(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7659271号
(P7659271)

(45)発行日　令和7年4月9日(2025.4.9)

(24)登録日　令和7年4月1日(2025.4.1)

(51)国際特許分類		FI		
C07K	*14/015 (2006.01)*	C07K	14/015	
C12N	*7/01 (2006.01)*	C12N	7/01	
C12N	*15/864 (2006.01)*	C12N	15/864	１００Ｚ
C40B	*40/10 (2006.01)*	C40B	40/10	
A61P	*7/04 (2006.01)*	A61P	7/04	

請求項の数　23　（全61頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-557657(P2021-557657)
(86)(22)出願日　令和2年3月30日(2020.3.30)
(65)公表番号　特表2022-527917(P2022-527917A)
(43)公表日　令和4年6月7日(2022.6.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/025720
(87)国際公開番号　WO2020/198737
(87)国際公開日　令和2年10月1日(2020.10.1)
審査請求日　令和5年3月29日(2023.3.29)
(31)優先権主張番号　62/825,703
(32)優先日　平成31年3月28日(2019.3.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　592017633
ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイション
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フルーツ ストリート ５５
(73)特許権者　507044516
プレジデント アンド フェローズ オブ ハーバード カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８， ケンブリッジ， クインシー ストリート １７
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　導入遺伝子発現のための操作されたアデノ随伴（ＡＡＶ）ベクター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

カプシド表面に露出されたカプシドの領域に挿入された、配列ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）に由来する少なくとも５つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む、ＡＡＶカプシドタンパク質。

【請求項２】

配列ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）に由来する少なくとも６つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

【請求項３】

前記ＡＡＶは、ＡＡＶ９である、請求項１または２に記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

【請求項４】

ＡＡＶ９　ＶＰ１を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

【請求項５】

前記配列は、配列番号６のアミノ酸５８８および５８９に対応する位置に挿入されている、請求項４に記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

【請求項６】

請求項１～５のいずれか一項に記載のＡＡＶカプシドタンパク質をコードする核酸。

【請求項７】

請求項１～５のいずれか一項に記載のカプシドタンパク質を含む、ＡＡＶ。

【請求項８】
前記ＡＡＶが、野生型ＶＰ１、ＶＰ２、またはＶＰ３カプシドタンパク質を含まない、請求項７に記載のＡＡＶ。
【請求項９】
導入遺伝子をさらに含む、請求項７または８に記載のＡＡＶ。
【請求項１０】
前記導入遺伝子が、治療用導入遺伝子である、請求項９に記載のＡＡＶ。
【請求項１１】
導入遺伝子を細胞に送達するための方法において使用するための、請求項７～１０のいずれか一項に記載のＡＡＶを含む組成物。
【請求項１２】
前記細胞は、ニューロン、アストロサイト、心筋細胞、筋細胞、アストロサイト、グリア細胞、内有毛細胞、外有毛細胞、支持細胞、内耳の線維細胞、光受容体、介在ニューロン、網膜神経節細胞、または網膜色素上皮細胞である、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記ニューロンは、後根神経節ニューロンまたはらせん神経節ニューロンである、請求項１２に記載の組成物。
【請求項１４】
前記細胞は、生きている対象に存在する、請求項１２または１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記対象は、哺乳動物対象である、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
前記細胞は、脳、脊髄、後根神経節、心臓、内耳、眼、または筋肉、およびそれらの組合せから選択される組織に存在する、請求項１４または１５に記載の組成物。
【請求項１７】
前記対象は、アルツハイマー病、パーキンソン病、Ｘ連鎖副腎白質ジストロフィー、カナバン病、ニーマンピック病、脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、コネキシン－２６、アッシャー３Ａ型、アッシャー２Ｄ型、有毛細胞関連聴力喪失、有毛細胞関連聴力喪失（ＤＦＮＢ７／１１）、内有毛細胞関連聴力喪失（ＤＦＮＢ９）、アッシャー１Ｆ型、アッシャー１Ｂ型、網膜色素変性症（ＲＰ；非症候性）、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経症、アッシャー症候群（ＲＰ；難聴を伴う症候群）、デュシェンヌ筋ジストロフィー、同種移植血管症、または血友病ＡもしくはＢを有する、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
前記細胞は、前記対象の脳に存在し、前記ＡＡＶは、非経口送達、脳内、または髄腔内送達により投与される、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９】
前記髄腔内送達は、腰椎注射、大槽注射、または実質内注射による、請求項１８に記載の組成物。
【請求項２０】
前記ＡＡＶは、非経口送達により送達される、請求項１４～１９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１】
前記ＡＡＶは、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内送達により送達される、請求項１４～２０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２】
前記細胞は、前記対象の眼に存在し、前記ＡＡＶは、網膜下または硝子体内注射により投与される、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３】
前記細胞は、前記対象の内耳に存在し、前記ＡＡＶは、正円窓膜の上からもしくはそれを通して、正円窓に隣接する外科的蝸牛切開術による穿孔を通して、骨性卵円窓の窓を通

して、または半規管を通して適用することにより、蝸牛に投与される、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

優先権の主張

本出願は、２０１９年３月２８日に出願された米国特許仮出願第６２／８２５，７０３号の利益を主張するものである。上記文献の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

連邦政府が支援する研究または開発

本発明は、国立衛生研究所の助成金ＡＧ０４７３３６号およびＤＣ０１７１１７号に基づく政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明にある特定の権利を有する。

【０００３】

本明細書には、例えば、ＣＮＳ、ＰＮＳ、内耳、心臓、または網膜における導入遺伝子発現のための操作されたＡＡＶベクター、およびそれらの使用方法が記載されている。所望の細胞タイプにて導入遺伝子発現を媒介する新しい操作されたＡＡＶベクターを発見するための方法も提供される。

【背景技術】

【０００４】

ＡＡＶ９ベクターは、全身性送達後のＣＮＳへの送達に顕著な可能性を示し、脊髄性筋萎縮症[1]を有する小児患者で臨床的成功を収めているが、高用量のＡＡＶベクターの全身性注射は、形質導入細胞を排除してしまう可能性があるＴ細胞応答の誘導に結び付く場合がある[2]。サルでは、高全身性用量のＡＡＶ９様ベクターが、毒性および全身性炎症に起因する動物死亡をもたらしたという報告が１件存在する[3]。筋ジストロフィーの治療に高用量のＡＡＶ９を使用した最近の第Ｉ相臨床試験は、１人の患者でベクター注入後に免疫反応が見られたため、ＦＤＡにより保留された。高用量を必要とする理由は、相当数の標的細胞に十分な導入遺伝子発現を提供するためには、１ベクター当たりのゲノムコピー数を基準とした場合のＡＡＶの効率が比較的低いためである。したがって、より低用量でより効率的な形質導入を可能にする新しいＡＡＶカプシドを開発することは、免疫毒性などの安全性の問題を低下させつつ、より良好な治療有効性をもたらすはずである。

【発明の概要】

【０００５】

本明細書には、２部分発現カセットを有するアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターゲノムを使用して、新規ウイルスクローンを同定する方法が記載されている。第１のものは、目的のプロモーター下にあるＣｒｅ－リコンビナーゼカセットである。第２の部分は、ウイルスゲノムの最初の部分に対して「シス位」にクローニングされた、操作されたカプシド遺伝子の発現を駆動するためのＡＡＶプロモーターである。レポーター遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）を発現するが、上流にｌｏｘＰ／終止部位を有するため、ＡＡＶベクターにより送達されるＣｒｅが終止部位を除去するまでレポーターの発現が防止される細胞を使用して、ウイルスベクターを、導入遺伝子発現（高感度Ｃｒｅ発現）について選択する。レポーター遺伝子陽性細胞を単離することができ、回収されたＡＡＶカプシド配列は、効率的な導入遺伝子発現を媒介するより高い可能性を有することになる。また、本明細書には、中枢神経系（ＣＮＳ）、および末梢神経系（ＰＮＳ）、心臓、肝臓、および内耳において効率的な発現を駆動する操作されたウイルス配列が記載されている。

【０００６】

したがって、本明細書には、配列ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）またはＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２）に由来する少なくとも４つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含むＡＡＶカプシドタンパク質が提供される。一部の実施形態では、ＡＡＶカプシドタンパク質は、配列ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）またはＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２）に由来する少

なくとも５つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＡＶカプシドタンパク質は、配列ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）またはＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２）に由来する少なくとも６つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む。あるいは、ＡＡＶカプシドタンパク質は、図２Ａまたは７Ｃに示されている配列（配列番号１７～１５０）に由来する少なくとも４つ、５つ、または６つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む。

【０００７】

一部の実施形態では、ＡＡＶはＡＡＶ９である。

【０００８】

一部の実施形態では、ＡＡＶカプシドタンパク質は、ＡＡＶ９　ＶＰ１を含む。

【０００９】

一部の実施形態では、配列は、配列番号６のアミノ酸５８８および５８９に対応する位置で、ＶＰ１／ＶＰ２インターフェース（アミノ酸１３８）で、または５８３～５９０の任意の部位でカプシドに挿入されている。

【００１０】

また、本明細書では、本明細書に記載の通りのＡＡＶカプシドタンパク質をコードする核酸が提供される。

【００１１】

加えて、本明細書では、本明細書に記載のカプシドタンパク質を含み、好ましくは野生型ＶＰ１、ＶＰ２、またはＶＰ３カプシドタンパク質を含まないＡＡＶが提供される。一部の実施形態では、ＡＡＶは、導入遺伝子、好ましくは治療用導入遺伝子をさらに含む。

【００１２】

導入遺伝子を、細胞に、例えばｉｎ　ｖｉｖｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ／ｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に送達するための方法がさらに提供される。方法は、細胞を、本明細書に記載の通りのＡＡＶと接触させることを含む。一部の実施形態では、細胞は、ニューロン（任意選択で、後根神経節ニューロンまたはらせん神経節ニューロン）、アストロサイト、心筋細胞、または筋細胞、アストロサイト、グリア細胞、内有毛細胞、外有毛細胞、支持細胞、内耳の線維細胞、光受容体、介在ニューロン、網膜神経節、または網膜色素上皮である。

【００１３】

一部の実施形態では、細胞は、生きている対象に、例えば、哺乳動物対象に、好ましくはヒトに存在する。一部の実施形態では、細胞は、脳、脊髄、後根神経節、心臓、内耳、眼、または筋肉、およびそれらの組合せから選択される組織に存在する。一部の実施形態では、対象は、アルツハイマー病、パーキンソン病、Ｘ連鎖副腎白質ジストロフィー、カナバン病、ニーマンピック病、脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、コネキシン－２６、アッシャー３Ａ型、アッシャー２Ｄ型、有毛細胞関連聴力喪失、有毛細胞関連聴力喪失（ＤＦＮＢ７／１１）、内有毛細胞関連聴力喪失（ＤＦＮＢ９）、アッシャー１Ｆ型、アッシャー１Ｂ型、網膜色素変性症（ＲＰ；非症候性）、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経症、アッシャー症候群（ＲＰ；難聴を伴う症候群）、デュシェンヌ筋ジストロフィー、同種移植血管症、または血友病ＡおよびＢを有する。本明細書に記載の方法および組成物を使用して、こうした状態を、状態の１つまたは複数の症状の改善、リスク低減、または発症遅延に十分な、治療用導入遺伝子を保有する治療有効量のＡＡＶを投与することにより、治療することができる。

【００１４】

一部の実施形態では、細胞は、対象の脳に存在し、ＡＡＶは、非経口送達により、脳内に、または髄腔内送達により投与される。

【００１５】

一部の実施形態では、髄腔内送達は、腰椎注射、大槽（cisternal magna）注射、または実質内注射によるものである。

【００１６】

一部の実施形態では、ＡＡＶは、非経口送達により、好ましくは、静脈内、動脈内、皮

下、腹腔内、または筋肉内送達により送達される。
【００１７】
一部の実施形態では、細胞は、対象の眼に存在し、ＡＡＶは、網膜下または硝子体内（intravireal）注射により投与される。
【００１８】
一部の実施形態では、細胞は、対象の内耳に存在し、ＡＡＶは、正円窓膜の上からもしくはそれを通して、正円窓に隣接する外科的蝸牛切開術による穿孔を通して、骨性卵円窓の窓を通して、または半規管を通して適用することにより、蝸牛に投与される。
【００１９】
また、本明細書では、
（ｉ）プロモーターにより駆動されるＣｒｅリコンビナーゼをコードする配列、
（ｉｉ）ＡＡＶ９カプシドタンパク質をコードする配列であって、本明細書に記載の通りのペプチド、例えばヘプタマーペプチドが、カプシドのアミノ酸（ａａ）５８８～５８９をコードする配列間に挿入されており、プロモーターにより駆動され、Ｃｒｅカセットの下流にある配列を含むライブラリー構築物ＡＡＶが提供される。一部の実施形態では、ペプチドは、ランダムペプチド配列または事前に選択されたペプチド配列を含む。
【００２０】
本明細書に記載の通りの複数のライブラリー構築物を含むライブラリーがさらに提供される。一部の実施形態では、ペプチド配列がランダムである場合、ライブラリーは、ヘプタマーのすべての考え得るバリアントをコードする配列を有するライブラリー構築物を含む。
【００２１】
加えて、本明細書では、事前に選択された細胞タイプにて導入遺伝子発現を媒介する操作されたカプシドを同定するための方法が提供される。方法は、（ａ）請求項２３または２４に記載のライブラリーを、非ヒトモデル動物、好ましくは哺乳動物に投与するステップであって、モデル動物の細胞は、レポーター配列の上流にあるｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットを発現するステップ；（ｂ）事前に選択された細胞タイプの細胞を単離するステップ；（ｃ）レポーター配列が発現されている細胞を選択するステップ；（ｄ）ライブラリー構築物の少なくとも部分、好ましくはヘプタマーを含む部分を、ステップ（ｃ）のレポーター配列が発現されている選択された細胞から単離するステップ；および（ｅ）ステップ（ｄ）で単離されたライブラリー構築物中のヘプタマーが同定されたことを決定するステップであって、単離されたヘプタマーは、事前に選択された細胞タイプにて導入遺伝子発現を媒介することができるステップ、を含む。
【００２２】
一部の実施形態では、レポーター配列は、蛍光レポータータンパク質をコードする。
【００２３】
一部の実施形態では、モデル動物は、レポーター配列の上流にあるｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットについてトランスジェニックであるか、またはレポーター配列の上流にあるｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットを、第２の構築物から発現させることができる。
【００２４】
一部の実施形態では、ライブラリー構築物中のヘプタマーが同定されたことを決定することは、ＤＮＡシーケンシング分析を使用することを含む。
【００２５】
また、一部の実施形態では、方法は、ステップ（ｅ）の前および／または後に、ＰＣＲを使用して、任意選択で完全なカプシド配列を含む、ヘプタマー配列を含む配列を、ステップ（ｄ）で単離されたライブラリー構築物から増幅するステップ；増幅された配列を、第２のセットのライブラリーベクターにクローニングして戻すステップ；第２のセットのライブラリーベクターを再パッケージングするステップ；および第２のライブラリーベクターに対して、ステップ（ａ）～（ｄ）または（ａ）～（ｅ）を実施することを含む。
【００２６】

別様に定義されていない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本発明に使用するための方法および材料は本明細書に記載されており、当技術分野で公知の他の好適な方法および材料も使用することができる。材料、方法、および例は、説明に過ぎず、限定は意図されていない。本明細書で言及されているすべての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリー、および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先されるものとする。

【００２７】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図ならびに特許請求の範囲から明白になるだろう。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１－１】標的組織にて効率的な導入遺伝子発現が可能な新規ＡＡＶカプシドを選択するためのｉＴｒａｎｓｄｕｃｅライブラリーを示す図である。ａ．２成分系のライブラリー構築物。１．Ｃｒｅリコンビナーゼは、最小ニワトリベータアクチン（ＣＢＡ）プロモーターにより駆動される。２．Ｃｒｅカセットの下流にクローニングされており、ランダムヘプタマーペプチドがａａ５８８～５８９間に挿入されているｐ４１プロモーター駆動性ＡＡＶ９カプシド。ｂ．選択戦略。ｉ．カプシド（異なる色で表されている）に発現される様々なペプチドインサートを含むｉＴｒａｎｓｄｕｃｅライブラリーを、ｔｄＴｏｍａｔｏレポーター遺伝子の上流にあるｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットがＧｔ（ＲＯＳＡ）２６Ｓｏｒ遺伝子座に挿入されているＡｉ９トランスジェニックマウスにｉ．ｖ．注射する。目的の細胞に進入することはできるが、細胞を機能的に形質導入しない（Ｃｒｅを発現させない）ＡＡＶカプシドは、ｔｄＴｏｍａｔｏ発現をオンにしない。機能的形質導入を媒介することができる（Ｃｒｅを発現させる）カプシドは、ｔｄＴｏｍａｔｏ発現をオンにすることになる。ｉｉ．目的の器官（例えば、脳）から細胞を単離し、形質導入細胞をｔｄＴｏｍａｔｏ発現および任意選択で細胞マーカーにより選別する。ｉｉｉ．カプシドＤＮＡを、選別された細胞からＰＣＲ増幅し、ライブラリーベクターにクローニングして戻し、別の選択ラウンドのために再パッケージングする。選択プロセスをモニターするために、各ラウンド後にＤＮＡシーケンシング分析を使用する。

【図１－２】図１－１の続きである。

【図１－３】図１－１の続きである。

【図２－１】全身性注射後の脳形質導入のためにｉｎ　ｖｉｖｏ選択を２ラウンド行った後のＡＡＶ－ＳおよびＡＡＶ－Ｆの同定を示す図である。円グラフは、次世代シーケンシングにより決定された特定のペプチドインサートの頻度を示す。ａ．産生後だが注射前のラウンド２ベクター配列の表である（配列番号１７～８６）。ｂ．ラウンド２注射後のｉＴｒａｎｓｄｕｃｅ単離物に出現したペプチド頻度の円グラフである（配列番号１～３）。「その他」は、プール全体の１％未満として出現する配列バリアントを示す（（ａ）では、ラウンド２スクリーニング後に単離された１％未満で出現するバリアントも強調表示されている）。＊は、終止コドンを示す。

【図２－２】図２－１の続きである。

【図３－１】ＡＡＶ－Ｆは、全身性注射後にマウス脳を効率的に形質導入することを示す図である。ａ．カプシドの形質導入能力を比較するために使用される一本鎖ＡＡＶ－ＧＦＰ発現カセット。ＩＴＲ、末端逆位配列；ＣＢＡ、ハイブリッドＣＭＶエンハンサー／ニワトリベータアクチンプロモーター；ＷＰＲＥ、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント；ｐＡ、ポリＡシグナル（Ｓｖ４０およびウシ成長ホルモン由来の両方）。ｂ．1×10^{11}ｖｇ（低用量）のＡＡＶ９、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ、ＡＡＶ－Ｓ、またはＡＡＶ－Ｆで形質導入されたＣ５７ＢＬ／６マウス（雄）の全脳矢状切片の代表的な低倍率画像。ｃ．Ｃ５７ＢＬ／６雄に8×10^{11}ｖｇ（高用量）の各ベクターを注射した後の脳矢状切片の代表的な画像。ｄ．高用量（8×10^{11}ｖｇ／マウス）で静脈内投与された４つのベクターの各々により形質導入された脊髄の切片の例。ｅ．低用量（左パネル

）および高用量（右パネル）での蛍光でカバーされた切片のパーセンテージによる、各ベクターから発現される天然ＧＦＰの定量化。ｆ．高用量での脳における形質導入の多領域比較。チューキー多重比較検定による一元配置ＡＮＯＶＡ後、＊＊＊、ｐ＜０．００１；＊＊＊、ｐ＜０．０００１（各群ｎ＝３）。
【図３－２】図３－１の続きである。
【図３－３】図３－１の続きである。
【図３－４】図３－１の続きである。
【図４－１】ニューロンおよびアストロサイト形質導入ならびに生体内分布のＡＡＶベクター比較を示す図である。マーカーで共免疫染色した後の、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＰＨＰ．Ｂ、ＡＡＶ－Ｓ、およびＡＡＶ－Ｆ形質導入細胞（ＧＦＰ陽性）の高倍率画像。ａ．ニューロン（ＮｅｕＮ）、およびｂ．アストロサイト（グルタミンシンテターゼ、ＧＳ）、マージした細胞はＤＡＰＩによる核染色も含む。ｃ．1×10^{11}ｖｇの各ベクターをｉ．ｖ．送達した後の、形質導入された皮質アストロサイトおよびニューロンのパーセンテージの立体解析学的評価。Ｐ＜０．０００１　一元配置ＡＮＯＶＡ。（＊）および（＊＊）は、チューキー多重比較検定後の各ベクター群間の有意差を表す（ｎ＝３匹マウス／群）。ｄ．ベクターゲノムのｑＰＣＲにより測定され、ＧＡＰＤＨゲノムＤＮＡレベル（入力ＤＮＡ）で正規化された、脳および肝臓におけるベクターの生体内分布。ｅ．Ｃ５７ＢＬ／６雄に8×10^{11}ｖｇで静脈内投与した後の末梢器官におけるＡＡＶ９、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ、ＡＡＶ－Ｓ、およびＡＡＶ－Ｆの形質導入。網膜画像：ＲＰＥ、網膜色素上皮；ＯＮＬ；外顆粒層；ＯＰＬ、外網状層；ＩＮＬ、内顆粒層；ＩＰＬ、内網状層；ＧＣＬ、神経節細胞層。＊＊＊＊、ｐ＜０．０００１（ｎ＝３匹マウス／群、チューキー多重比較検定による一元配置ＡＮＯＶＡ）。
【図４－２】図４－１の続きである。
【図４－３】図４－１の続きである。
【図４－４】図４－１の続きである。
【図５－１】ＡＡＶ－Ｆは、雄および雌Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおいて、およびＢＡＬＢ／ｃマウスでも高い形質導入効率を媒介する。ａ．1×10^{11}ｖｇ／マウスのＡＡＶ－Ｆにより形質導入された雄および雌マウス（ｎ＝３）の矢状脳切片にわたるＧＦＰシグナルの代表的な画像。ｂ．1×10^{11}ｖｇ／マウスのＡＡＶ－Ｆ（左）またはＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ（右）を注射した雄ＢＡＬＢ／ｃマウスの矢状脳切片。ＰＨＰ．Ｂ処置脳切片を視覚化するために、ＧＦＰと共にＤＡＰＩを対比染色として提供した。ｃ．蛍光でカバーされた切片のパーセンテージによる、各ベクターから発現された内因性ＧＦＰの定量化。＊＊、ｐ＜０．０１。独立ｔ検定（ｎ＝３匹マウス／群）。
【図５－２】図５－１の続きである。
【図６】ＡＡＶ－Ｆは、ヒト皮質ニューロンにてＡＡＶ９よりも高い形質導入効率を媒介することを示す図である。ａ．ＡＡＶ－Ｆにより形質導入された胎児由来初代ヒトニューロンでのＧＦＰ発現。形質導入を定量化するために、β－チューブリンに対する抗体でニューロンを共標識した。ｂ．ＡＡＶ９、ＡＡＶ－Ｓ、およびＡＡＶ－Ｆによるヒトニューロンの形質導入効率の定量化。＊、ｐ＜０．０５。
【図７－１】ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅライブラリーは、Ｃｒｅ組換えを機能的に誘発し、ｃａｐ遺伝子中の７量体ペプチドコードインサートのＰＣＲ増幅を組織からレスキューことができることを示す図である。ａ．Ａｉ９　ｌｏｘＰ導入／ＳＴＯＰ　ｔｄＴｏｍａｔｏトランスジェニックマウス（右パネル）における未選択ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅライブラリーによる形質導入後の組織中のｔｄＴｏｍａｔｏ　ＤＡＢ染色の例。対照としてＰＢＳを注射した（左パネル）。赤色矢印は、形質導入細胞の例を示す。ｂ．野生型およびトランスジェニック非形質導入マウスと比較した、Ｃａｐ遺伝子のインサート含有領域を、脳を含む種々の組織からレスキューするＰＣＲの例。ｃ．最初の選択ラウンド後に見られた多種多様なバリアントのスペクトルを示す表であり、最も高頻度のバリアントが強調表示されている（配列番号８７～１５０）。「その他」は、グループ化された配列バリアントを示し、それらの各々は、プール全体の１％未満として出現する。＊は、終止コドンを示す。

【図７－２】図７－１の続きである。
【図７－３】図７－１の続きである。
【図７－４】図７－１の続きである。
【図８－１】ラウンド２でのＣｒｅに基づく選択は、形質導入能力のあるＡＡＶを明らかにすることを示す図である。ａ．ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞のフローサイトメトリー分析。マウス脳を分離した後、細胞懸濁物を分析し、ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞を選別し、前方散乱および側方散乱（ＦＳＣ、ＳＳＣ）に基づきゲーティングを行って、非生存細胞を除外し（全事象）、単一細胞のみを捕捉し（シングレット）、最終的にｔｄＴｏｍａｔｏ発現（ｔｄＴｏｍａｔｏ＋／－細胞）を捕捉した。ＡＡＶライブラリーで形質導入した脳からｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞を選別するために、陰性対照（ＰＢＳ注射Ａｉ９）および陽性対照（ｈＳｙｎ－Ｃｒｅニューロン特異的カセットを保有するＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂで形質導入されたＡｉ９マウス）に基づき、ゲーティングを確立した。ｂ．ラウンド２ライブラリーを注射した後の肝臓および脳では、ｔｄＴｏｍａｔｏをＤＡＢで免疫染色した後でＣｒｅ依存性組換え事象が検出される（ＰＢＳ注射またはＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ　ｈＳｙｎ－Ｃｒｅ注射と比較して）。矢印は、ＡＡＶライブラリーを注射したマウスの脳内の陽性細胞（アストロサイト）を示す。
【図８－２】図８－１の続きである。
【図９】低用量（１×１０^{11}ｖｇ）または高用量（８×１０^{11}ｖｇ）のベクターを静脈内送達した後のＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ－Ｓによる脳の形質導入を示す図である。ｎ＝３匹のマウスにおける、ＡＡＶ９、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ、ＡＡＶ－Ｓ、およびＡＡＶ－Ｆによる形質導入後の脳の形質導入プロファイルは、矢状切片にて内因性（未染色）ＧＦＰ蛍光を示す。マウスには、１×１０^{11}ｖｇ（ａ）または８×１０^{11}ｖｇ（ｂ）のいずれかを投与した。各群の各切片は個々のマウスから得られる。
【図１０－１】（ａ）ＡＡＶ－Ｆは、マウス脳において複数のサブタイプのニューロンを形質導入することを示す図である。ＡＡＶ－Ｆにより駆動されるＧＦＰ発現は、脳およびＣＮＳの様々な領域にわたって広範囲のニューロンサブタイプで検出された。ＣａｍＫＩＩ、興奮性ニューロン。ＧＡＤ６７、抑制性ニューロン。チロシンヒドロキソラーゼ（ＴＨ）、プルキンエ神経細胞。コリンアセチルトランスフェラーゼ（ＣｈＡＴ）、運動ニューロン（白色矢印は、各サブタイプの形質導入ニューロンの例を表す）。（ｂ）ＡＡＶ－Ｆは、１×１０^{11}ｖｇ／マウスにて効率的な形質導入を媒介するが、ＡＡＶ９は媒介しない。図３ｂのマウスの代表的な１０×画像は、ＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ９を注射したマウスの線条体、海馬、および小脳にてＧＦＰが発現されたことを示す。
【図１０－２】図１０－１の続きである。
【図１１】全身性送達後のＡＡＶ－Ｆの生体内分布を示す図である。骨格筋、心臓、および脊髄組織における、ＡＡＶ９と比較したＡＡＶ－Ｆの生体内分布が示されている。ベクターゲノムのｑＰＣＲにより生体内分布を測定し、入力を等しくするために、試料をＧＡＰＤＨゲノムＤＮＡに対して正規化した。ｎ．ｓ、有意ではない。＊、ｐ＜０．０５（ｎ＝３匹マウス／群。各マウス試料は３重重複で実験した。両側ｔ検定）。
【図１２－１】透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）による空カプシドの定量化を示す図である。ａ～ｄ．ＡＡＶ９およびＡＡＶ－Ｆ調製物の電子顕微鏡写真の代表的な画像セグメントである。ＡＡＶ９（ａ、ｂ）およびＡＡＶ－Ｆ（ｃ、ｄ）の各々２つの調製物を、各調製物の５つの画像にわたって完全カプシド対空カプシドを計数することにより定量化した（空カプシドの例は矢印で示されている）。ｅ．ＡＡＶ９およびＡＡＶ－Ｆ調製物の空カプシドパーセンテージの定量化。ｎ．ｓ：有意ではない（ｐ＝０．５４、独立ｔ検定）。
【図１２－２】図１２－１の続きである。
【図１３】ＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ－Ｓを直接頭蓋内注射した後の持続的な神経形質導入を示す図である。ＡＡＶ－Ｆ（上段パネル）またはＡＡＶ－Ｓ（下段パネル）を皮質内および海馬内注射した後のマウス脳矢状切片にわたるＧＦＰ蛍光シグナル（およびＤＡＰＩ）の代表的な画像（ＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ－Ｓでは、それぞれ１．６５×１０^{10}および５．６×１０^{10}ｇｃ／注射部位）。スケールバー：全脳の低倍率画像の場合は１００

０μｍであり、皮質および海馬の高倍率画像の場合は２００μｍである。
【図１４－１】ＡＡＶ－Ｆベクターを腰椎髄腔内注射した後の脊髄および脳の広範な形質導入を示す図である。一本鎖ＡＡＶ－ＣＢＡ－ＧＦＰ発現カセットがパッケージングされている１０マイクロリットルのＡＡＶ９（１．２５×１０^{11}ｖｇ）またはＡＡＶ－Ｆ（８．８×１０^{10}ｖｇ）を、成体マウスの腰椎領域に髄腔内注射した（ｎ＝２／ベクター）。３週間後にマウスを死亡させ、抗ＧＦＰ免疫染色後のＧＦＰ発現について脊髄および脳を分析した。（ａ）上段画像：脳はＡＡＶ－Ｆによりロバストに形質導入されるがＡＡＶ９ではされないことを示す完全冠状脳切片スキャン。下段画像：ＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ９を用いた場合の脊髄の完全切片スキャン。ＡＡＶ－Ｆを注射したマウスは、非常に高いＧＦＰシグナルを示した。ＡＡＶ９は、両マウスで非常に低い発現を示した。すべての画像は、３３ｍｓの露光時間で撮影した。ＡＡＶ－Ｆの場合は、特徴をより良好な分解能で観察するために、追加の画像を４ｍｓで撮影した。切片が薄暗い場合は、切片境界の白色輪郭を含めた。示されていない場合、スケールバーは２５０μｍと等しい。（ｂ～ｄ）ＡＡＶ９（ｂ）およびＡＡＶ－Ｆ（ｃ、ｄ）で処置したマウスの脊髄の高倍率画像。ＧＦＡＰは、アストロサイト特異的染色およびニューロンのＮｅｕＮを示す。脊髄の区域は、各画像の右上に示されている。下段パネルの画像は、上段画像のボックスで囲まれた区域のより高倍率の画像である。（ｅ、ｆ）髄腔内注射後のＡＡＶ－Ｆ形質導入脳の高倍率画像である。ＡＡＶ－Ｆにより形質導入された（ｅ）アストロサイト、（ｆ）ニューロンの描写。ＡＡＶ９は、髄腔内注射後の脳では検出可能な形質導入を媒介しなかった。ＳＣ、脊髄；ＣＣ、脳梁、ＣＰ、尾状被殻。
【図１４－２】図１４－１の続きである。
【図１４－３】図１４－１の続きである。
【図１４－４】図１４－１の続きである。
【図１４－５】図１４－１の続きである。
【図１４－６】図１４－１の続きである。
【図１４－７】図１４－１の続きである。
【図１４－８】図１４－１の続きである。
【図１５】ＡＡＶ－Ｓ－ＣＢＡ－ＧＦＰを内耳に投与した後のＧＦＰ蛍光を示す図である。（ａ、ｂ）：ＡＡＶ－Ｓで形質導入された蝸牛感覚上皮の代表的な画像（６３×の倍率）である。（ｃ）：らせん板縁での形質導入。（ｄ）：らせん神経節領域での形質導入。Ｚおよび矢印は、Ｚスタックの様々な層を示す。ＯＨＣ：外有毛細胞。ＩＨＣ：内有毛細胞。
【図１６－１】内耳線維細胞および脊髄を効率的に形質導入するＡＡＶカプシドを選択するための、非トランスジェニックＮＨＰにおけるｉＴｒａｎｓｄｕｃｅライブラリーの使用を示す図である。（Ａ）ｉ．カニクイザル（または他の非ヒト霊長類）に、ＡＡＶカプシドライブラリーを、ＧＪＢ２駆動性ｌｏｘＰ導入－Ｓｔｏｐ－ｔｄＴｏｍａｔｏカセットをコードするＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂと共に同時注射する。ｉｉ．ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂは、ＡＡＶライブラリカプシドがＣｒｅを発現させると、線維細胞（網掛けで示されている）にてｔｄＴｏｍａｔｏを選択的に発現させることになる。ｉｉｉ．内耳を分離し、ｉｖ．ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性線維細胞をフローサイトメトリーで選別する。ｖ．機能する可能性のあるカプシドを、選別した細胞から回収したＤＮＡからＰＣＲ増幅し、ライブラリーを再パッケージングし、別の選択ラウンドを実施する。選択プロセスをモニターするために、各ラウンド後に次世代ＤＮＡシーケンシング分析を使用する。略語：ＴＭ、蓋膜；ＯＣ、コルチ器；ＳＬ、らせん靭帯。（Ｂ）．ｉ．カニクイザル（または他の非ヒト霊長類）に、ＡＡＶカプシドライブラリーを、ＣＢＡ駆動性ｌｏｘＰ導入－Ｓｔｏｐ－ｍＰｌｕｍカセットをコードするＡＡＶ９－と共に同時注射する。ｉｉ．、ｉｉｉ．ＡＡＶ９は、ＡＡＶライブラリカプシドがＣｒｅを発現させると、脊髄（網掛けで示されている）にてｍＰｌｕｍを発現させることになる。脊髄を分離し、ｍＰｌｕｍ陽性細胞をフローサイトメトリーで選別する。ｉｖ．機能する可能性のあるカプシドを、選別した細胞から回収したＤＮＡからＰＣＲ増幅し、ライブラリーを再パッケージングし、別の選択ラウンドを

実施する。選択プロセスをモニターするために、各ラウンド後に次世代ＤＮＡシーケンシング分析を使用する。
【図１６－２】図１６－１の続きである。
【図１６－３】図１６－１の続きである。
【発明を実施するための形態】
【００２９】
導入遺伝子を標的細胞へと効率的に送達するための有望な手法は、ＡＡＶベクターカプシドバリアントのプールまたはライブラリーを、ｉｎ　ｖｉｖｏ選択プロセスに供するプロセス、紛れもなく「適者生存」手法によるものである[4～8]。ランダムオリゴマーヌクレオチドを使用して短鎖（６～９つのアミノ酸）ランダムペプチドをカプシド表面の露出領域に挿入するＡＡＶライブラリー手法は、標的組織の形質導入増強などの独特な特性を有する新しいＡＡＶカプシドバリアントの同定に成功したことを示している[9、10]。ＡＡＶライブラリーの１つの主な制限は、選択プロセスの最終読み出しが、機能的導入遺伝子発現を媒介するカプシドとそうでないカプシドとを常に区別するとは限らないことである。ＡＡＶ形質導入は、細胞受容体結合および進入から、核輸送、二本鎖合成、ならびに最終的な遺伝子およびタンパク質発現までの複数のステップを含むプロセスである[11]。ＣＲＥＡＴＥと呼ばれる従来のＡＡＶライブラリー手法の最近の進歩により、Ｃｒｅ発現トランスジェニック動物の状況で核移行に成功したカプシドを選択的に単離することができたＣｒｅ感受性ＡＡＶゲノムが操作された[12]。本明細書には、Ｃｒｅ／ｌｏｘＰ系の能力を使用するカプシド選択系が記載されており、その一例はｉＴｒａｎｓｄｕｃｅと呼ばれる。Ｃｒｅトランスジェニックマウスを使用する代わりに、ペプチドインサートを有するカプシドをＣｒｅ発現カセットと共に両方ともコードするように、ＡＡＶを操作した。次いで、導入遺伝子発現を含む形質導入のプロセス全体を媒介するカプシドの選択を可能にするために、Ｃｒｅ感受性蛍光レポーターを用いて、マウスでの選択を実施した。ライブラリーのｉｎ　ｖｉｖｏ選択は、ＣＮＳの顕著な形質導入効率を媒介するＡＡＶカプシド、および内耳での形質導入を媒介する別のカプシドの同定をもたらした。
【００３０】
本発明者らは、ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅ系を使用して、それぞれマウスＣＮＳ（２つの系統を試験した）および内耳において非常に効率的な導入遺伝子発現を媒介する、本明細書ではＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ－Ｓと呼ばれる２つの新しいＡＡＶカプシドを単離した。ＡＡＶ－Ｆカプシドは、初代ヒトニューロンのロバストな形質導入も媒介した。
【００３１】
興味深いことには、発現に基づく選択を使用することにより、ＮＧＳリードの９７％を占めていた３つのペプチドクローン（ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）、ＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２）、およびＦＱＰＣＰ＊（配列番号３）が同定された。ＦＱＰＣＰ＊は終止コドンを有していたため、このゲノムは、産生中に別のカプシドに交差パッケージングされたと考えられた。交差パッケージングは、ＡＡＶライブラリーで生じることが指摘されている現象である[15]。これは、ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１、「ＡＡＶ－Ｓ」）の場合にも当てはまる可能性がある（図２）。ＡＡＶ－Ｓは、末梢器官（図４ｅ）および内耳（図１５）のロバストな形質導入を媒介したため、欠陥ベクターではなかった。ＡＡＶ－Ｓは、産生効率が非常に高かったため（表４）、クロスパッケージングされ易かった可能性がある。一方で、ＡＡＶ－Ｆ（ＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２））は、形質導入が極めて効率的であり、ＮＧＳからのわずか２つの有望な候補のうちの１つであった（図２）。こうした候補は両方とも、ラウンド２ライブラリープールでは非常に低いレベルで検出可能だった（図２）。そのため、本発明者らは、それらの濃縮が既存のバイアスによるものではなかったことを確認することができた。
【００３２】
本発明者らは、細胞タイプ（全脳）への不可知論的手法を使用してｉＴｒａｎｓｄｕｃｅ系の実証を実施したため、ＡＡＶ－Ｆが、ＡＡＶ９により形質導入される細胞であるアストロサイトおよびニューロンに対して高度に向性であったことは驚くべきことではない

。将来の研究では、本発明者らは、細胞特異的プロモーターを組み合わせて、ＡＡＶライブラリーベクターからのＣｒｅ発現を駆動させ、ならびに磁気細胞選別して、従来のＡＡＶベクター形質導入に抵抗性の細胞を形質導入することができるカプシドを単離する予定である。

【００３３】

ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅ系は、臨床候補ＡＡＶベクターを選択する能力に加えて、研究ツールとして使用するためのベクターを同定するために使用することができる。最近同定されたＡＡＶ－ＰＨＰ．Ｂカプシドは、マウス脳を遺伝子改変するための効率的なベクターとしての役目を果たしている[12]。しかしながら、ＡＡＶ－ＰＨＰ．Ｂカプシドは、ＢＡＬＢ／ｃまたはＢＡＬＢ／ｃ関連マウス血統を形質導入しない[13、14、16]。興味深いことには、ＡＡＶ－Ｆを静脈内注射した後、ＢＡＬＢ／ｃおよびＣ５７ＢＬ／６マウス脳のロバストな形質導入が観察された。これは、ＡＡＶ９での形質導入増強の機序が、ＡＡＶ－ＰＨＰ．ＢとＡＡＶ－Ｆとで異なることを示す。また、これにより、広く使われているＢＡＬＢ／ｃ系統にてＣＮＳ研究を行うための効率的なツールとしてＡＡＶ－Ｆを使用することが可能になる（ｌａｂｏｍｅ．ｃｏｍ／ｍｅｔｈｏｄ／Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ－Ｍｉｃｅ－ａｎｄ－Ｒａｔｓ．ｈｔｍｌ）。加えて、本明細書に示されているように、ＡＡＶ－Ｆは、直接注射および髄腔内ボーラス注射の後で両方とも、ＣＮＳにてロバストな導入遺伝子発現を媒介することもでき、ＡＡＶ－Ｓは、内耳での導入遺伝子発現を媒介することができる。

【００３４】

ＡＡＶ－Ｆをさらに試験するために、より大型の動物での将来の研究を、例えば前臨床研究で実施することができる。用量漸増試験を実施して、ＮＨＰにおいてＰＨＰ．Ｂを用いて観察されたように、ＡＡＶ－Ｆの用量関連毒性を試験することができる[14]。形質導入効率のより良好な異種間翻訳を可能にするために、異なる種（例えば、マウス、次いでラット）で選択ラウンドの反復を行うことができる。例えば、これは、マウスで、続いてｌｏｘＰ導入ＳＴＯＰ　ｔｄＴｏｍａｔｏトランスジェニックラットで行うことができる[17]。あるいは、ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅライブラリーの直接選択を、トランスジェニックマーモセットで[18、19]、または他の非ヒト非トランスジェニック霊長類においてでさえも実施することができる（図１６Ａおよび１６Ｂ）。

【００３５】

最適化カプシド配列を同定するための方法

「ウイルスベクターライブラリー」は、ウイルスのプールされたバリアントであり、選択圧力下で（ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏ）、目的の標的細胞／組織／器官に特異的なウイルスのクローン単離を促進することができる。現行ライブラリー技術の１つの制限は、候補ウイルスクローンの多くが、導入遺伝子発現（必要とされる最終的なベクターの機能）を媒介しないことである。この制限の主な理由は、ベクター媒介性導入遺伝子発現に基づくベクター選択を可能にするための戦略が考案されていないことである。本明細書には、２部分発現カセットを有するアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターゲノムを使用する方法が記載されている。第１のものは、目的のプロモーター下にあるＣｒｅ－リコンビナーゼカセットである。第２の部分は、ウイルスゲノムの最初の部分に対して「シス位」にクローニングされた、カプシド遺伝子の発現を駆動するためのＡＡＶプロモーターである。今や、レポーター遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）を発現するが、上流にｌｏｘＰ／終止部位を有するため、ＡＡＶベクターにより送達されるＣｒｅが終止部位を除去するまでレポーター発現が防止される細胞を使用して、ウイルスベクターを、導入遺伝子発現（高感度Ｃｒｅ発現）について選択することができる。レポーター遺伝子陽性細胞を単離することができ、回収したＡＡＶカプシド配列は、効率的な導入遺伝子発現を媒介するより高い可能性を有することになる。

【００３６】

したがって、本明細書では、（ｉ）プロモーター、例えば最小ニワトリベータアクチン（ＣＢＡ）プロモーターにより駆動されるＣｒｅリコンビナーゼ；（ｉｉ）本明細書に記

載の通りのペプチド、例えばランダムヘプタマーペプチドまたは選択されたヘプタマーペプチドをコードする配列がカプシドタンパク質に挿入されており、Ｃｒｅカセットの下流にあるプロモーター（例えば、ｐ４１プロモーター）駆動性ＡＡＶ９カプシド配列を含むライブラリー構築物ＡＡＶが提供される。好ましくは、ペプチドは、カプシドのアミノ酸（ａａ）５８８～５８９をコードする配列間に挿入されているが、ウイルスの機能を妨害せず、選択された細胞の感染を促進する活性を維持する限り、他の場所、例えば、ＶＰ１／ＶＰ２インターフェース（アミノ酸１３８）または５８３～５９０の任意の部位に挿入されていてもよい。ＣＢＡプロモーターは、ほとんどの細胞タイプでＣｒｅを駆動する強力な活性プロモーターである。Ｐ４１プロモーターは、Ｃａｐ遺伝子発現を駆動するＡＡＶ特異的天然プロモーターである。使用することができる他のプロモーターとしては、これらに限定されないが、シナプシンプロモーター、ＧＦＡＰプロモーター、ＣＤ６８プロモーター、Ｆ４／８０プロモーター、ＣＸ３ＣＲ１プロモーター、ＣＤ３またはＣＤ４プロモーター、ＣＭＶプロモーター、肝臓特異的プロモーターが挙げられる。他の例は、下記に列挙されている。また、構築物は、Ｃｒｅ　ｃＤＮＡの末端およびｃａｐ　ＤＮＡの末端に終止コドンを含んでいてもよい。Ｃｒｅカセットおよびｃａｐカセットの後にポリＡシグナルが存在する。Ｃｒｅリコンビナーゼは当技術分野で公知である。例えば、Van Duyne, Microbiol Spectr. 2015 Feb;3(1):MDNA3-0014-2014を参照されたい。図１Ａには、例示的なライブラリー構築物が提供されている。

【００３７】

また、本明細書では、ライブラリー（つまり、複数のライブラリー構築物を含む組成物）が提供される。ランダムヘプタマー配列が使用される場合、ライブラリーは、好ましくは、ヘプタマーのすべてまたはほとんどすべての考え得るバリアントをコードする配列を有する構築物を含む。

【００３８】

図１Ｂ（ｉ）に示されている方法は、カプシドに発現される異なるペプチドインサート（異なる灰色網掛けで表されている）を含むライブラリーをモデル動物、例えば、マウス（例えば、Ａｉ９トランスジェニックマウス）、ウサギ、ラット、またはサルなどの哺乳動物に投与することを含んでいてもよい。モデル動物は、レポーター配列、例えば、蛍光レポータータンパク質配列、例えば、ｔｄＴｏｍａｔｏレポーター遺伝子の上流にあり、任意選択でＧｔ（ＲＯＳＡ）２６Ｓｏｒ遺伝子座に挿入されているｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットを含む。モデル動物は、トランスジェニックであってもよく、またはレポーター配列の上流にあるｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットは、第２の構築物から、例えば、動物モデルに投与される（例えば、ライブラリー構築物の前、後、または同時に投与される）第２のＡＡＶから発現されてもよい。目的の細胞に進入するが、細胞を機能的に形質導入しない（Ｃｒｅを発現しない）任意のＡＡＶカプシドは、レポーターの発現をオンにしない。機能的形質導入を媒介することができる（Ｃｒｅを発現させる）カプシドは、ｔｄＴｏｍａｔｏ発現をオンにすることになる。図１Ｂ（ｉｉ）に示されているように、細胞を、目的の器官（例えば、脳、目、耳、網膜、心臓など）から単離し、次いで、形質導入細胞を、レポーター遺伝子発現および任意選択で細胞マーカーにより選別することができる。図１Ｂ（ｉｉｉ）に示されているように、カプシドＤＮＡを得て、例えば、任意選択で、選別した細胞に由来する配列をＰＣＲ増幅することにより分析し、それらをライブラリーベクターにクローニングして戻し、別の選択ラウンドのために再パッケージングする。選択プロセスをモニターするために、各ラウンド後にＤＮＡシーケンシング分析を使用することができる。

【００３９】

プロモーター

本明細書に記載のライブラリー構築物は、１つはＣｒｅリコンビナーゼを駆動し、もう１つはＡＡＶカプシド配列を駆動する２つのプロモーターを含む。

【００４０】

ほとんどの細胞タイプにて発現を駆動するいわゆる「遍在性」プロモーターを含む、少

なからぬプロモーター配列、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（任意選択で、ＣＭＶエンハンサーを有する）、ニワトリベータアクチン（ＣＢＡ）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター（任意選択で、ＲＳＶエンハンサーを有する）、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、ＥＦ１アルファプロモーター、ユビキチンＣ（ＵＢＣ）、Ｂ－グルクロニダーゼ（ＧＵＳＢ）、およびＣＭＶ最／初期遺伝子エンハンサー／ＣＢＡプロモーターが当技術分野で公知である。

【００４１】

Ｃｒｅリコンビナーゼの発現は、組織特異的プロモーター、例えばとりわけ、ＣＮＳ、肝臓、心臓　蝸牛、網膜、またはＴ細胞の組織特異的プロモーターによっても駆動させることができる。一部の実施形態では、ＣＮＳの組織特異的プロモーターとしては、ニューロンプロモーター、マクロファージ／ミクログリアプロモーター、およびアストロサイトプロモーターが挙げられる。シナプシンプロモーター（ニューロン）、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）（ニューロン）、ＭｅＣＰ２（メチル－ＣＰＧ結合タンパク質２）（ニューロン）、グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）（アストロサイト）、オリゴデンドロサイト転写因子１（Ｏｌｉｇ１）（オリゴデンドロサイト）、ＣＮＰ（２’，３’－環式－ヌクレオチド３’－ホスホジエステラーゼ）（広域）、またはＣＢｈ（ハイブリッドＣＢＡまたはＣＢＡプロモーターを有するＭＶＭイントロン）（広域）を含む、少なからぬ組織特異的プロモーターが当技術分野で公知である。例えば、米国特許出願公開第２０１９００３２０７８号明細書を参照されたい。マクロファージ／ミクログリアプロモーターとしては、これらに限定されないが、以下のものが挙げられる：Ｃ－Ｘ３－Ｃモチーフケモカイン受容体１（ＣＸ３ＣＲ１）プロモーター、ＣＤ６８プロモーター、イオン化カルシウム結合アダプター分子１（ＩＢＡ１）プロモーター、膜貫通型タンパク質１１９（ＴＭＥＭ１１９）プロモーター、ｓｐａｌｔ様転写因子１（ＳＡＬＬ１）プロモーター、接着Ｇタンパク質共役受容体Ｅ１（Ｆ４／８０）プロモーター、脊髄増殖性肉腫ウィルスエンハンサー、陰性対照領域欠失ｄ１５８７ｒｅｖプライマー結合部位置換（ＭＮＤ）（negative control region deleted, d1587rev primer-binding site substituted）プロモーター、インテグリンサブユニットアルファＭ（ＩＴＧＡＭ；ＣＤ１１ｂ－骨髄性細胞（好中球、単球、およびマクロファージ）)プロモーター。内耳での発現の場合、プロモーターは、例えば、ＰＫＧ、ＣＡＧ、プレスチン、Ａｔｏｈ１、ＰＯＵ４Ｆ３、Ｌｈｘ３、Ｍｙｏ６、α９ＡｃｈＲ、α１０ＡｃｈＲ、ｏｎｃｏｍｏｄ、またはｍｙｏ７Ａプロモーターであってもよい。Ryan et al., Adv Otorhinolaryngol. 2009; 66: 99-115を参照されたい。

【００４２】

レポータータンパク質

少なからぬレポータータンパク質が当技術分野にて公知であり、以下のものが挙げられる：緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、緑色蛍光タンパク質のバリアント（ＧＦＰ１０）、高感度ＧＦＰ（ｅＧＦＰ）、ＴｕｒｂｏＧＦＰ、ＧＦＰＳ６５Ｔ、ＴａｇＧＦＰ２、ｍＵＫＧＥｍｅｒａｌｄ　ＧＦＰ、Ｓｕｐｅｒｆｏｌｄｅｒ　ＧＦＰ、ＧＦＰｕｖ、不安定化ＥＧＦＰ（ｄＥＧＦＰ）、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｅｎ、ｍＷａｓａｂｉ、Ｃｌｏｖｅｒ、ｍＣｌｏｖｅｒ３、ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ、ＮｏｗＧＦＰ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ｍＡｍｅｔｒｉｎｅ、光活性化可能ＧＦＰ（ＰＡ－ＧＦＰ）、Ｋａｅｄｅ、Ｋｉｋｕｍｅ、ｍＫｉｋＧＲ、ｔｄＥｏｓ、Ｄｅｎｄｒａ２、ｍＥｏｓＦＰ２、Ｄｒｏｎｐａ、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）、ｅＢＦＰ２、アジュライトＢＦＰ、ｍＴａｇＢＦＰ、ｍＫａｌａｍａ１、ｍＴａｇＢＦＰ２、ｓｈＢＦＰ、青緑色蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、ｅＣＦＰ、濃青色（Cerulian）ＣＦＰ、ＳＣＦＰ３Ａ、不安定化ＥＣＦＰ（ｄＥＣＦＰ）、ＣｙＰｅｔ、ｍＴｕｒｑｕｏｉｓｅ、ｍＴｕｒｑｕｏｉｓｅ２、ｍＴＦＰＩ、光スイッチ可能ＣＦＰ２（ＰＳ－ＣＦＰ２）、ＴａｇＣＦＰ、ｍＴＦＰ１、ｍＭｉｄｏｒｉｉｓｈｉ－Ｃｙａｎ、ａｑｕａｍａｒｉｎｅ、ｍＫｅｉｍａ、ｍＢｅＲＦＰ、ＬＳＳ－ｍＫ

ａｔｅ２、ＬＳＳ－ｍＫａｔｅ１、ＬＳＳ－ｍＯｒａｎｇｅ、ＣｙＯＦＰ１、Ｓａｎｄｅｒｃｙａｎｉｎ、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、ｅＲＦＰ、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＲｕｂｙ、ｍＡｐｐｌｅ、ｍＣａｒｄｉｎａｌ、ｍＳｔａｂｌｅ、ｍＭａｒｏｏｎ１１、ｍＧａｒｎｅｔ２、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、ＴａｇＲＦＰ、ＴａｇＲＦＰ６５７、ＴａｇＲＦＰ６７５、ｍＫａｔｅ２、ＨｃＲｅｄ、ｔ－ＨｃＲｅｄ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ｍＰｌｕｍ、ｍＮｅｐｔｕｎｅ、ＮｉｒＦＰ、Ｋｉｎｄｌｉｎｇ、遠赤外蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、ｅＹＦＰ、不安定化ＥＹＦＰ（ｄＥＹＦＰ）、ＴａｇＹＦＰ、Ｔｏｐａｚ、Ｖｅｎｕｓ、ＳＹＦＰ２、ｍＣｈｅｒｒｙ、ＰＡ－ｍＣｈｅｒｒｙ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｙｐｅｔ、ＩＡＮＲＦＰ－ＡＳ８３、ｍＰａｐａｙａ１、ｍＣｙＲＦＰ１、ｍＨｏｎｅｙｄｅｗ、ｍＢａｎａｎａ、ｍＯｒａｎｇｅ、Ｋｕｓａｂｉｒａ Ｏｒａｎｇｅ、Ｋｕｓａｂｉｒａ Ｏｒａｎｇｅ２、ｍＫｕｓａｂｉｒａ Ｏｒａｎｇｅ、ｍＯｒａｎｇｅ２、ｍＫＯ$_{K}$、ｍＫＯ２、ｍＧｒａｐｅ１、ｍＧｒａｐｅ２、ｚｓＹｅｌｌｏｗ、ｅｑＦＰ６１１、Ｓｉｒｉｕｓ、Ｓａｎｄｅｒｃｙａｎｉｎ、ｓｈＢＦＰ－Ｎ１５８Ｓ／Ｌ１７３Ｉ、近赤外タンパク質、ｉＦＰ１．４、ｉＲＦＰ７１３、ｉＲＦＰ６７０、ｉＲＦＰ６８２、ｉＲＦＰ７０２、ｉＲＦＰ７２０、ｉＦＰ２．０、ｍＩＦＰ、ＴＤｓｍＵＲＦＰ、ｍｉＲＦＰ６７０、Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｖｉｏｌｅｔ（ＢＶ）４２１、ＢＶ６０５、ＢＶ５１０、ＢＶ７１１、ＢＶ７８６、ＰｅｒＣＰ、ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５、ＤｓＲｅｄ、ＤｓＲｅｄ２、ｍＲＦＰ１、ｐｏｃｉｌｌｏｐｏｒｉｎ、ウミシイタケＧＦＰ、ＭｏｎｓｔｅｒＧＦＰ、ｐａＧＦＰ、またはフィコビリンタンパク質、またはそれらのいずれか１つの生物学的活性バリアントもしくは断片。

【００４３】

キット

また、本明細書には、ランダムヘプタマー配列を有するまたは有しない、本明細書に記載の通りの１つまたは複数のライブラリー構築物ＡＡＶを含むキットが提供される。また、キットは、レポーター配列の上流にｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットを含む構築物を含んでいてもよい。

【００４４】

操作されたＡＡＶカプシドタンパク質

本方法は、ＡＡＶ、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ８、またはＡＡＶ９のカプシドに挿入すると、指定の細胞において導入遺伝子発現を媒介するＡＡＶの能力を変更する２つのペプチド配列を同定した。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも７つのアミノ酸の配列を含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、配列（ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）またはＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２））の少なくとも４つ、例えば、５つ、６つ、または７つの連続アミノ酸を含む。

【００４５】

逆配列を含むペプチド、例えば、ＰＳＹＬＴＴＳ（配列番号４）およびＹＳＱＧＶＶＦ（配列番号５）も使用することができる。あるいは、ペプチドは、図２Ａまたは７Ｃ（配列番号１７～１５０）に示されている配列に由来する少なくとも４つ、５つ、または６つの連続アミノ酸を含んでいてもよい。

【００４６】

ＡＡＶ

本方法、キット、および組成物で使用するためのウイルスベクターとしては、好ましくは、本明細書に記載の通りのカプシドペプチドおよび任意選択で標的組織にて発現させるための導入遺伝子を含む組換えレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、アルファウイルス、およびレンチウイルスが挙げられる。

【００４７】

本方法での核酸送達に有用な好ましいウイルスベクター系は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）である。ＡＡＶは、２５ｎｍのカプシドを有する小型非エンベロープウイルスである。野生型ウイルスに関連付けられる疾患は知られていないかまたは示されていない。Ａ

ＡＶは、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ゲノムを有する。ＡＡＶは、長期エピソーム導入遺伝子発現を呈することが示されており、ＡＡＶは、脳、特にニューロンにて優れた導入遺伝子発現を示している。外因性ＤＮＡ用の空間は、約４．７ｋｂに制限される。Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985)に記載されているものなどのＡＡＶベクターを使用して、ＤＮＡを細胞へと導入することができる。ＡＡＶベクターを使用して様々な核酸が、異なる細胞タイプへと導入されている（例えば、Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 (1984)；Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1985)；Wondisford et al., Mol. Endocrinol. 2:32-39 (1988)；Tratschin et al., J. Virol. 51:611-619 (1984)；およびFlotte et al., J. Biol. Chem. 268:3781-3790 (1993)を参照）。数多くの代替的ＡＡＶバリアントが存在しており（１００個よりも多くがクローニングされている）、ＡＡＶバリアントは、望ましい特徴に基づいて同定されている。一部の実施形態では、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ｒｈ．８、ＡＡＶ９、ｒｈ．１０、ｒｈ．３９、ｒｈ．４３、またはＣＳｐ３であり、ＣＮＳに使用する場合、一部の実施形態では、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、またはＡＡＶ９である。一例として、ＡＡＶ９は、血液脳関門をやや効率的に通過することが示されている。本方法を使用して、本明細書に記載の通りのペプチド配列を、カプシドタンパク質に、例えば、アミノ酸５８８と５８９との間のＡＡＶ９カプシドタンパク質ＶＰ１に挿入することにより、ＢＢＢを越える透過性または特定の組織への透過性を増加させるように、ＡＡＶカプシドを遺伝子操作することができる。

【００４８】

例示的な野生型ＡＡＶ９カプシドタンパク質ＶＰ１（Ｑ６ＪＣ４０－１）配列は、以下の通りである。

【００４９】

【化１】

```
         10          20          30          40          50
MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY
         60          70          80          90         100
KYLGPGNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF
        110         120         130         140         150
QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP
        160         170         180         190         200
QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS
        210         220         230         240         250
LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRVI TTSTRTWALP
        260         270         280         290         300
TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR
        310         320         330         340         350
LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSDY
        360         370         380         390         400
QLPYVLGSAH EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF
        410         420         430         440         450
PSQMLRTGNN FQFSYEFENV PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT
        460         470         480         490         500
INGSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE
        510         520         530         540         550
FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR
        560         570         580         590         600
DNVDADKVMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG
        610         620         630         640         650
ILPGMVWQDR DVYLQGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK
        660         670         680         690         700
NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ
        710         720         730
YTSNYYKSNN VEFAVNTEGV YSEPRPIGTR YLTRNL
```

(配列番号６)

【００５０】

したがって、本明細書では、本明細書に記載のペプチド配列の１つまたは複数を含むＡＡＶ、例えば、本明細書に記載の配列を含むカプシドタンパク質、例えば、配列番号１または配列番号２を含むカプシドタンパク質を含むＡＡＶであって、ペプチド配列は、例えば、アミノ酸５８８と５８９との間の配列に挿入されている、ＡＡＶが提供される。

【００５１】

ＡＡＶの例示的な配列は、下記に提供されている。挿入されたペプチド配列は、タンパク質配列では太字および二重下線で強調されており、ＤＮＡ配列では太字および大文字で示されている。

【００５２】

ＡＡＶ－Ｆカプシドタンパク質配列

【００５３】

【化２】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLG
PGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGN
LGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLN
FGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCD
SQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFH
CHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSD
YQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
NNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAG
PSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMAS
HKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQ
SAQ**FVVGQSY**AQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGG
FGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWN
PEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号７)

ＡＡＶ－Ｆカプシドｄｎａ配列

【００５４】

【化３－１】

atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacaaccttagtgaaggaattcgcgagtggtgggctttgaaacctggagcccctcaacccaaggcaaatcaacaacatcaagacaacgctcgaggtcttgtgcttccgggttacaaataccttggacccggcaacggactcgacaaggggagccggtcaacgcagcagacgcggcggccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaggccggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacgccgagttccaggagcggctcaaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagtcttccaggccaaaaagaggcttcttgaacctcttggtctggttgaggaagcggctaagacggctcctggaaagaagaggcctgtagagcagtctcctcaggaaccggactcctc

【００５５】

【化３－２】

cgcgggtattggcaaatcgggtgcacagcccgctaaaaagagactcaatttcggtcaga
ctggcgacacagagtcagtcccagaccctcaaccaatcggagaacctcccgcagccccc
tcaggtgtgggatctcttacaatggcttcaggtggtggcgcaccagtggcagacaataa
cgaaggtgccgatggagtgggtagttcctcgggaaattggcattgcgattcccaatggc
tgggggacagagtcatcaccaccagcacccgaacctgggccctgcccacctacaacaat
cacctctacaagcaaatctccaacagcacatctggaggatcttcaaatgacaacgccta
cttcggctacagcacccccctgggggtattttgacttcaacagattccactgccacttct
caccacgtgactggcagcgactcatcaacaacaactggggattccggcctaagcgactc
aacttcaagctcttcaacattcaggtcaaagaggttacggacaacaatggagtcaagac
catcgccaataaccttaccagcacggtccaggtcttcacggactcagactatcagctcc
cgtacgtgctcgggtcggctcacgagggctgcctcccgccgttcccagcggacgttttc
atgattcctcagtacgggtatctgacgcttaatgatggaagccaggccgtgggtcgttc
gtccttttactgcctggaatatttcccgtcgcaaatgctaagaacgggtaacaacttcc
agttcagctacgagtttgagaacgtacctttccatagcagctacgctcacagccaaagc
ctggaccgactaatgaatccactcatcgaccaatacttgtactatctctcaaagactat
taacggttctggacagaatcaacaaacgctaaaattcagtgtggccggacccagcaaca
tggctgtccagggaagaaactacatacctggacccagctaccgacaacaacgtgtctca
accactgtgactcaaaacaacaacagcgaatttgcttggcctggagcttcttcttgggc
tctcaatggacgtaatagcttgatgaatcctggacctgctatggccagccacaaagaag
gagaggaccgtttctttccttttgtctggatctttaatttttggcaaacaaggaactgga
agagacaacgtggatgcggacaaagtcatgataaccaacgaagaagaaattaaaactac
taacccggtagcaacggagtcctatggacaagtggccacaaaccaccagagtgcccaa**T**
TTGTTGTTGGTCAGAGTTATgcacaggcgcagaccggctgggttcaaaaccaaggaata
cttccgggtatggtttggcaggacagagatgtgtacctgcaaggacccatttgggccaa
aattcctcacacggacggcaactttcacccttctccgctgatgggagggtttggaatga
agcacccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacacctgtacctgcggatcctccaacg
gccttcaacaaggacaagctgaactctttcatcacccagtattctactggccaagtcag
cgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaagcgctggaacccggagatcc
agtacacttccaactattacaagtctaataatgttgaatttgctgttaatactgaaggt
gtatatagtgaaccccgccccattggcaccagatacctgactcgtaatctg

(配列番号８)

ＡＡＶ－Ｓカプシドタンパク質配列

【００５６】

【化４】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLG
PGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGN
LGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLN
FGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCD
SQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFH
CHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSD
YQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
NNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAG
PSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMAS
HKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQ
SAQ**STTLYSP**AQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGG
FGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWN
PEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号９)

ＡＡＶ－ＳカプシドＤＮＡ配列

【００５７】

【化５－１】

atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacaaccttagtgaaggaattcgcgagtggtgggctttgaaacctggagcccctcaacccaaggcaaatcaacaacatcaagacaacgctcgaggtcttgtgcttccgggttacaaataccttggacccggcaacggactcgacaaggggagccggtcaacgcagcagacgcggcggccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaggccggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacgccgagttccaggagcggctcaaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagtcttccaggccaaaaagaggcttcttgaacctcttggtctggttgaggaagcggctaagacggctcctggaaagaagaggcctgtagagcagtctcctcaggaaccggactcctccgcgggtattggcaaatcgggtgcacagcccgctaaaaagagactcaatttcggtcagactggcgacacagagtcagtcccagaccctcaaccaatcggagaacctcccgcagccccctcaggtgtgggatctcttacaatggcttcaggtggtggcgcaccagtggcagacaataacgaaggtgccgatggagtgggtagttcctcgggaaattggcattgcgattcccaatggctgggggacagagtcatcaccaccagcacccgaacctgggccctgcccacctacaacaatcacctctacaagcaaatctccaacagcacatctggaggatcttcaaatgacaacgcctacttcggctacagcacccccctgggggtattttgacttcaacagattccactgccacttctcaccacgtgactggcagcgactcatcaacaacaactggggattccggcctaagcgactc

【００５８】

【化５－２】

aacttcaagctcttcaacattcaggtcaaagaggttacggacaacaatggagtcaagac
catcgccaataaccttaccagcacggtccaggtcttcacggactcagactatcagctcc
cgtacgtgctcgggtcggctcacgagggctgcctcccgccgttcccagcggacgttttc
atgattcctcagtacgggtatctgacgcttaatgatggaagccaggccgtgggtcgttc
gtcctttactgcctggaatatttcccgtcgcaaatgctaagaacgggtaacaacttcc
agttcagctacgagtttgagaacgtacctttccatagcagctacgctcacagccaaagc
ctggaccgactaatgaatccactcatcgaccaatacttgtactatctctcaaagactat
taacggttctggacagaatcaacaaacgctaaaattcagtgtggccggacccagcaaca
tggctgtccagggaagaaactacatacctggacccagctaccgacaacaacgtgtctca
accactgtgactcaaaacaacaacagcgaatttgcttggcctggagcttcttcttgggc
tctcaatggacgtaatagcttgatgaatcctggacctgctatggccagccacaaagaag
gagaggaccgtttctttcctttgtctggatctttaatttttggcaaacaaggaactgga
agagacaacgtggatgcggacaaagtcatgataaccaacgaagaagaaattaaaactac
taacccggtagcaacggagtcctatggacaagtggccacaaaccaccagagtgcccaa**T**
CTACTACGCTTTATAGTCCTgcacaggcgcagaccggctgggttcaaaaccaaggaata
cttccgggtatggtttggcaggacagagatgtgtacctgcaaggacccatttgggccaa
aattcctcacacggacggcaactttcacccttctccgctgatgggagggtttggaatga
agcacccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacacctgtacctgcggatcctccaacg
gccttcaacaaggacaagctgaactctttcatcacccagtattctactggccaagtcag
cgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaagcgctggaacccggagatcc
agtacacttccaactattacaagtctaataatgttgaatttgctgttaatactgaaggt
gtatatagtgaaccccgccccattggcaccagatacctgactcgtaatctg

(配列番号 10)

【００５９】

ＡＡＶ配列は、例えば、本明細書に示されている参照ＡＡＶ配列と少なくとも８０、８５、９０、９５、９７、または９９％同一であってもよく、例えば、好ましくは、細胞にて導入遺伝子発現を媒介するＡＡＶの能力を低減させないバリアントを挙げることができる。２つのアミノ酸配列または２つの核酸配列の同一性パーセントを決定するためには、配列を、最適な比較目的のためにアラインする（例えば、最適なアラインメントのために、第１および第２のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入してもよく、非相同配列を比較目的では無視してもよい）。好ましい実施形態では、比較目的でアラインさせる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも８０％であり、一部の実施形態では、少なくとも９０％または１００％である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第１の配列の位置が、第２の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、分子はその位置で同一である（本明細書で使用される場合、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と等価である）。２つの配列間の同一性パーセントは、２つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップの数

および各ギャップの長さを考慮に入れた、配列により共有される同一位置の数の関数である。

【００６０】

２配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。例えば、２つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（gcg.comにおいてワールドワイドウェブ上で利用可能）のＧＡＰプログラムに組み込まれているＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（(1970) J. Mol. Biol. 48:444-453）アルゴリズムを使用し、初期設定のパラメーター、例えば、ギャップペナルティが１２であり、ギャップ伸長ペナルティが４であり、フレームシフトギャップペナルティが５であるＢｌｏｓｓｕｍ６２スコアリングマトリックスを使用して決定することができる。

【００６１】

導入遺伝子

また、一部の実施形態では、ＡＡＶは、導入遺伝子配列（つまり、異種配列）、例えば、本明細書に記載の通りのもしくは当技術分野で公知の通りの治療剤、または蛍光タンパク質、例えば蛍光タンパク質、検出可能な生成物を産出する反応を触媒する酵素、または細胞表面抗原をコードする導入遺伝子を含んでいてもよい。導入遺伝子は、好ましくは、標的組織での導入遺伝子の発現を促進／駆動する配列に連結されている。

【００６２】

治療薬として使用するための例示的な導入遺伝子としては、以下のものが挙げられる：神経細胞アポトーシス阻害タンパク質（ＮＡＩＰ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、グリア由来成長因子（ＧＤＮＦ）、脳由来成長因子（ＢＤＮＦ）、繊毛様神経栄養因子（ＣＮＴＦ）、チロシンヒドロキシラーゼ（tyrosine hydroxlase）（ＴＨ）、ＧＴＰ－シクロヒドロラーゼ（ＧＴＰＣＨ）、アミノ酸デカルボキシラーゼ（ＡＡＤＣ）、アスパルトアシラーゼ（ＡＳＰＡ）、β－グロビン、ヘモグロビン、組織プラスミノーゲン活性化因子、および凝固因子などの血液因子；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）；ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９などのインターロイキン；ケラチノサイト成長因子（ＫＧＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、線維芽細胞成長因子（塩基性ＦＧＦおよび酸性ＦＧＦなどのＦＧＦ）、肝細胞成長因子（ＨＧＦ）、インスリン様成長因子（ＩＧＦ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、成長分化因子－９（ＧＤＦ－９）、肝細胞腫由来成長因子（ＨＤＧＦ）、ミオスタチン（ＧＤＦ－８）、神経成長因子（ＮＧＦ）、ニューロトロフィン、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、トロンボポイエチン（ＴＰＯ）、トランスフォーミング成長因子アルファ（ＴＧＦ－α）、および形質転換成長因子ベータ（ＴＧＦ－β）などの成長因子；可溶性ＴＮＦ－α受容体、可溶性ＶＥＧＦ受容体、可溶性インターロイキン受容体（例えば、可溶性ＩＬ－１受容体および可溶性ＩＩ型ＩＬ－１受容体）、可溶性ガンマ／デルタＴ細胞受容体、可溶性受容体のリガンド結合断片などの可溶性受容体；α－グルコシダーゼ、イミグルセラーゼ（imiglucarase）、およびβ－グルコセレブロシダーゼなどの酵素；組織プラスミノーゲン活性化因子などの酵素活性化因子;ＩＰ－１０、インターフェロンガンマにより誘導されるモノカイン（Ｍｉｇ）、Ｇｒｏａ／ＩＬ－８、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β、ＭＣＰ－１、およびＰＦ－４などのケモカイン；血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ、例えば、ＶＥＧＦ１２１、ＶＥＧＦ１６５、ＶＥＧＦ－Ｃ、ＶＥＧＦ－２）、トランスフォーミング増殖因子－ベータ、塩基性線維芽細胞増殖因子、神経膠腫由来増殖因子、アンジオゲニン、およびアンジオゲニン－２などの血管新生剤；可溶性ＶＥＧＦ受容体などの抗血管新生剤；タンパク質ワクチン；神経成長因子（ＮＧＦ）、ブラジキニン、コレシストキニン、ガストチン（gastin）、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

ＩＩ、チロトロピン放出ホルモン、血管作用性腸ペプチド、および睡眠ペプチドなどの向神経活性ペプチド；血栓溶解剤；心房性ナトリウム利尿ペプチド；リラキシン；グリア線維性酸性タンパク質；卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）；ヒトアルファ－１アンチトリプシン；白血病抑制因子（ＬＩＦ）；トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）；組織因子、黄体形成ホルモン；マ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；メタロプロテイナーゼの組織阻害剤；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；およびＩＬ－１受容体アンタゴニストなど。目的のタンパク質の一部の他の例としては、以下のものが挙げられる：繊毛様神経栄養因子（ＣＮＴＦ）；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ＶＩＩＩ因子、第ＩＸ因子、第Ｘ因子などの血友病関連凝固タンパク質；ジストロフィンまたはｎｉｎｉ－ジストロフィン（nini-dystrophin）；リソソーム酸性リパーゼ；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、およびグリコーゲンシンターゼなどの糖原病関連酵素；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）；ならびにそれらの任意のバリアント。

【００６３】

また、導入遺伝子は、抗体、例えば、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４（細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質－４；ＣＤ１５２）などに対する免疫チェックポイント抑制抗体；ＬＡＧ－３（リンパ球活性化遺伝子３；ＣＤ２２３）；ＴＩＭ－３（Ｔ細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン３；ＨＡＶＣＲ２）；ＴＩＧＩＴ（ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体）；Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２７６）；ＶＳＩＲ（Ｖセット免疫調節性受容体、ａｋａ　ＶＩＳＴＡ、Ｂ７Ｈ５、Ｃ１０ｏｒｆ５４）；ＢＴＬＡ３０（Ｂ－およびＴリンパ球アテニュエーター、ＣＤ２７２）；ＧＡＲＰ（糖タンパク質Ａ反復優勢；ＰＶＲＩＧ（ＰＶＲ関連免疫グロブリンドメイン含有）；またはＶＴＣＮ１（Ｖｓｅｔドメイン含有Ｔ細胞活性化阻害剤１、ａｋａ　Ｂ７－Ｈ４）に対する抗体をコードしてもよい。

【００６４】

他の導入遺伝子としては、標的遺伝子の発現を変更／低減する小型または抑制性核酸、例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴ、または遺伝子発現を変更する長鎖非コードＲＮＡ（例えば、国際公開第２０１２０８７９８３号パンフレットおよび米国特許出願公開第２０１４０１４２１６０号明細書を参照）、またはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９／ｃａｓ１２ａおよびガイドＲＮＡを挙げることができる。

【００６５】

また、ウイルスは、導入遺伝子の発現を促進する１つもしくは複数の配列、例えば、１つもしくは複数のプロモーター配列；エンハンサー配列、例えば５’非翻訳領域（ＵＴＲ）もしくは３’ＵＴＲ；ポリアデニル化部位；および／またはインスレーター配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、プロモーターは、脳組織特異的プロモーター、例えば、ニューロン特異的またはグリア特異的プロモーターである。ある特定の実施形態では、プロモーターは、ニューロン核（ＮｅｕＮ）、グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）、ＭｅＣＰ２、大腸腺腫性ポリポーシス（ＡＰＣ）、イオン化カルシウム結合アダプター分子１（Ｉｂａ－１）、シナプシンＩ（ＳＹＮ）、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、チューブリンアルファＩ、ニューロン特異的エノラーゼ、および血小板由来成長因子ベータ鎖から選択される遺伝子のプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、汎細胞タイププロモーター、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ベータグルクロニダーゼ（ＧＵＳＢ）、ユビキチンＣ（ＵＢＣ）、またはラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーターである。ウッドチャック肝炎ウイルス転写後応答エ

レメント（ＷＰＲＥ）も使用することができる。
【００６６】
　また、一部の実施形態では、ＡＡＶは、標的組織、例えばＣＮＳへの送達を増加させるかもしくは組織オフターゲットを低減させる１つもしくは複数の追加の突然変異、例えば、ＣＮＳ、心臓、もしくは筋肉送達が意図されている場合は、肝臓送達を減少させる突然変異（例えば、Pulicherla et al. (2011) Mol Ther 19:1070-1078に記載の通りの）；あるいは例えば、Chen et al. (2008) Nat Med 15:1215-1218もしくはXu et al., (2005) Virology 341:203-214または米国特許第９１０２９４９号明細書、米国特許第９５８５９７１号明細書、および米国特許出願公開第２０１７０１６６９２６号明細書に記載の通りの他のペプチドの付加を有する。また、sfn.org/~/media/SfN/Documents/Short%20Courses/ 2011%20Short%20Course%20I/2011_SC1_Gray.ashx.で利用可能な、Gray and Samulski (2011) "Vector design and considerations for CNS applications," in Gene Vector Design and Application to Treat Nervous System Disorders ed. Glorioso J., editor. (Washington, DC: Society for Neuroscience;) 1-9を参照されたい。
【００６７】
　使用方法
　本明細書に記載の方法および組成物を使用して、任意の組成物、例えば目的の配列を、組織に、例えば、中枢神経系（脳）、心臓、筋肉、末梢神経系（例えば、後根神経節または脊髄）に、または内耳に、または網膜に送達することができる。一部の実施形態では、方法は、特定の脳領域、例えば、皮質、小脳、海馬、黒質、扁桃体への送達を含む。一部の実施形態では、方法は、例えば、くも膜下腔または硬膜外腔への腰椎送達を含む。一部の実施形態では、方法は、ニューロン、アストロサイト、またはグリア細胞への送達を含む。一部の実施形態では、方法は、内有毛細胞および／または外有毛細胞、らせん神経節ニューロン、支持細胞、または内耳の線維細胞への送達を含む。一部の実施形態では、方法は、光受容体、介在ニューロン、網膜神経節細胞（例えば、ＡＡＶ－Ｆを使用）、または網膜の網膜色素上皮（ＲＰＥ）（例えば、ＡＡＶ－Ｓを使用）への送達を含む。
【００６８】
　一部の実施形態では、方法、および組成物、例えばＡＡＶは、疾患、例えばＣＮＳの疾患を有する対象に核酸配列を送達するために使用される。例えば、米国特許第９１０２９４９号明細書、米国特許第９５８５９７１号明細書、および米国特許出願公開第２０１７０１６６９２６号明細書を参照されたい。一部の実施形態では、対象は、表１～３に列挙されている状態を有する。一部の実施形態では、ベクターは、表１～３に列挙されている治療剤を送達して、表１～３に列挙されている対応する疾患を治療するために使用される。治療剤は、例えば、ウイルスベクターを介して、治療用タンパク質、もしくはアンチセンスオリゴ、ｓｉＲＮＡ、およびｓｈＲＮＡなどの他の核酸をコードする核酸として送達してもよく、または本明細書に記載の通りのペプチドとの融合タンパク質／複合体として送達してもよい。
【００６９】
　本明細書に記載の方法および組成物を使用して、それを必要とする対象のこうした状態を、状態の１つまたは複数の症状の改善、リスク低減、または発症遅延に十分な、治療用導入遺伝子を保有する治療有効量のＡＡＶを投与することにより、を治療することができる。
【００７０】

【表１】

表 1. CNS 標的(AAV-F、AAV-S)

疾患	標的遺伝子	標的細胞/組織	参考文献
アルツハイマー病	*CD33, APOE, BACE,*	脳	(Griciuc et al., 2013)
パーキンソン病	*GDNF, AADC*	脳 ニューロン	(Christine et al., 2019)
X 連鎖副腎白質ジストロフィー	*ABCD1*	脳/脊髄 ニューロン/アストロサイト/ミクログリア/内皮細胞	(Eichler et al., 2017; Gong et al., 2015)
カナバン病	*ASPA*	脳	(Leone et al., 2012)
ニーマンピック病	*NPC1*	脳	(Hughes et al., 2018)
脊髄性筋萎縮症	*SMN*	運動ニューロン	(Al-Zaidy et al., 2019)
ハンチントン病	*HTT*	脳 ニューロン	(Caron et al., 2020; Keskin et al., 2019)

【００７１】
【表２】

表 2. 内耳標的(AAV-S)

疾患	標的遺伝子	標的細胞/組織	参考文献
コネキシン-26	***GJB2***	内耳 - 蝸牛 線維細胞/支持細胞	**ARO 2020**
アッシャー3A 型*	***CLRN1***	内耳 - 蝸牛 *有毛細胞(内および外)*	**(György et al., 2019)**
アッシャー2D 型*	***WHLN***	内耳 - 蝸牛 *有毛細胞(内および外)*	**(Isgrig et al., 2017)**
有毛細胞関連聴力喪失	***ATOH1***	内耳 - 蝸牛 支持細胞(HC 再生のため)	**(Tan et al., 2019)**
有毛細胞関連聴力喪失 (DFNB7/11)	***TMC1***	内耳 - 蝸牛 *有毛細胞(内および外)*	**(Nist-Lund et al., 2019)**
内有毛細胞関連聴力喪失 (DFNB9)	***OTOF***	内耳 - 蝸牛 *内有毛細胞*	**(Akil et al., 2019)**
アッシャー1F 型*	***PCDH15***	内耳 - 蝸牛 *有毛細胞(内および外)*	**(Zhang et al., 2018)** に総説
アッシャー1B 型*	***Myo7a***	内耳 - 蝸牛 *有毛細胞(内および外)*	**(Lopes and Williams, 2015)**に総説

*アッシャー症候群は、上記のような難聴および網膜色素変性症による失明の両方を引き起こす。

【００７２】

【表３】

表 3. 末梢標的(AAV-F、AAV-S)

疾患	標的遺伝子	標的細胞/組織	参考文献
網膜色素変性症 (RP;非症候性)	*RHO*、*RPGR*、*RP2*、*NRL*、*その他*	網膜 (光受容体)	(Cehajic-Kapetanovic et al., 2020; Millington-Ward et al., 2011; Mookherjee et al., 2015; Yu et al., 2017)
レーバー先天性黒内障	*RPE65*	網膜 (網膜色素上皮)	(Maguire et al., 2019)
レーバー遺伝性視神経症	*ND1-6* (ミトコンドリア)	網膜 (網膜神経節細胞)	(Wan et al., 2016; Yang et al., 2016)
アッシャー症候群 (RP;難聴を伴う症候群)	上記に列挙されているアッシャー遺伝子	網膜 (光受容体)	同上
デュシェンヌ筋ジストロフィー	ジストロフィン	筋肉	(Duan, 2018)に総説
同種移植血管症	*TIMP-1*	心臓	(Remes et al., 2020)
血友病 A および B	*FVIII, FIX*	肝臓	(Nathwani, 2019)に総説

【００７３】

医薬組成物および投与方法

本明細書に記載の方法は、ＡＡＶを活性成分として含む医薬組成物の使用を含む。

【００７４】

医薬組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という言語は、生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤、および抗真菌剤、等張剤、および吸収遅延剤などを含み、薬剤投与と適合性である。

【００７５】

医薬組成物は、典型的には、その意図されている投与経路と適合性を有するように製剤化される。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、髄腔内、筋肉内、または注射もしくは注入投与が挙げられる。したがって、送達は、全身性であってもよくまたは局所性であってもよい。例えば、内耳に送達する場合は、正円窓膜の上からもしくはそれを通して、正円窓に隣接する外科的蝸牛切開術による穿孔を通して、骨性卵円窓の窓を通して、または半規管を通して適用することによる蝸牛への送達を使用することができ（例えば、Kim et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2019 Jan 11; 13:197-204；Ren et al., Front Cell Neurosci. 2019; 13: 323を参照されたい）;網膜に送達する場合は、網膜下または硝子体内注射を使用することができる（例えば、Ochakovski et al., Front Neurosci. 2017; 11: 174; Xue et al., Eye (Lond). 2017 Sep ;31(9):1308-1316を参照）。

【００７６】

好適な医薬組成物を製剤化するための方法は、当技術分野で公知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005；およびDrugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY)シリーズの書籍を参照されたい。例えば、非経口応用に使用される溶液または懸濁

物は、以下の成分を含んでいてもよい：注射用水、生理食塩溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗細菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの緩衝剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの、張度を調整するための作用剤。ｐＨは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。非経口製剤は、アンプル、使い捨て注射器、またはガラス製もしくはプラスチック製の複数用量バイアルに封入されていてもよい。

【００７７】

注射可能な使用に好適な医薬組成物としては、無菌水溶液（水溶性の場合）または分散物、および無菌注射用溶液または分散物を即時調製するための無菌粉末を挙げることができる。静脈内投与の場合、好適な担体としては、生理的食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ、パーシッパニー、ニュージャージー州）またはリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。すべての場合において、組成物は無菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度に流動性であるべきである。組成物は、製造および保管の条件下で安定性であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、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（polyetheylene glycol）など）、およびそれらの好適な混合物を含む溶媒または分散媒であってもよい。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散物の場合は、必要な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。微生物作用の防止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、およびチメロサールなどにより達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖；マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール；塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましいだろう。注射用組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる作用剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることによりもたらすことができる。

【００７８】

無菌注射用溶液は、上記に列挙されている成分の１つまたは組合せと共に、必要な量の活性化合物を適切な溶媒に組み込み、続いて必要に応じて濾過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散物は、活性化合物を、基本分散媒および上記に列挙されているものから必要な他の成分を含む無菌ビヒクルに組み込むことにより調製される。無菌注射用溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これらにより、その以前に滅菌濾過された溶液に由来する活性成分ならびに任意の追加の所望の成分の粉末が産出される。

【００７９】

一実施形態では、治療用化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤など、治療用化合物を体内から急速に排除されることを防ぐことになる担体を用いて調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの、生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤は、標準的技法を使用して調製することができるか、または例えば、Ａｌｚａ　ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎおよびＮｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃから商業的に入手することができる。リポソーム懸濁物（細胞抗原に対するモノクローナル抗体を有する、選択された細胞を標的とするリポソームを含む）も、薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号明細書に記載のような、当業者に公知の方法に従って調製することができる。

【００８０】

医薬組成物は、投与説明書と共に、キット、容器、パック、またはディスペンサーに含まれていてもよい。例えば、キットは、本明細書に記載の通りのペプチドを含むＡＡＶを

含む組成物を含んでいてもよい。
【実施例】
【００８１】
本発明は、以下の実施例にさらに記載されており、特許請求の範囲に記載されている本発明の範囲は、それらにより限定されない。
【００８２】
物質および方法
別様の記載がない限り、下記の実施例では、以下の物質および方法を使用した。
【００８３】
ＡＡＶライブラリー構築
ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅプラスミド：ｐＡＡＶ－ＣＢＡ－Ｃｒｅ－^{ｍｕｔ}－ｐ４１－Ｃａｐ９ｄｅｌ
本発明者らは、ｐＡＡＶ－ＣＢＡ－Ｃｒｅ^{ｍｕｔ}－ｐ４１－Ｃａｐ９ｄｅｌと呼ばれるｉＴｒａｎｓｄｕｃｅライブラリー骨格プラスミドを構築した。これには、２つの発現カセット：１）本発明者らにより偏在性プロモーターＣＢＡ下の突然変異Ｃｒｅ　ｃＤＮＡ（ＣＣＧ－＞ＣＣＴ、Ｐｒｏ１５アミノ酸をコードするが、元々存在するＡｇｅＩ部位が排除される）が導入されたＣＢＡ－Ｃｒｅ^{ｍｕｔ}、２）ＡＡＶ５　ｐ４１プロモーター下のＡＡＶ９カプシド遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＦ０８５７１６．１の残基１６８０～１９７４）およびＡＡＶ２　ｒｅｐ遺伝子のスプライシング配列（^{12}に記載されているものと同様）で構成されているｐ４１－Ｃａｐ９ｄｅｌがシス位に含まれている。
【００８４】
ＫｐｎＩおよびＳａｌＩ制限部位により隣接されている突然変異Ｃｒｅ　ｃＤＮＡ（Ｃｒｅ^{ｍｕｔ}）ならびにｐ４１－ＣＡＰ９（ｄｅｌ）－ポリＡ断片は両方とも、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔにより合成され、ｐｕＣ５７骨格にクローニングされた。本発明者らは、まず、本発明者らのｐＡＡＶ－ＣＢＡ－ＷＰＲＥ骨格（ＮｃｏＩ－ｂｌｕｎｔ／ＳａｌＩで開環し、それにより元々存在していたｅＧＦＰ－ＷＰＲＥ断片を排除した）のｅＧＦＰ－ＷＰＲＥの代わりに、突然変異Ｃｒｅ　ｃＤＮＡ（断片ＫｐｎＩ－ｂｌｕｎｔ、ＳａｌＩ）をサブクローニングすることにより、ｐＡＡＶ－ＣＢＡ－Ｃｒｅ^{ｍｕｔ}－ポリＡプラスミドを構築した。次いで、本発明者らは、一意のＸｂａＩ部位の作出を可能にするＫ４４９Ｒ突然変異をＣａｐ９配列に保有し、ＸｂａＩ制限部位とＡｇｅＩ制限部位との間の４４７ｂｐ　Ｃａｐ配列が欠失されていたｐ４１－Ｃａｐ９ｄｅｌ断片を導入した。
【００８５】
ランダム７量体ペプチドｃａｐ断片を生成するための、およびＰＣＲにより回収されるＣＡＰ９断片をサブクローニングするためのプラスミド：ｐＵＣ５７－Ｃａｐ９－ＸｂａＩ／ＫｐｎＩ／ＡｇｅＩ
本発明者らは、まず、ＸｂａＩ部位／ＡｇｅＩ部位間のＡＡＶ９カプシド配列の４４７ｂｐ領域（ｐＡＡＶ－ＣＢＡ－Ｃｒｅ^{ｍｕｔ}－ｐ４１－Ｃａｐ９ｄｅｌに欠けている配列）を、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ（ピスカタウエイ、ニュージャージー州）により合成してもらい、ｐＵＣ５７－Ｋａｎプラスミドにサブクローニングしてもらった。このカプシド配列では、Ｄｅｖｅｒｍａｎら（２０１５年）により記載されているようなＷＴ　ＡＡＶ９の制限消化除去を可能にする、この４４７ｂｐ領域ＷＴ　ＡＡＶ９　ｃａｐのＥａｒＩ部位が同様に除去されている。これにより、一意のＫｐｎＩ部位も作出される。ｐＵＣ５７－Ｃａｐ９－ＸｂａＩ／ＫｐｎＩ／ＡｇｅＩのｃａｐ断片を使用して、ＡＡＶ９　ＶＰ１のアミノ酸５８８および５８９をコードするヌクレオチド間に挿入されたランダム２１量体ヌクレオチド配列（７量体ペプチドをコードする）の初期ライブラリーを生成した。本発明者らは、Ｄｅｖｅｒｍａｎら（２０１５年）と同様の戦略を使用した。手短に言うと、ｐＵＣ５７－Ｃａｐ９－ＸｂａＩ／ＫｐｎＩ／ＡｇｅＩは、ｃａｐ　ＤＮＡを増幅し、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを使用してランダム２１量体配列を挿入するための鋳型としての役目を果たした。プライマー情報：ＸＦ－ｅｘｔｅｎｄ（５’ＧＴＡＣＴＡＴＣＴＣＴＣＴＡＧＡＡＣｔａｔｔａａｃｇｇｔｔｃ３’；配列番号１１）およびリバー

スプライマー５８８ｉＲｅｖ　５’（ＧＴＡＴＴＣＣＴＴＧＧＴＴＴＴＧＡＡＣＣＣＡＡＣＣＧＧＴＣＴＧＣＧＣＣＴＧＴＧＣＸＭＮＮＭＮＮＭＮＮＭＮＮＭＮＮＭＮＮＭＮＮＴＴＧＧＧＣＡＣＴＣＴＧＧＴＧＧＴＴＴＧＴＧ３’；配列番号１２）。配列中、ＭＮＮ反復は、ランダム化２１量体ヌクレオチドを指す（ＩＤＴから購入）。ＸＦ－ｅｘｔｅｎｄおよび５８８ｉＲｅｖを、Ｐｈｕｓｉｏｎポリメラーゼ（ＮＥＢ）および鋳型としてのｐＵＣ５７－Ｃａｐ９－ＸｂａＩ／ＫｐｎＩ／ＡｇｅＩによるＰＣＲに使用した。４４７ｂｐのＰＣＲ産物を、ＸｂａＩおよびＡｇｅＩにより３７℃にて一晩消化し、産物をゲル精製した（Ｑｉａｇｅｎ）。同様に、ｐＡＡＶ－ＣＢＡ－Ｃｒｅ－^{ｍｕｔ}－ｐ４１－Ｃａｐ９ｄｅｌを、ＸｂａＩおよびＡｇｅＩで消化し、ゲル精製した。次に、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ（ＮＥＢ）によるライゲーション反応（室温で１時間）を、３：１のｃａｐインサート対ベクターモル比を使用して実施した。その後のライゲーションされたプラスミドは、ｐＡＡＶ－ＣＢＡ－Ｃｒｅ－^{ｍｕｔ}－ｐ４１－Ｃａｐ９－７量体と呼び、ＡＡＶ９　ＶＰ１の５８８および５８９をコードするヌクレオチド間のｃａｐ遺伝子にランダム７量体ペプチドが挿入されたプラスミドのプールを含んでいた。

【００８６】

このプラスミド（ｐＵＣ５７－Ｃａｐ９－ＸｂａＩ／ＫｐｎＩ／ＡｇｅＩ）を、脳組織からＰＣＲにより増幅されたＣＡＰ９断片をサブクローニングするための本発明者らのレシピエントプラスミドとしても使用した。本発明者らは、ＳａｃＩおよびＮｓｉＩで消化し、ライゲーションすることにより、ｐＵＣ５７プラスミドの上流ＫｐｎＩ部位を除去した。これにより、カプシド断片のＫｐｎＩ部位を一意にすることが可能になった。以下を参照されたい。

【００８７】

Ｒｅｐ発現プラスミド

本発明者らは、Ｄｅｖｅｒｍａｎら[12]と同様の戦略を使用して、ｐＡＲ９－Ｃａｐ９－ｓｔｏｐ／ＡＡＰ／Ｒｅｐと呼ばれるｒｅｐ発現プラスミドを構築した。ｃＤＮＡ全体は、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔにより合成され、ｐＵＣ５７－Ｋａｎプラスミドにクローニングされた。ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３の開始コドンの代わりに終止コドンを挿入したため、親ＡＡＶ９カプシドは産生されなかったが、ＡＡＰおよびｒｅｐの発現は維持された。

【００８８】

ＡＡＶライブラリー産生および精製

各産生で、本発明者らは、１５ｃｍ組織培養皿に１．５×１０[7]個の２９３Ｔ細胞／皿を播種した。翌日、リン酸カルシウム法を使用して、アデノウイルスヘルパープラスミド（ｐＡｄΔＦ６、１プレート当たり２６μｇ）、ｒｅｐプラスミド（ｐＡＲ９－Ｃａｐ９－ｓｔｏｐ／ＡＡＰ／Ｒｅｐ、１プレート当たり１２μｇ）、およびＩＴＲ隣接ＡＡＶライブラリー（ｐＡＡＶ－ＣＢＡ－Ｃｒｅ－ｍｕｔ／ｐ４１－Ｃａｐ９－７量体、１プレート当たり１μｇ）を細胞にトランスフェクトして、ＡＡＶの産生を誘導した。トランスフェクション翌日に、培地を、２％ＦＢＳを含むＤＭＥＭに交換した。イオジキサノール密度勾配超遠心分離を使用して、ＡＡＶを細胞ライセートから精製した。ＺＥＢＡスピンカラム（７Ｋ　ＭＷＣＯ；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してＰＢＳへの緩衝液交換を行い、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１００ｋＤａ　ＭＷＣＯ限外濾過遠心分離デバイス（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用してさらなる濃縮を実施した。ベクターは、使用するまで－８０℃で保管した。本発明者らは、ＩＴＲ配列特異的プライマーおよびプローブを用いたＴａｑＭａｎ　ｑＰＣＲを使用して、ＡＡＶ調製物中のＡＡＶゲノムコピー数（ｖｇ）を定量化した[20、21]。

【００８９】

ライブラリーの次世代シーケンシング

プラスミドＡＡＶ９ライブラリープールに対して次世代シーケンシングを実施し、ならびにカプシドのパッケージングを追跡した。また、ｃａｐ断片のＰＣＲレスキューに続いてシーケンシングを実施した（脳組織から、またはフローサイトメトリーで選別した単離ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞からのいずれか）。各選択ラウンドで、インサート含有領域に

対応するウイルスＤＮＡを、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏｌａｂｓのＰｈｕｓｉｏｎ Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ＰＣＲキットを使用したＰＣＲで増幅した（フォワードプライマー：５’－ＡＡＴＣＣＴＧＧＡＣＣＴＧＣＴＡＴＧＧＣ－３’（配列番号１３）、リバースプライマー：５’－ＴＧＣＣＡＡＡＣＣＡＴＡＣＣＣＧＧＡＡＧ－３’（配列番号１４））。ＰＣＲ増幅は、Ｑ５ポリメラーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して実施した。一意のバーコードアダプターを各試料にアニーリングし、試料をＩｌｌｕｍｉｎａ Ｍｉｓｅｑ（１５０ｂｐリード）でシーケンシングした。１試料当たりおよそ５０～１００，０００個のリードを分析した。シーケンシング出力ファイルを、まず、ＦａｓｔＱＣ（ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．ｂａｂｒａｈａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｐｒｏｊｅｃｔｓ／ｆａｓｔｑｃ／）を使用して品質チェックし、Ｐｙｔｈｏｎで特注作成されたプログラムで分析した。手短に言えば、配列を、インサートの有無に基づいて分別し、次いで、インサート含有配列を基線参照配列と比較し、検出された一意のインサートの各々の発生率に基づき、無エラーリードを表にした。インサートを翻訳し、正規化した。

【００９０】

動物

動物実験はすべて、国立衛生研究所の実験動物の管理および使用に関するガイドに定められているガイドラインに従って、マサチューセッツ総合病院の研究動物管理小委員会による承認を受けた。本発明者らは、成体年齢（８～１０週齢）のＡｉ９（系統番号００７９０９）、Ｃ５７ＢＬ／６（系統番号０００６６４）、およびＢＡＬＢ／ｃ（系統番号０００６５１）マウスを使用した。これらはすべてＴｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、バーハーバー、メイン州からのものだった。動物はすべて注射３週間後に安楽死させ、経心的に灌流した。組織を採取し、ＰＢＳ中の４％パラホルムアルデヒドで固定したか、液体窒素で急速凍結したか、またはフローサイトメトリーのために分離した。

【００９１】

脳向性カプシドのｉｎ ｖｉｖｏ選択

Ａｉ９マウスに、結果セクションに示されている、単位がｖｇの用量を静脈内（尾静脈）に注射し、注射３週間後にマウスを安楽死させ、組織を採取した。

【００９２】

イソフルオラン（isofluorane）でマウスに深い麻酔をかけ、断頭した。ラウンド１用に、脳を素早く解剖し、２つの冠状切片（厚さ２ｍｍ）を採取した。一方の切片を使用して全脳ＤＮＡを抽出した（ＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｋｉｔｓ、Ｑｉａｇｅｎ、ヒルデン、ドイツ）。他方の冠状切片を、４％ＰＦＡで固定し、免疫組織学のためにパラフィン包埋した（Ｒｏｃｋｌａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌｓのウサギ抗ＲＦＰ抗体を使用したＤＡＢ染色により、各選択ラウンド後にｔｄｔｏｍａｔｏ陽性細胞を検出した）。次いで、ラウンド２用に、脳組織を、かみそり刃で１mm^3小片に切断し、製造業者の説明書に従って、パパイン分離（Ｐａｐａｉｎ Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ、Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ）により神経細胞を単離した。分離後、ミエリンを除去し（Ｍｉｌｔｅｎｙｉのミエリン除去ビーズＩＩ、ヒト、マウス、ラット）、Ｔｄ－ｔｏｍａｔｏ陽性細胞を、Ｓ３ｅＴＭ細胞選別機（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で選別した。まず細胞破片を除外するためにゲート設定し、シングレットのみを選択することにより細胞を選別した。ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ－Ｃｒｅを注射したＡｉ９（陽性対照）およびＰＢＳを注射したＡｉ９マウス（陰性対照）に由来する細胞懸濁物を使用してゲート設定し、ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性および陰性細胞を選別した。選別後、ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞を、遠心分離により直ちにペレット化し、ＡＲＣＴＵＲＵＳ ＰｉｃｏＰｕｒｅ ＤＮＡ抽出キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用してＤＮＡを抽出した。

【００９３】

ＤＮＡ抽出後、Ｃａｐ９インサート（７量体ペプチドをコードする２１量体配列を含む）を、以下のプライマーを使用して増幅した：Ｃａｐ９＿Ｋｐｎ／Ａｇｅ＿Ｆｏｒ：５’－ＡＧＣＴＡＣＣＧＡＣＡＡＣＡＡＣＧＴＧＴ－３’（配列番号１５）およびＣａｐ９＿Ｋｐｎ／Ａｇｅ＿Ｒｅｖ：５’－ＡＧＡＡＧＧＧＴＧＡＡＡＧＴＴＧＣＣＧＴ－３’（配列番号

１６）（Ｐｈｕｓｉｏｎ Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ＰＣＲキット、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）。次いで、アンプリコンを精製し（Ｍｏｎａｒｃｈ ＰＣＲ＆ＤＮＡクリーンアップキット、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）、ＫｐｎＩ、ＡｇｅＩ、ＢａｎＩＩで消化し、Ｃａｐ９ ＫｐｎＩ－ＡｇｅＩ断片（１４４ｂｐ）をアガロースゲルで精製してから（Ｍｏｎａｒｃｈ ＤＮＡゲル抽出キット、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）、ｐＵＣ５７－Ｃａｐ９－ＸｂａＩ／ＡｇｅＩ／ＫｐｎＩプラスミド（ＫｐｎＩおよびＡｇｅＩで開環されており、Ｃａｌｆイノシトールホスファターゼで脱リン酸化されている。Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）にライゲーションした。ライゲーション産物をエレクトロコンピテントＤＨ５アルファ細菌（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）に形質転換し、形質転換物全体を、ＬＢ－アンピシリン培地で一晩成長させた。ｐＵＣ５７－Ｃａｐ９－ＸｂａＩ／ＡｇｅＩ／ＫｐｎＩプラスミドを、ｍａｘｉ ｐｒｅｐ（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。プラスミドをＸｂａＩ／ＡｇｅＩで消化して４４７ｂｐのｃａｐ断片を放出させ、それをゲル精製し、次のラウンドのＡＡＶライブラリー産生のために、同様に切断したｐＡＡＶ－ＣＢＡ－Ｃｒｅ－ｍｕｔ／ｐ４１－Ｃａｐ９ｄｅｌにライゲーションした。

【００９４】

ベクター産生のための、ＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ－Ｓペプチドインサートを含むＡＡＶｒｅｐ／ｃａｐプラスミド

目的の導入遺伝子（例えば、ＧＦＰ）をコードするベクターを産生するための目的のペプチドインサートを提示するＡＡＶ９カプシドをコードするｒｅｐ／ｃａｐプラスミドを作出するために、本発明者らは、ペプチド配列挿入のためのＶＰ３アミノ酸５８８部位に隣接する断片を除去するＢｓｉＷＩおよびＢａｅＩを用いてＡＡＶ９ ｒｅｐ／ｃａｐプラスミドを消化した。次に、本発明者らは、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＩＤＴ、コーラルビル、アイオワ州）に、ＢｓｉＷＩ／ＢａｅＩ切断ＡＡＶ９と重複するギブソン相同性アーム、ならびに目的のペプチドをＶＰ３のアミノ酸５８８後にインフレームでコードする２１量体ヌクレオチド配列を含む、９９７ｂｐのｄｓＤＮＡ断片を発注した。最後に、本発明者らは、Ｇｉｂｓｏｎ Ａｓｓｅｍｂｌｙ（登録商標）Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（ＮＥＢ、イプスウィッチ、マサチューセッツ州）を使用してＧｉｂｓｏｎ Ａｓｓｅｍｂｌｙを実施して、インサートを含むペプチドをＡＡＶ９ ｒｅｐ／ｃａｐプラスミドにライゲーションした。

【００９５】

形質導入分析のためのＡＡＶベクター

各産生で、本発明者らは、１５ｃｍ組織培養皿に１．５×10^{7}個の２９３Ｔ細胞／皿を播種した。翌日、リン酸カルシウム法を使用して、アデノウイルスヘルパープラスミド（ｐＡｄΔＦ６、１プレート当たり２６μｇ）、ｒｅｐ／ｃａｐプラスミド（ＡＡＶ９、ＡＡＶ－Ｆ、ＡＡＶ－Ｓ；１プレート当たり１２μｇ）、およびＩＴＲ隣接導入遺伝子カセットプラスミド（一本鎖ＡＡＶ－ＣＢＡ－ＧＦＰ－ＷＰＲＥ^{22}、１プレート当たり１０μｇ）を細胞にトランスフェクトして、ＡＡＶの産生を誘導した。トランスフェクションの翌日に、培地を、２％ＦＢＳを含むＤＭＥＭに交換した。イオジキサノール密度勾配超遠心分離を使用して、ＡＡＶを細胞ライセートから精製した。ＺＥＢＡスピンカラム（７Ｋ ＭＷＣＯ；Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してＰＢＳへの緩衝液交換を行い、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １００ｋＤａ ＭＷＣＯ限外濾過遠心分離デバイス（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用してさらなる濃縮を実施した。ベクターは、使用するまで－８０℃で保管した。本発明者らは、ＢＧＨポリＡ配列特異的プライマーおよびプローブを使用したＴａｑＭａｎ ｑＰＣＲを使用して、ＡＡＶ調製物中のＡＡＶゲノムコピー数を定量化した^{23}。

【００９６】

動物安楽死および組織採取

マウス（各図に示されている系統）に、無菌ＰＢＳで希釈した２００μｌの試験ＡＡＶベクター（低用量：４×10^{12}ｖｇ／ｋｇおよび高用量：３．２×10^{13}ｖｇ／ｋｇ）

を外側尾静脈からゆっくりと注射し、その後、出血が止まるまで注射部位を穏やかに指でつまんだ。注射の３週間後、マウスを安楽死させ、無菌冷却リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で経心的に灌流した。次に、脳を縦方向に２つの半球に二分した。一方の半球を、ＰＢＳで希釈した１５％グリセロール／４％パラホルムアルデヒドで４８時間にわたって後固定し、続いて３０％グリセロールでさらに４８～７２時間にわたって凍結保存した。また、高用量コホートでは、免疫組織学のために、心臓、筋肉（腓腹筋）、および網膜の小型片を処理した。本発明者らは、ＡＡＶ－Ｓ、ＡＡＶ－Ｆ、およびＡＡＶ９の３つの独立調製物を製作した（表Ｉ）。マウスでの形質導入結果は、各ベクターの１つの調製物からのものだったが、本発明者らは、そうした結果をさらに２つの独立実験で再現した。

【００９７】

ＡＡＶ－ＣＢＡ－ＧＦＰ形質導入神経およびニューロン細胞集団の免疫組織学および高倍率画像

クリオスタットミクロトームを使用して、冠状浮遊切片（４０μｍ）を切断した。ｔｒｉｓ緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）緩衝液でグリセロールを洗い流した後、凍結切片を、ＴＢＳ中０．５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（ＡｍｅｒｉｃａｎＢｉｏ）で３０分間室温にて透過処理し、５％正常ヤギ血清（または正常ロバ血清）およびＴＢＳ中０．０５％Ｔｒｉｔｏｎで１時間室温にてブロッキングした。一次抗体を、２．５％ＮＧＳおよび０．０５％Ｔｒｉｔｏｎを含むＴＢＳ中で４℃にて一晩インキュベートし、翌日に、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ４８８または－Ｃｙ３コンジュゲート二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ボルチモア、米国）を１時間インキュベートした。この研究に使用した一次抗体は、ニワトリ抗ＧＦＰ（Ａｖｅｓ Ｌａｂｓ、タイガード、米国）、マウス抗ＮｅｕＮ（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、バーリントン、米国）；ウサギ抗グルタミンシンテターゼ（Ａｂｃａｍ、ケンブリッジ、米国）；ウサギ抗Ｏｌｉｇ２（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、バーリントン、米国）；ウサギ抗Ｉｂａ１（Ｗａｋｏ、日本）；ウサギ抗ＣａｍＫＩＩ（Ａｂｃａｍ、ケンブリッジ、米国）；マウス抗ＧＡＤ６７（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、バーリントン、米国）；ウサギ抗ＣｈＡＴ（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、バーリントン、米国）；マウス抗カルビンジン（Ａｂｃａｍ、ケンブリッジ、米国）；およびウサギ抗ＴＨ（Ｎｏｖｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、リトルトン、米国）だった。ＤＡＰＩを有するＶｅｃｔａｓｈｉｅｌｄ封入剤で切片を封入した（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、バーリンゲーム、米国）。

【００９８】

各ベクターにより形質導入された神経細胞タイプを同定し、ＡＡＶ－Ｆにより標的とされた種々のニューロンサブタイプを調査するために、ＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎソフトウェアおよび６０×対物レンズを備えたＺｅｉｓｓ Ａｘｉｏ Ｉｍａｇｅｒ Ｚ落射蛍光顕微鏡を使用して、ＧＦＰと各細胞マーカーとの共局在化を示す高解像度画像を撮影した。

【００９９】

グローバルＧＦＰシグナルカバレッジの画像化および定量化

脳および肝臓切片における天然ＧＦＰ蛍光シグナル全体を定量化するために、ロボットスライドスキャナー仮想スライド顕微鏡ＶＳ１２０（Ｏｌｙｍｐｕｓ）を使用し、Ｏｌｙｍｐｕｓ ＵＰＬＳＡＰＯ １０×対物レンズを使用して、スライドのバッチ全体を一度に画像化した。バラツキを低減するため、スライドのバッチ全体を１回のセッションで画像化した。ＧＦＰの初期露光時間は、蛍光シグナルがすべての実験群にわたって不飽和でもなく過飽和でもないように設定し、バッチスキャン全体にわたって変化させずに維持した。スライドの順序を無作為化し、最終的な統計分析まで盲検を維持した。次いで、Ｏｌｙｍｐｕｓ ｃｅｌｌＳｅｎｓ Ｓｔａｎｄａｒｄソフトウェアを使用して、各脳区画のＧＦＰカバレッジパーセントを分析した。まず、目的領域（ＲＯＩ）を、「ＲＯＩ－ｐｏｌｙｇｏｎ」ツールを使用して画定した。本発明者らは、分析したすべてのスライドのＧＦＰチャンネルに同様の検出閾値を適用した後、この初期ＲＯＩ内のＧＦＰ陽性面積を定量化した（閾値は、すべてのマウス脳切片の分析で同様のレベルに設定したが、すべてのマウス肝臓切片およびすべてのラット脳切片の分析には異なる閾値を適用した）。次いで、Ｒ

ＯＩの総表面に応じたＧＦＰ陽性面積のパーセンテージを算出した。本発明者らは、自己蛍光レベルを上回るｅＧＦＰ蛍光強度の閾値を設定したため、本発明者らの分析では自己蛍光シグナルが考慮された（ＡＡＶ－ＧＦＰ形質導入細胞からのシグナルのみが考慮されることを確実にするため）。加えて、本発明者らは、高レベルの自己蛍光を示す可能性があるため、切片の端部直近を避けて各脳切片の各ＲＯＩを設定した。また、脳室腔を本発明者らの分析から除外した。最後に、マウス１匹当たり３つの技術的複製（脳切片）を測定し、分析の最終ステップまですべての測定を盲検で行った。

【０１００】

形質導入アストロサイトおよびニューロンのパーセンテージの立体解析学に基づく定量分析

ＧＦＰおよびＮｅｕＮ（ニューロンマーカー）またはＧＦＰおよびＧＳ（グルタミンシンテターゼ、汎アストロサイトマーカー）で脳切片を共染色した後、立体解析学に基づく研究を、以前の記載[24、25]の通りに実施した。本発明者らは、ミクログリアおよびオリゴデンドロサイトは、こうした細胞タイプの相当量が形質導入されなかったため、この分析には含めなかった。ＡＡＶ形質導入ニューロンおよびアストロサイトのパーセンテージの立体解析学的評価は、初期に注射したベクターが何であったかを分からなくした後、ＤＰ７０デジタルＣＣＤカメラ、Ｘ－Ｃｉｔｅ蛍光ランプ、および付属のＣＡＳＴ立体解析学ソフトウェアバージョン２．３．１．５（Ｏｌｙｍｐｕｓ、東京、日本）を備えたＯｌｙｍｐｕｓ　ＢＸ５１落射蛍光顕微鏡の電動ステージを用いて、盲検的に行った。まず４×対物レンズ下で皮質を輪郭化した。ＣＡＳＴソフトウェアの光学ディセクタープローブを使用して、選択した区域のランダムサンプリングを画定した。ＡＡＶ９、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ、ＡＡＶ－Ｓ、およびＡＡＶ－Ｆで形質導入されたアストロサイトまたはニューロンのパーセンテージを評価するために、２０×対物レンズ下で、「高形質導入」ＡＡＶの場合は皮質表面の１０％および「低形質導入」ＡＡＶの場合は２０％を蛇行サンプリングして（こうした場合はＧＦＰ陽性細胞の頻度が低いことを考慮した）、立体解析学に基づく計数を実施した。各計数フレーム毎に、アストロサイト（ＧＳ陽性細胞）またはニューロン（ＮｅｕＮ陽性細胞）の総数、およびそうした集団の各々でのＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージを評価した。計数フレーム内にＤＡＰＩ陽性核を有するグリア細胞およびニューロン細胞のみを考慮した。

【０１０１】

脳および肝臓におけるベクターゲノム定量化

ベクターゲノム生体内分布用にＡＡＶゲノムを単離するため、一方の脳半球および肝臓小型片を新鮮凍結した。新鮮凍結脳および肝臓試料について、本発明者らは、ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　ａｎｄ　Ｔｉｓｓｕｅキット（Ｑｉａｇｅｎ）を製造業者の説明書に従って使用して、１０ｍｇの組織からゲノムおよびＡＡＶベクターＤＮＡを単離した。ＤＮＡを、ＮａｎｏＤｒｏｐ　ＮＤ－１０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して定量化した。次に、本発明者らは、５０ｎｇのゲノムＤＮＡを鋳型として使用して、導入遺伝子発現カセットのポリＡ領域に対するプローブおよびプライマーを使用したＴａｑｍａｎ　ｑＰＣＲを実施した（精製ＡＡＶベクターの力価測定に使用したものと同じアッセイ）。各試料のゲノムＤＮＡ入力が等しいことを確実にするため、本発明者らは、ＧＡＰＤＨゲノムＤＮＡを検出するＴａｑｍａｎプローブおよびプライマーセット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、アッセイＩＤ　Ｍｍ０１１８０２２１＿ｇ１、遺伝子記号Ｇｍ１２０７０）を使用して、各試料に対して別々のｑＰＣＲを実施した。各器官／組織について、本発明者らは、以下の式：（ＡＡＶベクターゲノムコピー数）／（$2^{\Delta Ct}$）を使用してＧＡＰＤＨ　Ｃｔ値のあらゆる違いを考慮に入れることにより、各試料のＡＡＶベクターゲノムコピー数を調整した。ΔＣｔ値は、以下の式を使用して算出した：目的試料のＧＡＰＤＨ　Ｃｔ値　－　最も少量のＧＡＰＤＨを有する試料の平均ＧＡＰＤＨ　Ｃｔ値（最も高いＣｔ値）。データは、５０ｎｇゲノムＤＮＡ当たりのＡＡＶベクターゲノム数として表した。

【０１０２】

ヒトニューロン形質導入：

初代ヒト胎児神経幹細胞（ＮＳＣ）を、ＮＩＨの倫理ガイドラインに完全に準拠して、Ｂｉｒｔｈ Ｄｅｆｅｃｔｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（ワシントン大学、シアトル、ワシントン州）から入手した。単離手順は、以前に詳細に説明されているもの[26]にわずかな変更を加えて用いた。手短に言うと、脳組織を、ハンクス平衡塩類溶液（ＨＢＳＳ）で希釈した０．２５％トリプシン、ＤＮａｓｅ（９０単位／ｍＬ）中で４５分間インキュベートした。組織を滴定し、４℃の熱不活化ウシ胎児血清に移し、５００ｇで２０分間遠心分離した。ペレットを、１０μｇの塩基性線維芽細胞成長因子（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１００μｇの上皮成長因子（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、５μｇの白血病抑制因子（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、６０ｎｇ／ｍＬのＮ－アセチルシステイン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、４ｍＬの神経生存因子－１サプリメント（Ｌｏｎｚａ）、５ｍＬの１００×Ｎ－２サプリメント（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１００Ｕのペニシリン、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、および２．５μｇ／ｍＬのファンギゾン（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で補完したｘ－Ｖｉｖｏ１５（フェノールレッドおよびゲンタマイシンを有していない；Ｌｏｎｚａ）で構成されるＮＳＣ完全培地に再懸濁した。次いで、上清を４０μｍセルストレーナー（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）で濾過した。直径が４０μｍよりも大きなニューロスフェアを、Ａｃｃｕｔａｓｅで分離した（１０分間）。神経分化培地は、１×Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地、２％Ｂ－２７無血清サプリメント、および２ｍＭ ＧｌｕｔａＭＡＸ－Ｉサプリメント（すべてＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから）で構成されており、ヒト組換え脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）（１０ｎｇ／ｍＬ；Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）で補完されていた。

【０１０３】

分化中のＮＳＣをチャンバースライドの分化培地中で２週間成長させ、次いで、ＧＦＰをコードする指定のＡＡＶベクター（７×１０^{9}ｖｇ／ウェルで添加、１５０ｖｇ／細胞）で処理した。形質導入の１週間後、細胞を４％パラホルムアルデヒドで固定し、１×リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中０．０５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で透過処理した。細胞を、ニューロン特異的クラスＩＩＩβ－チューブリン（１：５０；Ａｂｃａｍ）に対する一次モノクローナル抗体（ＴＵ－２０）で染色した。Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ５９４（１：２００に希釈；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にコンジュゲートされている二次抗体を１時間添加し、続いてＤＡＰＩを３０分間添加した。次いで、スライドをＰｒｏＬｏｎｇ退色防止試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて封入した。Ｎｉｋｏｎ Ａ１Ｒ共焦点顕微鏡を使用して撮像したＺスタックから最大投影画像を生成した。

【０１０４】

ＺスタックをＩｍａｒｉｓに読み込み、表面モジュールを使用して画像を３Ｄ体積にレンダリングした。ＧＦＰ＋ニューロン（チャンネル１－緑色）およびクラスＩＩＩβ－チューブリン陽性ニューロン（チャンネル２－赤色）を計数した。Ｉｍａｒｉｓの共局在化モジュールを使用して、上記に対して二重陽性のニューロン集団を決定した。

【０１０５】

統計

データの統計分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェア（バージョン８．００）を使用して実施した。一元配置ＡＮＯＶＡとそれに続くチューキー多重比較検定を、異なる群ＡＡＶ９、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ、ＡＡＶ－Ｓ、およびＡＡＶ－Ｆにわたって実施した。ｐ＜０．０５の値を、統計的に有意であるとみなした。結果は平均±Ｓ．Ｅ．Ｍ．として示されている。脳および肝臓におけるＡＡＶゲノムの生体内分布アッセイ、ならびにヒトニューロンの形質導入について、同様の分析を実施した。

【０１０６】

ベクターの直接定位注射

成体Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、ケタミン／キシラジン（それぞれ、１００ｍｇ／ｋｇお

よび５０ｍｇ／ｋｇ体重）の腹腔内注射により麻酔し、定位固定フレーム（Ｋｏｐｆ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、タハンガ、米国）に位置決めした。ベクターの注射を、皮質（体性感覚皮質）および海馬で実施した。合計３μｌのウイルス懸濁物を、０．１５μｌ／分の速度で注射し（ＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ－Ｓの１注射部位あたりそれぞれ１．６５×１０^{10}および５．６×１０^{10}ｇｃ）、１０μｌハミルトン注射器（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、セントルイス、米国）に取り付けられた３３ゲージ鋭針を使用した。注射部位の定位座標をブレグマから算出した（皮質座標：前後－１mm、内外方向±１mm、および背腹－０．８mm；海馬座標：前後－２mm、内外方向±１．７mm、および背腹－２．５mm）。

【０１０７】

髄腔内ボーラス送達（ＩＴボーラス）

イソフルランで成体Ｃ５７ＢＬ／６マウスに麻酔をかけた。腰椎領域の皮膚を剃り、きれいにした後、皮膚の３～４ｃｍ正中矢状切開を行って、筋肉および脊柱を露出させた。カテーテルをＬ４－Ｌ５脊柱領域間に挿入し、３３ゲージ鋼針を有する気密性ハミルトン注射器に取り付けた。１０マイクロリットルのＡＡＶ９－ＣＢＡ－ＧＦＰ（１．２５×１０^{11}ｖｇ）ベクターまたはＡＡＶ－Ｆ－ＣＢＡ－ＧＦＰ（８．８×１０^{10}ｖｇ）を２μｌ／分の速度でゆっくりと注射した。注射の３週間後にマウスを死亡させた。

【０１０８】

脊髄全体および脳切片の低倍率画像化では、本発明者らは、抗ＧＦＰ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｇ１０３６２、希釈１：２５０）で一晩染色し、続いて二次抗体染色および画像化を図３のように行った。

【０１０９】

脳および脊髄における細胞タイプの免疫染色の場合、固定組織切片を、ＰＢＳで洗浄し、ヤギ血清でブロッキングし、ＰＢＳ中０．３％のＴｒｉｔｏｎで透過処理した。標的抗体をブロッキング緩衝液で希釈し、４℃で一晩インキュベートした。

【０１１０】

一次抗体：抗ＧＦＰ：カタログ番号ａｂ１２１８（ａｂｃａｍ）：希釈１：１０００
ＧＦＡＰ：カタログ番号ｃａｔｚ０３３４（Ｄａｋｏ）；希釈１：５００
ＮｅｕＮ：カタログ番号ａｂ１７７４８７（ａｂｃａｍ）；希釈１：３００

【０１１１】

一晩インキュベーションした後、スライドを、０．１％Ｔｗｅｅｎを有するＰＢＳでよく洗浄した。蛍光色素コンジュゲート二次抗体（１：５００希釈）を添加し、室温で１時間インキュベートした。洗浄後、スライドをＰＢＳで洗浄し、ＤＡＰＩ封入溶液（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｐ３６９３１）を使用して封入した。スライドを、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ８００共焦点レーザー走査型顕微鏡を使用して画像化した。

【０１１２】

透過型電子顕微鏡法

カーボンコーティンググリッド（Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＥＭＳ）を、２５mAのグロー放電に２０秒間曝露するにより親水性にした。各ＡＡＶベクタープレ（AAV vector pre）について、５μｌをグリッドに１分間吸着させ、１％酢酸ウラニル（ＥＭＳ＃２２４００）で２０秒間染色した。グリッドを、ＴｅｃｎａｉＧ^{2}Ｓｐｉｒｉｔ　ＢｉｏＴＷＩＮで調査し、ＡＭＴ　２ｋ　ＣＣＤカメラで画像化した。作業は、ハーバード大学医学部電子顕微鏡施設で実施した。計数は以下のように実施した：各ベクター調製物の５つの代表的な画像を撮影し、Ｐｈｏｔｏｓｈｏｐ（ＣＳ６）の計数ツールを使用して、すべての完全カプシドおよび空カプシドを計数した。各画像の空カプシドパーセンテージを算出し、プロットした。

【０１１３】

[実施例１]

ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅ　－　発現に基づくＡＡＶライブラリーの設計

最初に、本発明者らは、ニワトリベータアクチン（ＣＢＡ）駆動性Ｃｒｅリコンビナー

ゼおよびｐ４１プロモーター駆動性ＡＡＶ９カプシドで構成されるＡＡＶ２　ＩＴＲ隣接発現カセットからなるＡＡＶライブラリープラスミドを構築した（図１ａの概略図）。ＰＣＲにより、アミノ酸５８８／５８９をコードするＡＡＶ９　ＶＰ１ヌクレオチドの間に疑似ランダム２１塩基ヌクレオチドを挿入した。ウイルスパッケージングの前に、本発明者らは、低深度次世代シーケンシング（ＮＧＳ）を使用してこのプラスミドライブラリーをシーケンシングし、大多数のプラスミドに２１量体のインサートが存在し、バリアントバイアスが欠如していることを確認した（データは示されていない）。次いで、本発明者らは、カプシドライブラリーをパッケージングし、ＮＧＳを実施して、ベクター作出プロセスが、選択に十分な多様性を維持していたことを検証した。ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅは、各々一意のカプシドが、それ自体のｃａｐ遺伝子ならびにＣｒｅ発現構築物を両方とも保有することに依存する（図１ｂ）。ｌｏｘＰ導入ＳＴＯＰ　ｔｄＴｏｍａｔｏカセットを保持するトランスジェニックマウス（Ａｉ９）に、ＡＡＶライブラリーを静脈内注射する（図１ｂ－ｉ）。細胞の形質導入に成功したこうしたカプシドは、任意の標的器官または細胞タイプでのｔｄＴｏｍａｔｏ発現を可能にし（特定のＣｒｅトランスジェニックマウス系列の利用可能性に依存することなく）、次いで、こうしたｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞を、目的の組織からフローサイトメトリーで選別することができる（任意選択で細胞特異的マーカーと共に、図１ｂ－ｉｉ）。こうした細胞からレスキューされたウイルスＤＮＡは、導入遺伝子発現に対する細胞外および細胞内の生物学的障壁をすべて効果的に克服することのできるカプシドバリアントに対応するはずである（図１ｂ－ｉｉｉ）。

【０１１４】

[実施例２]

導入遺伝子発現を使用して機能的カプシドを同定するための新しいＡＡＶ９カプシドバリアントの選択

ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅライブラリー戦略を試験するために、本発明者らは、概念実証選択を実施して、全身性注射後に脳細胞を形質導入する能力を有するＡＡＶカプシドバリアントの単離を試みた。１．２７×１０^{11}ベクターゲノム（ｖｇ、５×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ）のライブラリーを、１匹の成体雄および１匹の雌Ａｉ９マウスの尾静脈から静脈内注射し、注射の３週間後にマウスを死亡させた。肝臓、脳、脾臓、および腎臓の切片を切除し、ｔｄＴｏｍａｔｏの免疫染色を実施した。本発明者らは、肝臓においてｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞（肝細胞の可能性が高い）を容易に検出し、脳ならびに他の器官にもｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞（ニューロンおよびアストロサイトの両方）が散在していた（図７ａ）。また、本発明者らは、２１塩基インサートを含むｃａｐ　ＤＮＡをＰＣＲでレスキューすることができるか否かを試験し、本発明者らは、ライブラリーを注射したマウスの１０個の器官／組織で特定のバンドを検出したが、対照の未注射マウスでは検出しなかった（図７ｂ）。本発明者らは、雌および雄マウスの残りの脳組織をプールし、ＤＮＡを、まず最初の選択ラウンドのために全脳組織から抽出した。本発明者らは、２１量体のインサートを含むｃａｐ　ＤＮＡを増幅し、ＮＧＳを使用してそれらの同一性およびリード計数を分析した。本発明者らは、未選択のライブラリーおよび肝臓から回収したバリアントと比較して、単一の選択ラウンド後に脳組織から採取したライブラリー集団では特定のペプチドがかなり濃縮されていたことを観察した（図７ｃ、データは示されていない）。次に、本発明者らは、ウイルスＤＮＡのインサート含有領域を単離し、第２の選択ラウンドのために、それをＡＡＶプラスミド骨格に再クローニングして戻し、カプシドを再パッケージングした（「脳濃縮カプシドライブラリー」）。

【０１１５】

第２ラウンドの選択では、２匹のＡｉ９マウス（雄１匹、雌１匹）に、ラウンド１からレスキューされたライブラリー（１．９１×１０^{10}ｖｇ、７．６４×１０^{11}ｖｇ／ｋｇの用量）を注射し、３週間後に　　殺した。注射する前に、バリアント領域を含む配列を増幅し、ＮＧＳによりシーケンシングして、既存のバイアスがベクタープールに導入されていないことを確認した（図２）。脳組織を分離して、フローサイトメトリーでｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞を選別するための細胞懸濁物を得た。本発明者らは、３，８３４個のｔｄ

Ｔｏｍａｔｏ陽性細胞（初期細胞懸濁物の０．０４３％）をフローサイトメトリーで選別した（図８ａ～８ｂ）。これは、形質導入が成功したことを示す。ｔｄＴｏｍａｔｏ選別細胞に由来するウイルスＤＮＡを、以前に行われたように増幅およびシーケンシングした（図２）。ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞から単離されたウイルスＤＮＡは、リードの９７％が、ＳＴＴＬＹＳＰ、ＦＶＶＧＱＳＹ、およびＦＱＰＣＰ＊（＊は終止コドンを示す）という３つのペプチドのみで占められることを示した（図２ｂ）。本発明者らは、これらのうち２つ：ＳＴＴＬＹＳＰ（ＡＡＶ－Ｓと称する）およびＦＶＶＧＱＳＹ（ＡＡＶ－Ｆと称する）を、ｉｎ　ｖｉｖｏでの機能評価のために選択した（本発明者らは、ＦＱＰＣＰ＊の評価は、それがクロスパッケージングの産物である可能性が高かったため除外した）。図２に見られるように、こうした配列は両方とも、ラウンド２ライブラリーでは低レベル（各バリアントのリードの約０．４％）で検出可能だったが、選択後には脳内で高度に濃縮されていた。

【０１１６】

[実施例３]

ＡＡＶ－Ｆカプシドは、マウスＣＮＳにて効率的な導入遺伝子発現を媒介する。

ＡＡＶのカプシドに発現されるこうしたペプチドが、ＡＡＶベクターによる効率的な導入遺伝子発現を媒介することができるか否かを試験するために、本発明者らは、一本鎖ＣＢＡプロモーター駆動性ＧＦＰ発現カセットをパッケージングするこうしたカプシド（ＡＡＶ－ＳおよびＡＡＶ－Ｆ）を産生した（図３ａ）。比較のため、本発明者らは、親ＡＡＶ９ベクターおよびＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂを含めた。ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂは、定向進化により生じた７量体ペプチド挿入（ＴＬＡＶＰＦＫ）を有する最も広く研究されているＡＡＶ９バリアントである[12]。ベクターはすべて良好に産生され、ＡＡＶ９よりもわずかに低い産生効率を示した（表４）。

【０１１７】

【表４】

表 4. AAV カプシド*の産生効率

AAV カプシド	力価 (vg/ml)	産生効率 (vg/細胞)
AAV9	$3.20x10^{13}$ ($\pm 2.55x10^{13}$)	$3.06x10^{4}$ ($\pm 1.39x10^{4}$)
AAV-F	$5.51x10^{12}$ ($\pm 4.23x10^{12}$)	$9.57x10^{3}$ ($\pm 8.00x10^{3}$)
AAV-S	$1.88x10^{13}$ ($1.38x10^{13}$)	$2.09x10^{4}$ ($\pm 5.65x10^{3}$)

*カプシドはすべて、一本鎖 AAV2 ITR 隣接 AAV-CBA-GFP-WPRE 導入遺伝子カセットをパッケージングしていた。

【０１１８】

成体雄Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、以下のベクター：ＡＡＶ９、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ、ＡＡＶ－Ｓ、およびＡＡＶ－Ｆ（それぞれ、ｎ＝３）の１つを、低用量または高用量（それぞれ、１×１０^{１１}ｖｇおよび８×１０^{１１}ｖｇのベクター；およそ４×１０^{１２}および$３．２\times１０^{１３}$ｖｇ／ｋｇ）で外側尾静脈から注射した。注射の３週間後、マウスを死亡させ、内因性（未染色）ＧＦＰ蛍光分析のために器官を採取した。本発明者らは、連続矢状脳切片におけるＧＦＰシグナルのカバレッジパーセントを定量化した（動物１匹当たり３つの切片を分析した）。注目すべきことに、ＡＡＶ－Ｆは、１×１０^{１１}ｖｇおよび８×１０^{１１}ｖｇでは、親ＡＡＶ９ベクターと比較して、それぞれ１１９倍（ｐ＜０．０００１）および６８倍（ｐ＝０．０００４）増加したＧＦＰ蛍光カバレッジを示した（図３ｂ、３ｃ、３ｅ、３ｆ；図９Ａ～９Ｂ）。ＡＡＶ９およびＡＡＶ－Ｓは、同様のＧＦＰカバレッジレベルを示した（図３ｂ、３ｃ、３ｅ、３ｆ）。ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂは、

低用量ではＡＡＶ－Ｆと比較してわずかにより高いＧＦＰカバレッジをもたらしたが、８×１０^{11}ｖｇ用量では、同様のレベルのＧＦＰカバレッジが観察された（図３ｂ、３ｃ、３ｅ、３ｆ）。ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂと同様に、ＡＡＶ－Ｆは、顕著な効率で脊髄を形質導入した（図３ｄ）。脳のほとんどの区域がＡＡＶ－Ｆにより効率的に標的とされ、皮質、海馬、線条体、小脳、および嗅球でロバストなＧＦＰシグナルが観察された（図３ｆ）。

【０１１９】

ＡＡＶ－ＳおよびＡＡＶ－Ｆにより標的とされる細胞タイプを詳細に理解するために、本発明者らは、次に、ＧＦＰ、ならびにニューロン（ＮｅｕＮ）、アストロサイト（グルタミンシンテターゼ、ＧＳ）、ミクログリア（Ｉｂａ－１）、およびオリゴデンドロサイト（Ｏｌｉｇ２）のマーカーを用いた一連の共免疫染色を実施した。ＡＡＶ－ＦおよびＡＡＶ－Ｓは、他の２つの参照ベクターと同様に、主にニューロンおよびアストロサイトを形質導入した（バリアントはいずれも、ミクログリア細胞またはオリゴデンドログリア細胞を効果的に形質導入しないと考えられた。図４ａ、４ｂ）。１×１０^{11}ｖｇ用量での皮質におけるニューロンおよびアストロサイトの立体解析学的定量化により、ＡＡＶ－Ｆは、従来のＡＡＶ９と比較してアストロサイトで６５倍、ニューロンで１７１倍という効率的な形質導入能力を有することが確認されたが、ＡＡＶＳとＡＡＶ９との差異は有意ではなかった（ＧＦＰ陽性アストロサイトのパーセントは、それぞれ、ＡＡＶ９では０．６３％±０．２４％、ＡＡＶ－Ｓでは０．３６±０．１５％だった。ＧＦＰ陽性ニューロンのパーセントは、ＡＡＶ９では０．０３９％±０．０．０２％、ＡＡＶ－Ｓでは０．０２９±０．００２％だった。±数値はすべて、平均の標準誤差、ＳＥＭを表す）。なお、ＡＡＶ－Ｆは、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ（２８．２１±０．２５％）よりも有意により多くのアストロサイト（４０．７８±０．７３％）を標的とし、ニューロンの場合はその逆が該当した（ＡＡＶ－Ｆでは６．６７±０．５％およびＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂでは１０．５９±０．１６％、図４ｃ）。これは、マウスでは、これら２つのベクター間で向性がわずかに異なることを示唆する。加えて、ＡＡＶ－Ｆは、興奮性（ＣａｍＫＩＩ陽性）および抑制性（ＧＡＤ６７陽性）皮質ニューロン、線条体のドーパミン作動性ニューロン（チロシンヒドロキシラーゼ、ＴＨを発現する）、小脳のプルキンエニューロン（カルビンジン陽性）、および脊髄の運動ニューロン（コリンアセチルトランスフェラーゼマーカー、ＣｈＡＴを発現する。図１０ａ）を含む、様々なニューロンサブタイプを形質導入した。皮質の立体解析学的計数（図４ｃ）および高用量のＡＡＶ－Ｆ対ＡＡＶ９の画像（図３ｆ）と一致して、本発明者らは、１×１０^{11}ｖｇ／マウスの用量では、線条体、海馬、および小脳（cerrebellum）においてＡＡＶ－Ｆによるニューロンおよびアストロサイトの効率的な形質導入を観察したが、ＡＡＶ９では観察しなかった（図１０ｂ）。

【０１２０】

脳におけるＡＡＶ－Ｆによる高レベルのＧＦＰ導入遺伝子発現が、脳におけるより高レベルのＡＡＶゲノムに対応するか否かをより良好に理解するため、本発明者らは肝臓および脳からベクターおよびマウスゲノムＤＮＡを単離し、８×１０^{11}ｖｇ用量マウスに対してｑＰＣＲを実施した。ＡＡＶ－Ｆは、ＡＡＶ９と比較して、脳におけるＡＡＶゲノムが２０倍に増強されたこと（ｐ＜０．０００１）を示した（図４ｄ）。報告されているように、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂは、脳におけるＡＡＶゲノム量がＡＡＶ９と比較してはるかに多かったが（２５倍）、ＡＡＶ－Ｓは、ＧＦＰ蛍光データと同様に低レベルだった（図３）。ＰＨＰ．Ｂは、ＡＡＶ９およびＡＡＶ－Ｆよりもわずかに低い、肝臓での発現レベルを示した（ただし、ＡＡＶ－Ｓは該当しなかった。図４ｄ）。ＡＡＶ－Ｆは、ＡＡＶ９と同様の肝臓におけるレベルを示し、ＡＡＶ－Ｓは、より低いが有意ではない下降傾向を示した。また、本発明者らは、幾つかの他の器官－骨格筋、心臓、および脊髄において、ＡＡＶ－Ｆの生体内分布をＡＡＶ９と比較して調査した（図１１）。本発明者らは、筋肉および心臓では２つのベクター間に有意差を観察しなかった（ただし、心臓のＡＡＶ－Ｆに関しては上昇傾向が見られた）。脳での発現から予想されることになるように、ＡＡＶ－Ｆは、ＡＡＶ９と比較して、脊髄において有意により高い発現レベルを示した（ｐ＜０

．０５、ｔ検定）。
【０１２１】
全身性注射後の末梢器官での導入遺伝子発現を調査するために、本発明者らは、肝臓、心臓、骨格筋、および網膜におけるＧＦＰ蛍光を分析した（図４ｅ）。驚くことではないが、すべてのベクターが肝臓を効率的に形質導入した。心臓および骨格筋では、ＡＡＶ－Ｓは、ＡＡＶ９およびＡＡＶ－Ｆよりも多数の明ＧＦＰシグナル／区画をもたらした。カプシドはすべて、静脈内送達だったことから予想されるように、網膜では低い形質導入しか媒介しなかった。興味深いことに、ＡＡＶ－９およびＡＡＶ－Ｓは、神経網膜を形質導入しなかったが、網膜色素上皮（ＲＰＥ）では一貫した発現が観察された。ＡＡＶ９－ＰＨＰ．ＢおよびＡＡＶ－Ｆは両方とも、網膜の複数の層、最も顕著には神経節細胞層（ＧＣＬ）の細胞を形質導入した。ＧＦＰ発現は、内顆粒層（ＩＮＬ）でも観察され、外網状層（ＯＰＬ）ではかなりの発現が示された。これは、双極性または抑制性の水平細胞形質導入を反映している可能性がある。
【０１２２】
マウスでのＡＡＶベクターによる形質導入は、性別とマウス系統との間で大幅に異なる可能性があるため、本発明者らは、最も効率的なカプシドであるＡＡＶ－Ｆが、雌Ｃ５７ＢＬ／６ならびに雄ＢＡＬＢ／ｃの全身性注射後に脳を効率的に形質導入できるか否かを調査した。マウスに、1×10^{11}ｖｇ（4×10^{12}ｖｇ／ｋｇ）を注射した。本発明者らは、系統または性別に関わりなくロバストで効率的な形質導入を観察した（図５ａ～５ｃ）。こうした結果は、以前に報告されているように、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂが、ＢＡＬＢ／ｃ系統では全身性送達後の中枢神経系形質導入の有効性を欠如したことと対照的だった（図５ｂ、５ｃ）[13、14]。
【０１２３】
ＡＡＶ－Ｆでは空カプシドが過剰であったことが、脳への生体内分布がＡＡＶ９と比較して増加したことを説明し得るか否かを調査するために、本発明者らは、イオジキサノール密度勾配精製により大部分の空カプシドを除去し、ＡＡＶ－Ｆの２つの別々の調製物に対して透過型電子顕微鏡法（ＴＥＭ）を実施し、それらをＡＡＶ９の２つの独立調製物と比較した。図１２Ａ～１２Ｅに見られるように、本発明者らは、ＡＡＶ－ＦとＡＡＶ９との間で空カプシドレベルの有意差を観察しなかった（ＡＡＶ９およびＡＡＶ－Ｆの空カプシドは、それぞれ平均４．６３±１．９９％対５．２±２．１８％だった。平均±ＳＤ、ｐ＝０．５４、独立ｔ検定）。
【０１２４】
次に、本発明者らは、ＡＡＶ－Ｆが、他の投与経路によるＣＮＳ形質導入のためのベクターとして有用性を有することになるか否かを試験した。本発明者らは、まず、成体Ｃ５７ＢＬ／６マウスの直接海馬注射後に脳において導入遺伝子発現を媒介するＡＡＶ－ＳおよびＡＡＶ－Ｆを試験した。本発明者らは、両カプシドが、主にニューロンにおいて直接注射後にＧＦＰの広範な発現を達成することを見出した（図１３）。脊髄を形質導入するためのＡＡＶベクターの髄腔内注射は、この区画の治療に有望であることを示している。１つの欠点は、ベクターを腰椎注射した後の脳へのベクターの広がりが限られていることである。本発明者らは、成体Ｃ５７ＢＬ／６マウスの脊髄の腰椎領域にベクターをボーラス髄腔内注射した後のＡＡＶ９およびＡＡＶ－Ｆを比較した。注射３週間後、マウスを死亡させ、脊髄および脳を分析した。注目すべきことには、ＡＡＶ－Ｆは、ＡＡＶ９と比較して脊髄全体で非常により強力なＧＦＰ発現をもたらし、白質および灰白質を両方とも形質導入した。一方で、ＡＡＶ９形質導入は、主に白質に限定されていた。驚くべきことに、本発明者らは、ＡＡＶ－Ｆを注射したマウスの脳でのアストロサイトおよびニューロンの形質導入も検出したが、ＡＡＶ９では検出しなかった（図１４）。
【０１２５】
[実施例４]
ＡＡＶ－Ｆはヒトニューロンの形質導入増強を媒介する
選択はマウスで実施したため、本発明者らは、ＡＡＶ－Ｆのロバストな形質導入特徴が

、ヒト細胞にも当てはまるか否かを分析した。初代ヒト幹細胞由来ニューロンを、すべてＧＦＰをコードする等用量のＡＡＶ９、ＡＡＶ－Ｓ、およびＡＡＶ－Ｆで形質導入した。１週間後、それらを固定し、クラスＩＩＩβチューブリンで染色し、ＧＦＰ陽性ニューロンのパーセンテージを分析した。注目すべきことには、ＡＡＶ－Ｆは、ニューロンの６２％を形質導入した。これは、ＡＡＶ９よりも３倍高かった（ｐ＜０．０５）（図６ａ、６ｂ）。ＡＡＶ－Ｓは、ＡＡＶ９よりも、わずかであるが統計的に有意な（ｐ＜０．０５）形質導入効率の増加をもたらした（図６ａ）。

【０１２６】

[実施例５]

ＡＡＶ－Ｓは内耳を高効率で形質導入する

近年、特定の器官および細胞タイプを高い有効性で標的とするように設計された新しいＡＡＶベクターの開発が見受けられる。それらの多くでは、特定のＡＡＶ血清型の形質導入特性を修飾する７量体ペプチド挿入が使用されている。しかしながら、そうしたベクターは、多くの場合、内耳などの、治療が困難な組織を含む他の組織を形質導入するために再利用することができる。有毛細胞などの、内耳のある特定の細胞タイプの形質導入は依然として課題であり、多くの従来型ＡＡＶベクターは、有毛細胞の１つのクラスである外有毛細胞（ＯＨＣ）を一貫して標的にすることができない。

【０１２７】

上記に述べられているように、一方（ＡＡＶ－Ｆ）は、全身性注射後に非常に有望で高度なＣＮＳ発現を示したが、他方（ＡＡＶ－Ｓ）は示さなかった。全身性注射したＡＡＶ－Ｓは、血液脳関門を効果的には通過しなかったが、心臓、肝臓、および筋肉など、様々な組織を形質導入した。脳に直接注射した後、ＡＡＶ－Ｓは、比較的低用量においてでさえ、ニューロンでの高い局所形質導入効率を示した。内耳での形質導入特性をアッセイするため、本発明者らは、ＣＢＡプロモーター下でＥＧＦＰを駆動する一本鎖発現カセットをコードするＡＡＶ－Ｓを産生し、それを正円窓から新生仔（Ｐ１）マウスに注射した。本発明者らは、ＡＡＶ－Ｓが、蝸牛の有毛細胞を極めて良好に形質導入することを見出した。内有毛細胞および外有毛細胞は両方とも、試験した用量（２×１０^{10}ＶＧ）では、最大で１００％および９９％の効率で形質導入された（図１５ａ、１５ｂ）。また、本発明者らは、らせん板縁およびらせん神経節の有意な形質導入を観察した（図１５ｃ、１５ｄ）。全体として、本発明者らは、本明細書にて、ＡＡＶ－Ｓを内耳の遺伝子療法に使用することができることを示している。

【０１２８】

[実施例６]

非トランスジェニック成体霊長類にて選択を行うためのｉＴｒａｎｓｄｕｃｅ系を使用して、線維細胞を効率的に形質導入するカプシドを単離する

線維細胞を標的とするＡＡＶカプシドの２～３ラウンドの選択を、非ヒト霊長類、例えばカニクイザルで実施する。線維細胞選択的で形質導入能力のあるＡＡＶカプシドを同定するために、ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅ　ＡＡＶライブラリーを、ＧＪＢ２－ｌｏｘＰ導入ＳＴＯＰ－ｔｄＴｏｍａｔｏカセット（そのサイズはＡＡＶカプシド内に収まる）をコードするＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂと共に同時注射することにより選択を実施する。ＮＨＰ内耳では、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｂ－ＣＢＡ－ＧＦＰは、線維細胞、ＨＣ、およびらせん神経節ニューロン領域を含む、蝸牛の多くの細胞を形質導入する。この選択戦略では（図１６Ａを参照）、ｔｄＴｏｍａｔｏ発現は、ＧＪＢ２プロモーター下の線維細胞に限定され、本質的に内耳トランスジェニックＮＨＰを作出する。線維細胞に進入し、ｔｄＴｏｍａｔｏをオンにするＡＡＶカプシドを、分離した蝸牛からフローサイトメトリーで選別し、カプシドＤＮＡをＮＧＳのためにレスキューし、クローニングして、線維細胞でのＡＡＶ媒介性発現を可能にするペプチド配列を同定する。個々のペプチドを濃縮した後、上記に記載の通りにディープシーケンシングを行って、追加の選択ラウンドをいつ中止するかを通知する（おそらくは、特定のペプチドがリードの＞２５％を占めた際に）。

【０１２９】

あるいは、またはそれに加えて、脊髄細胞を標的とするＡＡＶカプシドの２～３ラウンドの選択を、非ヒト霊長類、例えばカニクイザルで実施する。脊髄選択的で形質導入能力のあるＡＡＶカプシドを同定するために、ｉＴｒａｎｓｄｕｃｅ　ＡＡＶライブラリーを、ＣＢＡ－ｌｏｘＰ導入ＳＴＯＰ－ｍＰｌｕｍカセット（そのサイズはＡＡＶカプシド内に収まる）をコードするＡＡＶ９と共に同時注射することにより選択を実施する。ＮＨＰ脊髄では、ＡＡＶ９－は、ニューロンおよびアストロサイトを含む細胞を形質導入する。この選択戦略では（図１６Ｂを参照）、脊髄細胞に進入し、ｍＰｌｕｍ蛍光をオンにするＡＡＶカプシドを、分離脊髄からフローサイトメトリーで選別し、カプシドＤＮＡを、ＮＧＳのためにレスキューし、クローニングして、脊髄の細胞でのＡＡＶ媒介性発現を可能にするペプチド配列を同定する。個々のペプチドを濃縮した後、上記に記載の通りにディープシーケンシングを行って、追加の選択ラウンドをいつ中止するかを通知する（おそらくは、特定のペプチドがリードの＞２５％を占めた際に）。

【０１３０】

候補カプシドクローンが同定されたら、以前と同様に、ＧＦＰカセットをコードするようにベクター化した。次に、直接正円窓膜（ＲＭＷ）注射（例えば、１６Ａに示されているように）または髄腔内注射（例えば、１６Ｂに示されているように）した後、標的細胞の形質導入についてカプシドを試験する。

【０１３１】

参考文献

【０１３２】

【表５－１】

1. Mendell, J.R., S. Al-Zaidy, R. Shell, W.D. Arnold, L.R. Rodino-Klapac, T.W. Prior, L. Lowes, L. Alfano, K. Berry, K. Church, J.T. Kissel, S. Nagendran, J. L'Italien, D.M. Sproule, C. Wells, J.A. Cardenas, M.D. Heitzer, A. Kaspar, S. Corcoran, L. Braun, S. Likhite, C. Miranda, K. Meyer, K.D. Foust, A.H.M. Burghes, and B.K. Kaspar, Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. N Engl J Med, 2017. 377(18): p. 1713-1722.

2. Manno, C.S., G.F. Pierce, V.R. Arruda, B. Glader, M. Ragni, J.J. Rasko, M.C. Ozelo, K. Hoots, P. Blatt, B. Konkle, M. Dake, R. Kaye, M. Razavi, A. Zajko, J. Zehnder, P.K. Rustagi, H. Nakai, A. Chew, D. Leonard, J.F. Wright, R.R. Lessard, J.M. Sommer, M. Tigges, D. Sabatino, A. Luk, H. Jiang, F. Mingozzi, L. Couto, H.C. Ertl, K.A. High, and M.A. Kay, Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. Nat Med, 2006. 12(3): p. 342-7.

3. Hinderer, C., N. Katz, E.L. Buza, C. Dyer, T. Goode, P. Bell, L.K. Richman, and J.M. Wilson, Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. Hum Gene Ther, 2018. 29(3): p. 285-298.

4. Paulk, N.K., K. Pekrun, G.W. Charville, K. Maguire-Nguyen, M.N. Wosczyna, J. Xu, Y. Zhang, L. Lisowski, B. Yoo, J.G. Vilches-Moure, G.K. Lee, J.B. Shrager, T.A. Rando, and M.A. Kay, Bioengineered Viral Platform for Intramuscular Passive Vaccine Delivery to Human Skeletal Muscle. Mol Ther Methods Clin Dev, 2018. 10: p. 144-155.

5. Paulk, N.K., K. Pekrun, E. Zhu, S. Nygaard, B. Li, J. Xu, K. Chu, C. Leborgne, A.P. Dane, A. Haft, Y. Zhang, F. Zhang, C. Morton, M.B. Valentine, A.M.

【０１３３】

【表５－２】

Davidoff, A.C. Nathwani, F. Mingozzi, M. Grompe, I.E. Alexander, L. Lisowski, and M.A. Kay, Bioengineered AAV Capsids with Combined High Human Liver Transduction In Vivo and Unique Humoral Seroreactivity. Mol Ther, 2018. 26(1): p. 289-303.

6. Gray, S.J., B.L. Blake, H.E. Criswell, S.C. Nicolson, R.J. Samulski, T.J. McCown, and W. Li, Directed evolution of a novel adeno-associated virus (AAV) vector that crosses the seizure-compromised blood-brain barrier (BBB). Mol Ther, 2010. 18(3): p. 570-8.

7. Tse, L.V., K.A. Klinc, V.J. Madigan, R.M. Castellanos Rivera, L.F. Wells, L.P. Havlik, J.K. Smith, M. Agbandje-McKenna, and A. Asokan, Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. 114(24): p. E4812-E4821.

8. Koerber, J.T., N. Maheshri, B.K. Kaspar, and D.V. Schaffer, Construction of diverse adeno-associated viral libraries for directed evolution of enhanced gene delivery vehicles. Nat Protoc, 2006. 1(2): p. 701-6.

9. Korbelin, J., T. Sieber, S. Michelfelder, L. Lunding, E. Spies, A. Hunger, M. Alawi, K. Rapti, D. Indenbirken, O.J. Muller, R. Pasqualini, W. Arap, J.A. Kleinschmidt, and M. Trepel, Pulmonary Targeting of Adeno-associated Viral Vectors by Next-generation Sequencing-guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries. Mol Ther, 2016. 24(6): p. 1050-1061.

10. Sallach, J., G. Di Pasquale, F. Larcher, N. Niehoff, M. Rubsam, A. Huber, J. Chiorini, D. Almarza, S.A. Eming, H. Ulus, S. Nishimura, U.T. Hacker, M. Hallek, C.M. Niessen, and H. Buning, Tropism-modified AAV vectors overcome barriers to successful cutaneous therapy. Mol Ther, 2014. 22(5): p. 929-39.

11. Berry, G.E. and A. Asokan, Cellular transduction mechanisms of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol, 2016. 21: p. 54-60.

12. Deverman, B.E., P.L. Pravdo, B.P. Simpson, S.R. Kumar, K.Y. Chan, A. Banerjee, W.L. Wu, B. Yang, N. Huber, S.P. Pasca, and V. Gradinaru, Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. Nat Biotechnol, 2016. 34(2): p. 204-9.

【０１３４】

【表５－３】

13. Matsuzaki, Y., M. Tanaka, S. Hakoda, T. Masuda, R. Miyata, A. Konno, and H. Hirai, Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Shared among Diverse Inbred Strains of Mice. Mol Ther, 2019. 27(4): p. 700-704.

14. Hordeaux, J., Q. Wang, N. Katz, E.L. Buza, P. Bell, and J.M. Wilson, The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. Mol Ther, 2018. 26(3): p. 664-668.

15. Nonnenmacher, M., H. van Bakel, R.J. Hajjar, and T. Weber, High capsid-genome correlation facilitates creation of AAV libraries for directed evolution. Mol Ther, 2015. 23(4): p. 675-82.

16. Hordeaux, J., Y. Yuan, P.M. Clark, Q. Wang, R.A. Martino, J.J. Sims, P. Bell, A. Raymond, W.L. Stanford, and J.M. Wilson, The GPI-Linked Protein LY6A Drives AAV-PHP.B Transport across the Blood-Brain Barrier. Mol Ther, 2019. 27(5): p. 912-921.

17. Igarashi, H., K. Koizumi, R. Kaneko, K. Ikeda, R. Egawa, Y. Yanagawa, S. Muramatsu, H. Onimaru, T. Ishizuka, and H. Yawo, A Novel Reporter Rat Strain That Conditionally Expresses the Bright Red Fluorescent Protein tdTomato. PLoS One, 2016. 11(5): p. e0155687.

18. Park, J.E., X.F. Zhang, S.H. Choi, J. Okahara, E. Sasaki, and A.C. Silva, Generation of transgenic marmosets expressing genetically encoded calcium indicators. Sci Rep, 2016. 6: p. 34931.

19. Sasaki, E., H. Suemizu, A. Shimada, K. Hanazawa, R. Oiwa, M. Kamioka, I. Tomioka, Y. Sotomaru, R. Hirakawa, T. Eto, S. Shiozawa, T. Maeda, M. Ito, R. Ito, C. Kito, C. Yagihashi, K. Kawai, H. Miyoshi, Y. Tanioka, N. Tamaoki, S. Habu, H. Okano, and T. Nomura, Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. Nature, 2009. 459(7246): p. 523-7.

20. D'Costa, S., V. Blouin, F. Broucque, M. Penaud-Budloo, A. Francois, I.C. Perez, C. Le Bec, P. Moullier, R.O. Snyder, and E. Ayuso, Practical utilization of recombinant AAV vector reference standards: focus on vector genomes titration by free ITR qPCR. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. 5: p. 16019.

21. Aurnhammer, C., M. Haase, N. Muether, M. Hausl, C. Rauschhuber, I. Huber, H. Nitschko, U. Busch, A. Sing, A. Ehrhardt, and A. Baiker, Universal real-time

【０１３５】

【表５－４】

PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. Hum Gene Ther Methods, 2012. 23(1): p. 18-28.

22. Gyorgy, B., E.J. Meijer, M.V. Ivanchenko, K. Tenneson, F. Emond, K.S. Hanlon, A.A. Indzhykulian, A. Volak, K.D. Karavitaki, P.I. Tamvakologos, M. Vezina, V.K. Berezovskii, R.T. Born, M. O'Brien, J.F. Lafond, Y. Arsenijevic, M.A. Kenna, C.A. Maguire, and D.P. Corey, Gene Transfer with AAV9-PHP.B Rescues Hearing in a Mouse Model of Usher Syndrome 3A and Transduces Hair Cells in a Non-human Primate. Mol Ther Methods Clin Dev, 2019. 13: p. 1-13.

23. Maguire, C.A., L. Balaj, S. Sivaraman, M.H. Crommentuijn, M. Ericsson, L. Mincheva-Nilsson, V. Baranov, D. Gianni, B.A. Tannous, M. Sena-Esteves, X.O. Breakefield, and J. Skog, Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. Mol Ther, 2012. 20(5): p. 960-71.

24. Hudry, E., C. Martin, S. Gandhi, B. Gyorgy, D.I. Scheffer, D. Mu, S.F. Merkel, F. Mingozzi, Z. Fitzpatrick, H. Dimant, M. Masek, T. Ragan, S. Tan, A.R. Brisson, S.H. Ramirez, B.T. Hyman, and C.A. Maguire, Exosome-associated AAV vector as a robust and convenient neuroscience tool. Gene Ther, 2016. 23(4): p. 380-92.

25. Dashkoff, J., E.P. Lerner, N. Truong, J.A. Klickstein, Z. Fan, D. Mu, C.A. Maguire, B.T. Hyman, and E. Hudry, Tailored transgene expression to specific cell types in the central nervous system after peripheral injection with AAV9. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. 3: p. 16081.

26. Watters, A.K., S. Rom, J.D. Hill, M.K. Dematatis, Y. Zhou, S.F. Merkel, A.M. Andrews, J. Cena, R. Potula, A. Skuba, Y.J. Son, Y. Persidsky, and S.H. Ramirez, Identification and dynamic regulation of tight junction protein expression in human neural stem cells. Stem Cells Dev, 2015. 24(12): p. 1377-89.

27. Akil, O., Dyka, F., Calvet, C., Emptoz, A., Lahlou, G., Nouaille, S., De Monvel, J. B., Hardelin, J. P., Hauswirth, W. W., Avan, P., Petit, C., Safieddine, S., and Lustig, L. R. (2019). Dual AAV-mediated gene therapy restores hearing in a DFNB9 mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1817537116.

28. Al-Zaidy, S. A., Kolb, S. J., Lowes, L., Alfano, L. N., Shell, R., Church, K. R., Nagendran, S., Sproule, D. M., Feltner, D. E., Wells, C., Ogrinc, F., Menier, M., L'Italien, J., Arnold, W. D., Kissel, J. T., Kaspar, B. K., and Mendell, J. R. (2019).

【０１３６】

【表５－５】

AVXS-101 (Onasemnogene Abeparvovec) for SMA1: Comparative Study with a Prospective Natural History Cohort. *J. Neuromuscul. Dis.* doi:10.3233/JND-190403.

29. Caron, N. S., Southwell, A. L., Brouwers, C. C., Cengio, L. D., Xie, Y., Black, H. F., Anderson, L. M., Ko, S., Zhu, X., van Deventer, S. J., Evers, M. M., Konstantinova, P., and Hayden, M. R. (2020). Potent and sustained huntingtin lowering via AAV5 encoding miRNA preserves striatal volume and cognitive function in a humanized mouse model of Huntington disease. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkz976.

30. Cehajic-Kapetanovic, J., Xue, K., Martinez-Fernandez de la Camara, C., Nanda, A., Davies, A., Wood, L. J., Salvetti, A. P., Fischer, M. D., Aylward, J. W., Barnard, A. R., Jolly, J. K., Luo, E., Lujan, B. J., Ong, T., Girach, A., Black, G. C. M., Gregori, N. Z., Davis, J. L., Rosa, P. R., Lotery, A. J., Lam, B. L., Stanga, P. E., and MacLaren, R. E. (2020). Initial results from a first-in-human gene therapy trial on X-linked retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR. *Nat. Med.* doi:10.1038/s41591-020-0763-1.

31. Christine, C. W., Bankiewicz, K. S., Van Laar, A. D., Richardson, R. M., Ravina, B., Kells, A. P., Boot, B., Martin, A. J., Nutt, J., Thompson, M. E., and Larson, P. S. (2019). Magnetic resonance imaging–guided phase 1 trial of putaminal AADC gene therapy for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* doi:10.1002/ana.25450.

32. Duan, D. (2018). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* doi:10.1016/j.ymthe.2018.07.011.

33. Eichler, F., Duncan, C., Musolino, P. L., Orchard, P. J., De Oliveira, S., Thrasher, A. J., Armant, M., Dansereau, C., Lund, T. C., Miller, W. P., Raymond, G. V., Sankar, R., Shah, A. J., Sevin, C., Gaspar, H. B., Gissen, P., Amartino, H., Bratkovic, D., Smith, N. J. C., Paker, A. M., Shamir, E., O'Meara, T., Davidson, D., Aubourg, P., and Williams, D. A. (2017). Hematopoietic stem-cell gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy. *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/NEJMoa1700554.

34. Gong, Y., Mu, D., Prabhakar, S., Moser, A., Musolino, P., Ren, J. Q., Breakefield, X. O., Maguire, C. A., and Eichler, F. S. (2015). Adenoassociated virus serotype 9-mediated gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol. Ther.* doi:10.1038/mt.2015.6.

【０１３７】

【表５－６】

35. Griciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A. R., Lesinski, A. N., Asselin, C. N., Mullin, K., Hooli, B., Choi, S. H., Hyman, B. T., and Tanzi, R. E. (2013). Alzheimer's disease risk gene cd33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron.* doi:10.1016/j.neuron.2013.04.014.

36. György, B., Meijer, E. J., Ivanchenko, M. V., Tenneson, K., Emond, F., Hanlon, K. S., Indzhykulian, A. A., Volak, A., Karavitaki, K. D., Tamvakologos, P. I., Vezina, M., Berezovskii, V. K., Born, R. T., O'Brien, M., Lafond, J. F., Arsenijevic, Y., Kenna, M. A., Maguire, C. A., and Corey, D. P. (2019). Gene Transfer with AAV9-PHP.B Rescues Hearing in a Mouse Model of Usher Syndrome 3A and Transduces Hair Cells in a Non-human Primate. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* doi:10.1016/j.omtm.2018.11.003.

37. Hughes, M. P., Smith, D. A., Morris, L., Fletcher, C., Colaco, A., Huebecker, M., Tordo, J., Palomar, N., Massaro, G., Henckaerts, E., Waddington, S. N., Platt, F. M., and Rahim, A. A. (2018). AAV9 intracerebroventricular gene therapy improves lifespan, locomotor function and pathology in a mouse model of Niemann-Pick type C1 disease. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddy212.

38. Isgrig, K., Shteamer, J. W., Belyantseva, I. A., Drummond, M. C., Fitzgerald, T. S., Vijayakumar, S., Jones, S. M., Griffith, A. J., Friedman, T. B., Cunningham, L. L., and Chien, W. W. (2017). Gene Therapy Restores Balance and Auditory Functions in a Mouse Model of Usher Syndrome. *Mol. Ther.* doi:10.1016/j.ymthe.2017.01.007.

39. Keskin, S., Brouwers, C. C., Sogorb-Gonzalez, M., Martier, R., Depla, J. A., Vallès, A., van Deventer, S. J., Konstantinova, P., and Evers, M. M. (2019). AAV5-miHTT Lowers Huntingtin mRNA and Protein without Off-Target Effects in Patient-Derived Neuronal Cultures and Astrocytes. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* doi:10.1016/j.omtm.2019.09.010.

40. Leone, P., Shera, D., McPhee, S. W. J., Francis, J. S., Kolodny, E. H., Bilaniuk, L. T., Wang, D. J., Assadi, M., Goldfarb, O., Goldman, H. W., Freese, A., Young, D., During, M. J., Samulski, R. J., and Janson, C. G. (2012). Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Sci. Transl. Med.* doi:10.1126/scitranslmed.3003454.

【０１３８】

【表５－７】

41. Lopes, V. S., and Williams, D. S. (2015). Gene therapy for the retinal degeneration of usher syndrome caused by mutations in MYO7A. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* doi:10.1101/cshperspect.a017319.

42. Maguire, A. M., Russell, S., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., Marshall, K. A., McCague, S., Reichert, H., Davis, M., Simonelli, F., Leroy, B. P., Wright, J. F., High, K. A., and Bennett, J. (2019). Efficacy, Safety, and Durability of Voretigene Neparvovec-rzyl in RPE65 Mutation–Associated Inherited Retinal Dystrophy: Results of Phase 1 and 3 Trials. *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2019.06.017.

43. Millington-Ward, S., Chadderton, N., O'Reilly, M., Palfi, A., Goldmann, T., Kilty, C., Humphries, M., Wolfrum, U., Bennett, J., Humphries, P., Kenna, P. F., and Farrar, G. J. (2011). Suppression and Replacement Gene Therapy for Autosomal Dominant Disease in a Murine Model of Dominant Retinitis Pigmentosa. *Mol. Ther.* 19, 642–649. doi:10.1038/mt.2010.293.

44. Mookherjee, S., Hiriyanna, S., Kaneshiro, K., Li, Y., Li, W., Qian, H., Li, T., Colosi, P., Swaroop, A., Wu, Z., Li, L., and Khanna, H. (2015). Long-term rescue of cone photoreceptor degeneration in retinitis pigmentosa 2 (RP2)-knockout mice by gene replacement therapy. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddv354.

45. Nathwani, A. C. (2019). Gene therapy for hemophilia. *Hematol. (United States)*. doi:10.1182/hematology.2019000007.

46. Nist-Lund, C. A., Pan, B., Patterson, A., Asai, Y., Chen, T., Zhou, W., Zhu, H., Romero, S., Resnik, J., Polley, D. B., Géléoc, G. S., and Holt, J. R. (2019). Improved TMC1 gene therapy restores hearing and balance in mice with genetic inner ear disorders. *Nat. Commun.* doi:10.1038/s41467-018-08264-w.

47. Remes, A., Franz, M., Zaradzki, M., Borowski, C., Frey, N., Karck, M., Kallenbach, K., Müller, O. J., Wagner, A. H., and Arif, R. (2020). AAV-mediated TIMP-1 overexpression in aortic tissue reduces the severity of allograft vasculopathy in mice. *J. Hear. Lung Transplant.* doi:10.1016/j.healun.2020.01.1338.

48. Tan, F., Chu, C., Qi, J., Li, W., You, D., Li, K., Chen, X., Zhao, W., Cheng, C., Liu, X., Qiao, Y., Su, B., He, S., Zhong, C., Li, H., Chai, R., and Zhong, G.

【０１３９】

【表５－８】

(2019). AAV-ie enables safe and efficient gene transfer to inner ear cells. *Nat. Commun.* doi:10.1038/s41467-019-11687-8.

49. Wan, X., Pei, H., Zhao, M., Yang, S., Hu, W., He, H., Ma, S., Zhang, G., Dong, X., Chen, C., Wang, D., and Li, B. (2016). Efficacy and Safety of rAAV2-ND4 Treatment for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Sci. Rep.* 6, 1–10. doi:10.1038/srep21587.

50. Yang, S., Ma, S.-Q., Wan, X., He, H., Pei, H., Zhao, M.-J., Chen, C., Wang, D.-W., Dong, X.-Y., Yuan, J.-J., and Li, B. (2016). Long-term outcomes of gene therapy for the treatment of Leber's hereditary optic neuropathy. *EBioMedicine* 10, 258–268. doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.002.

51. Yu, W., Mookherjee, S., Chaitankar, V., Hiriyanna, S., Kim, J. W., Brooks, M., Ataeijannati, Y., Sun, X., Dong, L., Li, T., Swaroop, A., and Wu, Z. (2017). Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice. *Nat. Commun.* doi:10.1038/ncomms14716.

52. Zhang, W., Kim, S. M., Wang, W., Cai, C., Feng, Y., Kong, W., and Lin, X. (2018). Cochlear Gene Therapy for Sensorineural Hearing Loss: Current Status and Major Remaining Hurdles for Translational Success. *Front. Mol. Neurosci.* doi:10.3389/fnmol.2018.00221.

【０１４０】

他の実施形態

本発明は、その詳細な説明と併せて記載されているが、上述の記載は、説明のためのものであり、添付の特許請求の範囲により規定される本発明の範囲を限定するものではないことを理解されたい。他の態様、利点、および改変は、以下の特許請求の範囲内である。本発明の様々な実施形態を以下に示す。

１．配列ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）またはＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２）に由来する少なくとも４つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含むＡＡＶカプシドタンパク質。

２．配列ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）またはＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２）に由来する少なくとも５つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む、上記１に記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

３．配列ＳＴＴＬＹＳＰ（配列番号１）またはＦＶＶＧＱＳＹ（配列番号２）に由来する少なくとも６つの連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む、上記１に記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

４．前記ＡＡＶは、ＡＡＶ９である、上記１～３のいずれかに記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

５．ＡＡＶ９　ＶＰ１を含む、上記１～４のいずれかに記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

６．前記配列は、配列番号６のアミノ酸５８８および５８９に対応する位置に挿入されている、上記５に記載のＡＡＶカプシドタンパク質。

７．上記１～６のいずれかに記載のＡＡＶカプシドタンパク質をコードする核酸。

８．上記１～６のいずれかに記載のカプシドタンパク質を含み、好ましくは、野生型ＶＰ１、ＶＰ２、またはＶＰ３カプシドタンパク質を含まないＡＡＶ。

９．導入遺伝子、好ましくは治療用導入遺伝子をさらに含む、上記８に記載のＡＡＶ。

１０．導入遺伝子を細胞に送達するための方法であって、前記細胞を、上記１～９のいずれかに記載のＡＡＶと接触させるステップを含む、方法。
１１．前記細胞は、ニューロン（任意選択で、後根神経節ニューロンまたはらせん神経節ニューロン）、アストロサイト、心筋細胞、または筋細胞、アストロサイト、グリア細胞、内有毛細胞、外有毛細胞、支持細胞、内耳の線維細胞、光受容体、介在ニューロン、網膜神経節、または網膜色素上皮である、上記１０に記載の方法。
１２．前記細胞は、生きている対象に存在する、上記１１に記載の方法。
１３．前記対象は、哺乳動物対象である、上記１１に記載の方法。
１４．前記細胞は、脳、脊髄、後根神経節、心臓、内耳、眼、または筋肉、およびそれらの組合せから選択される組織に存在する、上記１０～１３のいずれかに記載の方法。
１５．前記対象は、アルツハイマー病、パーキンソン病、Ｘ連鎖副腎白質ジストロフィー、カナバン病、ニーマンピック病、脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、コネキシン－２６、アッシャー３Ａ型、アッシャー２Ｄ型、有毛細胞関連聴力喪失、有毛細胞関連聴力喪失（ＤＦＮＢ７／１１）、内有毛細胞関連聴力喪失（ＤＦＮＢ９）、アッシャー１Ｆ型、アッシャー１Ｂ型、網膜色素変性症（ＲＰ；非症候性）、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経症、アッシャー症候群（ＲＰ；難聴を伴う症候群）、デュシェンヌ筋ジストロフィー、同種移植血管症、または血友病ＡおよびＢを有する、上記１４に記載の方法。
１６．前記細胞は、前記対象の脳に存在し、前記ＡＡＶは、非経口送達、脳内、または髄腔内送達により投与される、上記１０～１３のいずれかに記載の方法。
１７．前記髄腔内送達は、腰椎注射、大槽注射、または実質内注射による、上記１６に記載の方法。
１８．前記ＡＡＶは、非経口送達により、好ましくは、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内送達により送達される、上記１０～１６のいずれかに記載の方法。
１９．前記細胞は、前記対象の眼に存在し、前記ＡＡＶは、網膜下または硝子体内注射により投与される、上記１０～１３のいずれかに記載の方法。
２０．前記細胞は、前記対象の内耳に存在し、前記ＡＡＶは、正円窓膜の上からもしくはそれを通して、正円窓に隣接する外科的蝸牛切開術による穿孔を通して、骨性卵円窓の窓を通して、または半規管を通して適用することにより、蝸牛に投与される、上記１０～１３のいずれかに記載の方法。
２１．（ｉ）プロモーターにより駆動されるＣｒｅリコンビナーゼをコードする配列、
（ｉｉ）ＡＡＶ９カプシドタンパク質をコードする配列であって、ヘプタマーペプチドが前記カプシドのアミノ酸（ａａ）５８８～５８９をコードする配列間に挿入されており、プロモーターにより駆動され、前記Ｃｒｅカセットの下流にある配列
を含むライブラリー構築物ＡＡＶ。
２２．前記ヘプタマーは、ランダムヘプタマーペプチドまたは事前に選択されたヘプタマーペプチドを含む、上記２１に記載のライブラリー構築物ＡＡＶ。
２３．上記２１または２２に記載の複数のライブラリー構築物を含むライブラリー。
２４．前記ヘプタマーのすべての考え得るバリアントをコードする配列を有するライブラリー構築物を含む、上記２３に記載のライブラリー。
２５．事前に選択された細胞タイプにて導入遺伝子発現を媒介する操作されたカプシドを同定するための方法であって、
（ａ）上記２３または２４に記載のライブラリーを、非ヒトモデル動物、好ましくは哺乳動物に投与するステップであって、前記モデル動物の細胞は、レポーター配列の上流にあるｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットを発現する、ステップ；
（ｂ）前記事前に選択された細胞タイプの細胞を単離するステップ；
（ｃ）前記レポーター配列が発現されている細胞を選択するステップ；
（ｄ）前記ライブラリー構築物の少なくとも部分、好ましくは前記ヘプタマーを含む部分を、ステップ（ｃ）の前記レポーター配列が発現されている前記選択された細胞から単離するステップ；および
（ｅ）ステップ（ｄ）で単離された前記ライブラリー構築物中の前記ヘプタマーが同定

されたことを決定するステップであって、単離された前記ヘプタマーは、前記事前に選択された細胞タイプにて導入遺伝子発現を媒介することができる、ステップ
を含む方法。
２６．前記レポーター配列は、蛍光レポータータンパク質をコードする、上記２５に記載の方法。
２７．前記モデル動物は、前記レポーター配列の上流にあるｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットについてトランスジェニックであるか、または前記レポーター配列の上流にあるｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットを、第２の構築物から発現させることができる、上記２５に記載の方法。
２８．前記ライブラリー構築物中の前記ヘプタマーが同定されたことを決定することは、ＤＮＡシーケンシング分析を使用することを含む、上記２５に記載の方法。
２９．ステップ（ｅ）の前および／または後に、
ＰＣＲを使用して、任意選択で完全なカプシド配列を含む、前記ヘプタマー配列を含む配列を、ステップ（ｄ）で単離された前記ライブラリー構築物から増幅するステップ；
前記増幅された配列を、第２のセットのライブラリーベクターにクローニングして戻すステップ；
前記第２のセットのライブラリーベクターを再パッケージングするステップ；および
前記第２のライブラリーベクターに対して、ステップ（ａ）～（ｄ）または（ａ）～（ｅ）を実施するステップ
をさらに含む、上記２５に記載の方法。

【図面】

【図１－１】

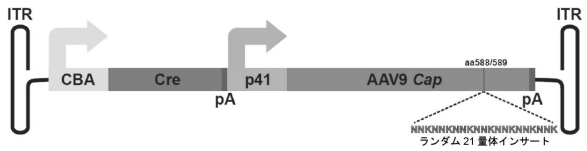


図 1A

【図１－２】

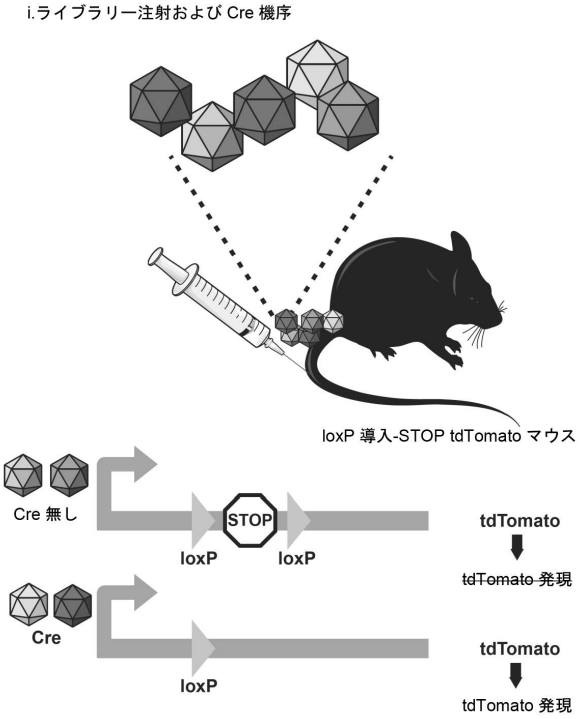


図 1B

【図１－３】

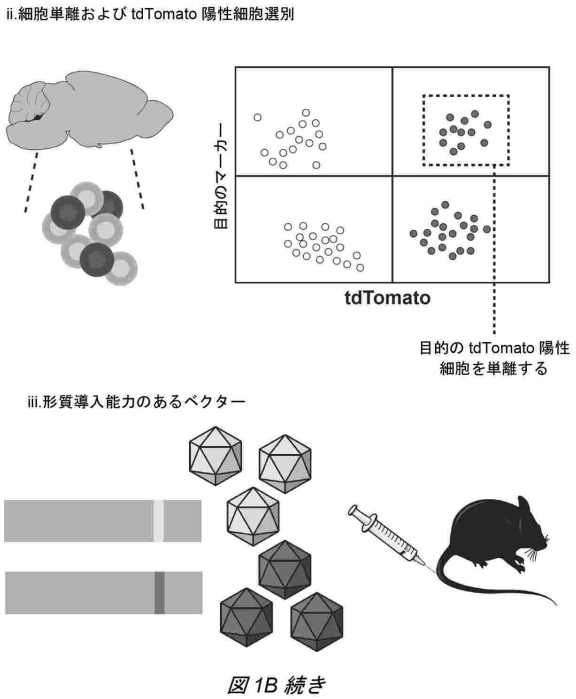


図 1B 続き

【図２－１】

ヌクレオチド配列	配列番号	ペプチド配列	配列番号	プールの%
CAGCCTCGTCTTACTGAGCTT	17.	QPRLTEL	18.	0.05572947
AGTCATTTTAGTAATTCTATG	19.	SHFSNSM	20.	0.02365472
CCGCCTTCTACGGGGAATCCT	21.	PPSTGNP	22.	0.02328549
AATAGTCTTGGGGTGATGGAT	23.	NSLGVMD	24.	0.02276376
CCTCCTATGGCTACGCCTCAG	25.	PPMATPQ	26.	0.02126276
CCGCATACTCGGGCTGAGCCT	27.	PHTRAEP	28.	0.01834104
GTGAATCAGACTAATTATTCT	29.	VNQTNYS	30.	0.01784338
CATGCGCCGAGGCTGGTTCAG	31.	HAPRLVQ	32.	0.01539524
TGGAGTAAGGAGTCGAATCAT	33.	WSKESNH	34.	0.01529892
ACTACTGCTGGTCCGACTGAG	35.	TTAGPTE	36.	0.01419123
TCGTGGCCGCAGTCGCCTTCG	37.	SWPQSPS	38.	0.0139424
ACTTGTGCTGTTCCGGATCGG	39.	TCAVPDR	40.	0.01326816
CCTCGTGCGGAGCCTCGGACG	41.	PRAEPRT	42.	0.01314776
CCTACTGCGGGTGTGTATCTG	43.	PTAGVYL	44.	0.01308354
CAGTTGAGTAATACGACGTTG	45.	QLSNTTL	46.	0.01285077
CGGATGGATATGGCTGTGAGG	47.	RMDMAVR	48.	0.01261799
CGGCCGCCGCCTGCGACTCCT	49.	RPPPATP	50.	0.01257786
CAGTATCTGTTTCATATTTTT	51.	QYLFHIF	52.	0.01226482
GGTGCTGGGACTCTTACTTCT	53.	GAGTLTS	54.	0.01223271
CCTCTTTCGCGTGTTGCTTTG	55.	PLSRVAL	56.	0.0119277
ACTACTGCTAAGACGACTGGG	57.	TTAKTTG	58.	0.01187954
TCGCTGCCGGCTACTCATGTG	59.	SLPATHV	60.	0.01170295
AGTGAGAAGGTGATTCGGAGT	61.	SEKVIRS	62.	0.01136583
AAGTCGACTATGCGGAAGCCG	63.	KSTMRKP	64.	0.01134977
GTGTCGAAGCAGAATACGACT	65.	VSKQNTT	66.	0.01106081
GCTGATATGACGGGGCCTACT	67.	ADMTGPT	68.	0.01080396
CCTACTCGTGCGACTCCTATT	69.	PTRATPI	70.	0.01057921
TCTTGGCCTGGGCTGTTGCTG	71.	SWPGLLL	72.	0.01055513
TGGAGGCTGGAGCAGTTGAAG	73.	WRLEQLK	74.	0.01037051
CTTCCGAGTTCTCCGGTTTTT	75.	LPSSPVF	76.	0.31919829
CCTCAGCGGCATCAGAATGAT	77.	PQRHQND	78.	0.00414981
TCGATTCCGTTTCGGTATCCG	79.	SIPFRYP	80.	0.03205067
CCTGATGGTCCGCAGGCTCTG	81.	PDGPQAL	82.	0.00370834
TCGACTACGTGGAAGTCTGAT	83.	STTWKSD	84.	0.05475021
TTGCAGAAGATGGCTGTTCCG	85.	LQKMAVP	86.	0.00273711
N/A		その他		0.13220799

図 2A

【図２－２】

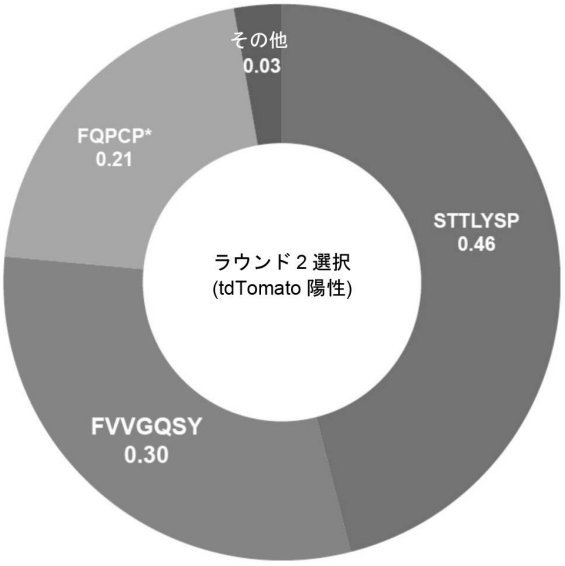


図 2B

【図３－１】



図 3A

【図３－２】

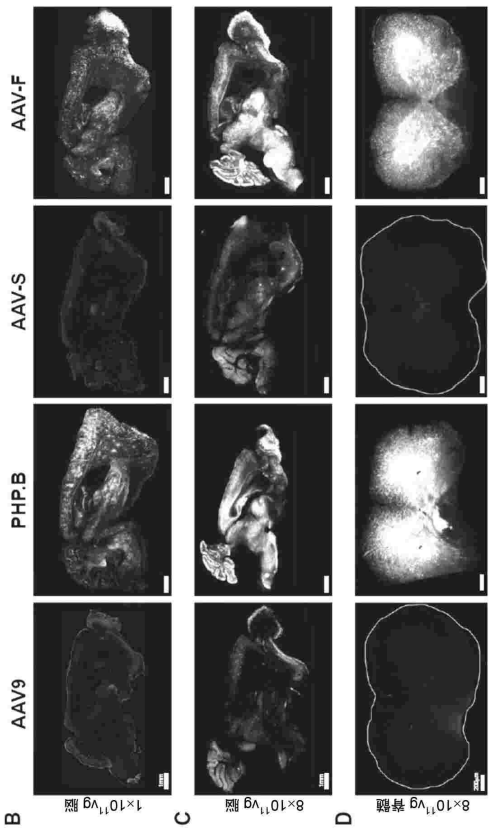


図 3B-D

【図３－３】

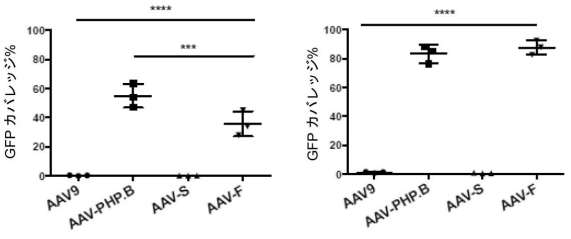


図 3E

【図３－４】

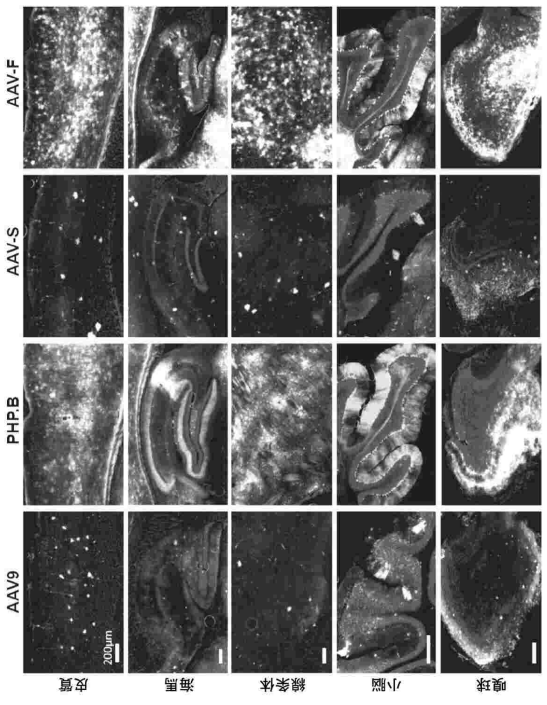


図 3F

【図４－１】

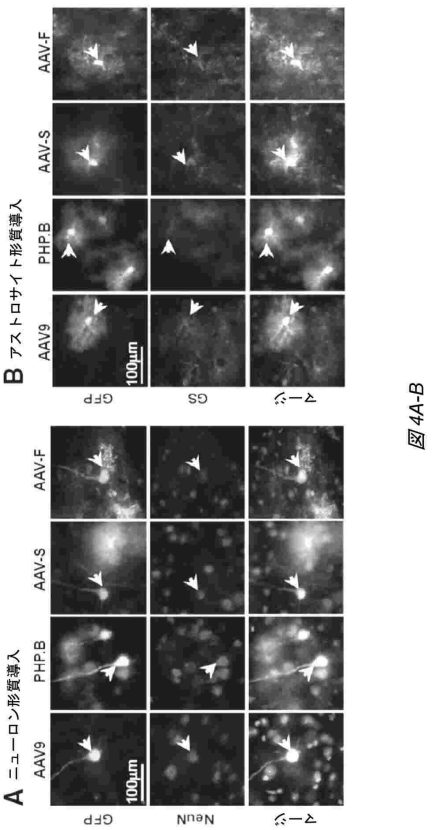


図 4A-B

【図４－２】

ニューロンおよびアストロサイトの細胞タイプ計数

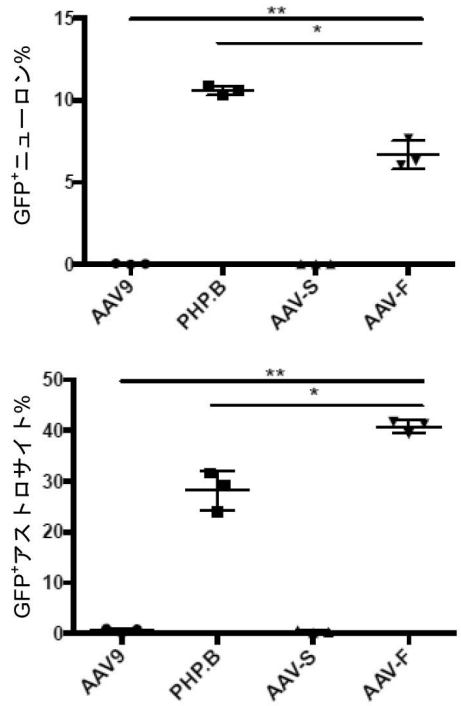


図 4C

【図４－３】

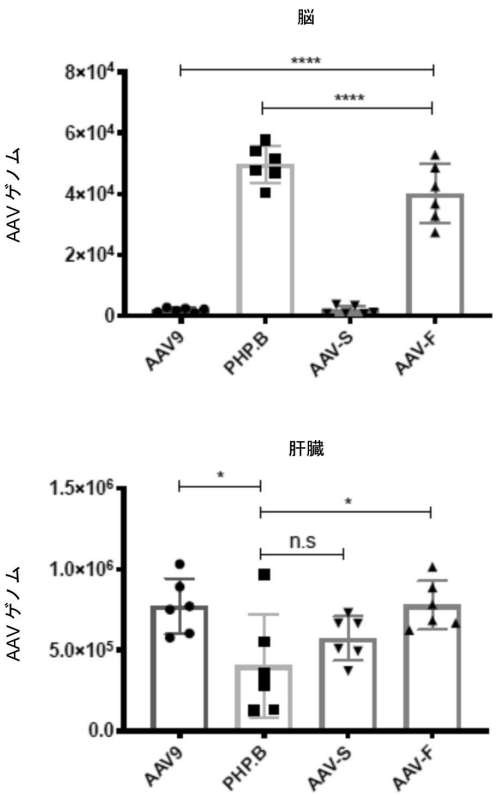


図 4D

【図４－４】

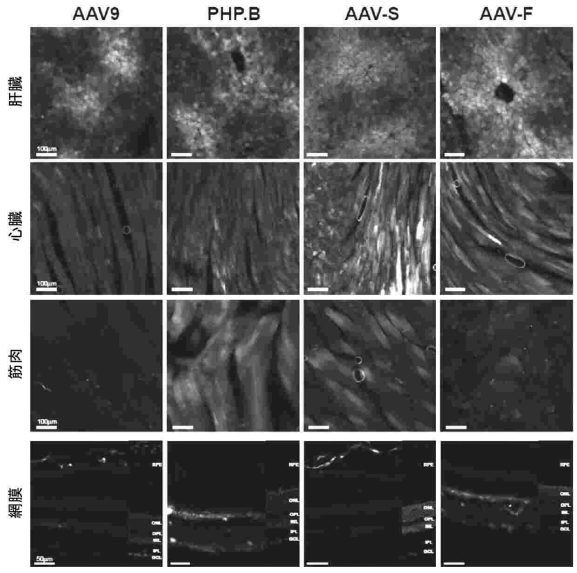


図 4E

【図５－１】

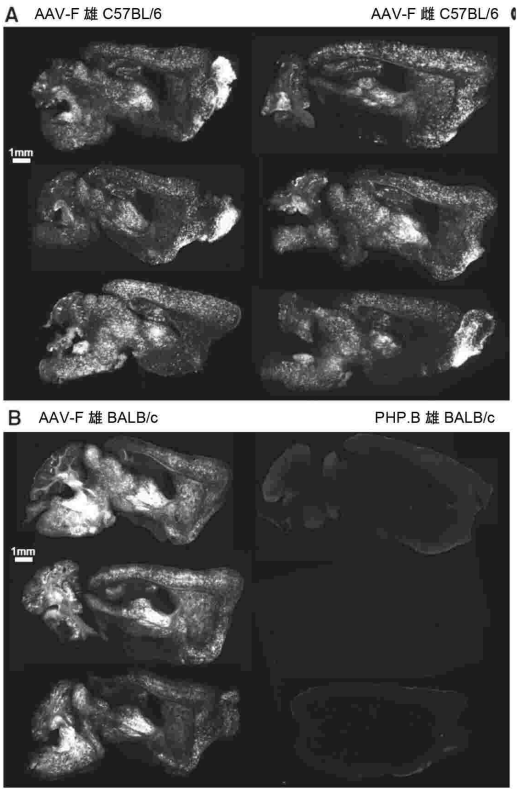


図 5A-B

【図５－２】

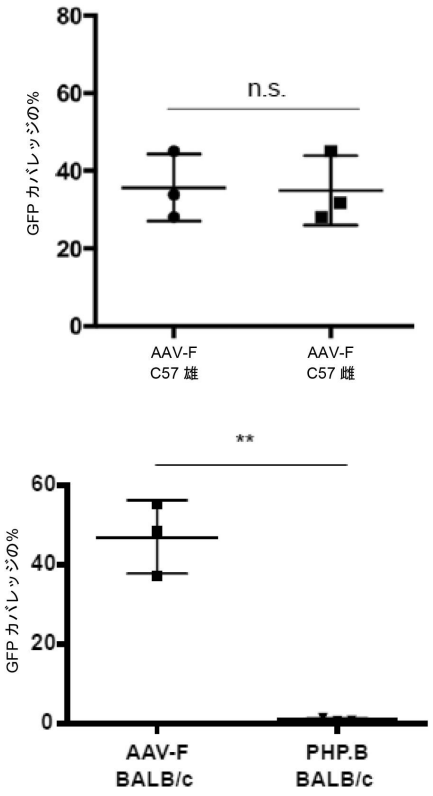


図 5C

【図６】

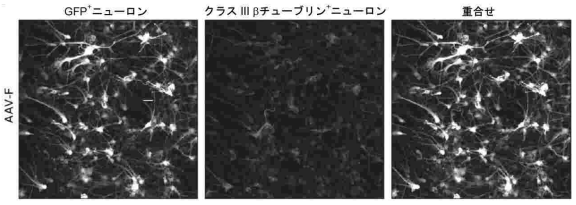


図 6A

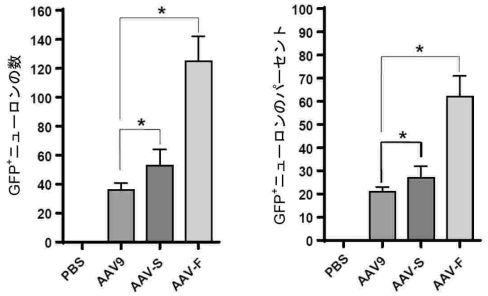


図 6B

【図７－１】

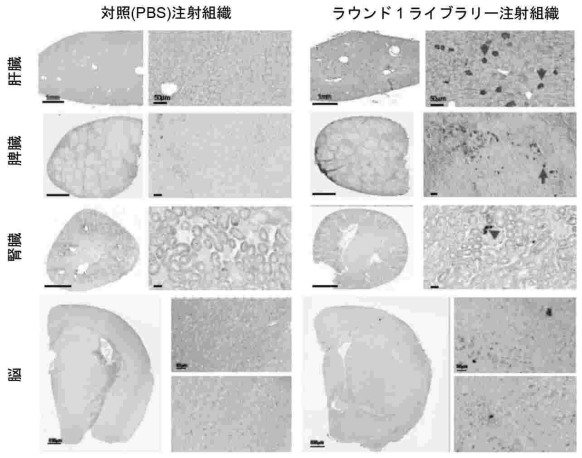


図 7A

【図７－２】

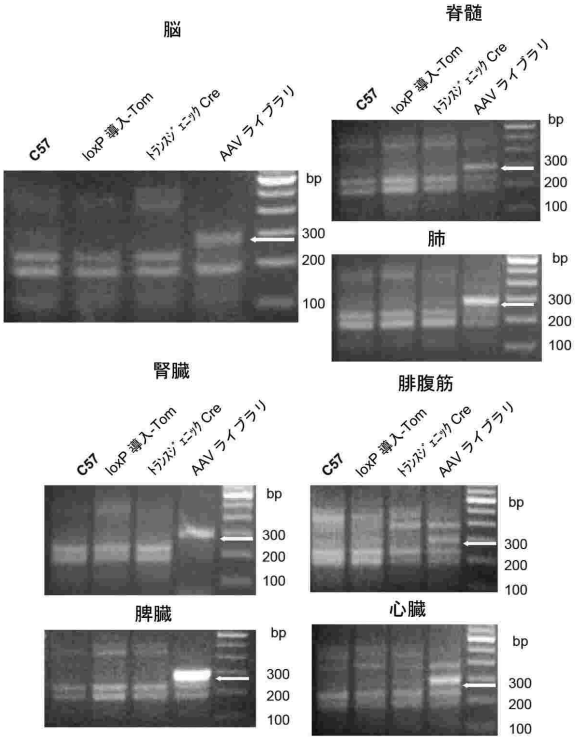


図 7B

【図７－３】

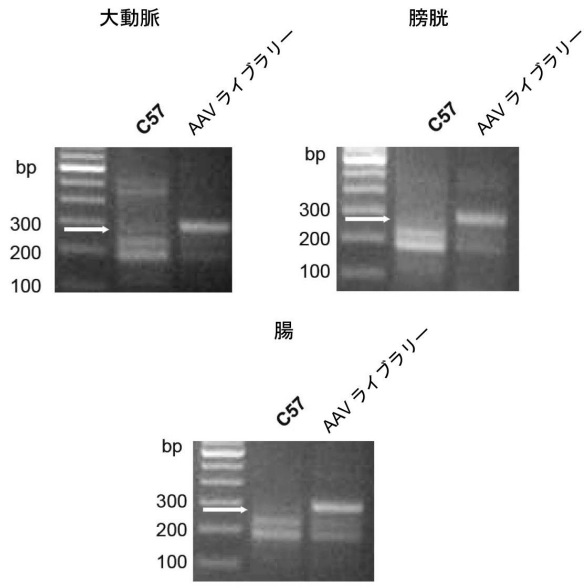


図7B 続き

【図７－４】

DNA 配列	配列番号	ペプチド配列	配列番号	頻度
ACGGGGTGTAAGTGTTCGCAG	87.	TGCKCSQ	88.	0.05897
CATCTGCCTGTTATGAATGAG	89.	HLPVMNE	90.	0.055593
GTTTCGTTGAATTATACTGCT	91.	VSLNYTA	92.	0.052346
CCTCCTCCTCCTCCGCCTGTG	93.	PPPPPPV	94.	0.0498
AGTTCTACTGCTAGTCGTCGT	95.	SSTASRR	96.	0.048579
CTGCTTGTGACGTGTCCGGAT	97.	LLVTCPD	98.	0.039487
TCGTTGCTGCGTTATGCTCCG	99.	SLLRYAP	100.	0.039149
CAGCCGCTGCGTCCGAATCTG	101.	QPLRPNL	102.	0.037876
GCTTTGGATACTCATCATTGG	103.	ALDTHHW	104.	0.036811
CGGCCTACTCGTCTTTCTCCG	105.	RPTRLSP	106.	0.036811
GATGCTTGGTCGGCTTCTATT	107.	DAWSASI	108.	0.036213
TATAAGTGTTGGCCGAGGAGT	109.	YKCWPRS	110.	0.03585
AAGTATCTGACTAATCTTTCT	111.	KYLTNLS	112.	0.034941
TCGCGGCCTCCGCCGTCTCTG	113.	SRPPPSL	114.	0.030083
TAGGCGCCGATTCTTTAGTTG	115.			0.029433
ATGCCTCCTTCTCCTCCGGGT	116.	MPPSPPG	117.	0.029069
CCGTTTCCTCAGATGCTTTTT	118.	PFPQMLF	119.	0.028108
CCTCAGGCGTCTCATGTTAAT	120.	PQASHVN	121.	0.027199
GAGTATTGTTCTTAGATTCCT	122.	EYCS	123.	0.026887
TCGTAGAATTTGCGGGTGTTG	124.	S	125.	0.025588
TATTATCATTCGCTGTCGTCG	126.	YYHSLSS	127.	0.024809
AAGCATTCTCAGCGGCGGAAT	128.	KHSQRRN	129.	0.024004
TAGACTAATGTGTGGATTAAT	130.			0.023484
ACTAAGACGCCTGAGCATTAG	131.	TKTPEH	132.	0.019977
GGGCCGGAGGGGCCGCGTCTG	133.	GPEGPRL	134.	0.019536
TGTACTTCTAATCTGCATGGG	135.	CTSNLHG	136.	0.018263
GTTATTACTCATCTGACTGAT	137.	VITHLTD	138.	0.018133
GATTCTAATCATTTTGGTCCG	139.	DSNHFGP	140.	0.017899
CCGAGTCAGCAGACTTAGATG	141.	PSQQT	142.	0.014652
TTTGTTGCTGATTGGGAGCCT	143.	FVADWEP	144.	0.014262
CTGATGCAGACTAATATTACG	145.	LMQTNIT	146.	0.011742
CTGGTGGTTCCTAATCGTGAT	147.	LVVPNRD	148.	0.011586
N/A	149.	その他	150.	0.022861

図7C

【図８－１】

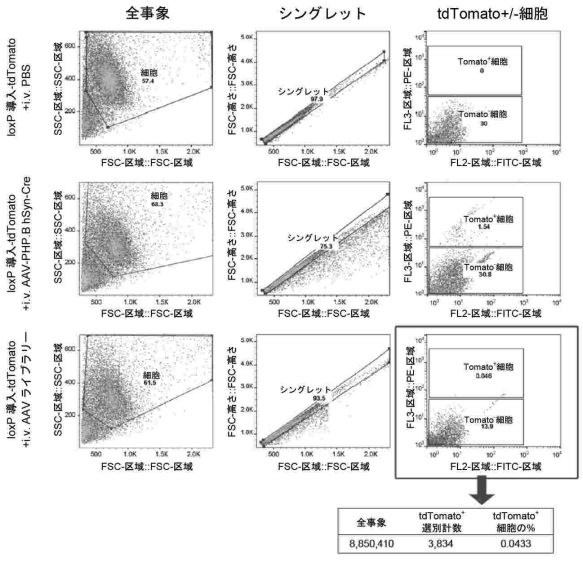


図8A

【図８－２】

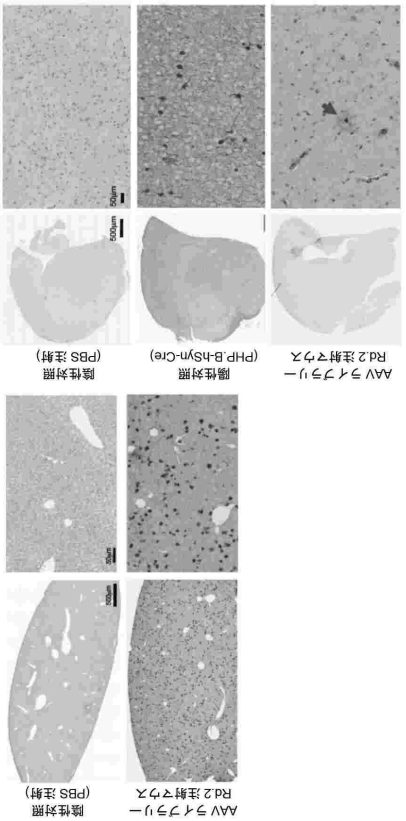


図8B

【図９】

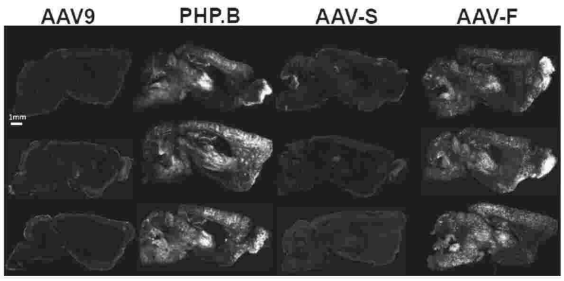


図9A

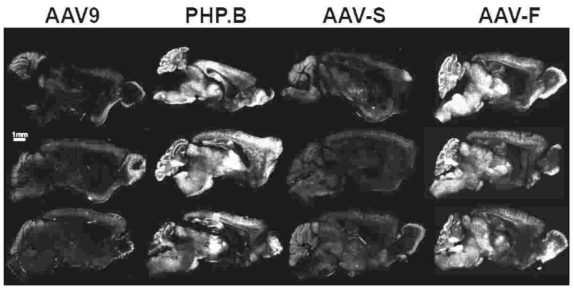


図9B

【図１０－１】

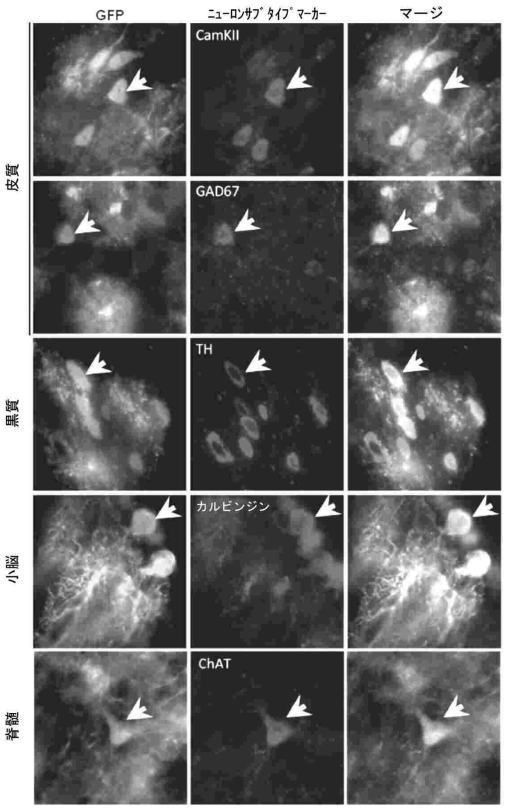


図10A

【図１０－２】

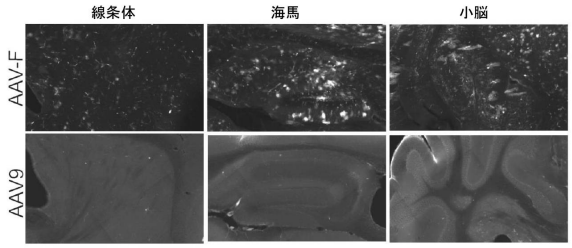


図10B

【図１１】

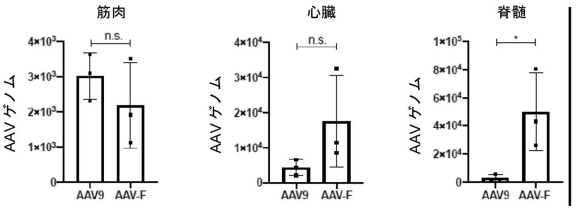


図11

【図１２－１】

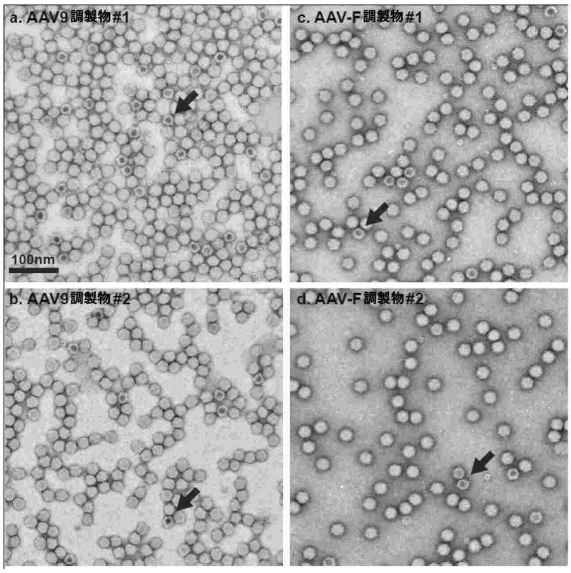


図12A-D

【図１２－２】

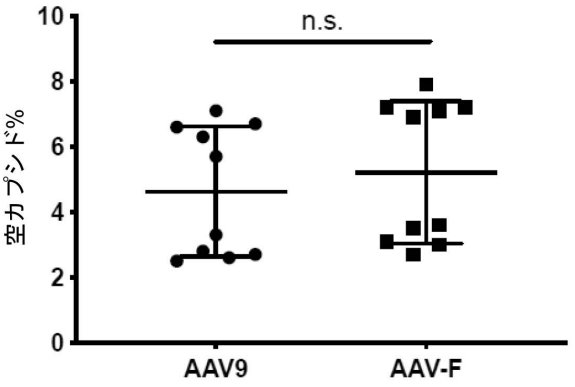


図12E

【図１３】

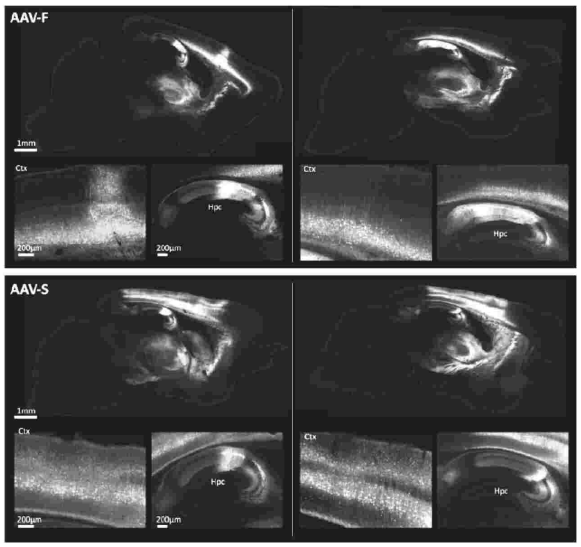


図13

【図１４－１】

髄腔内注射後の脳形質導入

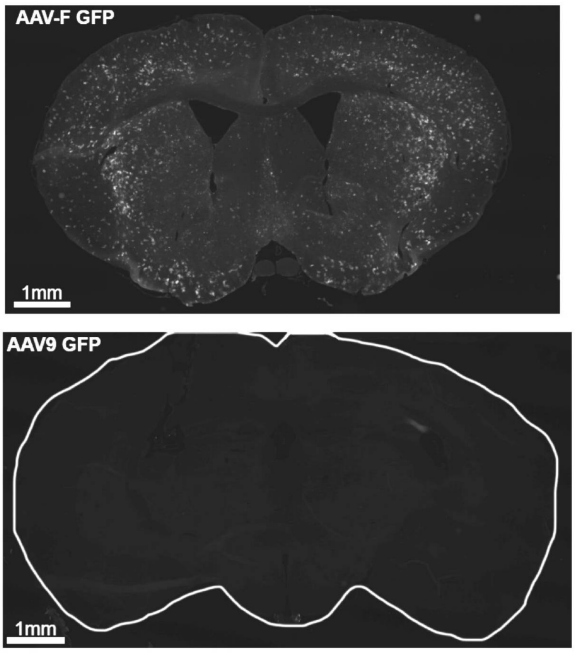


図14A

【図１４－２】

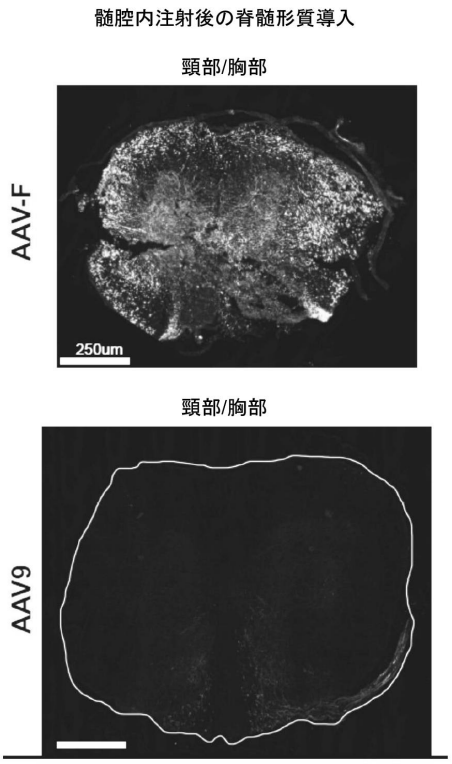


図14A 続き

【図１４－３】

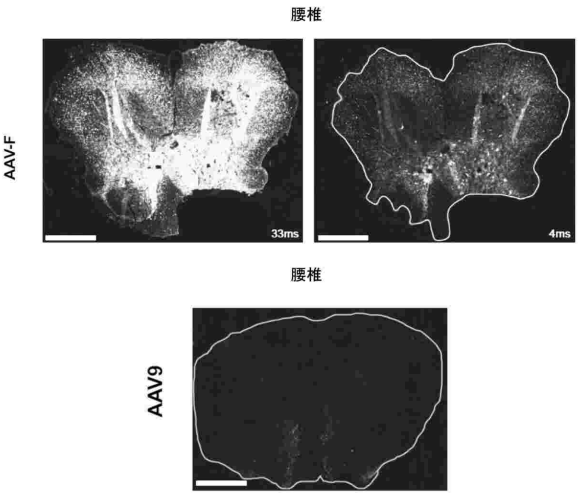


図14A 続き

【図１４－４】

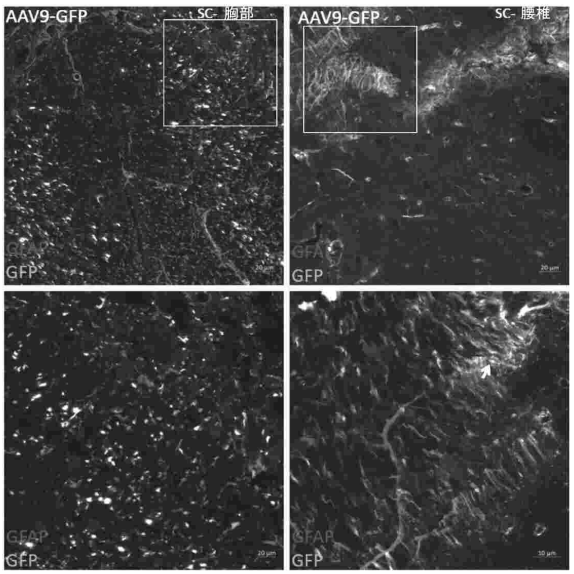


図14B

【図１４－５】

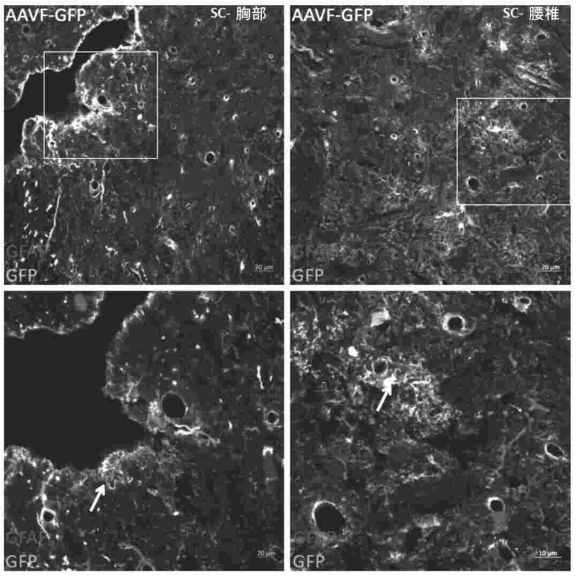


図14C

【図１４－６】

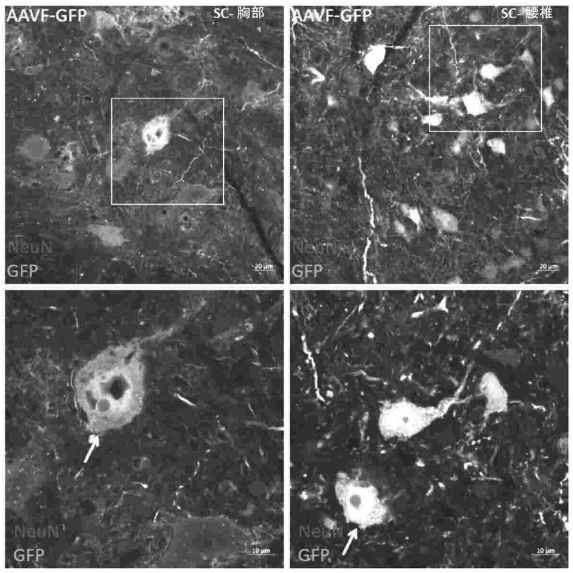


図14D

【図１４－７】

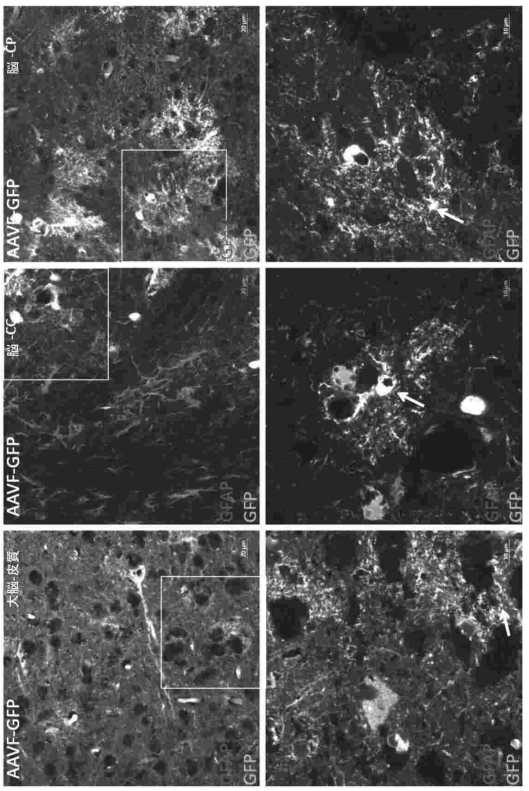


図14E

【図１４－８】

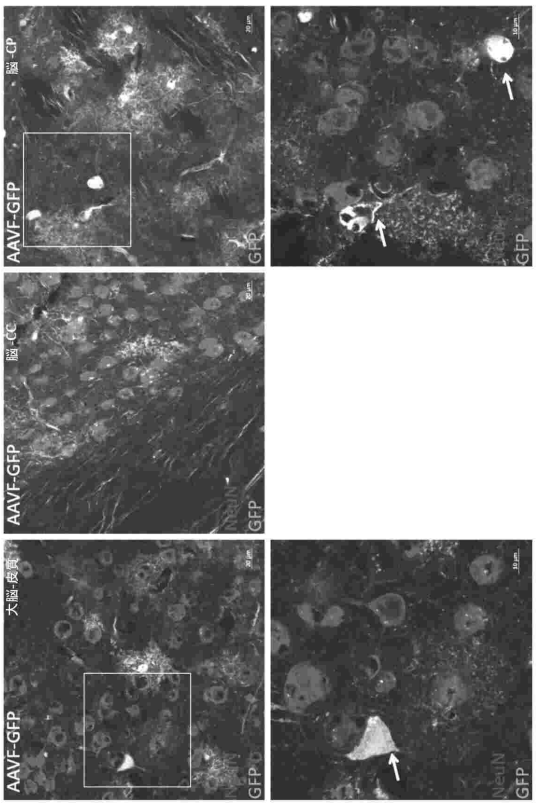


図14F

【図１５】

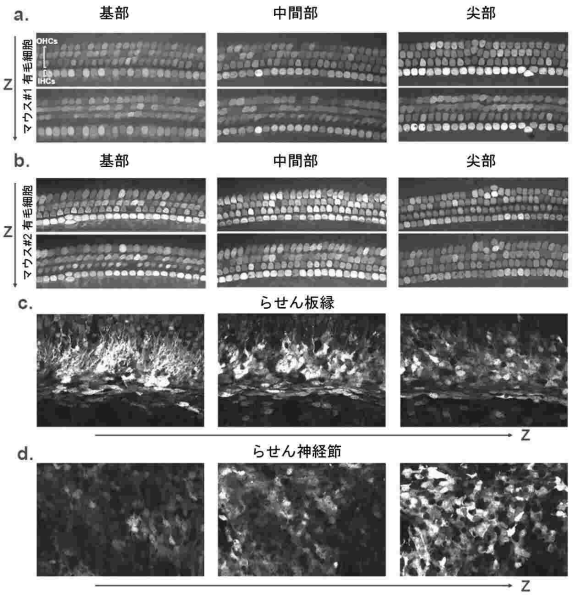


図15A-D

【図１６－１】

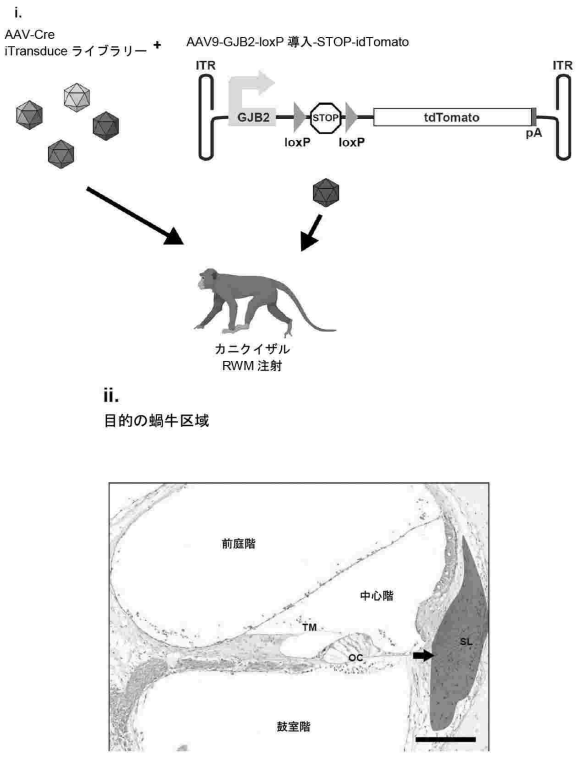


図 16A

【図１６－２】

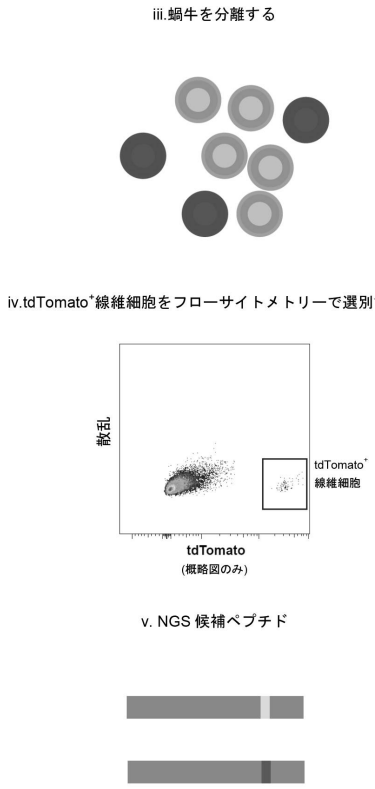


図 16A 続き

【図１６－３】

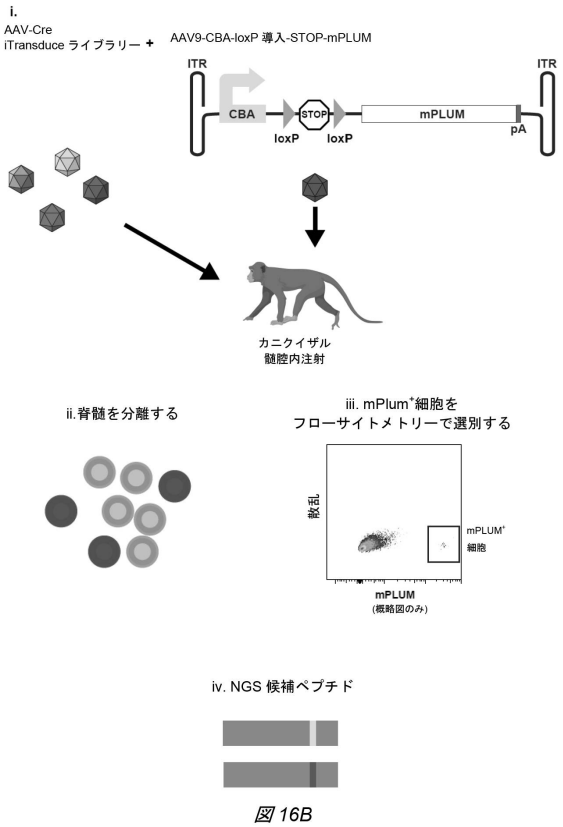


図 16B

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
A61P	*9/00*	*(2006.01)*	A61P	9/00	
A61P	*21/04*	*(2006.01)*	A61P	21/04	
A61P	*25/02*	*(2006.01)*	A61P	25/02	
A61P	*27/02*	*(2006.01)*	A61P	27/02	
A61P	*27/16*	*(2006.01)*	A61P	27/16	
A61P	*21/00*	*(2006.01)*	A61P	21/00	
A61P	*25/14*	*(2006.01)*	A61P	25/14	
A61P	*25/28*	*(2006.01)*	A61P	25/28	
A61P	*25/16*	*(2006.01)*	A61P	25/16	
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	25/00	
A61P	*5/38*	*(2006.01)*	A61P	5/38	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	111
A61K	*35/76*	*(2015.01)*	A61K	35/76	
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	48/00	
C12N	*15/35*	*(2006.01)*	C12N	15/35	ZNA
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z

(74)代理人 100196966
弁理士 植田 渉
(72)発明者 マグワイア，ケイシー エー．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４７４，アーリントン，カール ロード ３２
(72)発明者 ハドリー，エロイーズ マリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１２０，ロクスベリー クロッシング，グリーンウィッチ ストリート １３
(72)発明者 ハンロン，キリアン，エス．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１１４，ボストン，フルート ストリート ５５
審査官 齋藤 光介

(56)参考文献 国際公開第２０１８／０２２６０８（WO，A１）
国際公開第２０１７／１３６５３６（WO，A１）
国際公開第２０１８／１８９２４４（WO，A１）
Nature Biotechnology，2016年，34，204-209

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ７／００－７／０８，
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）