

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和5年4月4日(2023.4.4)

【国際公開番号】WO2020/205889
 【公表番号】特表2022-527199(P2022-527199A)
 【公表日】令和4年5月31日(2022.5.31)
 【年通号数】公開公報(特許)2022-096
 【出願番号】特願2021-558819(P2021-558819)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/35(2006.01)
 C 1 2 N 7/01(2006.01)
 C 0 7 K 14/015(2006.01)
 C 1 2 N 5/077(2010.01)
 C 1 2 N 5/10(2006.01)
 A 6 1 K 35/76(2015.01)
 A 6 1 P 9/00(2006.01)
 A 6 1 K 48/00(2006.01)
 A 6 1 P 43/00(2006.01)
 C 1 2 Q 1/02(2006.01)
 C 1 2 Q 1/6869(2018.01)
 C 1 2 N 15/864(2006.01)

20

【F I】

C 1 2 N 15/35
 C 1 2 N 7/01 Z N A
 C 0 7 K 14/015
 C 1 2 N 5/077
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 Q 1/6869 Z
 C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

30

【手続補正書】

【提出日】令和5年3月27日(2023.3.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

40

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオンであって：

a) 親AAV5カプシドと比較して、T 5 8 2 A、T 5 8 2 G、T 5 8 2 V、T 5 8 2 L
T 5 8 2 I、S 6 5 1 A、S 6 5 1 G、S 6 5 1 V、S 6 5 1 L、S 6 5 1 I、T 5 7
8 A、T 5 7 8 G、T 5 7 8 V、T 5 7 8 L、またはT 5 7 8 I、から選択される1つま
 たは複数の置換を含むAAV5カプシドタンパク質；および

50

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、r A A V ビリオン。

【請求項 2】

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、T 5 8 2 AもしくはT 5 8 2 V；S 6 5 1 AもしくはS 6 5 1 V；および/または T 5 7 8 AもしくはT 5 7 8 Vから選択される2つまたはそれより多くの置換を含む、請求項 1 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 3】

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、T 5 8 2 A および S 6 5 1 A 置換を含む、請求項 2 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 4】

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、T 5 7 8 A および T 5 8 2 A 置換を含む、請求項 2 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 5】

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、T 5 7 8 A および S 6 5 1 A 置換を含む、請求項 2 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 6】

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、S 6 5 1 A、T 5 7 8 A、および T 5 8 2 A 置換を含む、請求項 2 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 7】

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、配列番号 7 3 と少なくとも 9 5 % の同一性、少なくとも 9 8 % の同一性、または少なくとも 9 9 % の同一性を共有する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 8】

親 A A V 5 カプシドと比較して、T 5 8 2 A、T 5 8 2 G、T 5 8 2 V、T 5 8 2 L、T 5 8 2 I、S 6 5 1 A、S 6 5 1 G、S 6 5 1 V、S 6 5 1 L、S 6 5 1 I、T 5 7 8 A、T 5 7 8 G、T 5 7 8 V、T 5 7 8 L、または T 5 7 8 Iから選択される1つまたは複数の置換を含む A A V 5 カプシドタンパク質。

【請求項 9】

T 5 8 2 AもしくはT 5 8 2 V；S 6 5 1 AもしくはS 6 5 1 V；または T 5 7 8 AもしくはT 5 7 8 Vから選択される2つまたはそれより多くの置換を含む、請求項 8 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

【請求項 10】

T 5 8 2 A および S 6 5 1 A 置換を含む、請求項 9 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

【請求項 11】

T 5 7 8 A および T 5 8 2 A 置換を含む、請求項 9 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

【請求項 12】

T 5 7 8 A および S 6 5 1 A 置換を含む、請求項 9 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

【請求項 13】

S 6 5 1 A、T 5 7 8 A、および T 5 8 2 A 置換を含む、請求項 9 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

【請求項 14】

配列番号 7 3 と少なくとも 9 0 % の同一性を共有する、請求項 8 から 1 3 のいずれか一項に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

【請求項 15】

配列番号 7 3 と少なくとも 9 5 % の同一性、少なくとも 9 8 % の同一性、または少なくとも 9 9 % の同一性を共有する、請求項 8 から 1 3 のいずれか一項に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

請求項 8 から 15 のいずれか一項に記載の AAV5 カプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の rAAV ビリオンを含む医薬組成物。

【請求項 18】

心臓細胞を形質導入する in vitro の方法であって、前記心臓細胞に、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の rAAV ビリオンを接触させるステップを含み、前記 rAAV ビリオンが前記心臓細胞を形質導入する、方法。

【請求項 19】

1 つまたは複数の遺伝子産物を心臓細胞に送達する in vitro の方法であって、前記心臓細胞に、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の rAAV ビリオンを接触させるステップを含み、前記心臓細胞が前記遺伝子産物を発現する、方法。

10

【請求項 20】

前記 1 つまたは複数の遺伝子産物が、必要に応じて心トロポニン T；心サルコメアタンパク質； α -ミオシン重鎖；心室ミオシン必須軽鎖 1；心室ミオシン調節軽鎖 2；心 - アクチン； α -トロポミオシン；心トロポニン I；心ミオシン結合タンパク質 C；four-and-a-half LIM タンパク質 1；チチン；5' - AMP - 活性化タンパク質キナーゼサブユニットガンマ - 2；トロポニン I 3 型、ミオシン軽鎖 2、アクチンアルファ心筋 1；心 LIM タンパク質；カベオリン 3 (CAV3)；ガラクトシダーゼアルファ (GLA)；リソソーム関連膜タンパク質 2 (LAMP2)；ミトコンドリア転移 RNA グリシン (MTTG)；ミトコンドリア転移 RNA イソロイシン (MTTI)；ミトコンドリア転移 RNA リシン (MTTK)；ミトコンドリア転移 RNA グルタミン (MTTQ)；ミオシン軽鎖 3 (MYL3)；トロポニン C (TNNC1)；トランスサイレチン (TTR)；筋小胞体カルシウム - ATP アーゼ 2a (SERCA2a)；間質由来因子 - 1 (SDF-1)；アデニレートシクラーゼ - 6 (AC6)； β -ARKct (アドレナリン受容体キナーゼ C 末端)；線維芽細胞成長因子 (FGF)；血小板由来成長因子 (PDGF)；血管内皮成長因子 (VEGF)；肝細胞成長因子；低酸素誘導成長因子；チモシンベータ 4 (TMSB4X)；一酸化窒素シンターゼ - 3 (NOS3)；アポリポタンパク質 - E (ApoE)；およびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)；S100A1 から選択されるポリペプチドを含む、請求項 18 または請求項 19 に記載の in vitro の方法。

20

30

【請求項 21】

前記 1 つまたは複数の遺伝子産物が、必要に応じて ASCL1、MYOCD、MEF2C、TBX5、CCNB1、CCND1、CDK1、CDK4、AURKB、OCT4、BAF60C、ESRRG、GATA4、GATA6、HAND2、IRX4、ISLL、MESP1、MESP2、NKX2.5、SRF、TBX20、および ZFPM2 から選択される 1 つまたは複数のリプログラミング因子を含む、請求項 18 または請求項 19 に記載の in vitro の方法。

【請求項 22】

前記心臓細胞を心臓の心筋細胞へとリプログラムする、請求項 21 に記載の in vitro の方法。

40

【請求項 23】

それを必要とする対象における心病態を処置するための医薬の製造における、請求項 17 に記載の医薬組成物の使用であって、前記処置は、前記医薬組成物の治療有効量を前記対象に投与するステップを含み、前記 rAAV ビリオンが心組織を形質導入する、使用。

【請求項 24】

前記 rAAV ビリオンが心外膜注射によって投与されることを特徴とする、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

50

前記 r A A V ビリオンが、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心臓内注射、心臓内カテーテル挿入、直接心筋内注射、経血管投与、順行性冠動脈内注射、逆行性注射、経心内膜心筋注射、または再循環送達を伴う分子心臓手術 (M C A R D) によって投与されることを特徴とする、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 2 6】

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンであって：

a) 親配列の G H ループにおける挿入部位に前記親配列に対して 5 ~ 1 1 アミノ酸の挿入を含む A A V 5 カプシドタンパク質；および

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、r A A V ビリオン。

10

【請求項 2 7】

前記挿入部位が、配列番号 1 の 5 6 0 ~ 5 9 4 に対応する前記親配列における位置での任意の 2 つの、必要に応じて隣接するアミノ酸の間である、請求項 2 6 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 2 8】

前記挿入部位が、配列番号 1 の 5 7 4 および 5 7 5 に対応する前記親配列における隣接するアミノ酸の間である、請求項 2 7 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 2 9】

前記挿入が以下の式：

- X₀ - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ -

(式中、X₀ および X₈ が、各々独立して A、S、G であるか、または存在しない) (配列番号 1 1 0 2)

のペプチドである、請求項 2 6 から 2 8 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

20

【請求項 3 0】

前記挿入が以下の式：

- A - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - A -

(式中：

a) X₁ が、P、R、または G であり；

b) X₂ が、K、L、または R であり；

c) X₃ が、任意のアミノ酸であり；

d) X₄ が、N、H、K、または Q であり；

e) X₅ が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じて X₅ が、G、K、もしくは S であり；

f) X₆ が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じて X₆ が、T もしくは V であり；

g) X₇ が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じて X₇ が、K もしくは V である) (配列番号 1 1 0 3)

のペプチドである、請求項 2 9 に記載の r A A V ビリオン。

30

【請求項 3 1】

前記挿入が、配列番号 1 0 1 ~ 6 0 0 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 0 に記載の r A A V ビリオン。

40

【請求項 3 2】

前記挿入が、R K V H I E V (配列番号 8 1)、R K Y Q S D L (配列番号 8 2)、P L T N T V K (配列番号 8 3)、L K Y H G P P (配列番号 8 4)、R K Y Q G D M (配列番号 8 5)、R K F H S T D (配列番号 8 6)、R K H H G L E (配列番号 8 7)、P G T N V T K (配列番号 8 8)、R K M H M P D (配列番号 8 9)、P L K K I V Q (配列番号 9 0)、P L G K K T S (配列番号 9 1)、P R G V K V T (配列番号 9 2)、P L A K S K S (配列番号 9 3)、P R T K G A V (配列番号 9 4)、P S G R K A T (配列番号 9 5)、A R K V H I E V A (配列番号 1 0 1)、A R K Y Q S D L A (配列番号 1 0 2)、A P L T N T V K A (配列番号 1 0 3)、A L K Y H G P P A (配列番号 1 0

50

4)、ARKYQGDMA (配列番号105)、ARKFHSTDA (配列番号106)、ARKHHGLEA (配列番号107)、APGTNVTKA (配列番号108)、ARKMHMPDA (配列番号109)、APLKKIVQA (配列番号110)、APLGKKTSA (配列番号111)、APRGVKVTA (配列番号112)、APLAKSKSA (配列番号113)、APRTKGAVA (配列番号114)、およびAPSGRKATA (配列番号115)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項30に記載のrAAVビリオン。

【請求項33】

前記挿入が、アミノ酸配列PLTNTVK (配列番号83)、またはPLTNTVK (配列番号83)と比較して多くて1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含む配列を含む、あるいは

10

前記挿入が、アミノ酸配列PLKKIVQ (配列番号90)、またはPLKKIVQ (配列番号90)と比較して多くて1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含む配列を含む、請求項30に記載のrAAVビリオン。

【請求項34】

前記カプシドタンパク質が親AAV5カプシドと比較してS651A、T578A、またはT582Aから選択される1つ、2つまたはそれより多くの置換を含む、請求項26から33のいずれか一項に記載のrAAVビリオン。

【請求項35】

前記AAV5カプシドタンパク質が、T582AおよびS651A置換、またはS651A、T578A、およびT582A置換を含む、請求項35に記載のrAAVビリオン。

20

【請求項36】

前記AAV5カプシドタンパク質が、T578AおよびT582A置換を含む、または前記AAV5カプシドタンパク質が、T578AおよびS651A置換を含む、請求項35に記載のrAAVビリオン。

【請求項37】

前記親配列を含むAAVビリオンと比較して心臓細胞において形質導入効率の増加を示す、ならびに/あるいは

前記親配列を含むAAVビリオンと比較してヒト心臓線維芽細胞(hCF)細胞において形質導入効率の増加を示す、請求項26から36のいずれか一項に記載のrAAVビリオン。

30

【請求項38】

親配列のGHループにおける挿入部位に前記親配列に対して5~11アミノ酸の挿入を含む、AAV5カプシドタンパク質。

【請求項39】

前記挿入部位が、配列番号1の574および575に対応する前記親配列における隣接するアミノ酸の間である、そして

前記挿入が以下の式：

-X₀-(X)_n-X₁₀-

(式中、nが5~9であり、

X₀およびX₁₀が、各々独立してA、S、Gであるか、または存在しない)(配列番号1101)

40

のペプチドである、あるいは

前記挿入が以下の式：

-X₀-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-

(式中、X₀およびX₈が、各々独立してA、S、Gであるか、または存在しない)(配列番号1102)

のペプチドである、請求項38に記載のAAV5カプシドタンパク質。

【請求項40】

50

前記挿入が以下の式：

- A - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - A -

(式中：

a) X₁が、P、R、またはGであり；

b) X₂が、K、L、またはRであり；

c) X₃が、任意のアミノ酸であり；

d) X₄が、N、H、K、またはQであり；

e) X₅が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じてX₅が、G、K、もしくはSであり；

f) X₆が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じてX₆が、TもしくはVであり；

g) X₇が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じてX₇が、KもしくはVである)
(配列番号1103)

のペプチドである、請求項38または請求項39に記載のAAV5カプシドタンパク質。

【請求項41】

前記挿入が、配列番号101～600から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項40に記載のAAV5カプシドタンパク質。

【請求項42】

前記挿入が、RKVHIEV (配列番号81)、RKYQSDL (配列番号82)、PLTNTVK (配列番号83)、LKYHGPP (配列番号84)、RKYQGDM (配列番号85)、RKFHSTD (配列番号86)、RKHGLE (配列番号87)、PGTNVTK (配列番号88)、RKMHPD (配列番号89)、PLKKIVQ (配列番号90)、PLGKKTSA (配列番号91)、PRGVKVT (配列番号92)、PLAKSKS (配列番号93)、PRTKGAV (配列番号94)、PSGRKAT (配列番号95)、ARKVHIEVA (配列番号101)、ARKYQSDLA (配列番号102)、APLNTNTVKA (配列番号103)、ALKYHGPPA (配列番号104)、ARKYQGDMA (配列番号105)、ARKFHSTDA (配列番号106)、ARKHGLEA (配列番号107)、APGNTNTVKA (配列番号108)、ARKMHPDA (配列番号109)、APLKKIVQA (配列番号110)、APL
GKKTSA (配列番号111)、APRGVKVTA (配列番号112)、APLAKSKSA (配列番号113)、APRRTKGAVA (配列番号114) および APSGRKATA (配列番号115) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項40
に記載のAAV5カプシドタンパク質。

【請求項43】

前記挿入が、アミノ酸配列PLTNTVK (配列番号83)、またはPLTNTVK (配列番号83)と比較して多くて1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含む配列を含む、あるいは

前記挿入が、アミノ酸配列PLKKIVQ (配列番号90)、またはPLKKIVQ (配列番号90)と比較して多くて1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含む配列を含む、請求項40に記載のAAV5カプシドタンパク質。

【請求項44】

親AAV5カプシドと比較してS651A、T578A、またはT582Aから選択される1つ、2つまたはそれより多くの置換を含む、請求項38から43のいずれか一項に記載のAAV5カプシドタンパク質。

【請求項45】

請求項38から44のいずれか一項に記載のAAV5カプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項46】

請求項26から37のいずれか一項に記載のrAAVビリオンを含む医薬組成物。

【請求項47】

心臓細胞を形質導入する in vitro の方法であって、前記心臓細胞に、請求項 26 から 37 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオンを接触させるステップを含み、前記 r A A V ビリオンが前記心臓細胞を形質導入する、in vitro の方法。

【請求項 48】

心臓細胞に 1 つまたは複数の遺伝子産物を送達する in vitro の方法であって、前記心臓細胞に、請求項 26 から 37 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオンを接触させるステップを含み、前記心臓細胞が前記遺伝子産物を発現する、in vitro の方法。

【請求項 49】

それを必要とする対象における心病態を処置するための医薬の製造における請求項 46 に記載の医薬組成物の使用であって、前記処置が、前記医薬組成物の治療有効量を前記対象に投与するステップを含み、前記 r A A V ビリオンが心組織を形質導入する、使用。

10

【請求項 50】

標的細胞において形質導入効率の増加を r A A V ビリオンに付与する A A V カプシドタンパク質を同定する方法であって：

a) r A A V ビリオンの集団を提供するステップであって、その r A A V ゲノムが、バリアント A A V カプシドタンパク質をコードする c a p ポリヌクレオチドのライブラリーを含む、ステップ；

b) 前記 r A A V ビリオンによる標的細胞への前記 c a p ポリヌクレオチドの形質導入を可能にするために十分な期間、前記集団に前記標的細胞を接触させるステップ；および

20

c) 前記標的細胞から前記 c a p ポリヌクレオチドをシーケンシングし、それによって前記標的細胞において形質導入効率の増加をもたらす A A V カプシドタンパク質を同定するステップ

を含み、

必要に応じて、ステップ (b) の前に、r A A V ビリオンの前記集団に、非標的細胞への前記 r A A V ビリオンの結合を可能にするために十分な期間、前記非標的細胞を接触させることによって、前記集団を枯渇させるステップをさらに含む、方法。

【請求項 51】

それを必要とする対象における心病態を処置するための請求項 17 に記載の医薬組成物であって、前記 r A A V ビリオンが心組織を形質導入する、医薬組成物。

30

【請求項 52】

それを必要とする対象における心病態を処置するための請求項 46 に記載の医薬組成物であって、前記 r A A V ビリオンが心組織を形質導入する、医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0388

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0388】

ブタでの試験

40

A A V x 1 ベクターをブタ心筋梗塞 (M I) モデルにおいてさらに試験した。M y A を A A V x 1 カプシドにパッケージングして、90 分間バルーン閉塞して虚血性傷害を導入後の 28 日にブタ心臓の境界領域に心外膜注射した。これと並行して梗塞を有するブタに、製剤緩衝液も注射し、各々の群は 10 匹の動物からなった。心エコー検査を、注射後 3 週、5 週、7 週および 9 週に実施した。A A V x 1 ベクターを投与したブタは、対照の注射後 5 週、7 週および 9 週と比較して駆出率の有意な改善を実証した (図 13)。このように A A V x 1 ベクターによる処置は、投与前のベースラインを超える心成績の平均で 10 % 改善をもたらした。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

50

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンであって：

a) 親 A A V 5 カプシドと比較して、S 6 5 1 A、S 6 5 1 G、S 6 5 1 V、S 6 5 1 L、S 6 5 1 I、T 5 7 8 A、T 5 7 8 G、T 5 7 8 V、T 5 7 8 L、T 5 7 8 I、T 5 8 2 A、T 5 8 2 G、T 5 8 2 V、T 5 8 2 L、または T 5 8 2 I から選択される 1 つまたは複数の置換を含む A A V 5 カプシドタンパク質；および

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、r A A V ビリオン。

(項目 2)

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、S 6 5 1 A または S 6 5 1 V；T 5 7 8 A または T 5 7 8 V；および / または T 5 8 2 A もしくは T 5 8 2 V から選択される 2 つまたはそれより多くの置換を含む、項目 2 に記載の r A A V ビリオン。

10

(項目 3)

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、T 5 8 2 A および S 6 5 1 A 置換を含む、項目 2 に記載の r A A V ビリオン。

(項目 4)

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、T 5 7 8 A および T 5 8 2 A 置換を含む、項目 3 に記載の r A A V ビリオン。

(項目 5)

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、T 5 7 8 A および S 6 5 1 A 置換を含む、項目 3 に記載の r A A V ビリオン。

20

(項目 6)

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、S 6 5 1 A、T 5 7 8 A、および T 5 8 2 A 置換を含む、項目 3 に記載の r A A V ビリオン。

(項目 7)

前記 A A V 5 カプシドタンパク質が、配列番号 7 3 と少なくとも 9 5 % の同一性、少なくとも 9 8 % の同一性、または少なくとも 9 9 % の同一性を共有する、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の r A A V ビリオン。

(項目 8)

親 A A V 5 カプシドと比較して、S 6 5 1 A、S 6 5 1 G、S 6 5 1 V、S 6 5 1 L、S 6 5 1 I、T 5 7 8 A、T 5 7 8 G、T 5 7 8 V、T 5 7 8 L、T 5 7 8 I、T 5 8 2 A、T 5 8 2 G、T 5 8 2 V、T 5 8 2 L、または T 5 8 2 I から選択される 1 つまたは複数の置換を含む A A V 5 カプシドタンパク質。

30

(項目 9)

S 6 5 1 A または S 6 5 1 V；T 5 7 8 A または T 5 7 8 V；または T 5 8 2 A もしくは T 5 8 2 V から選択される 2 つまたはそれより多くの置換を含む、項目 8 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

(項目 1 0)

T 5 8 2 A および S 6 5 1 A 置換を含む、項目 9 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

(項目 1 1)

T 5 7 8 A および T 5 8 2 A 置換を含む、項目 9 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

40

(項目 1 2)

T 5 7 8 A および S 6 5 1 A 置換を含む、項目 9 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

(項目 1 3)

S 6 5 1 A、T 5 7 8 A、および T 5 8 2 A 置換を含む、項目 9 に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

(項目 1 4)

配列番号 7 3 と少なくとも 9 0 % の同一性を共有する、項目 8 から 1 3 のいずれか一項に記載の A A V 5 カプシドタンパク質。

(項目 1 5)

配列番号 7 3 と少なくとも 9 5 % の同一性、少なくとも 9 8 % の同一性、または少なく

50

とも99%の同一性を共有する、項目8から13のいずれか一項に記載のAAV5カプシドタンパク質。

(項目16)

項目8から15のいずれか一項に記載のAAV5カプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(項目17)

項目1から7のいずれか一項に記載のrAAVビリオンを含む医薬組成物。

(項目18)

心臓細胞を形質導入する方法であって、前記心臓細胞に、項目1から7のいずれか一項に記載のrAAVビリオンを接触させるステップを含み、前記rAAVビリオンが前記心臓細胞を形質導入する、方法。

(項目19)

1つまたは複数の遺伝子産物を心臓細胞に送達する方法であって、前記心臓細胞に、項目1から7のいずれか一項に記載のrAAVビリオンを接触させるステップを含み、前記心臓細胞が前記遺伝子産物を発現する、方法。

(項目20)

前記1つまたは複数の遺伝子産物が、必要に応じて心トロポニンT；心サルコメアタンパク質； α -ミオシン重鎖；心室ミオシン必須軽鎖1；心室ミオシン調節軽鎖2；心アクトニン； α -トロポミオシン；心トロポニンI；心ミオシン結合タンパク質C；four-and-a-half LIMタンパク質1；チチン；5'-AMP-活性化タンパク質キナーゼサブユニットガンマ-2；トロポニンI 3型、ミオシン軽鎖2、アクチンアルファ心筋1；心LIMタンパク質；カベオリン3(CAV3)；ガラクトシダーゼアルファ(GLA)；リソソーム関連膜タンパク質2(LAMP2)；ミトコンドリア転移RNAグリシン(MTTG)；ミトコンドリア転移RNAイソロイシン(MTTI)；ミトコンドリア転移RNAリシン(MTTK)；ミトコンドリア転移RNAグルタミン(MTTQ)；ミオシン軽鎖3(MYL3)；トロポニンC(TNNC1)；トランスサイレチン(TTR)；筋小胞体カルシウム-ATPアーゼ2a(SERCA2a)；間質由来因子-1(SDF-1)；アデニレートシクラーゼ-6(AC6)； α -ARKct(アドレナリン受容体キナーゼC末端)；線維芽細胞成長因子(FGF)；血小板由来成長因子(PDGF)；血管内皮成長因子(VEGF)；肝細胞成長因子；低酸素誘導成長因子；チモシンベータ4(TMSB4X)；一酸化窒素シンターゼ-3(NOS3)；アポリポタンパク質-E(ApoE)；およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)；S100A1から選択されるポリペプチドを含む、項目18または項目19に記載の方法。

(項目21)

前記1つまたは複数の遺伝子産物が、必要に応じてASCL1、MYOCD、MEF2C、TBX5、CCNB1、CCND1、CDK1、CDK4、AURKB、OCT4、BAF60C、ESRRG、GATA4、GATA6、HAND2、IRX4、ISLL、MESP1、MESP2、NKX2.5、SRF、TBX20、およびZFPM2から選択される1つまたは複数のリプログラミング因子を含む、項目18または項目19に記載の方法。

(項目22)

前記心臓細胞を心臓の心筋細胞へとリプログラムする、項目21に記載の方法。

(項目23)

それを必要とする対象における心病態を処置する方法であって、項目17に記載の医薬組成物の治療有効量を前記対象に投与するステップを含み、前記rAAVビリオンが心組織を形質導入する、方法。

(項目24)

前記rAAVビリオンが心外膜注射によって投与される、項目23に記載の方法。

(項目25)

前記rAAVビリオンが、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心臓内注射、心臓内

10

20

30

40

50

カテーテル挿入、直接心筋内注射、経血管投与、順行性冠動脈内注射、逆行性注射、経心内膜心筋注射、または再循環送達を伴う分子心臓手術（MCA RD）によって投与される、項目23に記載の方法。

（項目26）

組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ビリオンであって：

a) 親配列のGHループにおける挿入部位に前記親配列に対して5～11アミノ酸の挿入を含むAAV5カプシドタンパク質；および

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、rAAVビリオン。

（項目27）

前記挿入部位が、配列番号1の560～594に対応する前記親配列における位置での任意の2つの、必要に応じて隣接するアミノ酸の間である、項目26に記載のrAAVビリオン。

（項目28）

前記挿入部位が、配列番号1の574および575に対応する前記親配列における隣接するアミノ酸の間である、項目27に記載のrAAVビリオン。

（項目29）

前記挿入が以下の式：

- X₀ - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ -

（式中、X₀およびX₈が、各々独立してA、S、Gであるか、または存在しない）（配列番号1102）

のペプチドである、項目26から28のいずれか一項に記載のrAAVビリオン。

（項目30）

前記挿入が以下の式：

- A - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - A -

（式中：

a) X₁が、P、R、またはGであり；

b) X₂が、K、L、またはRであり；

c) X₃が、任意のアミノ酸であり；

d) X₄が、N、H、K、またはQであり；

e) X₅が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じてX₅が、G、K、もしくはSであり；

f) X₆が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じてX₆が、TもしくはVであり；

g) X₇が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じてX₇が、KもしくはVである）（配列番号1103）

のペプチドである、項目29に記載のrAAVビリオン。

（項目31）

前記挿入が、配列番号101～600から選択されるアミノ酸配列を含む、項目30に記載のrAAVビリオン。

（項目32）

前記挿入が、RKVHIEV（配列番号81）、RKYQSDL（配列番号82）、PLTNTVK（配列番号83）、LKYHGPP（配列番号84）、RKYQGDM（配列番号85）、RKFHSTD（配列番号86）、RKHGLE（配列番号87）、PGTNVTK（配列番号88）、RKMHPD（配列番号89）、PLKKIVQ（配列番号90）、PLGKKTTS（配列番号91）、PRGVKVT（配列番号92）、PLAKSKS（配列番号93）、PRTKGAV（配列番号94）、およびPSGRKAT（配列番号95）から選択されるアミノ酸配列を含む、項目30に記載のrAAVビリオン。

（項目33）

10

20

30

40

50

前記挿入が、ARKVHIEVA（配列番号101）、ARKYQSDLA（配列番号102）、APLTNTVKA（配列番号103）、ALKYHGPPA（配列番号104）、ARKYQGDMA（配列番号105）、ARKFHSTDA（配列番号106）、ARKHHGLEA（配列番号107）、APGTNVTKA（配列番号108）、ARKMHMPDA（配列番号109）、APLKKIVQA（配列番号110）、APLGKKTSA（配列番号111）、APRGVKVTA（配列番号112）、APLAKSKSA（配列番号113）、APRTKGAVA（配列番号114）、APSGRKAATA（配列番号115）から選択されるアミノ酸配列を含む、項目30に記載のrAAVビリオン。

（項目34）

前記挿入が、アミノ酸配列PLTNTVK（配列番号83）、またはPLTNTVK（配列番号83）と比較して多くて1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含む配列を含む、項目30に記載のrAAVビリオン。

（項目35）

前記挿入が、アミノ酸配列PLKKIVQ（配列番号90）、またはPLKKIVQ（配列番号90）と比較して多くて1、2、3、もしくは4個のアミノ酸置換を含む配列を含む、項目30に記載のrAAVビリオン。

（項目36）

前記カプシドタンパク質が親AAV5カプシドと比較してS651A、T578A、またはT582Aから選択される1つまたは複数の置換を含む、項目26から35のいずれか一項に記載のrAAVビリオン。

（項目37）

前記AAV5カプシドタンパク質が、S651A、T578A、またはT582Aから選択される2つまたはそれより多くの置換を含む、項目36に記載のrAAVビリオン。

（項目38）

前記AAV5カプシドタンパク質が、T582AおよびS651A置換を含む、項目36に記載のrAAVビリオン。

（項目39）

前記AAV5カプシドタンパク質が、T578AおよびT582A置換を含む、項目36に記載のrAAVビリオン。

（項目40）

前記AAV5カプシドタンパク質が、T578AおよびS651A置換を含む、項目36に記載のrAAVビリオン。

（項目41）

前記AAV5カプシドタンパク質が、S651A、T578A、およびT582A置換を含む、項目36に記載のrAAVビリオン。

（項目42）

前記親配列を含むAAVビリオンと比較して心臓細胞において形質導入効率の増加を示す、項目26から41のいずれか一項に記載のrAAVビリオン。

（項目43）

前記親配列を含むAAVビリオンと比較してヒト心臓線維芽細胞（hCF）において形質導入効率の増加を示す、項目26から42に記載のrAAVビリオン。

（項目44）

親配列のGHループにおける挿入部位に前記親配列に対して5～11アミノ酸の挿入を含む、AAV5カプシドタンパク質。

（項目45）

前記挿入部位が、配列番号1の574および575に対応する前記親配列における隣接するアミノ酸の間である、項目44に記載のAAV5カプシドタンパク質。

（項目46）

前記挿入が以下の式：

10

20

30

40

50

- X₀ - (X)_n - X₁₀ -

(式中、n が 5 ~ 9 であり、

X₀ および X₁₀ が、各々独立して A、S、G であるか、または存在しない) (配列番号 1101)

のペプチドである、項目 44 または項目 45 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 47)

前記挿入が以下の式：

- X₀ - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ -

(式中、X₀ および X₈ が、各々独立して A、S、G であるか、または存在しない) (配列番号 1102)

のペプチドである、項目 44 または項目 45 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 48)

前記挿入が以下の式：

- A - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - A -

(式中：

a) X₁ が、P、R、または G であり；

b) X₂ が、K、L、または R であり；

c) X₃ が、任意のアミノ酸であり；

d) X₄ が、N、H、K、または Q であり；

e) X₅ が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じて X₅ が、G、K、もしくは S であり；

f) X₆ が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じて X₆ が、T もしくは V であり；

g) X₇ が、任意のアミノ酸であるか、または必要に応じて X₇ が、K もしくは V である) (配列番号 1103)

のペプチドである、項目 47 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 49)

前記挿入が、配列番号 101 ~ 600 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 48 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 50)

前記挿入が、RKVHIEV (配列番号 81)、RKYQSDL (配列番号 82)、PLTNTVK (配列番号 83)、LK YHGPP (配列番号 84)、RKYQGDM (配列番号 85)、RKFHSTD (配列番号 86)、RKHGLE (配列番号 87)、PGTNVTK (配列番号 88)、RKMHPD (配列番号 89)、PLKKIVQ (配列番号 90)、PLGKKT S (配列番号 91)、PRGVKVT (配列番号 92)、PLAKSKS (配列番号 93)、PRTKGAV (配列番号 94)、および PSGRKAT (配列番号 95) から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 48 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 51)

前記挿入が、ARKVHIEVA (配列番号 101)、ARKYQSDLA (配列番号 102)、APL T N T V K A (配列番号 103)、A L K Y H G P P A (配列番号 104)、A R K Y Q G D M A (配列番号 105)、A R K F H S T D A (配列番号 106)、A R K H H G L E A (配列番号 107)、A P G T N V T K A (配列番号 108)、A R K M H M P D A (配列番号 109)、A P L K K I V Q A (配列番号 110)、A P L G K K T S A (配列番号 111)、A P R G V K V T A (配列番号 112)、A P L A K S K S A (配列番号 113)、A P R T K G A V A (配列番号 114)、A P S G R K A T A (配列番号 115) から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 48 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 52)

前記挿入が、アミノ酸配列 PLTNTVK (配列番号 83)、または PLTNTVK (

10

20

30

40

50

配列番号 83) と比較して多くて 1、2、3、もしくは 4 個のアミノ酸置換を含む配列を含む、項目 48 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 53)

前記挿入が、アミノ酸配列 PLKKIVQ (配列番号 90)、または PLKKIVQ (配列番号 90) と比較して多くて 1、2、3、もしくは 4 個のアミノ酸置換を含む配列を含む、項目 48 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 54)

親 AAV5 カプシドと比較して S651A、T578A、または T582A から選択される 1 つまたは複数の置換を含む、項目 44 から 53 のいずれか一項に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 55)

S651A、T578A、または T582A から選択される 2 つまたはそれより多くの置換を含む、項目 54 に記載の AAV5 カプシドタンパク質。

(項目 56)

項目 44 から 55 のいずれか一項に記載の AAV5 カプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(項目 57)

項目 26 から 43 のいずれか一項に記載の rAAV ビリオンを含む医薬組成物。

(項目 58)

心臓細胞を形質導入する方法であって、前記心臓細胞に、項目 26 から 43 のいずれか一項に記載の rAAV ビリオンを接触させるステップを含み、前記 rAAV ビリオンが前記心臓細胞を形質導入する、方法。

(項目 59)

心臓細胞に 1 つまたは複数の遺伝子産物を送達する方法であって、前記心臓細胞に、項目 26 から 43 のいずれか一項に記載の rAAV ビリオンを接触させるステップを含み、前記心臓細胞が前記遺伝子産物を発現する、方法。

(項目 60)

前記 1 つまたは複数の遺伝子産物が、必要に応じて心トロポニン T ; 心サルコメアタンパク質 ; - ミオシン重鎖 ; 心室ミオシン必須軽鎖 1 ; 心室ミオシン調節軽鎖 2 ; 心 - アクチン ; a - トロポミオシン ; 心トロポニン I ; 心ミオシン結合タンパク質 C ; f o u r - a n d - a - h a l f L I M タンパク質 1 ; チチン ; 5 ' - A M P - 活性化タンパク質キナーゼサブユニットガンマ - 2 ; トロポニン I 3 型、ミオシン軽鎖 2、アクチンアルファ心筋 1 ; 心 L I M タンパク質 ; カベオリン 3 (C A V 3) ; ガラクトシダーゼアルファ (G L A) ; リソソーム関連膜タンパク質 2 (L A M P 2) ; ミトコンドリア転移 R N A グリシン (M T T G) ; ミトコンドリア転移 R N A イソロイシン (M T T I) ; ミトコンドリア転移 R N A リシン (M T T K) ; ミトコンドリア転移 R N A グルタミン (M T T Q) ; ミオシン軽鎖 3 (M Y L 3) ; トロポニン C (T N N C 1) ; トランスサイレチン (T T R) ; 筋小胞体カルシウム - A T P アーゼ 2 a (S E R C A 2 a) ; 間質由来因子 - 1 (S D F - 1) ; アデニレートシクラーゼ - 6 (A C 6) ; - A R K c t (アドレナリン受容体キナーゼ C 末端) ; 線維芽細胞成長因子 (F G F) ; 血小板由来成長因子 (P D G F) ; 血管内皮成長因子 (V E G F) ; 肝細胞成長因子 ; 低酸素誘導成長因子 ; チモシンベータ 4 (T M S B 4 X) ; 一酸化窒素シンターゼ - 3 (N O S 3) ; アポリポタンパク質 - E (A p o E) ; およびスーパーオキシドジスムターゼ (S O D) ; S 1 0 0 A 1 から選択されるポリペプチドを含む、項目 58 または項目 59 に記載の方法。

(項目 61)

前記 1 つまたは複数の遺伝子産物が、必要に応じて A S C L 1、M Y O C D、M E F 2 C、T B X 5、C C N B 1、C C N D 1、C D K 1、C D K 4、A U R K B、O C T 4、B A F 6 0 C、E S R R G、G A T A 4、G A T A 6、H A N D 2、I R X 4、I S L L、M E S P 1、M E S P 2、N K X 2 . 5、S R F、T B X 2 0、および Z F P M 2 から選択される 1 つまたは複数のリプログラミング因子を含む、項目 58 または項目 59 に記

10

20

30

40

50

載の方法。

(項目62)

前記心臓細胞を心臓の心筋細胞へとリプログラムする、項目61に記載の方法。

(項目63)

それを必要とする対象における心病態を処置する方法であって、項目57に記載の医薬組成物の治療有効量を前記対象に投与するステップを含み、前記rAAVピリオンが心組織を形質導入する、方法。

(項目64)

前記rAAVピリオンが心外膜注射によって投与される、項目63に記載の方法。

(項目65)

前記rAAVピリオンが、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心臓内注射、心臓内カテーテル挿入、直接心筋内注射、経血管投与、順行性冠動脈内注射、逆行性注射、経心内膜心筋注射、または再循環送達を伴う分子心臓手術(MCARD)によって投与される、項目63に記載の方法。

(項目66)

標的細胞において形質導入効率の増加をrAAVピリオンに付与するAAVカプシドタンパク質を同定する方法であって：

a) rAAVピリオンの集団を提供するステップであって、そのrAAVゲノムが、バリエーションAAVカプシドタンパク質をコードするcapポリヌクレオチドのライブラリーを含む、ステップ；

b) 前記rAAVピリオンによる標的細胞への前記capポリヌクレオチドの形質導入を可能にするために十分な期間、前記集団に前記標的細胞を接触させるステップ；および

c) 前記標的細胞から前記capポリヌクレオチドをシーケンシングし、それによって前記標的細胞において形質導入効率の増加をもたらすAAVカプシドタンパク質を同定するステップ

を含む、方法。

(項目67)

ステップ(b)の前に、rAAVピリオンの前記集団に、非標的細胞への前記rAAVピリオンの結合を可能にするために十分な期間、前記非標的細胞を接触させることによって、前記集団を枯渇させるステップをさらに含む、項目66に記載の方法。

(項目68)

前記バリエーションAAVカプシドタンパク質が、AAV5カプシドタンパク質である、項目66または項目67に記載の方法。

(項目69)

前記バリエーションカプシドタンパク質が各々個々に、親配列のGHループにおける挿入部位に前記親配列に対して5~11アミノ酸の挿入を含む、項目66から68のいずれか一項に記載の方法。

(項目70)

前記挿入部位が、配列番号1の560~594に対応する前記親配列における位置での任意の2つの、必要に応じて隣接するアミノ酸の間である、項目69に記載の方法。

(項目71)

前記挿入部位が配列番号1の574および575に対応する前記親配列における隣接するアミノ酸の間である、項目69に記載の方法。

(項目72)

前記挿入が以下の式：

- X₀ - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ -

(式中、X₀およびX₈が各々独立して、A、S、Gであるか、または存在しない)(配列番号1102)

のペプチドである、項目69から71のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50