 ラウンドの M - C R E A T E 選択を行った。図 5 B は、更なる研究のために選択された選択対照 A A V および 20 個のカプシドバリエーションを投与した多様な C r e トランスジェニックマウスおよび野生型マウスにおける脳濃縮のラウンド 2 選択を示す。株間の最終スクリーニングのための小規模生産中に収量を決定した。図 5 C は、モック（なし）または L y 6 c 1 受容体でトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞における P H P . e B、P H P . C 2 および P H P . e C（図 5 B のバリエーション 19）の細胞培養感染性アッセイにおける効力を示し、P H P . e C が L y 6 c 1 相互作用を保持していたことを実証している。感染の程度（最大：0.93、最小：0.02）。シグナル面積当たりの総輝度（最大：0.74、最小：0.16）。図 5 D は、P H P . C 2 および P H P . e C を投与した N O D / S h i L t J マウスおよび B A L B / c J マウスの脳および肝臓全体の導入遺伝子発現アッセイからの蛍光画像を示す。ユビキタス C A G プロモーターの制御下で m N e o n G r e e n をパッケージングした P H P . C 2 および P H P . e C を、動物 1 匹当たり 3×10^{11} v . g .（1 条件当たり $n = 3$ ）の用量で N O D / S h i L t J マウスおよび B A L B / c J マウスに静脈内投与した。投与の 3 週間後、導入遺伝子発現を脳および肝臓全体で m N e o n G r e e n 蛍光によってアッセイし、P H P . e C の効力の増加を実証した。矢状画像スケールバー = 2 m m。脳領域スケールバー = 250 μ m。

10

20

【図 5 A - 2】同上。

【図 5 B - 1】同上。

【図 5 B - 2】同上。

【図 5 C】同上。

【図 5 D - 1】同上。

【図 5 D - 2】同上。

【0025】

【図 6 A】図 6 A ~ 図 6 G は、操作された A A V 受容体および L y 6 a 相互作用複合体のインシリコ予測に関連する非限定的な例示的实施形態およびデータを示す。図 6 A は、操作された A A V（A P P R A I S E - A A V）をスクリーニングするための A l p h a F o l d 2 ベースのインシリコ自動ペアワイズペプチド受容体分析の概要を示す。A A V バリエーション由来の表面ペプチドを、A l p h a F o l d 2 を使用してペアワイズ結合競合に入れた。ペプチド競合メトリックは、相互作用尤度のより広いランク付けされたマトリックスにアセンブルされる前に、各ペプチドの界面エネルギー、結合角およびポケット深さに従って計算された。競合結果は、A l p h a F o l d 2 ニューラルネットワークにコードされる相対的なペプチド結合確率を反映する。図 6 B は、操作された A A V カプシド、それらの確認された受容体、および A P P R A I S E - A A V で使用されるカプシドペプチド配列の表を示す。図 6 C は、L y 6 a、L y 6 c 1 およびマウス C a r 4 についての 10 回の複製条件にわたるそれらの平均競合メトリックによって A A V ペプチドをランク付けするマトリックスを示す。太字の A A V ペプチドラベルは、対応する受容体と相互作用することが実験的に同定されたものを示す。範囲外のメトリック値（-100 ~ 100）は、範囲限界に制限された。図 6 D は、A l p h a F o l d 2 予測 L y 6 a - P H P . e B ペプチド複合体構造を示す。モデル信頼度の残基ごとの推定である p L D D T（予測局所距離差試験）スコアによって、P H P . e B ペプチドを色付けした。最も高い信頼側鎖 P 5' および F 6' は、球として示されている。予測ペプチド相互作用を破壊するように選択された L y 6 a A 58 R 突然変異は、細胞培養感染性アッセイにおいて効力の減少をもたらした。感染の程度（最大：0.29、最小：0.03）。シグナル面積当たりの総輝度（最大：0.61、最小：0.16）。図 6 E は、モデル化された P H P . e B ペプチドの 5 オングストローム（ ）以内に少なくとも 2 個の原子を有する L y 6 a 残基を示す。図 6 F は、P H P . e B 三量体および L y 6 a 複合体の完全なモデルを示す

30

40

50

。図 6 D からの AlphaFold2 構造予測をカプシドモノマー受容体構造予測と組み合わせ、AAV 三量体の文脈内で Rosetta Remodel を使用して最適化した (図 13 A)。図 6 G は、モデル化された PHP . eB - Ly6a 複合体および Ly6a の 5 内に少なくとも 2 個の原子を有する PHP . eB 残基における、PHP . eB - Ly6a 結合界面の拡大図を示す。

【図 6 B】同上。

【図 6 C】同上。

【図 6 D】同上。

【図 6 E】同上。

【図 6 F】同上。

【図 6 G】同上。

【0026】

【図 7 A】図 7 A ~ 図 7 D は、操作された AAV と炭酸脱水酵素 IV との相互作用に関する非限定的な例示的な実施形態およびデータを示す。図 7 A は、AlphaFold2 予測マウス Car4 - 9P31 ペプチド複合体構造を示す。9P31 ペプチドを各残基の pLDDT スコアで色付けし、最も高い信頼側鎖を球として示した。図 7 B は、モデル化された 9P31 ペプチド結合ポーズ (左上) および結晶学的プリンゾラミド結合ポーズ (PDB ID: 3ZNC、右上) を有するマウス Car4 触媒ポケットの切断図を示す。操作された AAV に対するプリンゾラミドの効果の細胞培養感染性アッセイ (下)。感染の程度 (最大: 0.63、最小: 0.04)。シグナル面積当たりの総輝度 (最大: 0.75、最小: 0.18)。図 7 C は、プリンゾラミドおよび 9P31 ペプチド結合ポーズに関してマウス (PDB ID: 3ZNC) 炭酸脱水酵素 IV とヒト (PDB ID: 1ZNC) 炭酸脱水酵素 IV との間で異なるアミノ酸側鎖の図を示す。図 7 D は、マウス、アカゲザルまたはヒト炭酸脱水酵素 IV 受容体、ならびに図示のループ配列を交換するマウスおよびヒト炭酸脱水酵素 IV の 2 つのキメラ受容体でトランスフェクトした HEK293T 細胞における 9P31 および 9P36 の細胞培養感染性アッセイにおける効力を示す。感染の程度 (左、最大: 0.52、最小: 0.05、右、最大: 0.65、最小: 0.03)。シグナル面積当たりの総輝度 (左、最大: 0.78、最小: 0.46、右、最大: 0.75、最小: 0.13)。

【図 7 B】同上。

【図 7 C】同上。

【図 7 D】同上。

【0027】

【図 8 A - 1】図 8 A ~ 図 8 C は、非限定的な例示的な実施形態およびマウス系統にわたる低用量 AAV 性能に関するデータを示す。図 8 A は、動物 (n = 2) 1 匹当たり 1×10^{11} v. g. の CAG - mNeonGreen をパッケージングした操作された AAV を後眼窩注射した 129S1 / Sv1mJ マウス、CBA / J マウス、DBA / 2J マウスおよび NOD / ShiltJ マウスの図 2 A の矢状断面に対応するマウス系統にわたる低用量 AAV 性能を示す。マウスは注射時に 6 ~ 8 週齢であり、組織を注射 3 週間後に回収した。スケールバー = 2 mm。図 8 B は、動物 1 匹当たり 1×10^{11} v. g. の CAG - mNeonGreen をパッケージングした PHP . C1 または PHP . C2 (n = 2) を後眼窩注射した雄および雌の 129S1 / Sv1mJ マウスおよび CBA / J マウスの視床脳領域における平均蛍光強度の定量化を示す。マウスは注射時に 6 ~ 8 週齢であった。注射 3 週間後に組織を回収した。各データ点は 1 匹の動物を表し、バーは平均値を示す。図 8 C は、C57BL / 6J、CBA / J および F1 交雑マウスにおける AAV - PHP . C3 効力を示す。動物に 6 ~ 8 週齢で 3×10^{11} v. g. の CAG - mNeonGreen をパッケージングした AAV - PHP . C3 を後眼窩注射した。注射 3 週間後、組織を回収した。視床を画像化してウイルス効力をアッセイした。

【図 8 A - 2】同上。

【図 8 B】同上。

10

20

30

40

50

【図 8 C】同上。

【0028】

【図 9 A - 1】図 9 A ~ 図 9 C は、細胞培養感染性アッセイからの代表的な画像に関連する非限定的な例示の実施形態およびデータを示す。図 9 A は、96 ウェルプレート中の HEK293T 細胞に CAG - mNeonGreen をパッケージングした AAV9 および PHP.eB の用量依存性を示す蛍光画像を示す。1 ウェル当たり 1×10^9 v.g. で、Ly6a トランスフェクト HEK293T 細胞において、PHP.eB は AAV9 よりも著しく高い効力を有する。代表的な画像を示す。スケールバー = $500 \mu\text{m}$ 。図 9 B は、モックトランスフェクト（なし）または潜在的受容体でトランスフェクト（ウェル当たり 1×10^9 v.g. の PHP.B 配列ファミリー AAV（「Ly6a AAV」と標識された AAV は Ly6a 結合であった）または CAG - mNeonGreen をパッケージングした Ly6a 非依存性 AAV（Ly6a 非依存性 AAV と標識）で感染させた）した 96 ウェルプレート中で培養し、形質導入の 24 時間後に画像化した、HEK 細胞の代表的な画像を示す。明視野および蛍光画像のオーバーレイが提示される。スケールバー = $200 \mu\text{m}$ 。図 9 C は、モックトランスフェクト（なし）または Ly6a もしくは S1c1 でトランスフェクトした 96 ウェルプレート中で培養した HEK 細胞の代表的な画像を示す。S1c1 感染細胞は、試験した全ての AAV について細胞境界を超えて広がる薄暗い拡散した蛍光を示した。明視野および蛍光画像のオーバーレイが提示される。スケールバー = $200 \mu\text{m}$ 。

10

【図 9 A - 2】同上。

20

【図 9 B - 1】同上。

【図 9 B - 2】同上。

【図 9 B - 3】同上。

【図 9 B - 4】同上。

【図 9 C】同上。

【0029】

【図 10 A】図 10 A は、免疫蛍光によって確認された細胞培養スクリーニングからの選択された膜タンパク質の発現に関する非限定的な例示の実施形態およびデータを示す。示された抗体で染色された、トランスフェクトされていない HEK293T 細胞および受容体トランスフェクトされた HEK293T 細胞の DAPI および免疫蛍光（IF）オーバーレイ、ならびに受容体トランスフェクト HEK293T 細胞画像からの IF チャンネル単独（左）。スケールバー = $50 \mu\text{m}$ 。

30

【図 10 B】モックトランスフェクト細胞および Ly6a 発現細胞における 2 つの異なる用量での PHP.eB、PHP.N および CAG - mNeonGreen をパッケージングした CAP - B10、ならびに CAG - NLS - GFP をパッケージングした CAP - B22 の非限定的な例示的明視野画像（各列の左）および蛍光画像（各列の右）を示す。PHP.eB から操作された Ly6a 相互作用 AAV は、細胞培養において同程度の効力増強を示す。スケールバー = $100 \mu\text{m}$ 。

【図 10 C】図 10 C は、CAP - B10 および CAP - B22 の効力に関する非限定的な例示の実施形態およびデータを示す。CAP - B10 および CAP - B22 は、マーマーセット Ly6 タンパク質による効力増強を示さなかった。潜在的受容体でトランスフェクトした HEK293T 細胞に対する操作された AAV の効力を示す。感染の程度（最大：0.52、最小：0.05）。シグナル面積当たりの総輝度（最大：0.79、最小：0.17）。

40

【0030】

【図 11 A - 1】図 11 A は、非限定的な例示的な実施形態と、PHP.N、AAV9、および PHP.eB の性能に関連するデータとを示す。高用量の CBA/J マウスでは、PHP.N が AAV9 および PHP.eB を上回った。6 ~ 8 週齢の動物に 1×10^{12} v.g. の AAV9、PHP.eB、または CAG - mNeonGreen をパッケージングした PHP.N（ $n = 3$ ）を後眼窩注射した。注射の 4 週間後、組織を回収し、画像

50

化してウイルスの効力を検出した。視床の平均画素強度定量における各データ点は1匹の動物を表し、バーは平均値を示す。

【図11A-2】同上。

【図11B】図11Bは、WTマウスおよびCar4-KOマウスにおけるAAV効力の定量化に関する非限定的な例示的实施形態およびデータを示す。全脳矢状切片および肝臓切片の平均画素強度を定量化した。次いで、個々の各データ点を平均PHP・eB強度に対して正規化した。各データ点は1匹の動物を表し、バーは平均値を示す。

【0031】

【図12-1】図12は、M-CREATE選択中の濃縮カプシドバリエーションに関する非限定的な例示的实施形態およびデータを示す。M-CREATE Cre依存性回復またはCre非依存性回復を使用して、ラウンド1およびラウンド2の選択からのそれらの濃縮スコアに従ってカプシドをランク付けした。配列頻度プロットは、各ラウンドおよび選択タイプからの最も濃縮されたバリエーションのパターンを示す。

【図12-2】同上。

【図12-3】同上。

【図12-4】同上。

【0032】

【図13A】図13A~図13Dは、非限定的な例示的な実施形態、および統合構造モデリング法によって得られたPHP・eB-Ly6a相互作用のスナップショットに関するデータを示す。図13Aは、操作されたAAV受容体複合体構造(PHP・eB:pLDDTスコアで色付け、Ly6a:矢印で示す)をモデル化するためのワークフローを示す。図13Bは、計算モデル化されたPHP・eB-Ly6aと、未結合のPHP・eBのCryoEM構造(PDB ID:7WQO)との比較を示す。挿入されたペプチド内の全ての高信頼性残基(pLDDT>45、左パネル矢印を参照)は、CryoEMマップにおいて明確な側鎖密度を有さなかったF6'を除いて、2つのモデル間で一貫した立体配座を示した。未結合のPHP・eBモデルで予測されたF6'の側鎖は、予測された複雑なモデルで立体衝突を引き起こす。図13Cは、低温EM粒子再構成(PHP・eB:pLDDTスコアで着色、Ly6a:矢印で示す)で生じるであろう立体衝突にもかかわらず、全てのLy6a結合状態のアンサンブルを表す組み立てられたPHP・eBカプシド-Ly6aモデルを示す。上:組み立てられたカプシドモデルの断面。中央:3回スパイク(3-fold spike)の拡大図であり、3つの異なる結合状態間の立体衝突を強調している。図13Dは、計算モデル化されたPHP・eB-Ly6a(PHP・eB:レインボー)およびPHP・eB-AAVR PKD2のCryoEMモデル(PDB ID:7WQP)のオーバーレイ構造を示す。

【図13B】同上。

【図13C】同上。

【図13D】同上。

【0033】

【図14A-1】図14A~図14Bは、Ly6c1およびマウスCar4とのペプチド複合体のモデリングに関する非限定的な例示的实施形態およびデータを示す。図14Aは、AlphaFold-多量体v1およびv2によって予測された計算モデル化されたPHP・C2-Ly6c1結合ポーズ間の比較を示す。PHP・C2ペプチドをpLDDTスコアに従って残基によって着色した。突然変異のために選択されたLy6c1残基を球として示す。野生型または変異体Ly6c1受容体でトランスフェクトしたHEK293T細胞に対するPHP・C2の効力も示す(図14A(続き))。感染の程度(最大:0.67、最小:0.13)。シグナル面積当たりの総輝度(最大:0.72、最小:0.31)。図14Bは、各残基においてpLDDTスコアによって色付けされた9P31および9P36ペプチド、ならびに推定部位2結合を破壊するように設計された野生型または変異体Car4受容体でトランスフェクトされたHEK293T細胞についての9P31および9P36の効力を有する、上位5つのAlphaFold2予測マウスCar4

- 9 P 3 1 および C a r 4 - 9 P 3 6 ペプチド複合体構造を示す。感染の程度（上、最大：0.99、最小：0.12、下、最大：0.67、最小：0.13）。シグナル面積当たりの総輝度（上、最大：0.89、最小：0.33、下、最大：0.72、最小：0.31）。

【図 1 4 A - 2】同上。

【図 1 4 B - 1】同上。

【図 1 4 B - 2】同上。

【図 1 4 B - 3】同上。

【発明を実施するための形態】

【0034】

詳細な説明

以下の詳細な説明では、本明細書の一部を形成する添付の図面を参照する。図面では、文脈上別段の指示がない限り、類似の記号は通常、類似の構成要素を識別する。詳細な説明、図面、および特許請求の範囲に記載された例示的な実施形態は、限定を意味するものではない。本明細書に提示される主題の趣旨または範囲から逸脱することなく、他の実施形態を利用され得て、他の変更が行われ得る。本明細書で一般的に説明され、図に示されている本開示の態様は、多種多様な異なる構成で配置、置換、組み合わせ、分離、および設計することができ、その全てが本明細書で明示的に企図され、本明細書の開示の一部となることは容易に理解されよう。

【0035】

本明細書で言及される全ての特許、公開特許出願、他の刊行物、および G e n B a n k からの配列、ならびに他のデータベースは、関連技術に関してその全体が参照により組み込まれる。

【0036】

本明細書では、血液脳関門の透過性を増加させる方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、炭酸脱水酵素 I V に結合することができる標的化ペプチドを提供し、それによって血液脳関門の透過性を増加させることを含む。

【0037】

本明細書では、血液脳関門の透過性を増加させる方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、炭酸脱水酵素 I V 活性を低下させ、それによって血液脳関門の透過性を増加させることを含む。

【0038】

本明細書では、ペイロードを神経系に送達するための方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、炭酸脱水酵素 I V またはその誘導体に結合することができる標的化ペプチドを提供することであって、標的化ペプチドが送達系の一部であり、送達系が、神経系に送達される核酸配列を含む、炭酸脱水酵素 I V またはその誘導体に結合することができる標的化ペプチドを提供することと、送達系を、対象に投与することとを含む。いくつかの実施形態では、送達系、は A A V ベクターである。炭酸脱水酵素 I V に対する結合特異性を有する標的化ペプチドを含む組換え A A V (r A A V) ベクターも本明細書に開示される。

【0039】

本明細書では、抗体またはそのフラグメントが開示される。いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有するペプチドまたはその一部を含む。抗体またはそのフラグメントは、(1) 配列番号 11 ~ 12 および配列番号 70 ~ 174 から選択されるアミノ酸配列；(2) 配列番号 11 ~ 12 および配列番号 70 ~ 174 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。本明細書では、本明細書に開示される抗体またはそのフラグメントを含む抗体コンジュゲートを開示する。いくつかの実施形態では、抗体コンジュゲートは、治療剤または検出可能な標識を更に含むことができる。本明細書では、炭酸脱水酵素 I V に対する特異性を有するペプチドまたはその誘導体もしくはコンジュゲー

10

20

30

40

50

トが開示される。本明細書では、本明細書に開示される抗体もしくはそのフラグメントまたはペプチドもしくはその誘導体もしくはコンジュゲートをコードする配列を含む核酸が開示される。

【0040】

本明細書では、(1)炭酸脱水酵素Ⅴに対する特異性を有する標的化ペプチドと、(2)医薬品とを含む送達系を開示する。

【0041】

本明細書では、炭酸脱水酵素Ⅴに対する特異性を有する標的化ペプチドを設計する方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、(1)配列番号179のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素ⅤにおけるS20、G21、W22、L36、W41、P42、E90、V111、Q112、H114、H139、V141、K143、F156、L217、T218、T219、P220、N221、D223もしくはW228と機能的に等価な1もしくはそれを超える位置、または(2)配列番号180のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素ⅤにおけるS21、H22、W23、L37、W42、G43、M92、K113、Q114、H116、H141、V143、E145、Q158、L224、T225、T226、P227、T228、D231もしくはW236と機能的に等価な1もしくはそれを超える位置とそれぞれ相互作用することができる1または複数の標的化ペプチドをインシリコで生成することを含む。

10

【0042】

本明細書では、マウス種において血液脳関門の透過性を増加させるための方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、Ly6c1に結合することができる標的化ペプチドを提供し、それによってマウス種において血液脳関門の透過性を増加させることを含む。

20

定義

【0043】

他に定義されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本開示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。例えば、Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989)を参照されたい。本開示の目的のために、以下の用語を以下に定義する。

30

【0044】

本明細書で使用される場合、「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は交換可能であり、ホスホジエステル結合または修飾結合、例えばホスホトリエステル、ホスホルアミデート、シロキサソ、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホルアミデート、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホルアミデート、架橋ホスホルアミデート、架橋メチレンホスホネート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオエート、架橋ホスホロチオエートまたはスルトン結合、およびそのような結合の組み合わせから構成されるかどうかにかかわらず、任意の核酸を指すことができる。「核酸」および「ポリヌクレオチド」の用語はまた、具体的には、5つの生物学的に存在する塩基以外の塩基(アデニン、グアニン、チミン、シトシンおよびウラシル)から構成される核酸も含む。

40

【0045】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、核酸を保有または移入するためのビヒクルを指すことができる。ベクターの非限定的な例としては、プラスミドおよびウイルス(例えば、AAVウイルス)が挙げられる。

【0046】

本明細書で使用される場合、「コンストラクト」という用語は、特定のヌクレオチド配

50

列の発現を目的として生成された、または他の組換えヌクレオチド配列の構築に使用される組換え核酸を指すことができる。

【0047】

本明細書で使用される場合、「プラスミド」という用語は、宿主生物内の組換えDNA配列を複製するために使用することができる核酸を指すことができる。配列は、二本鎖DNAであり得る。

【0048】

「ウイルスゲノム」という用語は、核酸のウイルスカプシドへのパッケージングを媒介するシス作用核酸配列に隣接する核酸配列を指す。AAVおよびパルボウイルスの場合、例えば、ウイルスゲノムの5'および3'末端に位置する「逆方向末端反復」(ITR: i 10 nverted terminal repeats)がこの機能を有すること、およびITRが異種、例えば非野生型ウイルスゲノムのウイルスカプシドへのパッケージングを媒介し得ることが知られている。

【0049】

「エレメント」という用語は、何かの別個のまたは別個の部分、例えば、より長い核酸配列内の別個の機能を有する核酸配列を指すことができる。「調節エレメント」および「発現制御エレメント」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現に影響を及ぼし得る核酸分子を指す。これらの用語は、プロモーター、RNAポリメラーゼと転写因子との基本的な相互作用に必要なコアエレメント、上流エレメント、エンハンサー、および応答エレメント(例えば、L 20 ewin、' ' Genes V ' ' (Oxford University Press、オックスフォード)の847~873頁を参照)を含む、転写を促進または調節する全てのエレメントに広く使用され、それらを包含する。原核生物における例示的な調節エレメントは、プロモーター、オペレーター配列およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞において使用される調節エレメントとしては、限定されないが、宿主細胞におけるコード配列の発現および/またはコードされたポリペプチドの産生を提供および/または調節する転写および翻訳制御配列、例えばプロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナル、内部リボソーム進入エレメント(IRES)、2A配列等が挙げられ得る。

【0050】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼの結合を可能にし、遺伝子の転写を指示するヌクレオチド配列である。典型的には、プロモーターは、遺伝子の転写開始部位の近位の、遺伝子の5'非コード領域に位置する。転写の開始において機能するプロモーター内の配列エレメントは、コンセンサスヌクレオチド配列によって特徴付けられることが多い。プロモーターの例としては、細菌、酵母、植物、ウイルスおよび哺乳動物(ヒトを含む)由来のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。プロモーターは、誘導性、抑制性および/または構成的であり得る。誘導性プロモーターは、温度の変化等の培養条件の何らかの変化に応答して、それらの制御下でDNAからの転写レベルの上昇を開始する。

【0051】

本明細書で使用される場合、「エンハンサー」という用語は、転写の開始部位に対するエンハンサーの距離または配向にかかわらず、転写の効率を高めることができる調節エレメントのタイプのことを指す。

【0052】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、調節エレメントと遺伝子またはそのコード領域との間の連結を説明するために使用される。典型的には、遺伝子発現は、1または複数の調節エレメント、例えば、限定されないが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、組織特異的調節エレメントおよびエンハンサーの制御下に置かれる。遺伝子またはコード領域は、調節エレメントに「作動可能に連結される」または「作動可能に連結される」または「作動可能に会合される」と言われ、遺伝子また

30

40

50

はコード領域が調節エレメントによって制御または影響されることを意味する。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列に作動可能に連結される。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、単一の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することを意図し、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって直線的に連結されたモノマー（アミノ酸）で構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意のまたはそれを超える鎖を指し、産物の特定の長さを指すものではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2またはそれを超えるアミノ酸の1つの鎖または複数の鎖を指すために使用される任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかの代わりに、またはこれらの用語と互換的に使用され得る。「ポリペプチド」という用語はまた、限定するものではないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解的切断、または天然に存在しないアミノ酸による修飾を含む、ポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことを意図する。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来し得るか、または組換え技術によって産生され得るが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳されない。これは、化学合成を含む任意の方法で生成され得る。

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと実質的に同様の配列を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指すことができる。ポリヌクレオチドの場合、バリエーションは、参照ポリヌクレオチドと比較して、5'末端、3'末端および/または1もしくはそれを超える内部部位に1もしくはそれを超えるヌクレオチドの欠失、置換および/または付加を有することができる。バリエーションと参照ポリヌクレオチドとの間の配列の類似性および/または相違は、当技術分野で公知の従来の技術、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびハイブリダイゼーション技術を用いて検出することができる。バリエーションポリヌクレオチドはまた、例えば部位特異的突然変異誘発を使用することによって生成されたもの等の合成由来ポリヌクレオチドを含む。一般に、限定されないが、DNAを含むポリヌクレオチドのバリエーションは、当業者に公知の配列アラインメントプログラムによって決定される場合、参照ポリヌクレオチドに対して少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれを超える配列同一性を有することができる。ポリペプチドの場合、バリエーションは、参照ポリペプチドと比較して、アミノ酸の欠失、置換、付加の1または複数を含むことができる。バリエーションと参照ポリペプチドとの間の配列の類似性および/または相違は、当技術分野で公知の従来の技術、例えばウェスタンブロットを用いて検出することができる。一般に、ポリペプチドのバリエーションは、当業者に公知の配列アラインメントプログラムによって決定される場合、参照ポリペプチドと少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれを超える配列同一性を有することができる。

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用される場合、2つの核酸またはポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」または「同一性」は、指定された比較ウィンドウにわたって最大の対応のために整列されたときに同じである2つの配列中のヌクレオチド塩基またはアミノ酸残基を参照する。配列同一性または類似性のパーセンテージをタンパク質に関して使用する場合、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換によって異なることが多く、アミノ酸残基は、類似の物理化学的特性を有するアミノ酸残基の機能的に等価な残基で置換され、したがって分子の機能的特性を変化させないことが認識される。

【 0 0 5 6 】

本明細書で使用されるアミノ酸の機能的に等価な残基は、典型的には、元のアミノ酸と実質的に同様の物理化学的および立体化学的特性を有する他のアミノ酸残基を指すことができる。物理化学的特性は、水溶性（疎水性または親水性）、誘電特性および電気化学的特性、生理学的 pH、側鎖の部分電荷（陽性、陰性または中性）および当業者に特定可能な他の特性を含む。立体化学的特徴は、アミノ酸の空間的および立体配座的配置ならびにそれらのキラリティーを含む。例えば、グルタミン酸は、本開示の意味においてアスパラギン酸と機能的に等価な残基であると考えられる。チロシンおよびトリプトファンは、フェニルアラニンと機能的に等価な残基と考えられる。アルギニンおよびリジンは、ヒスチジンと機能的に等価な残基と見なされる。

10

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用される場合、「結合」という用語は、高分子間の非共有結合相互作用（例えば、2つのタンパク質および/またはペプチドの間）を指す。非共有結合相互作用の状態にある間、巨大分子は「会合」または「相互作用」または「結合」と言われる（例えば、分子 X が分子 Y と相互作用すると言われる場合、それは、分子 X が非共有結合様式で分子 Y に結合することを意味する）。結合相互作用は、解離定数（ K_d ）、例えば $10^{-6} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $10^{-12} M$ 、 $10^{-13} M$ 、 $10^{-14} M$ 、 $10^{-15} M$ の K_d もしくはこれより小さい K_d 、またはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲によって特徴付けることができる。 K_d は、環境条件、例えば pH および温度に依存し得る。「親和性」は、結合の強度を指し、結合親和性の増加は、より低い K_d と関連する。

20

【 0 0 5 8 】

第1の分子と第2の分子との結合に関して本明細書で使用される場合、「特異的」、「特異的に」または「特異性」という用語は、第1の分子と第2の分子との間の安定な複合体の認識、接触および形成と並んで、第1の分子および第2の分子の各々と存在し得る他の分子との間の安定な複合体の認識、接触および形成が実質的に少ないかまたは全くないことを指す。例示的な特異的結合は、抗体-抗原相互作用、細胞受容体-リガンド相互作用、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション、酵素基質相互作用等である。複合体の分子成分に関して本明細書で使用される場合、「特異的」という用語は、その成分がその成分の一部である特定の複合体へのその成分の固有の会合を指す。ポリヌクレオチドの配列に関して本明細書で使用される場合、「特異的」という用語は、相補的配列である単一のポリヌクレオチドとの配列の固有の関連を指す。「安定な複合体」とは、検出可能であり、任意のレベルの安定性を必要としない複合体を意味するが、より高い安定性が一般に好ましい。炭酸脱水酵素 I V への標的化ペプチドの結合に関して本明細書で使用される場合、「特異的」、「特異的に」または「特異性」という用語は、炭酸脱水酵素 I V と安定な複合体を形成する標的化ペプチドの能力を指し、存在し得る炭酸脱水酵素 I V 以外の高分子への結合は実質的に少ないかまたは全くない。炭酸脱水酵素 I V への標的化ペプチドの結合に関して本明細書で使用される場合、「特異的」、「特異的に」または「特異性」という用語はまた、炭酸脱水酵素 I V が標的化ペプチドと安定な複合体を形成する能力を指し、存在し得る同定された標的化ペプチド以外の候補ペプチドへの結合は実質的に少ないかまたは全くない。

30

40

【 0 0 5 9 】

「AAV」または「アデノ随伴ウイルス (adenovirus-associated virus)」という用語は、ウイルスのパルボウイルス科属内のデベンドパルボウイルス属を指す。例えば、AAV は、天然に存在する「野生型」ウイルスに由来する AAV、天然に存在するキャップ遺伝子によってコードされるカプシドタンパク質に由来するカプシドにパッケージングされた rAAV ゲノムに由来する AAV、および/または非天然のカプシドキャップ遺伝子によってコードされるカプシドタンパク質に由来するカプシドにパッケージングされた rAAV ゲノムであり得る。AAV の非限定的な例としては、AAV 1 型 (AAV 1)、AAV 2 型 (AAV 2)、AAV 3 型 (AAV 3)、AAV 4 型 (AAV

50

4)、AAV5型(AAV5)、AAV6型(AAV6)、AAV7型(AAV7)、AAV8型(AAV8)、AAV9型(AAV9)、AAV10型(AAV10)、AAV11型(AAV11)、AAV12型(AAV12)、AAVタイプDJ(AAV-DJ)、鳥類AAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、およびヒツジAAVが挙げられる。いくつかの例では、AAVは、霊長類に感染するAAVを指す「霊長類AAV」として記載される。同様に、AAVはウシ動物(例えば、「ウシAAV」等)に感染し得る。いくつかの例では、AAVは野生型または天然に存在する。いくつかの例では、AAVは組換えである。

【0060】

本明細書で使用される場合、「AAVカプシド」という用語は、アデノ随伴ウイルスのカプシドタンパク質またはペプチドを指す。いくつかの例では、AAVカプシドタンパク質は、遺伝情報(例えば、異種核酸、導入遺伝子、治療用核酸、ウイルスゲノム)をカプシド化するように構成される。いくつかの例では、本開示のAAVカプシドはバリエーションAAVカプシドであり、これはいくつかの例では、親AAVカプシドタンパク質のアミノ酸配列において改変されている親または野生型AAVカプシドであることを意味する。

10

【0061】

本明細書で使用される場合、「AAVゲノム」という用語は、ウイルスに関連する遺伝情報をコードする核酸ポリヌクレオチドを指すことができる。ゲノムは、いくつかの例では、AAV逆方向末端反復(ITR)配列に隣接する核酸配列を含む。AAVゲノムは、組換え遺伝学法を使用して生成されたrAAVゲノムであり得、ITR配列を含むおよび/またはITR配列に隣接する異種核酸(例えば導入遺伝子)を含み得る。

20

【0062】

「rAAV」という用語は、「組換えAAV」を指す。いくつかの実施形態では、組換えAAVは、repおよびcap遺伝子の一部または全部が異種配列で置き換えられたAAVゲノムを有する。本明細書で互換的に使用される「AAV粒子」、「AAVナノ粒子」、または「AAVベクター」という用語は、AAV(ITR配列)に隣接する核酸配列を含む異種DNAポリヌクレオチドまたは「ゲノム」がパッケージングされたAAVカプシドを含むAAVウイルスまたはビリオンを指す。場合によっては、AAV粒子は、親AAV粒子に対して修飾されている。

【0063】

「cap遺伝子」という用語は、ウイルスのカプシドまたはタンパク質シェルを形成するか、その形成に寄与するカプシドタンパク質をコードする核酸配列を指す。AAVの場合、カプシドタンパク質はVP1、VP2またはVP3であり得る。他のパルボウイルスの場合、カプシドタンパク質の名称および数は異なり得る。

30

【0064】

「rep遺伝子」という用語は、ウイルスの複製および産生に必要な非構造タンパク質(rep78、rep68、rep52およびrep40)をコードする核酸配列を指す。

【0065】

「ネイティブ」および「野生型」という用語は、本明細書では互換的に使用され、存在する場合、それ自体の調節配列を有する天然に見られるポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドの形態を指すことができる。

40

【0066】

本明細書で使用される場合、「内因性」は、生物内または生物のゲノム内のその天然の位置にあるポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドのネイティブ形態を指す。「内因性ポリヌクレオチド」は、生物のゲノム内のその天然の位置にあるネイティブポリヌクレオチドを含む。「内因性遺伝子」は、生物のゲノム内の天然の位置にあるネイティブ遺伝子を含む。「内因性ポリペプチド」は、生物内のその天然の位置にあるネイティブポリペプチドを含む。

【0067】

50

本明細書で使用される場合、「異種」は、宿主生物に通常見られないが、宿主生物に導入されるポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドを指す。「異種ポリヌクレオチド」は、対応するネイティブポリヌクレオチドとは異なる形態で供給源生物に再導入されるネイティブのコード領域またはその一部を含む。「異種遺伝子」は、対応するネイティブ遺伝子とは異なる形態で供給源生物に再導入されるネイティブコード領域またはその一部を含む。例えば、異種遺伝子は、ネイティブ宿主に再導入される非ネイティブ調節領域を含むキメラ遺伝子の一部であるネイティブコード領域を含み得る。「異種ポリペプチド」は、対応するネイティブポリペプチドとは異なる形態で供給源生物に再導入されるネイティブポリペプチドを含む。対象の遺伝子およびタンパク質を他の遺伝子およびタンパク質に融合して、キメラまたは融合タンパク質を生成することができる。本開示の実施形態に従って有用な遺伝子およびタンパク質は、具体的に例示された全長配列だけでなく、これらの配列、そのバリエーション、突然変異体、キメラおよび融合物の部分、セグメントおよび/またはフラグメント（完全長分子と比較して連続したフラグメントならびに内部および/または末端の欠失を含む）も含む。

10

【0068】

本明細書で使用される場合、「外因性」遺伝子という用語は、個体のゲノム内に天然に存在しない全ての遺伝子を包含することを意味する。例えば、miRNAは、ウイルス、例えばAAVナノ粒子によって外因的に導入され得る。

【0069】

本明細書で使用される場合、「抗体」または「抗原結合ポリペプチド」は、抗原を特異的に認識して結合するポリペプチドまたはポリペプチド複合体を指す。抗体は、全抗体および任意の抗原結合フラグメントまたはその一本鎖であり得る。したがって、「抗体」という用語は、抗原に結合する生物学的活性を有する免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含む。そのようなものの例としては、重鎖もしくは軽鎖の相補性決定領域(CDR)もしくはそのリガンド結合部分、重鎖もしくは軽鎖可変領域、重鎖もしくは軽鎖定常領域、フレームワーク(FR)領域もしくはその任意の部分、または結合タンパク質の少なくとも1つの部分が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0070】

本明細書で使用される場合、「抗体フラグメント」または「抗原結合フラグメント」という用語は、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ 等の抗体の一部である。構造にかかわらず、抗体フラグメントは、インタクトな抗体によって認識される同じ抗原と結合する。「抗体フラグメント」という用語は、アプタマー、シュピーゲルマー(spiegelmeyer)、およびダイアボディを含む。「抗体フラグメント」という用語はまた、特定の抗原に結合して複合体を形成することによって抗体のように作用する任意の合成または遺伝子操作されたタンパク質を含む。

30

【0071】

本明細書で使用される場合、「対象」は、処置、観察または実験の対象である動物を指す。「動物」としては、冷血および温血動物の脊椎動物および無脊椎動物、例えば魚、甲殻類、爬虫類、特に哺乳動物が挙げられる。本明細書で使用される場合、「哺乳動物」は、哺乳綱に属する個体を指し、ヒト、飼育動物および家畜、動物園の動物、スポーツ動物およびペットの動物を含むがこれらに限定されない。哺乳動物の非限定的な例としては、マウス；ラット；ウサギ；モルモット；イヌ；ネコ；ヒツジ；ヤギ；ウシ；ウマ；霊長類、例えばサル、チンパンジーおよび類人猿、特にヒトが挙げられる。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。しかしながら、いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトではない。いくつかの実施形態では、対象は、げっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。いくつかの実施形態では、対象は、霊長類（例えば、ヒトまたはサル(monkey)）である。

40

【0072】

本明細書で使用される場合、「処置」という用語は、患者によって示される疾患、障害

50

または生理学的症状に応答して行われる介入を指す。処置の目的は、症候の緩和または予防、疾患、障害、または症状の進行または悪化の遅延または停止、および疾患、障害、または症状の寛解の1または複数を含み得るが、これらに限定されない。「処置する」および「処置」という用語は、例えば、治療的処置、予防的処置、および対象が障害または他の危険因子を発症するリスクを低下させる用途を含む。処置は、障害の完全な治癒を必要とせず、症候または根底にある危険因子を軽減する実施形態を包含する。いくつかの実施形態では、「処置」は、治療的処置および予防的または予防的措置の両方を指す。処置を必要とする者としては、疾患もしくは障害または望ましくない生理学的症状に既に罹患している者、ならびに疾患もしくは障害または望ましくない生理学的症状が予防されるべき者が挙げられる。本明細書で使用される場合、「予防」という用語は、後にそれらの症候を発現する個体の負担を軽減する任意の活性を指す。これは、一次、二次および/または三次予防レベルで行うことができ、a) 一次予防は症候/障害/症状の発症を回避する；b) 二次予防活動は、症状/障害/症候の処置の初期段階に向けられ、それにより、症状/障害/症候の進行および症候の出現を予防するための介入の機会を増加させる；ならびにc) 三次予防は、例えば、機能を回復させること、および/または任意の症状/障害/症候もしくは関連する合併症を減少させることによって、既に確立された症状/障害/症候の悪影響を減少させる。「予防する」という用語は、事象の可能性を100%排除することを必要としない。むしろ、これは、化合物または方法の存在下で事象の発生の可能性が低下したことを示す。

10

【0073】

20

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、有益または望ましい生物学的および/または臨床的結果をもたらすのに十分な量を指す。

【0074】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容され得る」担体という用語は、使用される投与量および濃度で曝露されている細胞または哺乳動物に対して非毒性であるものである。「薬学的に許容され得る」担体は、限定するものではないが、経口適用または注射等の選択された適用様式に適した有機または無機の固体または液体賦形剤であり得、従来の医薬製剤、例えば錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固体、および溶液、エマルジョン、懸濁液等の液体の形態で投与され得る。多くの場合、生理学的に許容され得る担体は、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液等のpH緩衝水溶液である。生理学的に許容され得る担体はまた、アスコルビン酸を含む抗酸化剤、低分子量(約10残基より少ない)ポリペプチド、血清アルブミン等のタンパク質、ゼラチン、免疫グロブリン、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、アミノ酸、グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む炭水化物、EDTA等のキレート剤、マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール、ナトリウム等の塩形成対イオン、ならびに例えばTween(商標)、ポリエチレングリコール(PEG)およびPluronic(商標)等の非イオン性界面活性剤の1または複数を含み得る。補助剤、安定剤、乳化剤、潤滑剤、結合剤、pH調整剤制御剤、等張剤および他の従来の添加剤も担体に添加され得る。

30

【0075】

血液脳関門(BBB)は、大きな分子を中枢神経系(CNS)に送達することに大きな課題を提示する。これは、一部には、BBB横断のための有効な標的が不足しているためであり、その同定は薬物開発の重要な第1のステップである。

40

【0076】

本明細書では、BBB横断を増強するためのBBB界面上の新規受容体(例えば、炭酸脱水酵素IV)、およびBBBの透過性を増加させ、作用物質を神経系に送達するためにそれを使用する関連方法(例えば、CNS)が開示される。本明細書ではまた、本明細書に開示されるBBB通過型受容体(例えば、炭酸脱水酵素IV)に結合することができる標的化ペプチドまたはその誘導体、および標的化ペプチドまたはその誘導体を含む組換えAAVベクター、抗体またはそのフラグメント、ペプチドまたはその誘導体を開示する。本明細書には、炭酸脱水酵素IVに対する結合特異性を有する標的化ペプチドを設計する

50

方法も開示される。炭酸脱水酵素ⅠⅤの同定および計算モデリングからの構造的洞察は、ヒト脳浸透性化学物質（薬物）および生物学的物質（遺伝子送達を含む）への新しい経路を提供する。

強化された血液脳関門横断のための受容体

【0077】

血液脳関門（BBB）は、中枢神経系（CNS）と血液との間の物質の交換を制御して、血液から脳への物質の制御されない漏出を防ぐ複雑で動的な適応可能な界面として浮上した。BBBの構造を構成する細胞には、主に脳内皮細胞が含まれ、これらは常にCNSの他の細胞（例えば、星状膠細胞、ミクログリア、ニューロン、肥満細胞および周皮細胞、ならびに循環免疫細胞）と通信し、CNSの必要性に役立つようにそれらの挙動を適合させ、病理学的症状に応答し、場合によっては疾患の発症、維持または進行に関与する。BBB機能の複雑さは、BBBを横断することができる薬物を開発する際の困難さの多くを説明する。BBBインターフェース上の受容体を利用することにより、BBBを横断する方法を提供することができる。

10

【0078】

本明細書では、BBB界面上の新規受容体、ならびにBBBの透過性を増加させ、BBBを越えて神経系に治療剤を送達する等、BBB横断およびCNS効力を増強するためにそれを使用する方法を開示する。いくつかの実施形態では、BBB横断を増強するための受容体は炭酸脱水酵素ⅠⅤである。いくつかの実施形態では、BBB通過型受容体はLy6c1である。いかなる理論にも束縛されるものではないが、本明細書に開示される新規標的受容体は、ヒト等の哺乳動物を含む様々な種にわたるBBB受容体媒介性トランスサイトosisの増強を促進し得る。

20

【0079】

いくつかの実施形態では、BBBの透過性を増加させる方法は、BBB通過型受容体（例えば、炭酸脱水酵素ⅠⅤまたはリンパ球抗原6複合体、遺伝子座C1（Ly6c1））に結合することができる標的化ペプチドを提供し、それによって（例えば、トランスサイトosisを介して）BBBの透過性を増加させることを含む。いくつかの実施形態では、BBB通過型受容体（例えば、炭酸脱水酵素ⅠⅤまたはLy6c1）の少なくとも1つの活性を、標的化ペプチドへの結合を通して低下させることができる。したがって、いくつかの実施形態では、BBBの透過性を増加させる方法は、炭酸脱水酵素ⅠⅤまたはLy6c1の活性を低下させ、それによってBBBの透過性を増加させることを含む。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、炭酸脱水酵素ⅠⅤの亜鉛結合部位（例えば、触媒ポケット）および基質結合部位の1または複数に結合する。炭酸脱水酵素ⅠⅤは、非ヒト霊長類およびヒトを含む脊椎動物炭酸脱水酵素ⅠⅤであり得る。いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素ⅠⅤは、マウス炭酸脱水酵素ⅠⅤ（Car4）、ヒト炭酸脱水酵素ⅠⅤ（CA4）、またはそのバリエーションもしくはホモログである。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、マウス種においてLy6c1に結合し、それにより、マウス種における血液脳関門の透過性を増加させる。

30

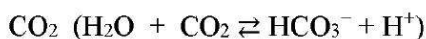
炭酸脱水酵素ⅠⅤ

【0080】

いくつかの実施形態では、BBBを横切る医薬品の送達を促進することができる本明細書に開示されるBBB通過型受容体は、炭酸脱水酵素ⅠⅤである。炭酸脱水酵素ⅠⅤは、炭酸脱水酵素ファミリー（亜鉛金属酵素のファミリー）に属するアイソザイムであり、

40

【化1】



の水和の可逆反応を触媒し、酵素が細胞内および細胞外の CO_2 、 H^+ 、および HCO_3^- 濃度を調節することを可能にする。炭酸脱水酵素は、呼吸、石灰化、酸塩基平衡、骨吸収、ならびに房水、脳脊髄液、唾液、および胃酸の形成を含む様々な生物学的過程に関与する。炭酸脱水酵素は、組織分布およびそれらの細胞内局在において広範な多様性を示す

50

。Ⅰ～ⅤⅠⅠと呼ばれる哺乳動物炭酸脱水酵素の少なくとも7つの遺伝的に異なるアイソザイムが存在し、その各々が水酸化亜鉛機構による二酸化炭素の可逆的水和を触媒する。炭酸脱水酵素によって調節される生理学的機能は、例えば、呼吸による肺における HCO_3^- の除去、腎臓における HCO_3^- の再利用、眼における房水の産生、脳における脳脊髄液、胃における胃液の産生、胆汁、および破骨細胞による骨吸収を含む。炭酸脱水酵素ファミリーのメンバーはまた、尿素形成、糖新生および脂質生成を含む代謝プロセスにおいて重要な役割を果たす。

【0081】

可溶性であるかまたは膜貫通ドメインによって原形質膜に結合している他の炭酸脱水酵素とは異なり、炭酸脱水酵素ⅠⅤはグリコシルホスファチジルイノシトール固定膜アイソザイムである。炭酸脱水酵素ⅠⅤは脊椎動物全体で広く保存されており、ヒトにおいて同様のCNS発現プロファイルを有し、ヒト脳血管系の最近の単一細胞分析により、ヒトBBBにおけるCA4の発現が確認された。炭酸脱水酵素ⅠⅤは、神経放電に関連し、イオンゲート型チャネルを介して神経機能に影響を及ぼし得るpHを調節することが示されている。

10

【0082】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される炭酸脱水酵素ⅠⅤは、ヒト炭酸脱水酵素ⅠⅤ(CA4)である。CA4は、皮質および小脳全体の脳内皮細胞の管腔表面に局在し、そこで二酸化炭素-重炭酸塩バランスを酵素的に調節することが知られている。ヒトCA4は、 CO_2 水和において「高い活性」を有し、 HCO_3^- の脱水を触媒することにおいて他のアイソザイムよりも高い活性を有する35-kDaのタンパク質として以前に特徴付けられている。一般に、ヒトCA4は、小胞体(ER)移行のためのタンパク質のN末端に18アミノ酸のシグナル配列を含み、細胞質CAと30~36%の相同性を示す活性部位アミノ酸残基を含む260アミノ酸の「CADメイン」を含む。C末端において、膜をスパンするのに十分な21アミノ酸の疎水性配列を含有する更なる27アミノ酸残基は、GPIアンカリングのための6アミノ酸シグナル配列によって先行される。アミノ酸残基Ser266は、GPIアンカーの結合部位として同定された。CA4前駆体に見られるC末端疎水性ドメインの除去は、GPIアンカリング、細胞表面発現、および酵素活性の実現に重要な影響を及ぼす。ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列に基づいて、ヒトCA4は、N-グリコシル化のための古典的なコンセンサス部位(Asn-XXX-Ser/Thr)を含まない。ヒトCA4はまた、オリゴ糖鎖を含有しないが、他の哺乳動物炭酸脱水酵素ⅠⅤ(例えば、マウス炭酸脱水酵素ⅠⅤ(Car4))は、1~数個のオリゴ糖側鎖を有する糖タンパク質である。

20

30

【0083】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される炭酸脱水酵素ⅠⅤは、マウス炭酸脱水酵素ⅠⅤ(Car4)である。Car4は、最近、脳における血漿タンパク質取り込みと最も強く正に相関するマウスタンパク質の中にあることが見出された(頻繁に標的化されるトランスフェリン受容体よりもわずかに強い)。この特性は、増強されたBBB横断の受容体を同定するのに有用である。Car4はまた、GI管、腎臓および肺、ならびに炭酸化の感知を可能にする味覚受容細胞において発現される。マウスCar4およびヒトCA4は高度に相同であり、酵素活性に重要な位置に同じアミノ酸を含有し(例えば、ヒスチジン残基64(His64))、例えば、マウスCar4はN結合糖タンパク質であり、マウスCar4によって触媒される CO_2 水和速度はヒトCA4よりもはるかに低いことを含むいくつかの違いがある。いかなる理論にも束縛されるものではないが、マウスCar4のより低い酵素活性は、いくつかの他のアミノ酸置換の中でも、Gln63によるヒトCA4のGly63の置換に関連し得る。マウスCar4とヒトCA4との別の違いは、マウスCar4において α ヘリックスを形成し、ヒトCA4において伸長ループを形成するVal-131-Asp-136セグメント(130のセグメント)である。

40

【0084】

いくつかの実施形態では、BBB横断を増強するための受容体として本明細書に開示さ

50

れる炭酸脱水酵素 I V (C a r 4) は、任意の炭酸脱水酵素 I V、例えばマウス C a r 4、ヒト C A 4、またはそれらの相同性もしくはバリエーションであり得る。炭酸脱水酵素 I V ホモログおよび/またはバリエーションは、マウス、ラット、ヒト、ウシ、ウサギ、サル、ブタ、ウマ、レイノボーマス、チンパンジー、リス、ニワトリ、ヤギおよびヒツジを含むがこれらに限定されない脊椎動物種に由来し得る。様々な種からの炭酸脱水酵素 I V ホモログは、例えば U n i P r o t、N C B I および S w i s s - P r o t を含む当業者に特定可能な公開データベースに見出すことができる。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態では、B B B 横断を増強するための受容体として本明細書に開示されるマウス C a r 4 は、配列番号 1 7 9 を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、B B B 横断を増強するための受容体として本明細書に開示されるヒト C A 4 は、配列番号 1 8 0 を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、B B B 横断を増強するための本明細書に開示される受容体は、ヒト C A 4 (例えば、配列番号 1 8 0) またはマウス C a r 4 (配列番号 1 7 9) の炭酸脱水酵素 I V ホモログまたはバリエーションである。炭酸脱水酵素 I V ホモログおよびバリエーションは、配列番号 1 7 9 または配列番号 1 8 0 の配列とほぼ同一であり得るか、または少なくとも 5 0 % (例えば、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはこれらの値の任意の 2 つの間の数もしくは範囲) 同一であり得る。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、本明細書に開示される炭酸脱水酵素 I V (例えば、マウス C a r 4、ヒト C A 4 またはその相同性もしくはバリエーション) に結合することができ、それによって(例えば、トランスサイトシスを介して) B B B の透過性を増加させる。いくつかの実施形態では、B B B の透過性の増加は、炭酸脱水酵素 I V 活性を変化させる(例えば、増加または減少)、例えばその活性を低下させることによって達成される。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、炭酸脱水酵素 I V 活性の改変は、亜鉛結合部位および疎水性基質結合ポケットを含む炭酸脱水酵素 I V の 1 または複数の活性部位への標的化ペプチド結合によって達成される。例えば、標的化ペプチドは、亜鉛結合部位、疎水性基質結合ポケット、またはその両方に結合することができる。

【 0 0 8 8 】

炭酸脱水酵素 I V 中の亜鉛結合部位は、少なくとも 3 つの H i s 残基によって形成された金属結合部位を有する β シート超構造によって支配された保存された構造を有する。いかなる理論にも束縛されるものではないが、亜鉛結合部位は、亜鉛が 3 つの H i s 残基および四面体幾何形状を有する水酸化物イオンによってリガンド結合されている 1 5 - の深さの円錐形活性部位裂隙の底部の β シートの 1 つの面上にあると考えられる。疎水性基質結合ポケットは、亜鉛結合水酸化物に隣接しており、その塩基に V a l、その首に V a l、T r p および L e u 等の嵩高い残基によって大部分が形成される。このポケットは、系統比較に基づいて、全ての活性アイソザイム間で高度に保存されている。いかなる理論にも束縛されるものではないが、疎水性ポケットは、効率的な触媒作用のための最小幅および深さを有すると考えられ、線形自由エネルギー関係は、ポケットの基部におけるアミノ酸残基の体積およびポケットの首部における残基の疎水性が活性にとって重要であることを示す。亜鉛結合部位および疎水性基質結合ポケットの両方が、炭酸脱水酵素アイソザイム間で高度に保存されている。

【 0 0 8 9 】

標的化ペプチドは、炭酸脱水酵素 I V の相互作用部位で 1 または複数の保存的アミノ酸

残基に結合することができる。いくつかの実施形態では、計算モデリング法（例えば、AlphaFold2多量体）を使用して、炭酸脱水酵素IV（例えば、マウスCar4）上のペプチド相互作用部位（例えば、ペプチドがAAVカプシドの一部である場合、AAV相互作用部位）を予測することができる。表1は、マウス炭酸脱水酵素IV上のAlphaFold2多量体予測AAV相互作用部位およびヒトCA4における対応する残基のリストを提供する。

【表1-1】

表1. AlphaFold2多量体によって予測されたマウスおよびヒト炭酸脱水酵素IV上の例示的なAAV相互作用部位			
マウスCar4 (U37091.1) 残基指数	pLDDT	接触原子数 (<5 オングストローム、非水素)	対応するヒトCA4 (NM_000717.5) 残基指数
S20	59.17	5	S21
G21	82.35	4	H22
W22	90.49	12	W23
L36	91.66	6	L37
W41	93.24	2	W42
P42	90.06	2	G43
E90	94.79	4	M92
V111	93.54	3	K113
Q112	94.05	4	Q114
H114	96.91	4	H116

10

20

【表1-2】

H139	98.17	4	H141
V141	95.98	3	V143
K143	92.39	5	E145
F156	93.28	4	Q158
L217	94.14	6	L224
T218	95.56	2	T225
T219	93.34	6	T226
P220	89.71	6	P227
N221	87.81	6	T228
D223	90.74	3	D231
W228	98.7	2	W236

30

【0090】

いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号179のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素IVにおけるS20、G21、W22、L36、W41、P42、E90、V111、Q112、H114、H139、V141、K143、F156、L217、T218、T219、P220、N221、D223またはW228と機能的に等価な1または複数の位置と相互作用することができる。いくつかの実施形態では、標的ペプチドは、配列番号180のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素IVにおけるS21、H22、W23、L37、W42、G43、M92、K113、Q114、H116、H141、V143、E145、Q158、L224、T225、T226、P227、T228、D231またはW236と機能的に等価な1または複数の位置と相互作用することができる。

40

リンパ球抗原6

【0091】

いくつかの実施形態では、マウス種において標的化ペプチドに結合するとBBB横断を増強することができる本明細書に開示されるBBB通過型受容体は、リンパ球抗原6複合体、遺伝子座C1(Ly6c1)である。Ly6c1は、グリコシルホスファチジルイノ

50

シトールアンカー（GPIアンカー）タンパク質であり、GPIアンカー表面糖タンパク質のLy6ファミリーに属する。リンパ球抗原6またはウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体として知られるLy6は、共通の構造を共有するが、それらの組織発現パターンおよび機能が異なる密接に関連したマウス糖タンパク質のファミリーである。Ly6ファミリータンパク質は、三本指構造モチーフを形成する別個のジスルフィド架橋を可能にする特定の間隔パターンで配置された10個のシステインを含む80アミノ酸ドメインであるLUドメインを特徴とする構造的に関連したタンパク質である。Ly6c1は、例えばインシリコ設計と組み合わせて指向性進化を使用してLy6c1に対する増強されたAAVカプシドを設計することを含む、マウスにおける強力な研究ツールとして役立つ新規受容体として使用することができる。

10

【0092】

いくつかの実施形態では、増強されたBBB横断に対する受容体として本明細書に開示されるLy6c1受容体は、マウスLy6c1またはその相同性もしくはバリエーションであり得る。いくつかの実施形態では、ハツカネズミ（Mus musculus）のLy6c1受容体は、配列番号293（UniProtアクセッション：P0CWO2）のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、BBB横断を増強するための本明細書に開示されるLy6c1受容体は、配列番号293の配列と約50%または少なくとも50%（例えば、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこれらの値の任意の2つの間の数もしくは範囲）同一であり得る。

20

【0093】

いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、本明細書に開示されるLy6c1に結合することができ、それによってマウス種におけるBBBの透過性を増加させる。マウス種は、ネズミ（Muridae）科、ネズミ（Murinae）亜科、ハツカネズミ（Mus）属および/またはハツカネズミ（Mus）亜属の種から選択することができる。

標的化ペプチドおよびインシリコスクリーニング

30

【0094】

BBBの透過性を増加させ、BBBを越えて神経系に医薬品を送達するために本明細書に記載の受容体を使用する方法は、本明細書に開示のBBB通過型受容体（例えば、Ly6c1または炭酸脱水酵素IV）に結合することができる標的化ペプチド、またはBBB通過型受容体（例えば、Ly6c1またはCar4およびCA4等の炭酸脱水酵素IV）に対する結合特異性を有する標的化ペプチドを提供することを含む。

炭酸脱水酵素IVの標的化ペプチド

【0095】

いくつかの実施形態では、本方法は、炭酸脱水酵素IVに結合することができる標的化ペプチド、または炭酸脱水酵素IV（例えば、Car4およびCA4）に対する結合特異性を有する標的化ペプチドを対象に提供することを含む。

40

【0096】

標的化ペプチドは、上記のように炭酸脱水酵素IVの亜鉛結合部位および/または疎水性基質結合ポケットに結合し、それによって炭酸脱水酵素IVの活性を変化させる（例えば、炭酸脱水酵素IV活性の低下）ことができる。標的化ペプチドの長さは、約、少なくともまたは最大で4~15（例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15）アミノ酸長であり得る。

【0097】

標的化ペプチドは、（1）配列番号11~12および配列番号70~174から選択されるアミノ酸配列；（2）配列番号11~12および配列番号70~174から選択され

50

るアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこれらの値の任意の2つの間の数もしくは範囲）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0098】

標的化ペプチドは、配列番号70～108から選択されるアミノ酸配列を含むことができる。標的化ペプチドは、配列番号70～86から選択されるアミノ酸配列を含むことができる。標的化ペプチドは、AKPTPLLLGLLQAQTG（配列番号70）、AKPTPLLLLLQAQTG（配列番号71）、AQPPLLGGLLQAQTG（配列番号72）、AKPPGPWAEQAQTG（配列番号73）、またはAQPPLLGLLQAQTG（配列番号74）から選択されるアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号70～74から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこれらの値の任意の2つの間の数もしくは範囲）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0099】

標的化ペプチドは、配列AKPTPLLLGLLQAQTG（配列番号70）からの少なくとも4個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、KPTP（配列番号181）、PTPL（配列番号182）、TPLL（配列番号183）、PLLG（配列番号184）、LLGL（配列番号185）、LGLL（配列番号186）またはGLLQ（配列番号187）の配列を含み得る。標的化ペプチドは、AKPTPLLLGLLQAQTG（配列番号70）の配列からの少なくとも5個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、KPTPL（配列番号188）、PTPLL（配列番号189）、TPLLG（配列番号190）、PLLGL（配列番号191）、LLGLL（配列番号192）またはLGLLQ（配列番号193）の配列を含み得る。標的化ペプチドは、AKPTPLLLGLLQAQTG（配列番号70）の配列からの少なくとも6個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、KPTPLL（配列番号194）、PTPLLGL（配列番号195）、TPLLGL（配列番号196）、PLLGLL（配列番号197）またはLLGLLQ（配列番号198）の配列を含み得る。標的化ペプチドは、AKPTPLLLGLLQAQTG（配列番号70）の配列からの少なくとも7個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、KPTPLLGL（配列番号199）、PTPLLGL（配列番号200）、TPLLGLL（配列番号201）またはPLLGLLQ（配列番号202）の配列を含み得る。標的化ペプチドは、AKPTPLLLGLLQAQTG（配列番号70）の配列からの少なくとも8個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、KPTPLLGLL（配列番号203）、PTPLLGLL（配列番号204）、またはTPLLGLLQ（配列番号205）の配列を含み得る。標的化ペプチドは、AKPTPLLLGLLQAQTG（配列番号70）の配列からの少なくとも9個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、KPTPLLGLL（配列番号206）またはPTPLLGLLQ（配列番号207）の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、AKPTPLLLGLLQAQTG（配列番号70）を含む。

【0100】

標的化ペプチドは、配列AKPTPLLLLLQAQTG（配列番号71）からの少なくとも4個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、KPTP（配列番号181）、PTPL（配列番号182）、TPLL（配列番号183）、PLLL（配列番号208）、LLLL（配列番号209）またはLLLQ（配列番号210）の配列を含み得る。標的化ペプチドは、AKPTPLLLLLQAQTG（配列番号71）の配列からの少なくとも5個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、KPTPL（配列番号188）、PTPLL（配列番号189）、TPLLL（配列番号211）

、 P L L L L (配列番号 2 1 2)、 L L L L L (配列番号 2 1 3) または L L L L Q (配列番号 2 1 4) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A K P T P L L L L L Q A Q T G (配列番号 7 1) の配列からの少なくとも 6 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、 K P T P L L (配列番号 1 9 4)、 P T P L L L (配列番号 2 1 5)、 T P L L L L (配列番号 2 1 6)、 P L L L L L (配列番号 2 1 7) または L L L L L Q (配列番号 2 1 8) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A K P T P L L L L L Q A Q T G (配列番号 7 1) の配列からの少なくとも 7 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、 K P T P L L L (配列番号 2 1 9)、 P T P L L L L (配列番号 2 2 0)、 T P L L L L L (配列番号 2 2 1) または P L L L L L Q (配列番号 2 2 2) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A K P T P L L L L L Q A Q T G (配列番号 7 1) の配列からの少なくとも 8 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、 K P T P L L L L (配列番号 2 2 3)、 P T P L L L L L (配列番号 2 2 4) または T P L L L L L Q (配列番号 2 2 5) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A K P T P L L L L L Q A Q T G (配列番号 7 1) の配列からの少なくとも 9 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、 K P T P L L L L L L (配列番号 2 2 6) または P T P L L L L L L Q (配列番号 2 2 7) の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、 A K P T P L L L L L L Q A Q T G (配列番号 7 1) を含む。

10

【 0 1 0 1 】

標的化ペプチドは、配列 A Q P P L G G L L A Q A Q T G (配列番号 7 2) からの少なくとも 4 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、 P P L G (配列番号 2 2 8)、 P L G G (配列番号 2 2 9)、 L G G L (配列番号 2 3 0)、 G G L L (配列番号 2 3 1)、 G L L A (配列番号 2 3 2) または L L A Q (配列番号 2 3 3) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A Q P P L G G L L A Q A Q T G (配列番号 7 2) の配列からの少なくとも 5 個の連続アミノ酸を含むことができる。例えば、標的化ペプチドは、 P P L G G (配列番号 2 3 4)、 P L G G L (配列番号 2 3 5)、 L G G L L (配列番号 2 3 6)、 G G L L A (配列番号 2 3 7) または G L L A Q (配列番号 2 3 8) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A Q P P L G G L L A Q A Q T G (配列番号 7 2) の配列からの少なくとも 6 個の連続アミノ酸を含むことができる。例えば、標的化ペプチドは、 P P L G G L (配列番号 2 3 9)、 P L G G L L (配列番号 2 4 0)、 L G G L L A (配列番号 2 4 1)、または G G L L A Q (配列番号 2 4 2) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A Q P P L G G L L A Q A Q T G (配列番号 7 2) の配列からの少なくとも 7 個の連続アミノ酸を含むことができる。例えば、標的化ペプチドは、 P P L G G L L (配列番号 2 4 3)、 P L G G L L A (配列番号 2 4 4)、または L G G L L A Q (配列番号 2 4 5) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A Q P P L G G L L A Q A Q T G (配列番号 7 2) の配列からの少なくとも 8 個の連続アミノ酸を含むことができる。例えば、標的化ペプチドは、 P P L G G L L A (配列番号 2 4 6) または P L G G L L A Q (配列番号 2 4 7) の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、 A Q P P L G G L L A Q A Q T G (配列番号 7 2) を含む。

20

30

【 0 1 0 2 】

標的化ペプチドは、配列 A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号 7 3) からの少なくとも 4 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、 K P P G (配列番号 2 4 8)、 P P G P (配列番号 2 4 9)、 P G P W (配列番号 2 5 0)、 G P W A (配列番号 2 5 1)、 P W A E (配列番号 2 5 2)、 W A E A (配列番号 2 5 3) または A E A Q (配列番号 2 5 4) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号 7 3) の配列からの少なくとも 5 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、 K P P G P (配列番号 2 5 5)、 P P G P W (配列番号 2 5 6)、 P G P W A (配列番号 2 5 7)、 G P W A E (配列番号 2 5 8)、 P W A E A (配列番号 2 5 9) または W A E A Q (配列番号 2 6 0) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、 A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号 7 3) の配列からの少なくとも 6 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、 K P P G P W (配列番号 2 6 1)、 P P G

40

50

P W A (配列番号 2 6 2)、P G P W A E (配列番号 2 6 3)、G P W A E A (配列番号 2 6 4) または P W A E A Q (配列番号 2 6 5) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号 7 3) の配列からの少なくとも 7 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、K P P G P W A (配列番号 2 6 6)、P P G P W A E (配列番号 2 6 7)、P G P W A E A (配列番号 2 6 8) または G P W A E A Q (配列番号 2 6 9) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号 7 3) の配列からの少なくとも 8 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、K P P G P W A E (配列番号 2 7 0)、P P G P W A E A (配列番号 2 7 1)、または P G P W A E A Q (配列番号 2 7 2) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号 7 3) の配列からの少なくとも 9 10 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、K P P G P W A E A (配列番号 2 7 3) または P P G P W A E A Q (配列番号 2 7 4) の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、A K P P G P W A E A Q A Q T G (配列番号 7 3) を含む。

【0103】

標的化ペプチドは、配列 A Q P P L L G G L A Q A Q T G (配列番号 7 4) からの少なくとも 4 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、P P L L (配列番号 2 7 5)、P L L G (配列番号 1 8 4)、L L G G (配列番号 2 7 6)、L G G L (配列番号 2 3 0)、G G L A (配列番号 2 7 7) または G L A Q (配列番号 2 7 8) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、A Q P P L L G G L A Q A Q T G (配列番号 7 4) の配列 20 からの少なくとも 5 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、P P L L G (配列番号 2 7 9)、P L L G G (配列番号 2 8 0)、L L G G L (配列番号 2 8 1)、L G G L A (配列番号 2 8 2)、または G G L A Q (配列番号 2 8 3) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、A Q P P L L G G L A Q A Q T G (配列番号 7 4) の配列からの少なくとも 6 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、P P L L G G (配列番号 2 8 4)、P L L G G L (配列番号 2 8 5)、L L G G L A (配列番号 2 8 6)、または L G G L A Q (配列番号 2 8 7) の配列を含み得る。標的化ペプチドは、A Q P P L L G G L A Q A Q T G (配列番号 7 4) の配列からの少なくとも 7 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、P P L L G G L (配列番号 2 8 8)、P L L G G L A (配列番号 2 8 9)、または L L G G L A Q (配列番号 2 9 0) の配列を含むこと 30 ができる。標的化ペプチドは、A Q P P L L G G L A Q A Q T G (配列番号 7 4) の配列からの少なくとも 8 個の連続アミノ酸を含み得る。例えば、標的化ペプチドは、P P L L G G L A (配列番号 2 9 1) または P L L G G L A Q (配列番号 2 9 2) の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、A Q P P L L G G L A Q A Q T G (配列番号 7 4) を含む。

L y 6 c 1 に対する標的化ペプチド

【0104】

いくつかの実施形態では、上記方法は、L y 6 c 1 に結合することができる標的化ペプチド、または対象 (例えば、マウス) において L y 6 c 1 に対する結合特異性を有する標的化ペプチドを提供することを含む。 40

【0105】

標的化ペプチドは、1) A Q F V V G Q S Y A Q (配列番号 6)、A Q R Y Q G D S V A Q (配列番号 7)、A Q W S T N A G Y A Q (配列番号 8)、A Q E R V G F A Q A Q (配列番号 9)、A Q W M T H G S A A Q (配列番号 10)、A Q W P T S Y D A A Q (配列番号 11)、D G S S S Y Y D A A Q (配列番号 12)、A Q G E N P G R W A Q (配列番号 13)、D G T G Q V T G W A Q (配列番号 14)、D G T G S T T G W A Q (配列番号 15)、および S P R Y K G D S V A Q (配列番号 57) から選択されるアミノ酸配列、または (2) A Q F V V G Q S Y A Q (配列番号 6)、A Q R Y Q G D S V A Q (配列番号 7)、A Q W S T N A G Y A Q (配列番号 8)、A Q E R V G F A Q A Q (配列番号 9)、A Q W M T H G S A A Q (配列番号 10)、A Q W P T S Y D A A Q (配列 50

番号 11)、D G S S S Y Y D A A Q (配列番号 12)、A Q G E N P G R W A Q (配列番号 13)、D G T G Q V T G W A Q (配列番号 14)、D G T G S T T G W A Q (配列番号 15)、および S P R Y K G D S V A Q (配列番号 57) から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0106】

いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、S P R Y K G D S V A Q のアミノ酸配列 (配列番号 57) または S P R Y K G D S V A Q と少なくとも (例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこれらの値の任意の 2 つの間の数もしくは範囲) 配列同一性を有するアミノ酸配列 (配列番号 57) を含む。

10

標的化ペプチドのインシリコスクリーニング

【0107】

本明細書には、炭酸脱水酵素 I V に対する結合特異性を有する標的化ペプチドを設計するための方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、(1) 配列番号 179 のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素 I V における S 20、G 21、W 22、L 36、W 41、P 42、E 90、V 111、Q 112、H 114、H 139、V 141、K 143、F 156、L 217、T 218、T 219、P 220、N 221、D 223 もしくは W 228 と機能的に等価な 1 もしくはそれを超える位置、または (2) 配列番号 180 のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素 I V における S 21、H 22、W 23、L 37、W 42、G 43、M 92、K 113、Q 114、H 116、H 141、V 143、E 145、Q 158、L 224、T 225、T 226、P 227、T 228、D 231 もしくは W 236 と機能的に等価な 1 もしくはそれを超える位置とそれぞれ相互作用することができる 1 または複数の標的化ペプチドをインシリコで生成することを含む。

20

【0108】

いくつかの実施形態では、1 または複数の標的化ペプチドを *in silico* で生成することは、*in silico* で複数の候補ペプチドを生成することと、炭酸脱水酵素 I V に結合する複数の候補ペプチドの各々についてコンピュータ支援ドッキングシミュレーションを実行することと、(1) 配列番号 179 のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素 I V における S 20、G 21、W 22、L 36、W 41、P 42、E 90、V 111、Q 112、H 114、H 139、V 141、K 143、F 156、L 217、T 218、T 219、P 220、N 221、D 223 もしくは W 228 と機能的に等価な 1 または複数の位置、または (2) 配列番号 180 のアミノ酸配列を有する炭酸脱水酵素 I V における S 21、H 22、W 23、L 37、W 42、G 43、M 92、K 113、Q 114、H 116、H 141、V 143、E 145、Q 158、L 224、T 225、T 226、P 227、T 228、D 231 もしくは W 236 と機能的に等価な 1 または複数の位置と相互作用することができる、1 または複数の標的化ペプチドを同定するために、1 または複数の候補ペプチドに結合する炭酸脱水酵素 I V の分子構造を分析することと、を含み得る。

30

【0109】

インシリコ法は、多数の候補ペプチドをスクリーニングし、所望の特異性を有する標的化ペプチドを同定するためのハイスループット手法を提供することができる。いくつかの実施形態では、候補ペプチドは、A A V カプシドタンパク質の一部を含むことができる。いくつかの実施形態では、候補ペプチドは、A A V カプシドタンパク質の一部である。この方法は、炭酸脱水酵素 I V (例えば、コンピュータ支援ドッキングシミュレーションを実行する工程) と複合体を形成した各候補ペプチドについて、1 または複数のペプチド受容体モデルを構築することを含み得る。分子モデルは、本明細書に記載されているかまたは当技術分野で公知の任意の合理的な計算ペプチド設計およびドッキング方法、データベース、プログラム、またはアルゴリズムを使用して、ペプチド-タンパク質複合体のために構築することができる。例示的なコンピュータシミュレーションモデリング方法、公開データベースおよびプログラムとしては、AlphaFold (例えば、github.com/

40

50

deepmind/alphafoldで入手可能な、DeepMindによって提供されるAlphaFold2およびAlphaFold-多量体)、RoseTTAFold(github.com/RosettaCommons/RoseTTAFold)、AutoDock、DOCK、FlexX、GOLD、OSPREY、SCWRL、PyMol、SWISS-MODEL(academic.oup.com/nar/article/46/W1/W296/5000024)、Protein Data Bank(PDB)(メンバー組織のウェブサイト、例えば、PDBe-pdbe.org、PDBj-pdbj.org、RCSB-rcsb.org/pdb、およびBMRB-bmrB.wisc.eduを介して利用可能)、Phyre2(nature.com/articles/nprot.2015.053)、およびRaptorX(nature.com/articles/nprot.2012.085)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

この方法は、PyMol、Qlucore Omics Explorer、WebMol、Insight II、Discovery Studio 2.1、および当業者に特定可能な他のもの等の視覚化ソフトウェアを使用して、候補ペプチドと炭酸脱水酵素IVとの間の相互作用に関連する特徴またはパラメータを評価することを更に含むことができる。評価される特徴またはパラメータは、界面エネルギーならびに物理的および幾何学的なスコアリングを含むことができる。候補ペプチドと炭酸脱水酵素IVとの間の相互作用に関連する特徴またはパラメータを評価することは、表面相補性、溶媒に接触可能な表面積、溶媒和自由エネルギー、静電相互作用エネルギー、ファンデルワールスエネルギーおよび/または全分子力学エネルギーを測定することを含むことができる。この方法はまた、各推定ペプチド-受容体複合体モデルにおいて、界面の原子の総数、炭酸脱水酵素IVと衝突しているペプチドの原子の総数、ペプチドの結合角、および/またはペプチドの結合深度を決定することを含み得る。この方法はまた、ペプチド-炭酸脱水酵素IV複合体の最低エネルギー立体配座を同定することを含み得る。各立体配座のエネルギースコアは、当業者によって理解されるように、静電エネルギー、脱溶媒和エネルギー、ファンデルワールスエネルギーを含む、ペプチドと炭酸脱水酵素IVとの間の相互作用エネルギーを計算することによって決定することができる。

【0111】

いくつかの実施形態では、標的化ペプチドに結合スコアを割り当て、結合スコアに基づいてランク付けすることができる。所望の標的化ペプチドを同定するために閾値を課すことができる。この方法は、炭酸脱水酵素IVに結合する複数の候補ペプチドの各々について結合スコアを得ること、および炭酸脱水酵素IVに対する結合特異性(または高い結合親和性)を有する標的化ペプチドとして、閾値を超える結合スコアを有する1または複数の複数の候補ペプチドを選択することを含み得る。

【0112】

結合スコアを生成するために、界面エネルギー、結合角度、および結合ポケット深度の計算を含む物理的および幾何学的スコアリングパラメータの組み合わせを使用することができる。いくつかの実施形態では、複数の候補ペプチド配列の各々についての結合スコアは、(1)候補ペプチドと炭酸脱水酵素IVとの界面における原子の総数をカウントすること、(2)候補ペプチド中の原子の総数をカウントすることであって、原子が炭酸脱水酵素IVと衝突している、候補ペプチド中の原子の総数をカウントすること、(3)候補ペプチドの結合角を得ること、および/または(4)候補ペプチドの結合深度を得ること、によって得られる。

【0113】

候補ペプチドと炭酸脱水酵素とのインターフェース原子の総数は、候補ペプチドの界面原子と炭酸脱水酵素のインターフェース原子との間のカットオフ距離内の原子の総数であり得る。カットオフ距離は、異なる実施形態では変化し得る。いくつかの実施形態では、カットオフ距離は、最大で約5オングストローム(例えば、2オングストローム、3オン

グストローム、4 オングストロームまたは5 オングストローム)である。候補ペプチドと炭酸脱水酵素ⅠⅤとの間のインターフェース原子の数は、異なる実施形態では異なり得る。例えば、インターフェース原子の数は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50個、もしくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50個であり得るか、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲であり得る。

【0114】

炭酸脱水酵素ⅠⅤと衝突するペプチド中の原子の総数は、衝突距離内の原子の総数であり得る。衝突距離は、ペプチド原子と受容体原子との間に幾何学的衝突が生じる距離として定義することができる。いくつかの実施形態では、衝突距離は約1 オングストロームであり得る。

10

【0115】

ペプチドの結合角は、炭酸脱水酵素ⅠⅤの重心から炭酸脱水酵素ⅠⅤのアンカーへのベクターと、炭酸脱水酵素の重心からペプチドの重心へのベクターとの間の角度として定義することができる。

【0116】

結合深度は、炭酸脱水酵素ⅠⅤの中心に対するペプチド上の最も近い点と、短径によって正規化された炭酸脱水酵素ⅠⅤの楕円体殻の短径との間の距離の差として定義することができる。

20

【0117】

結合スコアは、候補ペプチドと炭酸脱水酵素との界面における原子の総数および衝突した原子の総数に基づいて算出される接触スコアの和)、結合角および結合深度であり得る。いくつかの実施形態では、結合スコアは、0またはそれを超える。例えば、結合スコアは、接触スコア、結合角度および結合深度の合計が負である場合、0と定義される。炭酸脱水酵素ⅠⅤに結合する標的化ペプチドの結合スコアは、約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、またはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であり得る。

30

【0118】

いくつかの実施形態では、候補ペプチド

【数1】

($B_{\text{ペプチド}}$)

の結合スコアは、以下のように定義され得る。

【数2】

$$B_{\text{ペプチド}} = \max(B_{\text{ペプチド}}^{\text{エネルギー性}} + B_{\text{角}}^{\text{ペプチド}} + B_{\text{深度}}^{\text{ペプチド}}, 0) \quad (1)$$

40

$$B_{\text{エネルギー性}}^{\text{ペプチド}} = \max(N_{\text{接触}}^{\text{ペプチド}} \cdot 10^3 \cdot N_{\text{衝突}}^{\text{ペプチド}}, 0) \quad (2)$$

$$B_{\text{角}}^{\text{ペプチド}} = \begin{cases} -10^3 \cdot \left(1 - \frac{\theta}{\frac{\pi}{2}}\right)^{10}, & \text{if } \theta < \frac{\pi}{2} \\ 0, & \text{if } \frac{\pi}{2} \leq \theta \leq \pi \end{cases} \quad (3)$$

$$B_{\text{深度}}^{\text{ペプチド}} = 10^2 \cdot d^3 \quad (4)$$

50

【 0 1 1 9 】

この方法は、閾値を超える結合スコアを有する 1 または複数の候補ペプチドを、炭酸脱水酵素 I V に対する結合特異性を有する標的化ペプチドとして選択することを更に含むことができる。閾値は、ユーザによって定義された任意の値とすることができる。いくつかの実施形態では、閾値は、炭酸脱水酵素 I V に対する結合特異性を有することが知られている標的化ペプチドの結合スコアであることができる。いくつかの実施形態では、個々のペアワイズ競合からの結果 (2 つの競合ペプチド間の相対スコア) を、 A l p h a F o l d 2 ニューラルネットワークにコードされるそれらの受容体結合確率に従って候補ペプチドのセットをランク付けするペプチド競合メトリックに組み立てることができる。

【 0 1 2 0 】

表 2 は、 A u t o m a t e d P a i r w i s e P e p t i d e R e c e p t o r A n a l y s i s f o r S c r e e n i n g E n g i n e e r e d A A V (A P P R A I S E - A A V) によってランク付けされた標的化ペプチドの例示的なリストを提供し、その詳細は本開示の実施例 1 および 3 に記載されている。表 2 の B _ P O I は、目的の各ペプチドの結合スコアである。表 2 中のペプチド配列は、 A A V 9 残基 A 5 8 7 で始まり、残基 G 5 9 4 で終わるアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2: APPRAISE-AAVランク付けされたヒト炭酸脱水酵素 IV- 相互作用する操作された AAV			
ランク	ペプチド配列	B POI	配列番号
1	AKPTPLLGLLQAQTG	113.5	70
2	AKPTPLLLLLQAQTG	99.4	71
3	AQPPLGGLLAQAQTG	88.2	72
4	AKPPGPWAEAQAQTG	86.3	73
5	AQPPLLGGLAQAQTG	86.1	74
6	AQPPGPWAAAQAQTG	81.5	75
7	AQPPGPYAVAQAQTG	79.1	76
8	ASSETATWATQAQTG	79.0	77
9	AQPPGPWAVAQAQTG	76.4	78
10	AQAGGDYDAVQAQTG	76.1	79
11	AQGASGIDQAQAQTG	76.0	80
12	AKPPSPWAEAQAQTG	74.7	81
13	AQGGGEYEEVQAQTG	73.9	82
14	AQAKGLYEAVQAQTG	73.2	83
15	AQPPGPWAEAQAQTG	71.4	84
16	AKPTPLLKLLQAQTG	71.1	85
17	AQAGGDYEAVQAQTG	70.7	86
18	AQPPPLGGLAQAQTG	69.6	87
19	AQPKGPPWAEAQAQTG	69.3	88
20	AQAGGEYEEAQAQTG	67.4	89
21	AQGKGLYEEALAQTG	67.0	90
22	AQAKGDYEAALAQTG	66.0	91
23	AKPPSPWAKAQAQTG	65.9	92
24	AQGGGDYEAALAQTG	63.3	93
25	AQGKGDYEAALAQTG	59.8	94
26	AKPPPLLLLLQAQTG	57.3	95
27	AKPPGPFAKAQAQTG	56.8	96
28	AQPKGPPYAEAQAQTG	56.5	97
29	AQPPGPYAEAQAQTG	54.8	98
30	AQGGAEVLTAQAQTG	54.5	99
31	AQGKGLYEAVQAQTG	54.5	100
32	AKPPGPWAKAQAQTG	53.9	101
33	AKPPGPFAEAQAQTG	53.5	102
34	AQAGGDYEAALAQTG	53.1	103
35	AKPPSPFAEAQAQTG	52.3	104
36	AQNKKMYYYAQAQTG	51.4	105
37	AQGGGDYEAVQAQTG	51.2	106

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

38	AQGKGLYEEVQAQTG	51.1	107
39	AKPPSPFAKAQAQTG	50.7	108
40	AQPPLGGGLAQAQTG	49.5	109
41	AQGGGEYEEALAQTG	49.1	110
42	AQAKGLYEALAQTG	47.6	111
43	AQGGGEYEEAQAQTG	46.9	112
44	AQKGKGYWYGQAQTG	46.4	113
45	AQAKGLYEEAQAQTG	46.1	114
46	AQAKGLYEEVQAQTG	45.1	115
47	AQGKGLYEEAQAQTG	45.1	116
48	AQKGGDYEA VQAQTG	43.8	117
49	AQAKGLYEEALAQTG	43.2	118
50	AKPPGPYAEAQAQTG	41.2	119
51	AQAKGLYEEAQAQTG	41.1	120
52	AQNMTAAHYAQAQTG	39.8	121
53	AQAGGEYEEALAQTG	39.2	122
54	AQNDKMYWYGQAQTG	39.1	123
55	AQNDKMYEAAQAQTG	38.5	124
56	AQGKGLYEEAQAQTG	38.1	125
57	AQAKGDYEEAQAQTG	37.9	126
58	AQGGGDYDAALAQTG	37.6	127
59	AQAGGDYDAALAQTG	37.1	128
60	AQAKGDYEA VQAQTG	37.0	129
61	AQAKNPAQPALAQTG	36.7	130
62	AQEDKVYDAAQAQTG	36.4	131
63	AQGKGLYEEALAQTG	35.8	132
64	AQKGGDYEEAQAQTG	35.7	133
65	AQNGGMYAAAQAQTG	29.8	134
66	AQNGKGYAYAQAQTG	29.8	135
67	AQAGGEYEEVQAQTG	29.7	136
68	AQGGKGYAYAQAQTG	29.4	137
69	AKPPGPYAKAQAQTG	29.3	138
70	AKPPSPYAEAQAQTG	27.6	139
71	AQPPGPAAEAQAQTG	27.1	140
72	AQPPGPYAAAQAQTG	26.2	141
73	AQPPGPAAVAQAQTG	25.9	142
74	AKPPSPYAKAQAQTG	24.8	143
75	AQGNPAQPAQAQTG	24.2	144
76	AQAGGDYEEAQAQTG	23.0	145
77	AQNGKMYYYAQAQTG	22.5	146
78	AQGGGDYDAVQAQTG	22.4	147
79	AQNKKMYAAAQAQTG	22.0	148
80	AQGKGGYEEAQAQTG	19.5	149
81	AKPPSPSAKAQAQTG	18.1	150
82	AQGGKGYEYAQAQTG	17.8	151
83	AKPPGPAAKAQAQTG	17.7	152
84	AKPPGPSAEAQAQTG	17.6	153
85	AKPPSPAAEAQAQTG	16.9	154
86	AQAGGDYDAAQAQTG	16.6	155
87	AKPPGPSAKAQAQTG	16.2	156

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

88	AQGKNPAQPALAQTG	15.9	157
89	AQGNNPAKPALAQTG	15.3	158
90	AQGGGDYEAQAQTG	13.7	159
91	AQGKNPAQPVQAQTG	12.6	160
92	AKPPGPAAEAQAQTG	12.5	161
93	ATAPSGGGEGQAQTG	12.0	162
94	AKPPSPAAKAQAQTG	11.8	163
95	AQPKGPAEAQAQTG	10.1	164
96	AQPPGPAAAAQAQTG	8.8	165
97	AQGNNPAKPVQAQTG	8.5	166
98	AKPPSPSAEAQAQTG	8.2	167
99	AQGGGDYDAAQAQTG	6.9	168
100	AQANNPAKPVQAQTG	6.4	169
101	AHADERADTAQAQTG	5.5	170
102	AQANNPAKPALAQTG	4.9	171
103	ASAPPKEDSSQAQTG	4.1	172
104	AQAKNPAQPAQAQTG	3.1	173
105	AQAKNPAQPVQAQTG	2.9	174
106	AQGNNPAKPAQAQTG	0.0	175
107	AQANNPAKPAQAQTG	0.0	176
108	AQEGAESDSAQAQTG	0.0	177

10

20

抗体およびペプチド誘導体

【0121】

本明細書には、本明細書に開示のBBB通過型受容体（例えば、炭酸脱水酵素IVまたはLy6c1）に対する結合特異性を有するアミノ酸配列を含む抗体またはそのフラグメントも開示される。本明細書ではまた、本明細書に開示されるBBB通過型受容体（例えば、炭酸脱水酵素IVまたはLy6c1）に対する特異性を有するペプチド誘導体またはそのコンジュゲートを開示する。

【0122】

いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、Fcドメインを更に含むことができる。いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、一本鎖可変フラグメント（scFv）、単ドメイン抗体、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ヒト化抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、ジスルフィド結合Fv、scFv、単ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体、またはその機能的に活性なエピトープ結合フラグメントである。

30

【0123】

いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、炭酸脱水酵素IVに対する特異性を有する少なくとも1つのFabを含む二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、異なる抗原に向けられた別の結合部位を含むことができる。

40

【0124】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体またはそのフラグメントは、配列番号11～12および配列番号70～174から選択されるアミノ酸配列、または（2）配列番号11～12および配列番号70～174から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体またはそのフラグメントは、配列番号6～15および57から選択されるアミノ酸配列、または（2）配列番号6～15および57から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

50

【 0 1 2 5 】

いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、処置される対象、例えばヒトにおいて有害な免疫応答を誘発することができない。いくつかの実施形態では、本開示の抗体、そのフラグメント、バリエーションまたは誘導体は、当技術分野で認識されている技術を使用してそれらの免疫原性を低下させるように修飾される。例えば、抗体は、ヒト化抗体、霊長類化抗体、脱免疫化抗体またはキメラ抗体であり得る。

【 0 1 2 6 】

いくつかの実施形態では、抗体、そのフラグメント、バリエーションまたは誘導体は、抗体と天然には会合していない化学的部分を更に含むことができる。例えば、抗体またはそのフラグメントは、可撓性リンカーを含むことができ、または検出可能な標識等の機能性部分を付加するように修飾することができる。抗体、そのフラグメント、バリエーションまたは誘導体は、結合が抗体のエピトープへの結合を妨害または防止しないように、すなわち、抗体への化学的部分の共有結合または非共有結合によって修飾することができる。いくつかの実施形態では、化学的部分は、当技術分野で公知の任意の技術を使用して抗体にコンジュゲートさせることができる。

【 0 1 2 7 】

本開示はまた、本開示のペプチド、抗体、フラグメント、バリエーションまたは誘導体をコードする単離されたポリヌクレオチドまたは核酸分子を提供する。例えば、本開示のポリヌクレオチドは、同じポリヌクレオチド分子上または別個のポリヌクレオチド分子上の抗体、そのフラグメント、バリエーションまたは誘導体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードすることができる。いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、同じポリヌクレオチド分子上または別々のポリヌクレオチド分子上の抗体（例えば、CDR領域）、そのフラグメント、バリエーションまたは誘導体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の一部をコードすることができる。

B B Bを横切るペイロード送達

【 0 1 2 8 】

本明細書では、ペイロード（例えば、治療剤）を神経系に送達するための方法および送達系が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、炭酸脱水酵素I Vまたはその誘導体に結合することができる標的化ペプチドを提供することを含む。標的化ペプチドは、送達系の一部であり得、送達系は、神経系に送達されるペイロードを含み得る。この方法は、送達系を対象に投与することを更に含むことができる。

【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態では、送達系は、ナノ粒子、ナノチューブ、ナノワイヤ、デンドリマー、リボソーム、エトソームおよびアクアソーム、ポリマーソームおよびニオソーム、フォーム、ヒドロゲル、キューボソーム、量子ドット、エキソソーム、マクロファージ、ならびにそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、送達系は、脂質ベースのナノ粒子、ポリマーナノ粒子、無機ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、ナノワイヤ、シリカナノ粒子、ウイルス様粒子、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子、脂質ポリマー粒子、ナノリボタンパク質粒子、およびそれらの組み合わせから選択されるナノ粒子を含む。

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態では、送達系は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを含む。例えば、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターを含むことができる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターはAAVベクターであり、標的ペプチドはAAVベクターのカプシドタンパク質の一部であり得る。

アデノ随伴ウイルス（AAV）および組換えAAV（rAAV）

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態では、B B Bを横切ってペイロードを送達するための送達系はAAVベクターである。AAVは複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖DNAゲノムは

10

20

30

40

50

、１４５ヌクレオチド逆位末端反復（ＩＴＲ）を含む約４．７ｋｂの長さである。ＩＴＲは、ＡＡＶ ＤＮＡの宿主細胞ゲノムへの組み込みにおいて役割を果たす。ＡＡＶが宿主細胞に感染すると、ウイルスゲノムは宿主の染色体に組み込まれ、細胞の潜伏感染をもたらす。天然の系では、ヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス）は、感染細胞においてＡＡＶウイルスの産生を可能にする遺伝子を提供する。アデノウイルスの場合、遺伝子Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ４およびＶＡはヘルパー機能を提供する。ヘルパーウイルスに感染すると、ＡＡＶプロウイルスがレスキューされ、増幅され、ＡＡＶとアデノウイルスの両方が産生される。Ｒｅｐおよび／またはＣａｐ遺伝子を有さない組換えＡＡＶベクターの場合、ＡＡＶは非組込み型であり得る。

【０１３２】

10

いくつかの実施形態では、ＡＡＶベクターは、１または複数の目的のタンパク質のコード領域を含むことができる。ＡＡＶベクターは、５′ＡＡＶ ＩＴＲ、３′ＡＡＶ ＩＴＲ、プロモーター、および目的の１または複数のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの挿入を可能にするためのプロモーターの下流の制限部位を含むことができ、プロモーターおよび制限部位は、５′ＡＡＶ ＩＴＲの下流および３′ＡＡＶ ＩＴＲの上流に位置する。いくつかの実施形態では、ＡＡＶベクターは、制限部位の下流および３′ＡＡＶ ＩＴＲの上流に転写後レギュレーターエレメントを含む。

【０１３３】

ウイルスベクターは、ベクターを真核生物における複製および組込みに適したものにす
る更なる配列を含むことができる。他の実施形態では、本明細書に開示されるウイルスベ
クターは、ベクターを原核生物および真核生物の両方における複製および組込みに適した
ものにするシャトルエレメントを含むことができる。いくつかの実施形態では、ウイルス
ベクターは、プロモーターおよびエンハンサー等の更なる転写および翻訳開始配列、なら
びにポリアデニル化シグナル等の更なる転写および翻訳ターミネーターを含むことができ
る。ＡＡＶベクターに含めることができる様々な調節エレメントは、参照によりその全体
が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１２／０２３２１３３号に記載されて
いる。

20

【０１３４】

ＡＡＶカプシドタンパク質を誘導するために使用されるＡＡＶ血清型は変化し得る。Ａ
ＡＶカプシドは、ＡＡＶ９またはそのバリエーションに由来し得る。ＡＡＶカプシドは、Ａ
ＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、Ａ
ＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ヒト分離株ｈｕ．３１、ヒト分離株ｈｕ．３２、アカゲ
ザル分離株ｒｈ．８、およびアカゲザル分離株ｒｈ．１０から選択されるＡＡＶに由来し
得る。いくつかの実施形態では、ＡＡＶカプシドタンパク質は、ＡＡＶ９、ＡＡＶ９
Ｋ４４９Ｒ（またはＫ４４９Ｒ ＡＡＶ９）、ＡＡＶ１、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶ－ＤＪ、
ＡＡＶ－ＤＪ８、ＡＡＶ５、ＡＡＶＰＨＰ．Ｂ（ＰＨＰ．Ｂ）、ＡＡＶＰＨＰ．Ａ（Ｐ
ＨＰ．Ａ）、ＡＡＶＧ２Ｂ－２６、ＡＡＶＧ２Ｂ－１３、ＡＡＶＴＨ１．１－３２、ＡＡ
ＶＴＨ１．１－３５、ＡＡＶＰＨＰ．Ｂ２（ＰＨＰ．Ｂ２）、ＡＡＶＰＨＰ．Ｂ３（Ｐ
ＨＰ．Ｂ３）、ＡＡＶＰＨＰ．Ｎ／ＰＨＰ．Ｂ－ＤＧＴ、ＡＡＶＰＨＰ．Ｂ－ＥＳＴ、ＡＡ
ＶＰＨＰ．Ｂ－ＧＧＴ、ＡＡＶＰＨＰ．Ｂ－ＡＴＰ、ＡＡＶＰＨＰ．Ｂ－ＡＴＴ－Ｔ、Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｄ
Ｇ
Ｔ
－
Ｔ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｇ
Ｇ
Ｔ
－
Ｔ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｓ
Ｇ
Ｓ
、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ａ
Ｑ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｑ
Ｑ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｓ
Ｎ
Ｐ
（
３
）
、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｓ
Ｎ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｑ
Ｇ
Ｔ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｎ
Ｑ
Ｔ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｅ
Ｇ
Ｓ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｓ
Ｇ
Ｎ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｅ
Ｇ
Ｔ
、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｄ
Ｓ
Ｔ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｄ
Ｓ
Ｔ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｓ
Ｔ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｐ
Ｑ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｓ
Ｑ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｑ
Ｌ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｔ
Ｍ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｂ
－
Ｔ
Ｔ
Ｐ、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｓ
／
Ｇ
２
Ａ
１
２、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｇ
２
Ａ
１
５
／
Ｇ
２
Ａ
３
（
Ｇ
２
Ａ
３
）
、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｇ
２
Ｂ
４
（
Ｇ
２
Ｂ
４
）
、
Ａ
Ａ
Ｖ
Ｇ
２
Ｂ
５
（
Ｇ
２
Ｂ
５
）
、
Ｐ
Ｈ
Ｐ
．
Ｓ、
Ａ
Ａ
Ｖ
２、
Ａ
Ａ
Ｖ
２
Ｇ
９、
Ａ
Ａ
Ｖ
３、
Ａ
Ａ
Ｖ
３
ａ、
Ａ
Ａ
Ｖ
３
ｂ、
Ａ
Ａ
Ｖ
３
－
３、
Ａ
Ａ
Ｖ
４、
Ａ
Ａ
Ｖ
４
－
４、
Ａ
Ａ
Ｖ
６、
Ａ
Ａ
Ｖ
６
．
１、
Ａ
Ａ
Ｖ
６

30

40

50

. 2、AAV 6 . 1 . 2、AAV 7、AAV 7 . 2、AAV 8、AAV 9 . 1 1、AAV
 9 . 1 3、AAV 9 . 1 6、AAV 9 . 2 4、AAV 9 . 4 5、AAV 9 . 4 7、AAV
 9 . 6 1、AAV 9 . 6 8、AAV 9 . 8 4、AAV 9 . 9、AAV 1 0、AAV 1 1、
 AAV 1 2、AAV 1 6 . 3、AAV 2 4 . 1、AAV 2 7 . 3、AAV 4 2 . 1 2、A
 AV 4 2 - 1 b、AAV 4 2 - 2、AAV 4 2 - 3 a、AAV 4 2 - 3 b、AAV 4 2 -
 4、AAV 4 2 - 5 a、AAV 4 2 - 5 b、AAV 4 2 - 6 b、AAV 4 2 - 8、AAV
 4 2 - 1 0、AAV 4 2 - 1 1、AAV 4 2 - 1 2、AAV 4 2 - 1 3、AAV 4 2 - 1
 5、AAV 4 2 - a a、AAV 4 3 - 1、AAV 4 3 - 1 2、AAV 4 3 - 2 0、AAV
 4 3 - 2 1、AAV 4 3 - 2 3、AAV 4 3 - 2 5、AAV 4 3 - 5、AAV 4 4 . 1、
 AAV 4 4 . 2、AAV 4 4 . 5、AAV 2 2 3 . 1、AAV 2 2 3 . 2、AAV 2 2 3 10
 . 4、AAV 2 2 3 . 5、AAV 2 2 3 . 6、AAV 2 2 3 . 7、AAV 1 - 7 / r h .
 4 8、AAV 1 - 8 / r h . 4 9、AAV 2 - 1 5 / r h . 6 2、AAV 2 - 3 / r h .
 6 1、AAV 2 - 4 / r h . 5 0、AAV 2 - 5 / r h . 5 1、AAV 3 . 1 / h u . 6
 、AAV 3 . 1 / h u . 9、AAV 3 - 9 / r h . 5 2、AAV 3 - 1 1 / r h . 5 3
 、AAV 4 - 8 / r 1 1 . 6 4、AAV 4 - 9 / r h . 5 4、AAV 4 - 1 9 / r h . 5
 5、AAV 5 - 3 / r h . 5 7、AAV 5 - 2 2 / r h . 5 8、AAV 7 . 3 / h u . 7
 、AAV 1 6 . 8 / h u . 1 0、AAV 1 6 . 1 2 / h u . 1 1、AAV 2 9 . 3 / b
 b . 1、AAV 2 9 . 5 / b b . 2、AAV 1 0 6 . 1 / h u . 3 7、AAV 1 1 4 .
 3 / h u . 4 0、AAV 1 2 7 . 2 / h u . 4 1、AAV 1 2 7 . 5 / h u . 4 2、AA
 V 1 2 8 . 3 / h u . 4 4、AAV 1 3 0 . 4 / h u . 4 8、AAV 1 4 5 . 1 / h u . 20
 5 3、AAV 1 4 5 . 5 / h u . 5 4、AAV 1 4 5 . 6 / h u . 5 5、AAV 1 6 1 .
 1 0 / h u . 6 0、AAV 1 6 1 . 6 / h u . 6 1、AAV 3 3 . 1 2 / h u . 1 7、A
 AV 3 3 . 4 / h u . 1 5、AAV 3 3 . 8 / h u . 1 6、AAV 5 2 / h u . 1 9、A
 AV 5 2 . 1 / h u . 2 0、AAV 5 8 . 2 / h u . 2 5、AAV A 3 . 3、AAV A 3
 . 4、AAV A 3 . 5、AAV A 3 . 7、AAV C 1、AAV C 2、AAV C 5、AAV
 F 3、AAV F 5、AAV H 2、AAV r h . 7 2、AAV h u . 8、AAV r h . 6 8
 、AAV r h . 7 0、AAV p i . 1、AAV p i . 3、AAV p i . 2、AAV r h .
 6 0、AAV r h . 4 4、AAV r h . 6 5、AAV r h . 5 5、AAV r h . 4 7、A
 AV r h . 6 9、AAV r h . 4 5、AAV r h . 5 9、AAV h u . 1 2、AAV H 6
 、AAV H - 1 / h u . 1、AAV H - 5 / h u . 3、AAV L G - 1 0 / r h . 4 0、30
 AAV L G - 4 / r h . 3 8、AAV L G - 9 / h u . 3 9、AAV N 7 2 1 - 8 / r h
 . 4 3、AAV C h . 5、AAV C h . 5 R 1、AAV c y . 2、AAV c y . 3、AA
 V c y . 4、AAV c y . 5、AAV C y . 5 R 1、AAV C y . 5 R 2、AAV C y .
 5 R 3、AAV C y . 5 R 4、AAV c y . 6、AAV h u . 1、AAV h u . 2、AA
 V h u . 3、AAV h u . 4、AAV h u . 5、AAV h u . 6、AAV h u . 7、AA
 V h u . 9、AAV h u . 1 0、AAV h u . 1 1、AAV h u . 1 3、AAV h u . 1
 5、AAV h u . 1 6、AAV h u . 1 7、AAV h u . 1 8、AAV h u . 2 0、AA
 V h u . 2 1、AAV h u . 2 2、AAV h u . 2 3 . 2、AAV h u . 2 4、AAV h
 u . 2 5、AAV h u . 2 7、AAV h u . 2 8、AAV h u . 2 9、AAV h u . 2 9
 R、AAV h u . 3 1、AAV h u . 3 2、AAV h u . 3 4、AAV h u . 3 5、AA40
 V h u . 3 7、AAV h u . 3 9、AAV h u . 4 0、AAV h u . 4 1、AAV h u .
 4 2、AAV h u . 4 3、AAV h u . 4 4、AAV h u . 4 4 R 1、AAV h u . 4 4
 R 2、AAV h u . 4 4 R 3、AAV h u . 4 5、AAV h u . 4 6、AAV h u . 4 7
 、AAV h u . 4 8、AAV h u . 4 8 R 1、AAV h u . 4 8 R 2、AAV h u . 4 8
 R 3、AAV h u . 4 9、AAV h u . 5 1、AAV h u . 5 2、AAV h u . 5 4、A
 AV h u . 5 5、AAV h u . 5 6、AAV h u . 5 7、AAV h u . 5 8、AAV h u
 . 6 0、AAV h u . 6 1、AAV h u . 6 3、AAV h u . 6 4、AAV h u . 6 6、
 AAV h u . 6 7、AAV h u . 1 4 / 9、AAV h u . t 1 9、AAV r h . 2、AA
 V r h . 2 R、AAV r h . 8、AAV r h . 8 R、AAV r h . 1 0、AAV r h . 1
 2、AAV r h . 1 3、AAV r h . 1 3 R、AAV r h . 1 4、AAV r h . 1 7、A50

AVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.
 .22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、
 AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.
 .36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.
 .39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1
 、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.
 .51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、A
 AAvrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh
 .64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh
 .74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R変異体、AAVrh8R R53 10
 3 A変異体、AAAV、BAAV、ヤギ AAV、ウシ AAV、AAVhE1.1、
 AAVhEr1.5、AAVhEr1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.1
 6、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr
 1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAV
 hEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhEr1.23
 、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV
 -LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK0
 6、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AA
 V-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK 20
 15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、A
 AV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、A
 AV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre
 -miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV
 SM10-2、AAV Shuff1e100-1、AAV Shuff1e100-3
 、AAV Shuff1e100-7、AAV Shuff1e10-2、AAV Sh
 uff1e10-6、AAV Shuff1e10-8、AAV Shuff1e100
 -2、AAV SM10-1、AAV SM10-8、AAV SM100-3、AAV
 SM100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、A
 AAvrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu
 .19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG 30
 -9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV
 54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、
 AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.
 43, 真型 AAV(ttAAV)、EGRENN AAV10、Japanese A
 AV10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr
 -7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5
 、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AA
 V CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr
 -E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV
 CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、A 40
 AV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6
 .10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、
 AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CH
 t-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AA
 V CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、A
 AV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、A
 AV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-
 B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV
 CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、
 AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd 50

- N 3、A A V C K d - N 4、A A V C K d - N 9、A A V C L g - F 1、A A V C L g - F 2、A A V C L g - F 3、A A V C L g - F 4、A A V C L g - F 5、A A V C L g - F 6、A A V C L g - F 7、A A V C L g - F 8、A A V C L v - 1、A A V C L v 1 - 1、A A V C l v 1 - 1 O、A A V C L v 1 - 2、A A V C L v - 1 2、A A V C L v 1 - 3、A A V C L v - 1 3、A A V C L v 1 - 4、A A V C l v 1 - 7、A A V C l v 1 - 8、A A V C l v 1 - 9、A A V

C L v - 2、A A V C L v - 3、A A V C L v - 4、A A V C L v - 6、A A V C L v - 8、A A V C L v - D 1、A A V C L v - D 2、A A V C L v - D 3、A A V C L v - D 4、A A V C L v - D 5、A A V C L v - D 6、A A V C L v - D 7、A A V C L v - D 8、A A V C L v - E 1、A A V C L v - K 1、A A V C L v - K 3、A A V C L v - K 6、A A V C L v - L 4、A A V C L v - L 5、A A V C L v - L 6、A A V C L v - M 1、A A V C L v - M 1 1、A A V C L v - M 2、A A V C L v - M 5、A A V C L v - M 6、A A V C L v - M 7、A A V C L v - M 8、A A V C L v - M 9、A A V C L v - R 1、A A V C L v - R 2、A A V C L v - R 3、A A V C L v - R 4、A A V C L v - R 5、A A V C L v - R 6、A A V C L v - R 7、A A V C L v - R 8、A A V C L v - R 9、A A V C S p - 1、A A V C S p - 1 O、A A V C S p - 1 1、A A V C S p - 2、A A V C S p - 3、A A V C S p - 4、A A V C S p - 6、A A V C S p - 7、A A V C S p - 8、A A V C S p - 8 . 1 0、A A V C S p - 8 . 2、A A V C S p - 8 . 4、A A V C S p - 8 . 5、A A V C S p - 8 . 6、A A V C S p - 8 . 7、A A V C S p - 8 . 8、A A V C S p - 8 . 9、A A V C S p - 9、A A V . h u . 4 8 R 3、A A V . V R - 3 5 5、A A V 3 B、A A V 4、A A V 5、A A V F 1 / H S C 1、A A V F 1 1 / H S C 1 1、A A V F 1 2 / H S C 1 2、A A V F 1 3 / H S C 1 3、A A V F 1 4 / H S C 1 4、A A V F 1 5 / H S C 1 5、A A V F 1 6 / H S C 1 6、A A V F 1 7 / H S C 1 7、A A V F 2 / H S C 2、A A V F 3 / H S C 3、A A V F 4 / H S C 4、A A V F 5 / H S C 5、A A V F 6 / H S C 6、A A V F 7 / H S C 7、A A V F 8 / H S C 8、A A V F 9 / H S C 9 から選択される A A V 血清型、それらのバリエーション、前述の A A V 血清型のいずれかのハイブリッドもしくはキメラ、またはそれらの任意の組み合わせに由来し得る。

【 0 1 3 5 】

A A V ベクターは、配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列、または配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の配列同一性（例えば、少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % またはそれ以上）を有するアミノ酸配列を有する A A V 9 であり得る。

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される A A V ベクターは、宿主細胞において目的のタンパク質を発現することができる組換え A A V ウイルスを産生するための、目的のタンパク質（例えば、標的化ペプチド）をコードする導入遺伝子を担持する A A V 移入ベクターとして使用することができる。したがって、組換え A A V ウイルス（r A A V）も本明細書中に開示される。r A A V は、本明細書に記載の A A V カプシドタンパク質を含むことができる。

【 0 1 3 7 】

r A A V は、キメラ A A V カプシドを含むことができる。「キメラ」A A V カプシドは、外因性アミノ酸またはアミノ酸配列を有するカプシドを指す。r A A V は、モザイク A A V カプシドを含み得る。「モザイク」A A V カプシドとは、各々が異なる A A V 血清型に由来する 2 またはそれを超えるカプシドタンパク質またはポリペプチドで構成されるカプシドを指す。r A A V は、場合によっては、第 1 の血清型から第 2 の血清型のカプシドへの逆方向末端反復配列（I T R）のパッケージングを指し、第 1 および第 2 の血清型は

同じではない、カプシド転換の結果であり得る。場合によっては、親 A A V 血清型バンのカプシド遺伝子はシュードタイプ化され、これは、第 1 の A A V 血清型（例えば、A A V 1）由来の I T R が第 2 の A A V 血清型（例えば、A A V 9）由来のカプシドに使用され、第 1 および第 2 の A A V 血清型が同じではないことを意味する。非限定的な例として、A A V 1 I T R および A A V 9 カプシドタンパク質を含む偽型 A A V 血清型が A A V 1 / 9 として示され得る。r A A V は、追加的または代替的に、外因性リガンド結合部分（例えば、受容体）を発現するように操作されたカプシド、または改変されたネイティブ受容体を含み得る。

【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態では、r A A V カプシドタンパク質は、A A V カプシドタンパク質の
10
のアミノ酸配列内の 1 または複数のアミノ酸の置換または挿入を含む。本明細書に記載の
r A A V カプシドタンパク質は、場合によっては、挿入または置換のアミノ酸位置におい
て野生型 A A V カプシドタンパク質と異種であるアミノ酸の挿入または置換を有する。い
くつかの実施形態では、アミノ酸は、挿入または置換のアミノ酸位置において野生型 A A
V カプシドタンパク質に対して内因性ではない。アミノ酸は、異なる A A V カプシドタン
パク質への置換の挿入と同じまたは同等のアミノ酸位置の天然に存在するアミノ酸であり
得る。本開示の操作された A A V カプシドタンパク質が産生される A A V カプシドタンパ
ク質は、「親」もしくは「野生型」A A V カプシドタンパク質、または「対応する修飾さ
れていないカプシドタンパク質」と呼ぶことができる。場合によっては、親 A A V カプシ
ドタンパク質は、A A V 1、A A V 2、r A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A
20
A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、および A A V 12 から選択され
る血清型を有する。A A V - 1 の完全ゲノムは、GenBank アクセッション番号 NC
__002077 で提供される；A A V - 2 の完全ゲノムは、GenBank アクセシ
ョン番号 NC__001401 および Srivastava ら、J. Virol., 45: 5
55 - 564 (1983) で提供される；A A V - 3 の完全ゲノムは、GenBank ア
クセッション番号 NC__1829 で提供される；A A V - 4 の完全ゲノムは、GenBa
nk アクセッション番号 NC__001829 で提供される；A A V - 5 ゲノムは、Gen
Bank アクセッション番号 AF085716 で提供される；A A V - 6 の完全ゲノムは
GenBank アクセッション番号 NC__001862 に提供されている；A A V - 7
30
および A A V - 8 ゲノムの少なくとも一部は、それぞれ GenBank アクセッション番
号 AX753246 および AX753249 で提供される；A A V - 9 ゲノムは、Gao
ら、J. Virol., 78: 6381 - 6388 (2004) で提供される；A A V -
10 ゲノムは Mol. Ther., 13 (1): 67 - 76 (2006) で提供される；
A A V - 11 ゲノムは、Virology, 330 (2): 375 - 383 (2004)
で提供される；A A V - 12 ゲノムの部分は、Genbank アクセッション番号 DQ8
13647 で提供される；A A V - 13 ゲノムの部分は、Genbank アクセッション
番号 EU285562 で提供される。A A V - DJ ゲノムの少なくとも一部は、Grim
m, D. ら、J. Virol., 82, 5887 - 5911 (2008) において提供され
る。

【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される r A A V ベクターは、炭酸脱水酵素 I
V に結合することができる、または炭酸脱水酵素 I V（例えば、Car4 または CA4）
に対する特異性を有する本明細書に記載の標的化ペプチドをコードする導入遺伝子を有す
ることができる。標的化ペプチドは、r A A V のカプシドの一部であり得る。本明細書に
は、A A V カプシドタンパク質も開示される。A A V カプシドタンパク質は、本明細書に
開示される標的化ペプチドを含むことができる。

【 0 1 4 0 】

カプシドタンパク質内の標的化ペプチドの位置は変化し得る。いくつかの実施形態では
、標的化ペプチドは、A A V 9 カプシドタンパク質の A A 586 - 595（例えば、A A
586 と A A 587 との間、A A 587 と A A 588 との間、A A 588 と A A 589 と
40
50

の間、A A 5 8 9 と A A 5 9 0 との間、A A 5 9 0 と A A 5 9 1 との間、A A 5 9 1 と A A 5 9 2 との間、A A 5 9 2 と A A 5 9 3 との間、A A 5 9 3 との間、A A 5 9 4 と A A 5 9 5 との間) 中の 2 つの隣接するアミノ酸または他の A A V カプシドタンパク質中のその機能的等価物の間に挿入することができる。A A V ベクターは、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 3 b、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V - D J、ヒト分離株 h u . 3 1、ヒト分離株 h u . 3 2、アカゲザル分離株 r h . 8、アカゲザル分離株 r h . 10、またはバリエーションから選択されるベクターである得る。いくつかの実施形態では、A A V ベクターは A A V 9 またはそのバリエーションもしくは誘導体である。例えば、A A V カプシドタンパク質は、配列番号 1 7 8 または配列番号 1 7 8 と少なくとも 8 0 % (例えば、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはこれらの値の任意の 2 つの間の数もしくは範囲) 同一のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

10

【0141】

標的化ペプチドは、A A V 9 カプシドタンパク質の A A 5 8 8 ~ 5 8 9 または他の A A V カプシドタンパク質中のその機能的等価物の間に挿入され得る。2 つの隣接するアミノ酸は、A A 5 8 8 ~ 5 8 9 であり得る。いくつかの実施形態では、標的化ペプチドは、A A V 9 カプシドタンパク質の A A 5 8 7 ~ 5 9 0、または他の A A V カプシドタンパク質中のその機能的等価物の間に挿入される。

20

【0142】

標的化ペプチドは、(1) 配列番号 1 1 ~ 1 2 および配列番号 7 0 ~ 1 7 4 から選択されるアミノ酸配列；(2) 配列番号 1 1 ~ 1 2 および配列番号 7 0 ~ 1 7 4 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % (例えば、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはこれらの値の任意の 2 つの間の数もしくは範囲) の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0143】

標的化ペプチドは、(1) 配列番号 6 ~ 1 5 および 5 7 から選択されるアミノ酸配列、(2) 配列番号 6 ~ 1 5 および 5 7 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % (例えば、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはこれらの値の任意の 2 つの間の数もしくは範囲) の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

30

【0144】

r A A V によって担持される標的化ペプチドと炭酸脱水酵素 I V との間の結合特異性は、多重化 C r e 組換えベースの A A V 標的化進化 (C R E A T E) 法 (M - C R E A T E) を用いてスクリーニングすることができる。M - C R E A T E において、r A A V 核酸は、2 つの l o x 配列が隣接する標識配列を含む。標的細胞 (例えば、脳内の内皮細胞) においてのみ発現される C r e リコンビナーゼをコードする遺伝子を有する r A A V を動物 (例えば、マウス) に投与する。標的細胞に入ることができる r A A V の標識配列は、標的細胞において発現される C r e リコンビナーゼによって反転される。標的細胞に対する特異性を欠く r A A V の核酸は C r e リコンビナーゼにアクセスできないので、その標識配列は反転されない。したがって、動物から回収された r A A V の核酸をシーケンシングした後、逆位標識配列を含む r A A V の標的化ペプチドは標的細胞に対して特異性を有する。M - C R E A T E 法は、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 1 6 6 9 2 6 号 A 1 に詳細に記載されており、その内容は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0145】

ウイルスベクターの作製は、例えば、S a m b r o o k ら (M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l . C o l d S p r i n g H a

50

rbor Laboratory Press, N. Y. (1989))に記載されているように、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製およびDNAシーケンシングの標準的な技術を含むがこれらに限定されない、当技術分野で周知の任意の適切な遺伝子工学技術を使用して達成することができる。ウイルスベクターは、任意の既知の生物のゲノムからの配列を組み込むことができる。配列は、それらのネイティブ形態で組み込むことができ、または所望の活性を得るために任意の方法で改変することができる。例えば、配列は、挿入、欠失または置換を含み得る。

ペイロード送達のためのAAVベクターおよびrAAVの使用

【0146】

本明細書に開示されるのは、対象の神経系等の標的環境へのペイロード（例えば、医薬品）の送達における使用のための組成物も含む。組成物は、（1）本明細書に開示されるAAVカプシドタンパク質および（2）対象の標的環境（例えば、神経系）に送達される作用物質を含むAAVを含むことができる。

【0147】

標的環境は、CNS、末梢神経系（PNS）、またはそれらの組み合わせであり得る。標的環境は、脳内皮細胞、ニューロン、脳内の毛細血管、脳内の細動脈、脳内の動脈、またはそれらの組み合わせであり得る。

【0148】

送達される作用物質は、核酸、ペプチド、小分子、アプタマー、またはそれらの組み合わせを含むことができる。本明細書に開示されるAAVベクターは、例えば核酸を送達するために、標的環境（例えば、CNS）に効果的に形質導入することができる。いくつかの実施形態では、核酸配列を神経系に送達する方法が提供される。タンパク質は、AAVのカプシドの一部であり得る。AAVは、神経系に送達される核酸配列を含み得る。次いで、AAVを対象に投与することができる。

【0149】

いくつかの実施形態では、標的環境（例えば、神経系）に送達される核酸配列は、神経系および/または送達の局所もしくは周囲の組織もしくは環境に何らかの用途または利益がある1または複数の配列を含む。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質をコードする核酸であり得る。核酸は、a) 栄養因子、成長因子または可溶性タンパク質をコードするDNA配列；b) その遺伝子に1または複数の遺伝子突然変異を持つヒトまたは動物にタンパク質機能を回復させるcDNA；c) 細胞の活性または状態を制御または改変するために使用され得るタンパク質をコードするcDNA；d) 細胞の状態を評価するために使用することができるタンパク質または核酸をコードするcDNA；e) 遺伝子編集のためのタンパク質またはガイドRNAをコードするcDNA；f) 相同組換えによるゲノム編集のためのDNA配列；g) 治療用RNAをコードするDNA配列；h) shRNAまたは人工miRNA送達系；およびi) 内因性遺伝子のスプライシングに影響を及ぼすDNA配列の1または複数の含むことができる。

【0150】

いくつかの実施形態では、ベクターはまた、対象の所望の細胞内におけるポリヌクレオチドによってコードされるRNA産物および/またはタンパク質産物の発現に影響を及ぼすための当業者に公知の調節制御エレメントを含むことができる。

【0151】

機能的には、ポリヌクレオチドの発現は、作動可能に連結された調節エレメントによって少なくとも部分的に制御可能であり得、そのエレメントは、ポリヌクレオチドの転写、ポリヌクレオチドによってコードされるRNAの輸送、プロセッシングおよび安定性、ならびに必要に応じて転写物の翻訳を調節する。発現制御エレメントの具体例はプロモーターであり、これは通常転写配列の5'に位置する。発現制御エレメントの別の例は、転写配列の5'もしくは3'または転写配列内に位置し得るエンハンサーである。調節エレメントの別の例は、マイクロRNAの認識配列である。調節エレメントの別の例は、イントロンならびにイントロンのスプライシングを調節するスプライスドナーおよびスプライスアク

セプター配列である。調節エレメントの別の例は、転写終結シグナルおよび／またはポリアデニル化配列である。

【 0 1 5 2 】

発現制御エレメントおよびプロモーターは、本明細書において「組織特異的発現制御エレメント／プロモーター」と称される、特定の組織または細胞型において活性なものを含む。組織特異的発現制御エレメントは、典型的には、特定の細胞または組織において活性である（例えば、肝臓、脳、中枢神経系、脊髄、眼、網膜または肺）。発現制御エレメントは、典型的には、特定の細胞、組織または器官型に固有の転写活性化タンパク質または転写の他の調節因子によって認識されるので、これらの細胞、組織または器官において活性である。

10

【 0 1 5 3 】

発現制御エレメントは、多くの異なる細胞型においてポリヌクレオチドの発現を駆動することができる遍在性または無差別性のプロモーター／エンハンサーも含む。そのようなエレメントとしては、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーター／エンハンサー配列、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター／エンハンサー配列、CMV、ニワトリβ-アクチン、ウサギβ-グロビン（CAG）プロモーター／エンハンサー配列、および様々な哺乳動物細胞型において活性な他のウイルスプロモーター／エンハンサー；ベータアクチン、ユビキチンまたはEF1アルファを含むがこれらに限定されない偏在的または無差別的に発現される哺乳動物遺伝子由来のプロモーター／エンハンサー配列；または自然界に存在しない合成エレメントが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 1 5 4 】

発現制御エレメントはまた、調節可能な様式で発現を付与することができ、すなわち、シグナルまたは刺激は、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を増加または減少させる。シグナルまたは刺激に応答して作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を増加させる調節可能なエレメントは、「誘導性エレメント」（すなわち、シグナルによって誘導される）とも呼ばれる。特定の例としては、ホルモン（例えば、ステロイド）誘導性プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。シグナルまたは刺激に応答して、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を減少させる調節可能なエレメントは、「抑制可能なエレメント」（すなわち、シグナルは発現を減少させ、その結果、シグナルが除去されるか、または存在しない場合、発現は増加する）と称される。典型的には、そのようなエレメントによって与えられる増加または減少の量は、存在するシグナルまたは刺激の量に比例し、シグナルまたは刺激の量が多いほど、発現の増加または減少が大きくなる。

30

【 0 1 5 5 】

異種核酸は、5' ITRおよび3' ITRを含むことができる。作用物質は、タンパク質（例えば、栄養因子、成長因子、または可溶性タンパク質）をコードするDNA配列を含むことができる。異種核酸は、例えばタンパク質またはRNA剤をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含むことができる。プロモーターは、ポリヌクレオチドの転写を誘導することができる。ポリヌクレオチドの転写は、転写物を生成することができる。異種核酸は、5' UTR、3' UTR、ミニプロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、1または複数のサイレンサーエフェクター結合配列、タンパク質分解シグナル、および内部リボソーム進入エレメント（IRES）の1または複数を含み得る。サイレンサーエフェクターは、マイクロRNA（miRNA）、前駆体マイクロRNA（pre-miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、ショートヘアピンRNA（shRNA）、それらの前駆体、それらの誘導體、またはそれらの組み合わせを含むことができる。サイレンサーエフェクターは、1または複数のサイレンサーエフェクター結合配列に結合することができ、それによって転写物の安定性を低下させ、および／または転写物の翻訳を低下させることができる。いくつかの実施形態では、サイレンシングエフェクターは1または複数のmiRNA結合部位（例えば、miR-122結合部位）を含む。miRNA結合部位は、典型的

40

50

には転写配列の3' UTRに位置する作動可能に連結された調節エレメントである。標的転写物(RNA誘導サイレンシング複合体、RISCとの複合体)へのmiRNAの結合は、翻訳阻害および/または転写物分解を介して標的転写物の発現を低下させることができる。

【0156】

ポリヌクレオチドは、転写物安定化エレメントを更に含むことができる。転写安定化エレメントは、ウッドチャック肝炎翻訳後調節エレメント(WPRE: woodchuck hepatitis post-translational regulatory element)、ウシ成長ホルモンポリアデニル化(bGH-polyA)シグナル配列、ヒト成長ホルモンポリアデニル化(hGH-polyA)シグナル配列、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。核酸は、RNA剤であり得るか、またはRNA剤をコードし得る。RNA剤は、dsRNA、siRNA、shRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA、stRNA、lncRNA、piRNAおよびsnoRNAを含み得る。RNA剤は、細胞における目的の遺伝子の発現の1または複数を阻害または抑制する。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、SOD1、MAPT、APOE、HTT、C9ORF72、TDP-43、APP、BACE、SNCA、ATXN1、ATXN2、ATXN3、ATXN7、SCN1A-SCN5AおよびSCN8A-SCN11Aから選択され得る。異種核酸は、1または複数の二次タンパク質をコードするポリヌクレオチドを更に含むことができ、タンパク質および1または複数の二次タンパク質は合成タンパク質回路の1または複数を含むことができる。異種核酸は、一本鎖AAV(ssAAV)ベクターまたは自己相補的AAV(scAAV)ベクターを含むことができる。

10

20

【0157】

プロモーターは、ユビキタスプロモーターを含むことができる。ユビキタスプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーター、CMVプロモーター、ウイルス性サルウイルス40(SV40)(例えば、早期または後期)、モロニーマウス白血病ウイルス(MoMLV)LTRプロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTR、RSVプロモーター、単純ヘルペスウイルス(HSV)(チミジンキナーゼ)プロモーター、ワクシニアウイルス由来のH5、P7.5およびP11プロモーター、伸長因子1-アルファ(EF1a)プロモーター、初期増殖応答1(EGR1)、フェリチンH(FerH)、フェリチンL(FerL)、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、真核生物翻訳開始因子4A1(EIF4A1)、熱ショック70kDaタンパク質5(HSPA5)、熱ショックタンパク質90kDaベータ、メンバー1(HSP90B1)、熱ショックタンパク質70kDa(HSP70)、β-キネシン(β-KIN)、ヒトROSA26遺伝子座、ユビキチンCプロモーター(UBC)、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、3-ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー、ヒトβ-アクチン(HBA)プロモーター、ニワトリβ-アクチン(CBA)プロモーター、CAGプロモーター、CBHプロモーター、またはそれらの任意の組み合わせから選択され得る。

30

【0158】

プロモーターは、テトラサイクリン応答性プロモーター、TREプロモーター、Tre3Gプロモーター、エクジソン応答性プロモーター、クメート応答性プロモーター、グルココルチコイド応答性プロモーター、およびエストロゲン応答性プロモーター、PPAR-γプロモーター、RU-486応答性プロモーター、またはそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない誘導性プロモーターであり得る。

40

【0159】

プロモーターは、組織特異的プロモーターおよび/または系統特異的プロモーターを含むことができる。組織特異的プロモーターは、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)

50

プロモーター、クレアチンキナーゼ (MCK) プロモーター、哺乳動物デスミン (DES) プロモーター、 α -ミオシン重鎖 (α -MHC) プロモーター、または心筋トロポニン T (cTnT) プロモーターであり得る。組織特異的プロモーターは、ニューロン特異的プロモーター、例えばシナプシン-1 (Syn) プロモーター、CaMKII α プロモーター、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII α プロモーター、チューブリン α I プロモーター、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター、血小板由来成長因子 β 鎖プロモーター、TRPV1 プロモーター、Nav1.7 プロモーター、Nav1.8 プロモーター、Nav1.9 プロモーター、またはAdvillin プロモーターであり得る。組織特異的プロモーターは、筋肉特異的プロモーター、例えばMCK プロモーターであり得るか、またはそれを含み得る。

10

【0160】

プロモーターは、イントロン配列を含むことができる。プロモーターは、双方向プロモーターおよび/またはエンハンサーを含むことができる。いくつかの実施形態では、エンハンサーはCMVエンハンサーである。対象の1または複数の細胞は、核酸配列(例えば、遺伝子)の内因性バージョンを含むことができ、プロモーターは、内因性バージョンのプロモーターを含むことができるか、またはそれに由来することができる。いくつかの実施形態では、対象の1または複数の細胞は、核酸配列の内因性バージョンを含み、配列は内因性バージョンに対して短縮されていない。

【0161】

プロモーターは、長さが様々であり得、例えば、1 kb より小さい場合がある。他の実施形態では、プロモーターは1 kb より大きい。プロモーターは、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800 bp の長さ、またはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲、または800 bp もしくはそれを超える長さを有することができる。プロモーターは、限定されないが、CNS等の標的組織において一定期間治療用遺伝子発現産物の発現を提供し得る。治療用遺伝子発現産物の発現は、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、8日、9日、10日、11日、12日、13日、2週間、15日、16日、17日、18日、19日、20日、3週間、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、1年、13ヶ月、14ヶ月、15ヶ月、16ヶ月、17ヶ月、18ヶ月、19ヶ月、20ヶ月、21ヶ月、22ヶ月、23ヶ月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年、55年、60年、65年、またはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲、または65年もしくはそれを超える期間にわたる場合がある。

20

30

40

【0162】

本明細書で使用される場合、「目的のタンパク質」は、天然に存在するタンパク質および天然に存在しないタンパク質を含む任意のタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、1または複数の目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本明細書に開示されるAAVベクターの1つに存在することができ、ポリヌクレオチドはプロモーター

50

と作動可能に連結されている。いくつかの例では、プロモーターは、宿主細胞（例えば、内皮細胞）における目的のタンパク質の発現を駆動することができる。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、抗タウ抗体、抗 A B 抗体および / または A p o E アイソフォームである。

【0163】

タンパク質は、芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素 (A A D C)、生存運動ニューロン 1 (S M N 1)、フラタキシン (F X N)、嚢胞性線維症膜貫通伝導制御因子 (C F T R)、第 X 因子 (F I X)、R P E 6 5、レチノイドイソメロヒドロラーゼ (R P E 6 5)、サルコグリカンアルファ (S G C A)、および筋小胞体 (s a r c o / e n d o p l a s m i c r e t i c u l u m) C a ²⁺ - A T P アーゼ (S E R C A 2 a)、A p o E 2、G B A 1、G R N、A S P A、C L N 2、G L B 1、S G S H、N A G L U、I D S、N P C 1、G A N、C F T R、G D E、O T O F、D Y S F、M Y O 7 A、A B C A 4、F 8、C E P 2 9 0、C D H 2 3、D M D、A L M S 1、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

10

【0164】

タンパク質は、疾患関連タンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態では、疾患関連タンパク質の発現レベルは、疾患の発生および / または進行と相関する。タンパク質は、メチル C p G 結合タンパク質 2 (M e C P 2)、D R K 1 A、K A T 6 A、N I P B L、H D A C 4、U B E 3 A、E H M T 1、染色体 9 q 3 4 . 3 上にコードされる 1 もしくはそれを超える遺伝子、N P H P 1、L I M K 1 染色体 7 q 1 1 . 2 3 上にコードされる 1 または複数の遺伝子、P 5 3、T P I 1、F G F R 1 および関連遺伝子、R A 1、S H A N K 3、C L N 3、N F - 1、T P 5 3、P F K、C D 4 0 L、C Y P 1 9 A 1、P G R N、C H R N A 7、P M P 2 2、C D 4 0 L G、それらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

20

【0165】

いくつかの実施形態では、核酸は、細胞の活性もしくは状態を制御もしくは監視するため、および / または細胞の状態を評価するためのタンパク質をコードする c D N A を含み得る。タンパク質は、蛍光活性、ポリメラーゼ活性、プロテアーゼ活性、ホスファターゼ活性、キナーゼ活性、S U M O 化活性、脱 S U M O 化活性、リボシル化活性、誘導体化活性、ミリストイル化活性、脱ミリストイル化活性、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。タンパク質は、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、D N A 修復活性、D N A 損傷活性、脱アミノ化活性、デイスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスボザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、グリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。タンパク質は、核局在化シグナル (N L S) または核外輸送シグナル (N E S) を含み得る。

30

【0166】

タンパク質は、C R E リコンビナーゼ、G C a M P、細胞療法成分、ロックダウン遺伝子療法成分、細胞表面露出エピトープ、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。タンパク質は、キメラ抗原受容体を含むことができる。タンパク質は、診断剤（例えば、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、増強緑色蛍光タンパク質 (E G F P)、黄色蛍光タンパク質 (Y F P)、増強黄色蛍光タンパク質 (E Y F P)、青色蛍光タンパク質 (B F P)、赤色蛍光タンパク質 (R F P)、T a g R F P、D r o n p a、P a d r o n、m A p p l e、m C h e r r y、m r u b y 3、r s C h e r r y、r s C h e r r y R e v、それらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせ）を含むことができる。

40

【0167】

いくつかの実施形態では、核酸は、遺伝子編集のためのタンパク質をコードする c D N A、もしくはガイド R N A、または相同組換えによるゲノム編集のための D N A 配列を含

50

むことができる。タンパク質は、プログラム可能なヌクレアーゼを含むことができる。いくつかの実施形態では、プログラム可能なヌクレアーゼは、SpCas9またはその誘導体；VREER、VQR、EQR SpCas9；xCas9-3.7；eSpCas9；Cas9-HF1；HypaCas9；evoCas9；HiFi Cas9；ScCas9；StCas9；NmCas9；SaCas9；CjCas9；CasX；Cas9 H940A ニッカーゼ；Cas12 およびその誘導体；dCas9-APOBEC1 融合物、BE3、およびdCas9-デアミナーゼ融合物；dCas9-Krab、dCas9-VP64、dCas9-Tet1、およびdCas9-転写調節因子融合物；Dcas9 蛍光タンパク質融合物；Cas13 蛍光タンパク質融合物；RCas9 蛍光タンパク質融合物；Cas13-アデノシンデアミナーゼ融合物から選択される。プログラム可能なヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）および/または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）を含むことができる。プログラム可能なヌクレアーゼは、化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）Cas9（SpCas9）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）Cas9（SaCas9）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEエフェクターヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、MegaTAL、Tev-m TALEN、MegaTev、ホーミングエンドヌクレアーゼ、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas100、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、CsF1、CsF2、CsF3、CsF4、Cpf1、C2c1、C2c3、Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas13a、Cas13b、Cas13c、それらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。異種核酸および/またはrAAVは、(i) 標的化分子および/または(ii) ドナー核酸をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。標的化分子は、プログラム可能なヌクレアーゼと会合することができる。標的化分子は、一本鎖DNAまたは一本鎖RNAを含み得る。標的化分子は、単一のガイドRNA（sgRNA）を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0168】

本明細書に開示されるrAAVは、本明細書に開示される1または複数の異種核酸を含むことができる。異種核酸は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。核酸は、RNA剤であり得るか、またはRNA剤をコードし得る。異種核酸は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含むことができる。本明細書に開示されるように、いくつかの実施形態では、遺伝子は適切な調節エレメントと作動可能に連結される。異種核酸の1または複数の遺伝子は、siRNA、shRNA、アンチセンスRNAオリゴヌクレオチド、アンチセンスmiRNA、トランスプライシングRNA、ガイドRNA、シングルガイドRNA、crRNA、tracrRNA、トランスプライシングRNA、プレmRNA、mRNA、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。異種核酸の1または複数の遺伝子は、1または複数の合成タンパク質回路成分を含むことができる。異種核酸の1または複数の遺伝子は、1または複数の合成タンパク質回路全体を含むことができる。異種核酸の1または複数の遺伝子は、2またはそれを超える合成タンパク質回路を含むことができる。

【0169】

タンパク質は、天然に存在するタンパク質および天然に存在しないタンパク質を含む任意のタンパク質であり得る。例としては、ルシフェラーゼ；蛍光タンパク質（例えば、GFP）；成長ホルモン（GH）およびそのバリエーション；インスリン様成長因子（IGF）およびそのバリエーション；顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）およびそのバリエーション；エリスロポエチン（EPO）およびそのバリエーション；インスリン、例えばプロインスリン

、プレプロインスリン、インスリン、インスリン類似体等；抗体およびそのバリエーション、例えばハイブリッド抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体；抗体の抗原結合フラグメント（F a bフラグメント）、抗体の一本鎖可変フラグメント（s c F Vフラグメント）；ジストロフィンおよびそのバリエーション；凝固因子およびそのバリエーション；嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（C F T R）およびそのバリエーション；ならびにインターフェロンおよびそのバリエーションが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 7 0 】

目的のタンパク質の例としては、ルシフェラーゼ；蛍光タンパク質（例えば、G F P）；成長ホルモン（G H）およびそのバリエーション；インスリン様成長因子（I G F）およびそのバリエーション；顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）およびそのバリエーション；エリスロポエチン（E P O）およびそのバリエーション；インスリン、例えばプロインスリン、プレプロインスリン、インスリン、インスリン類似体等；抗体およびそのバリエーション、例えばハイブリッド抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体；抗体の抗原結合フラグメント（F a bフラグメント）、抗体の一本鎖可変フラグメント（s c F Vフラグメント）；ジストロフィンおよびそのバリエーション；凝固因子およびそのバリエーション；C F T Rおよびそのバリエーション；ならびにインターフェロンおよびそのバリエーションが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 7 1 】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、治療用タンパク質またはそのバリエーションである。治療用タンパク質の非限定的な例としては、血液因子、例えば、 β -グロビン、ヘモグロビン、組織プラスミノゲン活性化因子、および凝固因子；コロニー刺激因子（C S F）；インターロイキン、例えば、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9等；成長因子、例えば、ケラチノサイト成長因子（G F）、幹細胞因子（S C F）、線維芽細胞成長因子（F G F、例えば塩基性F G Fおよび酸性F G F）、肝細胞成長因子（H G F）、インスリン様成長因子（I G F）、骨形成タンパク質（B M P）、上皮成長因子（E G F）、成長分化因子 - 9（G D F - 9）、ヘパトーマ由来成長因子（H D G F）、ミオスタチン（G D F - 8）、神経成長因子（N G F）、ニューロトロフィン、血小板由来成長因子（P D G F）、トロポポエチン（T P O）、トランスフォーミング成長因子アルファ（T G F - α ）、トランスフォーミング成長因子ベータ（T G F - β ）等；可溶性受容体、例えば、可溶性T N F - α 受容体、可溶性V E G F受容体、可溶性インターロイキン受容体（例えば、可溶性I L - 1受容体および可溶性I I型I L - 1受容体）、可溶性 γ / δ T細胞受容体、可溶性受容体のリガンド結合フラグメント等；酵素、例えば、 α -グルコシダーゼ、イミグルカーゼ、 β -グルコセレブロシダーゼ、アルグルセラゼ等；酵素活性化因子、例えば組織プラスミノゲン活性化因子；ケモカイン、例えば、I P - 10、インターフェロン - ガンマ（M i g）、G r o a / I L - 5、R A N T E S、M I P - 1 α 、M I P - 1 β 、M C P - 1、P F - 4等によって誘導されるモノカイン；血管新生剤、例えば、血管内皮成長因子（V E G F、例えば、V E G F 121、V E G F 165、V E G F - C、V E G F - 2）、トランスフォーミング成長因子ベータ、塩基性線維芽細胞成長因子、神経膠腫由来成長因子、アンジオゲニン、アンジオゲニン - 2等；抗血管新生剤、例えば、可溶性V E G F受容体；タンパク質ワクチン；神経活性ペプチド、例えば、神経成長因子（N G F）、ブラジキニン、コレシストキニン、ガスチン、セクレチン、オキシトシン、ゴナドトロピン放出ホルモン、ベータ - エンドルフィン、エンケファリン、サブスタンス P、ソマトスタチン、プロラクチン、ガラニン、成長ホルモン放出ホルモン、ボンベシン、ダイノルフィン、ワルファリン、ニューロテンシン、モチリン、チロトロピン、ニューロペプチド Y、黄体形成ホルモン、カルシトニン、インスリン、グルカゴン、バソプレシン、アンジオテンシン I I、チロトロピン放出ホルモン、血管作動性腸ペプチド、睡眠ペプチド等；血栓溶解剤；心房性ナトリウム利尿ペプチド；リラキシン；グリア線維酸性タンパク質；卵胞刺激ホルモン（F S H）；ヒトアルファ - 1アンチトリプシン；白血病抑制因子（L I F）；トランスフォーミング成長因子（T G F）；組織因子、黄体形成ホルモン；マ

10

20

30

40

50

クロファージ活性化因子；腫瘍壊死因子（TNF）；好中球走化性因子（NCF）；神経成長因子；メタロプロテアーゼ（*metalloproteinases*）の組織阻害剤；血管作用性腸ペプチド；アンジオゲニン；アンジオトロピン（*angiotropin*）；フィブリン；ヒルジン；IL-1受容体アンタゴニスト等が挙げられる。目的のタンパク質のいくつかの他の非限定的な例としては、毛様体神経栄養因子（CNTF）；脳由来神経栄養因子（BDNF）；ニューロトロフィン3および4/5（NT-3および4/5）；グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）；芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ（AADC）；第IX因子または第X因子等の血友病関連凝固タンパク質；ジストロフィンまたはミニジストロフィン（*nini-dystrophin*）；リソソーム酸リパーゼ；フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）；グルコース-6-ホスファターゼ、酸性マルターゼ、グリコーゲン脱分枝酵素、筋肉グリコーゲンホスホリラーゼ、肝臓グリコーゲンホスホリラーゼ、筋肉ホスホフルクトキナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ（例えば、PHKA2）、グルコーストランスポーター（例えば、GLUT2）、アルドラーゼA、 β -エノラーゼ、グリコーゲンシンターゼ等のグリコーゲン貯蔵疾患関連酵素；リソソーム酵素（例えば、ベータ-N-アセチルヘキソサミニダーゼA）；およびその任意のバリエーションが挙げられる。

10

【0172】

目的のタンパク質は、例えば、前述のタンパク質のいずれか等のタンパク質の活性フラグメント、2またはそれを超えるタンパク質の一部または全部を含む融合タンパク質、または前述のタンパク質のいずれかの全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。

20

【0173】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、2またはそれを超える目的のタンパク質のコード領域を含むポリヌクレオチドを含み、2またはそれを超える目的のタンパク質は、互いに同じであっても異なってもよい。いくつかの実施形態では、2またはそれを超える目的のタンパク質は、関連ポリペプチド、例えば同じ抗体の軽鎖および重鎖である。

【0174】

目的のタンパク質は、マルチサブユニットタンパク質であり得る。例えば、目的のタンパク質は、2またはそれを超えるサブユニット、または2またはそれを超える独立したポリペプチド鎖を含むことができる。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、限定されないが、様々なアイソタイプ（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG、IgA、IgD、IgEおよびIgM）の抗体を含む抗体；モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントを含む、当業者に公知の任意の手段によって産生されるモノクローナル抗体；ヒト化抗体；キメラ抗体；一本鎖抗体；Fv、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fabc、scFv等の抗体フラグメント（ただし、抗体が抗原に結合することができることを条件とする）であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は完全長抗体である。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は免疫アドヘシンではない。

30

【0175】

いくつかの実施形態では、得られた標的化分子は、長寿命細胞集団へのインビボ遺伝子導入適用に関連する方法および/または治療に使用することができる。いくつかの実施形態では、例えば、脊髄性筋萎縮症（SMA）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、フリードライヒ運動失調症、ポンベ病、ハンチントン病、アルツハイマー病、バテン病、リソソーム蓄積症、多形性膠芽腫、レット症候群、レーバー先天性筋萎縮症、慢性疼痛、脳卒中、脊髄損傷、外傷性脳損傷およびリソソーム蓄積障害を含めて、これらは、任意のrAAVベースの遺伝子治療に適用することができる。さらに、rAAVは、光遺伝学、遺伝子過剰発現、shRNAもしくはmiRNAによる遺伝子ノックダウン、miRNAスポンジもしくはデコイを使用した内因性miRNAの調節、条件付き遺伝子欠失のためのリコンビナーゼ送達、条件付き（リコンビナーゼ依存性）発現、またはCRISPR、TALEN、およびジンクフィンガーヌクレアーゼによる遺伝子編集等の非治療科学研究のための導入遺伝子のインビボ送達に使用することもできる。

40

50

【0176】

いくつかの実施形態では、遺伝子は、免疫応答（例えば、適応免疫応答）を刺激することができる免疫原性材料、例えば、病原体由来の抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードする。抗原の発現は、身体の適応免疫系を刺激して適応免疫応答を提供し得る。したがって、本明細書で提供される異種核酸のいくつかの実施形態は、（例えば、ワクチンとして）感染性疾患の予防または処置のためのワクチンとして使用することができると考えられる。

【0177】

本明細書に記載されるように、タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の発現効率を改善するために修飾することができる。本明細書における遺伝子の転写および/または翻訳を改善するために使用することができる方法は、特に限定されない。例えば、ヌクレオチド配列は、宿主（例えば、哺乳動物）における遺伝子発現（例えば、タンパク質産生）を増加させるために、宿主のコドン使用頻度をよりよく反映するように改変され得る。

【0178】

標的細胞における遺伝子発現の程度は様々であり得る。対象において発現されるタンパク質の量（例えば、被験体のCNS）は変動し得る。例えば、いくつかの実施形態では、タンパク質は、対象において、少なくとも約9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、少なくとも約900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または少なくとも約1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で発現され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、対象において、約9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲の量で発現される。当業者は、方法が有効であるためにタンパク質が必要とされる発現レベルが、特定のタンパク質および処置を受ける対象等の非限定的な因子に依存して変動し得、有効量のタンパク質が、過度の実験を行うことなく当業者に公知の従来の方法を使用して容易に決定され得ることを理解するであろう。

【0179】

作用物質は、細胞死の誘導剤であり得る。作用物質は、非内因性細胞死経路（例えば、細菌細胞形成毒素）によって細胞死を誘導することができる。いくつかの実施形態では、作用物質（例えば、核酸によってコードされるタンパク質）は、生存促進タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、作用物質は免疫系の調節物質である。作用物質は、適応免疫応答、自然免疫応答、またはその両方を活性化することができる。いくつかの実施形態では、核酸は、免疫応答（例えば、適応免疫応答）を刺激することができる免疫原性材料、例えば、病原体由来の抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードする。抗原の発現は、身体の適応免疫系を刺激して適応免疫応答を提供し得る。したがって、本明細書で提供される組成物のいくつかの実施形態は、（例えば、ワクチンとして）感染性疾患の予防または処置のためのワクチンとして使用することができると考えられる。タンパク質は、CREリコンビナーゼ、GCAMP、細胞療法成分、ノックダウン遺伝子療法成分、細胞表面露出エピトープ、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、CFTR、GDE、OTOF、DYSF、MYO7A、ABCA4、F8、CEP290、CDH23、DMDおよびALMS1を含む。

【0180】

作用物質は、RNA作用物質、例えばアンチセンスRNA、RNAi、shRNAおよびマイクロRNA（miRNA）、miRNAスポンジまたはデコイ、条件付き遺伝子欠

10

20

30

40

50

失のためのリコンビナーゼ送達、条件付き（リコンビナーゼ依存）発現（本明細書に記載の遺伝子編集成分に必要なものを含む）をコードする配列等の非タンパク質コード遺伝子を含むことができる。非タンパク質コード遺伝子はまた、tRNA、rRNA、tmRNA、piRNA、二本鎖RNA、snRNA、snoRNA、および/または長い非コードRNA（lncRNA）をコードし得る。いくつかの実施形態では、RNA剤は、非天然または修飾ヌクレオチド（例えば、プソイドウリジン）を含むことができる。いくつかの実施形態では、非タンパク質コード遺伝子は、標的遺伝子または遺伝子発現産物の発現または活性を調節することができる。例えば、本明細書中に記載されるRNAは、標的細胞、例えば、中枢神経系（CNS）における細胞における遺伝子発現を阻害するために使用される場合がある。いくつかの実施形態では、遺伝子発現の阻害は、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または100%の阻害を指す。場合によっては、標的遺伝子のタンパク質産物は、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または99%阻害される。遺伝子は、野生型遺伝子または少なくとも1つの突然変異を有する遺伝子のいずれかであり得る。標的タンパク質は、野生型タンパク質、または少なくとも1つの突然変異を有するタンパク質であり得る。

【0181】

治療用タンパク質をコードする遺伝子の例としては、シグナル伝達生化学経路に関連する配列、例えば、シグナル伝達生化学経路関連遺伝子またはポリヌクレオチド（例えば、シグナル伝達物質）が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法および組成物は、適切なバージョンのシグナル伝達物質を含むタンパク質の調節された発現を伴う内因性シグナル伝達物質のノックダウンを含む。本明細書で企図されるDNAまたはRNA配列の例としては、疾患関連遺伝子またはポリヌクレオチドの配列が挙げられる。「疾患関連」遺伝子またはポリヌクレオチドは、非疾患対照の組織または細胞と比較して、疾患に罹患した組織に由来する細胞において異常なレベルまたは異常な形態の転写産物または翻訳産物を生じている任意の遺伝子またはポリヌクレオチドを指す。それは、異常に高いレベルで発現されるようになる遺伝子であり得る。異常に低いレベルで発現されるようになる遺伝子であり得、ここで、改変された発現は、疾患の発生および/または進行と相関する。疾患関連遺伝子はまた、疾患の病因に関与する遺伝子と直接関与するかまたは連鎖不平衡にある突然変異または遺伝的変異を有する遺伝子を指す。転写または翻訳された産物は、既知または未知であり得、正常または異常なレベルであり得る。シグナル伝達物質は、1または複数の疾患または障害に関連し得る。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、本明細書に開示される1または複数のシグナル伝達物質の異常なシグナル伝達を特徴とする。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質の活性化レベルは、疾患または障害の発生および/または進行と相関する。シグナル伝達物質の活性化レベルは、疾患または障害の病因に直接的または間接的に関与し得る。

【0182】

多くのタンパク質（例えば、酵素）が分泌され、クロスコレクション（cross-correction effect）効果を発揮することができる。これらのために、本開示のAAVを使用して遺伝物質を脳内皮細胞に送達し、これらの細胞をバイオ工場に形質転換して治療薬を産生し、他の細胞型に分配することができる。例えば、脳内皮細胞における分泌されたSpargl1/Hevinタンパク質の産生は、Hevin KOマウスの視床皮質シナプス損失表現型を救済することができる（以下の実施例1を参照）。この概念実証は、酵素、抗体または他の生物学的治療薬の産生のための脳内皮細胞バイオファクトリーモデルを支援し、リソソーム蓄積障害のような疾患のための新規な治療アプローチを提供する。

【0183】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される1または複数の標的化ペプチドを含むカプシドタンパク質を有するrAAVを使用して、対象の標的環境中の特定の細胞型に遺伝子を送達することができる。例えば、rAAVは、対象（例えば、哺乳動物）の神経系

(P N S、C N S、またはその両方を含む) のニューロンおよびグリアに遺伝子を送達するために使用することができる。本明細書に開示される組成物および方法を、例えば、(i) 例えば、r A A V ゲノム内にハンチンチン特異的マイクロRNA発現カセットを組み込み、例えば脈管構造を介した送達のためにr A A V ゲノムをバリエーションr A A V にパッケージングすることによってハンチントン病を有する患者における変異体ハンチンチンの発現を減少させること、(i i) フラタキシン遺伝子の機能的コピーをフリードライヒ運動失調症を有する患者に送達すること、(i i i) 遺伝子突然変異のために酵素の発現を欠く患者 (例えば、ニーマン・ピック病、ムコ多糖症 I I I および / またはゴーシェ病の患者) において正常なリソソーム機能に重要な酵素の発現を回復させること、(i v) r A A V を使用して疾患の動物モデルを作製すること、またはそれらの組み合わせにおいて使用することができる。 10

【 0 1 8 4 】

必要とする対象は、慢性疼痛、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病 (H D)、アルツハイマー病 (A D)、パーキンソン病 (P D)、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、脊髄性筋萎縮症 I 型および I I 型 (S M A I および I I)、フリードライヒ運動失調症 (F A)、脊髄小脳失調症、多発性硬化症 (M S)、慢性外傷性脳症 (C T E)、H I V - 1 関連認知症、または C N S 内の細胞が関与するリソソーム蓄積障害の 1 または複数を持っているか、発症するリスクがある対象である。リソソーム蓄積障害は、クラッペ病、サンドホフ病、テイ・サックス病、ゴーシェ病 (I、I I または I I I 型)、ニーマン・ピック病 (N P C 1 または N P C 2 欠乏症)、ハーラー症候群、ポンベ病、またはバッテン 20

【 0 1 8 5 】

いくつかの実施形態では、対象は、急性症状または損傷に罹患している。必要とする対象は、脳卒中、外傷性脳損傷、てんかんまたは脊髄損傷に罹患している、発症するリスクがある、または罹患している対象であり得る。

医薬組成物および投与方法

【 0 1 8 6 】

本明細書に開示される 1 または複数の r A A V ウイルスと、1 または複数の薬学的に許容され得る担体とを含む医薬組成物も本明細書に開示される。組成物はまた、希釈剤、安定剤、賦形剤、およびアジュバント等の追加の成分を含むことができる。本明細書で使用 30
される場合、「薬学的に許容され得る」担体、賦形剤、希釈剤、アジュバント、または安定剤は、使用される投与量および濃度で曝露されている細胞または対象に対して非毒性 (好ましくは不活性) であるか、または当業者によって決定される許容可能なレベルの毒性を有する。担体、希釈剤およびアジュバントは、リン酸塩、クエン酸塩または他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸等の酸化防止剤；低分子量ポリペプチド (例えば、約 1 0 残基より少ない)；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、リジン等のアミノ酸；単糖、二糖、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む他の炭水化物；E D T A 等のキレート剤；マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；および / または T w e e n (商標)、 40
P l u r o n i c s (商標) もしくはポリエチレングリコール (P E G) 等の非イオン性界面活性剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、生理学的に許容され得る担体は、p H 緩衝水溶液である。

【 0 1 8 7 】

本明細書では、対象の神経系に作用物質を送達する方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に開示される A A V カプシドタンパク質を含む A A V ベクターを提供することを含む。いくつかの実施形態では、A A V ベクターは、神経系に送達される作用物質を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、A A V ベクターを対象に投与することを含む。組成物は、静脈内投与用であり得る。組成物は、全身投与用であり得る。作用物質は、対象の脳室の内皮内層、脊髄の中心管、脳の毛細血管、脳の細動脈、脳 50

の動脈、またはそれらの組み合わせに送達することができる。対象は、成体動物であり得る。

【0188】

投与される r A A V の力価は、例えば、特定の r A A V、投与様式、処置目標、個体、および標的とされる細胞型に応じて異なり、当技術分野の標準的な方法によって決定することができる。当業者には容易に明らかであるように、投与される組換えウイルスの有用なインビボ投与量および特定の投与様式は、年齢、体重、苦痛の重症度および処置される動物種、使用される目的のタンパク質を発現する特定の組換えウイルス、および組換えウイルスが使用される特定の使用に応じて変化する。有効投与量レベル、すなわち所望の結果を達成するのに必要な投与量レベルの決定は、日常的な薬理学的方法を使用して当業者によって達成することができる。典型的には、製品のヒト臨床適用は、より低い投与量レベルで開始され、投与量レベルは、所望の効果が達成されるまで増加される。あるいは、許容され得るインビトロ研究を使用して、確立された薬理学的方法を使用して、本方法によって同定された組成物の有用な用量および投与経路を確立することができる。

10

【0189】

正確な投与量は、薬物ごとに決定することができ、ほとんどの場合、投与量に関するいくつかの一般化を行うことができる。いくつかの実施形態では、対象の神経系（例えば、C N S）への作用物質の送達のための r A A V は、例えば注射によって、対象 1 k g 当たり 1×10^{10} ウイルスゲノム (v g) $\sim 2 \times 10^{14}$ v g / k g の間、例えば 5×10^{11} v g / k g $\sim 5 \times 10^{12}$ v g / k g の間の用量で対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、対象に投与される r A A V の用量は、1 k g 当たり 2×10^{14} v g である。いくつかの実施形態では、対象に投与される r A A V の用量は、1 k g 当たり 5×10^{12} v g である。いくつかの実施形態では、対象に投与される r A A V の用量は、1 k g 当たり 5×10^{11} v g である。

20

【0190】

本明細書に開示される疾患または症状を予防または処置するための医薬組成物の有効な用量および投与量は、疾患もしくは症状、または疾患もしくは症状の症候に関連する観察された有益な応答によって定義される。有益な応答は、疾患もしくは症状、または疾患もしくは症状の症候を予防、緩和、停止、または治癒することを含む。いくつかの実施形態では、有益な応答が、対象におけるバイオマーカー、トランスクリプトームリスクプロファイルまたは腸内微生物叢の存在、レベルまたは活性における測定可能な改善を検出することによって測定される場合がある。本明細書で使用される場合、「改善」は、正常個体（例えば、疾患または症状に罹患していない個体）で観察される存在、レベルまたは活性への存在、レベルまたは活性のシフトを指す。治療用 r A A V 組成物が治療的に有効でない場合、または疾患もしくは症状、または疾患もしくは症状の症候の十分な緩和を提供していない場合、投与量および/または投与経路を変更してもよく、または追加の作用物質を治療用 r A A V 組成物と共に対象に投与してもよい。いくつかの実施形態では、患者が治療用 r A A V 組成物のレジメンで開始されると、患者は第 2 の処置レジメンからも離脱される（例えば、用量の段階的減少）。

30

【0191】

いくつかの実施形態では、本開示による医薬組成物は、対象の体重で約 0 . 0 0 0 1 m g / k g $\sim$ 約 1 0 0 m g / k g、約 0 . 0 0 1 m g / k g $\sim$ 約 0 . 0 5 m g / k g、約 0 . 0 0 5 m g / k g $\sim$ 約 0 . 0 5 m g / k g、約 0 . 0 0 1 m g / k g $\sim$ 約 0 . 0 0 5 m g / k g、約 0 . 0 5 m g / k g $\sim$ 約 0 . 5 m g / k g、約 0 . 0 1 m g / k g $\sim$ 約 5 0 m g / k g、約 0 . 1 m g / k g $\sim$ 約 4 0 m g / k g、約 0 . 5 m g / k g $\sim$ 約 3 0 m g / k g、約 0 . 0 1 m g / k g $\sim$ 約 1 0 m g / k g、約 0 . 1 m g / k g $\sim$ 約 1 0 m g / k g、または約 1 m g / k g $\sim$ 約 2 5 m g / k g を 1 日に 1 または複数の回数送達して、所望の治療効果、診断効果、または予防効果を得るのに十分な用量レベルで投与される。上記投与濃度は、当業者によって投与される v g もしくはウイルスゲノム / k g または総ウイルスゲノムに変換することができることが理解されよう。

40

50

【0192】

いくつかの実施形態では、医薬組成物の用量は、少なくともまたは約 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、または 10^{17} の感染性粒子の濃度を含む。場合によっては、感染性粒子の濃度は、 2×10^7 、 2×10^8 、 2×10^9 、 2×10^{10} 、 2×10^{11} 、 2×10^{12} 、 2×10^{13} 、 2×10^{14} 、 2×10^{15} 、 2×10^{16} 、 2×10^{17} 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。場合によっては、感染性粒子の濃度は、 3×10^7 、 3×10^8 、 3×10^9 、 3×10^{10} 、 3×10^{11} 、 3×10^{12} 、 3×10^{13} 、 3×10^{14} 、 3×10^{15} 、 3×10^{16} 、 3×10^{17} 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。場合によっては、感染性粒子の濃度は、 4×10^7 、 4×10^8 、 4×10^9 、 4×10^{10} 、 4×10^{11} 、 4×10^{12} 、 4×10^{13} 、 4×10^{14} 、 4×10^{15} 、 4×10^{16} 、 4×10^{17} 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。場合によっては、感染性粒子の濃度は、 5×10^7 、 5×10^8 、 5×10^9 、 5×10^{10} 、 5×10^{11} 、 5×10^{12} 、 5×10^{13} 、 5×10^{14} 、 5×10^{15} 、 5×10^{16} 、 5×10^{17} 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。場合によっては、感染性粒子の濃度は、 6×10^7 、 6×10^8 、 6×10^9 、 6×10^{10} 、 6×10^{11} 、 6×10^{12} 、 6×10^{13} 、 6×10^{14} 、 6×10^{15} 、 6×10^{16} 、 6×10^{17} 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。場合によっては、感染性粒子の濃度は、 7×10^7 、 7×10^8 、 7×10^9 、 7×10^{10} 、 7×10^{11} 、 7×10^{12} 、 7×10^{13} 、 7×10^{14} 、 7×10^{15} 、 7×10^{16} 、 7×10^{17} 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。場合によっては、感染性粒子の濃度は、 8×10^7 、 8×10^8 、 8×10^9 、 8×10^{10} 、 8×10^{11} 、 8×10^{12} 、 8×10^{13} 、 8×10^{14} 、 8×10^{15} 、 8×10^{16} 、 8×10^{17} 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。場合によっては、感染性粒子の濃度は、 9×10^7 、 9×10^8 、 9×10^9 、 9×10^{10} 、 9×10^{11} 、 9×10^{12} 、 9×10^{13} 、 9×10^{14} 、 9×10^{15} 、 9×10^{16} 、 9×10^{17} 、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。

【0193】

本明細書に開示される組換えウイルスは、それを必要とする対象（例えば、ヒト）に投与することができる。投与経路は、特に限定されない。例えば、治療有効量の組換えウイルスを、当技術分野で標準的な経路を介して対象に投与することができる。投与は、全身投与であり得る。投与は、静脈内投与であり得る。

【0194】

経路の非限定的な例としては、筋肉内、腔内、静脈内、腹腔内、皮下、皮膚上、皮内、直腸、眼内、肺、頭蓋内、骨内、経口、頬側、全身または鼻が挙げられる。いくつかの実施形態では、組換えウイルスは、全身的形質導入（systematic transduction）によって対象に投与される。いくつかの実施形態では、組換えウイルスは筋肉内注射によって対象に投与される。いくつかの実施形態では、rAAVを、非経口経路（例えば、静脈内、筋肉内または皮下注射によって）によって、表面の癒痕化によって、または対象の体腔への接種によって対象に投与する。rAAVウイルスのAAV成分の投与経路および血清型は、処置される感染および/または疾患状態、ならびに目的のタンパク質を発現する標的細胞/組織を考慮して、当業者によって容易に決定することができる。いくつかの実施形態では、静脈内投与を介してrAAVを投与することが有利であり得る。本明細書で提供されるバリエーションAAVは、CNSに対する指向性が増強されたベクターの静脈内投与を有利に提供することができる。

【0195】

いくつかの実施形態では、対象は霊長類であり、作用物質は内皮細胞および/または神経系のニューロンに送達される。神経系、は中枢神経系（CNS）であり得る。作用物質は、神経系のニューロンへの作用物質の送達よりも少なくとも1.5倍、2倍、または3倍効率的に対象の神経系の内皮細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、作用物質

は、神経系のニューロンへの作用物質の送達よりも3倍効率的に（例えば、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲）対象の神経系の内皮細胞に送達される。

【0196】

本明細書では、作用物質を細胞に送達する方法が開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に開示されるAAVカプシドタンパク質を含むAAVベクターを細胞と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、神経系に送達される作用物質を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、内皮細胞またはニューロンである。いくつかの実施形態では、AAVベクターと細胞との接触は、インビトロ、インビボまたはエキスピボで行われる。細胞は、組織、器官または対象に存在し得る。細胞は、脳内皮細胞、ニューロン、脳の毛細血管の細胞、脳の細動脈の細胞、脳の動脈の細胞、脳血管系の細胞、またはそれらの組み合わせであり得る。

10

【0197】

AAVベクターは、AAV9ベクターまたはそのバリエーションであり得る。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、ヒト分離株hu.31、ヒト分離株hu.32、アカゲザル分離株rh.8、アカゲザル分離株rh.10、またはそれらのバリエーションである。AAVベクターの血清型は、AAVカプシドの血清型とは異なり得る。

20

【0198】

バリエーションAAVカプシドは、中枢神経系（CNS）の組織または細胞に対する指向性を備えることができる。標的細胞は、神経細胞、神経幹細胞、星状膠細胞または腫瘍細胞であり得る。標的細胞は、脳または脊髄に位置し得る。標的細胞は、抗原提示細胞、樹状細胞、マクロファージ、神経細胞、脳細胞、星状膠細胞、ミクログリア細胞およびニューロンを含み得る。いくつかの実施形態では、標的細胞は、内皮細胞である。

【0199】

rAAVの実際の投与は、rAAVを対象の神経系に輸送する任意の物理的方法を使用することによって達成することができる。例えば、本明細書に開示されるrAAVは、CNSへの送達のために静脈内投与することが有利であり得る。本明細書に開示されるように、rAAVのカプシドタンパク質は、rAAVが中枢神経系等の目的の特定の標的環境を標的とし、目的の標的環境（例えば、CNS向性）に対する指向性を増強するように改変することができる。医薬組成物は、例えば、注射用製剤として調製することができる。

30

【0200】

使用される組換えウイルスは、液体または凍結乾燥形態（凍結乾燥プロセス中にウイルスを保護するための1または複数の適切な防腐剤および/または保護剤と組み合わせて）で利用することができる。遺伝子治療（例えば、特定の遺伝子産物によって改善され得る神経障害の）のために、治療用タンパク質を発現する組換えウイルスの治療有効量が、そのような処置を必要とする宿主に投与される。宿主において免疫を誘導するため、または宿主に遺伝子治療を提供するための医薬品の製造における本明細書に開示される組換えウイルスの使用は、本出願の範囲内である。

40

【0201】

rAAVのヒト投与量が少なくともいくつかの症状について確立されている場合、それらと同じ投与量、または確立されたヒト投与量の約0.1%~500%、より好ましくは約25%~250%の投与量を使用することができる。新たに発見された医薬組成物の場合のように、ヒト投与量が確立されていない場合、適切なヒト投与量は、動物における毒性研究および有効性研究によって適格とされるように、ED₅₀値もしくはID₅₀値、またはインビトロもしくはインビボ研究から得られる他の適切な値から推測することができる。

【0202】

50

治療有効量の r A A V を様々な時点で対象に投与することができる。例えば、r A A V は、対象が疾患または障害を発症する前、発症中または発症後に対象に投与することができる。r A A V はまた、疾患もしくは障害（例えば、ハンチントン病（H D）、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、I 型および I I 型、フリードライヒ運動失調症、脊髄小脳失調症、ならびに限定されないが、クラッペ病、サンドホフ病、テイ・サックス病、ゴーシェ病（I、I I、または I I I 型）、ニーマン・ピック病（N P C 1 または N P C 2 欠乏症）、ハーラー症候群、ポンペ病、バッテン病、またはそれらの任意の組み合わせを含む、C N S 内（w i t h）の細胞が関与するリソソーム蓄積障害のいずれか）、慢性疼痛、またはそれらの組み合わせの発生前、発生中、または発生後に対象に投与することもできる。いくつかの実施形態では、r A A V は、疾患または障害の寛解中に対象に投与される。いくつかの実施形態では、r A A V は、対象における疾患または障害の発症前に投与される。いくつかの実施形態では、r A A V は、疾患または障害を発症するリスクがある対象に投与される。

10

【0203】

疾患または障害は、神経学的疾患または障害を含み得る。例えば、神経疾患または障害は、てんかん、ドラベ症候群、レノックス・ガストー症候群、ミオクロニー発作、若年性ミオクロニーてんかん、難治性てんかん、統合失調症、若年性けいれん、ウエスト症候群、乳児けいれん、難治性乳児けいれん、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ症候群/病、ウシ海綿状脳症（B S E）、プリオン関連感染症、ミトコンドリア機能障害を伴う疾患、β - アミロイドおよび/またはタウオパチーを伴う疾患、ダウン症候群、肝性脳症、ハンチントン病、運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、オリブ橋小脳萎縮症、術後認知障害（P O C D）、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、シェーグレン症候群、神経セロイドリポフスチン症、神経変性小脳失調症、パーキンソン病、パーキンソン認知症、軽度認知障害、様々な形態の軽度認知障害における認知障害、様々な形態の認知障害、拳闘家認知症、血管性および前頭葉認知症、認知障害、学習障害、眼損傷、眼疾患、眼障害、緑内障、網膜症、黄斑変性、頭部または脳または脊髄損傷、頭部または脳または脊髄外傷、痙攣、てんかん性痙攣、てんかん、側頭葉てんかん、ミオクロヌステんかん、耳鳴り、ジスキネジア、舞蹈病、ハンチントン舞蹈病、アテトーシス、ジストニア、常同症、バリズム、遅発性ジスキネジア、チック障害、痙攣性斜頸（t o r t i c o l l i s s p a s m o d i c u s）、眼瞼痙攣、局所性および全身性ジストニア、眼振、遺伝性小脳失調、皮質基底核変性症、振戦、本態性振戦、嗜癇、不安障害、パニック障害、社会不安障害（S A D）、注意欠陥多動性障害（A D H D）、注意欠陥症候群（A D S）、下肢静止不能症候群（R L S）、子供の多動性、自閉症、認知症、アルツハイマー病における認知症、コルサコフ症候群における認知症、コルサコフ症候群、血管性認知症、H I V 感染症に関連する認知症、H I V - 1 脳症、A I D S 脳症、エイズ認知症複合、エイズ関連認知症、大うつ病性障害、うつ病、記憶喪失、ストレス、双極性うつ病性障害、薬物耐性、オピオイドに対する薬物耐性、運動障害、脆弱 X 症候群、過敏性腸症候群（I B S）、片頭痛、多発性硬化症（M S）、筋攣縮、疼痛、慢性疼痛、急性疼痛、炎症性疼痛、神経因性疼痛、外傷後ストレス障害（P T S D）、統合失調症、痙攣、トゥレット症候群、摂食症、食物依存症、広場恐怖症、全般不安症、強迫性障害、パニック障害、社会恐怖症、恐怖症性障害、物質誘発性不安障害、妄想性障害、統合失調感情障害、統合失調症様症、物質誘発性精神病性障害、高血圧、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

20

30

40

【0204】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の r A A V 組成物の送達に適した薬学的に許容され得る賦形剤および担体溶液の製剤、ならびに本明細書に記載の特定の組成物を様々な処置レジメンで使用するための適切な投与および処置レジメンが本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、各治療的に有用な組成物中の治療用遺伝子発現産物の量は、化合物の任意の所与の単位用量で適切な投与量が得られるように調製され得る。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品貯蔵寿命、ならびに他の薬理

50

学的考慮事項等の要因は、そのような医薬製剤を調製する当業者によって企図され、したがって、様々な投与量および処置レジメンが望ましい場合がある。いくつかの例では、r A A V 組成物は、眼内、硝子体内、非経口、皮下、静脈内、脳室内、筋肉内、髄腔内、経口、腹腔内、経口もしくは経鼻吸入によって、または直接注射による 1 または複数の細胞、組織もしくは器官への直接注射によって送達される、本明細書に開示される適切に製剤化された医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される r A A V は、C N S への送達のために静脈内投与することが有利であり得る。

【 0 2 0 5 】

いくつかの実施形態では、注射用途に適した A A V ベースのウイルス組成物の医薬形態は、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射液または分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、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）、それらの適切な混合物、および/または植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散の場合に必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤の使用によって維持されてもよい。微生物の作用の防止は、様々な抗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。多くの場合、等張剤、例えば糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の持続的な吸収は、吸収を遅延させる作用物質、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組成物における使用によってもたらされ得る。

【 0 2 0 6 】

いくつかの実施形態では、注射可能な水溶液の投与のために、例えば、溶液は、必要に応じて適切に緩衝化されてもよく、液体希釈剤は、最初に十分な生理食塩水またはグルコースで等張性にされる。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適している。処置される対象の症状に応じて、投与量のいくらかの変動が必然的に生じるであろう。投与の責任者は、いずれにせよ、個々の対象に対する適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与のために、製剤は、F D A O f f i c e o f B i o l o g i c s 規格によって要求される無菌性、発熱原性、ならびに一般的な安全性および純度の基準を満たすべきである。

【 0 2 0 7 】

本明細書に開示される r A A V 組成物を含む滅菌注射液が本明細書に開示され、これは、本明細書に開示される r A A V 組成物を必要量で、必要に応じて上に列挙した他の成分のいくつかと共に適切な溶媒に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製される。一般に、分散液は、様々な滅菌された有効成分を、基本的な分散媒および上に列挙したもののからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分 + 任意の追加の所望の成分の粉末をその以前に滅菌濾過された溶液から得る真空乾燥および凍結乾燥技術である。注射可能な溶液は、例えば静脈内投与による全身投与に有利であり得る。

【 0 2 0 8 】

中性形態または塩形態の製剤も本明細書で提供される。薬学的に許容され得る塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成される）が挙げられ、これは、無機酸、例えば塩酸もしくはリン酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸で形成される。遊離カルボキシル基で形成された塩は、無機塩基、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、または水酸化第二鉄、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から誘導することもできる。製剤化すると、溶液は、投与製剤と適合する様式で、治療上有効な量で投与される。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセル等の様々な剤形で容易に投与される。

【 0 2 0 9 】

鼻腔内投与のための製剤は、有効成分を含み、約 $0.2 \mu\text{m} \sim 500 \mu\text{m}$ の平均粒径を

10

20

30

40

50

有する粗末を含み得る。そのような製剤は、嗅ぎタバコを嗅ぐ様式で、例えば、鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻通路を介した迅速な吸入によって投与される。経鼻投与に適した製剤は、例えば、0.1% (w/w) 程度の少量から100% (w/w) 程度の有効成分を含んでもよく、本明細書に記載される1または複数の追加の成分を含んでもよい。医薬組成物は、頬側投与に適した製剤で調製、包装、および/または販売され得る。そのような製剤は、例えば、従来の方法を使用して製造された錠剤および/またはロゼンジの形態であってもよく、例えば、0.1% ~ 約20% (w/w) の有効成分をふくんでもよく、残部は、経口溶解性および/または分解性組成物、ならびに必要に応じて、本明細書に記載される1または複数の追加の成分を含む。あるいは、頬側投与に適した製剤は、有効成分を含む粉末および/またはエアロゾル化および/または霧化溶液および/または懸濁液を含み得る。そのような粉末化製剤、エアロゾル化製剤および/またはエアロゾル化製剤は、分散されている場合、約0.1 nm ~ 約200 nmの範囲の平均粒径および/または液滴サイズを含み得、本明細書に記載の任意の1または複数の追加の成分を更に含み得る。

10

【0210】

対象に投与される適切な用量および投与量は、限定されないが、特定の治療用 rAAV 組成物、疾患症状およびその重症度、処置を必要とする対象のアイデンティティ（例えば、体重、性別、年齢）を含む因子によって決定され、例えば、投与される特定の作用物質、投与経路、処置される症状、および処置される対象または宿主を含む、症例を取り巻く特定の状況に従って決定することができる。

20

【0211】

AAV 組成物の量およびそのような組成物の投与時間は、本教示の利益を有する当業者の範囲内である。しかしながら、いくつかの実施形態では、治療有効量の開示された組成物の投与は、そのような処置を受けている患者に治療上の利益を提供するのに十分な数の感染性粒子の単回注射等の単回投与によって達成され得る。これは、少なくとも部分的には、特定の標的細胞（例えば、ニューロン）が分裂せず、複数回または慢性投与の必要性がなくなるという事実によって可能になる。

【0212】

いくつかの実施形態では、そのような組成物の投与を監督する医師によって決定されるように、比較的短期間または比較的長期間にわたって AAV ベクター組成物の複数回または連続投与を提供することが有利である。例えば、哺乳動物に投与される感染性粒子の数は、単回用量として与えられるか、または処置される特定の疾患もしくは障害の治療を達成するために必要とされ得るように2回またはそれを超える投与に分割されるかのいずれかで、約 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、または更にそれ以上の感染性粒子/ml のオーダーであり得る。実際、特定の実施形態では、2またはそれを超える異なる AAV ベクター組成物を単独で、または1または複数の他の治療薬と組み合わせて投与して、特定の治療レジメンの所望の効果を達成することが望ましい場合がある。様々な実施形態では、1日投与量および単位投与量は、限定されないが、使用される治療用 rAAV 組成物の活性、処置される疾患または症状、投与様式、個々の対象の要件、処置される疾患または症状の重症度、および医師の判断を含む多くの変数に応じて変更される。

30

40

【0213】

本明細書に記載の標的化ペプチドは、異なる AAV 血清型（例えば、AAV9 および AAV1）に由来するカプシドタンパク質を用いて、CNS 指向性が増強された rAAV を生成するために使用することができる。いくつかの実施形態では、これは、対象において免疫応答を誘導することなく、2またはそれを超える異なる AAV ベクター組成物の投与を有利に提供することができる。

【0214】

rAAV ウイルスの投与頻度は変動し得る。例えば、rAAV ウイルスは、1週間に約1回、2週間に約1回、1ヶ月に約1回、6ヶ月に約1回、1年に約1回、2年に約1回

50

、3年に約1回、4年に約1回、5年に約1回、6年に約1回、7年に約1回、8年に約1回、9年に約1回、10年に約1回または15年に約1回、対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、rAAVウイルスは、最大で約1週間に1回、最大で約2週間に1回、最大で約1ヶ月に1回、最大で約6ヶ月に1回、最大で約1年に1回、最大で約2年に1回、最大で約3年に1回、最大で約4年に1回、最大で約5年に1回、最大で約6年に1回、最大で約7年に1回、最大で約8年に1回、最大で約9年に1回、最大で約10年に1回、または最大で約15年に1回、対象に投与される。

【0215】

本明細書に開示される組成物を含むキットが本明細書に開示される。CNS、PNS、または標的器官もしくは環境（例えば、CNS）の疾患または症状を処置または予防するためのキットも本明細書に開示される。いくつかの例では、疾患または症状は、癌、病原体感染、神経疾患、筋疾患、または本明細書に記載されるもの等の免疫障害である。一実施形態では、キットは、本明細書に提供される異種核酸および本開示のrAAVカプシドタンパク質をカプシド化する、有効量のrAAV粒子の組成物を含有する治療用または予防用組成物を含み得る。別の実施形態では、キットは、治療用核酸を発現する単位剤形で、本明細書に記載のrAAVによって修飾された有効量の細胞（「修飾細胞」）を含有する治療用または予防用組成物を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、治療用組成物を含有することができる滅菌容器を含む。そのような容器は、箱、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、プリスターパック、または当技術分野で公知の他の適切な容器形態であり得る。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属箔、または作用物質を保持するのに適した他の材料で作ることができる。

10

20

【0216】

いくつかの実施形態では、rAAVは、疾患または症状を有するかまたは発症するリスクがある対象にrAAVを投与するための説明書と共に提供される。説明書は、一般に、疾患または症状の処置または予防のための組成物の使用に関する情報を含み得る。

【0217】

キットは、同種異系細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、ゲノム改変を含むことができる細胞を含む。いくつかの実施形態では、キットは「既製」細胞を含む。いくつかの実施形態では、キットは、臨床使用のために増殖させることができる細胞を含む。いくつかの実施形態では、キットは、研究目的のための内容物を含む。

30

【0218】

いくつかの実施形態では、説明書は、以下のうちの少なくとも1つを含む：治療用rAAV組成物の説明；本明細書に開示される疾患または症状の処置または予防のための投与スケジュールおよび投与；注意；警告；指示；反作用；過剰投与情報；有害反応；動物薬理学；臨床研究；および/または参考文献。説明書は、容器に直接（存在する場合）、または容器に貼付されたラベルとして、または容器内または容器と共に供給される別個のシート、パンフレット、カード、またはフォルダとして印刷することができる。いくつかの実施形態では、説明書は、rAAVを対象に単独で投与するための手順を提供する。いくつかの実施形態では、説明書は、本明細書に開示される追加の治療剤を投与してから少なくとも約1時間（hr）、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、25時間、26時間、27時間、28時間、29時間、30時間、または最大2日間、3日間、4日間、5日間、6日間もしくは7日間またはそれ前にrAAVを対象に投与するための手順を提供する。いくつかの例では、説明書は、rAAVが静脈内注射用に製剤化されることを提供する。いくつかの例では、説明書は、rAAVが鼻腔内投与のために製剤化されることを提供する。

40

【実施例】

【0219】

50

実施例

上述した実施形態のいくつかの態様は、以下の実施例において更に詳細に開示されており、これは本開示の範囲を限定することを決して意図するものではない。

実施例 1

材料および方法

【0220】

以下の実験材料および方法を、以下に記載する実施例 2 および 3 に使用した。

プラスミド

【0221】

AAVカプシドバリエーションを pUCmini-iCAP-PHP、B 骨格にサブクローニングした (Addgene ID: 103002)。使用した ssAAV ゲノムは、図および凡例に記載されているように、pAAV: CAG-mNeonGreen (Addgene ID: 99134) および pAAV: CAG-2xNLS-EGFP (1つの NLS を有する等価バージョン: Addgene ID: 104061) であった。受容体候補プラスミドを、GenScript から購入した。選択した全てのオープンリーディングフレーム (ORF) クローンを、pcDNA3.1 中の Lynx1 を除いて、pcDNA3.1+/C-(K)-DYK 骨格に導入した。AAVカプシドライブラリを pCRII-9Cap-XE プラスミドから増幅し、AAV2/9 REP-AAV-DCap によるトランスフェクションのために rAAV-DCap-in-cis-Lox2 プラスミドにサブクローニングした。

動物

【0222】

全ての動物手順は、California Institute of Technology Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって承認され、全ての関連する倫理規則に従ったものである。C57BL/6J (000664)、BALB/cJ (000651)、129S1/SvImJ (002448)、CBA/J (000656)、DBA/2J (000671)、NOD/ShiLtJ (001976)、Syn1-Cre (3966)、GFAP-Cre (012886)、Tek-Cre (8863) および Olig2-Cre (025567) マウス系統を Jackson Laboratory (JAX) から購入した。ヘテロ接合 Car4 ノックアウトマウス (008217) を JAX によって凍結回収し、Caltech で飼育してホモ接合 WT/WT および KO/KO 動物を作製した。6~8 週齢の雄マウスに rAAV を後眼窩洞に静脈内注射した。形質導入表現型の試験中にマウスに特定の rAAV をランダムに割り当てた。実施した実験のいずれについても、実験者は盲検化しなかった。

AAV ベクター 産生

【0223】

AAV のパッケージングおよび精製を前述のように行った。簡潔には、ポリエチレンジオキシンを使用した HEK293T 細胞 (ATTC、CRL-3216) のトリプルトランスフェクションによって rAAV を産生した。培地をトランスフェクションの 72 時間後および 120 時間後に回収した。ウイルスを 2.5 M NaCl 中 40% ポリエチレングリコール中で沈殿させた。ウイルスを再懸濁し、500 mM NaCl、40 mM Tris、10 mM MgCl₂、および 100 U mL⁻¹ 塩活性ヌクレアーゼ (Arctic Zymes、70910-202) 中、37 °C で 120 時間、トランスフェクション後の細胞ペレットと組み合わせた。得られた溶解物を、超遠心分離後のイオジキサノール (Cosmo Bio USA、OptiPrep、AXS-1114542) 段階勾配から抽出した。精製ウイルスを濃縮し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で緩衝液交換した後、定量的 PCR による力価を決定した。

AAV ベクター 投与、組織処理、およびイメージング

【0224】

10

20

30

40

50

AAVベクターを、図および凡例に示されているように、 1×10^{11} v.g. または 3×10^{11} v.g. の用量で後眼窩注射によって成体雄マウスに静脈内投与した。発現の3週間後、マウスをEuthasol（ペントバルビタールナトリウムおよびフェニトインナトリウム溶液、Virbac AH）で麻酔し、約50 mLの0.1 M PBS、pH 7.4、次いで0.1 M PBS中の別の50 mLの4%パラホルムアルデヒド（PFA）で経心的に灌流した。次いで、器官を採取し、4% PFA中、4℃で一晩後固定した後、洗浄し、0.1 M PBSおよび0.05%アジ化ナトリウム中、4℃で保存した。最後に、脳をLeica VT1200ビブラトームで100 μ mの切片に切断した。画像を、Plan-Apochromat $\times 100$ 45 M27（作動距離、2.0 mm）対物レンズを使用するZeiss LSM880共焦点顕微鏡を用いて取得し、Zen Black 2.3 SP1（Zeiss）およびImageJソフトウェアで処理した。

10

単一細胞RNAシーケンシング分析

【0225】

以前に記載されたように、scVI v0.8.1およびScanpy v1.6.0のカスタムフォークオフを使用して、Python 3.7.4でカスタムスクリプトを用いて既存のC57BL/6J皮質単一細胞RNAシーケンシングデータセットに対して分析を行った。簡潔には、品質管理をパスした液滴は、訓練されたscANVI細胞型分類子を使用して「ニューロン」または「非ニューロン」として分類され、多重比較のための補正後に0.05の偽発見率閾値を超える細胞のみを保持した。訓練されたscVIモデルを使用して非神経細胞を更にサブタイプ化し、Scanpyに実装されているLeidenアルゴリズムを使用して学習された潜在空間に基づいてクラスタリングした。内皮細胞クラスターは、それらがその細胞サブタイプの全てのマーカー遺伝子について陽性である場合に割り当てられた。膜タンパク質をUniprotキーワード「細胞膜」によってフィルタにかけた。差次的発現スコアをScanpyで計算した。

20

免疫蛍光

【0226】

HEK293T細胞で免疫蛍光実験を行って、Ly6a（Abcam ab51317、1:200希釈）、Ly6c1（Abcam ab15627、1:200希釈）およびCar4（Invitrogen PA5-47312、1:40希釈）等の一過性トランスフェクト受容体を標識した。HEK293T細胞を6ウェルプレートに80%コンフルエンスで播種し、5%ウシ胎児血清（FBS）、1%非必須アミノ酸（NEAA）、および100 U/mLペニシリン-ストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中、37℃、5%CO₂で維持した。膜関連受容体候補をポリエチレンジイミン（PolySciences #23966）によってトランスフェクトした。細胞を、トランスフェクションの24時間後に、Neuvitro Poly-D-lysine coated 無菌German glass coverslips（Fisher Scientific #NC0343705）上の24ウェルプレートに播種し、次いで、4%パラホルムアルデヒド中で付着させて固定した。カバーガラスを、3%ウシ血清アルブミン（BSA）を含有する1×TBS緩衝生理食塩水（TBS）で30分間ブロックし、1×TBS、3%BSA、および0.05%Triton（登録商標）X-100中の一次抗体中で周囲温度にて60分間インキュベートした。カバーガラスを1×TBSで3回洗浄し、次いで、同じ培地中で二次抗体（Ly6aおよびLy6c1: Invitrogen A-21247、1:1000希釈；Car4: Invitrogen A-21432、1:1000希釈）と60分間インキュベートした。カバーガラスを、DAPIを含むDiamond Antifade Mounting Media（Invitrogen P36931）を用いてスライドにマウントした。共焦点レーザー走査型顕微鏡（LSM880、Carl Zeiss、米国）で蛍光顕微鏡画像をキャプチャした。

30

40

rAAVベクターの細胞培養物の特性評価

50

【0227】

HEK293T細胞を6ウェルプレートに80%コンフルエンスで播種し、5%FBS、1%NEAAおよび100U mL⁻¹ペニシリン・ストレプトマイシンを補充したDMEM中、37℃、5%CO₂で維持した。2.53μgのプラスミドDNAを各ウェルにトランスフェクトすることによって、HEK293T細胞において膜関連受容体候補を一過性に発現させた。受容体発現細胞を20%コンフルエンスで96ウェルプレートに移し、0.5%FBS、1%NEAA、100U mL⁻¹ペニシリン・ストレプトマイシン、1×GLUTAMAXおよび15μM HEPESを補充したFluoroBrite（商標）DMEM中、37℃、5%CO₂で維持した。各受容体候補を発現する細胞に、1E9v.g.ウェル⁻¹および5E8v.g.ウェル⁻¹の操作されたAAVバリエーションを形質導入した。プレートを、各ウェルをオートフォーカスするための4倍対物レンズおよびNucBlue（商標）Live Ready Probes（商標）試薬（Hoechst33342）を使用して、Keyence BZ-X700で形質導入の24時間後に撮像した。

10

細胞培養蛍光画像定量

【0228】

全ての画像処理を、カスタムPython画像処理パイプラインを使用して行った。簡潔には、明視野およびシグナル画像の両方で細胞の面積を決定した。形質導入された細胞の割合および形質導入面積当たりの輝度をこれらの画像から決定した。

【0229】

20

まず、ガウスぼかし（skimage.filters.gaussian、シグマ=30、トランケート=0.35）を適用し、元の明視野画像から積を減算することによって、明視野画像に対して背景減算を行った。明視野画像では、細胞は、明るいエッジと暗いエッジの両方を生成するラングによってシルエット化された。ヒストグラムベースの閾値処理をこれらの画像に適用して、明視野画像の明領域および暗領域を決定し、これらを組み合わせて画像内の細胞エッジのマスクを作成することができる。細胞は、skimage.morphology.closingを適用することによって充填することができ、skimage.morphology.closingは、連続領域を充填するために画像上にテンプレートを実行した（skimage.morphology.disk、半径=2）。次に、明視野画像内のセルの総面積は、マスク内の全てのピクセルを合計することによって決定することができる。

30

【0230】

シグナル画像に対して、ガウスぼかし（skimage.filters.gaussian、シグマ=100）を適用することによってバックグラウンド減算を行った。元のシグナル画像からガウスぼかしの積を減算すると、バックグラウンド強度の変動が最小の画像が生成された。ヒストグラムベースの閾値処理をこれらの画像に適用して、明視野画像における背景の強度を特定し、形質導入された細胞を含む画像における明領域のマスクを作成した。skimage.morphology.remove_small_objects（min_size=5）を使用してノイズをマスクから除去した。このことから、形質導入された細胞の総面積を、マスク内の全ての画素を合計することによって求めた。

40

【0231】

このセグメント化を行った後、全細胞面積に対するシグナル面積の比をとることによって、形質導入された細胞の割合を決定した。マスクに元の画像を乗算し、産物画像中の全てのピクセル強度を合計することによって、形質導入された細胞の総輝度を決定した。次いで、この値を形質導入細胞の総面積で割って、形質導入面積当たりの輝度を決定した。

受容体タンパク質産生

【0232】

Ly6a-Fcを、130rpmで振盪しながら37℃、5%CO₂インキュベーター内のExp293発現培地（Thermo Fisher Scientific）中

50

で増殖させた E x p i 2 9 3 F 懸濁細胞中で産生させた。トランスフェクションは、製造者の説明書 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) に従って E x p i f e c t a m i n e を用いて行った。細胞馴化培地の採取後、1 M T r i s (p H 8 . 0) を 2 0 m M の最終濃度まで添加した。N i - N T A アガロース (Q I A G E N) を約 5 % 馴化培地容量に添加した。1 M 滅菌 P B S 、 p H 7 . 2 (G I B C O) を約 3 × 馴化培地容量に添加した。混合物を 4 で一晩撹拌した。N i - N T A アガロースビーズをブフナー漏斗に回収し、約 3 0 0 m L のタンパク質洗浄緩衝液 (3 0 m M H E P E S 、 p H 7 . 2 、 1 5 0 m M N a C l 、 2 0 m M イミダゾール) で洗浄した。ビーズを E c o n o - P a k クロマトグラフィーカラム (B i o - R a d) に移し、タンパク質を 1 5 m L の溶出緩衝液 (3 0 m M H E P E S 、 p H 7 . 2 、 1 5 0 m M N a C l 、 2 0 0 m M イミダゾール) で溶出した。A m i c o n U l t r a c e l 1 0 K フィルタ (M i l l i p o r e) を用いてタンパク質を濃縮した。N a n o d r o p 2 0 0 0 分光光度計 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を用いて 2 8 0 n m の吸光度を測定し、タンパク質濃度を決定した。

表面プラズモン共鳴 (S P R)

【 0 2 3 3 】

S P R は S i e r r a S P R - 3 2 (B r u k e r) を用いて行った。H B S - P + 緩衝液 (G E H e a l t h c a r e) 中の L y 6 a - F c 融合タンパク質を、約 1 2 0 0 ~ 1 5 0 0 応答単位 (R U) の捕捉レベルでプロテイン A センサーチップに固定化した。 2×10^{12} v . g . m L $^{-1}$ で開始する r A A V の 2 倍希釈物を 1 0 μ l 分 $^{-1}$ の流速で、2 4 0 秒の接触時間および 6 0 0 秒の解離時間で注入した。各サイクルの後、プロテイン A センサーチップを 1 0 m M グリシン p H 1 . 5 で再生した。速度データを二重基準減算した。

操作された A A V (A P P R A I S E - A A V) のスクリーニングのための自動ペアワイズペプチド受容体分析

【 0 2 3 4 】

標的受容体アミノ酸配列 (成熟タンパク質部分のみ) ならびに目的の 2 つの A A V カプシド由来のアミノ酸 5 8 7 ~ 5 9 4 (野生型 A A V 9 V P 1 インデックス) に対応するペプチド配列を含有する F A S T A フォーマットファイルを、C o l a b F o l d のバッチバージョン (a l p h a f o l d - c o l a b f o l d 2 . 1 . 1 4) 、多重配列アライメントのクラウドに基づく実施、および A l p h a F o l d 2 多量体を使用した構造予測に使用した。C o l a b F o l d J u p y t e r ノートブックを、G P U (N V I D I A テスラ V 1 0 0 S X M 2 1 6 G B ; G P U の同じモデルが最も一貫した結果をもたらしたことが判明した) を使用した G o o g l e C o l a b o r a t o r y セッションで実行した。特に明記しない限り、A l p h a F o l d 2 - 多量体 - v 2 をデフォルトの A l p h a F o l d バージョンとして選択した。各モデルを 3 回リサイクルし、各競合から 1 0 個のモデルを生成した。モデルを、P y M o l (バージョン 2 . 3 . 3) を用いてカスタムスクリプトを使用して定量し、各推定ペプチド - 受容体複合体モデルにおいて、界面の原子の総数 (

【 数 3 】

$N_{\text{接触}}^{\text{POI}}$

、 5 オングストロームの距離カットオフによって定義される) 、受容体と衝突していたペプチドの原子の総数 (

【 数 4 】

$N_{\text{衝突}}^{\text{POI}}$

、 1 の距離カットオフによって定義される) 、ペプチドの結合角 (θ 、受容体重心から受容体アンカーまでのベクターと受容体重心からペプチド重心までのベクターとの間の角度として定義される) 、およびペプチドの結合深度 (d は、受容体中心に対するペプチド

上の最も近い点と、小半径によって正規化された受容体の楕円体殻の小半径との間の距離の差として定義される)をカウントした。Hu11Rad8.1(Ly6a:13.4、Ly6c1:12.7、マウスCar4:23.0)を使用して、受容体の楕円体外皮の短半径を測定した。最後に、受容体結合の傾向をランク付けするためのメトリック【数5】

$\Delta B^{\text{POI, 競合物}}$

を、目的のペプチドの総結合スコアを競合ペプチドの対応スコアで減算することによって計算した。

【数6】

$$\Delta B^{\text{POI, 競合物}} = B^{\text{POI}} - B^{\text{競合物}}$$

$$= \max(B_{\text{エネルギー性}}^{\text{POI}} + B_{\text{角}}^{\text{POI}} + B_{\text{深度}}^{\text{POI}}, 0) - \max(B_{\text{エネルギー性}}^{\text{競合物}} + B_{\text{角}}^{\text{競合物}} + B_{\text{深度}}^{\text{競合物}}, 0), \quad (5)$$

【0235】

ここで、個々の用語は以下のように定義される。

【数7】

$$B_{\text{エネルギー性}}^{\text{ペプチド}} = \max(N_{\text{接触}}^{\text{ペプチド}} - 10^3 \cdot N_{\text{衝突}}^{\text{ペプチド}}, 0) \quad (2)$$

$$B_{\text{角}}^{\text{ペプチド}} = \begin{cases} -10^3 \cdot \left(1 - \frac{\theta}{\frac{\pi}{2}}\right)^{10}, & \text{if } \theta < \frac{\pi}{2} \\ 0, & \text{if } \frac{\pi}{2} \leq \theta \leq \pi \end{cases} \quad (3)$$

$$B_{\text{深度}}^{\text{ペプチド}} = 10^2 \cdot d^3 \quad (4)$$

【0236】

反復にわたるこのメトリックの平均数を使用してマトリックスを形成し、ヒートマップをプロットした。ヒートマップ中のペプチドは、各ペプチドが勝った競合の総数から負けた競合の総数を引いてランク付けした(一標本スチューデントのt検定で0.05を超えるp値を有する

【数8】

$\Delta B^{\text{POI, 競合物}}$

スコアを有する競合は除外した)。

受容体 - AAV複合体の計算構造モデリング

【0237】

ペプチド受容体構造を、APPRAISE - AAVの節に記載されているのと同様の手順を使用してモデル化したが、より高い精度を達成するために入力ファイル中の目的の単一のペプチドのみを用いた。

【0238】

AAV三量体 - 受容体複合体モデルを、統合構造モデリング法(図13A)を用いて作製した。計算効率を最適化しながらウイルス粒子全体を再現する可能性がある推定受容体との最小完全結合界面として、AAV3回対称界面における三量体を選択した。最初に、ペプチド受容体モデルを、上記のような標的受容体との複合体における目的のAAVバリエーションからの残基587と残基594(両方とも野生型AAV9VP1インデックス)との間の15merペプチド配列をモデル化することによって作製した。次いで、目的の

10

20

30

40

50

AAVバリエーションの三量体モデルを、AlphaFold2多量体を使用してモデル化した。ペプチド受容体モデルの15量体ペプチド、Pro5'およびPhe6'において最も高い信頼スコア(pLDDTスコア)を有する2つの残基を、三量体モデルの第一鎖上の対応する残基に構造的に整列させた。次いで、ペプチド受容体モデル由来の受容体および2つの高信頼性AAV残基を三量体モデル由来の残りのAAV残基と組み合わせることによって、粗い組み合わせモデルを生成した。次いで、粗合成モデル(それぞれ残基588-(588+)⁴および残基(588+)⁷-590に対応する)におけるPro5'とPhe6'との間の2つのループおよび高信頼性AAV9主鎖を、Rosettaソフトウェアバンドル(リリース2018.48.60516)からのRosettaRemodelを使用して個別にリモデリングした。最後に、これらのリモデリングされたループをマージして最終モデルを生成した。元のAlphaFold2出力からの各残基のpLDDTスコアを使用して、最終モデルの画像を色付けした。

10

PHP.eCのためのM-CREATE選択

【0239】

AAVカプシドライブラリを、先に記載されたように次世代シーケンシングのためにインピボで作製し、投与し、回収した。簡潔には、AAV9 587から7mer挿入を経てAAV-PHP.C1、C2、C3およびC4のAAV9位590までスキャンする3つのアミノ酸NNK置換をプールすることによって初期ライブラリを生成した(図5A)。選択後のラウンド1ライブラリおよびスパイクインコントロールから同定された5515個のカプシドバリエーションの縮重コドン重複を含むカスタム設計合成ラウンド2ライブラリを、Twist Biosciencesによって等モル比で合成した。カプシドモザイク現象を防止するために、293T産生細胞の150mmディッシュあたり10ngの集合したライブラリのみをトランスフェクトし、集合したカプシドをトランスフェクションの60時間後に精製した。ラウンド1ライブラリを、Syn-Creにおいてマウス1匹当たり 5×10^{10} v.g.で後眼窩注入し、ラウンド2ライブラリをSyn-Cre、GFAP-Cre、Tek-Cre、Olig2-Cre、野生型C57BL/6J、および野生型BALB/cJマウスにおいてマウス1匹当たり 5×10^{11} v.g.で後眼窩注入した。

20

【0240】

注射の2週間後、マウスを安楽死させ、脳を含む全ての器官を回収し、ドライアイス上で急速凍結し、-80℃で保存した。Beadbugホモジナイザー(ホモジナイザー、Benchmark Scientific、D1032-15、D1032-30、D1033-28)を用いて凍結組織をホモジナイズし、rAAVゲノムをTrizol抽出した。精製されたrAAV DNA(Zymo DNA CleanおよびConcentrator Kit D4033)を、Cre依存性プライマーを使用してPCRによって増幅し、次世代シーケンシングのために多様化された領域の周りにフローセルアダプターを付加した。NGSデータを、ラウンド1バリエーション配列カウントおよびラウンド2バリエーション濃縮スコアを抽出するために以前に記載されたように整列させ、処理した。

30

実施例2

血液脳関門を横断するための新しい標的としての炭酸脱水酵素IVおよびマウス制限Ly6c1の同定

40

【0241】

この実施例は、血液脳関門を横断するための2つの新規標的としての炭酸脱水酵素IVおよびマウス拘束性Ly6c1の同定を実証する。CNS発現レベルと内皮細胞特異性との交差について選択された40個の候補受容体のキュレーションされたプールをスクリーニングすることにより、Ly6c1および炭酸脱水酵素IVを、10個のLy6a非依存性操作されたAAV(同様にまた、Ly6a依存のPHP.N)の増強されたBBB横断の分子受容体として同定した。これらの知見は、NHPのより効率的な割り当てを可能にし、将来の指向性進化ライブラリ設計に情報を与え、ヒトタンパク質相互作用のための受容体ガイドエンジニアリングを直接可能にする。

50

L y 6 a を利用しない操作された A A V の同定

【 0 2 4 2 】

L y 6 a は、マウスにおける P H P . B および P H P . e B の増強された C N S 指向性に関与する受容体である。1つの株特異的 S N P は、その G P I 固定膜局在化を破壊する(図 1 A)。以前に、M - C R E A T E 指向性進化選択プラットフォームを A A V 9 バリエーションのライブラリに適用して(カプシド可変領域 V I I I の位置 5 8 8 に 7 アミノ酸挿入を含む)、多様な C N S 向性およびそれらの起源メンバーである A A V - P H P . B に代表される共有配列モチーフを有する操作された A A V のファミリーを同定した(図 1 B)。バリエーションの増強された C N S 効力は、B A L B / c J マウスでは欠如しており、この現象は、B B B 横断に対する L y 6 a へのそれらの共通の依存によって説明された。最近、B A L B / c J マウスにおいて増強された C N S 指向性を保持する、P H P . B 配列ファミリー外の複数の操作された A A V が同定された。これらの A A V の脱オーファン化を試みる前に、L y 6 a のそれらの独立性が最初に確認された。

10

【 0 2 4 3 】

潜在的な L y 6 a 結合相互作用を直接プローブするために、本発明者らは表面プラズモン共鳴 (S P R) を実施した。更に弱い相互作用の検出を確実にするために、L y 6 a を F c への融合によって二量体化し、プロテイン A チップ上に高密度で固定化した。各 A A V 分析物を、ある範囲の濃度にわたって試験した(図 1 C)。予想通り、A A V 9 は、いずれの濃度でも結合の証拠を示さず、P H P . B 配列ファミリーメンバーは全て、L y 6 a との強い結合相互作用を示した。アビディティおよび質量輸送の影響のために正確な親和性を決定することはできなかったが、相互作用プロファイルはナノモル濃度以下の親和性と一致した。逆に、全ての B A L B / c J 強化人工 A A V は A A V 9 と区別できず、L y 6 a との検出可能な相互作用を示さなかった。

20

遺伝的に多様なマウス株にわたる L y 6 a 非依存性の操作された A A V の C N S 効力

【 0 2 4 4 】

B A L B / c J 強化 A A V の C N S 効力における系統特異的差異を特徴付けるために、複数の遺伝子多様性マウス系統においてそれらのいくつかを用いて探索的評価を行った(図 2 A ~ 図 2 C および図 8 A)。C A G - m N e o n G r e e n をパッケージングした s s A A V (s s 、一本鎖)を動物 1 匹当たり 1×10^{11} v . g . の低用量で後眼窩注射した。組織を採取し、注射 3 週間後に画像化した。この脳領域が試験した全ての A A V によって強力に標的化されたので、比較のために視床を選択した。予想通り、それらの L y 6 a 相互作用を考慮すると、P H P . e B および P H P . N は、膜局在 L y 6 a を発現した 1 2 9 S 1 / S v l m J および D B A / 2 J マウス株において増強された効力を示し、G P I 破壊 L y 6 a を発現した C B A / J および N O D / S h i l t J マウス株において効力を大幅に減少させた。しかしながら、L y 6 a 非依存性 A A V は、感染性増強の明確なパターンを示した。選択的な A A V 株とマウス株の組合せを両性で調査し、株全体で同様の傾向が観察された(図 8 B)。雌マウスで観察された潜在的により高い効力は、A A V 効力のバッチ間変動または性別に関連する差から生じ得る。

30

【 0 2 4 5 】

以前、遺伝子技術を使用して L y 6 a 受容体を同定した。L y 6 a 非依存性ベクターの C N S 形質導入の増強に関与する受容体を同定するためのこのアプローチに従って、C 5 7 B L / 6 J および C B A / J マウスを交雑し、その子孫 (F 1) においてベクター P H P . C 3 を試験し、受容体が L y 6 a と同様に遺伝した場合の中間表現型を予想した。親株および F 1 成体の両方に、動物 1 匹当たり 3×10^{11} v . g . を後眼窩注射した。3 週間後、組織を採取し、画像化した。驚くべきことに、このより高い用量では、P H P . C 3 は、3 つの集団全てにおいて堅牢な C N S 感染性を示した(図 8 C)。この用量依存性は、単一の受容体の存在または非存在とのより微妙な機構的差異を示唆し、異なるアプローチの適用をもたらした。

40

人工 A A V の推定受容体のための細胞培養スクリーニングの構築

【 0 2 4 6 】

50

操作された A A V が効率的な B B B 横断を選択することができる受容体は、高度に発現され、脳の内皮細胞に高度に特異的である可能性が高い。したがって、解離した C 5 7 B L / 6 J 脳組織から以前に回収した単一細胞 R N A シーケンシングデータを分析した（図 3 A）。全ての他の C N S 細胞型クラスターと比較した遺伝子発現レベルおよび示差的発現を C N S 内皮細胞クラスター内で調査した。S c a n p y におけるそれらの内皮細胞差次的発現スコアを計算する前に、U n i p r o t において原形質膜に局在するとアノテーションされた遺伝子のみを選択するために遺伝子をフィルタにかけた。次いで、これらのスコアを各転写物の平均存在量に対してプロットし、高度に発現され、高度に特異的な C N S 内皮膜タンパク質の長い尾部を明らかにした。心強いことに、L y 6 a はこの尾部の遠方に出現した。この分析から、4 0 個の豊富で特異的な候補受容体のパネルを選択した（表 3）。

【表 3 - 1】

表3: 細胞培養スクリーンに含まれる C57bL/6J 脳内皮細胞膜タンパク質の単一細胞 RNA シーケンシングプロファイル

名称	アクセッション番号	平均発現	差次的発現
Abcb1a	NM 011076.2	0.000688904	7.942371
Abcg2	NM 011920.3	0.000745241	5.5607147

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

Acvrl1	NM_009612.3	0.000485079	6.7861333
Adgrf5	NM_001357332.1	0.000546496	7.453164
Adgrl4	NM_133222.3	0.000763887	8.241394
App	NM_001198823.1	0.000845707	0.04600084
Bsg	NM_009768.2	0.013027801	4.6841507
Car4	NM_007607.2	0.000713242	3.7107854
Cd34	NM_133654.3	0.000467251	3.0983913
Cdh5	NM_009868.4	0.000332645	7.486805
Cldn5	NM_013805.4	0.005443705	9.174832
Clec2d	NM_053109.3	0.000584914	6.370406
Clic1	NM_033444.2	0.000377934	2.6402416
Clic4	NM_013885.2	0.000408817	3.1440303
Eng	NM_007932.2	0.000646813	5.9965453
Esam	NM_027102.3	0.000660755	6.0463476
Fcgrt	NM_010189.3	0.000503876	4.028085
Fltl	NM_010228.3	0.002267079	8.539886
Ifitm2	NM_030694.1	0.000314049	3.5160391
Ifitm3	NM_025378.2	0.001015794	5.313354
Igflr	NM_010513.2	0.000750016	3.374137
Itm2b	NM_008410.2	0.001596154	-0.10450481
Kdr	NM_010612.2	0.000304256	6.8344116
Kitl	NM_013598.3	0.000382663	3.2804174
Ly6a	NM_010738.3	0.002695857	8.700766
Ly6cl	NM_010741.3	0.00381227	8.841889
Ly6e	NM_008529.3	0.001050145	2.9547617
Ocln	NM_008756.2	0.000208863	6.836091
Paqr5	NM_028748.2	0.000262998	7.7742887
Pecam1	NM_008816.3	0.000423881	7.1343536
Podxl	NM_013723.3	0.000407256	6.3635473
Prom1	NM_001163577.1	0.000271125	5.4568763
Serinc3	NM_012032.4	0.000562215	1.2317827
Slc22a8	NM_001164634.1	0.000243451	5.054169
Slc2a1	NM_011400.3	0.001843255	5.4381437
Slc6a6	NM_009320.4	0.001148025	3.8466463
Slc7a1	NM_007513.4	0.000403344	4.1706085
Slc1A4	NM_030687.1	0.001701704	8.396132
Slc1e1	NM_021471.2	0.000828427	3.688315
Tek	NM_013690.3	0.000224058	7.496325

10

20

30

【0247】

HEK293細胞における膜局在Ly6aの発現は、低感染多重度(MOI)でのAAV9と比較して、PHP.eB感染の効力を選択的に改善し、感染の程度および感染細胞の輝度が著しく増加したことが観察された(図9A)。この特性は、BBB通過型受容体間で保存される可能性が高い。したがって、この挙動は、受容体一過性過剰発現スクリーニング(図3Bおよび図3C)の基礎となった。40個の候補受容体の各々のC57BL/6Jコード配列を哺乳動物発現プラスミドにクローニングし、2つの異なる用量(図3Aおよび図3D)で三連で操作されたAAVに対して試験した。Ly6aと対になったPHP.eBを陽性対照とした。

40

【0248】

予想されたように、PHP.B配列ファミリーの全てのメンバーは、非トランスフェクト細胞と比較してLy6aトランスフェクト細胞において顕著な感染性のブーストを示したが、Ly6a非依存性AAVは両方の条件下で同様に機能した(図3D、図3Eおよび

50

図 9 B)。興味深いことに、全ての L y 6 a 依存性カプシドの感染性は、同様の程度まで高められた (図 10 B)。

L y 6 a 非依存性操作された A A V の B B B 横断に対する受容体としての L y 6 c 1 および C a r 4 の同定

【 0 2 4 9 】

新規受容体 (図 3 D) を有する全ての試験された L y 6 a 非依存性 A A V について感染性のブーストが観察された。驚くべきことに、それらの異なる配列ファミリーおよび低用量での C N S 効力の系統依存的パターンを考えると、初期 L y 6 a 非依存性 A A V の全てが同じ候補受容体 L y 6 c 1 に応答した (図 3 D ~ 図 3 G および図 9 B)。さらに、マウス系統にわたる C N S 感染性の L y 6 a 依存性パターンにもかかわらず、L y 6 c 1 トランスフェクト細胞において、P H P . N は感染性の増強も示した。より高い用量では、G P I 破壊 L y 6 a を発現した C B A / J マウスにおいて、P H P . N は A A V 9 および P H P . e B の両方を上回った (図 11 A および図 11 B)。L y 6 c 1 の多型はマウス系統間に存在したが (全ゲノムが利用可能であった 36 のマウス系統の公表された分析によって示されるように)、これらの多型のいずれも、8 つの L y 6 c 1 相互作用 A A V のいずれかの C N S 効力のパターンと関連しなかった。さらに、L y 6 a とは異なり、P r e d G P I を使用した L y 6 c 1 の原形質膜への G P I アンカリングを破壊する多型は予測されなかった。L y 6 c 1 相互作用の特異性を決定するために、更なる密接に関連した C N S 発現 L y 6 スーパーファミリーメンバーを用いてフォローアップスクリーニングを行った。L y 6 c 1 依存性 A A V と他の L y 6 タンパク質との交差反応性は見られなかった (図 3 G)。カプシド可変領域 I V に 7 つのアミノ酸置換を有し、成体マーモセットにおいて増強された効力を示した C A P - B 10 および C A P - B 22 は、上記のスクリーニングまたはそれらの N H P 指向性を説明するであろうマーモセット C N S 発現 L y 6 ファミリーメンバー (図 10 C) を用いた第 3 のスクリーニングのいずれにおいても、いかなる追加の受容体相互作用も示さなかった。さらに、L y 6 相互作用 A A V は、マウス L y 6 a の近縁の、最近報告されたヒト L y 6 S と交差反応しなかった (図 3 G)。

【 0 2 5 0 】

L y 6 フォローアップスクリーニングを、以前に同定された操作された A A V の第 2 のセット (9 P) を含むように拡大し、更なる L y 6 a および L y 6 c 1 相互作用 A A V (図 3 G) を得た。しかしながら、9 P 31 および 9 P 36 は、パネル中のどの L y 6 タンパク質とも感染性の増強を示さなかったため、全受容体スクリーニング (図 3 D) で試験した。9 P 31 および 9 P 36 の両方が、G P I 結合型酵素 C a r 4 による感染性のブーストを示した (図 3 D および図 9 B)。この相互作用は、膜結合炭酸脱水酵素 (図 3 G) の中で C a r 4 に特異的であった。L y 6 c 1 と同様に、マウス系統にわたる C a r 4 の多型は、原形質膜への G P I アンカリングに影響を及ぼすとは予測されなかった。マウス制限 L y 6 a および L y 6 c 1 とは異なり、C a r 4 は、非ヒト霊長類およびヒトを含む脊椎動物全体にわたって保存されている。したがって、スクリーニング結果を、C a r 4 ノックアウトマウス (B 6 . 129 S1 - C a r 4 ^{tm1Slly} / J、J a c k s o n l a b s 株 # 008217) を使用してインビボで確認した。免疫蛍光により、C a r 4 がホモ接合 W T / W T マウスの脳血管系全体にわたって強く発現され、K O / K O には完全に存在しないことが確認された (図 4 A)。動物 1 匹当たり 3×10^{11} v . g . を投与した場合、P H P . e B、9 P 31、および 9 P 36 は全て、野生型マウスの脳と肝臓の両方で強く発現した (図 4 B)。K O / K O マウスにおいて同じ条件下で、9 P 31 および 9 P 36 の両方が増強された C N S 向性を完全に失ったのに対して、P H P . e B は影響を受けなかった (図 4 C および図 11 B)。一方、肝臓向性はこの効果から切り離され、3 つ全てのウイルスが K O / K O マウスにおいて強い形質導入を示した。K O / K O マウスの末梢における 9 P 31 および 9 P 36 の効力の差は、もはや C N S への効率的なアクセスではない薬物動態学的効果に起因する可能性がある。

【 0 2 5 1 】

注目すべきことに、試験した全ての A A V は、内在性膜陰イオン輸送体である S l c o

1 c 1 (O a t p 1 c 1 としても知られる) でトランスフェクトした細胞において中程度の感染性のブーストを示した (図 3 D) 。しかしながら、他の潜在的な受容体でトランスフェクトされた細胞とは異なり、S l c o 1 c 1 でトランスフェクトされた細胞の m N e o n G r e e n シグナルは弱く拡散しており、細胞境界 (図 9 C) を超えて広がり、導入遺伝子の搬出または細胞健康表現型を示唆した。この効果の普遍性および脳における S l c o 1 c 1 発現の特異性は、親 A A V 9 の弱い B B B トランスサイトシスにおける可能な役割を示唆した。他の 3 6 個の候補受容体のいずれも、スクリーニングされた 1 6 個の操作された A A V のいずれに対しても有意な感染性のブーストをもたらさなかった。

実施例 3

受容体結合ペプチドおよび B B B 横断のための操作された A A V

10

【 0 2 5 2 】

この実施例は、受容体結合ペプチドおよび受容体結合ペプチドを含む操作された A A V の設計を実証し、B B B 横断におけるそれらの増強された効力を説明する。

改善された L y 6 c 1 依存性カプシドの指向性進化

【 0 2 5 3 】

指向性進化は、基礎となる生物系の理解が不完全であるにもかかわらず、所望の特性に対する適合性が向上した生体分子を生成するための強力な方法である。重要なことに、指向性進化ライブラリの結果を使用して、進化した特性を有する分子の作用機序を調べることによって新しい生体分子をロック解除することができる。リバースエンジニアリングの指向性進化のこのパラダイムは、全身投与後の C N S 濃縮のために A A V ライブラリに選択圧を適用することから得られた豊富なデータの蓄積に適用されている。

20

【 0 2 5 4 】

受容体標的指向性進化の概念実証を実証した。この目的のために、マウス受容体 L y 6 c 1 (対ヒト C a r 4) を、(1) 明確な B B B の相違を有する株、例えば L y 6 a 、および (2) 他の種では C a r 4 に利用できなかった M - C R E A T E 選択のための多様な C r e 遺伝子導入動物の迅速な利用可能性のために選択した。さらに、前臨床動物モデルの背景が混在していることを考えると、げっ歯類についても機能的に異なる遺伝子送達ベクターを有することが依然として重要であった。したがって、単一の最適化されたカプシドを、A A V カプシド指向進化のための以前に開発された M - C R E A T E 法を使用して、まだ満たされていない必要性である G P I 破壊 L y 6 a マウス系統における研究ツールとして広く採用するために操作した (図 5 A ~ 図 5 D) 。この方法は、C r e トランスジェニックマウスにおけるインビボ選択後の所望の組織および細胞型からの C r e 依存性 A A V ゲノム回収を使用し、様々な細胞型および組織にわたる選択されたカプシドの深い特性評価を可能にした。

30

【 0 2 5 5 】

M - C R E A T E を使用して、化学的に多様な L y 6 c 1 相互作用バリエーション P H P . C 1 、P H P . C 2 、P H P . C 3 および P H P . C 4 において、走査型 3 量体置換カプシドライブラリを構築した。これらのライブラリを、S y n - C r e マウスにおいて 2 ラウンドの選択のためにプールした (図 5 A) 。第 2 のラウンドの選択では、O l i g 2 - C r e マウス、T e k - C r e マウス、および G F A P - C r e マウス、ならびに野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスおよび B A L B / c J マウスも含めて、これらの株または細胞型間の増強の潜在的差異をバリエーション間の選択中に検出することができた (図 5 B) 。興味深いことに、P H P . C 2 バリエーションは C 5 7 B L / 6 J バックグラウンドで両方の選択ラウンドを支配したが (C r e 依存性または非依存性) 、P H P . C 1 変異体は B A L B / c J でラウンド 2 C r e 非依存性選択を支配した (図 1 2) 。選択後、高性能バリエーションを個別に作製し、特徴付けた。A A V - P H P . e C (バリエーション 1 9) は、P H P . C 1 から進化し、細胞培養において L y 6 c 1 相互作用を保持し (図 5 C) 、膜破壊された L y 6 a を有する複数のマウス株において、P H P . C 2 を上回った (図 5 D) 。したがって、P H P . e C は、膜局在 L y 6 a を伴わないマウス系統における導入遺伝子送達のための強力なツールを提供した。

40

50

【0256】

低用量での遺伝的に多様なマウス系統にわたるそれらのカプシド挿入配列およびCNS効力のパターンの違いは、BBBを横断するための潜在的に多様な機構を示唆したが、9つのカプシドが同じ受容体Ly6c1と相互作用することが見出された。マウス系統にわたる効力の差は、PHP・C3およびPHP・Nで見られるように、高度に用量依存的であり得る。これは、場合によっては、細胞培養スクリーニングが、より高い用量でのみインビボで機能的に関連するようになり得る相互作用に感受性であり得ることを示唆している。いくつかのLy6c1多型がマウス系統にわたって存在したが、Ly6a依存性AAVにおける観察と同様に、突然変異バリエーションとAAVの系統効力との間に明確なパターンは現れない。さらに、Ly6aとは異なり、配列多型のいずれも、Ly6c1 GPIアンカリング、したがって膜局在化を妨げると予測されなかった。Ly6c1発現レベルも近交系マウス系統にわたって一貫して高かったが、最近の野生系マウス系統では有意に低かった。これは、ここで観察される低用量効力パターンが代わりに、各AAVの個々のLy6c1結合フットプリントがどのようにして株依存性配列多型によって影響されるかの違い、または未同定のオフターゲット相互作用の違いから生じ得ることを示唆している。

受容体結合ペプチドおよび操作されたAAV結合ポーズをインシリコで同定するためのAlphaFold2ベースの方法

【0257】

受容体とAAVカプシドのペアリングのパネルを同定したので、タンパク質構造予測方法を使用して、操作されたAAVおよびそれらの新たに同定された受容体の結合ポーズを生成した。APPRAISE - AAVのためのAlphaFold2ベースの計算方法を適用した。APPRAISE - AAVインシリコ法は、炭酸脱水酵素IV（例えば、Car4）を含む、選択された標的受容体と相互作用する可能性が高いカプシドバリエーションを探すために、任意の既存の操作されたカプシドライブラリデータセットに適用することができる。モデリングパイプラインはまた、構造的に解明することが困難であることが証明されているAAV受容体複合体の高信頼性結合モデルを提供することができる。AAVは、このインシリコアプローチを実証するための例として使用されるが、APPRAISE方法論はAAVに限定されない。さらに、完全なAAV三量体複合体構造を生成するためのパイプラインを容易に使用して、AAVの指向性進化によって同定された操作されたペプチド挿入の翻訳を他のタンパク質モダリティに導くことができる。

【0258】

具体的には、APPRAISE - AAVインシリコ法は、AlphaFold2を使用して、潜在的な受容体（図6A）と相互作用するために競合している2つの異なるAAVバリエーション由来の変異原性挿入にまたがる表面露出ペプチド（AA587-594）を配置した。これは、カプシド可変領域VIIの溶媒露出残基を包含する最小ペプチドを含んでいた。界面エネルギー、結合角度および結合ポケット深度の計算を含む物理的および幾何学的スコアリングパラメータの組み合わせを使用して、ペプチド競合メトリックを生成した。これらの個々のペアワイズ競合からの結果は、AlphaFold2ニューラルネットワークにコードされるそれらの受容体結合確率に従ってAAVカプシド挿入ペプチドのセットをランク付けするより大きなマトリックスに組み立てることができる。Ly6aおよび新たに同定された受容体に適用した場合、実験的に検証されたLy6a、Ly6c1およびCar4挿入ペプチドは、それぞれのランキングの上位に上げられた（図6B～図6C）。しかしながら、Ly6aを含む9P08またはCar4を含む9P36等、いくつかの偽陰性も観察された。

【0259】

ペプチドが受容体に結合するかどうかの予測に加えて、結合相互作用の構造的詳細も計算的に調べた。結合ポーズは、頂部AAV挿入ペプチドをその受容体と対にすることによって生成された。各ペアリングは、これらの予測されたポーズにおいて（残基ごとの推定モデル信頼度pLDDTスコアおよび複製モデル間の一貫性によって決定されるように）

結合界面の高信頼性領域を破壊すると仮定される点突然変異を含有する受容体を用いて細胞培養スクリーニングを繰り返すことによって検証された。PHP・eBペプチドは、Ly6aの溝に入り込み、Pro5'およびPhe6'（図6D）においていくつかのLy6a残基（図6E）との強い相互作用を形成すると予測された。したがって、この溝、Ly6a Ala58Argに突然変異を導入し、野生型受容体とのPHP・eBの感染性増強を破壊することが分かった。この実験結果は、in silico APPRAISE - AA Vランキングにおける信頼性を更に強化した。

【0260】

AA V - 受容体相互作用の全体像を得るために、AA Vカプシドの3回対称性スパイクと関連して、PHP・eB挿入ペプチドおよびLy6a受容体複合体をモデル化した。この構造は、大きなサイズのAA Vカプシド（三量体あたり約200kDa）、ならびに操作されたカプシドと受容体との間のしばしば弱い動的結合相互作用（アピディティなしで可能なμM親和性）のために、標準的なモデリングツールにとって困難であった。AlphaFold2は、完全長PHP・eBカプシドとLy6aとの間の直接的な接触を、単量体受容体構成または三量体受容体構成のいずれにおいても捕捉することができなかった（データは示さず）。この課題に対処するために、統合構造モデリングパイプラインが開発された。このパイプラインでは、AlphaFold2 - 多量体を使用して予測されたAA Vカプシド三量体の初期モデルを、ペプチド挿入の高信頼性Pro5'およびPhe6'残基、ならびにAA Vカプシド3回対称性スパイクと関連して連結ペプチド残基のRosettaRemodel最適化を通じてAlphaFold2予測ペプチド - 受容体複合体モデルと構造的に整列させた（図13A）。この完全結合モデル（図6E）は、高解像度構造特性評価に耐性があることがこれまで証明されている動的相互作用のスナップショットを提供した。

【0261】

PHP・eB - Ly6aモデルの結果は、利用可能な実験結果と一致した。PHP・eB単量体モデルと低温EMベースのモデル（PDB ID: 7WQO）との間の二乗平均平方根偏差（RMSD）は0.36オングストロームであった。RMSDは、PHP・eBの操作されたループで1.36オングストロームまで増加した。非複合化PHP・eBの低温EM構造からの唯一の高信頼性偏差はPhe6'の側鎖であり、これは有意な電子密度を示さず、柔軟性を示したが、PHP・eB単量体モデルにおいてLy6aと安定な相互作用を形成した（図13B、右）。Pro5'およびPhe6'の高信頼性予測は、PK3量体挿入のみがLy6a結合を得るのに十分であったことを示す最近の証拠と一致した。Ly6aは三量体の任意の挿入ループに結合することができるが、更なる相互作用は立体衝突を誘発し、カプシド三量体あたり1つのLy6aの比を支持した。興味深いことに、Ly6aの60個の結合コピーを含むことを強制されたPHP・EB - Ly6a複合アンサンブル画像は、最近報告されたCryoEMマップに似ており、その解析パイプラインは、60個の単一占有結合部位全てを平均して複合マップを形成する（図13C）。PHP・eB - Ly6a複合体モデルは、Ly6aドメインとAAVR PKD2ドメインの両方の単一コピーが、飽和結合実験と一致して、衝突することなく（図13D）同じ3倍スパイクに同時に結合することができることを示した。Ly6a SNP D63GがPHP・eB結合に影響を及ぼさなかったことを示す以前の研究と一致して、残基は、PHP・eB - Ly6a複合体モデルにおけるPHP・eBペプチド原子から10オングストロームを超えていた。PHP・eB - Ly6a複合体モデルは、AA V挿入隣接残基を含むいくつかの相互作用を含み、これは以前の報告と一致していた（図6G）。

【0262】

次いで、これらの構造モデリング法を、新たに同定された受容体に適用した。興味深いことに、Ly6aおよびCar4とは異なり、Ly6c1を有するPHP・C2ペプチドの予測される結合ポーズは、使用されたAlphaFold - 多量体のバージョンによって変化することが見出され、v1予測は、細胞培養感染性アッセイからの突然変異データと密接に一致する（図14A）。バージョン間のこのような相補性は、以前に報告されて

いる。マウス Car 4 では、9 P 3 1 ペプチドが酵素の触媒ポケットに侵入した（図 7 A）。9 P 3 6 と共有される 9 P 3 1 チロシン残基は酵素活性部位に接近し、9 P 3 1 の多様なトリプトファンは補助ポケット（図 7 B）にパーチェス（purchase）を見出す。この予測された結合ポーズは、緑内障に処方される広範な炭酸脱水酵素阻害剤であるプリンゾラミド（PDB ID 3NZC）の結合部位と競合的であった。細胞培養感染性アッセイでは、プリンゾラミドは 9 P 3 1 および 9 P 3 6 効力の用量依存的阻害を示したが、PHP.eB は影響を受けなかった（図 7 B）。より小さいプリンゾラミドは、側鎖が種間でほとんど保存されている Car 4 の触媒コアの深部に結合した（図 7 C）。しかしながら、9 P 3 1 ペプチドは、かなりの配列分散があった酵素の表面まで伸長した。同様に、プリンゾラミドはマウスおよびヒトの両方の Car 4 に結合したが、9 P 3 1 および 9 P 3 6 はマウスの Car 4 に特異的であった（図 7 D）。9 P 3 1 結合部位の高度に分岐したループを交換したキメラ受容体は、この領域が 9 P 3 1 および 9 P 3 6 の効力を制御するのに必要であるが十分ではないことを示した。第 2 の潜在的な Car 4 結合部位はまた、9 P 3 1 および 9 P 3 6 を有するより低いランクのポーズによって示唆されたが、突然変異誘発実験は一貫性のない効果を示した（図 14 B）。APPR AIS E - AAV 法によって支援される種に適した CA 4 に対する新しい AAV の将来の合理的な操作は、CNS 効力が増強された非侵襲性ベクターの作製のための有望な新しい手段である。CA 4 を標的とすることはまた、多様なタンパク質および化学様式にわたって用途を見出すことができる。最適な BBB 横断特性を有するヒト CA 結合 AAV の操作を更に検証するために、インビボ実験を行うことができる。

10

20

【0263】

前述の実施形態の少なくともいくつかでは、実施形態で使用される 1 または複数の要素は、そのような置換が技術的に実現不可能でない限り、別の実施形態で交換可能に使用することができる。特許請求される主題の範囲から逸脱することなく、上記の方法および構造に対して様々な他の省略、追加および修正が行われ得ることが当業者には理解されよう。そのような修正および変更は全て、添付の特許請求の範囲によって定義されるように、主題の範囲内に含まれることが意図されている。

【0264】

本明細書における実質的に任意の複数形および / または単数形の用語の使用に関して、当業者は、文脈および / または用途に適切であるように、複数形から単数形へ、および / または単数形から複数形へと変換することができる。様々な単数 / 複数の置換は、明確にするために本明細書に明示的に記載され得る。本明細書および添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、「1つの (a)」、「1つの (an)」および「その (the)」は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、複数の指示対象を含む。本明細書における「または」への任意の言及は、特に明記しない限り、「および / または」を包含することが意図される。

30

【0265】

一般に、本明細書、特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本体）で使用される用語は、一般に、「オープン」用語（例えば、「含む / 挙げられる (including)」という用語は、「含む / 挙げられるがこれに限定されない (including but not limited to)」と解釈されるべきであり、「有する (having)」という用語は、「少なくとも有する (having at least)」と解釈されるべきであり、「含む / 挙げられる (includes)」という用語は、「含む / 挙げられるがこれに限定されない (includes but not limited to)」等と解釈されるべきである）として意図されることが当業者によって理解されよう。特定の数の導入された請求項の記載が意図される場合、そのような意図は請求項に明示的に記載され、そのような記載がない場合、そのような意図は存在しないことが当業者によって更に理解されるであろう。例えば、理解を助けるために、以下の添付の特許請求の範囲は、特許請求の範囲の記載を導入するための導入句「少なくとも 1 つの」および「1 または複数の」の使用を含み得る。しかしながら、そのような語句の

40

50

使用は、不定冠詞「1つの(a)」または「1つの(an)」による請求項列挙の導入が、そのような導入された請求項列挙を含む任意の特定の請求項を、同じ請求項が導入句「1または複数の」または「少なくとも1つ」および「1つの(a)」または「1つの(an)」等の不定冠詞(例えば、「1つの(a)」および/または「1つの(an)」は、「少なくとも1つの(at least one)」または「1または複数の(one or more)」を意味すると解釈されるべきである)を含む場合であっても、1つのそのような列挙のみを含む実施形態に限定することを意味すると解釈されるべきではなく、特許請求の範囲の記載を導入するために使用される定冠詞の使用についても同じことが当てはまる。さらに、導入された請求項の記載の特定の数が明示的に記載されている場合でも、当業者は、そのような記載が少なくとも記載された数(例えば、他の修飾語を含まない「2つの列挙」の裸の列挙は、少なくとも2つの列挙、または2またはそれを超える列挙を意味する)を意味すると解釈されるべきであることを認識するであろう。さらに、「少なくとも1つのA、B、およびC等」に類似した慣例が使用される場合、一般に、そのような構成は、当業者がその慣例を理解するであろう意味で意図される(例えば、「少なくとも1つのA、B、およびCを有するシステム」は、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AとBとを一緒に、AとCとを一緒に、BとCとを一緒に、および/またはAとBとCとを一緒に有するシステム等を含むが、これらに限定されない)。「少なくとも1つのA、B、またはC等」に類似した慣例が使用される場合、一般に、そのような構成は、当業者が慣例を理解するであろうという意味で意図される(例えば、「少なくとも1つのA、B、またはCを有するシステム」は、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AとBとを一緒に、AとCとを一緒に、BとCとを一緒に、および/またはAとBとCとを一緒に有するシステム等を含むが、これらに限定されない)。2またはそれを超える代替的な用語を提示する実質的に任意の離散的な単語および/または句は、明細書、特許請求の範囲、または図面のいずれかにかかわらず、用語の1つ、用語のいずれか、または両方の用語を含む可能性を企図すると理解されるべきであることが当業者によって更に理解されるであろう。

【0266】

さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ群に関して記載されている場合、当業者は、本開示がそれによってマーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループに関して記載されていることを認識するであろう。

【0267】

当業者によって理解されるように、任意のおよび全ての目的のために、例えば書面による説明を提供することに関して、本明細書に開示される全ての範囲はまた、任意のおよび全ての可能な部分範囲およびその部分範囲の組み合わせを包含する。列挙された範囲はいずれも、同じ範囲を少なくとも等しい半分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1等に分割することを十分に説明し、可能にするものとして容易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で説明する各範囲は、下3分の1、中央3分の1、および上3分の1等に容易に分解することができる。また、当業者によって理解されるように、「最大(up to)」、「少なくとも(at least)」、「より大きい、~を超える(greater than)」、「より小さい、より少ない(less than)」等の全ての言語は、列挙された数を含み、後に上述のように部分範囲に分解することができる範囲を指す。最後に、当業者によって理解されるように、範囲は個々のメンバーを含む。したがって、例えば、1~3個の物品を有する群は、1、2、または3個の物品を有する群を指す。同様に、1~5個の物品を有する群は、1、2、3、4または5個の物品を有する群等を指す。

【0268】

様々な態様および実施形態が本明細書に開示されているが、他の態様および実施形態が当業者には明らかであろう。本明細書に開示される様々な態様および実施形態は、例示の目的のためのものであり、限定することを意図するものではなく、真の範囲および精神は以下の特許請求の範囲によって示される。

10

20

30

40

50

【 図 1 C - 2 】

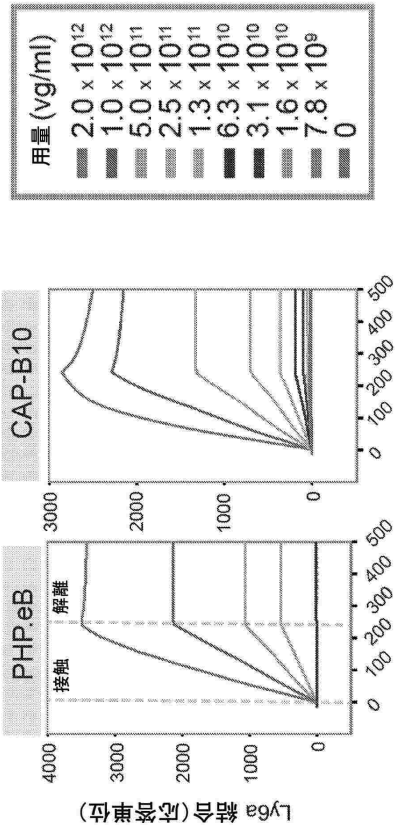


FIG. 1C (続き)

【 図 1 C - 3 】

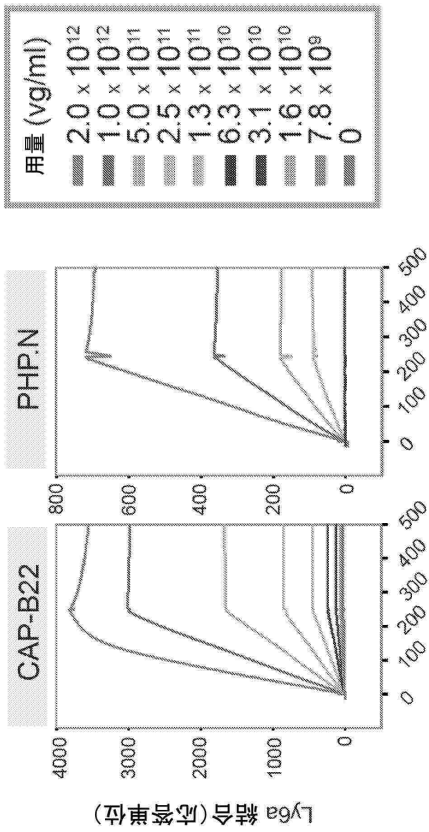


FIG. 1C (続き)

【 図 1 C - 4 】

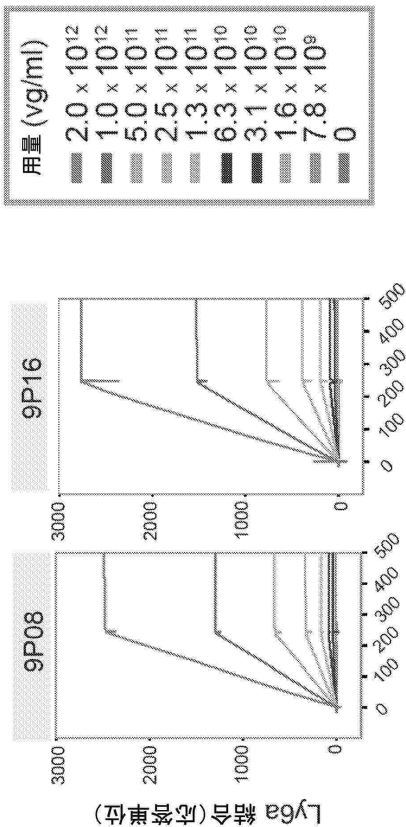


FIG. 1C (続き)

【 図 1 C - 5 】

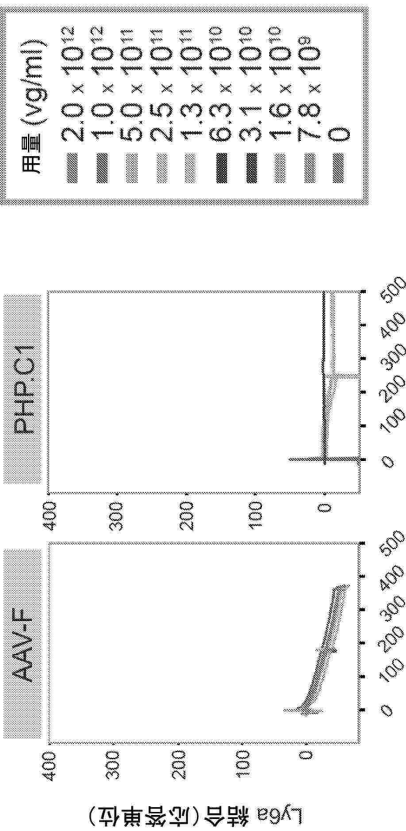


FIG. 1C (続き)

10

20

30

40

50

【 図 1 C - 6 】

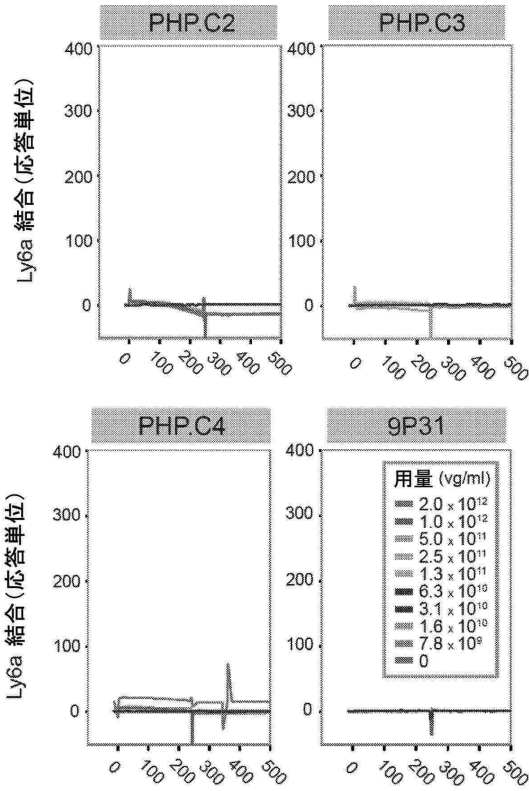


FIG. 1C (続き)

【 図 1 C - 7 】

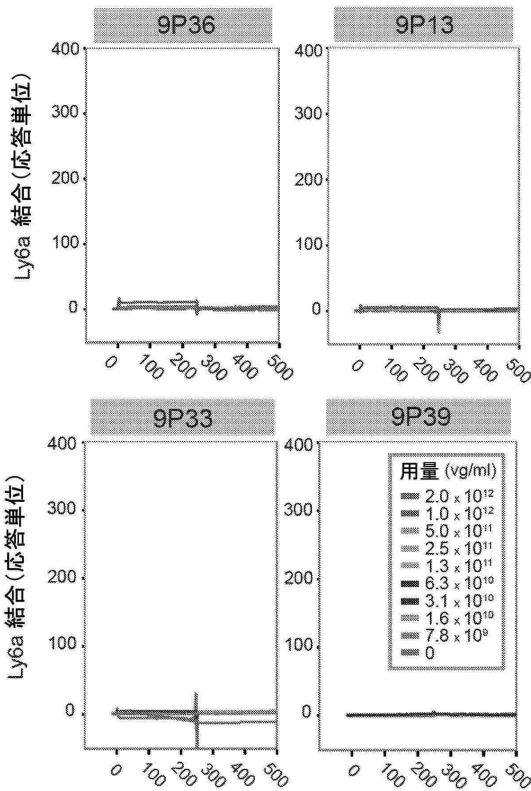


FIG. 1C (続き)

【 図 2 A - 1 】

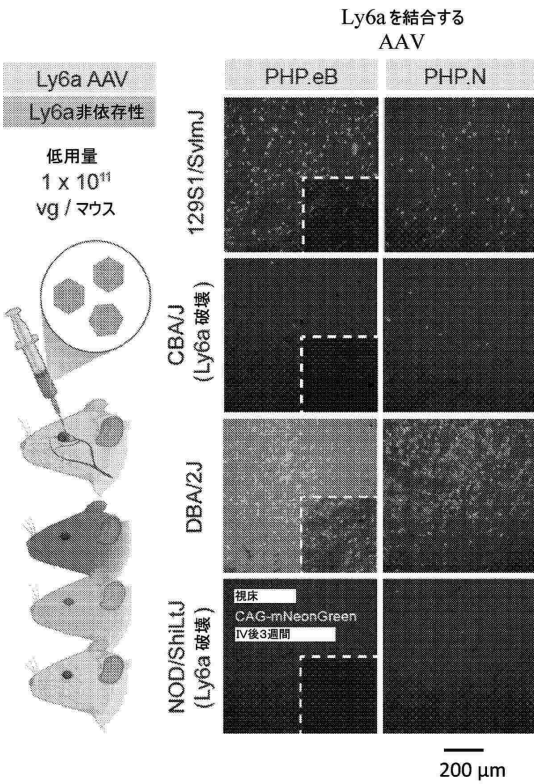


FIG. 2A

【 図 2 A - 2 】

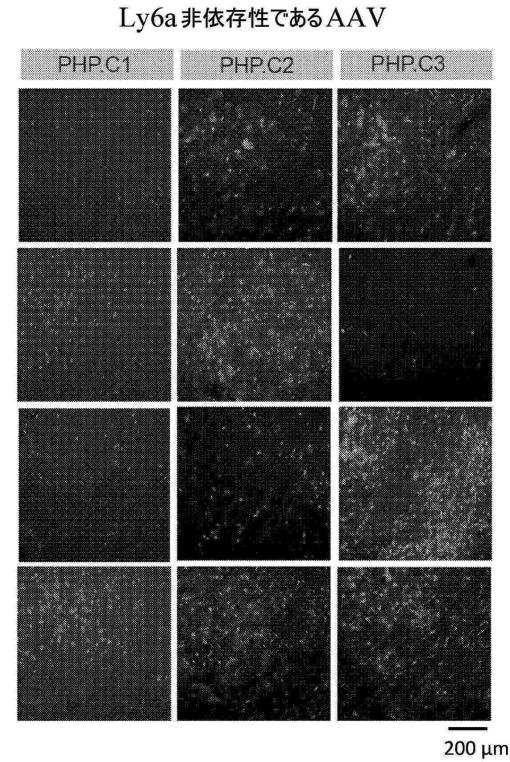


FIG. 2A (続き)

10

20

30

40

50

【 図 2 A - 3 】

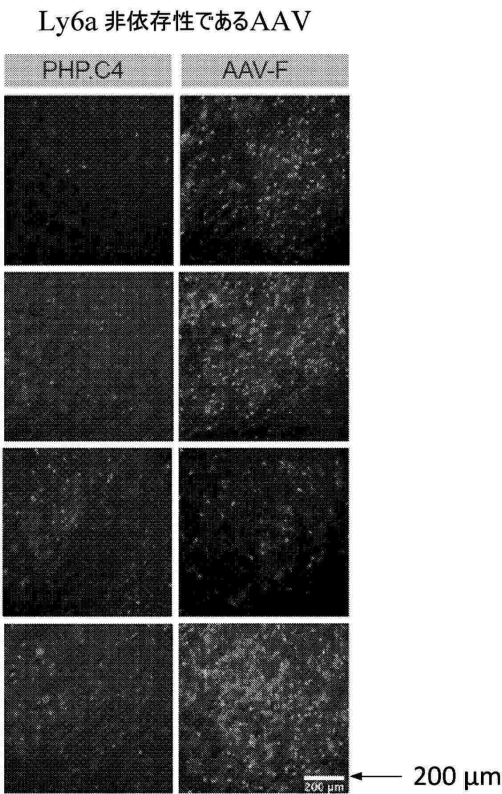


FIG. 2A (続き)

【 図 2 B 】

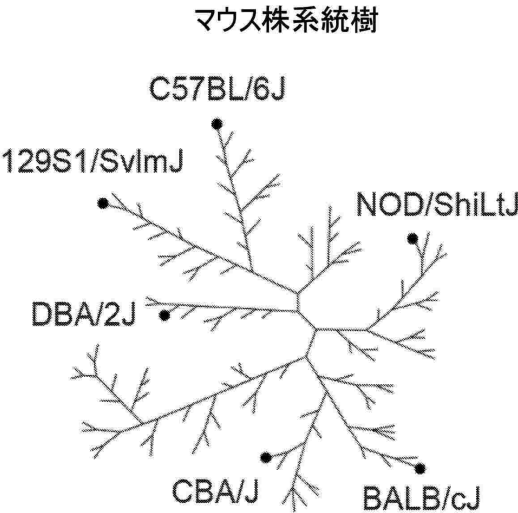


FIG. 2B

【 図 2 C - 1 】

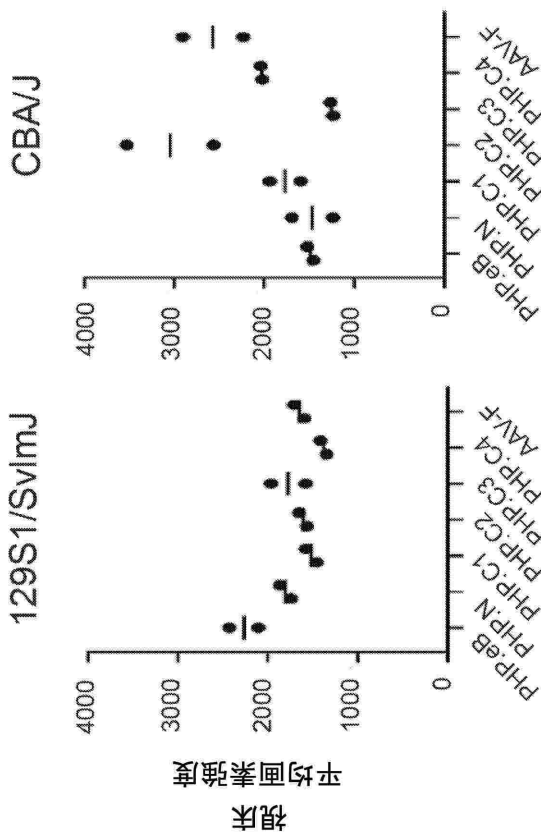


FIG. 2C

【 図 2 C - 2 】

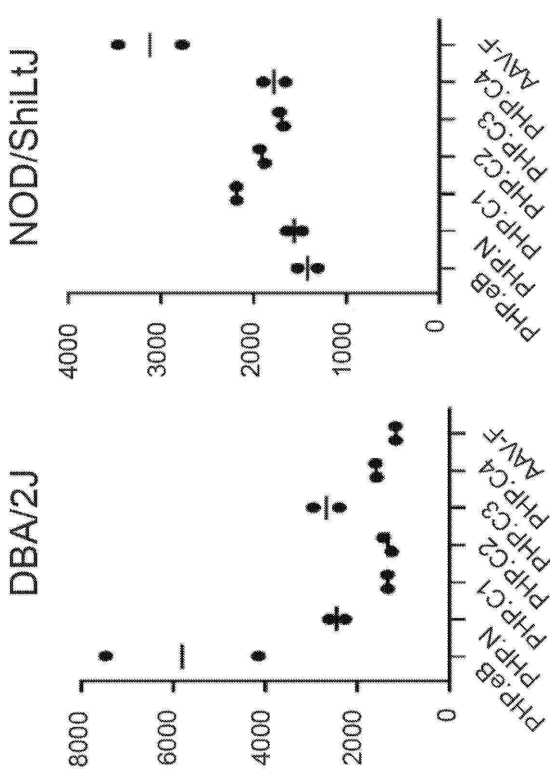


FIG. 2C (続き)

10

20

30

40

50

【 図 3 A 】

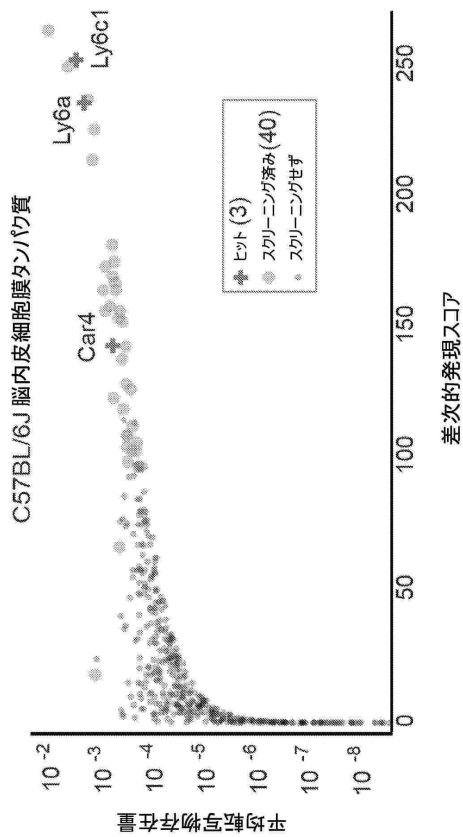


FIG. 3A

【 図 3 B 】

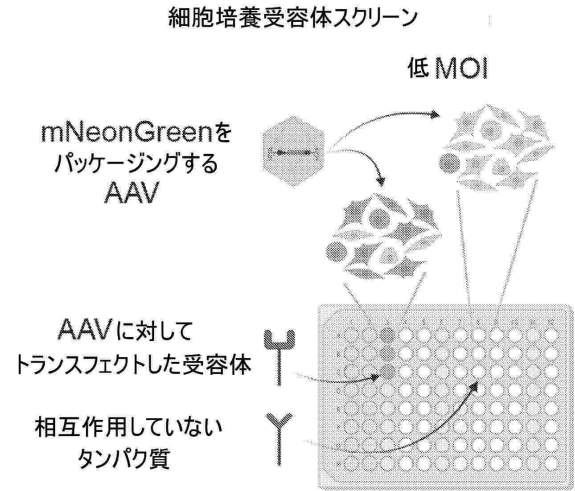


FIG. 3B

【 図 3 C 】

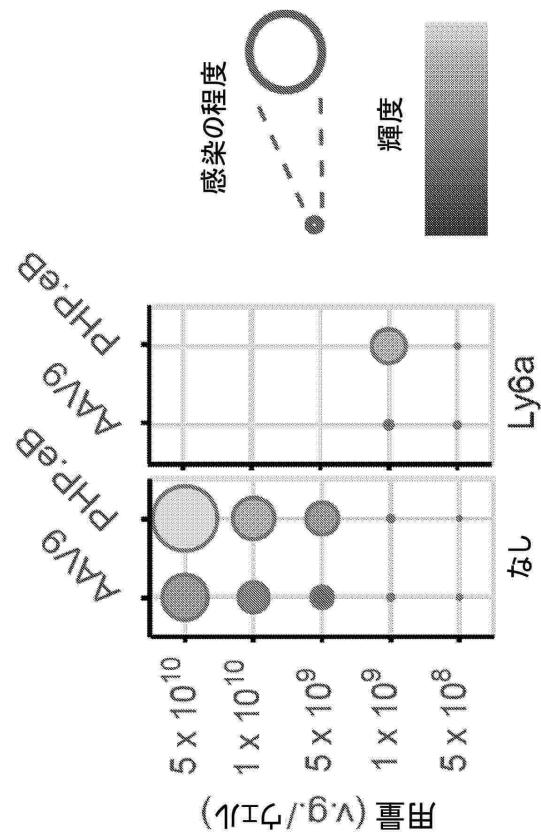


FIG. 3C

【 図 3 D 】

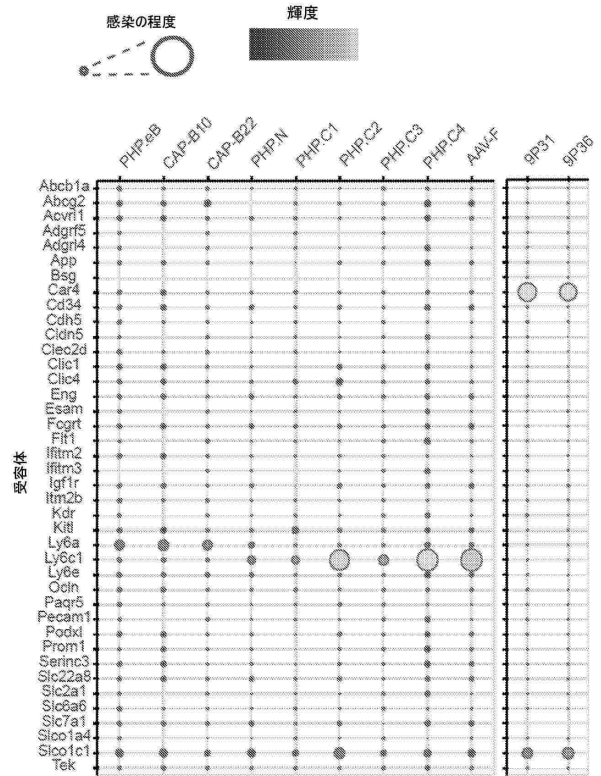


FIG. 3D

10

20

30

40

50

【 図 3 E 】

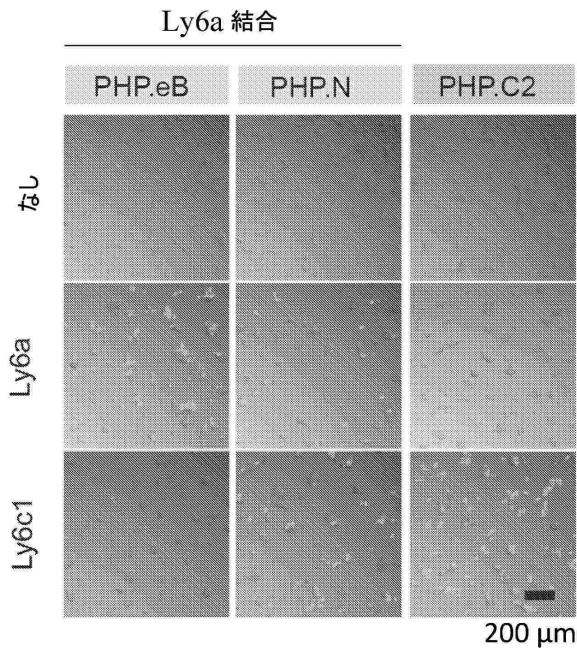


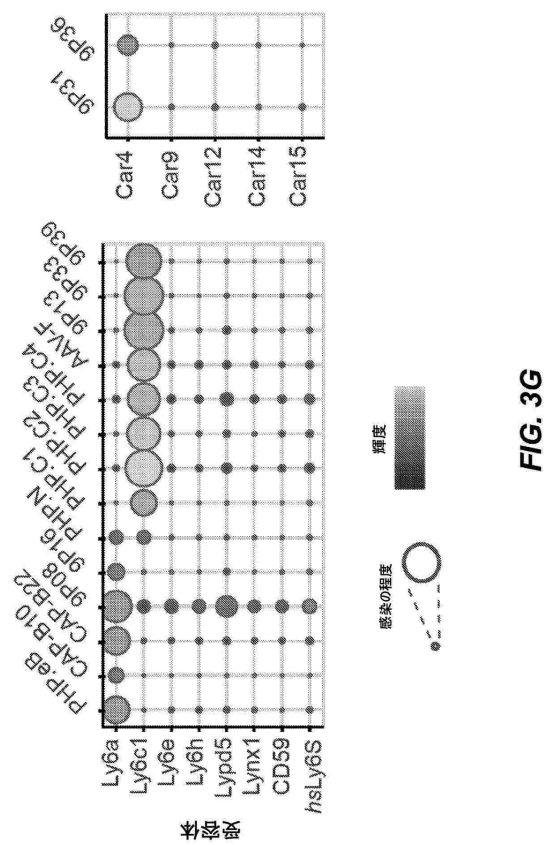
FIG. 3E

【 図 3 F 】

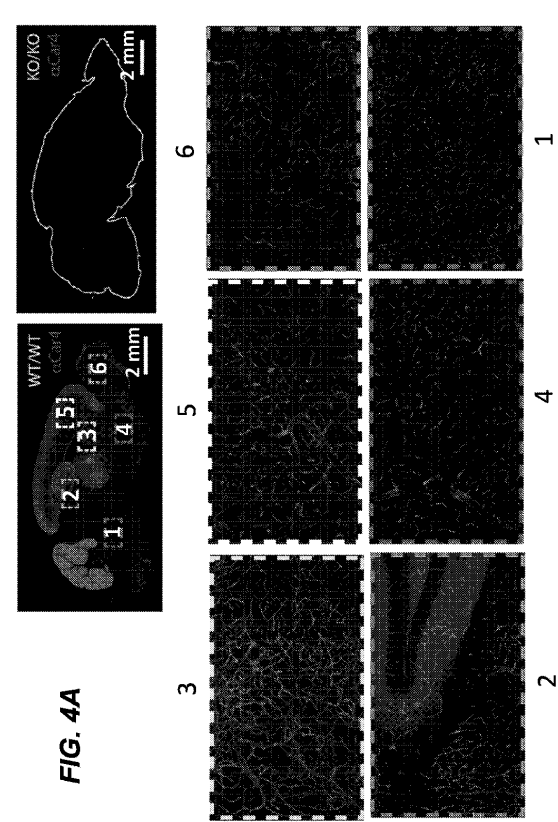


FIG. 3F

【 図 3 G 】



【 図 4 A 】



10

20

30

40

50

【 図 4 B 】

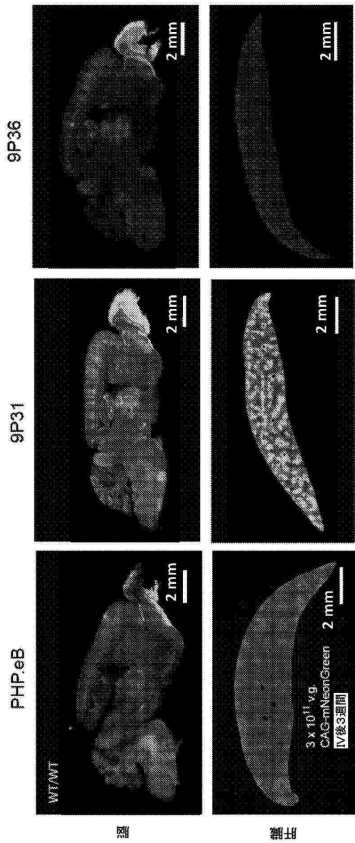


FIG. 4B

【 図 4 C 】

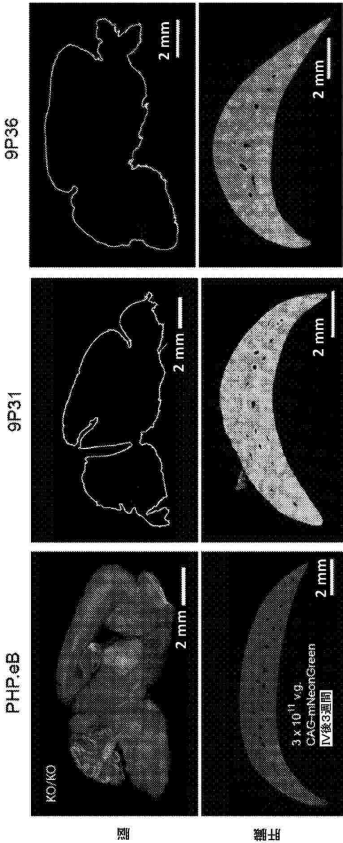


FIG. 4C

【 図 5 A - 1 】

M-CREATE ライブラリ設計			
PHP.C1		PHP.C2	
AQRYQGDSVAQ	配列番号 7	AQWSTNAGYAAQ	配列番号 8
XXXYYQGDSVAQ	配列番号 19	XXXSTNAGYAAQ	配列番号 24
AQXXXGDSVAQ	配列番号 20	AQXXXNAGYAAQ	配列番号 25
AQRYXXXSVAQ	配列番号 21	AQWSXXXGYAAQ	配列番号 26
AQRYQGXXXAAQ	配列番号 22	AQWSTNXXXAAQ	配列番号 27
AQRYQGDSXXX	配列番号 23	AQWSTNAGXXX	配列番号 28
PHP.C3		PHP.C4	
AQERVGFQAQAQ	配列番号 9	AQWTHGSAAQ	配列番号 10
XXXRVGFQAQAQ	配列番号 29	XXXTHGSAAQ	配列番号 34
AQXXXGFQAQAQ	配列番号 30	AQXXXHGSAAQ	配列番号 35
AQERXXXAQAQAQ	配列番号 31	AQWXXXSAAQ	配列番号 36
AQERVGXXXAAQ	配列番号 32	AQWTHXXXAAQ	配列番号 37
AQERVGFAXXXX	配列番号 33	AQWTHGSXXX	配列番号 38

FIG. 5A

【 図 5 A - 2 】

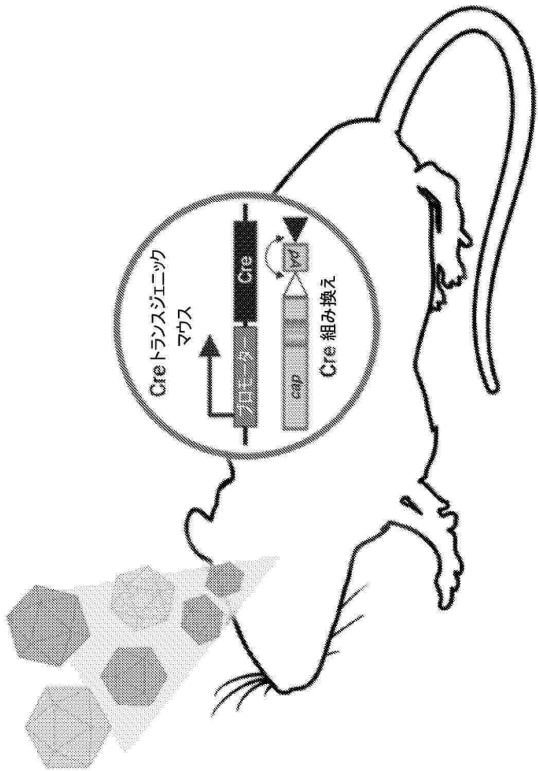


FIG. 5A (続き)

10

20

30

40

50

【 図 5 B - 1 】

ラウンド2 選択結果

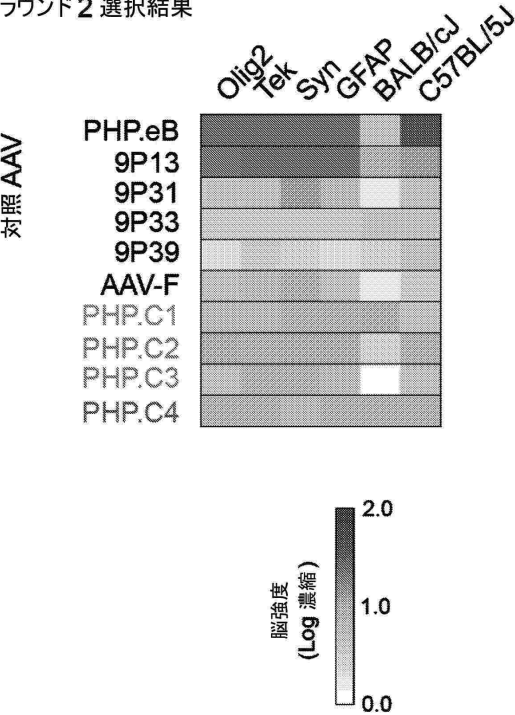


FIG. 5B

【 図 5 B - 2 】

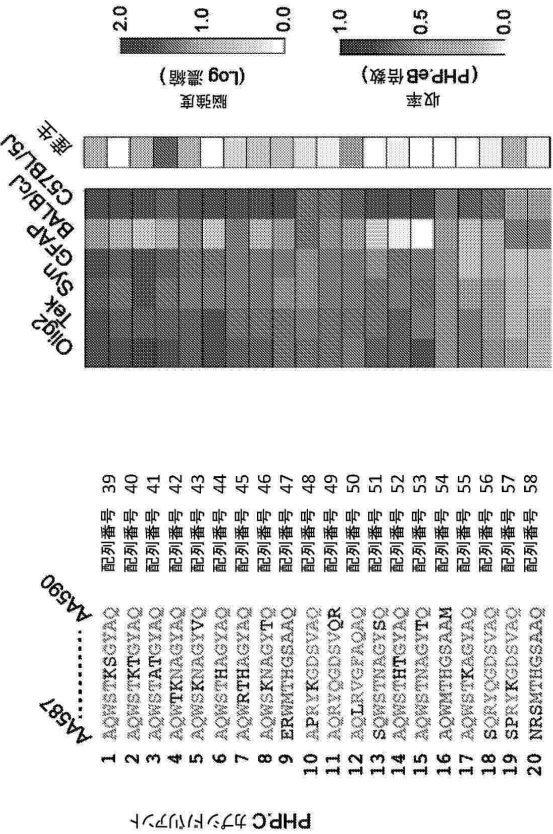


FIG. 5B (続き)

【 図 5 C 】

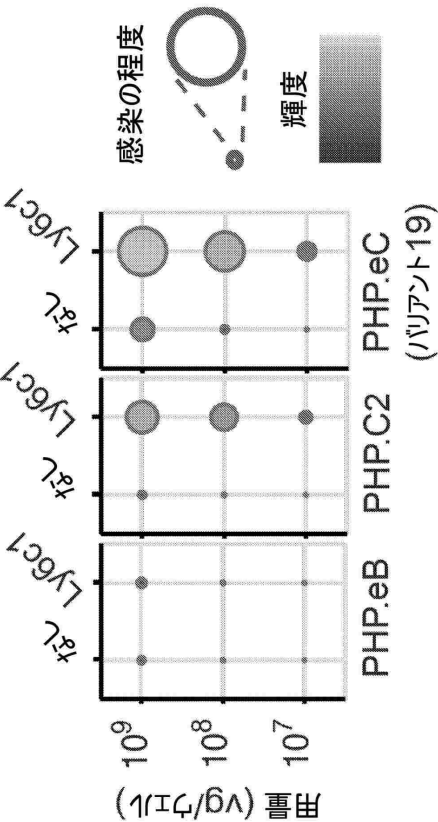


FIG. 5C

【 図 5 D - 1 】

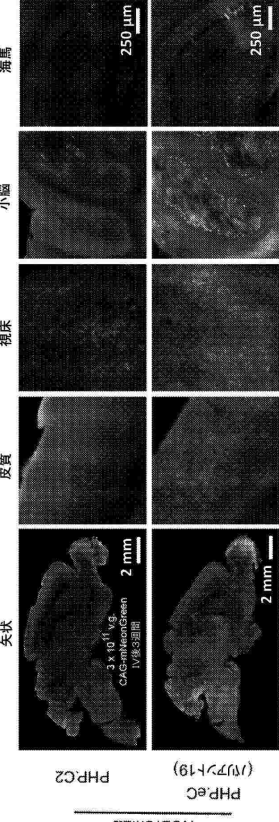


FIG. 5D

10

20

30

40

50

【 図 5 D - 2 】

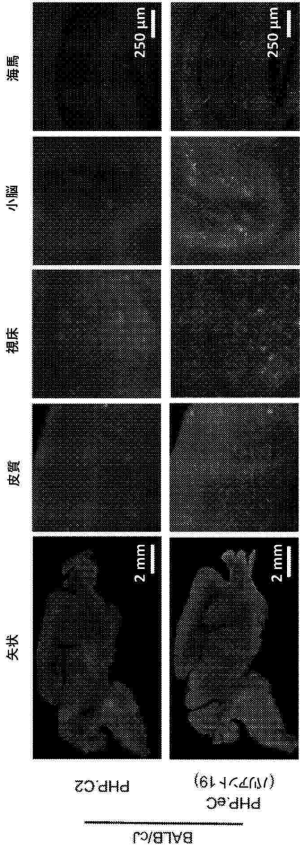


FIG. 5D (続き)

【 図 6 B 】

カプシド	受容体	ペプチド配列
AAV9		AQAQAQQTG
PHP.B	Ly6a	AQTLVPFKAQAQQTG
PHP.eB	Ly6a	DGTLAVPFKAQAQQTG
9P08	Ly6a	DGTLSQPFKAQAQQTG
PHP.C1	Ly6c1	AQRYQGDSVAQAQQTG
PHP.C2	Ly6c1	AQWSTNAGYAQAQQTG
9P31	Car4	AQWPTSYDAQAQQTG
9P36	Car4	DGSSSYDDAAQAQQTG

【 図 6 A 】

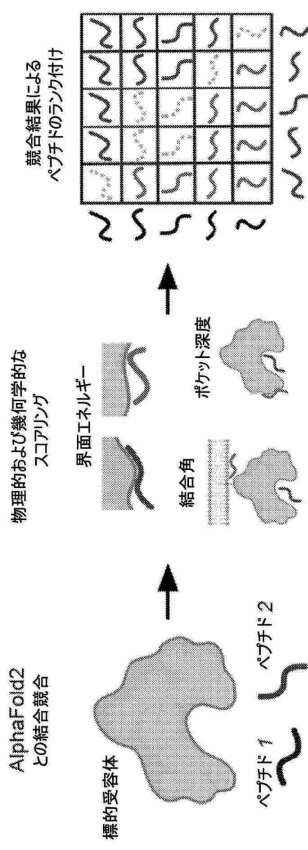


FIG. 6A

【 図 6 C 】

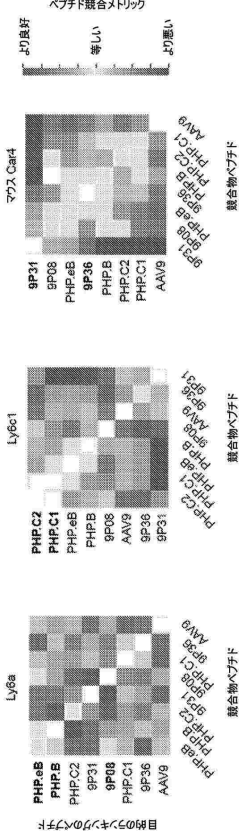


FIG. 6C

10

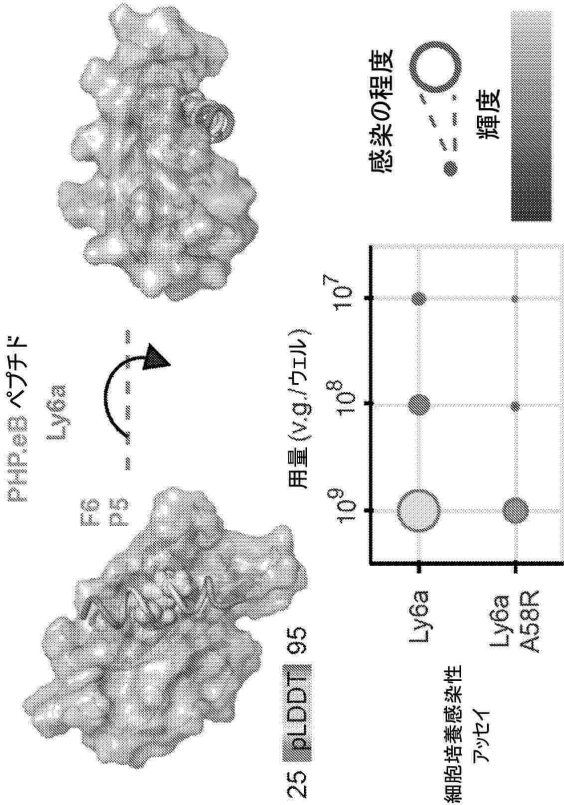
20

30

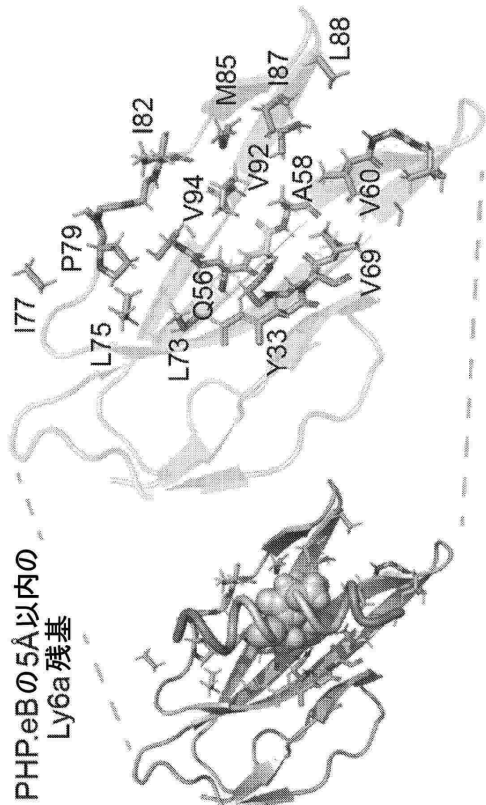
40

50

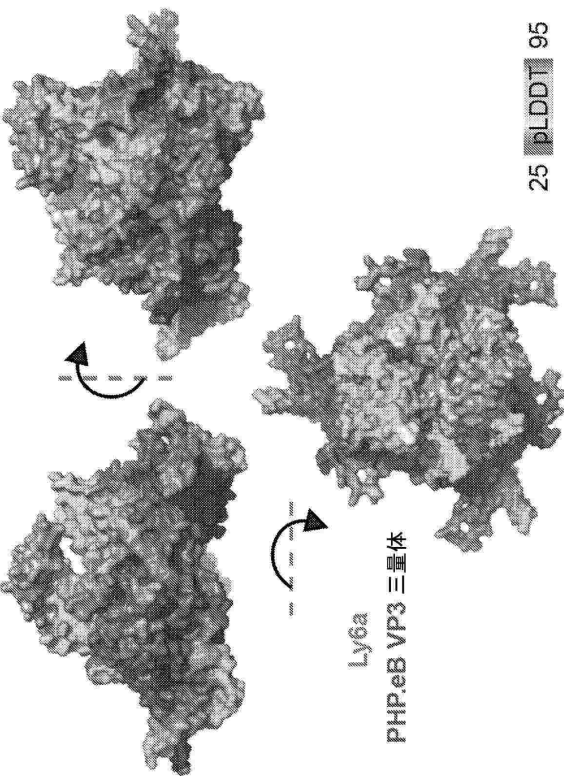
【 図 6 D 】



【 図 6 E 】



【 図 6 F 】



【 図 6 G 】

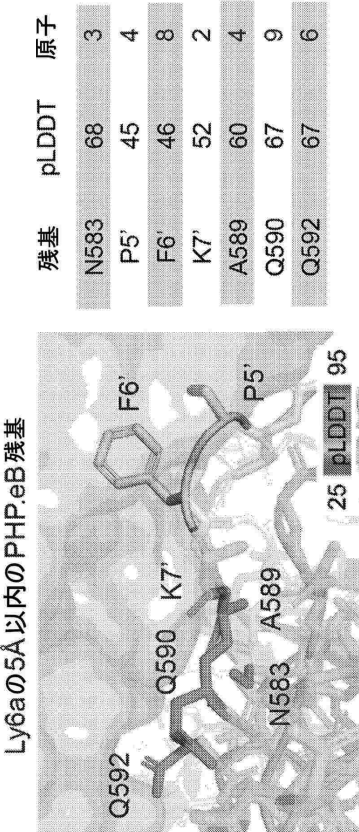


FIG. 6G

FIG. 6F

FIG. 6D

FIG. 6E

【 図 7 A 】

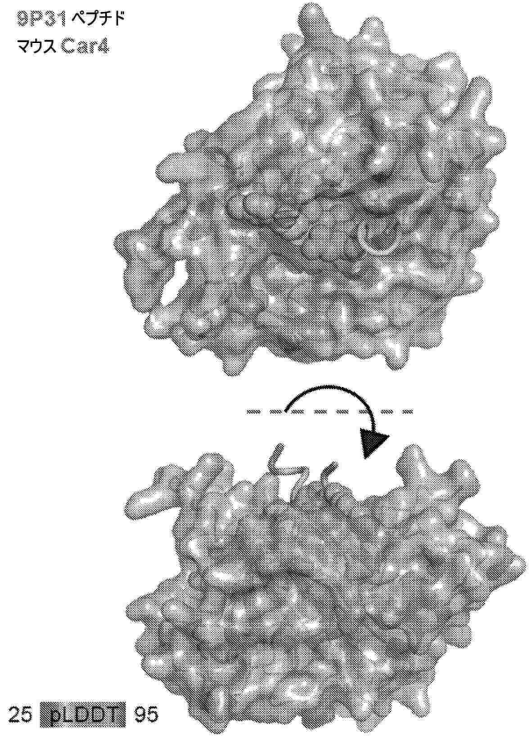


FIG. 7A

【 図 7 B 】

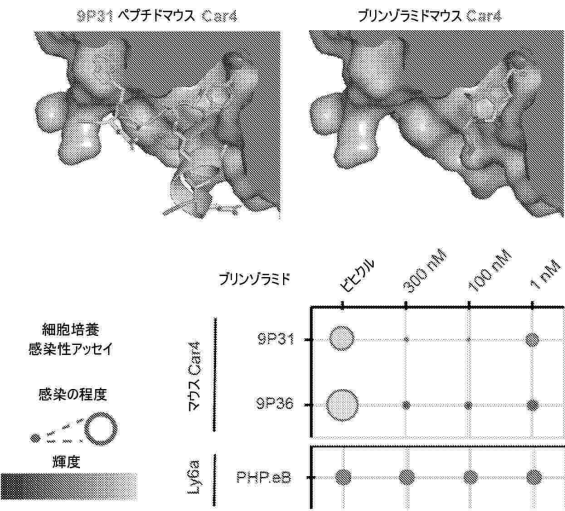


FIG. 7B

【 図 7 C 】

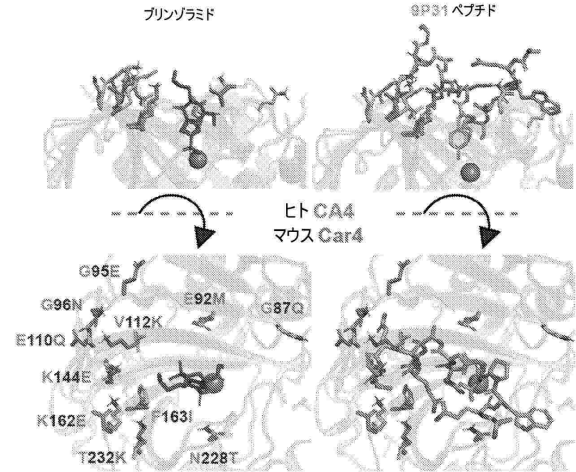


FIG. 7C

【 図 7 D 】

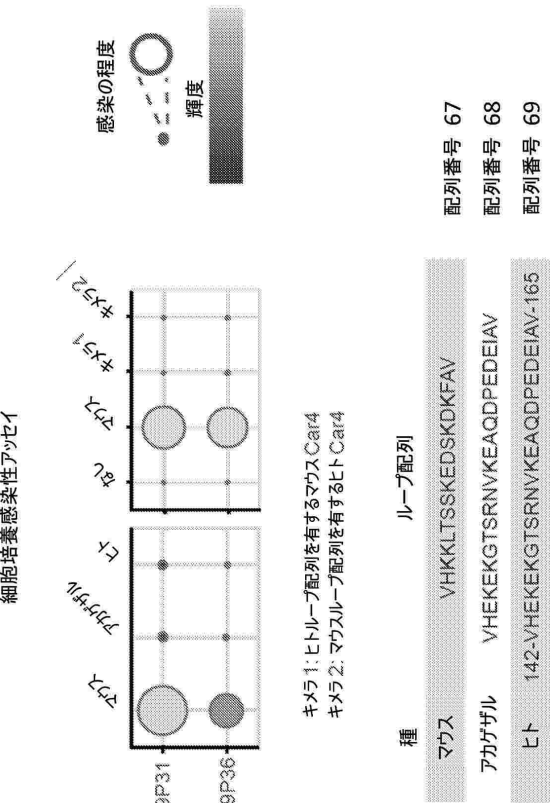


FIG. 7D

10

20

30

40

50

【 図 8 A - 1 】

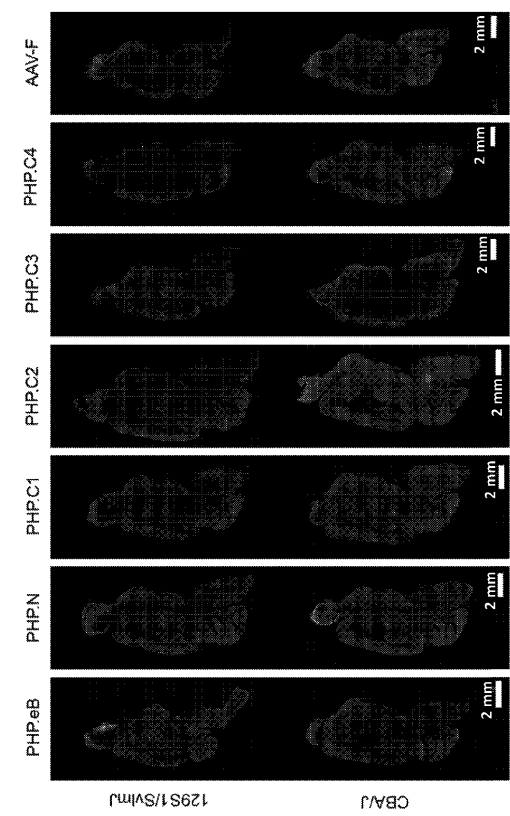


FIG. 8A

【 図 8 A - 2 】

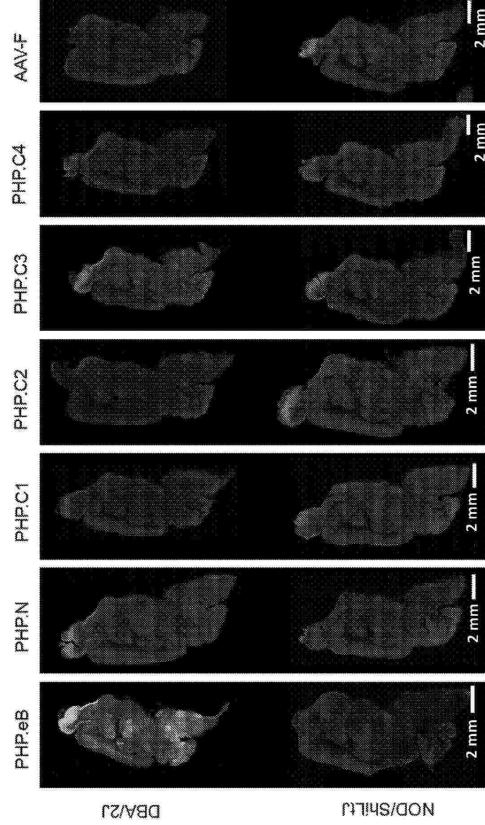


FIG. 8A (続き)

【 図 8 B 】

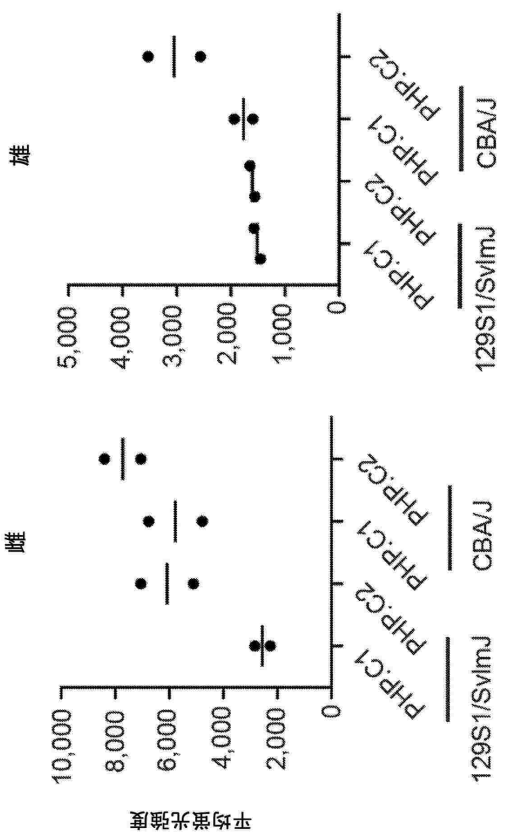


FIG. 8B

【 図 8 C 】

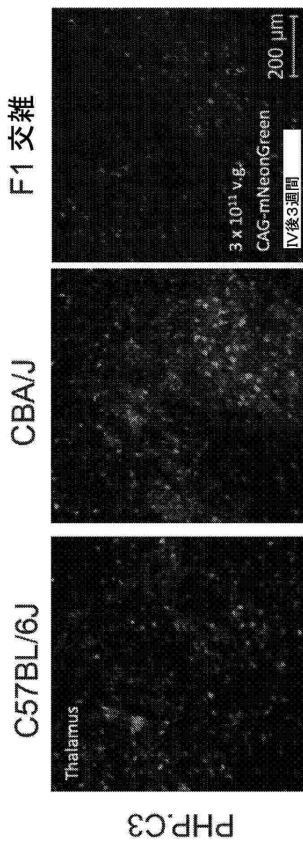


FIG. 8C

10

20

30

40

50

【 図 9 A - 1 】

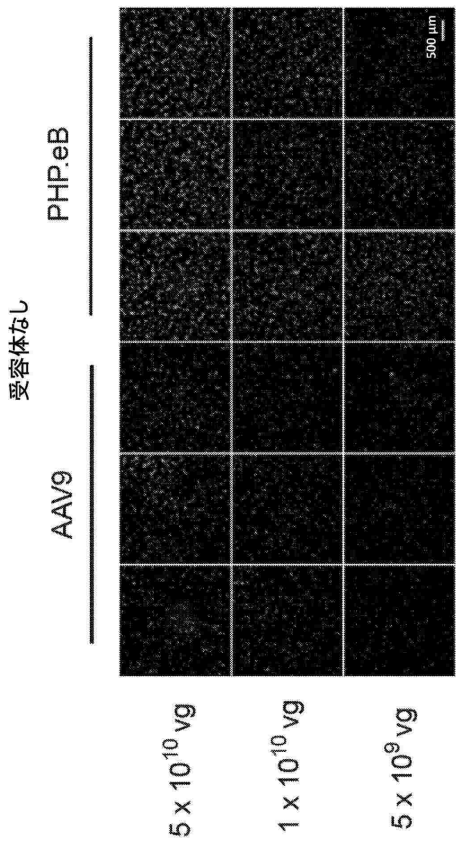


FIG. 9A

【 図 9 A - 2 】

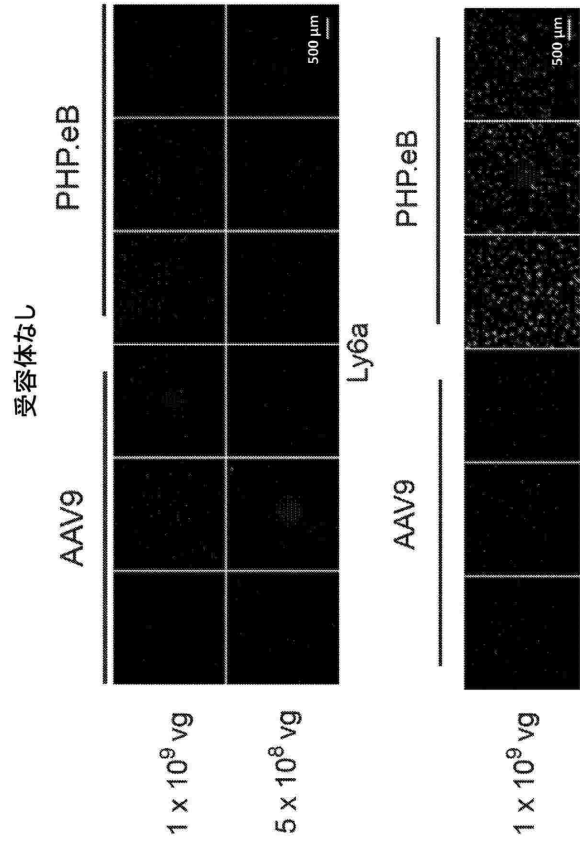


FIG. 9A (続き)

【 図 9 B - 1 】

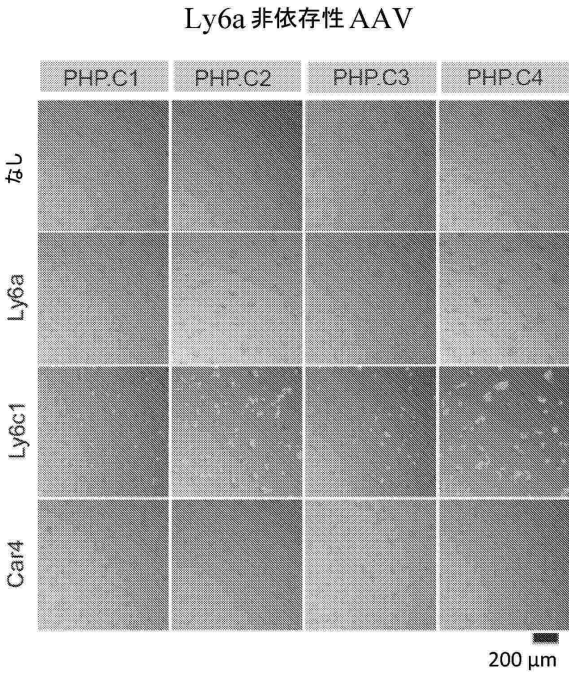


FIG. 9B

【 図 9 B - 2 】

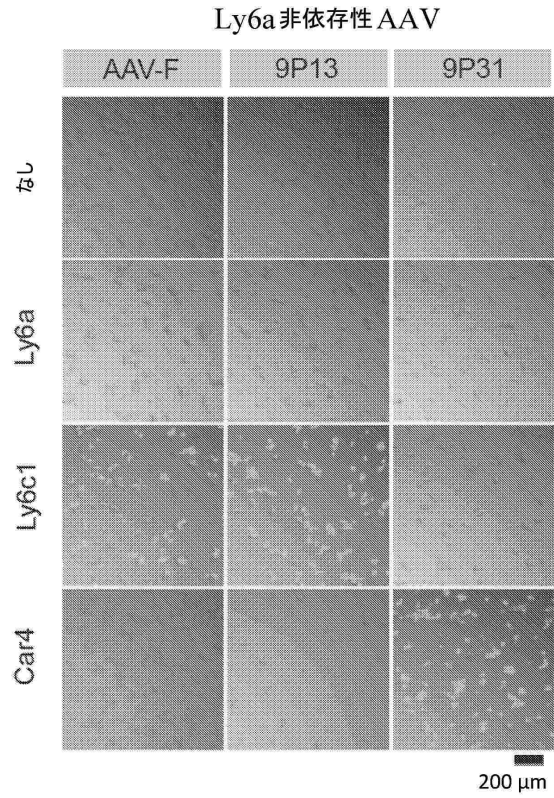


FIG. 9B (続き)

10

20

30

40

50

【 図 9 B - 3 】

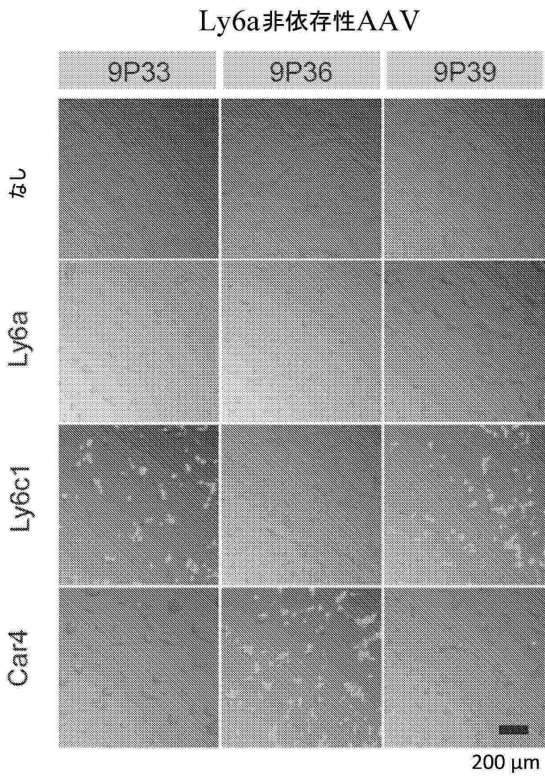


FIG. 9B (続き)

【 図 9 B - 4 】

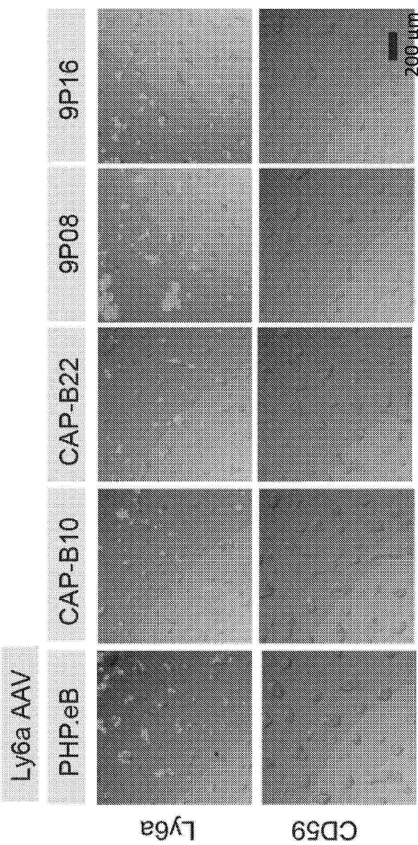


FIG. 9B (続き)

【 図 9 C 】

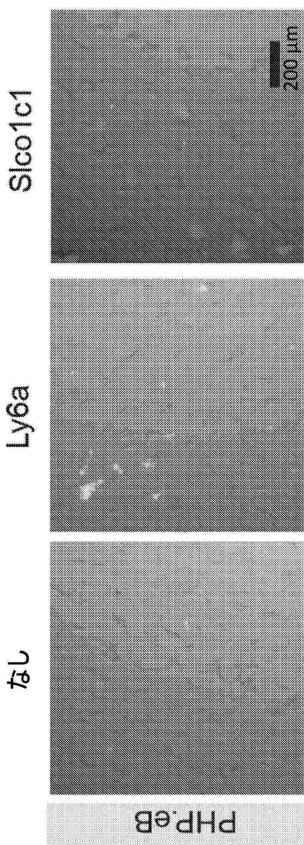


FIG. 9C

【 図 1 0 A 】

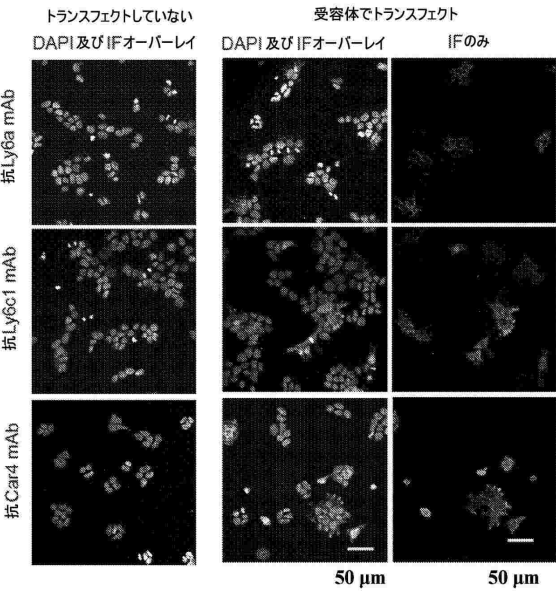


FIG. 10A

【図 1 0 B】

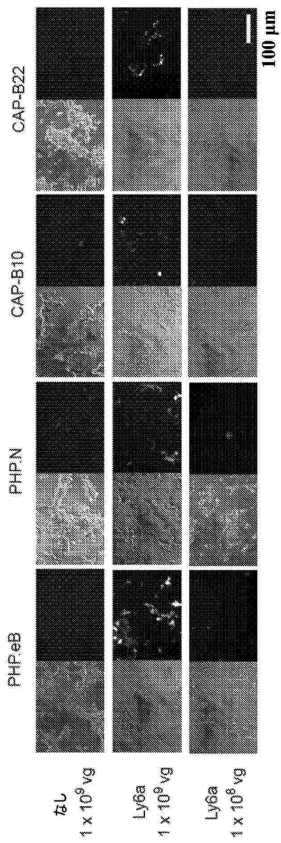


FIG. 10B

【図 1 0 C】

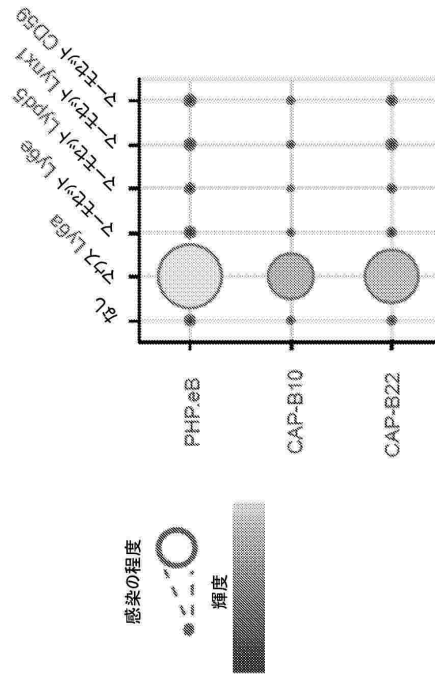


FIG. 10C

【図 1 1 A - 1】

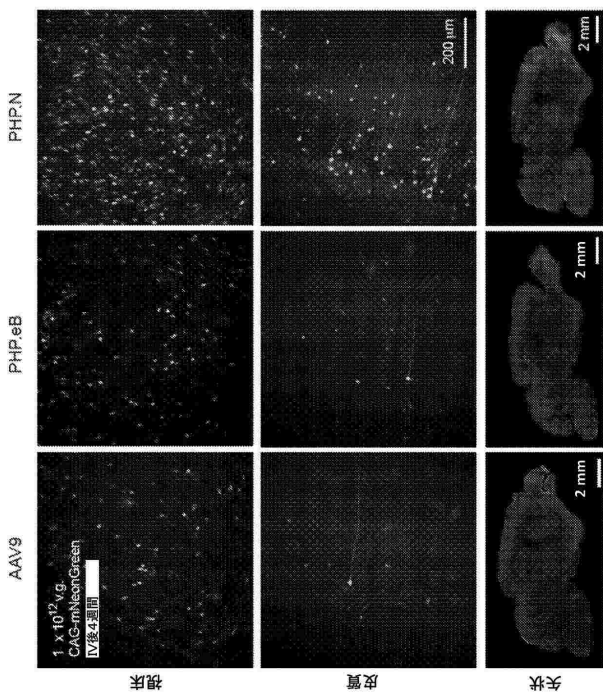


FIG. 11A

【図 1 1 A - 2】

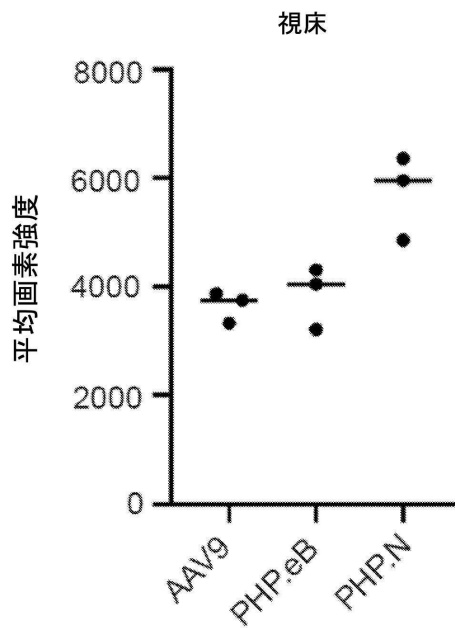


FIG. 11A (続き)

10

20

30

40

50

【図 1 1 B】

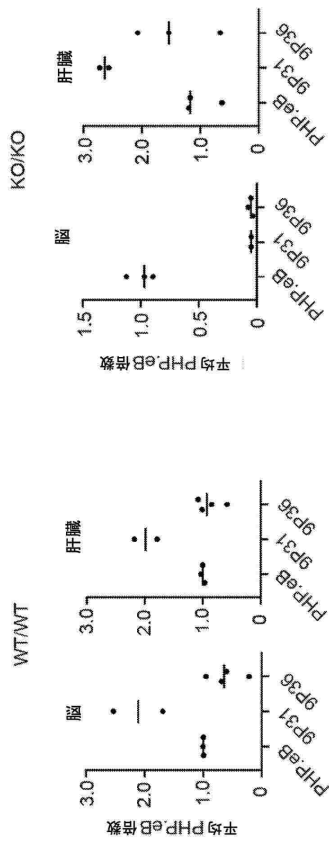


FIG. 11B

【図 1 2 - 1】

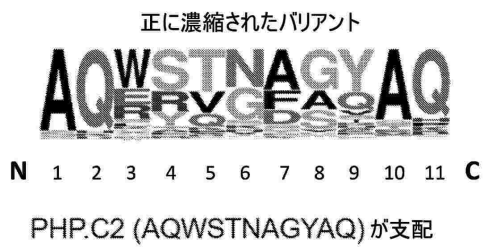
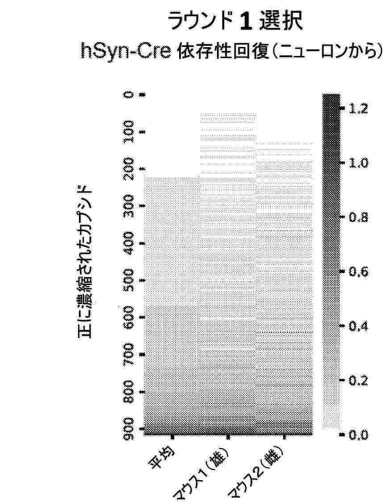
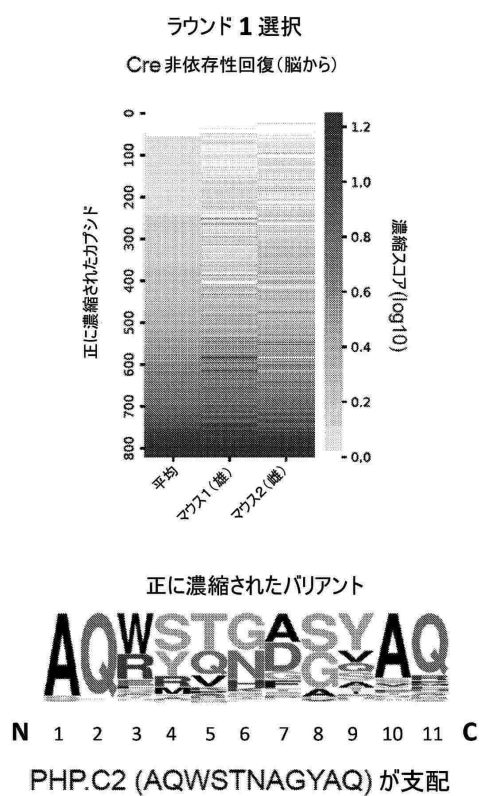


FIG. 12

【図 1 2 - 2】



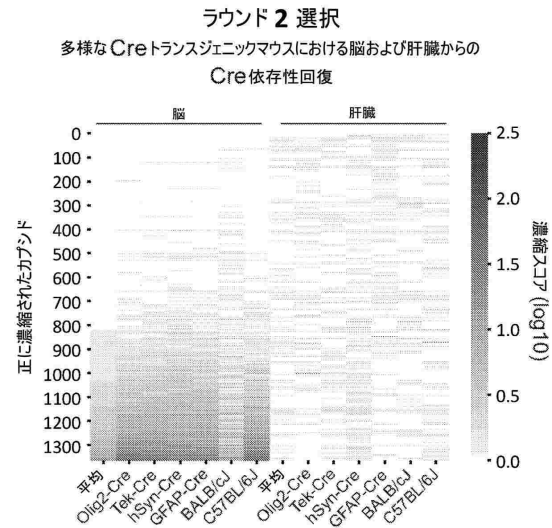
正に濃縮されたバリエーション



PHP.C2 (AQWSTNAGYAQ) が支配

FIG. 12 (続き)

【図 1 2 - 3】



上位 20 の濃縮バリエーション



PHP.C2 (AQWSTNAGYAQ) が支配

FIG. 12 (続き)

10

20

30

40

50

【 図 1 2 - 4 】

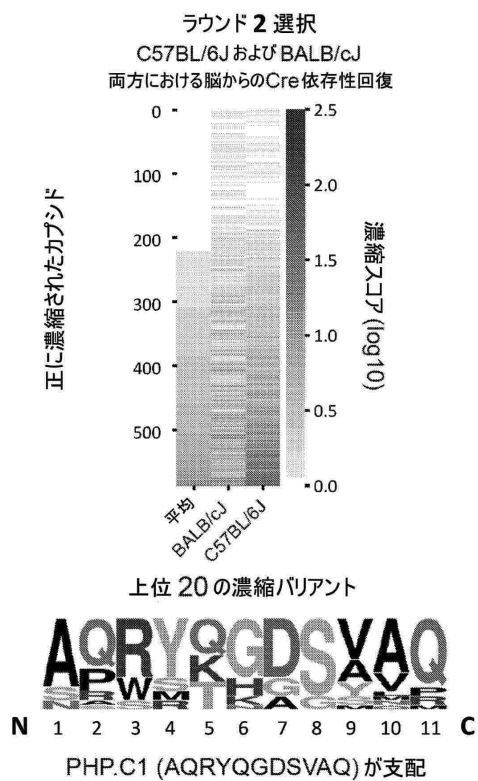


FIG. 12 (続き)

【 図 1 3 B 】

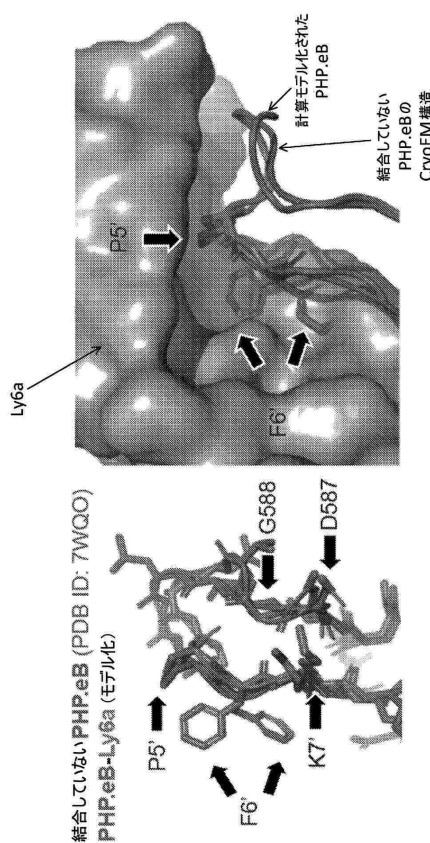


FIG. 13B

【 図 1 3 A 】

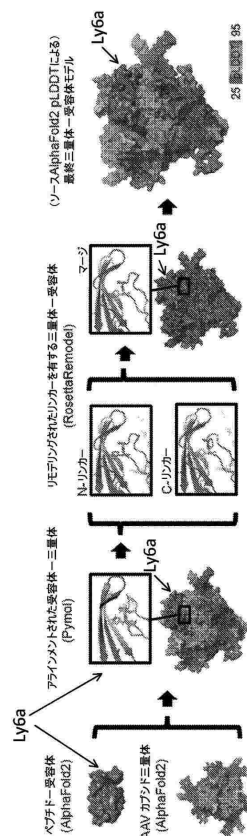


FIG. 13A

【 図 1 3 C 】

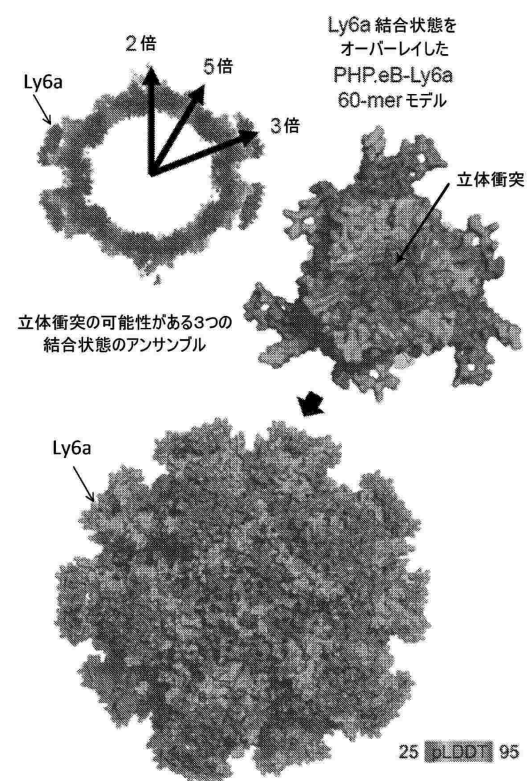


FIG. 13C

【 図 1 3 D 】

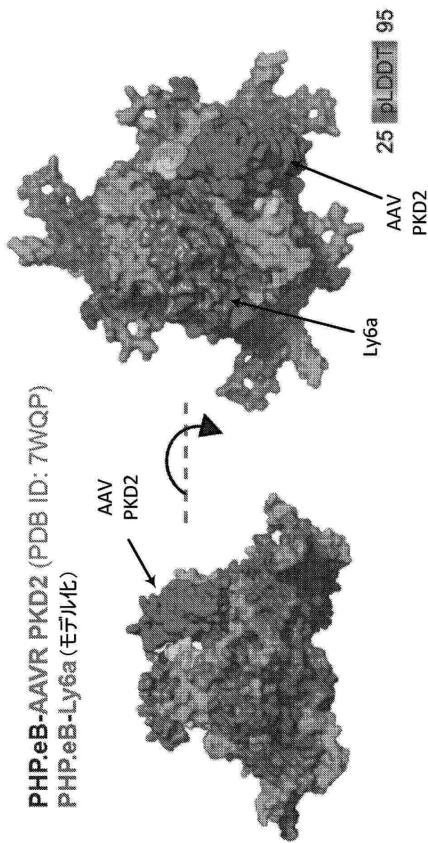


FIG. 13D

【 図 1 4 A - 1 】

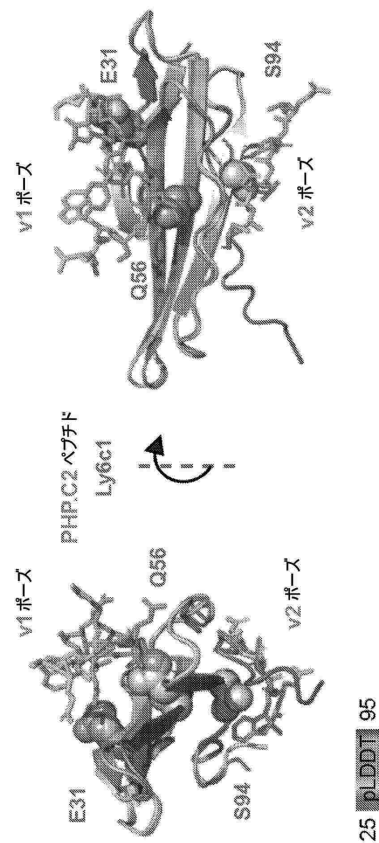


FIG. 14A

【 図 1 4 A - 2 】

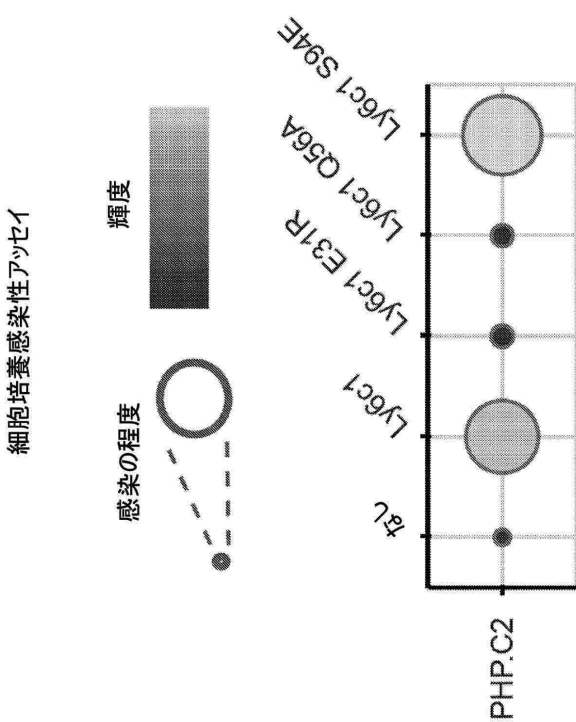


FIG. 14A (続き)

【 図 1 4 B - 1 】

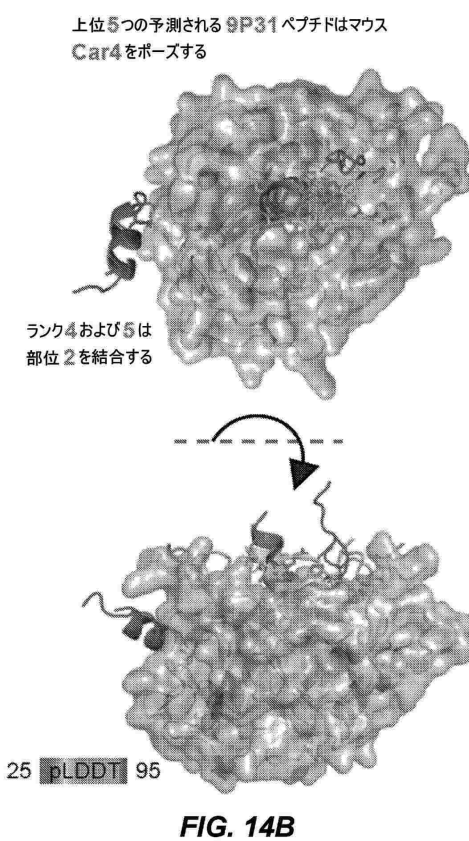


FIG. 14B

10

20

30

40

50

【 図 1 4 B - 2 】

上位 5 つの予測される 9P36 ペプチドはマウス
Car4 をボーズする

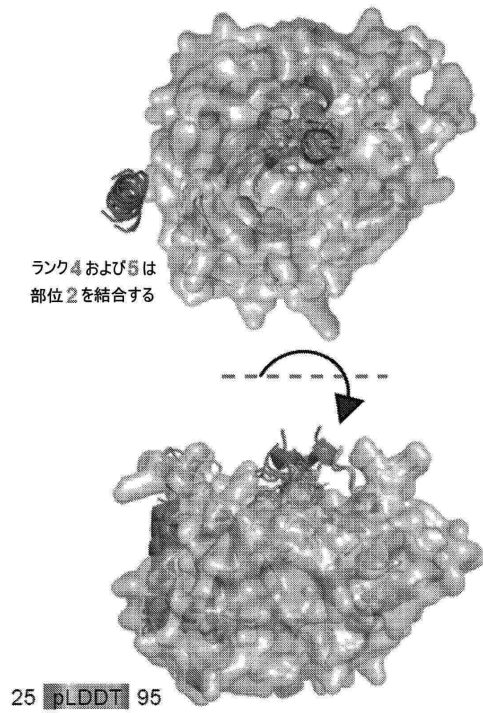


FIG. 14B (続き)

【 配 列 表 】

2025508968000001.xml

【 図 1 4 B - 3 】

細胞培養感染性アッセイ

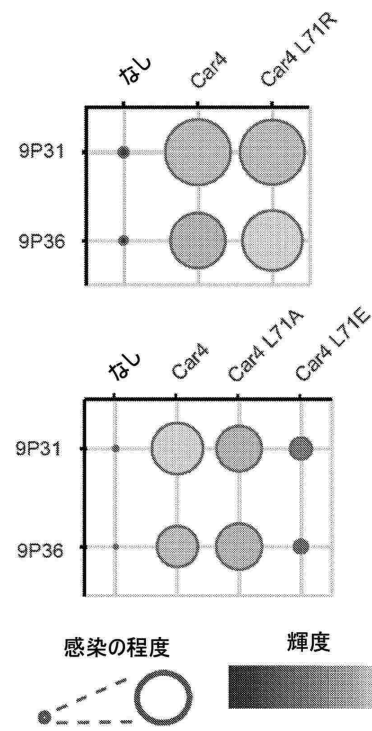


FIG. 14B (続き)

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2023/063571
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 7/08(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C12N 15/88(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i 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) C07K 7/08(2006.01); A61K 35/761(2015.01); C07K 14/005(2006.01); C07K 14/705(2006.01); C12N 15/86(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: blood brain barrier, permeability, carbonic anhydrase IV, Ly6c1, adeno-associated virus, capsid		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020-106852 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 28 May 2020 (2020-05-28) claims 1, 8-9, 15-16, 18; page 2, lines 21-25; page 12, lines 21-27; page 31, lines 8-14; page 32, lines 30-31; page 34, lines 20-30; page 47, lines 15-25; page 50, lines 16-20; figures 4A-4C	1-4,27-28,40, 42,44,46-48,56
Y		29,33-34
A		35,41,51-54,57-59
X	US 2003-0021792 A1 (ROBEN, P. W. et al.) 30 January 2003 (2003-01-30) claims 3, 116-117	40,42,44
Y	WO 2020-191300 A1 (STRIDE BIO, INC.) 24 September 2020 (2020-09-24) claims 1, 8; paragraphs [0102], [0236]	29,33-34
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 June 2023		Date of mailing of the international search report 28 June 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-5373

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/063571

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GHANDOUR, M. S. et al., "Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier" Proceedings of the National Academy of Sciences, August 1992, Vol. 89, pp. 6823-6827 the whole document	1-4,27-29,33-35,40-42, 44,46-48,51-54,56-59
A	RAVINDRA KUMAR, S., "Engineering vectors for non-invasive gene delivery to the central nervous system using Multiplexed-CREATE", PhD Thesis, 2020, California Institute of Technology, pp. 1-195 the whole document	1-4,27-29,33-35,40-42, 44,46-48,51-54,56-59
PX	SHAY, T. F. et al., "Primate-conserved Carbonic Anhydrase IV and murine-restricted Ly6c1 are new targets for crossing the blood-brain barrier", bioRxiv, 13 January 2023, preprint version, pp. 1-50 abstract; pages 5, 10-11, 40; figures 4-5	1-4,27-29,33-35,40, 42,44,46-48,56-59

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/063571

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/063571

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.: **6,12-26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6 and 12-26 pertain to a method for treatment of the human body by therapy or surgery, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search. 10
2. ☒ Claims Nos.: **7-11,14,37**
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:

Claim 7-11, 14 and 37 are regarded to be unclear because they refer to claim which does not comply with PCT Rule 6.4(a). 20
3. ☒ Claims Nos.: **5,12-13,15-26,30-32,36,38-39,43,45,49-50,55**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2023/063571

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020-106852	A1	28 May 2020	AU	2019-384032	A1	03 June 2021
				CA	3119771	A1	28 May 2020
				CN	113395975	A	14 September 2021
				EP	3897680	A1	27 October 2021
				JP	2022-513618	A	09 February 2022
				US	2021-0393713	A1	23 December 2021
US	2003-0021792	A1	30 January 2003	AU	2002-312410	A1	23 December 2002
				AU	2003-222185	A1	20 October 2003
				CA	2409333	A1	27 September 2001
				CA	2449517	A1	19 December 2002
				CA	2481334	A1	16 October 2003
				EP	1269195	A2	02 January 2003
				EP	1399215	A2	24 March 2004
				EP	1399215	A4	22 December 2004
				JP	2003-528115	A	24 September 2003
				JP	2005-501011	A	13 January 2005
				US	2004-0146516	A1	29 July 2004
				US	6903196	B1	07 June 2005
				WO	01-71359	A2	27 September 2001
				WO	01-71359	A3	18 July 2002
				WO	02-100336	A2	19 December 2002
				WO	02-100336	A3	01 May 2003
				WO	03-084469	A2	16 October 2003
				WO	2003-084469	A3	10 June 2004
				WO	2005-086775	A2	22 September 2005
				WO	2005-086775	A3	09 April 2009
WO	2020-191300	A1	24 September 2020	AU	2020-241888	A1	30 September 2021
				CA	3133453	A1	24 September 2020
				CN	113727992	A	30 November 2021
				EP	3941929	A1	26 January 2022
				IL	286464	A	01 December 2021
				JP	2022-525955	A	20 May 2022
				KR	10-2022-0011616	A	28 January 2022
				US	2022-0064675	A1	03 March 2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)
 C 1 2 N 15/113 (2010.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 7/01 (2006.01)
 C 0 7 K 16/40 (2006.01)
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 K 9/16 (2006.01)
 A 6 1 K 9/127 (2025.01)
 A 6 1 K 9/1273 (2025.01)
 A 6 1 K 9/06 (2006.01)
 A 6 1 K 9/12 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 35/761 (2015.01)
 A 6 1 K 9/51 (2006.01)
 A 6 1 K 9/107 (2006.01)
 A 6 1 K 47/04 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 38/10 (2006.01)
 A 6 1 K 9/08 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/04 (2006.01)
 A 6 1 P 25/02 (2006.01)
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/02 (2006.01)
 A 6 1 P 25/08 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 G 1 6 B 35/00 (2019.01)
 C 1 2 N 9/99 (2006.01)
 C 1 2 N 9/88 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 Z
 C 1 2 N 15/113 Z
 C 1 2 N 15/09 1 0 0
 C 1 2 N 7/01
 C 0 7 K 16/40
 C 0 7 K 16/46
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 15/62 Z
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 K 9/16
 A 6 1 K 9/127
 A 6 1 K 9/1273
 A 6 1 K 9/06
 A 6 1 K 9/12
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 35/761
 A 6 1 K 9/51
 A 6 1 K 9/107
 A 6 1 K 47/04
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 38/10
 A 6 1 K 9/08
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 25/04
 A 6 1 P 25/02
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 17/02
 A 6 1 P 25/08
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 47/68
 G 1 6 B 35/00
 C 1 2 N 9/99 Z N A
 C 1 2 N 9/88
 C 1 2 P 21/08

(32)優先日 令和5年1月17日(2023.1.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,R
 U,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,ME,
 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,N
 E,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,
 CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
 M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
 H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

-
- (72)発明者 シェイ, ティモシー エフ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 1 2 5, パサデナ, イー. カリフォルニア ブールバード
1 2 0 0, エム/シー 6 - 3 2
- (72)発明者 グラディナル, ヴィヴィアナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 1 2 5, パサデナ, イー. カリフォルニア ブールバード
1 2 0 0, エム/シー 6 - 3 2
- (72)発明者 デイン, シャオジェ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 1 2 5, パサデナ, イー. カリフォルニア ブールバード
1 2 0 0, エム/シー 6 - 3 2
- F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC03 CC06 CC12 CC15 CC24 CD13 CD21
CE02 CE03 CE08 DA01
4B065 AA93X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 BB12 BB25 BB37 BC03
BC07 BC11 BD01 BD15 BD16 CA23 CA24 CA25 CA44
4C076 AA09 AA12 AA19 AA24 AA29 AA65 BB13 BB21 CC01 CC11
CC19 CC41 DD29 EE41 EE59 FF63 FF68
4C084 AA02 AA13 BA01 BA18 MA02 MA65 MA66 NA05 NA14 ZA01
ZA02 ZA06 ZA08 ZA15 ZA16 ZA20 ZA36 ZA89 ZA94 ZB11
4C085 AA13 AA14 BB41 CC22 DD61 EE01 EE03 GG01 GG02
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA65 MA66 NA05 NA14 ZA01
ZA02 ZA06 ZA08 ZA15 ZA16 ZA20 ZA36 ZA89 ZA94 ZB11
4C087 AA01 AA02 BC83 MA65 MA66 NA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA06
ZA08 ZA15 ZA16 ZA20 ZA36 ZA89 ZA94 ZB11
4H045 AA10 AA11 AA30 BA16 BA17 BA41 CA01 DA76 EA20 FA74