

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年5月15日(15.05.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/100417 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 16/08 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/864 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/039335

(22) 国際出願日: 2024年11月5日(05.11.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-189677 2023年11月6日(06.11.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社ダイセル (DAICEL CORPORATION) [JP/JP]; 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町3番1号 (JP). 国立大学法人京都工芸繊維大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION

KYOTO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒6068585 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地 (JP).

(72) 発明者: 大倉 裕道 (OKURA, Hiromichi); 〒1088230 東京都港区港南2丁目18番1号 株式会社ダイセル内 (JP). 平林 由紀 (HIRABAYASHI, Yuki); 〒1088230 東京都港区港南2丁目18番1号 株式会社ダイセル内 (JP). 熊田 陽一 (KUMADA, Yoichi); 〒6068585 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地 国立大学法人京都工芸繊維大学内 (JP).

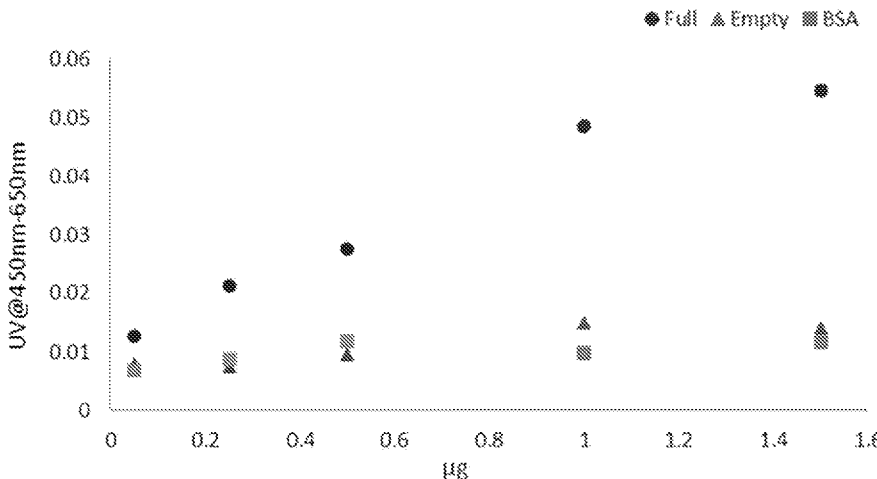
(74) 代理人: 田中 順也, 外 (TANAKA, Junya et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島6-2-40 中之島インテス21階 (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,

(54) Title: AFFINITY POLYPEPTIDE FOR FULL CAPSIDS OF AAV

(54) 発明の名称: AAVのフルカプシドに対するアフィニティポリペプチド

[図1]



(57) Abstract: The purpose of the present disclosure is to provide an affinity molecule that exhibits a higher affinity to AAV full capsids than capsids empty of AAV. An anti-AAV full capsid molecule of the present invention includes, as a heavy chain complementarity-determining region, a heavy chain variable region including CDR1 represented by SEQ ID NO: 6, CDR2 represented by SEQ ID NO: 7, and CDR3 represented by SEQ ID NO: 8, and includes, as a light chain complementarity-determining region, a light chain variable region including CDR1 represented by SEQ ID NO: 9, CDR2 formed of RAS, and CDR3 represented by SEQ ID NO: 10. The anti-AAV full capsid molecule exhibits a higher affinity to AAV full capsids than capsids empty of AAV.

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, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 本開示は、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対する結合性が高いアフィニティ分子を提供することを目的とする。重鎖相補性決定領域として、配列番号6で表されるCDR1、配列番号7で表されるCDR2、配列番号8で表されるCDR3とを含む重鎖可変領域と、軽鎖相補性決定領域として、配列番号9で表されるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号10で表されるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗AAVフルカプシド分子は、AAVの空カプシドよりもAAVVフルカプシドに対する結合性が高い。

明 細 書

発明の名称：

A A Vのフルカプシドに対するアフィニティポリペプチド

技術分野

[0001] 本開示は、アデノ随伴ウイルス（A A V）のフルカプシドに対するアフィニティポリペプチドに関する。

背景技術

[0002] 遺伝子治療薬として応用されるアデノ随伴ウイルス（A A V）の製造過程において、ウイルスに外来DNAが内包されて医薬品有効成分となるフルカプシドと、内包物が無い空カプシドとの混合物が得られる。当該製造過程では、この混合物から、フルカプシドを定量する手法が求められる。

[0003] フルカプシドを定量する具体的な手法として、定量PCR法（特許文献1）、干渉散乱質量分析法（特許文献2）等が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：CN101426935B

特許文献2：WO2021/191079

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 定量PCR法又は干渉散乱質量分析法を利用するフルカプシドの定量方法は、高額な専用の機器が必要で、簡便性及び汎用性に欠ける。

[0006] フルカプシドの定量を簡便に且つ汎用的な手法で行うには、アフィニティ分子を用いることが望まれる。このようなフルカプシドの定量に適したアフィニティ分子は、A A Vの空カプシドよりもA A Vフルカプシドに対する結合性が高いこと（つまり、A A Vフルカプシドに対する選択的結合性）が必要である。

[0007] そこで、本開示は、A A Vの空カプシドよりもA A Vフルカプシドに対す

る結合性が高いアフィニティ分子を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、鋭意検討の結果、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対する結合性が高い抗AAVフルカプシド分子を見出した。本開示はこの知見に基づいてさらに検討を重ねることにより完成したものである。

[0009] 即ち、本開示は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対して高い結合性を有する抗体である、抗AAVフルカプシド分子。

項2. 重鎖相補性決定領域として、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号3で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域と、

軽鎖相補性決定領域として、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号5で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗AAVフルカプシド分子。

項3. 重鎖相補性決定領域として、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号8で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域と、

軽鎖相補性決定領域として、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号10で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗AAVフルカプシド分子。

項4. 重鎖相補性決定領域として、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号13で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域と、

軽鎖相補性決定領域として、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列からなる CDR 1、QAS からなる CDR 2、配列番号 15 で表されるアミノ酸配列と 90% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる CDR 3 とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗 AAV フルカプシド分子。

項 5. 重鎖相補性決定領域として、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列からなる CDR 1、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなる CDR 2、配列番号 18 で表されるアミノ酸配列と 90% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる CDR 3 とを含む重鎖可変領域と、

軽鎖相補性決定領域として、配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなる CDR 1、RAS からなる CDR 2、配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなる CDR 3 とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗 AAV フルカプシド分子。

項 6. 前記重鎖可変領域が、

配列番号 21 の第 1～24 番目、配列番号 23 の第 1～24 番目、配列番号 25 の第 1～24 番目、又は配列番号 27 の第 1～24 番目のアミノ酸配列と 70% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる FR 1、

配列番号 21 の第 33～49 番目、配列番号 23 の第 34～50 番目、配列番号 25 の第 34～50 番目、又は配列番号 27 の第 34～50 番目のアミノ酸配列と 70% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる FR 2、

配列番号 21 の第 59～95 番目、配列番号 23 の第 60～96 番目、配列番号 25 の第 59～95 番目、又は配列番号 27 の第 60～96 番目のアミノ酸配列と 70% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる FR 3、及び

配列番号 21 の第 109～119 番目、配列番号 23 の第 109～119 番目、配列番号 25 の第 107～117 番目、又は配列番号 27 の第 113～123 番目のアミノ酸配列と 70% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる FR 4 を含み、

前記軽鎖可変領域が、

配列番号 22 の第 1 ～ 26 番目、配列番号 24 の第 1 ～ 26 番目、配列番号 26 の第 1 ～ 26 番目、又は配列番号 28 の第 1 ～ 26 番目のアミノ酸配列と 70% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる FR 1、

配列番号 22 の第 33 ～ 49 番目、配列番号 24 の第 33 ～ 49 番目、配列番号 26 の第 33 ～ 49 番目、又は配列番号 28 の第 33 ～ 49 番目のアミノ酸配列と 70% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる FR 2、

配列番号 22 の第 53 ～ 88 番目、配列番号 24 の第 53 ～ 88 番目、配列番号 26 の第 53 ～ 88 番目、又は配列番号 28 の第 53 ～ 88 番目のアミノ酸配列と 70% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる FR 3、及び

配列番号 22 の第 101 ～ 110 番目、配列番号 24 の第 101 ～ 110 番目、配列番号 26 の第 101 ～ 109 番目、又は配列番号 28 の第 98 ～ 107 番目のアミノ酸配列と 70% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる FR 4 を含む、項 2 ～ 5 のいずれかに記載の抗 AAV フルカプシド分子。

項 7. 前記重鎖可変領域が配列番号 21 で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号 22 で表されるアミノ酸配列を含む、項 2 に記載の抗 AAV フルカプシド分子。

項 8. 前記重鎖可変領域が配列番号 23 で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号 24 で表されるアミノ酸配列を含む、項 3 に記載の抗 AAV フルカプシド分子。

項 9. 前記重鎖可変領域が配列番号 25 で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含む、項 4 に記載の抗 AAV フルカプシド分子。

項 10. 前記重鎖可変領域が配列番号 27 で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号 28 で表されるアミノ酸配列を含む、項 5 に

記載の抗AAVフルカプシド分子。

項11. IgG抗体、Fab抗体、Fab'抗体、F(ab')₂抗体、Fv抗体、scFv抗体、dsFv抗体、scFv-Fc抗体、dsFv-Fc抗体、Bis-scFv抗体、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、又はテトラボディである、項1～10のいずれかに記載の抗AAVフルカプシド分子。

項12. 項1～11のいずれかに記載の抗AAVフルカプシド分子と、前記抗AAVフルカプシド分子が固定化された固相材料とを含む、AAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相。

項13. AAVの空カプシド及びAAVフルカプシドを含む試料を、項12に記載のAAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相に接触させ、前記AAVフルカプシドを捕捉する工程1を含む、AAVフルカプシドの捕捉方法。

項14. 捕捉されたAAVフルカプシドを酵素結合免疫吸着測定により定量する工程2をさらに含む、項13に記載の方法。

項15. 項1～11のいずれかに記載の抗AAVフルカプシド分子をコードしている核酸。

項16. 項15に記載の核酸を含む発現カセット又は組換えベクター。

項17. 項16に記載の発現カセット又は組換えベクターを用いて宿主を形質転換して得られる形質転換体。

項18. 項17に記載の形質転換体を培養する工程を含む、抗AAVフルカプシド分子の製造方法。

発明の効果

[0010] 本開示によれば、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対する結合性が高い抗AAVフルカプシド分子が提供される。このため、本開示によれば、当該抗AAVフルカプシド分子を用いたフルカプシドの定量が可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本開示の抗AAVフルカプシド分子（抗AAV-scfv）を用いた、AAV9フルカプシドの量とELISAシグナル（吸光度）との関係性を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 1. 抗AAVフルカプシド分子

本開示の抗AAVフルカプシド分子は、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対して高い結合性を有する抗体である。すなわち、本開示の抗AAVフルカプシド分子は、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対する結合性が高いポリペプチドであり、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対して高い結合性を示す重鎖相補性決定領域を含む重鎖可変領域と軽鎖相補性決定領域を含む軽鎖可変領域とを有する。好ましくは、本開示の抗AAVフルカプシド分子は、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対する結合性が高いポリペプチドであり、所定の重鎖相補性決定領域を含む重鎖可変領域と所定の軽鎖相補性決定領域を含む軽鎖可変領域とを有する。

[0013] 1-1. ターゲット

本開示の抗AAVフルカプシド分子のターゲットとなるAAVのセロタイプとしては特に限定されない。具体的なセロタイプとしては、AAV1、AAV2、AAV3a、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh.10、AAV11、AAV12及びAAV13が挙げられ、好ましくはAAV9が挙げられる。

[0014] AAV空カプシドは、内部に核酸を含まないAAVの空の外殻である。AAV空カプシドの典型例は、治療対象の細胞に送達すべき目的遺伝子（外来遺伝子）をパッケージングするために用いられるベシクルである。

[0015] AAVフルカプシドは、内部に核酸を含むAAVカプシドである。当該核酸の例として、当該AAVのウイルスゲノム、核酸医薬（アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi、アプタマー、デコイ等）、及び遺伝子治療用の遺伝子が導入されたベクター等が挙げられる。

[0016] 1－2．結合性

本開示の抗AAVフルカプシド分子は、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対して高い結合性を有する。

[0017] AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対して高い結合性を有することは、本開示の抗AAVフルカプシド分子を同条件でAAVの空カプシド又はAAVフルカプシドと接触させた場合に、AAVの空カプシドの結合量よりもAAVフルカプシドの結合量の方が多いことにより確認できる。例えば、本開示の抗AAVフルカプシド分子をアフィニティタグが付された形態で調製し、同条件でAAVの空カプシド又はAAVフルカプシドと接触させた後、カプシドに結合した抗AAVフルカプシド分子を、当該アフィニティタグに特異的且つシグナル基（例えば蛍光基等）を有する抗体（抗アフィニティタグ抗体）で捕捉し、抗AAVフルカプシド分子を捕捉した抗アフィニティタグ抗体のシグナル基に基づくシグナル強度（例えば蛍光基に基づく吸光度等）を測定することで確認できる。

[0018] AAVフルカプシドに対する結合性の具体的な程度としては、抗AAVフルカプシド分子とAAVカプシドとをpH7（25℃）、25℃で1時間接触させた場合、上記の吸光度に基づくAAVフルカプシドに対する結合性が、AAVの空カプシドに対する結合性の、1.5倍以上、具体的には1.5～5倍、好ましくは2～5倍、より好ましくは2.5～5倍、さらに好ましくは3～5倍、3.5～5倍、一層好ましくは4～5倍が挙げられる。

[0019] 1－3．相補性決定領域

本開示の抗AAVフルカプシド分子は、典型的に、3つの重鎖相補性決定領域（N末端側から、CDR1、CDR2及びCDR3）と、3つの軽鎖相補性決定領域（N末端側から、CDR1、CDR2及びCDR3）とを含む。

[0020] 好ましい実施形態において、本開示の抗AAVフルカプシド分子は、表1の[1]に示す第1の抗AAVフルカプシド分子、[2]に示す第2の抗AAVフルカプシド分子、[3]に示す第3の抗AAVフルカプシド分子、[

4] に示す第4の抗AAVフルカプシド分子を含む。

[0021] [表1]

		CDR1	CDR2	CDR3
[1]	重鎖	GFSFSSYG (配列番号1)	IYGGSSGST (配列番号2)	ARDRVGGNGYADL (配列番号3)
	軽鎖	QSISSY (配列番号4)	RAS	QSHYDIRNYGVA (配列番号5)
[2]	重鎖	GFSFSSNYW (配列番号6)	IYGGSSGST (配列番号7)	ATVDNGYSCLKL (配列番号8)
	軽鎖	QSIRNW (配列番号9)	RAS	QSSFYADSGEPA (配列番号10)
[3]	重鎖	GIDFSSGYD (配列番号11)	IYTGDSA (配列番号12)	ANDLDSGTVSI (配列番号13)
	軽鎖	QSISSW (配列番号14)	QAS	AGWTSSTTDGTA (配列番号15)
[4]	重鎖	GFSFSSSAY (配列番号16)	MHTISSVDT (配列番号17)	ARDDRNGYGYPSFDI (配列番号18)
	軽鎖	QTISSY (配列番号19)	RAS	LTYYGNSHN (配列番号20)

[0022] 第1の抗AAVフルカプシド分子は、重鎖相補性決定領域として、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号3で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域と、軽鎖相補性決定領域として、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号5で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む。

[0023] 第2の抗AAVフルカプシド分子は、重鎖相補性決定領域として、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号8で表されるアミノ酸配列と90%以

上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域と、軽鎖相補性決定領域として、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号10で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む。本開示の抗AAVフルカプシド分子の中でも、第2の抗AAVフルカプシド分子は、AAVフルカプシドに対する結合特異性が顕著である点で好ましい。

[0024] 第3の抗AAVフルカプシド分子は、重鎖相補性決定領域として、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号13で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域と、軽鎖相補性決定領域として、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、QASからなるCDR2、配列番号15で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む。

[0025] 第4の抗AAVフルカプシド分子は、重鎖相補性決定領域として、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号18で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域と、軽鎖相補性決定領域として、配列番号19で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号20で表されるアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む。

[0026] なお、本発明において、「配列同一性」とは、BLAST PACKAGE [sgis2 bit edition, Version 2.0.12; available from National Center for Biotechnology Information (NCBI)] のbl2seq program (Tatiana A. Tatsusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. L

ett., Vol. 174, p247-250, 1999) により得られるアミノ酸配列の同一性の値を示す。パラメーターは、Gap insertion Cost value: 11、Gap extension Cost value: 1 に設定すればよい。

[0027] 上記の配列同一性が100%未満のアミノ酸配列において、ミスマッチのアミノ酸残基が、基準となるアミノ酸配列から別のアミノ酸に置換されている場合、当該置換としては、類似アミノ酸による置換（即ち保存的アミノ酸置換）が好適である。具体的には、アミノ酸側鎖の性質に基づいて、次のような分類が確立しており、同じ分類に属するアミノ酸に置換されることが好ましい。

塩基性アミノ酸：リジン、アルギニン、ヒスチジン

酸性アミノ酸：グルタミン酸、アスパラギン酸

中性アミノ酸：グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、グルタミン、アスパラギン、プロリン

更に、前記中性アミノ酸は、極性側鎖を有するもの（アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するもの（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、アミド含有側鎖を有するもの（アスパラギン、グルタミン）、硫黄含有側鎖を有するもの（メチオニン、システイン）、芳香族側鎖を有するもの（フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン）、水酸基含有側鎖を有するもの（セリン、トレオニン、チロシン）、脂肪族側鎖を有するもの（アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン）等に分類することもできる。

[0028] アミノ酸配列中の所定のアミノ酸を他のアミノ酸に置換する方法については、例えば、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh T. et al., Gene, Vol. 152, p. 271-275 (1995); Zoller MJ. et al., Methods En

zymol. Vol. 100, p. 468-500 (1983)、Kramer W. et al., Nucleic Acids Res. Vol. 12, p. 9441-9456 (1984); Kramer W. et al., Methods. Enzymol. Vol. 154, p. 350-367 (1987); Kunkel T.A., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 82, p. 488-492 (1985)等)が知られており、当該部位特異的変異誘発法を用いてCDRのアミノ酸配列にアミノ酸置換を行うことができる。また、他のアミノ酸に置換する方法としては、WO2005/080432に記載されているライブラリ技術も挙げられる。

[0029] 1-4. フレームワーク領域

第1～4の抗AAVフルカプシド分子の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のフレームワーク領域は、抗AAVフルカプシド分子が、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対する結合性が高いことを限度として特に限定されず、任意の動物（ヒト及び非ヒト、好ましくはウサギ）の抗体のフレームワーク領域（FR）を用いることができる。

[0030] 例えば、第1～4の抗AAVフルカプシド分子は、好ましくは；

重鎖可変領域が、

配列番号21の第1～24番目、配列番号23の第1～24番目、配列番号25の第1～24番目、又は配列番号27の第1～24番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR1、

配列番号21の第33～49番目、配列番号23の第34～50番目、配列番号25の第34～50番目、又は配列番号27の第34～50番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR2、

配列番号21の第59～95番目、配列番号23の第60～96番目、配列番号25の第59～95番目、又は配列番号27の第60～96番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR

3、及び

配列番号21の第109～119番目、配列番号23の第109～119番目、配列番号25の第107～117番目、又は配列番号27の第113～123番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR4を含み、

前記軽鎖可変領域が、

配列番号22の第1～26番目、配列番号24の第1～26番目、配列番号26の第1～26番目、又は配列番号28の第1～26番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR1、

配列番号22の第33～49番目、配列番号24の第33～49番目、配列番号26の第33～49番目、又は配列番号28の第33～49番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR2、

配列番号22の第53～88番目、配列番号24の第53～88番目、配列番号26の第53～88番目、又は配列番号28の第53～88番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR3、及び

配列番号22の第101～110番目、配列番号24の第101～110番目、配列番号26の第101～109番目、又は配列番号28の第98～107番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR4を含み、

且つ、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対する結合性が高い分子である。

[0031] 上記70%以上の配列同一性の好ましい例は、基準となるアミノ酸配列の全長に応じて異なり得るが、好ましくは80%以上又は85%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは92%以上、一層好ましくは94%以上又は95%以上、より一層好ましくは96%以上又は97%以上、最も好ましくは100%が挙げられる。

[0032] 1－5. 可変領域の具体例

より好ましくは、第1の抗AAVフルカプシド分子は、前記重鎖可変領域が配列番号21で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号22で表されるアミノ酸配列を含む。

[0033] 重鎖可変領域の配列番号21は、N末端から、{第1～24番目のアミノ酸配列からなるFR1}－{第25～32番目のアミノ酸配列からなるCDR1（配列番号1のCDR1に相当）}－{第33～49番目のアミノ酸配列からなるFR2}－{第50～58番目のアミノ酸配列からなるCDR2（配列番号2のCDR2に相当）}－{第59～95番目のアミノ酸配列からなるFR3}－{第96～108番目のアミノ酸配列からなるCDR3（配列番号3のCDR3に相当）}－{第109～119番目のアミノ酸配列からなるFR4}で構成される。軽鎖可変領域の配列番号22は、N末端から、{第1～26番目のアミノ酸配列からなるFR1}－{第27～32番目のアミノ酸配列からなるCDR1（配列番号4のCDR1に相当）}－{第33～49番目のアミノ酸配列からなるFR2}－{第50～52番目のアミノ酸配列からなるCDR2}－{配列番号22の第53～88番目のアミノ酸配列からなるFR3}－{第89～100番目のアミノ酸配列からなるCDR3（配列番号5のCDR3に相当）}－{配列番号22の第101～110番目のアミノ酸配列からなるFR4}で構成される。

[0034] より好ましくは、第2の抗AAVフルカプシド分子は、前記重鎖可変領域が配列番号23で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号24で表されるアミノ酸配列を含む。

[0035] 重鎖可変領域の配列番号23は、N末端から、{第1～24番目のアミノ酸配列からなるFR1}－{第25～33番目のアミノ酸配列からなるCDR1（配列番号6のCDR1に相当）}－{第34～50番目のアミノ酸配列からなるFR2}－{第51～59番目のアミノ酸配列からなるCDR2（配列番号7のCDR2に相当）}－{第60～96番目のアミノ酸配列からなるFR3}－{第97～108番目のアミノ酸配列からなるCDR3（

配列番号8のCDR3に相当)} — {第109～119番目のアミノ酸配列からなるFR4}で構成される。軽鎖可変領域の配列番号24は、N末端から、{第1～26番目のアミノ酸配列からなるFR1} — {第27～32番目のアミノ酸配列からなるCDR1 (配列番号9のCDR1に相当)} — {第33～49番目のアミノ酸配列からなるFR2} — {第50～52番目のアミノ酸配列からなるCDR2} — {第53～88番目のアミノ酸配列からなるFR3} — {第89～100番目のアミノ酸配列からなるCDR3 (配列番号10のCDR3に相当)} — {第101～110番目のアミノ酸配列からなるFR4}で構成される。

[0036] より好ましくは、第3の抗AAVフルカプシド分子は、前記重鎖可変領域が配列番号25で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号26で表されるアミノ酸配列を含む。

[0037] 重鎖可変領域の配列番号25は、N末端から、{第1～24番目のアミノ酸配列からなるFR1} — {第25～33番目のアミノ酸配列からなるCDR1 (配列番号11のCDR1に相当)} — {第34～50番目のアミノ酸配列からなるFR2} — {第51～58番目のアミノ酸配列からなるCDR2 (配列番号12のCDR2に相当)} — {第59～95番目のアミノ酸配列からなるFR3} — {第96～106番目のアミノ酸配列からなるCDR3 (配列番号13のCDR3に相当)} — {第107～117番目のアミノ酸配列からなるFR4}で構成される。軽鎖可変領域の配列番号26は、N末端から、{第1～26番目のアミノ酸配列からなるFR1} — {第27～32番目のアミノ酸配列からなるCDR1 (配列番号14のCDR1に相当)} — {第33～49番目のアミノ酸配列からなるFR2} — {第50～52番目のアミノ酸配列からなるCDR2} — {第53～88番目のアミノ酸配列からなるFR3} — {第89～100番目のアミノ酸配列からなるCDR3 (配列番号15のCDR3に相当)} — {第101～109番目のアミノ酸配列からなるFR4}で構成される。

[0038] より好ましくは、第4の抗AAVフルカプシド分子は、前記重鎖可変領域

が配列番号 27 で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号 28 で表されるアミノ酸配列を含む。

[0039] 重鎖可変領域の配列番号 27 は、N末端から、{第 1～24 番目のアミノ酸配列からなる FR1} – {第 25～33 番目のアミノ酸配列からなる CDR1 (配列番号 16 の CDR1 に相当)} – {配列番号 27 の第 34～50 番目のアミノ酸配列からなる FR2} – {第 51～59 番目のアミノ酸配列からなる CDR2 (配列番号 17 の CDR2 に相当)} – {配列番号 27 の第 60～96 番目のアミノ酸配列からなる FR3} – {第 97～112 番目のアミノ酸配列からなる CDR3 (配列番号 18 の CDR3 に相当)} – {配列番号 27 の第 113～123 番目のアミノ酸配列からなる FR4} で構成される。軽鎖可変領域の配列番号 28 は、N末端から、{第 1～26 番目のアミノ酸配列からなる FR1} – {第 27～32 番目のアミノ酸配列からなる CDR1 (配列番号 19 の CDR1 に相当)} – {第 33～49 番目のアミノ酸配列からなる FR2} – {第 50～52 番目のアミノ酸配列からなる CDR2} – {第 53～88 番目のアミノ酸配列からなる FR3} – {第 89～97 番目のアミノ酸配列からなる CDR3 (配列番号 20 の CDR3 に相当)} – {第 98～107 番目のアミノ酸配列からなる FR4} で構成される。

[0040] 1-6. 抗AAVフルカプシド分子の具体的形態

本開示の抗AAVフルカプシド分子は、完全抗体であってもよいし、低分子抗体（完全抗体よりも分子量が小さい抗体）であってもよい。

[0041] 本開示の抗AAVフルカプシド分子が完全抗体である場合、そのアイソタイプについては特に制限されず、例えば、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA (IgA1、IgA2)、IgM、IgD、及びIgEが挙げられる。

[0042] 本開示の抗AAVフルカプシド分子が低分子抗体である場合、その具体例としては、Fab抗体 (約55 kDa)、Fab'抗体 (約55 kDa)、F(ab')²抗体 (約110 kDa)、Fv抗体 (約25 kDa)、scFv抗

体（約25 kDa）、dsFv抗体（約25 kDa）、scFv-Fc抗体（約105 kDa）、dsFv-Fc抗体（約105 kDa）、Bis-scFv抗体（約50 kDa）、ミニボディ（約80 kDa）、ダイアボディ（約55 kDa）、トリアボディ（約75 kDa）、テトラボディ（約100 kDa）等が挙げられる。

[0043] さらに、本開示の抗AAVフルカプシド分子は、所定の重鎖相補性決定領域を含む重鎖可変領域と所定の軽鎖相補性決定領域を含む軽鎖可変領域とを有する限り、多価特異性抗体（例えば二重特異性抗体）も包含する。これらの断片抗体及び多重特異性抗体は、従来公知の方法に従って作製することができる。

[0044] 本開示の抗AAVフルカプシド分子は、典型的には、単離されたモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体の作製方法は特に限定されないが、例えば、“Kohler G, Milstein C., Nature. 1975 Aug 7; 256 (5517): 495-497.” に掲載されているようなハイブリドーマ法；米国特許第4816567号に記載されているような組換え法；“Clackson et al., Nature. 1991 Aug 15; 352 (6336): 624-628.”、又は“Marks et al., J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222 (3): 581-597.” に記載されているようなファージ抗体ライブラリから単離する方法、“タンパク質実験ハンドブック、羊土社（2003）：92-96.” に掲載されている方法等により作製することができる。

[0045] 1-7. 他の構成

本開示の抗AAVフルカプシド分子は、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対して高い結合性を有する限りにおいて、抗体構成要素（上記相補性決定領域、上記フレームワーク、及び上記「1-6. 抗AAVフルカプシド分子の具体的形態」を構成する、相補性決定領域及びフレームワーク以外の部分）以外の他の構成を含んでいてもよい。

- [0046] 他の構成を含む場合の本開示の抗A A Vフルカプシド分子としては、ポリエチレングリコール、放射性物質、トキシン等の各種化合物等が他の構成として結合したコンジュゲート抗体、改変糖鎖が他の構成として結合した抗体、別のタンパク質が他の構成として融合した融合抗体等が挙げられる。
- [0047] 他の構成の好ましい例としては、ヒンジ領域、スペーサー、本開示の抗A A Vフルカプシド分子の精製を可能にするための精製用タグ、本開示の抗A A Vフルカプシド分子の固相への固定化を可能にするための固定化用修飾基等が挙げられる。これらの構成は、1種を単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。
- [0048] ヒンジ領域を構成するアミノ酸残基数については特に限定されないが、例えば1～25 aa、好ましくは5～20 aaが挙げられる。ヒンジ領域の具体例としては、EPKTPKPQ、AHHSEDPS、EPTPPQPQPQPQPQNPTE等が挙げられる。
- [0049] スペーサーとしては、適当な長さの配列を選択すればよく、例えば1～6 アミノ酸、好ましくは2～5 アミノ酸が挙げられる。
- [0050] 精製用タグは、直接的に、又は任意のリンカー基を介して間接的に、抗体の構成要素に結合している。精製用タグとしては、ヒスチジntag（6残基以上、好ましくは6～10残基のヒスチジンからなるオリゴヒスチジン。ニッケル（Ni²⁺）、コバルト（Co²⁺）等の中心金属となる金属イオンを表面に有する固相に、可逆的にキレート結合する。）；ストレップタグ（WSHPQFEKからなるタグ。ストレプトアビジンを表面に有する固相に、可逆的に結合する。）；フラッグタグ（DYKDDDDK又はDYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDKからなるタグ。フラッグタグ認識部位を表面に有する固相に、可逆的に結合する。）、スポットタグ（PDRVRAVSHWSSからなるタグ。スポットタグ認識部位を表面に有する固相に、可逆的に結合する。）、Cタグ（EPEAからなるタグ。Cタグ認識部位を表面に有する固相に、可逆的に結合する。）、Mycタグ（EQKLI SEEDLからなるタグ。抗Mycタグ抗体を表面に有する固相に、可逆的に結合する。）等のエピトープタグ；グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグ

（グルタチオン－S－トランスフェラーゼ認識部位又はグルタチオンを表面に有する固相に、可逆的に結合する。）、マルトース結合タンパク質タグ（マルトース結合タンパク質認識部位を表面に有する固相に、可逆的に結合する。）等のタンパク質タグが挙げられる。他の構成として、これらの精製用タグを、1種を単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてよい。これらの精製用タグを2種以上組み合わせ用いる場合は、適当なスペーサーを介して精製用タグを結合することができる。

[0051] 固定化用修飾基は、直接的に、又は任意のリンカー基を介して間接的に、抗体の構成要素に結合している。固定化用修飾基としては、アミノ基（ポリペプチドのカルボキシル基とともにカルバモイル基を構成する基。活性エステル基又はエポキシ基が表面に固定された固相に、アミノ基を介して固定される。）、チオール基（マレイミド基で表面修飾された固相に、マイケル付加反応により固定される。）、シクロペンタジエニル基（キノン基で表面修飾された固相に、ディールスアルダー反応により固定される。）、ビオチニル基（アビジン基で表面修飾された固相に、ビオチン－アビジン相互作用により固定化される。）、オキシアミノ基（ホルミル基で表面修飾された固相に、シッフ塩基により固定化される。）、システイン残基（ホルミル基で表面修飾された固相に、チアゾリン環形成により固定化される、又は、ベンジルチオエステルで表面修飾された固相に、エステル交換により固定化される）、2－（2－ピリジニルジチオ）－エタンアミン（PDEA）によるカルボキシル基の修飾基（チオール基で表面修飾された固相に、ジスルフィド結合により固定化される）等が挙げられる。

[0052] 上記の精製用タグ又は固定化用修飾基は、常法により、抗体の構成要素へ導入することができ、これにより、本開示の抗AAVフルカプシド分子を合成することができる。

[0053] 2. AAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相

本開示のAAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相は、上記「1. 抗AAVフルカプシド分子」と、当該抗AAVフルカプシド分子が固定化され

た固相材料（本明細書において、単に「固相」とも記載する。）とを含む。

[0054] 固相材料の材質については特に限定されず、例えば、樹脂（アガロース、セファロース、デキストラン、シリカゲル、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、（メタ）アクリル酸系ポリマー、フッ素樹脂、金属錯体樹脂等）、ガラス、金属、磁性体等が挙げられる。

[0055] 固相材料の形状については特に限定されず、本開示のAAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相の使用態様に応じて適宜決定することができる。固相の形状の例としては平板状、粒子状、繊維状等が挙げられる。

[0056] 固相材料の形状が平板状である場合、平板状の固相は、チップを構成していてもよいし、容器、ウェル等の底面を構成していてもよい。固相材料の形状が粒子状又は繊維状である場合、粒子状又は繊維状の固相は、カラムに充填された態様であってもよい。

[0057] 本開示のAAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相において、抗AAVフルカプシド分子の固定化の態様としては、上記「1-7. 他の構成」の固定化用修飾基についての説明で述べた通りである。

[0058] 3. AAVフルカプシドの捕捉方法

本開示のAAVフルカプシドの捕捉方法は、AAVの空カプシド及びAAVフルカプシドを含む試料を、上記「2. AAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相」で述べたAAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相に接触させ、前記AAVフルカプシドを捕捉する工程1を含む。

[0059] AAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相に固定化されている抗AAVフルカプシド分子が、AAVの空カプシドよりもAAVフルカプシドに対して高い結合性を示すため、工程1では、AAVの空カプシド及びAAVフルカプシドを含む試料を当該アフィニティ固相に接触させることで、試料中のAAVフルカプシドを選択的に捕捉する。試料を固相に接触させる条件としては特に限定されず、例えば中性条件（25℃でのpHで、例えば6.5～7.7）下、且つ例えば常温（好ましくは、15～30℃）で、例えば1

分～3時間が挙げられる。

[0060] 本開示のAAVフルカプシドの捕捉方法は、例えば、上記試料中のAAVフルカプシドを定量する方法、又は上記試料中のAAVフルカプシドを分離する方法に用いることができる。

[0061] 本開示のAAVフルカプシドの捕捉方法が、上記試料中のAAVフルカプシドを定量する方法に用いられる場合、捕捉されたAAVフルカプシドを酵素結合免疫吸着測定により定量する工程2をさらに含むことができる。酵素結合免疫吸着測定の方法については、公知の方法を用いることができ、具体的には、直接法、間接法、サンドイッチ法、競合法のいずれであってもよい。工程2では、アフィニティ固相とAAVフルカプシドとの結合が、蛍光標識等のシグナル基により発せられるシグナルに基づいて検出できるため、AAVフルカプシドを、当該シグナルの強度に基づいて定量することができる。

[0062] 本開示のAAVフルカプシドの捕捉方法が、上記試料中のAAVフルカプシドを分離する方法に用いられる場合、捕捉されたAAVフルカプシドを分離回収する工程3をさらに含むことができる。この場合、前記固相材料をクロマトグラフィーカラムに充填された形態で用いることができる。工程3では、アフィニティ固相に捕捉されたAAVフルカプシドを溶出により回収する。溶出方法については、pHの調整による溶出（例えば、酸溶出、アルカリ溶出）、塩濃度の調整による溶出（例えば、高濃度塩による溶出）等が挙げられる。回収されたAAVフルカプシド画分は、必要に応じ、さらに任意の精製方法により精製することができる。回収されたAAVフルカプシド画分又はその精製画分は、必要に応じて、凍結乾燥、真空乾燥、スプレードライ等により粉末化してもよい。

[0063] 4. 核酸

上記「1. 抗AAVフルカプシド分子」で述べた抗AAVフルカプシド分子をコードしている核酸（以下、「本開示の核酸」と表記することもある）は、当業者であれば、本開示の抗AAVフルカプシド分子のアミノ酸配列に

従って適宜調製及び設計することができる。本開示の核酸は、DNAであってもよいし、RNAであってもよい。

[0064] 本開示の核酸の塩基配列は、上記「1-3. 相補性決定領域」で述べた相補性決定領域のアミノ酸配列に従って、当業者が適宜設計可能である。

[0065] 例えば、第1の抗AAVフルカプシド分子をコードする塩基配列において、配列番号1で表されるCDR1、配列番号2で表されるCDR2、配列番号3で表されるCDR3をコードする塩基配列としては、それぞれ、配列番号29、30、31で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。配列番号4で表されるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号5で表されるCDR3をコードする塩基配列としては、それぞれ、配列番号32で表される塩基配列、agggcatcc、配列番号33で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。

[0066] 第2の抗AAVフルカプシド分子をコードする塩基配列において、配列番号6で表されるCDR1、配列番号7で表されるCDR2、配列番号8で表されるCDR3をコードする塩基配列としては、それぞれ、配列番号34、35、36で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。配列番号9で表されるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号10で表されるCDR3をコードする塩基配列としては、それぞれ、配列番号37で表される塩基配列、agggcatcc、配列番号38で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。

[0067] 第3の抗AAVフルカプシド分子をコードする塩基配列において、配列番号11で表されるCDR1、配列番号12で表されるCDR2、配列番号1

3で表されるCDR3をコードする塩基配列としては、それぞれ、配列番号39、40、41で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。配列番号14で表されるCDR1、QASからなるCDR2、配列番号15で表されるCDR3をコードする塩基配列としては、それぞれ、配列番号42で表される塩基配列、caggcatcc、配列番号43で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。

[0068] 第4の抗AAVフルカプシド分子をコードする塩基配列において、配列番号16で表されるCDR1、配列番号17で表されるCDR2、配列番号18で表されるCDR3をコードする塩基配列としては、それぞれ、配列番号44、45、46で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。配列番号19で表されるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号20で表されるCDR3をコードする塩基配列としては、それぞれ、配列番号47で表される塩基配列、agggcatcc、配列番号48で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。

[0069] 本開示の核酸の塩基配列は、さらに、上記「1-4. フレームワーク領域」で述べたフレームワーク領域のアミノ酸配列、又は上記「1-5. 可変領域の具体例」で述べた可変領域のアミノ酸配列に従って、当業者が適宜設計可能である。例えば、第1の抗AAVフルカプシド分子をコードする塩基配列において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をそれぞれコードする塩基配列としては、配列番号21、22で表されるアミノ酸配列それぞれをコードする、配列番号49、50で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジントな条件下でハイブリダイズ

するDNAの塩基配列が挙げられる。第2の抗AAVフルカプシド分子をコードする塩基配列において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をそれぞれコードする塩基配列としては、配列番号23、24で表されるアミノ酸配列それぞれをコードする、配列番号51、52で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。第3の抗AAVフルカプシド分子をコードする塩基配列において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をそれぞれコードする塩基配列としては、配列番号25、26で表されるアミノ酸配列それぞれをコードする、配列番号53、54で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。第4の抗AAVフルカプシド分子をコードする塩基配列において、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をそれぞれコードする塩基配列としては、配列番号27、28で表されるアミノ酸配列それぞれをコードする、配列番号55、56で表される塩基配列、及びそれら塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列が挙げられる。

[0070] なお、「ストリンジェントな条件下」とは、0.5%SDS、5×デンハルツ〔Denhartz's、0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400〕および100μg/mlサケ精子DNAを含む6×SSC（1×SSCは、0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0）中で、50℃～65℃で4時間～一晩保温する条件をいう。ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、具体的には、以下の手法によって行われる。即ち、DNAライブラリー又はcDNAライブラリーを固定化したナイロン膜を作成し、6×SSC、0.5% SDS、5×デンハルツ、100μg/mlサケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション溶液中、65℃でナイロン膜をブロッキングする。その後、³²Pでラベルした各プローブを加えて

、65℃で一晩保温する。このナイロン膜を6×SSC中、室温で10分間、0.1%SDSを含む2×SSC中、室温で10分間、0.1%SDSを含む0.2×SSC中、45℃で30分間洗浄した後、オートラジオグラフィーをとり、プローブと特異的にハイブリダイズしているDNAを検出することができる。

[0071] 本開示の核酸の塩基配列は、さらに、上記「1-7. 他の構成」で述べた他の構成のうちアミノ酸配列で表されるものに従って、適宜設計可能である。

[0072] また、本開示の核酸は、上記の抗AAVフルカプシド分子をコードしている核酸を鋳型として、少なくとも抗AAVフルカプシド分子をコードしている領域をPCR等によって取得することにより得ることもできる。また、本開示の核酸は、遺伝子の合成法によって人工合成することもできる。

[0073] また、本開示の核酸は、さらに、開始コドン及び終止コドンをコードする塩基配列の少なくともいずれかをさらに含んでいてもよい。

[0074] 本開示の核酸を得る方法として、ハイブリダイゼーションに基づく方法が挙げられる。

[0075] 本開示の核酸には、コドンの縮重に由来する多種の核酸が包含される。同じアミノ酸配列をコードする多種の核酸を人為的に作製することは、公知の遺伝子工学的手法を用いて容易に行うことができる。例えば、遺伝子工学的なポリペプチドの生産において、目的のタンパク質をコードする本来の遺伝子上で使用されているコドンが宿主中では使用頻度の低いものであった場合には、タンパク質の発現量が低いことがある。このような場合にはコードされているアミノ酸配列に変化を与えることなく、コドン利用頻度を宿主に最適化することにより、目的タンパク質の高発現を図ることができる。

[0076] コドン利用頻度を表す指標として、各コドンの宿主最適コドン利用頻度の総計を採択すればよい。最適コドンとは、同じアミノ酸に対応するコドンのうち利用頻度が最も高いコドンと定義される。コドン利用頻度は、宿主に最適化したものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌の最適コドンの

一例として以下のものが挙げられる。F：フェニルアラニン（t t t）、L：ロイシン（c t g）、I：イソロイシン（a t t）、M：メチオニン（a t g）、V：バリン（g t g）、Y：チロシン（t a t）、終止コドン（t a a）、H：ヒスチジン（c a t）、Q：グルタミン（c a g）、N：アスパラギン（a a t）、K：リジン（a a a）、D：アスパラギン酸（g a t）、E：グルタミン酸（g a a）、S：セリン（a g c）、P：プロリン（c c g）、T：スレオニン（a c c）、A：アラニン（g c g）、C：システイン（t g c）、W：トリプトファン（t g g）、R：アルギニン（c g c）、G：グリシン（g g c）。

[0077] 5. 発現カセット又は組換えベクター

上記「4. 核酸」で述べた核酸を含む発現カセット又は組換えベクター（以下、「本開示の発現カセット」又は「本開示の組換えベクター」とも表記する）は本開示のポリペプチドをコードする核酸を含む。

[0078] 本開示の発現カセット又は組換えベクターは、本開示の核酸にプロモーター及びターミネーターを連結することにより、若しくは、発現ベクターに本開示の発現カセット又は本開示の核酸挿入することにより得ることができる。

[0079] 本開示の発現カセット又は組換えベクターには、制御因子として、プロモーター及びターミネーターの他、更に必要に応じてエンハンサー、C C A A Tボックス、T A T Aボックス、S P I部位等の転写要素が含まれていてもよい。これらの制御因子は、本開示のD N Aに作動可能に連結されていればよい。作動可能に連結とは、本開示のD N Aを調節する種々の制御因子と本開示のD N Aが、宿主細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。

[0080] 本開示の発現カセット又は本開示の組換えベクターを、プロテアーゼ認識配列を含む全長ポリペプチドを一旦発現させた後にプロテアーゼで末端配列を切断可能となるように設計する場合、本開示の発現カセット又は組換えベクターは、プロテアーゼ認識配列をコードする塩基配列とN末端配列及び／又はC末端配列をコードする塩基配列とを組み合わせで含むように構成する

ことができる。

[0081] 発現ベクターとしては、宿主内で自律的に増殖し得るファージ、プラスミド、又はウイルスから遺伝子組換え用として構築されたものが好適である。このような発現ベクターは公知であり、宿主細胞との適切な組み合わせを当業者が適宜選択して用いることができる。例えば、微生物を宿主とする場合には、pBluescript (pBS) Ⅱ SK (−) (Stratagene社製)、pSTV系ベクター (タカラバイオ社製)、pUC系ベクター (タカラバイオ社製)、pET系ベクター (シグマアルドリッチジャパン合同会社製)、pGEX系ベクター (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製 (Cytiva))、pCold系ベクター (タカラバイオ社製)、pHY300PLK (タカラバイオ社製)、pUB110 (McKenzie, T. et al., 1986, Plasmid 15 (2), p. 93-103)、pBR322 (タカラバイオ社製)、pRS403 (ストラタジーン社製)、及びpMW218/219 (ニッポンジーン社製) 等が挙げられる。藻類又は微細藻類を宿主とする場合には、pUC19 (タカラバイオ社製)、P66 (Chlamydomonas Center)、P-322 (Chlamydomonas Center)、pPha-T1 (Yangmin Gong, et al., Journal of Basic Microbiology, 2011, vol. 51, p. 666-672 参照)、又はpJET1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 等が挙げられる。植物細胞を宿主とする場合には、pRI系ベクター (タカラバイオ社製)、pBI系ベクター (クロンテック社製)、及びIN3系ベクター (インプラントイノベーションズ社製) が挙げられる。

[0082] 6. 形質転換体

本開示の発現カセット又は組換えベクターを用いて宿主を形質転換することによって、形質転換体 (以下、「本開示の形質転換体」と表記することもある) が得られる。

[0083] 形質転換体の製造に使用される宿主としては、遺伝子の導入が可能であり、且つ自律増殖可能で本開示の遺伝子の形質を発現できるのであれば特に制限されないが、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属等に属する細菌；放線菌等；酵母等；糸状菌等の微生物が好適な例として挙げられるが、その他、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等であってもよい。これらの中でも大腸菌が特に好ましい。

[0084] 本開示の形質転換体は、宿主に本開示の発現カセット又は組換えベクターを導入することによって得ることができる。本開示の核酸を導入する場所も、目的の遺伝子が発現できる限り特に限定されず、プラスミド上であってもよいし、ゲノム上であってもよい。本開示の発現カセット又は本開示の組換えベクターを導入する具体的な方法としては、例えば、組換えベクター法、ゲノム編集法が挙げられる。

[0085] 宿主に本開示の発現カセット又は組換えベクターを導入する条件は、宿主の種類等に応じて適宜設定すればよい。宿主が微生物の場合であれば、例えば、カルシウムイオン処理によるコンピテントセルを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法及び酢酸リチウム法等が挙げられる。宿主が動物細胞の場合であれば、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法及びリポフェクション法等が挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合であれば、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法及びエレクトロポレーション法等が挙げられる。宿主が植物細胞の場合であれば、例えば、エレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、及びPEG法等が挙げられる。

[0086] 7. 抗AAVフルカプシド分子の製造方法

本開示は、上記「1. 抗AAVフルカプシド分子」で述べた抗AAVフルカプシド分子の製造方法も提供する。AAVの空カプシドよりもAAVフル

カプシドに対して高い結合性を有する抗体である抗A A Vフルカプシド分子は、有限の機械的作業により適宜製造できる。

[0087] 7-1.

本開示の抗A A Vフルカプシド分子は、抗体ライブラリから、A A Vフルカプシドに対する親和性選択により選抜し、選抜した抗体のA A Vフルカプシドに対する結合性がA A Vの空カプシドよりも高いことを確認するという有限の機械的作業により適宜取得できる。具体的には、A A Vカプシドタンパク質を抗原として動物に免疫し、当該動物のリンパ球から抗体遺伝子を取得し、得られた様々なV H領域と様々なV L領域とを組み合わせた抗体遺伝子をファージミドベクターに導入して抗体ライブラリを構築する工程；A A Vフルカプシドに対する結合性を持つファージクローンを選別するバイオパニングを行う工程；及び選別されたファージクローンの培養上清に含まれる抗体のA A Vフルカプシドに対する結合性が、A A Vの空カプシドよりも高いことを確認する工程により、抗A A Vフルカプシド分子を取得できる。

[0088] 7-2.

本開示の抗A A Vフルカプシド分子は、特定の配列番号で表されるアミノ酸配列からなるC D Rを持つものだけでなく、特定の配列番号で表されるアミノ酸配列と90%以上100%未満の配列同一性を有するC D Rを持つものも、有限の機械的作業により適宜製造できる。具体的には、構造ドメイン上のC D Rの領域に、特定の配列番号で表されるアミノ酸配列と90%以上100%未満の配列同一性を有する極めて限定的なバリエーションの配列（好ましくは保存的アミノ酸置換によるバリエーションの配列）を持つ抗体の遺伝子をファージミドベクターに導入することで抗体ファージライブラリを作製し、上記項目7-1で述べたように、バイオパニングによりA A Vフルカプシドに対する結合性を持つファージクローンを選別し、選抜したファージクローンが産生する抗体のA A Vフルカプシドに対する結合性がA A Vの空カプシドよりも高いことを確認することにより、本開示の抗A A Vフルカプシド分子を取得できる。

[0089] 7-3.

好ましい実施形態において、本開示の抗AAVフルカプシド分子は、前記本開示の形質転換体を培養することによって製造することができる。

[0090] 本開示の形質転換体の培養条件は、宿主の栄養生理学的性質を考慮して適宜設定すればよいが、好ましくは液体培養が挙げられる。また、工業的製造を行う場合であれば、通気攪拌培養が好ましい。

[0091] 本開示の形質転換体を培養し、培養液を遠心分離等の方法により培養上清若しくは培養菌体又は培養細胞を回収する。本開示のポリペプチドが培養菌体内又は培養細胞内に蓄積されている場合であれば、菌体又は細胞を超音波、フレンチプレス等の機械的方法又はリゾチーム等の溶菌酵素により処理を施し、必要に応じてプロテアーゼ等の酵素やドデシル硫酸ナトリウム（SDS）等の界面活性剤を使用することにより可溶化し、本開示の抗AAVフルカプシド分子を含む水溶性画分を得ることができる。

[0092] また、適当な発現ベクターと宿主を選択することにより、発現した本開示の抗AAVフルカプシド分子を培養液中に分泌させてもよい。

[0093] 上記のようにして得られた本開示の抗AAVフルカプシド分子を含む培養液、水溶性画分、又はプロテアーゼ処理物は、そのまま精製処理に供してもよいが、当該培養液、水溶性画分、又はプロテアーゼ処理物中の本開示の抗AAVフルカプシド分子を濃縮した後に精製処理に供してもよい。

[0094] 濃縮は、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、塩析処理、親水性有機溶媒（例えば、メタノール、エタノール及び／又はアセトン）による分別沈殿法等により行うことができる。

[0095] 本開示の抗AAVフルカプシド分子の精製処理は、例えば、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、精製用タグに対応するアフィニティークロマトグラフィー等の方法を適宜組み合わせることによって行うことができる。

[0096] このようにして精製された本開示の抗AAVフルカプシド分子は、必要に応じて、凍結乾燥、真空乾燥、スプレードライ等により粉末化してもよい。

[0097] 本明細書に開示された各々の態様は、本明細書に開示された他のいかなる特徴とも組み合わせることができる。

実施例

[0098] 以下に実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、各実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は、一例であって、本発明の主旨から逸脱しない範囲内で、適宜、構成の付加、省略、置換、及びその他の変更が可能である。本開示は、実施形態によって限定されることはなく、クレームの範囲によってのみ限定される。

[0099] [試験例 1]

(1) 抗体ライブラリの調製

AAVカプシドタンパク質から切り出したタンパク質を抗原としてウサギに免疫し抗体を産生させた。脾臓より全RNAを取得し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応でcDNAライブラリを構築した。次に、プライマーを用いて、重鎖（H鎖）の可変領域（VHドメイン）の遺伝子と、軽鎖（L鎖）の可変領域（VLドメイン）の遺伝子とをPCRで増幅した。次に、これらPCR産物をファージミドベクターに挿入するため、制限酵素による処理等を行った。また、ファージミドベクターにおいても所定の制限酵素による処理等を行い、制限酵素処理をした各遺伝子を、制限酵素処理したファージミドベクターへ挿入した。この組換えファージミドベクターで大腸菌TG-1を形質転換し、2×YT培地（1%グルコース、50mg/Lアンピシリン含有）10ml中に植菌した。200ml三角フラスコ中で37℃、200rpmにおいて一晩培養した（前培養）。

[0100] 前培養液を、OD₆₀₀=0.1となるように、50mlの2×YT培地（1%グルコース、50mg/Lアンピシリン含有）中に植菌し、30℃、200rpmで振とう培養した。OD=1.0付近まで培養後、ヘルパーファージVCSM13を感染多重度（MOI）=20となるように培養液に加え、37℃で30分インキュベートした。37℃で3000g、10分間遠心分離し、上清を除去し、2×YT培地（50mg/Lアンピシリン、35

mg/Lカナマイシン含有) 50 ml 中に穏やかに懸濁した。30℃、200 rpmで12時間以上振とうし、培養上清中に、単鎖抗体を提示するファージを生産した。上清を遠心分離によって回収し、PEG沈殿によって濃縮するとともに、1 mlのPBS中に単鎖抗体を提示するファージのライブラリを取得した。

[0101] (2) バイオパニング

AAV9フルカプシドサンプルを、緩衝液 (137mmol/l NaCl, 8.1mmol/l Na₂HPO₄, 2.68mmol/l KCl, 1.47mmol/l KH₂PO₄, pH7.4) 中でイムノチューブに物理吸着させた。続いて、BSAを2%となるよう緩衝液 (137mmol/l NaCl, 8.1mmol/l Na₂HPO₄, 2.68mmol/l KCl, 1.47mmol/l KH₂PO₄, pH7.4) に溶解・分散させた溶液で各チューブをブロッキングした。しばらくインキュベートした後、0.1%Tween20を含む緩衝液 (137mmol/l NaCl, 8.1mmol/l Na₂HPO₄, 2.68mmol/l KCl, 1.47mmol/l KH₂PO₄, pH7.4) で3回洗浄した。

[0102] 上記(1)で調製したファージライブラリ(約 1.0×10^{11} pfu分)を、2%のBSAを含む緩衝液 (137mmol/l NaCl, 8.1mmol/l Na₂HPO₄, 2.68mmol/l KCl, 1.47mmol/l KH₂PO₄, pH7.4) に溶解・分散させたものをチューブに添加し、1時間、25℃にてインキュベートした。インキュベート後に溶液を取り除き、0.1%Tween20を含む緩衝液 (137mmol/l NaCl, 8.1mmol/l Na₂HPO₄, 2.68mmol/l KCl, 1.47mmol/l KH₂PO₄, pH7.4) で5回チューブを洗浄し、0.1Mグリシン塩酸 (Glycine-HCl) (pH2.2) を加えて10分間25℃にてインキュベートした。その後、チューブの溶液を回収し、中和した後、大腸菌TG-1に感染させた。単鎖抗体を提示するファージを感染させた大腸菌TG-1をLB寒天培地 (Final 50mg/L となるようアンピシリン添加) に撒き、一晚37℃でインキュベートしてコロニーを形成した。ここから無作為に96クローンを選抜した。

[0103] (3) 実験手順

1. 0.1 μgのAAVを含む溶液 (PBS) をMaxisorp 96 well plateにアプライし、1時間室温で静置した。AAVサンプルとしては、AAV9につ

いて、フルカプシド又は空カプシドを含むもの、つまり、「AAV9 Full capsidサンプル」、及び「AAV9 Empty capsidサンプル」の2種類を用いた。

2. PBSで2回 wellを洗浄した。

3. 2% BSAブロッキング溶液をplateにアプライし、25℃で1時間振盪攪拌した。

4. PBST (0.1% Tween) で3回wellを洗浄した。

5. 別途、上記(2)で選抜された96クローンを各々2YT培地で37℃、24時間培養し、培養上清中に含まれていた抗AAV-scfvを、His MultiTrap FFにてプロトコールに従って精製し、定量した。96クローン中には、表2Aに示す可変領域のアミノ酸配列と、表2Bに示すリンカーのアミノ酸配列及びタグのアミノ酸配列とからなる、第1の抗AAV-scfv [1]、第2の抗AAV-scfv [2]、第3の抗AAV-scfv [3]、第4の抗AAV-scfv [4]を含んでいた。いずれの抗AAV-scfvも、N末端から、重鎖可変領域、リンカー、軽鎖可変領域、タグの順番で配列が構成されている。これら抗AAV-scfv [1]～[4]の水溶液をplateにアプライし、25℃で1時間振盪攪拌(pHは約7)した。

[0104]

[表2A]

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列 番号
[1]	HV	QSLSESGGLVKPGASLTLTCTAS	GFSFSSYG	ISWFRQAPGKGLEWIGT	IYGGSSGST	YYASWAKGRFTISKTSSTMTLQMASLTAADTATYFC	ARDRVGGNGYADL	WPGTLVTVTS
	LV	ELVMTQTAASVEAAVGGTVTIKCOAS	QSISSY	LAWYQQKPGQRPKLLIY	RAS	TLASGVSSRFKSGSGTEYTLTISDLECDDAATYTC	QSHYDIRNYGVA	FGGGTEVDIK
[2]	HV	QSLSESGGDLVKPGASLTLTCTAS	GFSFSSNYW	MFWWRQAPGKGLEWAH	IYGGSSGST	YYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC	ATVDNGYSDLKL	WPGTLVTVTS
	LV	ELVLTQTADSV EAGVGGTVTIKCOAS	QSI RNW	LSWYQQKPGQPPKLLIS	RAS	TLASGVPSRFSGSGTEFTLTISDLECDGATYTC	QSSFYADSGEPA	FGGGTEVDIK
[3]	HV	QSV EESGGDLVKPGASLTLTCTAS	GIDFSSGYD	MCWWRQAPGKGLEWGC	IYTGGD SA	WYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTGADTATYFC	ANDLDSGT VSI	WPGTLVTVTS
	LV	ELVLTQTAA SVSEPVGGTVTIKCOAS	QSISSW	LSWYQQKPGQPPKLLIY	QAS	KLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYTC	AGWTSSTTDGTA	FGGGTEVI
[4]	HV	QSLSESGGDLVKPGASLTLTCTAS	GFSFSSSAY	MCWWRQAPGKGLEWGC	MHTISSVDI	YYASWAKGRFAISKASSTTVTLQMTSLTAADTATYFC	ARDDRNGYGYPSYFDI	WPGTLVTVTS
	LV	ELDLTQTAA SVEAAVGGTITIKCOAS	QTISSY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	RAS	TLASGVSSRFKSGSGTEYTLTISDLECAADAATYTC	LTYYGNSHN	FGGGTEVVIK

HV: 重鎖可変領域 LV: 軽鎖可変領域

[0105] [表2B]

			配列 番号
[1]	リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS	57
	タグ	RSAAAGGSEQKLISEEDLGGGSHHHHHH*	58
[2]	リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS	57
	タグ	RSAAAGGSEQKLISEEDLGGGSHHHHHH*	58
[3]	リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS	57
	タグ	TGSAAAGGSEQKLISEEDLGGGSHHHHHH*	59
[4]	リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS	57
	タグ	GSAAAGGSEQKLISEEDLGGGSHHHHHH*	60

[0106] 6. P B S T (0.1% Tween) で3回wellを洗浄した。

7. H R P 修飾された抗体His-Tag抗体をplateにアプライし、1時間25℃で振盪攪拌した。

8. P B S T (0.1% Tween) で3回wellを洗浄した。

9. H R P 酵素の基質 (1-Step Ultra TMB-Substrate Solution) を添加した。

10. 室温でインキュベートし発色させた後、硫酸や塩酸を添加し反応を停止させた。

11. 450 nmおよび650nmの吸光度を各wellで測定し、450 nmの吸光度から650nmの吸光度を差し引いた値をE L I S A シグナルの吸光度の値とした。

12. 空カプシドのサンプルにおける吸光度 (I E) に対するフルカプシドのサンプルにおける吸光度 (I F) の比率 (I F / I E)、及びブランク (BSA) における吸光度 (I B) に対する空カプシドのサンプルにおける吸光度 (I E) の比率 (I E / I B) を導出した。

[0107] 結果

第1の抗A A V - s c F v [1]、第2の抗A A V - s c F v [2]、第3の抗A A V - s c F v [3]、第4の抗A A V - s c F v [4] について得られた、比率 I F / I E 及び比率 I E / I B を下記表3に示す。

[0108]

[表3]

	IF/IE	IE/IB
[1]	6.54	1.50
[2]	8.23	3.70
[3]	6.11	2.22
[4]	7.17	3.09

[0109] 表3に示される通り、[1]～[4]の抗AAV-scfvはいずれも、AAVフルカプシドに対する特異的な結合性が認められた。

[0110] [試験例2]

第2の抗AAV-scfv[2]を用い、試験例1の実験手順の「1」でplateにアプライしたAAVの量を変化させたことを除いて、試験例1と同様の手順を行い、450 nmおよび650nmの吸光度を各wellで測定し、450 nmの吸光度から650nmの吸光度を差し引いた値をELISAシグナルの吸光度の値とした。吸光度を縦軸、アプライしたAAVの量を横軸としたグラフを図1に示す。

[0111] 図1に示される通り、ブランク（BSA）及び空カプシド（Empty）については実質的に吸光度に差が無く且つ濃度依存性が認められなかったことに対し、フルカプシド（Full）については濃度依存的に吸光度が増加していた。つまり、抗AAV-scfvによるAAVフルカプシドを選択的に定量できることが認められた。

請求の範囲

- [請求項1] A A Vの空カプシドよりもA A Vフルカプシドに対して高い結合性を有する抗体である、抗A A Vフルカプシド分子。
- [請求項2] 重鎖相補性決定領域として、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるC D R 2、配列番号3で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるC D R 3とを含む重鎖可変領域と、
 軽鎖相補性決定領域として、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるC D R 1、R A SからなるC D R 2、配列番号5で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるC D R 3とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗A A Vフルカプシド分子。
- [請求項3] 重鎖相補性決定領域として、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるC D R 2、配列番号8で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるC D R 3とを含む重鎖可変領域と、
 軽鎖相補性決定領域として、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるC D R 1、R A SからなるC D R 2、配列番号10で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるC D R 3とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗A A Vフルカプシド分子。
- [請求項4] 重鎖相補性決定領域として、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるC D R 2、配列番号13で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるC D R 3とを含む重鎖可変領域と、
 軽鎖相補性決定領域として、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるC D R 1、Q A SからなるC D R 2、配列番号15で表され

るアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗AAVフルカプシド分子。

[請求項5] 重鎖相補性決定領域として、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号18で表されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるCDR3とを含む重鎖可変領域と、

軽鎖相補性決定領域として、配列番号19で表されるアミノ酸配列からなるCDR1、RASからなるCDR2、配列番号20で表されるアミノ酸配列からなるCDR3とを含む軽鎖可変領域とを含む、抗AAVフルカプシド分子。

[請求項6] 前記重鎖可変領域が、

配列番号21の第1～24番目、配列番号23の第1～24番目、配列番号25の第1～24番目、又は配列番号27の第1～24番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR1、

配列番号21の第33～49番目、配列番号23の第34～50番目、配列番号25の第34～50番目、又は配列番号27の第34～50番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR2、

配列番号21の第59～95番目、配列番号23の第60～96番目、配列番号25の第59～95番目、又は配列番号27の第60～96番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR3、及び

配列番号21の第109～119番目、配列番号23の第109～119番目、配列番号25の第107～117番目、又は配列番号27の第113～123番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一

性を有するアミノ酸配列からなるFR4を含み、

前記軽鎖可変領域が、

配列番号22の第1～26番目、配列番号24の第1～26番目、配列番号26の第1～26番目、又は配列番号28の第1～26番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR1、

配列番号22の第33～49番目、配列番号24の第33～49番目、配列番号26の第33～49番目、又は配列番号28の第33～49番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR2、

配列番号22の第53～88番目、配列番号24の第53～88番目、配列番号26の第53～88番目、又は配列番号28の第53～88番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR3、及び

配列番号22の第101～110番目、配列番号24の第101～110番目、配列番号26の第101～109番目、又は配列番号28の第98～107番目のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるFR4を含む、請求項2～5のいずれかに記載の抗AAVフルカプシド分子。

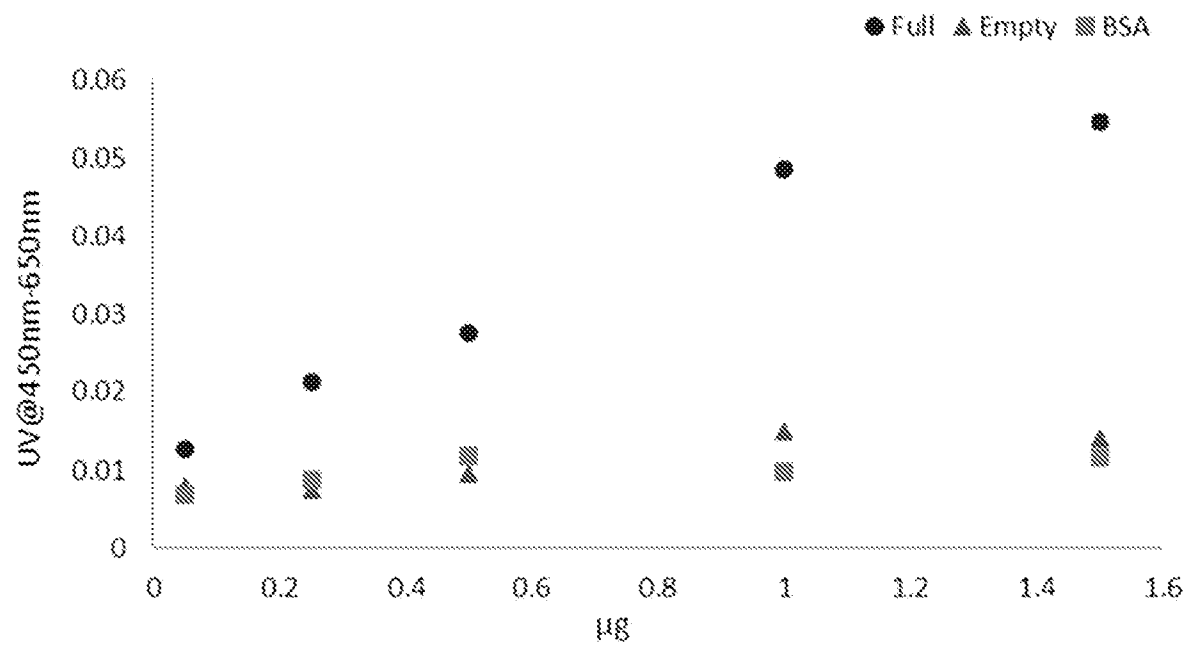
[請求項7] 前記重鎖可変領域が配列番号21で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号22で表されるアミノ酸配列を含む、請求項2に記載の抗AAVフルカプシド分子。

[請求項8] 前記重鎖可変領域が配列番号23で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号24で表されるアミノ酸配列を含む、請求項3に記載の抗AAVフルカプシド分子。

[請求項9] 前記重鎖可変領域が配列番号25で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号26で表されるアミノ酸配列を含む、請求項4に記載の抗AAVフルカプシド分子。

- [請求項10] 前記重鎖可変領域が配列番号27で表されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号28で表されるアミノ酸配列を含む、請求項5に記載の抗AAVフルカプシド分子。
- [請求項11] IgG抗体、Fab抗体、Fab'抗体、F(ab')₂抗体、Fv抗体、scFv抗体、dsFv抗体、scFv-Fc抗体、dsFv-Fc抗体、Bis-scFv抗体、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、又はテトラボディである、請求項1～5のいずれかに記載の抗AAVフルカプシド分子。
- [請求項12] 請求項1～5のいずれかに記載の抗AAVフルカプシド分子と、前記抗AAVフルカプシド分子が固定化された固相材料とを含む、AAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相。
- [請求項13] AAVの空カプシド及びAAVフルカプシドを含む試料を、請求項12に記載のAAVのフルカプシド結合用アフィニティ固相に接触させ、前記AAVフルカプシドを捕捉する工程1を含む、AAVフルカプシドの捕捉方法。
- [請求項14] 捕捉されたAAVフルカプシドを酵素結合免疫吸着測定により定量する工程2をさらに含む、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 請求項1～5のいずれかに記載の抗AAVフルカプシド分子をコードしている核酸。
- [請求項16] 請求項15に記載の核酸を含む発現カセット又は組換えベクター。
- [請求項17] 請求項16に記載の発現カセット又は組換えベクターを用いて宿主を形質転換して得られる形質転換体。
- [請求項18] 請求項17に記載の形質転換体を培養する工程を含む、抗AAVフルカプシド分子の製造方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/039335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 16/08</i> (2006.01)i; <i>C07K 1/22</i> (2006.01)i; <i>C07K 17/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/15</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/19</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/13</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/864</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/08</i> (2006.01)i FI: C07K16/08 ZNA; C07K17/00; C07K1/22; C12N15/864 100Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/08; C12N15/13 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) C07K16/08; C07K1/22; C07K17/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/13; C12N15/864; C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2025 Registered utility model specifications of Japan 1996-2025 Published registered utility model applications of Japan 1994-2025 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2022-549679 A (BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.) 28 November 2022 (2022-11-28) claim 1, paragraphs [0050], [0270]	1-6, 11-18
A	claim 1, paragraphs [0050], [0270]	7-10
Y	JP 2016-523821 A (FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.) 12 August 2016 (2016-08-12) paragraphs [0077]-[0078]	1-6, 11-18
A	paragraphs [0077]-[0078]	7-10
Y	JP 2015-513538 A (IMMUNDIAGNOSTIK AG) 14 May 2015 (2015-05-14) claims	1-6, 11-18
A	claims	7-10
☒ 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 10 January 2025		Date of mailing of the international search report 28 January 2025
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-536173 A (VIB VZW) 19 September 2013 (2013-09-19) claims, paragraph [0111]	1-6, 11-18
A	claims, paragraph [0111]	7-10
Y	JP 2023-529417 A (SAREPTA THERAPEUTICS, INC.) 10 July 2023 (2023-07-10) claims	1-6, 11-18
A	claims	7-10
Y	JP 2021-523702 A (OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY) 09 September 2021 (2021-09-09) claims	1-6, 11-18
A	claims	7-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/039335

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 13ter.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.
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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/039335

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2022-549679	A	28 November 2022	WO 2021/062164 A1	
				claim 1, paragraphs [0050], [0270]	
				US 2022/0308022 A1	
				EP 4034642 A1	
				CN 114729333 A	
JP	2016-523821	A	12 August 2016	KR 10-2022-0066164 A	
				WO 2014/174054 A1	
				paragraphs [0104]-[0105]	
				EP 2796147 A1	
				WO 2013/124462 A1	
JP	2015-513538	A	14 May 2015	claims	
				US 2015/0017738 A1	
				EP 2631247 A1	
				WO 2012/007593 A1	
				claims, paragraph [0160]	
JP	2013-536173	A	19 September 2013	US 2013/0137856 A1	
				EP 2593791 A1	
				CN 103180734 A	
				WO 2021/257497 A1	
				claims	
JP	2023-529417	A	10 July 2023	US 2021/0388064 A1	
				EP 4165076 A1	
				WO 2019/213668 A1	
				claims	
				US 2021/0292370 A1	
JP	2021-523702	A	09 September 2021	EP 3799568 A1	
				CN 112351787 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C07K 16/08(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i; C07K 17/00(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i;
C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i;
C12N 15/864(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i
FI: C07K16/08 ZNA; C07K17/00; C07K1/22; C12N15/864 100Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10;
C12P21/08; C12N15/13

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C07K16/08; C07K1/22; C07K17/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/13; C12N15/864;
C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年
日本国公開実用新案公報1971-2025年
日本国実用新案登録公報1996-2025年
日本国登録実用新案公報1994-2025年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2022-549679 A（バイオマリン ファーマシューティカル インコーポレイテッド） 28.11.2022（2022-11-28） 請求項1、[0050]、[0270]	1-6, 11-18
A	請求項1、[0050]、[0270]	7-10
Y	JP 2016-523821 A（フラウンホーファーゲゼルシャフト ツール フォルデルング デ ル アンゲヴァンテン フォルシュング エー. ファー. ）12.08.2016（2016-08-12） [0077] - [0078]	1-6, 11-18
A	[0077] - [0078]	7-10
Y	JP 2015-513538 A（イムーンダイアグノスティック・アー・ゲー）14.05.2015 （2015-05-14） 特許請求の範囲	1-6, 11-18
A	特許請求の範囲	7-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性が
ないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
10.01.2025

国際調査報告の発送日
28.01.2025

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

吉門 沙央里 4B 5081

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2013-536173 A (フエー・イー・ベー・フエー・ゼット・ウエー) 19.09.2013 (2013 - 09 - 19) 特許請求の範囲、 [0 1 1 1]	1-6, 11-18
A	特許請求の範囲、 [0 1 1 1]	7-10
Y	JP 2023-529417 A (サレプタ セラピューティクス, インコーポレイテッド) 10.07.2023 (2023 - 07 - 10) 特許請求の範囲	1-6, 11-18
A	特許請求の範囲	7-10
Y	JP 2021-523702 A (オレゴン ヘルス アンド サイエンス ユニバーシティ) 09.09.2021 (2021 - 09 - 09) 特許請求の範囲	1-6, 11-18
A	特許請求の範囲	7-10

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/039335

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2022-549679	A	28.11.2022	WO	2021/062164	A1	
				Claim 1, [0050], [0270]			
				US	2022/0308022	A1	
				EP	4034642	A1	
				CN	114729333	A	
				KR	10-2022-0066164	A	

JP	2016-523821	A	12.08.2016	WO	2014/174054	A1	
				[0104]-[0105]			
				EP	2796147	A1	

JP	2015-513538	A	14.05.2015	WO	2013/124462	A1	
				Claims			
				US	2015/0017738	A1	
				EP	2631247	A1	

JP	2013-536173	A	19.09.2013	WO	2012/007593	A1	
				Claims, [0160]			
				US	2013/0137856	A1	
				EP	2593791	A1	
				CN	103180734	A	

JP	2023-529417	A	10.07.2023	WO	2021/257497	A1	
				Claims			
				US	2021/0388064	A1	
				EP	4165076	A1	

JP	2021-523702	A	09.09.2021	WO	2019/213668	A1	
				Claims			
				US	2021/0292370	A1	
				EP	3799568	A1	
				CN	112351787	A	
