

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2024年11月28日(28.11.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/242150 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 14/705 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)  
C12N 7/02 (2006.01) C07K 17/00 (2006.01)  
C12N 15/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/018896

(22) 国際出願日: 2024年5月22日(22.05.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-084423	2023年5月23日(23.05.2023)	JP
特願 2024-007357	2024年1月22日(22.01.2024)	JP
特願 2024-007358	2024年1月22日(22.01.2024)	JP
特願 2024-063328	2024年4月10日(10.04.2024)	JP

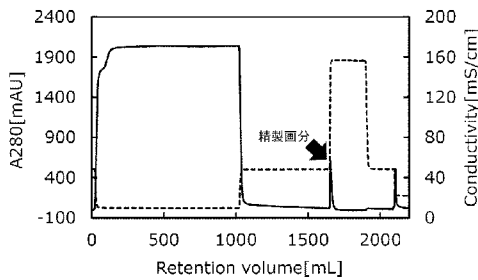
(71) 出願人: 東ソー株式会社 (TOSOH CORPORATION) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町4 5 6 0 番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 岩淵 圭篤 (IWABUCHI, Kiyoshige); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川 2 7 4 3 番地 1 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 栗原 健人 (KURIHARA, Kento); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川 2 7 4 3 番地 1 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 眞鍋 友理子 (MANABE, Yuriko); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川 2 7 4 3 番地 1 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 吉田 浩平 (YOSHIDA, Kouhei); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川 2 7 4 3 番地 1 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 大村 慧太 (OMURA, Keita); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川 2 7 4 3 番地 1

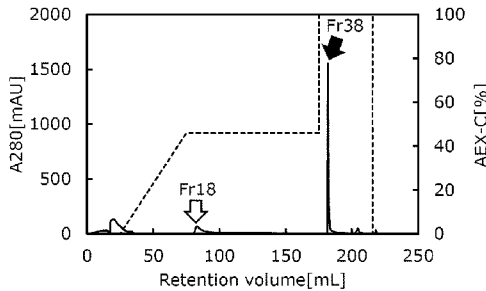
(54) Title: MODIFIED RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS (AAV)-BINDING PROTEIN AND METHOD FOR PURIFYING AAV

(54) 発明の名称: 変更された組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) 結合性タンパク質およびAAVの精製方法

(a) AVR29cカラム(AF精製)



(b) SkillPak GigaCap Qカラム(AEX精製)



(a) AVR29c column (AF purification)  
(b) SkillPak GigaCap Q column (AEX purification)

(57) Abstract: The present disclosure relates to a protein having a property of binding to an adeno-associated virus (AAV). Provided are: (i) an AAV-binding protein having an AAV-binding activity and comprising at least amino acid residues from the 25th serine to the 213th aspartic acid of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, where, at the 25th to 213th amino acid residues, a specific amino acid substitution has occurred; (ii) an AAV-binding protein having an AAV-binding activity and comprising at least amino acid residues from the 25th serine to the 213th aspartic acid of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, where, at the 25th to 213th amino acid residues, the specific amino acid substitution has occurred and, besides the specific amino acid substitution, any one or more of substitution, deletion, insertion and addition of one or more amino acid residues at one or more positions has additionally occurred; and (iii) an AAV-binding protein having an AAV-binding activity and comprising an amino acid sequence having 70% or more identity with the entire amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in which the specific amino acid substitution has occurred in the amino acid sequence from the 25th serine to the 213th aspartic acid, the amino acid sequence further having the at least one amino acid substitution remaining therein.

東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 田中 亨(TANAKA, Toru); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川 2 7 4 3 番地 1 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 2 3 番 1 号 虎ノ門ヒルズ森タワー 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

(57) 要約: 本開示は、アデノ随伴ウイルス (Adeno-Associated Virus: AAV) に結合性を有するタンパク質に関する。(i) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において特定のアミノ酸置換が生じ、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質; (ii) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において前記特定のアミノ酸置換が生じており、さらに前記特定のアミノ酸置換以外に1もしくは数個の位置での1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および付加のうち、いずれか1つ以上さらに生じ、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質; (iii) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸配列において、前記特定のアミノ酸置換が生じたアミノ酸配列全体に対して70%以上の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が残存したアミノ酸配列を含み、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質; が提供される。

## 明 細 書

発明の名称：

改変された組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）結合性タンパク質および  
AAVの精製方法

### 技術分野

[0001] 本開示は、アデノ随伴ウイルス（Adeno-Associated Virus：AAV）に結合性を有するタンパク質に関する。一態様において、本開示は、例えば、耐アルカリ性の向上した、改良された組換えAAV結合性タンパク質に関する。

[0002] また一態様において、本開示はアデノ随伴ウイルス（AAV）の精製方法に関する。さらに一態様において、本開示は例えば、遺伝子を含むAAVベクターを簡便に精製可能な方法に関する。

### 背景技術

[0003] アデノ随伴ウイルス（AAV）はパルボウイルス科（Parvoviridae）、ディペンドウイルス属（Dependovirus）に分類される非エンベロープウイルスである。AAV外殻粒子は3種類のタンパク質（VP1、VP2およびVP3）で構成されており、約60のタンパク質分子がおおよそVP1：VP2：VP3=1：1：10の比率で混在し集合することで、直径20nmから30nmの正二十面体の形状をしている。

[0004] 自然界でのAAVは自立性の増殖能を欠き、複製はアデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスに依存する。前記ヘルパーウイルスが存在すると、AAVゲノムは宿主細胞内で複製され、AAVゲノムを含む完全なAAV粒子が形成され、宿主細胞からAAV粒子が放出される。一方、前記ヘルパーウイルスが存在しない場合、AAVゲノムはエピソームに維持された状態または宿主染色体に組み込まれた状態（潜伏状態）となる。

[0005] AAVはヒトを含む広範な種の細胞に感染可能で、血球、筋、神経細胞などの分化を終えた非分裂細胞にも感染すること、ヒトに対する病原性がない

ため副作用の心配が低いこと、ウイルス粒子が物理化学的に安定であること、などから、先天性遺伝子疾患の治療を目的とした遺伝子導入用のベクターとしての利用価値が注目されている。

[0006] 遺伝子組換えAAVベクター（以下、単にAAVベクターとも表記）の製造は、通常、AAV粒子形成に必要な要素をコードする核酸を細胞に導入することで、AAVを産生する能力を有する細胞（以下、AAV産生細胞とも表記）を作製し、当該細胞を培養してAAV粒子形成に必要な要素を発現させることで行なう。製造したAAVベクターはAAV産生細胞から回収精製し、治療用AAVベクター製剤を得る。

[0007] AAV産生細胞からAAVベクターを回収精製する方法として、不溶性担体と当該担体に固定化したAAV結合性タンパク質とを含む吸着剤を用いた、AAVとの結合親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィによる方法があり、夾雑物質が共存したAAVベクターを含む溶液から当該ベクターを回収精製できる。具体例として、特許文献1には、K I A A 0 3 1 9 L ( U n i P r o t N o . Q 8 I Z A 0 ) の細胞外領域ドメイン1 ( P K D 1 ) およびドメイン2 ( P K D 2 ) を含み、ただしこれらドメイン中の特定位置にあるアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換することで、熱、酸およびアルカリに対する安定性が向上したポリペプチドを、不溶性担体に固定化するAAV結合性タンパク質（以下、単に「リガンドタンパク質」とも表記）として用いることで、AAVベクターの高純度な精製を実現している。

[0008] 一方で、上記吸着剤を精製用途として用いる場合、AAV精製後は通常、残存したAAVや夾雑物質を高濃度（例えば0.1M以上0.5M以下）の水酸化ナトリウム水溶液を使用してアルカリ洗浄する。したがって、当該アルカリ洗浄に耐えうるリガンドタンパク質の創製が望まれていた。

[0009] 製造したAAVベクターには、遺伝子を含むもの（F u l l A A Vベクター）と遺伝子を含まないもの（E m p t y A A Vベクター）が存在する。このうちE m p t y A A Vベクターは治療薬としての薬効を低下させたり、過剰投与による副作用を誘起させたりするおそれがある（非特許文献2

）。したがって、治療用AAVベクター製剤として用いるには、製造したAAVベクターの中からFull AAVベクターを高純度に精製する必要がある。

[0010] AAVベクターの精製法として、不溶性担体と、当該担体に固定化したAAV結合性タンパク質とを含むAAV吸着剤を用いたアフィニティクロマトグラフィによる方法が知られている（特許文献1および2、ならびに非特許文献2）。しかしながら、当該アフィニティクロマトグラフィで精製を行なっても、Empty AAVベクターの除去は困難であった。

[0011] Full AAVベクターを取得する方法として、製造したAAVベクターを含む溶液を超遠心分離し、Full AAVベクターを多く含む画分を取得する方法が知られている。しかしながら超遠心分離を行なうためには、密度勾配用の溶液の調製、超遠心、画分の取得といった複雑な工程が必要であり、Full AAVベクターを取得するのに一般的には数日間を要する。さらにFull AAVベクターを多く含む画分の判別がしづらいため、画分回収の際、前後の層を取得するおそれがあり、夾雑物が混入するおそれも高い。

[0012] また陰イオン交換ゲルにTosoh TSKgel Q-STATを、分離液に塩化コリンを用いて、Full AAVベクターとEmpty AAVベクターを分離する方法が報告されている（非特許文献3）。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0013] 特許文献1：WO2021/106882号

特許文献2：特表2018-507707号公報

### 非特許文献

[0014] 非特許文献1：Gerard A et al., Pharm Res, 36, 29 (2019)

非特許文献2：Kai G et al., Mol Ther Methods Clin Dev, 1:9 (2014)

非特許文献3：Sam Kurth et al., Anal Biochem, 686, 115421 (2024)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0015] 前述した通り、WO2021/106882号で開示しているアデノ随伴ウイルス（AAV）結合性タンパク質は、天然型（アミノ酸置換がないAAV結合性タンパク質）よりも熱、酸およびアルカリに対する安定性が向上している。一方で、前記公報で開示のAAV結合性タンパク質よりもアルカリ洗浄に耐えうるリガンドタンパク質が求められた。
- [0016] したがって一態様において、本開示の課題は、前記公報で開示のAAV結合性タンパク質よりも耐アルカリ性の向上したAAV結合性タンパク質を提供することである。
- [0017] 前述した通り、遺伝子を含まないAAVベクター（Empty AAVベクター）は治療薬としての薬効を低下させたり、過剰投与による副作用を誘起させたりするおそれがある。そのため、治療用AAVベクター製剤として用いるには、製造したAAVベクターの中から遺伝子を含むAAVベクター（Full AAVベクター）を高純度に精製することが求められた。
- [0018] したがって、一態様において、本開示の課題は、Full AAVベクターを高純度かつ簡便に精製可能な方法を提供することにある。かかる態様の一例では、本開示の課題は、例えば、AAV産生細胞を培養して得られる、AAVベクターを含む溶液から、Full AAVベクターを高純度かつ簡便に精製可能な方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

- [0019] 本開示者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、アデノ随伴ウイルス（AAV）結合性タンパク質を構成するアミノ酸残基のうち特定の残基を他のアミノ酸残基に置換することにより、耐アルカリ性が著しく向上することを見出した。
- [0020] また本開示者らは、AAVベクターを含む溶液をAAV結合性タンパク質

をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィで精製後、さらに陰イオン交換クロマトグラフィに供することで、Full AAVベクターを高純度に精製可能なことを見出した。

[0021] すなわち、本願発明は以下の [1] から [15] の態様を包含する。

[1]

以下の (i) から (iii) のいずれかから選択される AAV 結合性タンパク質：

(i) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち 25 番目のセリンから 213 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該 25 番目から 213 番目までのアミノ酸残基において以下の (1) から (74) のうち少なくともいずれか 1 つのアミノ酸置換が生じ、かつ AAV 結合活性を有する AAV 結合性タンパク質；

- (1) 配列番号 2 の 139 番目のスレオニンがアラニンに置換
- (2) 配列番号 2 の 32 番目のイソロイシンがアスパラギンに置換
- (3) 配列番号 2 の 34 番目のロイシンがグルタミンに置換
- (4) 配列番号 2 の 41 番目のロイシンがプロリンに置換
- (5) 配列番号 2 の 42 番目のアスパラギンがリジンまたはセリンに置換
- (6) 配列番号 2 の 45 番目のバリンがアラニンに置換
- (7) 配列番号 2 の 48 番目のバリンがアラニンに置換
- (8) 配列番号 2 の 51 番目のリジンがアルギニンに置換
- (9) 配列番号 2 の 53 番目のグルタミン酸がグリシンに置換
- (10) 配列番号 2 の 56 番目のスレオニンがアラニンまたはセリンに置換
- (11) 配列番号 2 の 57 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換
- (12) 配列番号 2 の 58 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
- (13) 配列番号 2 の 60 番目のグルタミンがリジンに置換
- (14) 配列番号 2 の 63 番目のスレオニンがアラニンに置換
- (15) 配列番号 2 の 73 番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- (16) 配列番号 2 の 78 番目のグルタミンがアルギニンに置換

- (17) 配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換
- (18) 配列番号2の80番目のロイシンがプロリンに置換
- (19) 配列番号2の81番目のリジンがアルギニンに置換
- (20) 配列番号2の82番目のロイシンがセリンに置換
- (21) 配列番号2の84番目のアスパラギンがアスパラギン酸またはセリンに置換
- (22) 配列番号2の89番目のロイシンがプロリンに置換
- (23) 配列番号2の90番目のチロシンがフェニルアラニンまたはアスパラギンに置換
- (24) 配列番号2の91番目のグルタミン酸がグリシンに置換
- (25) 配列番号2の92番目のチロシンがセリンに置換
- (26) 配列番号2の94番目のアラニンがスレオニンに置換
- (27) 配列番号2の95番目のバリンがイソロイシンに置換
- (28) 配列番号2の97番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- (29) 配列番号2の102番目のヒスチジンがアルギニンに置換
- (30) 配列番号2の107番目のバリンがアラニンまたはイソロイシンに置換
- (31) 配列番号2の109番目のバリンがグルタミン酸に置換
- (32) 配列番号2の110番目のスレオニンがアラニンまたはセリンに置換
- (33) 配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換
- (34) 配列番号2の115番目のプロリンがセリンに置換
- (35) 配列番号2の125番目のバリンがアラニンに置換
- (36) 配列番号2の148番目のアスパラギン酸がアラニンに置換
- (37) 配列番号2の166番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- (38) 配列番号2の167番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- (39) 配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換
- (40) 配列番号2の179番目のセリンがスレオニンに置換

- (4 1) 配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換
- (4 2) 配列番号2の185番目のアスパラギンがリジンに置換
- (4 3) 配列番号2の210番目のリジンがグルタミン酸に置換
- (4 4) 配列番号2の213番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換
- (4 5) 配列番号2の27番目のグリシンがアスパラギン酸に置換
- (4 6) 配列番号2の30番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
- (4 7) 配列番号2の31番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (4 8) 配列番号2の35番目のプロリンがアラニンに置換
- (4 9) 配列番号2の38番目のグルタミン酸がバリンに置換
- (5 0) 配列番号2の60番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (5 1) 配列番号2の75番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- (5 2) 配列番号2の76番目のヒスチジンがプロリンに置換
- (5 3) 配列番号2の92番目のチロシンがアスパラギンに置換
- (5 4) 配列番号2の105番目のグリシンがグルタミン酸に置換
- (5 5) 配列番号2の111番目のバリンがアラニンに置換
- (5 6) 配列番号2の112番目のグルタミン酸がリジンに置換
- (5 7) 配列番号2の119番目のアルギニンがヒスチジンに置換
- (5 8) 配列番号2の128番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (5 9) 配列番号2の129番目のフェニルアラニンがロイシンに置換
- (6 0) 配列番号2の134番目のロイシンがプロリンに置換
- (6 1) 配列番号2の146番目のセリンがグリシンに置換
- (6 2) 配列番号2の147番目のスレオニンがセリンに置換
- (6 3) 配列番号2の150番目のアスパラギン酸がバリンに置換
- (6 4) 配列番号2の158番目のグルタミン酸がリジンに置換
- (6 5) 配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換
- (6 6) 配列番号2の170番目のセリンがアルギニンに置換
- (6 7) 配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換
- (6 8) 配列番号2の191番目のスレオニンがイソロイシンに置換

- (69) 配列番号2の198番目のアラニンがバリンに置換
- (70) 配列番号2の199番目のスレオニンがアラニンに置換
- (71) 配列番号2の206番目のロイシンがメチオニンに置換
- (72) 配列番号2の209番目のアスパラギンがグルタミン酸に置換
- (73) 配列番号2の212番目のバリンがイソロイシンに置換
- (74) 配列番号2の213番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
- (i i) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において前記(1)から(74)のうち少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が生じており、さらに前記(1)から(74)に示すアミノ酸置換以外に1もしくは数個の位置での1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および付加のうち、いずれか1つ以上さらに生じ、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質；
- (i i i) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸配列において、前記(1)から(74)のうち少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が生じたアミノ酸配列全体に対して70%以上の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が残存したアミノ酸配列を含み、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質。

## [2]

以下の(i v)から(v i)のいずれかから選択される、[1]に記載のAAV結合性タンパク質：

- (i v) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において以下の(1)のアミノ酸置換が少なくとも生じ、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質；

(1) 配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換

(v) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において前記(1)のアミノ酸置換が少なくとも生じており、さらに前記(1)に示すアミノ酸置換以外に1もしくは数個の位置での1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および付加のうち、いずれか1つ以上さらに生じ、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質；

(vi) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸配列において、前記(1)のアミノ酸置換が少なくとも生じたアミノ酸配列全体に対して70%以上の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が残存したアミノ酸配列を含み、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質。

[3]

配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、以下の(A)から(P)のいずれかに示すアミノ酸置換が少なくとも生じ、かつAAV結合活性を有する、[1]または[2]に記載のAAV結合性タンパク質；

(A) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、かつ配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換

(B) 配列番号2の51番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、かつ配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換

(C) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目

のスレオニンがアラニンに置換し、かつ配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換

(D) 配列番号2の51番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、かつ配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換

(E) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の51番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、かつ配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換

(F) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、かつ配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換

(G) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換

(H) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換

(I) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2

の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換

(J) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、かつ配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換

(K) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換

(L) 配列番号2の27番目のグリシンがアスパラギン酸に置換し、配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、かつ配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換

(M) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の210番目のリジンがグルタミン酸に置換

(N) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の212番目のバリンがイソロイシンに置換

(O) 配列番号2の27番目のグリシンがアスパラギン酸に置換し、配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、配列番号2の210番目のリジンがグルタミン酸に置換し、かつ配列番号2の212番目のバリンがイソロイシンに置換

[4]

[1] から [3] のいずれかになにに記載の AAV 結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[5]

[4] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[6]

[5] に記載の発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られる形質転換体。

[7]

[6] に記載の形質転換体を培養することにより A A V 結合性タンパク質を発現させる工程と、得られた培養物から発現された A A V 結合性タンパク質を回収する工程とを含む、A A V 結合性タンパク質の製造方法。

[8]

不溶性担体と、当該担体に固定化した [1] から [3] のいずれかに記載の A A V 結合性タンパク質とを含む、A A V 吸着剤。

[9]

[8] に記載の A A V 吸着剤を含むカラム。

[10]

[9] に記載のカラムに A A V を含む溶液を添加して当該 A A V を前記吸着剤に吸着させる工程と、前記吸着剤に吸着した A A V を溶出液を用いて溶出させる工程とを含む、A A V の精製または分析方法。

[11]

A A V を溶出させる工程後の A A V 吸着剤をアルカリ溶液により洗浄する工程をさらに含む、[10] に記載の A A V の精製または分析方法。

[12]

試料中に含まれる A A V の精製方法であって、  
不溶性担体と前記不溶性担体に固定化した A A V 結合性タンパク質とを含む吸着剤に A A V を含む試料を添加し前記 A A V を前記吸着剤に吸着させる工程と、  
前記吸着剤に吸着した A A V を溶出させる工程と、  
陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に前記溶出工程で溶出した A A V を含

む画分を添加し前記 A A V を前記陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着させる工程と、  
前記陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着した A A V を溶出させる工程とを含む、  
精製方法。

[ 1 3 ]

試料中に含まれる A A V の精製方法であって、  
不溶性担体と前記不溶性担体に固定化した A A V 結合性タンパク質とを含む吸着剤に A A V を含む試料を添加し前記 A A V を前記吸着剤に吸着させる工程と、  
前記吸着剤に吸着した A A V を溶出させる工程と、  
陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に前記溶出工程で溶出した A A V を含む画分を添加し前記 A A V を前記陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着させる工程と、  
前記陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着した A A V を溶出させる工程とを含み、  
前記 A A V 結合性タンパク質が [ 1 ] から [ 3 ] のいずれかに記載の A A V 結合性タンパク質である、精製方法。

[ 1 4 ]

陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着した A A V を溶出させる工程が、前記担体に吸着した A A V を導電率  $13.5 \text{ mS/cm}$  以下の溶出液を用いて溶出後、前記担体に残存した A A V を導電率  $15.0 \text{ mS/cm}$  以上の溶出液を用いて溶出させる工程である、 [ 1 2 ] または [ 1 3 ] に記載の精製方法。

[ 1 5 ]

溶出液に塩化コリンを含む、 [ 1 4 ] に記載の精製方法。

### 図面の簡単な説明

[0022] [図1] A A V ベクター ( A A V 8 - E G F P ) を含む溶液をアフィニティクロ

- マト（AVR29cカラム）にアプライし得られたクロマトグラムである。
- [図2] AVR29cカラムで精製したAAV8-EGFPを含む画分を陰イオン交換クロマトグラフィ（GigaCapQカラム）にアプライし得られたクロマトグラムである。
- [図3] AAV8-EGFPを含む溶液を直接GigaCapQカラムにアプライし得られたクロマトグラムである。
- [図4] 図3のクロマトグラムに示す各ピークをサイズ排除クロマトグラフィ（G6000PW<sub>xL</sub>カラム）にアプライし得られたクロマトグラムである。
- [図5] AVR29cおよびAVR29c（-）の純度をSDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）で確認した図である。
- [図6] VLP2に対するAVR29cまたはAVR29c（-）の結合性を評価した結果を示す図である。
- [図7] AVR29cカラムまたはAVR29c（-）カラムに吸着したAAV8の溶出性を評価した結果を示す図である。
- [図8] AVR29cカラムで精製したAAV8-EGFPを含む画分を陰イオン交換クロマトグラフィカラム（SkillPak GigaCapQカラム、容量1.0mL）にアプライし得られたクロマトグラムである。溶液AEX-Aおよび300mmol/Lの塩化コリンを含む20mmol/Lのトリス塩酸緩衝液（pH9.0）の溶液AEX-Cについて、夾雑物を溶出させる混合比率を、（a）は49.0%、（b）は48.0%、（c）は47.0%、（d）は46.5%となるよう調節した場合のクロマトグラムである。
- [図9] AVR29cカラムで精製したAAV8-EGFPを含む画分をSkillPak GigaCapQカラム（容量5.0mL）にアプライし得られたクロマトグラムである。（a）はAVR29cカラムを用いてアフィニティクロマトグラフィ（AF）精製して、得られたクロマトグラムである。（b）はSkillPak GigaCapQカラムを用いて、陰イオン交

換クロマトグラフィ（AEX）精製して、得られたクロマトグラムである。  
[図10]実施例24（1）で得られたAAV8-EGFP溶液（図9（a）の黒矢印に示すピーク）、実施例24（3）（図9（b）の白矢印に示すピーク）および（4）（図9（b）の黒矢印に示すピーク）で得られた溶出画分をそれぞれ用いて細胞に感染させたときの陽性率を比較した図である。なおX軸に示す感染量を、（a）では1細胞当たりの粒子数で表している。X軸に示す感染量を、（b）では1細胞当たりのベクターゲノム（VG）数で表している。

### 発明を実施するための形態

[0023] 以下、本開示を詳細に説明する。

[0024] 本明細書においてAAV結合性タンパク質とは、天然型AAV結合性タンパク質である配列番号1に記載のKIAA0319L（UniProt No. Q81ZA0）のアミノ酸配列のうち、細胞外領域ドメイン1（PKD1）およびドメイン2（PKD2）に相当する領域である312番目のセリン（S）から500番目のアスパラギン酸（D）までのアミノ酸残基を少なくとも含むタンパク質であり、ただし当該312番目から500番目までのアミノ酸残基において特定位置にあるアミノ酸置換が生じたタンパク質である。したがって、本開示のAAV結合性タンパク質は、前記タンパク質のC末端側にある他の細胞外領域ドメイン（ドメイン3（PKD3）、ドメイン4（PKD4）およびドメイン5（PKD5））の全てまたは一部を含んでもよい。また、本開示のAAV結合性タンパク質は、PKD1のN末端側にあるMANSC（Motif At N terminus with Seven Cysteines）ドメインなどのシグナル配列やシステインリッチな領域の全てまたは一部を含んでもよい。また、本開示のAAV結合性タンパク質は、細胞外領域のN端側および／またはC末端側にある膜貫通領域ならびに細胞内領域の全てまたは一部を含んでもよい。

[0025] 前記特定位置におけるアミノ酸置換は、具体的には、配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち、312番目のセリンから500番目のアスパラギン酸

までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該312番目から500番目までのアミノ酸残基において、

V317D（この表記は、配列番号1の317番目のバリンがアスパラギン酸に置換されていることを表す、以下同様）、N324H、V326A、A330V、Q334L、E335V、T341A、Y342S、K362E、K371N、F379Y、K380R、V381A、I382V、G390S、K399E、K467Q、S476R、S482T、N487D、およびN492Dのアミノ酸置換を少なくとも含み、かつI319N、L321Q、L328P、N329K、N329S、V332A、E(V)335A（この表記は、配列番号1の335番目のグルタミン酸が配列番号2で一旦バリンに置換された後、さらにアラニンに置換されていることを表す、以下同様）、K338R、E340G、T343A、T343S、Y344F、D345G、Q347K、T350A、E360D、Q365R、I366F、L367P、K368R、L369S、K(N)371D、K(N)371S、L376P、Y377F、Y377N、E378G、F(Y)379S、V(A)381T、I(V)382I、E384D、H389R、V394A、V394I、V396E、T397A、T397S、E401G、P402S、V412A、T426A、D435A、E453D、E454D、A461P、S466T、K(Q)467N、N472K、K497E、D500N、G314D、V(D)317G、Q318R、P322A、E325V、Q347R、E362D、H363P、F(Y)379N、G392E、V398A、K(E)399K、R406H、Q415R、F416L、L421P、S433G、T434S、D437V、E445K、K455R、S457R、T474R、T478I、A485V、T486A、L493M、N496D、V499IおよびD500Gのいずれかのアミノ酸置換が少なくとも1つ生じていると、アルカリに対する安定性が向上するため好ましい。中でもT426Aのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質は、より好ましい態様である。

[0026] なお配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち312番目のセリンから500番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基からなり、ただし当該312番目から500番目までのアミノ酸残基において、V317D、N324H、V326A、A330V、Q334L、E335V、T341A、Y342S、K362E、K371N、F379Y、K380R、V381A、I382V、G390S、K399E、K467Q、S476R、S482T、N487D、およびN492Dのアミノ酸置換が生じたAAV結合性タンパク質は、配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基からなるAAV結合性タンパク質と同義である。また配列番号2におけるアミノ酸残基の位置は、配列番号1におけるアミノ酸残基の位置から287差し引いた位置に相当する。具体的にはV317Dのアミノ酸置換は配列番号2では30番目に位置するアミノ酸残基の置換に相当し、T426Aのアミノ酸置換は配列番号2では139番目に位置するアミノ酸残基の置換に相当する。

[0027] 本開示のAAV結合性タンパク質において、置換するアミノ酸の数に特に制限はない。一例として、以下の(A)から(P)のいずれかに示すAAV結合性タンパク質があげられる。これらのAAV結合性タンパク質はアルカリに対する安定性が向上する点でより好ましい。

[0028] (A) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、E401GおよびT426Aのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

[0029] (B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、K338R、T426AおよびA461Pのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

[0030] (C) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から

213番目までのアミノ酸残基において、N329K、E401G、T426AおよびA461Pのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

[0031] (D) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、K338R、E401G、T426AおよびA461Pのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

[0032] (E) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、K338R、E401G、T426AおよびA461Pのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

[0033] (F) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、E401G、T426A、A461PおよびK(Q)467Nのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

[0034] (G) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、I366F、E401G、T426A、A461P、K(Q)467NおよびT474Rのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

[0035] (H) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、V394A、E401G、T426A、A461P、K(Q)467NおよびT474Rのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

- [0036] (I) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、E401G、T426A、K455R、A461P、K(Q)467NおよびT474Rのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。
- [0037] (J) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、I366F、V394A、E401G、T426A、K455R、A461PおよびK(Q)467Nのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。
- [0038] (K) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、I366F、V394A、E401G、T426A、K455R、A461P、K(Q)467NおよびT474Rのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。
- [0039] (L) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、G314D、N329K、I366F、V394A、E401G、T426A、K455R、A461PおよびK(Q)467Nのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。
- [0040] (M) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、I366F、V394A、E401G、T426A、K455R、A461P、K(Q)467NおよびK497Eのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。

- [0041] (N) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、N329K、I366F、V394A、E401G、T426A、K455R、A461P、K(Q)467NおよびV499Iのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。
- [0042] (O) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を含み、かつ当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において、G314D、N329K、I366F、V394A、E401G、T426A、K455R、A461P、K(Q)467N、K497EおよびV499Iのアミノ酸置換が少なくとも生じたAAV結合性タンパク質。
- [0043] 前記(i i)および(v)において、「1もしくは数個」とは、AAV結合性タンパク質の立体構造におけるアミノ酸置換の位置やアミノ酸残基の種類によっても異なるが、一例として、1から50個、1から40個、1から30個、1から25個、1から20個、1から18個、1から15個、1から10個、1から9個、1から8個、1から7個、1から6個、1から5個、1から4個、1から3個、1から2個、1個のいずれかを意味する。
- [0044] 前記(i i)および(v)に記載の置換、欠失、挿入、または付加の例として、WO2021/106882号およびWO2023/140197号で開示しているアミノ酸残基の置換があげられる。
- [0045] なお前記(i i)および(v)における「1もしくは数個のアミノ酸残基の置換」には、前述した特定位置におけるアミノ酸置換の他に、物理的性質および/または化学的性質が類似したアミノ酸間で置換が生じる保守的置換が生じてよい。保守的置換は、一般に、置換が生じているものと置換が生じていないものとの間でタンパク質の機能が維持されることが当業者において知られている。保守的置換の一例としては、グリシンとアラニン間、セリンとスレオニン間、またはグルタミン酸とアスパラギン酸間での置換があげ



るポリペプチドがあげられる。

< i >配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち 3 1 2 番目のセリンから 5 0 0 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含むポリペプチド、

< i i >配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち 3 1 2 番目のセリンから 5 0 0 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該 3 1 2 番目から 5 0 0 番目までのアミノ酸残基において、1 もしくは数個の位置での 1 もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および付加のうち、いずれか 1 つ以上生じ、かつ A A V 結合活性を有するポリペプチド、

< i i i >配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち 3 1 2 番目のセリンから 5 0 0 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該 3 1 2 番目から 5 0 0 番目までのアミノ酸残基からなるアミノ酸配列全体に対して 7 0 % 以上の同一性を有し、かつ A A V 結合活性を有するポリペプチド。

[0050] なお配列番号 1 に記載のアミノ酸配列は、A A V R の一態様である K I A A 0 3 1 9 L (公式データベース: UniProt、アクセションナンバー: Q 8 I Z A 0) のアミノ酸配列であり、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 3 1 2 番目のセリン (S) から 5 0 0 番目のアスパラギン酸 (D) までのアミノ酸残基は、K I A A 0 3 1 9 L の細胞外領域ドメイン 1 (PKD 1) およびドメイン 2 (PKD 2) に相当する領域である。

[0051] 前記< i >から< i i i >のいずれかに示すポリペプチドは、前述した K I A A 0 3 1 9 L の PKD 1 および PKD 2 に相当する領域を少なくとも含んでいればよく、例えば、PKD 2 の C 末端側にある他の細胞外領域ドメイン (ドメイン 3 (PKD 3)、ドメイン 4 (PKD 4) およびドメイン 5 (PKD 5)) に相当する領域の全てまたは一部を含んでもよいし、PKD 1 の N 末端側にある M A N S C (M o t i f A t N t e r m i n u s w i t h S e v e n C y s t e i n e s) ドメインなどのシグナル配列に相当する領域やシステインリッチな領域の全てまたは一部を含んでもよい

し、細胞外領域のN末端側および／またはC末端側にある膜貫通領域ならびに細胞内領域の全てまたは一部を含んでもよい。

[0052] 前記< i i >の一例として、WO 2021 / 106882号およびWO 2023 / 140197号で開示のAAV結合性タンパク質や、以下の( I )から( L X I X )に示すアミノ酸置換を少なくとも1つ以上有するAAV結合性タンパク質があげられる；

- ( I ) 配列番号1の314番目のグリシンがアスパラギン酸に置換
- ( I I ) 配列番号1の317番目のバリンがグリシンに置換
- ( I I I ) 配列番号1の318番目のグルタミンがアルギニンに置換
- ( I V ) 配列番号1の319番目のイソロイシンがアスパラギンに置換
- ( V ) 配列番号1の321番目のロイシンがグルタミンに置換
- ( V I ) 配列番号1の322番目のプロリンがアラニンに置換
- ( V I I ) 配列番号1の325番目のグルタミン酸がバリンに置換
- ( V I I I ) 配列番号1の328番目のロイシンがプロリンに置換
- ( I X ) 配列番号1の329番目のアスパラギンがリジンまたはセリンに置換
- ( X ) 配列番号1の332番目のバリンがアラニンに置換
- ( X I ) 配列番号1の335番目のグルタミン酸がアラニンに置換
- ( X I I ) 配列番号1の338番目のリジンがアルギニンに置換
- ( X I I I ) 配列番号1の340番目のグルタミン酸がグリシンに置換
- ( X I V ) 配列番号1の343番目のスレオニンがアラニンまたはセリンに置換
- ( X V ) 配列番号1の344番目のチロシンがフェニルアラニンに置換
- ( X V I ) 配列番号1の345番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
- ( X V I I ) 配列番号1の347番目のグルタミンがリジンまたはアルギニンに置換
- ( X V I I I ) 配列番号1の350番目のスレオニンがアラニンに置換
- ( X I X ) 配列番号1の360番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換

- (XX) 配列番号1の362番目のリジンがアスパラギン酸に置換
- (XXI) 配列番号1の363番目のヒスチジンがプロリンに置換
- (XXII) 配列番号1の365番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (XXIII) 配列番号1の366番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換
- (XXIV) 配列番号1の367番目のロイシンがプロリンに置換
- (XXV) 配列番号1の368番目のリジンがアルギニンに置換
- (XXVI) 配列番号1の369番目のロイシンがセリンに置換
- (XXVII) 配列番号1の371番目のリジンがアスパラギン酸またはセリンに置換
- (XXVIII) 配列番号1の376番目のロイシンがプロリンに置換
- (XXIX) 配列番号1の377番目のチロシンがフェニルアラニンまたはアスパラギンに置換
- (XXX) 配列番号1の378番目のグルタミン酸がグリシンに置換
- (XXXI) 配列番号1の379番目のフェニルアラニンがセリンまたはアスパラギンに置換
- (XXXII) 配列番号1の381番目のバリンがスレオニンに置換
- (XXXIII) 配列番号1の384番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- (XXXIV) 配列番号1の389番目のヒスチジンがアルギニンに置換
- (XXXV) 配列番号1の392番目のグリシンがグルタミン酸に置換
- (XXXVI) 配列番号1の394番目のバリンがアラニンまたはイソロイシンに置換
- (XXXVII) 配列番号1の396番目のバリンがグルタミン酸に置換
- (XXXVIII) 配列番号1の397番目のスレオニンがアラニンまたはセリンに置換
- (XXXIX) 配列番号1の398番目のバリンがアラニンに置換
- (XL) 配列番号1の401番目のグルタミン酸がグリシンに置換

- (X L I) 配列番号1の402番目のプロリンがセリンに置換
  - (X L I I) 配列番号1の406番目のアルギニンがヒスチジンに置換
  - (X L I I I) 配列番号1の412番目のバリンがアラニンに置換
  - (X L I V) 配列番号1の415番目のグルタミンがアルギニンに置換
  - (X L V) 配列番号1の416番目のフェニルアラニンがロイシンに置換
  - (X L V I) 配列番号1の421番目のロイシンがプロリンに置換
  - (X L V I I) 配列番号1の426番目のスレオニンがアラニンに置換
  - (X L V I I I) 配列番号1の433番目のセリンがグリシンに置換
  - (X L I X) 配列番号1の434番目のスレオニンがセリンに置換
  - (L) 配列番号1の435番目のアスパラギン酸がアラニンに置換
  - (L I) 配列番号1の437番目のアスパラギン酸がバリンに置換
  - (L I I) 配列番号1の445番目のグルタミン酸がリジンに置換
  - (L I I I) 配列番号1の453番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- 換
- (L I V) 配列番号1の454番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
  - (L V) 配列番号1の455番目のリジンがアルギニンに置換
  - (L V I) 配列番号1の457番目のセリンがアルギニンに置換
  - (L V I I) 配列番号1の461番目のアラニンがプロリンに置換
  - (L V I I I) 配列番号1の466番目のセリンがスレオニンに置換
  - (L I X) 配列番号1の467番目のリジンがアスパラギンに置換
  - (L X) 配列番号1の472番目のアスパラギンがリジンに置換
  - (L X I) 配列番号1の474番目のスレオニンがアルギニンに置換
  - (L X I I) 配列番号1の478番目のスレオニンがイソロイシンに置換
  - (L X I I I) 配列番号1の485番目のアラニンがバリンに置換
  - (L X I V) 配列番号1の486番目のスレオニンがアラニンに置換
  - (L X V) 配列番号1の493番目のロイシンがメチオニンに置換
  - (L X V I) 配列番号1の496番目のアスパラギンがグルタミン酸に置換
  - (L X V I I) 配列番号1の497番目のリジンがグルタミン酸に置換

(L X V I I I) 配列番号 1 の 4 9 9 番目のバリンがイソロイシンに置換  
(L X I X) 配列番号 1 の 5 0 0 番目のアスパラギン酸がグリシンまたはアスパラギンに置換

また前記< i i >に記載の置換、欠失、挿入、または付加の例として、WO 2 0 2 1 / 1 0 6 8 8 2 号およびWO 2 0 2 3 / 1 4 0 1 9 7 号で開示しているアミノ酸残基の置換や、前記 ( I ) から ( L X I X ) に示すアミノ酸置換があげられる。

[0053] 前記< i i >における、「1もしくは数個」とは、A A V R の立体構造におけるアミノ酸置換の位置やアミノ酸残基の種類によっても異なるが、一例として、1個以上50個以下、1個以上40個以下、1個以上30個以下、1個以上25個以下、1個以上20個以下、1個以上15個以下、1個以上10個以下、1個以上9個以下、1個以上8個以下、1個以上7個以下、1個以上6個以下、1個以上5個以下、1個以上4個以下、1個以上3個以下、1個以上2個以下、1個のいずれかを意味する。「1もしくは数個」のアミノ酸残基の置換は、例えば、A A V 結合活性を有する限り、WO 2 0 2 1 / 1 0 6 8 8 2 号およびWO 2 0 2 3 / 1 4 0 1 9 7 号で開示のアミノ酸残基の置換、ならびに前記 ( I ) から ( L X I X ) に示すアミノ酸残基の置換以外の位置に生じてよい。

[0054] なお前記< i i >における「1もしくは数個のアミノ酸残基の置換」には、前述した特定位置におけるアミノ酸置換の他に、物理的性質および／または化学的性質が類似したアミノ酸間で置換が生じる保守的置換が生じてもよい。保守的置換は、一般に、置換が生じているものと置換が生じていないものとの間でタンパク質の機能が維持されることが当業者において知られている。保守的置換の一例としては、グリシンとアラニン間、セリンとスレオニン間、またはグルタミン酸とアスパラギン酸間での置換があげられる（タンパク質の構造と機能，メディカル・サイエンス・インターナショナル社、9、2005）。また前記< i i >における「1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加」には、A A V R の由来の違いや、種の違

いなどに基づく、天然にも存在する変異 (mutant または variant) も含まれる。

- [0055] 前記< i i i >におけるアミノ酸配列の同一性は70%以上あればよく、それ以上の同一性 (例えば、80%以上、85%以上、90%以上または95%以上) を有してもよい。アミノ酸配列間の「同一性」とは、それらアミノ酸配列における種類が同一であるアミノ酸残基の比率を意味する (実験医学、31 (3)、羊土社)。アミノ酸配列の同一性は、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) やFASTA等のアラインメントプログラム (alignment program) を利用して決定できる。
- [0056] 一態様において、本開示のAAV結合性タンパク質は、そのN末端側またはC末端側に、夾雑物質存在下の溶液から分離する際に有用なオリゴペプチドをさらに付加してもよい。前記オリゴペプチドとしては、ポリヒスチジン、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸等があげられる。またAAV結合性タンパク質をクロマトグラフィ用の支持体等の固相に固定化する際に有用な、システインを含むオリゴペプチドを、AAV結合性タンパク質のN末端側またはC末端側にさらに付加してもよい。
- [0057] AAV結合性タンパク質のN末端側またはC末端側に付加するオリゴペプチドの長さは、AAV結合性タンパク質のAAV結合性や安定性を損なわない限り特に制限はない。前記オリゴペプチドを本開示のAAV結合性タンパク質に付加させる際は、前記オリゴペプチドをコードするポリヌクレオチドを作製後、当業者に周知の方法を用いて遺伝子工学的にAAV結合性タンパク質のN末端側またはC末端側に付加させてもよい。また化学的に合成した前記オリゴペプチドをAAV結合性タンパク質のN末端側またはC末端側に化学的に結合させて付加させてもよい。
- [0058] さらに本開示のAAV結合性タンパク質のN末端側には、宿主として用いる大腸菌 (*Escherichia coli*) での効率的な発現を促すためのシグナルペプチドを付加してもよい。前記シグナルペプチドとしては、

P e l B、O m p A、D s b A、D s b C、M a l E、T o r Tなどといったペリプラズムにタンパク質を分泌させるシグナルペプチドを例示できる（特開2011-097898号公報）。またN末端側へのシグナルペプチドの付加を行わなくても良い。この場合、タンパク質調製の際、タンパク質の均質性が向上する点で好ましい。

- [0059] 本開示のAAV結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチド（以下、「本開示のポリヌクレオチド」とも表記）の作製方法の一例として、
- (1) 本開示のAAV結合性タンパク質のアミノ酸配列からヌクレオチド配列に変換し、当該ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを人工的に合成する方法や、
    - (11) AAV結合性タンパク質の全体または部分配列を含むポリヌクレオチドを直接人工的に、またはAAV結合性タンパク質のcDNA等からPCR法といったDNA増幅法を用いて調製し、調製した当該ポリヌクレオチドを適当な方法で連結する方法、が例示できる。
- [0060] 前記(1)の方法において、アミノ酸配列からヌクレオチド配列に変換する際、形質転換させる宿主である大腸菌におけるコドンの使用頻度を考慮して変換するのが好ましい。具体的には、アルギニン（R）ではAGA/AGG/CGG/CGAが、イソロイシン（I）ではATAが、ロイシン（L）ではCTAが、グリシン（G）ではGGAが、プロリン（P）ではCCCが、それぞれ使用頻度が少ないため（いわゆるレアコドンであるため）、それらのコドン避けるように変換すればよい。コドンの使用頻度の解析は公的データベース（例えば、かずさDNA研究所のウェブサイトにあるCodon Usage Databaseなど）を利用することによっても可能である。
- [0061] 本開示のポリヌクレオチドへ変異を導入する場合、エラープローンPCR法が利用できる。エラープローンPCR法における反応条件は、AAV結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドに所望の変異を導入できる条件であれば特に限定はない。例えば、基質である4種類のデオキシヌクレオチ

ド (dATP/dTTP/dCTP/dGTP) の濃度を不均一にし、MnCl<sub>2</sub>を0.01mM以上10mM以下 (好ましくは0.1mM以上1mM以下) の濃度でPCR反応液に添加してPCRを行なうことで、ポリヌクレオチドに変異を導入できる。またエラープロンPCR法以外の変異導入方法としては、AAV結合性タンパク質の全体または部分配列を含むポリヌクレオチドに、変異原となる薬剤を接触・作用させたり、紫外線を照射したりして、ポリヌクレオチドに変異を導入して作製する方法があげられる。当該方法において変異原として使用する薬剤としては、ヒドロキシルアミン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、亜硝酸、亜硫酸、ヒドラジン等、当業者が通常用いる変異原性薬剤を用いればよい。

[0062] 本開示のポリヌクレオチドを用いて宿主である大腸菌を形質転換する場合、本開示のポリヌクレオチドそのものを用いてもよいが、発現ベクター (例えば、原核細胞や真核細胞の形質転換に通常用いるバクテリオファージ、コスミドやプラスミド等) の適切な位置に本開示のポリヌクレオチドを挿入したものをを用いると、より好ましい。なお当該発現ベクターは、形質転換する宿主 (大腸菌) 内で安定に存在し複製できるものであれば特に制限はなく、pETプラスミドベクター、pUCプラスミドベクター、pTrcプラスミドベクター、pCDFプラスミドベクターを例示できる。

[0063] また前記適切な位置とは、発現ベクターの複製機能、所望の抗生物質マーカー、伝達性に関わる領域を破壊しない位置を意味してよい。前記発現ベクターに本開示のポリヌクレオチドを挿入する際は、発現に必要なプロモータといった機能性ポリヌクレオチドに連結される状態で挿入すると好ましい。当該プロモータの例として、trpプロモータ、tacプロモータ、trcプロモータ、lacプロモータ、T7プロモータ、recAプロモータ、lppプロモータがあげられる。

[0064] 前記方法により作製した、本開示のポリヌクレオチドを挿入した発現ベクター (以下、単に「本開示の発現ベクター」とも表記) を用いて宿主である大腸菌を形質転換するには、当業者が通常用いる方法で行なえばよい。具体

的には、Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory), 256, 1992等の公知の文献に記載の方法により形質転換すればよい。前述した方法で形質転換して得られた形質転換体は、適切な方法でスクリーニングすることにより、本開示のAAV結合性タンパク質を発現可能な形質転換体（以下、単に「本開示の形質転換体」とも表記）を取得できる。

[0065] 本開示の形質転換体から、本開示の発現ベクターを調製するには、本開示の形質転換体を培養して得られる培養物からアルカリ抽出法またはQIAprep Spin Miniprep kit（キアゲン社製）等の市販の抽出キットを用いて調製すればよい。

[0066] 本開示の形質転換体を培養し、得られた培養物から本開示のAAV結合性タンパク質を回収することで、AAV結合性タンパク質を製造できる。なお本明細書において培養物とは、培養された本開示の形質転換体の細胞そのもののほか、培養に用いた培地も含まれてよい。

[0067] タンパク質製造方法で用いる形質転換体は、対象宿主（大腸菌）の培養に適した培地で培養すればよく、好ましい培地の一例として、必要な栄養源を補ったLB (Luria-Bertani) 培地があげられる。なお、本開示のベクターの導入の有無により形質転換体を選択的に増殖させるために、培地に当該ベクターに含まれる薬剤耐性遺伝子に対応した薬剤を添加して培養すると好ましい。例えば、当該ベクターがカナマイシン耐性遺伝子を含んでいる場合は、培地にカナマイシンを添加すればよい。

[0068] また培地には、炭素、窒素および無機塩供給源の他に、適当な栄養源を添加してもよく、所望により、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレートおよびジチオスレイトールからなる群から選択される一種類以上の還元剤を含んでもよい。培養温度は一般に10℃以上40℃以下、好ましくは20℃以上37℃以下、より好ましくは25℃前後であるが、発現させるタンパク質の特性により選択すればよい。培地のpHは、pH6.8以上pH7.4以下、好ましくはpH7.0前後である。また本開示のベクタ

ーに誘導性のプロモータが含まれている場合は、本開示のAAV結合性タンパク質が良好に発現できるような条件下で誘導をかけると好ましい。

[0069] 誘導剤としてはIPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を例示できる。培養液の濁度 (600nmにおける吸光度) を測定し、概ね0.5以上1.0以下となったときに適量のIPTGを添加後、引き続き培養することで、AAV結合性タンパク質の発現を誘導できる。IPTGの添加濃度は0.005mM以上1.0mM以下の範囲から適宜選択すればよいが、0.01mM以上0.5mM以下の範囲が好ましい。IPTG誘導に関する種々の条件は当該技術分野において周知の条件で行なえばよい。

[0070] 本開示の形質転換体を培養して得られた培養物から本開示のAAV結合性タンパク質を回収するには、形質転換体におけるAAV結合性タンパク質の発現形態に適した方法で、当該培養物から分離/精製してAAV結合性タンパク質を回収すればよい。例えば、培養上清に発現する場合は菌体を遠心分離操作によって分離し、得られる培養上清からAAV結合性タンパク質を精製すればよい。また、細胞内 (ペリプラズムを含んでもよい) に発現する場合には、遠心分離操作により菌体を集めた後、酵素処理剤や界面活性剤等を添加することにより菌体を破碎してAAV結合性タンパク質を抽出した後、精製すればよい。

[0071] 本開示のAAV結合性タンパク質を精製するには、当該技術分野において公知の方法を用いればよく、一例として液体クロマトグラフィを用いた分離/精製があげられる。液体クロマトグラフィには、イオン交換クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、ゲルろ過クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ等が例示できる。これらのクロマトグラフィを組み合わせることで、本開示のAAV結合性タンパク質を高純度に調製できる。

[0072] 得られた本開示のAAV結合性タンパク質のAAVに対する結合活性を測定する方法としては、例えばAAVに対する結合活性はEnzyme-Li

nked ImmunoSorbent Assay法（以下、ELISA法と表記）を用いて測定すればよい。結合活性の測定に使用するAAVとしてはVLP（ウイルス様粒子）であってよい。また、本開示のAAV結合性タンパク質に対し結合活性を示せば、どのセロタイプ（血清型）のAAVベクターおよびVLPを使用してもよい。

[0073] 本開示のAAV結合性タンパク質は、例えば、AAVの精製または分析に使用できる。当該目的で使用した場合、結合するAAVの限定は特になく、自然界に存在するAAVであってもよいし、人工的に作製されたAAVでもよい。自然界に存在するAAVの例として、血清型1（AAV1）、血清型2（AAV2）、血清型3（AAV3）、血清型4（AAV4）、血清型5（AAV5）、血清型6（AAV6）、血清型7（AAV7）、血清型8（AAV8）、血清型9（AAV9）、血清型10（AAV10）、血清型11（AAV11）、血清型12（AAV12）、血清型13（AAV13）があげられる。また人工的に作製されたAAVとしては、AAVrh8、AAVrh10や、これら血清型のうち二以上の特徴（細胞指向性や感染能）を有したキメラAAVがあげられる。

[0074] 本開示のAAV結合性タンパク質は、例えば、不溶性担体に固定化して使用できる。すなわち、AAVの精製または分析は、具体的には、例えば、不溶性担体と、当該不溶性担体に固定化された本開示のAAV結合性タンパク質とを含む、AAV吸着剤を用いて実施できる。本明細書では、不溶性担体と、当該不溶性担体に固定化された本開示のAAV結合性タンパク質とを含むAAV吸着剤を、本開示のAAV吸着剤ともいう。なおAAVの精製とは、夾雑物質共存化の溶液からAAVの精製に限らず、構造、性質または活性等に基づくAAVの精製も含まれる。

[0075] 本開示のAAV吸着剤の構成要素である不溶性担体は、AAVを含む試料や精製に用いる溶液（溶出液、平衡化液、洗浄液など）に対して不溶性であれば特に制限されない。不溶性担体としては、アガロース、アルギネート（アルギン酸塩）、カラゲナン、キチン、セルロース、デキストリン、デキス

トラン、デンプン等の多糖質を原料とした担体や、ポリビニルアルコール、ポリメタクリレート、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリウレタン等の合成高分子を原料とした担体や、シリカ等のセラミックスを原料とした担体が例示できる。中でも、多糖質を原料とした担体や合成高分子を原料とした担体が不溶性担体として好ましい。前記好ましい担体の一例として、トヨパール(東ソー社製)等のヒドロキシ基を導入したポリメタクリレートゲル、Sephacryl(サイティバ社製)等のアガロースゲル、セルファイン(JNC社製)等のセルロースゲルが挙げられる。不溶性担体の形状は特に制限されず、例えば、粒状物、モノリス状物、膜状物および繊維状物のいずれであってもよく、また多孔性および非多孔性のいずれであってもよい。中でもカラムに充填できる形状とすると好ましい。

[0076] AAV吸着剤を製造する際、不溶性担体へのAAV結合性タンパク質への固定化は、例えば、共有結合を介して固定化すればよい。具体的には、例えば、不溶性担体が有する活性基を介してAAV結合性タンパク質と不溶性担体とを共有結合させることで、不溶性担体に固定化し、AAV吸着剤を製造すればよい。前記活性基としては、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)活性化エステル基、エポキシ基、カルボキシ基、マレイミド基、ハロアセチル基、トレシル基、ホルミル基、ハロアセトアミド基が挙げられる。活性基を有する不溶性担体としては、例えば、活性基を有する市販の不溶性担体をそのまま用いてもよいし、不溶性担体に活性基を導入して用いてもよい。活性基を有する市販の担体としては、TOYOPEARL AF-Epoxy-650M、TOYOPEARL AF-Tresyl-650M(いずれも東ソー社製)、HiTrap NHS-activated HP Columns、NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow、Epoxy-activated Sepharose 6B(いずれもサイティバ社製)、SulfoLink Coupling Resin(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)が例示できる。

- [0077] 担体表面に活性基を導入する方法としては、担体表面に存在するヒドロキシ基、エポキシ基、カルボキシ基、アミノ基等に対して2個以上の活性部位を有する化合物の一方を反応させる方法が例示できる。
- [0078] 担体表面に存在するヒドロキシ基やアミノ基にエポキシ基を導入する化合物としては、エピクロロヒドリン、エタンジオールジグリシジルエーテル、ブタンジオールジグリシジルエーテル、ヘキサジオールジグリシジルエーテルが例示できる。
- [0079] また担体表面に存在するエポキシ基にカルボキシ基を導入する化合物としては、2-メルカプト酢酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプト酪酸、6-メルカプト酪酸、グリシン、3-アミノプロピオン酸、4-アミノ酪酸、6-アミノヘキサン酸を例示できる。
- [0080] また担体表面に存在するヒドロキシ基、エポキシ基、カルボキシ基、アミノ基にマレイミド基を導入する化合物としては、N-( $\epsilon$ -マレイミドカプロン酸)ヒドラジド、N-( $\epsilon$ -マレイミドプロピオン酸)ヒドラジド、4-(4-N-マレイミドフェニル)酢酸ヒドラジド、2-アミノマレイミド、3-アミノマレイミド、4-アミノマレイミド、6-アミノマレイミド、1-(4-アミノフェニル)マレイミド、1-(3-アミノフェニル)マレイミド、4-(マレイミド)フェニルイソシアナート、2-マレイミド酢酸、3-マレイミドプロピオン酸、4-マレイミド酪酸、6-マレイミドヘキサン酸、N-( $\alpha$ -マレイミドアセトキシ)スクシンイミドエステル、(m-マレイミドベンゾイル)N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボニル-(6-アミノヘキサン酸)、スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸、(p-マレイミドベンゾイル)N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、(m-マレイミドベンゾイル)N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを例示できる。
- [0081] また担体表面に存在するヒドロキシ基やアミノ基にハロアセチル基を導入する化合物としては、クロロ酢酸、ブromo酢酸、ヨード酢酸、クロロ酢酸ク

ロリド、ブromo酢酸クロリド、ブromo酢酸ブromiド、クロロ酢酸無水物、ブromo酢酸無水物、ヨード酢酸無水物、2-(ヨードアセトアミド)酢酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、3-(ブromoアセトアミド)プロピオン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、4-(ヨードアセチル)アミノ安息香酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを例示できる。

[0082] また担体表面に活性基を導入する方法としては、担体表面に存在するヒドロキシ基やアミノ基に $\omega$ -アルケニルアルカングリシジルエーテルを反応させた後、ハロゲン化剤で $\omega$ -アルケニル部位をハロゲン化することで活性化する方法も例示できる。 $\omega$ -アルケニルアルカングリシジルエーテルとしては、アリルグリシジルエーテル、3-ブテニルグリシジルエーテル、4-ペンテニルグリシジルエーテルを例示できる。ハロゲン化剤としては、N-クロロスクシンイミド、N-ブromosクシンイミド、N-ヨードスクシンイミドを例示できる。

[0083] また担体表面に活性基を導入する方法としては、担体表面に存在するカルボキシ基に対して縮合剤と添加剤を用いて活性基を導入する方法も例示できる。縮合剤としては1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、ジシクロヘキシルカルボジアミド、カルボニルジイミダゾールを例示できる。添加剤としては、NHS、4-ニトロフェノール、1-ヒドロキシベンズトリアゾールを例示できる。

[0084] AAV結合性タンパク質の不溶性担体への固定化は、例えば、緩衝液中で実施できる。緩衝液としては、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、MES(2-MorpholinoEthaneSulfonic acid)緩衝液、HEPES(4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid)緩衝液、トリス(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)緩衝液、ホウ酸緩衝液を例示できる。固定化させるときの反応温度は、例えば、活性基の反応性やAAV結合性タンパク質の安定性等の諸条件に応じて適宜設定できる。固定化させるときの反応温度は、例えば、4℃以上50℃以下であって

よく、好ましくは10℃以上35℃以下であってよい。

[0085] 本開示のAAV吸着剤は、例えば、カラムに充填してAAVの精製や分析に使用できる。具体的には、例えば、本開示のAAV吸着剤を充填したカラム（以下、単に「本開示のカラム」とも表記）にAAVを含む溶液を添加して当該AAVを前記吸着剤に吸着させ、前記吸着剤に吸着したAAVを溶出させることで、AAVの精製や分析ができる。すなわち、一態様において、本開示は、本開示のカラムにAAVを含む溶液を添加して当該AAVを前記吸着剤に吸着させる工程と、前記吸着剤に吸着したAAVを溶出させる工程とを含む、AAVの精製または分析方法を提供する。本開示のカラムを用いたAAVの精製は、例えば、WO2021/106882号での開示内容に基づき実施すればよい。

[0086] 本開示のAAV吸着剤を用いてAAVを精製することで、精製されたAAVが得られ得る。すなわち、AAVの精製方法は、一態様において、AAVの製造方法であってよく、具体的には、精製されたAAVの製造方法であってよい。AAVは、例えば、AAVを含む溶出画分として得られる。すなわち、溶出されたAAVを含む画分を分取できる。AAV画分に分取は、例えば、常法で行なえる。AAV画分に分取する方法としては、一定の時間ごとや、一定の容量ごとに回収容器を交換する方法や、溶出液のクロマトグラムの形状に合わせて回収容器を換える方法や、オートサンプラー等の自動フラクションコレクター等画分に分取をする方法が挙げられる。さらに、AAVを含む画分からAAVを回収することもできる。AAVを含む画分からのAAVの回収は、例えば、タンパク質の精製に用いられる公知の方法で行なえる。

[0087] 本開示のAAV吸着剤をアルカリ洗浄することで、例えば残存していたAAVや夾雑物の混入を防ぐことができる。すなわち、AAV吸着剤の洗浄方法は、一態様において、AAVを精製後に行う、AAV吸着剤をアルカリ洗浄する方法であってよい。また本開示のAAV結合性タンパク質は耐酸性も有しているため、pHの低い溶液で洗浄したのち、アルカリ洗浄する方法で

あってもよい。使用される洗浄用のアルカリ溶液の例としては、0.1 M以上0.5 M以下の水酸化ナトリウム水溶液があげられる。

[0088] 一態様において、本開示のAAVの精製方法は、遺伝子を含むAAVベクター（Full AAVベクター）を精製することを意味してよい。

[0089] 一態様において、本開示のAAVの精製方法は、AAV吸着剤にAAVを含む試料を添加し当該AAVを当該吸着剤に吸着させる工程（以下、「第一吸着工程」とも表記）と、当該吸着剤に吸着したAAVを溶出させる工程（以下、「第一溶出工程」とも表記）と、陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に第一溶出工程で溶出したAAVを含む画分を添加し当該AAVを前記担体に吸着させる工程（以下、「第二吸着工程」とも表記）と、当該陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着したAAVを溶出させる工程（以下、「第二溶出工程」とも表記）と、を含む。なお、AAV吸着剤および陰イオン交換クロマトグラフィ用担体をカラムに充填した態様（以下それぞれ、「AAV吸着剤カラム」、「陰イオン交換カラム」とも表記）とすると、これら工程を簡便に行なえる点で好ましい。以下、AAV吸着剤カラムおよび陰イオン交換カラムを用いた態様を例に、詳細に説明する。

[0090] AAVを含む試料は、例えば、ポンプ等の送液手段を用いてAAV吸着剤カラムに添加できる。なお本明細書では、液体をカラムに添加することを、「液体をカラムに送液する」ともいう。なおAAVを含む試料は、AAV吸着剤カラムに添加する前に予め適切な衝液を用いて溶媒置換してよい。また、AAVを含む試料をAAV吸着剤カラムに添加する前（すなわち第一吸着工程前）に、適切な緩衝液（平衡化液）を用いてAAV吸着剤カラムを平衡化してよい。前記平衡化により、例えば、AAVをより高純度に精製できると期待される。溶媒置換や平衡化に用いる緩衝液としては、中性領域（本明細書ではpH 5.0以上9.0以下、好ましくはpH 5.5以上8.0以下

の領域を指す)で緩衝能を有する中性緩衝液であればよい。具体的には、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液が例示できる。そのような緩衝液には、例えば、さらに、 $0.1\text{ mmol/L}$ から $50\text{ mmol/L}$ のキレート剤を添加してもよい。溶媒置換に用いる緩衝液と平衡化液は、同一であってもよく、同一でなくてもよい。

[0091] また、AAVを含む試料のAAV吸着剤カラムへの通液後に夾雑物質等のAAV以外の成分がAAV吸着剤カラムに残存している場合、AAV吸着剤に吸着したAAVを溶出させる前(すなわち溶出工程前)に、そのような成分をAAV吸着剤カラムから除去(洗浄)してよい。AAV以外の成分は、例えば、適切な緩衝液を洗浄液として用いることでAAV吸着剤カラムから除去できる。当該洗浄液については、例えば、溶媒置換や平衡化に用いる緩衝液についての記載を準用できる。

[0092] 一態様において、第一溶出工程では、第一吸着工程によりAAV吸着剤に吸着させたAAVを、例えば、前記平衡化液もしくは洗浄液よりも低いpHの緩衝液、塩化物イオンもしくは当該イオンよりもホフマイスター系列が小さい陰イオンを $800\text{ mmol/L}$ 以上含む中性緩衝液、または第二吸着工程で使用するpHに調整したキレート剤(エチレンジアミン四酢酸など)を含む緩衝液を用いて溶出させればよい。前述した溶出液をAAV吸着剤カラムに通液することで、当該カラム内におけるAAVとAAV結合性タンパク質(AAV吸着剤のリガンド)との相互作用が弱まるため、AAV吸着剤に吸着したAAVは溶出され、AAVを含む画分が得られる。

[0093] 第一溶出工程で得られたAAVを含む画分は、例えば、トリスを用いてpHを8.0から9.5付近に調整したり、第二吸着工程で用いる緩衝液で希釈してもよい。

[0094] 陰イオン交換カラムは、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィ用担体を $1\text{ mol/L}$ の塩化ナトリウム水溶液に浸漬後、カラムに充填することで製造できる。第二吸着工程および第二溶出工程で用いる緩衝液成分は、pH8

、0から9.5付近に緩衝能を有する緩衝液成分であればよく、好ましくはトリスである。

[0095] 一態様において、第二溶出工程で溶出液に含ませる、好ましい塩の一例として、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、テトラメチルアンモニウムクロリド、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸アンモニウム、テトラエチルアンモニウムクロリド、塩化コリン、アセチルコリンクロリド、カルニチン塩酸塩、トリメチルグリシンなどがあげられ、より好ましくは、テトラエチルアンモニウムクロリドや塩化コリンである。特に塩化コリンを前記溶出液に含ませると、感染能を有した Full AAVを高純度に精製できるため好ましい。Full AAVとは、遺伝子を含んだAAVを意味してよい。

[0096] 第二溶出工程は、例えば、前述した塩の濃度をリニアグラジエントで適切な濃度まで上昇させ、1つ目のピークを溶出させた後、塩濃度をステップグラジエントで上昇させ、2つ目のピークを溶出させる。例えばAAV8を用いた場合には、1つ目のピークにEmpty AAVの割合が多い画分が、2つ目のピークにFull AAVの割合が高い画分が得られる。

[0097] 一態様において、前記1つ目のピークを溶出させる際の溶出液の導電率を13.5 mS/cm以下とし、前記2つ目のピークを溶出させる際の溶出液の導電率を15.0 mS/cm以上とすると、前記2つ目のピークに含まれるFull AAVの割合が向上するため好ましい。また前記1つ目のピークを溶出させる際の溶出液の導電率を5.0 mS/cm以上13.5 mS/cm以下とし、前記2つ目のピークを溶出させる際の溶出液の導電率を15.0 mS/cm以上50.0 mS/cm以下とすると、さらに好ましい。前記1つ目のピークを溶出させる際の溶出液の導電率を12.0 mS/cm以上13.5 mS/cm以下とし、前記2つ目のピークを溶出させる際の溶出液の導電率を20.0 mS/cm以上40.0 mS/cm以下とすると、さらに好ましい。導電率の測定方法はAKTAGO（サイティバ社製）のような液体クロマトグラフィシステムに内蔵されている導電率モニターを用い

ると良い。

[0098] 本明細書中では、遺伝子を含んだAAVベクターの割合をFull率とも呼ぶ。Full率の測定方法はRefeyn Two（レフェイン社製）のようなMass Photometry法を用いると良い。

## 実施例

[0099] 以下、実施例および参考例を用いて本開示をさらに詳細に説明するが、本開示はこれら例に限定されるものでない。なお参考例は本開示を構成しない。

[0100] 実施例1 AAVベクターの作製（その1）

（1）AAV血清型2（AAV2）のカプシドをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドpRC2-mi342 Vector（タカラバイオ社製）およびpHelper Vector（タカラバイオ社製）を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換体を、100 $\mu$ g/mLのカルベニシリンを含む2 $\times$ YT培地（1.6%（w/v）のTryptone、1%（w/v）のYeast Extract、0.5%（w/v）の塩化ナトリウム）1Lが入った、5Lバッフルフラスコにて、37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養した。

[0101] （2）（1）の培養液を遠心することで菌体を回収後、当該回収菌体からPlasmid Mega Kit（キアゲン社製）を用いて、pRC2-mi342 VectorおよびpHelper Vectorを大量に調製した。

[0102] （3）10%（v/v）のウシ血清を含んだD-MEM培地（富士フィルム和光純薬社製）40mLが入ったT-225フラスコ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）5枚でHEK293T細胞を培養した。

[0103] （4）TransIT-VirusGEN Transfection Reagent（タカラバイオ社製）を用いて、（2）で調製したpRC2-mi342 VectorおよびpHelper Vectorを、（3）で培養したHEK293T細胞に遺伝子導入し、5%の二酸化炭素、37 $^{\circ}$ C

の条件で3日間静置培養した。

[0104] (5) (4)で培養した細胞を回収し、AAVpro Purification Kit (タカラバイオ社製)で抽出、精製することでVLP2 (ウイルス様粒子、AAVセロタイプ2型の外殻タンパク粒子)を得た。5枚のT-225フラスコから約1mLのVLP2精製溶液を調製した。

[0105] 実施例2 AAV結合性タンパク質の変異ライブラリ作製とスクリーニング (その1)

AAV結合性タンパク質AVR21を含むポリペプチド (配列番号2)を発現可能なベクターpET-AVR21を鋳型とし、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチド部分に、エラープローンPCRを用いてランダムに変異導入を施した。なお配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのうち、1番目のメチオニン (M) から22番目のアラニン (A) までがPelBシグナルペプチド (UniProt No. P0C1C1のN末端側22アミノ酸残基) であり、25番目のセリン (S) から213番目のアスパラギン酸 (D) までがAAV結合性タンパク質AVR21であり、214番目から219番目のヒスチジン (H) がタグ配列である。またAVR21は、天然型AAV結合性タンパク質であるKIAA0319L (UniProt No. Q81ZA0) のうち、細胞外領域ドメイン1 (PKD1) およびドメイン2 (PKD2) に相当する、配列番号1の312番目から500番までのアミノ酸残基において、以下の21箇所のアミノ酸置換が生じたポリペプチドである (WO2023/140197号)。

配列番号1の317番目 (配列番号2では30番目) のバリン (V) がアスパラギン酸 (D) に置換

配列番号1の324番目 (配列番号2では37番目) のアスパラギン (N) がヒスチジン (H) に置換

配列番号1の326番目 (配列番号2では39番目) のバリン (V) がアラニン (A) に置換

配列番号1の330番目 (配列番号2では43番目) のアラニン (A) がバ

リン（V）に置換

配列番号1の334番目（配列番号2では47番目）のグルタミン（Q）がロイシン（L）に置換

配列番号1の335番目（配列番号2では48番目）のグルタミン酸（E）がバリン（V）に置換

配列番号1の341番目（配列番号2では54番目）のスレオニン（T）がアラニン（A）に置換

配列番号1の342番目（配列番号2では55番目）のチロシン（Y）がセリン（S）に置換

配列番号1の362番目（配列番号2では75番目）のリジン（K）がグルタミン酸（E）に置換

配列番号1の371番目（配列番号2では84番目）のリジン（K）がアスパラギン（N）に置換

配列番号1の379番目（配列番号2では92番目）のフェニルアラニン（F）がチロシン（Y）に置換

配列番号1の380番目（配列番号2では93番目）のリジン（K）がアルギニン（R）に置換

配列番号1の381番目（配列番号2では94番目）のバリン（V）がアラニン（A）に置換

配列番号1の382番目（配列番号2では95番目）のイソロイシン（I）がバリン（V）に置換

配列番号1の390番目（配列番号2では103番目）のグリシン（G）がセリン（S）に置換

配列番号1の399番目（配列番号2では112番目）のリジン（K）がグルタミン酸（E）に置換

配列番号1の467番目（配列番号2では180番目）のリジン（K）がグルタミン（Q）に置換

配列番号1の476番目（配列番号2では189番目）のセリン（S）がア

ルギニン（R）に置換

配列番号1の482番目（配列番号2では195番目）のセリン（S）がスレオニン（T）に置換

配列番号1の487番目（配列番号2では200番目）のアスパラギン（N）がアスパラギン酸（D）に置換

配列番号1の492番目（配列番号2では205番目）のアスパラギン（N）がアスパラギン酸（D）に置換。

[0106] (1) 鋳型としてAVR21を含むポリペプチド（配列番号2）を発現可能なベクターpET-AVR21を用いてエラープローンPCRを行なった。エラープローンPCRは、表1に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で2分間熱処理し、98℃で30秒間の第1ステップ、55℃で20秒間の第2ステップ、72℃で90秒間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することで行なった。前記エラープローンPCRによりAAV結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドに良好に変異が導入され、その平均変異導入率は1分子当たり1.4アミノ酸変異であった。

[0107] [表1]

組成	容量
5 ng/μL 鋳型	1 μL
10 μM PCR primer(配列番号3)	2 μL
10 μM PCR primer(配列番号4)	2 μL
10 mM MnCl <sub>2</sub>	1.5 μL
2.5 mM dNTPs	4 μL
10×Ex Taq Buffer(タカラバイオ社製)	5 μL
GoTaq polymerase(プロメガ社製)	0.5 μL
H <sub>2</sub> O	up to 50 μL

[0108] (2) (1) で得られたPCR産物を精製後、制限酵素NcoIとXhoIで消化し、あらかじめ同じ制限酵素で消化した発現ベクターpET26b

(Merck millipore社製)にライゲーションした。

- [0109] (3) ライゲーション反応終了後、反応液により大腸菌BL21 (DE3)を形質転換し、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含むLB (Luria-Bertani)プレート培地で培養(37°Cで18時間)後、プレート上に形成したコロニーをランダム変異体ライブラリとした。
- [0110] (4) (3)で作製したランダム変異体ライブラリー(形質転換体)を、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含む2YT液体培地 $200\mu\text{L}$ に接種し、96穴ディープウェルプレートを用いて、37°Cで一晩振とう培養した。
- [0111] (5) (4)の培養液を遠心分離し、得られた培養上清を超純水で2倍に希釈した。希釈した培養液 $60\mu\text{L}$ と0.5Mの水酸化ナトリウム水溶液 $60\mu\text{L}$ とを混合し30°Cで30分間アルカリ処理を行なった。
- [0112] (6) (5)の処理を行なったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性と、(5)の処理を行なわなかったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性を、以下に示すELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)法で評価した。
- [0113] (6-1) 実施例1で調製したVLP2を150mMの塩化ナトリウムを含む20mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で200倍に希釈し、96穴マイクロプレート(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)に $100\mu\text{L}/\text{well}$ で加え、固定化した(4°Cで18時間)。固定化終了後、2%(w/v)のSKIM MILK (Becton Dickinson社製)および150mMの塩化ナトリウムを含む20mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)でブロッキングした。
- [0114] (6-2) 洗浄緩衝液(0.05%(w/v)のTween 20 (Sigma-Aldrich社製)、150mMの塩化ナトリウムを含む20mMのTris塩酸緩衝液(pH7.4))でwellを洗浄後、(3)で調製した培養上清を添加し、AAV結合性タンパク質とVLP2とを反応させた(30°Cで1時間)。
- [0115] (6-3) 反応終了後、前記洗浄緩衝液で洗浄し、 $100\text{ng}/\text{mL}$ に希

釈したAnti-6His抗体 (Bethyl Laboratories社製) を100  $\mu$ L/wellで添加した。

[0116] (6-4) 30°Cで1時間反応させ、前記洗浄緩衝液で洗浄した後、TMB Peroxidase Substrate (KPL社製) を50  $\mu$ L/wellで添加した。1Mのリン酸を50  $\mu$ L/wellで添加することで発色を止め、マイクロプレートリーダー (テカン社製) にて450nmの吸光度を測定した。

[0117] アルカリ処理を行なった時のAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性を、アルカリ処理を行なわなかったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性で除することで、残存活性を算出した。

[0118] (7) (6) の方法で約1800株のランダム変異体ライブラリを評価し、その中から親分子であるAVR21と比較して残存活性が向上したAAV結合性タンパク質を発現する形質転換体を選択した。前記選択した形質転換体を培養し、QIAprep Spin Miniprep kit (キアゲン社製) を用いて発現ベクターを調製した。

[0119] (8) 得られた発現ベクターに挿入されたAAV結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチド領域の配列を、全自動DNAシーケンサーGenetic Analyzer 3500 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) にてヌクレオチド配列を解析し、アミノ酸置換箇所を特定した。なお当該解析の際、配列番号3 (5' -TAATACgACTCACTATAggg-3') または配列番号4 (5' -ATgCTAgTTATTgCTCAgCgg-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをシーケンス用プライマーとして使用した。

[0120] 前記(7) で選択した形質転換体が発現するAAV結合性タンパク質の、AVR21に対するアミノ酸置換位置ならびにアルカリ処理後の残存活性 [%] をまとめたものを表2に示す。

[0121] 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリン (S) から213番目のアスパラギン酸 (D) までのアミノ酸残基において、1319N (

この表記は、配列番号1の319番目（配列番号2では32番目）のイソロイシンがアスパラギンに置換されていることを示す、以下同様）、L321Q、L328P、N329K、N329S、V332A、E(V)335A（この表記は、配列番号1の335番目（配列番号2では48番目）のグルタミン酸が配列番号2で一旦バリンに置換された後、さらにアラニンに置換されていることを表す、以下同様）、K338R、E340G、T343A、T343S、Y344F、D345G、Q347K、T350A、E360D、Q365R、I366F、L367P、K368R、L369S、K(N)371D、K(N)371S、L376P、Y377F、Y377N、E378G、F(Y)379S、V(A)381T、I(V)382I、E384D、H389R、V394A、V394I、V396E、T397A、T397S、E401G、P402S、V412A、T426A、D435A、E453D、E454D、A461P、S466T、N472K、K497EおよびD500Nのいずれかのアミノ酸置換が少なくとも1つ生じているAAV結合性タンパク質は、AVR21と比較しアルカリへの安定性が向上しているといえる。

[0122]

[表2]

アミノ酸置換	残存活性 [%]
I319N,Y377F	45.1
L321Q	34.2
L321Q,T343S	50.4
L328P,V394A	40.5
N329K,E401G	43.1
N329S,K368R,V412A	37.1
V332A	57.6
E(V)335A	35.8
E(V)335A,V394I	37.3
K338R,A461P	36.4
E340G	28.1
T343A,K(N)371D	40.5
Y344F,T350A,Y377N	34.4
D345G,E454D	61.7
Q347K,N472K	58.9
E360D,H389R	46.7
Q365R,V(A)381T,K497E	42.0
I366F,D435A	38.4
L367P	35.7
L367P,V412A	35.8
L369S	51.4
K(N)371S,E453D,S466T	57.3
L376P	42.6
L376P,P402S	35.1
E378G	58.0
F(Y)379S	54.9
I(V)382I	32.8
E384D,V396E	45.3
T397A	40.4
T397S	38.4
V412A	32.5
T426A	43.5
D500N	39.3
AVR21	26.2

## [0123] 参考例 1

AAV結合性タンパク質AVR8gを含むポリペプチド（配列番号22）を発現可能なベクターpET-AVR8gを鋳型とし、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチド部分に、エラープローンPCRを用いてランダムに変異導入を施した。なお配列番号22に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのうち、1番目のメチオニン（M）から22番目のアラニン（A）までがPELシグナルペプチドであり、25番目のセリン（S）から213番目のアスパラギン酸（D）までがAAV結合性タンパク質AVR8gであり、214番目から219番目のヒスチジン（H）がタグ配列である。またAVR8gは、KIAA0319L（UniProt No. Q81ZA0）の細胞外領域ドメイン1（PKD1）およびドメイン2（PKD2）に相当する、配列番号1の312番目から500番までアミノ酸残基において、V317D、Y342C、K362E、K371N、G390S、K399E、S476RおよびN487Dのアミノ酸置換が生じたポリペプチドである（WO2021/106882号）。

[0124] (1) AVR8g（配列番号29）をコードするポリヌクレオチド（配列番号30）を挿入したプラスミドpET-AVR8gを鋳型とし、当該鋳型の濃度を10ng/μLとした他は、実施例2（1）と同様な方法でエラープローンPCRを行なった。前記エラープローンPCRによりAVR8gをコードするポリヌクレオチドに変異が導入され、その平均変異導入率は1分子当たり2.3アミノ酸変異であった。

[0125] (2) (1) で得られたPCR産物を精製後、実施例2（2）および（3）に記載の方法によりランダム変異体ライブラリーを作製した。

[0126] (3) (2) で作製したランダム変異体ライブラリー（形質転換体）を、50μg/mLのカナマイシンを含む2YT液体培地200μLに接種し、96穴ディープウェルプレートを用いて、37℃で一晩振とう培養した。

[0127] (4) (3) で作製した培養液10μLを0.1mMのIPTG（Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside）お

よび50 $\mu$ g/mLのカナマイシンを含む500 $\mu$ Lの2YT液体培地に植え継ぎ、96穴ディープウェルプレートを用いて、さらに25 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養した。

[0128] (5) (4) の培養液を遠心分離して得られた培養上清を、超純水で16倍に希釈した。当該希釈培養上清60 $\mu$ Lと0.1Mのグリシン水酸化ナトリウム緩衝液(pH10.0)60 $\mu$ Lとを混合し51.3 $^{\circ}$ Cで15分間熱およびアルカリ処理を行なった。

[0129] (6) (5) の処理を行なったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性と、(5) の処理を行なわなかったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性を、実施例2(6)に記載のELISA法にて測定した。

[0130] 熱処理を行なったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性を、熱処理を行なわなかったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性で除することで、残存活性を算出した。

[0131] (7) (6) に記載の方法で約1800株のランダム変異体ライブラリーを評価し、その中から親分子であるAVR8gと比較して残存活性が向上したAAV結合性タンパク質を発現する形質転換体を選択した。前記選択した形質転換体を培養し、QIAprep Spin Miniprep kit(キアゲン社製)を用いて発現ベクターを調製した。

[0132] (6) 得られた発現ベクターに挿入されたAAV結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチド領域の配列を、実施例2(8)に記載の方法で解析し、アミノ酸置換箇所を特定した。

[0133] (7) (6) で選択した形質転換体が発現するAAV結合性タンパク質の、AVR8gに対するアミノ酸置換位置ならびに熱およびアルカリ処理後の残存活性[%]をまとめたものを表3に示す。

[0134]

[表3]

アミノ酸置換	残存活性 [%]
Y331H, F379S, K467N, A491T	28.1
AVR8g	8.8

## [0135] 参考例 2

参考例 1 で明らかになった、A A V 結合性タンパク質の熱およびアルカリ安定性向上に關与するアミノ酸置換（Y 3 3 1 H、F 3 7 9 S、K 4 6 7 N および A 4 9 1 T）のうち任意の 1 つを A V R 8 g（配列番号 2 2）に対し導入しても熱およびアルカリ安定性が向上するか確認した。具体的には、以下の（a）から（d）に示す 4 種類の A A V 結合性タンパク質の熱およびアルカリ安定性を確認した。

（a）A V R 8 g に対し、Y 3 3 1 H のアミノ酸置換を導入したタンパク質（配列番号 2 4、A V R 9 a と命名）

（b）A V R 8 g に対し、F 3 7 9 S のアミノ酸置換を導入したタンパク質（配列番号 2 5、A V R 9 b と命名）

（c）A V R 8 g に対し、K 4 6 7 N のアミノ酸置換を導入したタンパク質（配列番号 2 6、A V R 9 c と命名）

（d）A V R 8 g に対し、A 4 9 1 T のアミノ酸置換を導入したタンパク質（配列番号 2 7、A V R 9 d と命名）

（1）A V R 9 a（配列番号 2 4）、A V R 9 b（配列番号 2 5）、A V R 9 c（配列番号 2 6）および A V R 9 d（配列番号 2 7）のいずれかを発現可能な形質転換体（宿主：大腸菌 B L 2 1 株（D E 3））を、それぞれ 5 0  $\mu$  g / m L のカナマイシンを含む 3 m L の 2  $\times$  Y T 液体培地に接種し、3 7  $^{\circ}$  C で一晩、好氣的に振とう培養することで前培養を行なった。

[0136] （2）5 0 0 m L のバツフルフラスコに 5 0  $\mu$  g / m L のカナマイシンを添加した 2 0 0 m L の 2  $\times$  Y T 液体培地に（1）の前培養液をそれぞれ 2 m L 接種し、3 7  $^{\circ}$  C で好氣的に振とう培養を行なった。

- [0137] (3) 培養開始2.0時間後、氷上にて冷却し、終濃度0.1mMとなるようIPTGをそれぞれ添加後、引き続き25℃で20時間、好氣的に振とう培養した。
- [0138] (4) 培養終了後、培養液を4℃、8000rpmで20分間遠心分離することで各菌体を回収した。
- [0139] (5) (4)で回収した菌体を150mMの塩化ナトリウムおよび20mMのイミダゾールを含む20mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)(以下、「平衡化液A」とも表記)に5mL/1g(菌体)となるように懸濁後、超音波発生装置(インソネーター201M[久保田商事社製])を用いて、4℃で約10分間、約150Wの出力で菌体を破砕した。菌体破砕液は4℃で20分間、8000rpmの遠心分離を2回行ない、各上清を回収した。
- [0140] (6) (5)で得られた上清を、あらかじめ平衡化液Aで平衡化した、Ni Sepharose 6 Fast Flow(サイティバ社製)1.5mLを充填したオープンカラムにアプライした。平衡化液Aで洗浄後、0.5Mのイミダゾールおよび150mMの塩化ナトリウムを含む20mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で溶出した。
- [0141] (7) (6)で得た各溶出液を、150mMの塩化ナトリウムを含む20mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で透析することで、AAV結合性タンパク質を調製した。
- [0142] (8) (7)で調製したAAV結合性タンパク質と、実施例1で調製したVLP2との結合活性を、実施例2(6)に記載のELISA法を用いて測定した。前記測定結果である450nmにおける吸光度に基づき、当該測定値が同様になるよう(7)で得たAAV結合性タンパク質を純水で希釈した。
- [0143] (9) 希釈したAAV結合性タンパク質溶液60μLと0.1Mグリシン水酸化ナトリウム緩衝液(pH10.0)60μLとを混合し、55.7℃、60.1℃、66.1℃または70℃で15分間熱およびアルカリ処理を行なった。

[0144] (10) (9) の処理を行なったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性と、(9) の処理を行なわなかったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性を、実施例2(6)に記載のELISA法にて測定した。(9) の処理を行なった時のAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性を、(9) の熱処理を行なわなかったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性で除することで、残存活性を算出した。

[0145] 結果を表4に示す。AVR8g(配列番号29)のアミノ酸配列のうち25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)までのアミノ酸残基において、Y331H、F379S、K467NおよびA491Tのいずれかのアミノ酸置換が少なくとも1つ生じたAAV結合性タンパク質は、AVR8gと比較し熱およびアルカリへの安定性が向上しているといえる。

[0146] [表4]

AAV結合性タンパク質			残存活性[%]			
名称	アミノ酸置換(*)	配列番号	55.7°C	60.1°C	66.1°C	70°C
AVR9a	Y331H	24	10.6	12.9	5.73	13.8
AVR9b	F379S	25	92.5	55.5	76.2	55.4
AVR9c	K467N	26	42.3	26.4	5.45	32.7
AVR9d	A491T	27	82.3	65.6	30.2	55.7
AVR8g	—	22	0.837	4.18	0	3.77

(\*) AVR8gに対するアミノ酸置換

[0147] 実施例3 AVR21アミノ酸置換集積体の作製

実施例2で明らかになったAAV結合性タンパク質のアルカリ安定性向上に関与するアミノ酸置換の中からN329K、K338R、E401G、T426AおよびA461Pを、参考例1および2で明らかとなったAAV結合性タンパク質の熱およびアルカリ安定性向上に関与するアミノ酸置換の中からK467Nを、それぞれ選択し、これらアミノ酸置換をAVR21(配列番号2)に対し集積することで、さらなるアルカリ安定性の向上を図った。

。具体的には、以下の（a）から（e）に示す5種類のAAV結合性タンパク質を設計し、作製した。

（a）AVR21に対し、N329K、E401GおよびT426Aのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号5、AVR24aと命名）

（b）AVR21に対し、K338R、T426AおよびA461Pのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号6、AVR24bと命名）

（c）AVR21に対し、N329K、E401G、T426AおよびA461Pのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号7、AVR25aと命名）

（d）AVR21に対し、K338R、E401G、T426AおよびA461Pのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号8、AVR25bと命名）

（e）AVR21に対し、N329K、K338R、E401G、T426AおよびA461Pのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号9、AVR26と命名）

以下、前記（a）から（e）に示す6種類のAAV結合性タンパク質の作製方法について説明する。

[0148] 変異集積体を作成するためのPCRプライマーセットを設計した。具体的には、

N329Kのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号10（Forward）および11（Reverse）を、

K338Rのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号12（Forward）および13（Reverse）を、

E401Gのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号14（Forward）および15（Reverse）を、

T426Aのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列

番号16 (Forward) および17 (Reverse) を、  
A461Pのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列  
番号18 (Forward) および19 (Reverse) を、  
それぞれ設計した。

[0149] (a) AVR24a

本タンパク質は、実施例2で明らかになったアルカリ安定性に関与するア  
ミノ酸置換の中から、N329K、E401GおよびT426Aを選択し、  
当該アミノ酸置換をAVR21 (配列番号2) に導入することで作製した。

[0150] (a-1) AVR21を含むポリペプチド (配列番号2) を発現可能なベ  
クターpET-AVR21を鋳型とし、配列番号10 (5' -AGCTGA  
AAGTCTACGTACTGCTGGT-3') および配列番号11 (5'  
' -TAGACTTTCAGCTGGGCTTTCATGTT-3') に記載  
の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組  
成の反応液を調製後、当該反応液を98°Cで5分間熱処理し、98°Cで10  
秒間の第1ステップを55°Cで5秒間の第2ステップを72°Cで6分間の第  
3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72°Cで  
5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0151] [表5]

組成	容量
10 ng/ $\mu$ L 鋳型	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR forward primer (配列番号10, 12, 14, 16, 18, 29)	1.5 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR reverse primer (配列番号11, 13, 15, 17, 19, 30)	1.5 $\mu$ L
10 $\times$ KOD buffer(東洋紡社製)	5 $\mu$ L
2 mM dNTPs	5 $\mu$ L
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ L
1 U/ $\mu$ L KOD Plus(東洋紡社製)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ L

- [0152] (a-2) (a-1) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号14 (5' - AGCCTGGCCCGCGCAAGAATCGTCC - 3' ) および配列番号15 (5' - CGCGGGCCAGGCTCAACCGTTACGT - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。
- [0153] (a-3) (a-2) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号16 (5' - CAAGTGCGGTGATCGACGGATCGCA - 3' ) および配列番号17 (5' - ATCACCGCACTTGTAGTCGGGAGTG - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。
- [0154] (a-4) (a-3) で得られたPCR産物を用いて大腸菌BL21株 (DE3) を形質転換した。得られた形質転換体を50 μg/mLのカナマイシンを添加したLB培地で培養後、遠心分離で回収した菌体 (形質転換体) からプラスミドを抽出することで、天然型AAV結合性タンパク質に対して24箇所アミノ酸置換したAVR24aをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド (発現ベクター) pET-AVR24aを得た。
- [0155] (a-5) pET-AVR24aのヌクレオチド配列を実施例2 (8) と同様な方法で解析し、確認した。
- [0156] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR24aのアミノ酸配列を配列番号5に示す。なお配列番号5において、1番目のメチオニン (M) から22番目のアラニン (A) まだがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン (S) から213番目のアスパラギン酸 (D) がAA

V結合性タンパク質AVR24a（配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当）であり、214番目から219番目のヒスチジン（H）がタグ配列である。また配列番号5において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、K467Qのグルタミンは180番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、それぞれ存在する。

[0157] (b) AVR24b

本タンパク質は、実施例2で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、K338R、T426A、およびA461Pを選択し、当該アミノ酸置換をAVR21（配列番号2）に導入することで作製した。

[0158] (b-1) AVR21を含むポリペプチド（配列番号2）を発現可能なベクターpET-AVR21を鋳型とし、配列番号12（5'-CACCGCGCGGGGAAGCGTCAACGTA-3'）および配列番号13（5'-TCCCCGCGCGGTGGAACCAGCAGTA-3'）に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第

3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0159] (b-2) (b-1) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号16 (5' -CAAGTGCGGTGATCGACGGATCGCA-3') および配列番号17 (5' -ATCACCGCACTTGTAGTCGGGAGTG-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0160] (b-3) (b-2) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号18 (5' -ATACCCCGATTCTTAAGCTCTCGCA-3') および配列番号19 (5' -AGAATCGGGGTATCCTCGCTGATCT-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0161] (b-4) (b-3) で得られたPCR産物を用いて大腸菌BL21株 (DE3) を形質転換した。得られた形質転換体を50 μg/mLのカナマイシンを添加したLB培地で培養後、遠心分離で回収した菌体 (形質転換体) からプラスミドを抽出することで、天然型AAV結合性タンパク質に対して24箇所アミノ酸置換したAVR24bをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド (発現ベクター) pET-AVR24bを得た。

[0162] (b-5) pET-AVR24bのヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0163] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR24bのアミノ酸配列を配列番号6に示す。なお配列番号6において、1番目のメチオニン

(M) から 22 番目のアラニン (A) まだが P e l B シグナルペプチドであり、25 番目のセリン (S) から 213 番目のアスパラギン酸 (D) が A A V 結合性タンパク質 A V R 2 4 b (配列番号 2 の 25 番目から 213 番目までの領域に相当) であり、214 番目から 219 番目のヒスチジン (H) がタグ配列である。また配列番号 6 において、V 3 1 7 D のアスパラギン酸は 30 番目に、N 3 2 4 H のヒスチジンは 37 番目に、V 3 2 6 A のアラニンは 39 番目に、A 3 3 0 V のバリンは 43 番目に、Q 3 3 4 L のロイシンは 47 番目に、E 3 3 5 V のバリンは 48 番目に、K 3 3 8 R のアルギニンは 51 番目に、T 3 4 1 A のアラニンは 54 番目に、Y 3 4 2 S のセリンは 55 番目に、K 3 6 2 E のグルタミン酸は 75 番目に、K 3 7 1 N のアスパラギンは 84 番目に、F 3 7 9 Y のチロシンは 92 番目に、K 3 8 0 R のアルギニンは 93 番目に、V 3 8 1 A のアラニンは 94 番目に、I 3 8 2 V のバリンは 95 番目に、G 3 9 0 S のセリンは 103 番目に、K 3 9 9 E のグルタミン酸は 112 番目に、T 4 2 6 A のアラニンは 139 番目に、A 4 6 1 P のプロリンは 174 番目に、K 4 6 7 Q のグルタミンは 180 番目に、S 4 7 6 R のアルギニンは 189 番目に、S 4 8 2 T のスレオニンは 195 番目に、N 4 8 7 D のアスパラギン酸は 200 番目に、N 4 9 2 D のアスパラギン酸は 205 番目に、それぞれ存在する。

[0164] (c) A V R 2 5 a

本タンパク質は、実施例 2 で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、N 3 2 9 K、E 4 0 1 G、T 4 2 6 A、および A 4 6 1 P を選択し、当該アミノ酸置換を A V R 2 1 (配列番号 2) に導入することで作製した。

[0165] (c-1) A V R 2 1 を含むポリペプチド (配列番号 2) を発現可能なベクター p E T - A V R 2 1 を鋳型とし、配列番号 10 (5' - A G C T G A A A G T C T A C G T A C T G C T G G T - 3' ) および配列番号 11 (5' - T A G A C T T T C A G C T G G G C T T C A T G T T - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドを P C R プライマーとし、表 5 に示す組

成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0166] (c-2) (c-1) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号14 (5'-AGCCTGGCCCGCGCAAGAATCGTCC-3') および配列番号15 (5'-CGCGGGCCAGGCTCAACCGTTACGT-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0167] (c-3) (c-2) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号16 (5'-CAAGTGCGGTGATCGACGGATCGCA-3') および配列番号17 (5'-ATCACCGCACTTGTAGTCGGGAGTG-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0168] (c-4) (c-3) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号18 (5'-ATACCCCGATTCTTAAGCTCTCGCA-3') および配列番号19 (5'-AGAATCGGGGTATCCTCGCTGATCT-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

- [0169] (c-5) (c-4) で得られたPCR産物を用いて大腸菌BL21株 (DE3) を形質転換した。得られた形質転換体を50  $\mu$ g/mLのカナマイシンを添加したLB培地で培養後、遠心分離で回収した菌体 (形質転換体) からプラスミドを抽出することで、天然型AAV結合性タンパク質に対して25箇所アミノ酸置換したAVR25aをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド (発現ベクター) pET-AVR25aを得た。
- [0170] (c-6) pET-AVR25aのヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。
- [0171] シグナル配列およびポリヒスチジントグを付加したAVR25aのアミノ酸配列を配列番号7に示す。なお配列番号7において、1番目のメチオニン (M) から22番目のアラニン (A) までがPEIBシグナルペプチドであり、25番目のセリン (S) から213番目のアスパラギン酸 (D) がAAV結合性タンパク質AVR25a (配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当) であり、214番目から219番目のヒスチジン (H) がタグ配列である。また配列番号7において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Qのグルタミンは180番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、それぞれ存在す

る。

[0172] (d) AVR25b

本タンパク質は、実施例2で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、K338R、E401G、T426A、およびA461Pを選択し、当該アミノ酸置換をAVR21（配列番号2）に導入することで作製した。

[0173] (d-1) AVR21を含むポリペプチド（配列番号2）を発現可能なベクターpET-AVR21を鋳型とし、配列番号12（5′-CACCGCGCGGGGAAGCGTCAACGTA-3′）および配列番号13（5′-TCCCCGCGCGGTGGAACCAGCAGTA-3′）に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0174] (d-2) (d-1) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号14（5′-AGCCTGGCCCGCGCAAGAATCGTCC-3′）および配列番号15（5′-CGCGGGCCAGGCTCAACCGTTACGT-3′）に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0175] (d-3) (d-2) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号16（5′-CAAGTGCGGTGATCGACGGATCGCA-3′）および配列番号17（5′-ATCACCGCACTTGTAGTCGGGAGTG-3′）に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処

理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0176] (d-4) (d-3) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号18 (5' - ATACCCCGATTCTTAAGCTCTCGCA - 3' ) および配列番号19 (5' - AGAATCGGGGTATCCTCGCTGATCT - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0177] (d-5) (d-4) で得られたPCR産物を用いて大腸菌BL21株 (DE3) を形質転換した。得られた形質転換体を50 μg/mLのカナマイシンを添加したLB培地で培養後、遠心分離で回収した菌体 (形質転換体) からプラスミドを抽出することで、天然型AAV結合性タンパク質に対して25箇所アミノ酸置換したAVR25bをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド (発現ベクター) pET-AVR25bを得た。

[0178] (d-6) pET-AVR25bのヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0179] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR25bのアミノ酸配列を配列番号8に示す。なお配列番号8において、1番目のメチオニン (M) から22番目のアラニン (A) まだがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン (S) から213番目のアスパラギン酸 (D) がAAV結合性タンパク質AVR25b (配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当) であり、214番目から219番目のヒスチジン (H) がタグ配列である。また配列番号8において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは

47番目に、E335Vのバリンは48番目に、K338Rのアルギニンは51番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Qのグルタミンは180番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、それぞれ存在する。

[0180] (e) AVR26

本タンパク質は、実施例2で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、N329K、K338R、E401G、T426A、およびA461Pを選択し、当該アミノ酸置換をAVR21（配列番号2）に導入することで作製した。

[0181] (e-1) AVR21を含むポリペプチド（配列番号2）を発現可能なベクターpET-AVR21を鋳型とし、配列番号10（5'-AGCTGA AAGTCTACGTACTGCTGGT-3'）および配列番号11（5'-TAGACTTTCAGCTGGGCTTCATGTT-3'）に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0182] (e-2) (e-1) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号12（5'-CACCGCGCGGGGAAGCGTCAACGTA-3'）およ

び配列番号13 (5' - T C C C C G C G C G G T G G A A C C A G C A G T A - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0183] (e-3) (e-2) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号14 (5' - A G C C T G G C C C G C G C A A G A A T C G T C C - 3' ) および配列番号15 (5' - C G C G G G C C A G G C T C A A C C G T T A C G T - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0184] (e-4) (e-3) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号16 (5' - C A A G T G C G G T G A T C G A C G G A T C G C A - 3' ) および配列番号17 (5' - A T C A C C G C A C T T G T A G T C G G G A G T G - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0185] (e-5) (e-4) で得られたPCR産物を鋳型とし、配列番号18 (5' - A T A C C C C G A T T C T T A A G C T C T C G C A - 3' ) および配列番号19 (5' - A G A A T C G G G G T A T C C T C G C T G A T C T - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとし、表5に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを

72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0186] (e-6) (e-5) で得られたPCR産物を用いて大腸菌BL21株 (DE3) を形質転換した。得られた形質転換体を50 μg/mLのカナマイシンを添加したLB培地で培養後、遠心分離で回収した菌体 (形質転換体) からプラスミドを抽出することで、天然型AAV結合性タンパク質に対して26箇所アミノ酸置換したAVR26をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド (発現ベクター) pET-AVR26を得た。

[0187] (e-7) pET-AVR26のヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0188] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR26のアミノ酸配列を配列番号9に示す。なお配列番号9において、1番目のメチオニン (M) から22番目のアラニン (A) までがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン (S) から213番目のアスパラギン酸 (D) がAAV結合性タンパク質AVR26 (配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当) であり、214番目から219番目のヒスチジン (H) がタグ配列である。また配列番号9において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、K338Rのアルギニンは51番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、K371Nのアスパラギン酸は84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Qのグルタミンは180番目に、S47

6 Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、それぞれ存在する。

[0189] 実施例4 AVR21アミノ酸置換集積体のアルカリ安定性評価

(1) AAV結合性タンパク質を発現可能な形質転換体として、実施例3で取得した6種類のAAV結合性タンパク質(AVR21アミノ酸置換集積体、具体的にはAVR24a [配列番号5]、AVR24b [配列番号6]、AVR25a [配列番号7]、AVR25b [配列番号8] およびAVR26 [配列番号9]、ならびにAVR21 (配列番号2) のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで大腸菌株BL21 (DE3) を形質転換し得られた形質転換体を、それぞれ50  $\mu$ g/mLのカナマイシンを含む3 mLの2 $\times$ YT液体培地に接種し、37 $^{\circ}$ Cで一晩、好氣的に振とう培養することで前培養を行なった。

[0190] (2) 1 Lのバッフルフラスコに50  $\mu$ g/mLのカナマイシンを添加した200 mLの2 $\times$ YT液体培地に(1)の前培養液をそれぞれ2 mL接種し、37 $^{\circ}$ Cで好氣的に振とう培養を行なった。

[0191] (3) 培養開始2.0時間後、氷上にて冷却し、終濃度0.1 mMとなるようIPTGをそれぞれ添加後、引き続き25 $^{\circ}$ Cで20時間、好氣的に振とう培養した。

[0192] (4) 培養終了後、培養液を4 $^{\circ}$ C、8000 rpmで20分間遠心分離することで各培養菌体(形質転換体)を回収した。

[0193] (5) (4)で回収した菌体を150 mMの塩化ナトリウムおよび20 mMのイミダゾールを含む20 mMのトリス塩酸緩衝液(pH 7.4) (以下、「平衡化液A」とも表記)に5 mL/1 g (菌体)となるように懸濁後、超音波発生装置(インソネーター201M (久保田商事社製))を用いて、8 $^{\circ}$ Cで約10分間、約150 Wの出力で菌体を破碎した。菌体破碎液は4 $^{\circ}$ Cで20分間、8000 rpmの遠心分離を2回行ない、各上清を回収した。

[0194] (6) (5)で得られた上清を、あらかじめ平衡化液Aで平衡化した、N

i Sepharose 6 Fast Flow (サイティバ社製) 1.5 mLを充填したオープンカラムにアプライした。平衡化液Aで洗浄後、0.5 Mのイミダゾールおよび150 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMのトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で溶出した。

[0195] (7) (6) で得た各溶出液を、150 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMのトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で透析することで、AAV結合性タンパク質を調製した。

[0196] (8) 実施例2 (6) に記載のELISA法を用いて、(7) で調製したAAV結合性タンパク質と、実施例1で調製したVLP2との結合活性を測定した。前記測定結果である450 nmにおける吸光度に基づき、当該測定値が同様になるよう(7) で得たAAV結合性タンパク質を純水で希釈した。

[0197] (9) (8) で希釈した各AAV結合性タンパク質溶液を2つの画分に分けた。そのうち一方の画分には、0.5 Mの水酸化ナトリウム水溶液を等量混合し、一定温度/一定時間静置するアルカリ処理を行ない(処理温度: 30°C、処理時間: 0、30、60分)、もう一方の画分は前記アルカリ処理を行なわなかった(アルカリ処理「開始時」に相当)。

[0198] (10) (9) の処理後の画分に、0.5 MのMES (2-(N-Morpholino) Ethane Sulfonic acid) 緩衝液 (pH 6.0) を、8:2の割合で混合することでpHを6付近にした後、実施例2 (6) に記載のELISA法にてVLP2との結合活性を測定した。

[0199] (11) (10) のアルカリ処理を行なったときの450 nmの吸光度を、処理時間0時間のときの450 nmの吸光度で除することで、残存活性を算出した。

[0200] 結果を表6に示す。実施例3で取得したAVR21アミノ酸置換集積体は、いずれもAVR21 (配列番号2) と比較して残存活性が高く、アルカリに対する安定性が向上していることがわかる。

[0201]

[表6]

AAV結合性タンパク質		残存活性[%]		
名称	配列番号	開始時	30分後	60分後
AVR24a	5	100	37.6	0.3
AVR24b	6	100	89.1	17.6
AVR25a	7	100	100	47.9
AVR25b	8	100	100	1.5
AVR26	9	100	100	23.9
AVR21	2	100	16.9	0

## [0202] 実施例5 AAVベクターの作製（その2）

以降の実施例でAAVとして使用するAAVベクターを以下の方法で調製した。

[0203] (1) 配列番号20に記載のアミノ酸配列からなるEGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) をコードするポリヌクレオチドの5'末端側に制限酵素EcoRI認識配列(GAATTC)を、3'末端側に終止コドン(TAG)およびBamHI認識配列(GGATTC)を、それぞれ付加したヌクレオチド配列(配列番号21)を設計した。

[0204] (2) 配列番号21に記載の配列からなるポリヌクレオチドを全合成しプラスミドにクローニングした(FASMAC社に委託、pUC-EGFPと命名)。pUC-EGFPで大腸菌JM109株を形質転換し、得られた形質転換体を培養した。培養液からQIAprep Spin Miniprep kit (キアゲン社製)を用いてpUC-EGFPを抽出した。

[0205] (3) (2)で得られたpUC-EGFPを制限酵素EcoRIとBamHIで消化後、あらかじめ制限酵素EcoRIとBamHIで消化した発現ベクターpAAV-CMV (タカラバイオ社製)にライゲーションし、当該ライゲーション産物を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。

- [0206] (4) (3) で得られた形質転換体を、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のカルベニシリンを含む2YT培地(1.6% (w/v)のTryptone、1% (w/v)のYeast Extract、0.5% (w/v)の塩化ナトリウム)1Lが入った、5Lバッフルフラスコにて、 $37^{\circ}\text{C}$ で一晩振とう培養した。培養終了後、遠心分離することで菌体を回収し、Plasmid Mega Kit(キアゲン社製)を用いて、当該回収した菌体からpAAV-EGFPを大量に調製した。
- [0207] (5) 血清型8(AAV8)のカプシドをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド(以下、「pRC8 Vector」とも表記)およびpHelper Vector(タカラバイオ社製)を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換体を用いて(4)と同様の操作を行なうことで、pRCX VectorおよびpHelperを大量に調製した。
- [0208] (6) 10% (v/v)のウシ血清を含むD-MEM培地(富士フィルム和光純薬社製)45mLが入ったT-225フラスコ(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)10枚でHEK293T細胞を培養した。そこへ(4)で調製したpAAV-EGFP、(5)で調製したpRC8 VectorおよびpHelperならびにポリエチレンイミン(Poly Sciences社製)の複合体を添加することで遺伝子導入し、5% (v/v)の二酸化炭素、 $37^{\circ}\text{C}$ の条件で3日間静置培養した。培養後、遠心分離により剥離した細胞を回収し、T-225フラスコ5枚分から得られた細胞ごとに $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。
- [0209] (7) (6) で得られた冷凍細胞を解凍し、0.5Mの塩化ナトリウム、4mMの塩化マグネシウムおよび0.01% (w/v)のTween 20(Sigma-Aldrich社製)を含む20mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)10mLに懸濁した。Benzonase(メルクミリポア社製)を1/2000量加えて $37^{\circ}\text{C}$ で1時間静置後、 $13000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離し上清を得た。得られた上清に15%飽和となるよう硫

安（硫酸アンモニウム）を添加し、再度同条件で遠心分離した。得られた上清を孔径0.45 μmのフィルターに供し、浮遊物を除去した。

[0210] (8) 浮遊物を除去した上清を、あらかじめ0.5 Mの塩化ナトリウムを含む20 mMのトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）（以下、「平衡化液B」とも表記）で平衡化した、7 mLのPOROS AAVXカラム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）にアプライした。

[0211] (9) 平衡化液Bで洗浄後、0.5 Mの塩化ナトリウムを含む0.1 Mの酢酸緩衝液（pH 2.5）で溶出した。得られた溶出液に、20 mMの塩化マグネシウムを含む1 Mのトリス塩酸緩衝液（pH 8.5）を1/4量加えることで中和し、AAVベクターであるAAV8-EGFP溶液を得た。

[0212] (10) (9) で得られた溶液中のAAV8-EGFP濃度を、AAVpro Titration Kit（タカラバイオ社製）を用いてqPCRで定量した。また前記溶液をSDS-PAGEに供し、Pierce Silver Stain Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて銀染色することで前記溶液中に含まれるAAVベクターの純度を確認した。

[0213] 実施例6 AAV結合性タンパク質AVR25aへのアミノ酸置換導入  
実施例4でアルカリ安定性を評価したAVR21アミノ酸置換集積体の中からAVR25a（配列番号7）を選択し、当該AVR25aに対し、参考例1および2で熱およびアルカリ安定性が向上するアミノ酸置換であると判明したK467Nのアミノ酸置換を導入したAVR21アミノ酸置換集積体（AVR25cと命名）を作製した。なおK467Nのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号29（Forward）および30（Reverse）を、それぞれ設計した。

[0214] (1) AVR25aを含むポリペプチド（配列番号7）を発現可能なベクターpET-AVR25aを鋳型とし、配列番号29（5'-GAGAGC TTAAGAATGGGGGTATCCTC-3'）および配列番号30（5'-TTCTTAAGCTCTCGAATCTGGTACC-3'）に記

載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとした他は、実施例3(a-1)と同様な方法でPCRを行なった。

[0215] (2) (1) で得られたPCR産物から、実施例3(a-4)と同様な方法で、天然型AAV結合性タンパク質に対して25箇所アミノ酸置換したAVR25cをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド(発現ベクター) pET-AVR25cを得た。

[0216] (3) pET-AVR25cのヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0217] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR25cのアミノ酸配列を配列番号28に示す。なお配列番号28において、1番目のメチオニン(M)から22番目のアラニン(A)までがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)がAAV結合性タンパク質AVR25c(配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当)であり、214番目から219番目のヒスチジン(H)がタグ配列である。また配列番号28において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Nのアスパラギンは180番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、それぞ

れ存在する。

[0218] 実施例7 AAV結合性タンパク質AVR25cのアルカリ安定性評価  
 実施例6で取得したAVR25c（配列番号28）をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、または実施例3（c）で取得したAAV結合性タンパク質AVR25a（配列番号7）をコードするプラスミドで大腸菌株BL21（DE3）を形質転換し得られた形質転換体を、それぞれ実施例4（1）から（3）と同様な方法で培養後、実施例4（4）に記載の方法で培養菌体を回収し、実施例4（5）から（8）に記載の方法でAAV結合性タンパク質を調製し、実施例4（9）から（11）に記載の方法でアルカリ安定性を評価した。

[0219] 結果を表7に示す。K467Nのアミノ酸置換を導入したAVR25c（配列番号28）は、当該アミノ酸置換がないAVR25a（配列番号7）と比較して残存活性が高く、アルカリに対する安定性が向上していることがわかる。

[0220] [表7]

AAV結合性タンパク質		残存活性[%]		
名称	配列番号	開始時	30分後	90分後
AVR25c	28	100	91.2	66.9
AVR25a	7	100	62.3	0

[0221] 実施例8 AAV結合性タンパク質の変異ライブラリ作製とスクリーニング（その3）

実施例6で作製したAAV結合性タンパク質AVR25cを含むポリペプチド（配列番号28）を発現可能なベクターpET-AVR25cを鋳型とし、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチド部分に、エラープローンPCRを用いてランダムに変異導入を施した。

[0222] （1）鋳型としてAVR25cを含むポリペプチド（配列番号28）を発現可能なベクターpET-AVR25cを用いた他は、実施例2（1）の記

載と同様な方法でエラープローンPCRを行なった。前記エラープローンPCRによりAAV結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドに良好に変異が導入され、その平均変異導入率は1分子当たり1.8アミノ酸変異であった。

[0223] (2) (1) で得られたPCR産物から、実施例2(2)および(3)に記載の方法でランダム変異体ライブラリーを作製した。

[0224] (3) (2) で作製したランダム変異体ライブラリー(形質転換体)を、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシンを含む $2\times\text{YT}$ 液体培地 $200\mu\text{L}$ に接種し、96穴ディープウェルプレートを用いて、 $37^\circ\text{C}$ で一晩振とう培養した。

[0225] (4) (3) の培養液を遠心分離し、得られた培養上清を超純水で2倍に希釈した。希釈した培養上清 $50\mu\text{L}$ と1Mの水酸化ナトリウム水溶液 $50\mu\text{L}$ とを混合後、 $30^\circ\text{C}$ で15分間アルカリ処理を行なった。

[0226] (5) (4) の処理を行なったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性と、(4)の処理を行なわなかったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性を、実施例2(6)に記載のELISA法で評価した。アルカリ処理を行なった時のAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性を、アルカリ処理を行なわなかったときのAAV結合性タンパク質とVLP2との結合活性で除することで、残存活性を算出した。

[0227] (6) (5) の方法で約1800株のランダム変異体ライブラリーを評価し、その中から親分子であるAVR25cと比較して残存活性が向上したAAV結合性タンパク質を発現する形質転換体を選択した。

[0228] (7) (6) で選択した形質転換体を培養し、QIAprep Spin Miniprep kit(キアゲン社製)を用いて発現ベクターを調製後、当該ベクターに挿入されたAAV結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチド領域の配列を実施例2(8)に記載の方法で解析し(FASMAC社に委託)、アミノ酸置換箇所を特定した。

[0229] 前記(7)で選択した形質転換体が発現するAAV結合性タンパク質の、AVR25cに対するアミノ酸置換位置ならびにアルカリ処理後の残存活性

[%] をまとめたものを表 8 に示す。

[0230] 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち 25 番目のセリン (S) から 500 番目のアスパラギン酸 (D) までのアミノ酸残基において、G 314 D、V (D) 317 G、Q 318 R、P 322 A、E 325 V、Q 347 R、T 350 A、E 362 D、H 363 P、I 366 F、E 378 G、F (Y) 379 N、G 392 E、V 394 A、V 398 A、E 399 K、R 406 H、Q 415 R、F 416 L、L 421 P、S 433 G、T 434 S、D 437 V、E 445 K、K 455 R、S 457 R、T 474 R、T 478 I、A 485 V、T 486 A、L 493 M、N 496 D、K 497 E、V 499 I および D 500 G のいずれかのアミノ酸置換が少なくとも 1 つ生じている AA V 結合性タンパク質は、AVR 25 c (配列番号 28) と比較しアルカリへの安定性が向上しているといえる。

[0231]

[表8]

アミノ酸置換	残存活性 [%]
G314D, E399K, E445K	62.5
G314D, V499I	79.1
V(D)317G, T478I	82.0
Q318R, E362D, E378G	66.1
P322A, T350A, L421P	49.6
E325V, D437V	76.7
Q347R, T486A, D500G	72.8
H363P, K497E	69.6
I366F, V394A, K455R	71.9
E378G, V398A	67.5
F(Y)379N	55.1
G392E, S433G, A485V, L493M, N496D	61.0
R406H, F416L	41.9
Q415R, S457R	55.1
T434S	77.3
T474R	100
AVR25c	33.5

## [0232] 実施例9 AVR25cアミノ酸置換集積体の調製（その1）

実施例8で明らかになった、AAV結合性タンパク質のアルカリ安定性向上に関与するアミノ酸置換の中からG314D、I366F、V394A、K455R、T474R、K467EおよびV499Iを選択し、これらアミノ酸置換をAVR25c（配列番号28）に対し集積することで、さらなるアルカリ安定性の向上を図った。具体的には、以下の（a）から（i）に示す9種類のAAV結合性タンパク質を設計し、作製した。

（a）AVR25cに対し、I366FおよびT474Rのアミノ酸置換を

導入したAAV結合性タンパク質（配列番号31、AVR27bと命名）

（b）AVR25cに対し、V394AおよびT474Rのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号32、AVR27cと命名）

（c）AVR25cに対し、K455RおよびT474Rのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号33、AVR27dと命名）

（d）AVR25cに対し、I366F、V394AおよびK455Rのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号34、AVR28と命名）

（e）AVR25cに対し、I366F、V394A、K455RおよびT474Rのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号35、AVR29aと命名）

（f）AVR25cに対し、G314D、I366F、V394AおよびK455Rのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号36、AVR29bと命名）

（g）AVR25cに対し、I366F、V394A、K455RおよびK497Eのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号37、AVR29cと命名）

（h）AVR25cに対し、I366F、V394A、K455RおよびV499Iのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号38、AVR29dと命名）

（i）AVR25cに対し、G314D、I366F、V394A、K455R、K497EおよびV499Iのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質（配列番号39、AVR31と命名）

以下、前記（a）から（i）に示す9種類のAAV結合性タンパク質の作製方法について説明する。

[0233] 変異集積体を作成するためのPCRプライマーセットを設計した。具体的には、

G314Dのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列

番号40 (Forward) および41 (Reverse) を、  
I366Fのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号42 (Forward) および43 (Reverse) を、  
V394Aのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号44 (Forward) および45 (Reverse) を、  
K455Rのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号46 (Forward) および47 (Reverse) を、  
T474Rのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号48 (Forward) および49 (Reverse) を、  
K497Eのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号50 (Forward) および51 (Reverse) を、  
V499Iのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号52 (Forward) および53 (Reverse) を、  
K497EおよびV499Iのアミノ酸置換を導入するためのPCRプライマーとして、配列番号54 (Forward) および55 (Reverse) を、  
それぞれ設計した。

[0234] (a) AVR27b

本タンパク質は、実施例9で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、I366FおよびT474Rを選択し、当該アミノ酸置換のうちI366Fを、実施例8で取得した、AVR25cに対しT474Rのアミノ酸置換を導入したAAV結合性タンパク質(表8参照、以下「AVR25c\_\_T474R」とも表記)に導入することで作製した。

[0235] (a-1) AVR25c\_\_T474Rを発現可能なベクターを鋳型とし、配列番号42 (5' -GTCAGTTTCTGAAATTATCCAACCTT-3') および配列番号43 (5' -TTCAGAAACTGACTGTGTTCCGCTT-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして、表9に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を9

8℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップを55℃で5秒間の第2ステップを72℃で6分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で5分間熱処理することでPCRを行なった。

[0236] [表9]

組成	容量
50 ng/μL 鋳型	1 μL
10 μM PCR forward primer (配列番号40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56)	1 μL
10 μM PCR reverse primer (配列番号41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57)	1 μL
10×KOD buffer(東洋紡社製)	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μL
1 U/μL KOD Plus(東洋紡社製)	1 μL
H <sub>2</sub> O	up to 50 μL

[0237] (a-2) (a-1) で得られたPCR産物をDpnI (ニューイングランドバイオラボ社製) で処理することで鋳型鎖を消化後、PCR産物を用いて大腸菌BL21株 (DE3) を形質転換した。得られた形質転換体を50 μg/mLのカナマイシンを添加したLB培地で培養後、遠心分離で回収した菌体 (形質転換体) からプラスミドを抽出することで、天然型AAV結合性タンパク質に対して27箇所アミノ酸置換したAVR27bをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド (発現ベクター) pET-AVR27bを得た。

[0238] (a-3) pET-AVR27bのヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0239] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR27bのアミノ酸配列を配列番号31に示す。なお配列番号31において、1番目のメチオニン(M)から22番目のアラニン(A)までがPeIBシグナルペプチドであり、25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)がAAV結合性タンパク質AVR27b(配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当)であり、214番目から219番目のヒスチジン(H)がタグ配列である。また配列番号31において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、I366Fのフェニルアラニンは79番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Nのアスパラギンは180番目に、T474Rのアルギニンは187番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、それぞれ存在する。

[0240] (b) AVR27c

本タンパク質は、実施例8で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、V394AおよびT474Rを選択し、当該アミノ酸置換のうちV394AをAVR25c\_\_T474Rに導入することで作製した。

[0241] (b-1) AVR25c\_\_T474Rを発現可能なベクターを鋳型とし、

配列番号44 (5' -GGTATGCGAACGTAACGGTTGAGCC-3') および配列番号45 (5' -ACGTTTCGCATACCCCTCGGAATGCG-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとした他は、(a-1)と同様な方法でPCRを行なった。

[0242] (b-2) (b-1) で得られたPCR産物から(a-2)と同様な方法で、天然型AAV結合性タンパク質に対して27箇所アミノ酸置換したAVR27cをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド(発現ベクター) pET-AVR27cを得た。

[0243] (b-3) pET-AVR27cのヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0244] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR27cのアミノ酸配列を配列番号32に示す。なお配列番号32において、1番目のメチオニン(M)から22番目のアラニン(A)までがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)がAAV結合性タンパク質AVR27c(配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当)であり、214番目から219番目のヒスチジン(H)がタグ配列である。また配列番号32において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、V394Aのアラニンは107番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Nのアスパラギンは180番

目に、T 4 7 4 Rのアルギニンは1 8 7番目に、S 4 7 6 Rのアルギニンは1 8 9番目に、S 4 8 2 Tのスレオニンは1 9 5番目に、N 4 8 7 Dのアスパラギン酸は2 0 0番目に、N 4 9 2 Dのアスパラギン酸は2 0 5番目に、それぞれ存在する。

[0245] (c) AVR 2 7 d

本タンパク質は、実施例8で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、K 4 5 5 RおよびT 4 7 4 Rを選択し、当該アミノ酸置換のうちK 4 5 5 RをAVR 2 5 c\_\_T 4 7 4 Rを発現可能なベクターを鋳型とし、に導入することで作製した。

[0246] (c-1) AVR 2 5 c\_\_T 4 7 4 Rを発現可能なベクターを鋳型とし、を発現可能なベクターを鋳型とし、配列番号4 6 (5' - A A G A A C G C A T C A G C G A G G A T A C C C C - 3' ) および配列番号4 7 (5' - C T G A T G C G T T C T T C A C G G A G C G G G C - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとした他は、(a-1)と同様な方法でPCRを行なった。

[0247] (c-2) (c-1) で得られたPCR産物から(a-2)と同様な方法で、天然型AAV結合性タンパク質に対して27箇所アミノ酸置換したAVR 2 7 dをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド(発現ベクター) pET-AVR 2 7 dを得た。

[0248] (c-3) pET-AVR 2 7 dのヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0249] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR 2 7 dのアミノ酸配列を配列番号33に示す。なお配列番号33において、1番目のメチオニン(M)から22番目のアラニン(A)までがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)がAAV結合性タンパク質AVR 2 7 d(配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当)であり、214番目から219番目のヒスチジン(H)がタグ配列である。また配列番号33において、V 3 1 7 Dのアスパラギ

ン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのア  
ラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリ  
ンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリン  
は48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは  
55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、K371Nのアスパ  
ラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのア  
ルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vの  
バリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、K399Eのグ  
ルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T42  
6Aのアラニンは139番目に、K455Rのアルギニンは168番目に、  
A461Pのプロリンは174番目に、K467Nのアスパラギンは180  
番目に、T474Rのアルギニンは187番目に、S476Rのアルギニン  
は189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのア  
スパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に  
、それぞれ存在する。

[0250] (d) AVR28

本タンパク質は、実施例8で明らかになったアルカリ安定性に関与するア  
ミノ酸置換の中から、I366F、V394A、およびK455Rを選択し  
た。なお本タンパク質は実施例8で取得済（表8参照）のため、それを流用  
した。

[0251] シグナル配列およびポリヒスチジントグを付加したAVR28のアミノ酸  
配列を配列番号34に示す。なお配列番号34において、1番目のメチオニ  
ン(M)から22番目のアラニン(A)までがPeIBシグナルペプチドで  
あり、25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)がA  
AV結合性タンパク質AVR28a（配列番号2の25番目から213番目  
までの領域に相当）であり、214番目から219番目のヒスチジン(H)  
がタグ配列である。また配列番号34において、V317Dのアスパラギン  
酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラ

ニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、I366Fのフェニルアラニンは79番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、V394Aのアラニンは107番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、K455Rのアルギニンは168番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Nのアスパラギンは180番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、それぞれ存在する。

[0252] (e) AVR29a

本タンパク質は、実施例8で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、T474Rを選択し、当該アミノ酸置換をAVR28(配列番号34)に導入することで作製した。

[0253] (e-1) AVR28を含むポリペプチド(配列番号34)を発現可能なベクターpET-AVR28aを鋳型とし、配列番号48(5'-ACTACCGCTTTCGCCTGACCGTGAC-3')および配列番号49(5'-CGAAAGCGGTAGTTACCTGGTACCA-3')に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとした他は、(a-1)と同様な方法でPCRを行なった。

[0254] (e-2) (e-1)で得られたPCR産物から(a-2)と同様な方法で、天然型AAV結合性タンパク質に対して29箇所アミノ酸置換したAVR29aをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド(発現ベクター)pET-AVR29aを得た。

[0255] (e-3) pET-AVR29aのヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0256] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR29aのアミノ酸配列を配列番号35に示す。なお配列番号35において、1番目のメチオニン(M)から22番目のアラニン(A)までがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)がAAV結合性タンパク質AVR29a(配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当)であり、214番目から219番目のヒスチジン(H)がタグ配列である。また配列番号35において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、I366Fのフェニルアラニンは79番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、V394Aのアラニンは107番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、K455Rのアルギニンは168番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Nのアスパラギンは180番目に、T474Rのアルギニンは187番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、それぞれ存在する。

[0257] (f) AVR29b

本タンパク質は、実施例9で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、G314Dを選択し、当該アミノ酸置換をAVR28

(配列番号34)に導入することで作製した。

[0258] (f-1)配列番号40(5'-CTGCAGATGAAAGCGACC  
AAATCAC-3')および配列番号41(5'-CTTTCATCTG  
CAGAGCCCATGGCCA-3')に記載の配列からなるオリゴヌク  
レオチドをPCRプライマーとした他は、(e-1)と同様な方法でPCR  
を行なった。

[0259] (f-2) (f-1)で得られたPCR産物から(a-2)と同様な方法  
で、天然型AAV結合性タンパク質に対して29箇所アミノ酸置換したAV  
R29bをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド(発現ベクター)  
pET-AVR29bを得た。

[0260] (f-3) pET-AVR29bのヌクレオチド配列を実施例2(8)と  
同様な方法で解析し、確認した。

[0261] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR29bのアミノ  
酸配列を配列番号36に示す。なお配列番号36において、1番目のメチオ  
ニン(M)から22番目のアラニン(A)までがPEIBシグナルペプチド  
であり、25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)が  
AAV結合性タンパク質AVR29b(配列番号2の25番目から213番  
目までの領域に相当)であり、214番目から219番目のヒスチジン(H  
)がタグ配列である。また配列番号36において、G314Dのアスパラギ  
ン酸は27番目に、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324H  
のヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329  
Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lの  
ロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのア  
ラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグル  
タミン酸は75番目に、I366Fのフェニルアラニンは79番目に、K3  
71Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、  
K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に  
、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、

V 3 9 4 Aのアラニンは1 0 7番目に、K 3 9 9 Eのグルタミン酸は1 1 2番目に、E 4 0 1 Gのグリシンは1 1 4番目に、T 4 2 6 Aのアラニンは1 3 9番目に、K 4 5 5 Rのアルギニンは1 6 8番目に、A 4 6 1 Pのプロリンは1 7 4番目に、K 4 6 7 Nのアスパラギンは1 8 0番目に、S 4 7 6 Rのアルギニンは1 8 9番目に、S 4 8 2 Tのスレオニンは1 9 5番目に、N 4 8 7 Dのアスパラギン酸は2 0 0番目に、N 4 9 2 Dのアスパラギン酸は2 0 5番目に、それぞれ存在する。

[0262] (g) AVR 2 9 c

本タンパク質は、実施例8で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、K 4 9 7 Eを選択し、当該アミノ酸置換をAVR 2 8 (配列番号34) に導入することで作製した。

[0263] (g-1) 配列番号50 (5' -TTAACGAAGCCGTCGACCATCATCA-3') および配列番号51 (5' -ACGGCTTCGTTAACGGTCAAGTCTG-3') に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとした他は、(e-1) と同様な方法でPCRを行なった。

[0264] (g-2) (g-1) で得られたPCR産物から(a-2) と同様な方法で、天然型AAV結合性タンパク質に対して29箇所アミノ酸置換したAVR 2 9 cをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド (発現ベクター) pET-AVR 2 9 cを得た。

[0265] (g-3) pET-AVR 2 9 cのヌクレオチド配列を実施例2 (8) と同様な方法で解析し、確認した。

[0266] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR 2 9 cのアミノ酸配列を配列番号37に示す。なお配列番号37において、1番目のメチオニン (M) から22番目のアラニン (A) まだがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン (S) から213番目のアスパラギン酸 (D) がAAV結合性タンパク質AVR 2 9 c (配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当) であり、214番目から219番目のヒスチジン (H

) がタグ配列である。また配列番号37において、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、I366Fのフェニルアラニンは79番目に、K371Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、V394Aのアラニンは107番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、K455Rのアルギニンは168番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Nのアスパラギンは180番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、K497Eのグルタミン酸は210番目に、それぞれ存在する。

[0267] (h) AVR29d

本タンパク質は、実施例8で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、V499Iを選択し、当該アミノ酸置換をAVR28(配列番号34)に導入することで作製した。

[0268] (h-1) 配列番号52 (5' - AAGCCATTGACCATCATCATCATCA - 3' ) および配列番号53 (5' - TGGTCAATGGCTTTGTTAACGGTCA - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとした他は、(e-1)と同様な方法でPCRを行なった。

[0269] (h-2) (h-1) で得られたPCR産物から(a-2)と同様な方法で、天然型AAV結合性タンパク質に対して29箇所アミノ酸置換したAV

R 2 9 d をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド（発現ベクター）  
p E T - A V R 2 9 d を得た。

[0270] (h-3) p E T - A V R 2 9 d のヌクレオチド配列を実施例 2 (8) と  
同様な方法で解析し、確認した。

[0271] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加した A V R 2 9 d のアミノ  
酸配列を配列番号 3 8 に示す。なお配列番号 3 8 において、1 番目のメチオ  
ニン (M) から 2 2 番目のアラニン (A) まだが P e l B シグナルペプチド  
であり、2 5 番目のセリン (S) から 2 1 3 番目のアスパラギン酸 (D) が  
A A V 結合性タンパク質 A V R 2 9 d (配列番号 2 の 2 5 番目から 2 1 3 番  
目までの領域に相当) であり、2 1 4 番目から 2 1 9 番目のヒスチジン (H  
) がタグ配列である。また配列番号 3 8 において、V 3 1 7 D のアスパラギ  
ン酸は 3 0 番目に、N 3 2 4 H のヒスチジンは 3 7 番目に、V 3 2 6 A のア  
ラニンは 3 9 番目に、N 3 2 9 K のリジンは 4 2 番目に、A 3 3 0 V のバリ  
ンは 4 3 番目に、Q 3 3 4 L のロイシンは 4 7 番目に、E 3 3 5 V のバリ  
ンは 4 8 番目に、T 3 4 1 A のアラニンは 5 4 番目に、Y 3 4 2 S のセリンは  
5 5 番目に、K 3 6 2 E のグルタミン酸は 7 5 番目に、I 3 6 6 F のフェニ  
ルアラニンは 7 9 番目に、K 3 7 1 N のアスパラギンは 8 4 番目に、F 3 7  
9 Y のチロシンは 9 2 番目に、K 3 8 0 R のアルギニンは 9 3 番目に、V 3  
8 1 A のアラニンは 9 4 番目に、I 3 8 2 V のバリンは 9 5 番目に、G 3 9  
0 S のセリンは 1 0 3 番目に、V 3 9 4 A のアラニンは 1 0 7 番目に、K 3  
9 9 E のグルタミン酸は 1 1 2 番目に、E 4 0 1 G のグリシンは 1 1 4 番目  
に、T 4 2 6 A のアラニンは 1 3 9 番目に、K 4 5 5 R のアルギニンは 1 6  
8 番目に、A 4 6 1 P のプロリンは 1 7 4 番目に、K 4 6 7 N のアスパラギ  
ンは 1 8 0 番目に、S 4 7 6 R のアルギニンは 1 8 9 番目に、S 4 8 2 T の  
スレオニンは 1 9 5 番目に、N 4 8 7 D のアスパラギン酸は 2 0 0 番目に、  
N 4 9 2 D のアスパラギン酸は 2 0 5 番目に、V 4 9 9 I のイソロイシンは  
2 1 2 番目に、それぞれ存在する。

[0272] (i) A V R 3 1

本タンパク質は、実施例8で明らかになったアルカリ安定性に関与するアミノ酸置換の中から、K497EおよびV499Iを選択し、当該アミノ酸置換をAVR29b（配列番号36）に導入することで作製した。

[0273] (i-1) AVR29bを含むポリペプチド（配列番号36）を発現可能なベクターpET-AVR29bを鋳型とし、配列番号54（5'-AACGAAGCCATTGACCATCATCATCATCAT-3'）および配列番号55（5'-GTCAATGGCTTCGTTAACGGTCAAGTCTGC-3'）に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとした他は、(a-1)と同様な方法でPCRを行なった。

[0274] (i-2) (i-1)で得られたPCR産物から(a-2)と同様な方法で、天然型AAV結合性タンパク質に対して31箇所アミノ酸置換したAVR31をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド（発現ベクター）pET-AVR31を得た。

[0275] (i-3) pET-AVR31のヌクレオチド配列を実施例2(8)と同様な方法で解析し、確認した。

[0276] シグナル配列およびポリヒスチジンタグを付加したAVR31のアミノ酸配列を配列番号39に示す。なお配列番号39において、1番目のメチオニン(M)から22番目のアラニン(A)までがPelBシグナルペプチドであり、25番目のセリン(S)から213番目のアスパラギン酸(D)がAAV結合性タンパク質AVR31（配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当）であり、214番目から219番目のヒスチジン(H)がタグ配列である。また配列番号39において、G314Dのアスパラギン酸は27番目に、V317Dのアスパラギン酸は30番目に、N324Hのヒスチジンは37番目に、V326Aのアラニンは39番目に、N329Kのリジンは42番目に、A330Vのバリンは43番目に、Q334Lのロイシンは47番目に、E335Vのバリンは48番目に、T341Aのアラニンは54番目に、Y342Sのセリンは55番目に、K362Eのグルタミン酸は75番目に、I366Fのフェニルアラニンは79番目に、K371

Nのアスパラギンは84番目に、F379Yのチロシンは92番目に、K380Rのアルギニンは93番目に、V381Aのアラニンは94番目に、I382Vのバリンは95番目に、G390Sのセリンは103番目に、V394Aのアラニンは107番目に、K399Eのグルタミン酸は112番目に、E401Gのグリシンは114番目に、T426Aのアラニンは139番目に、K455Rのアルギニンは168番目に、A461Pのプロリンは174番目に、K467Nのアスパラギンは180番目に、S476Rのアルギニンは189番目に、S482Tのスレオニンは195番目に、N487Dのアスパラギン酸は200番目に、N492Dのアスパラギン酸は205番目に、K497Eのグルタミン酸は210番目に、V499Iのイソロイシンは212番目に、それぞれ存在する。

[0277] 実施例10 AVR25cアミノ酸置換集積体の調製（その2）

(1) AAV結合性タンパク質を発現可能な形質転換体として、実施例9で取得した9種類のAAV結合性タンパク質（AVR25cアミノ酸置換集積体、具体的にはAVR27b（配列番号31）、AVR27c（配列番号32）、AVR27d（配列番号33）、AVR28（配列番号34）、AVR29a（配列番号35）、AVR29b（配列番号36）、AVR29c（配列番号37）、AVR29d（配列番号38）およびAVR31（配列番号39））、ならびにAVR21（配列番号2）およびAVR25c（配列番号28）のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで大腸菌株BL21（DE3）を形質転換し得られた形質転換体を用いた他は、実施例4（1）から（4）と同様な方法で形質転換体を培養し、菌体を回収した。

[0278] (2) Bugbuster 10X（Novagen社製）を全体の10分の1量に、Benzonase nuclease, Purity>90%（メルク社製）を25U/mLに、それぞれなるよう、20mMのイミダゾールを含む20mMのトリス塩酸緩衝液（pH7.4）（以下、「平衡化液D」とも表記）に混合した。当該混合液を用いて（1）で回収した菌体を

5 mL / 1 g (菌体) となるように懸濁し、15°Cで20分間振とうすることで菌体を破碎した。菌体破碎液は4°Cで20分間、8000 rpmの遠心分離を行ない、各上清を回収した。

[0279] (3) (2) で得られた上清を、あらかじめ平衡化液Dで平衡化した、Ni-NTA Agarose (富士フィルム和光純薬社製) 1.5 mLを充填したオープンカラムにアプライした。平衡化液Aで洗浄後、0.5 Mのイミダゾールを含む20 mMのトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で溶出した。

[0280] (4) (3) で得た各溶出液を、PD MiniTrap G-25 (サイティバ社製) を用いて脱塩することで、AAV結合性タンパク質溶液を調製した。

[0281] 実施例 11 AVR 25 c アミノ酸置換集積体のアルカリ安定性評価 (その1)

実施例 10 で調製した AAV 結合性タンパク質のうち、AVR 25 c (配列番号 28)、AVR 28 (配列番号 34) および AVR 29 a (配列番号 35) を用いてアルカリ安定性の評価を行なった。

[0282] (1) 実施例 10 で調製した AAV 結合性タンパク質溶液の濃度を NanoDrop One C (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) で測定後、タンパク質濃度として 5 µg / mL になるように 20 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した。

[0283] (2) (1) で希釈した各 AAV 結合性タンパク質溶液を、1 mM の塩化カルシウムを含む 1 M の水酸化ナトリウム水溶液と等量混合し、一定温度 / 一定時間静置するアルカリ処理を行なった (処理温度: 30°C、処理時間: 0、30、60分)。

[0284] (3) (2) の処理後の画分に、0.5 M の MES 緩衝液 (pH 6.0) を、8 : 2 の割合で混合することで pH を 6 付近にした後、実施例 2 (6) に記載の ELISA 法にて VLP 2 との結合活性を測定した。

[0285] (4) (3) のアルカリ処理を行なったときの 450 nm の吸光度を、処理時間 0 時間のときの 450 nm の吸光度で除することで、残存活性を算出

した。

[0286] 結果を表10に示す。AVR28（配列番号34）およびAVR29a（配列番号35）はいずれもAVR25c（配列番号28）と比較して残存活性が高く、アルカリに対する安定性が向上していることがわかる。

[0287] [表10]

AAV結合性タンパク質		残存活性[%]		
名称	配列番号	開始時	30分後	60分後
AVR28	34	100	22.5	3.00
AVR29a	35	100	24.2	5.07
AVR25c	28	100	2.87	0.197

[0288] 実施例12 AVR25cアミノ酸置換集積体のアルカリ安定性評価（その2）

実施例10で調製したAAV結合性タンパク質のうち、AVR25c（配列番号28）、AVR27b（配列番号31）、AVR27c（配列番号32）およびAVR27d（配列番号33）を用いてアルカリ安定性の評価を行なった。当該評価は、処理時間を0、30分または45分とした他は実施例11と同様な方法で行なった。

[0289] 結果を表11に示す。AVR27b（配列番号31）、AVR27c（配列番号32）およびAVR27d（配列番号33）はいずれもAVR25c（配列番号28）と比較して残存活性が高く、アルカリに対する安定性が向上していることがわかる。

[0290]

[表11]

AAV結合性タンパク質		残存活性[%]		
名称	配列番号	開始時	30分後	45分後
AVR27b	31	100	17.1	4.54
AVR27c	32	100	13.6	1.73
AVR27d	33	100	15.8	5.11
AVR25c	28	100	5.28	0

[0291] 実施例13 AVR25cアミノ酸置換集積体のアルカリ安定性評価（その3）

実施例10で調製したAVR25cアミノ酸置換集積体のうち、AVR25c（配列番号28）、AVR29b（配列番号36）、AVR29c（配列番号37）およびAVR29d（配列番号38）を用いてアルカリ安定性の評価を行なった。当該評価は、処理時間を0、20分または45分とした他は実施例11と同様な方法で行なった。

[0292] 結果を表12に示す。AVR29b（配列番号36）、AVR29c（配列番号37）およびAVR29d（配列番号38）はいずれもAVR25c（配列番号28）と比較して残存活性が高く、アルカリに対する安定性が向上していることがわかる。

[0293] [表12]

AAV結合性タンパク質		残存活性[%]		
名称	配列番号	開始時	20分後	45分後
AVR29b	36	100	58.7	1.31
AVR29c	37	100	78.7	1.93
AVR29d	38	100	63.0	4.47
AVR25c	28	100	12.1	0

[0294] 実施例14 AVR25cアミノ酸置換集積体のアルカリ安定性評価（そ

の4)

実施例10で調製したAAV結合性タンパク質のうち、AVR28（配列番号34）、AVR29b（配列番号36）、AVR29c（配列番号37）およびAVR29d（配列番号38）を用いてアルカリ安定性の評価を行なった。当該評価は、処理時間を0、20分または60分とした他は実施例11と同様な方法で行なった。

[0295] 結果を表13に示す。AVR29b（配列番号36）、AVR29c（配列番号37）およびAVR29d（配列番号38）はいずれもAVR28（配列番号34）と比較して残存活性が高く、アルカリに対する安定性が向上していることがわかる。

[0296] [表13]

AAV結合性タンパク質		残存活性[%]		
名称	配列番号	開始時	20分後	60分後
AVR29b	36	100	63.7	1.08
AVR29c	37	100	93.2	2.39
AVR29d	38	100	68.6	1.06
AVR28	34	100	42.5	1.22

[0297] 実施例15 AVR25cアミノ酸置換集積体のアルカリ安定性評価（その5）

実施例10で調製したAAV結合性タンパク質のうち、AVR25c（配列番号28）、AVR28（配列番号34）、AVR29c（配列番号37）およびAVR31（配列番号39）を用い、実施例11に記載の方法でアルカリ安定性の評価を行なった。

[0298] 結果を表14に示す。AVR28（配列番号34）、AVR29c（配列番号37）およびAVR31（配列番号39）はいずれもAVR25c（配列番号28）と比較して残存活性が高く、アルカリに対する安定性が向上していることがわかる。

[0299] [表14]

AAV結合性タンパク質		残存活性[%]		
名称	配列番号	開始時	30分後	60分後
AVR28	34	100	42.0	6.29
AVR29c	37	100	57.7	15.7
AVR31	39	100	48.3	10.6
AVR25c	28	100	22.0	2.19

[0300] 実施例16 AVR25cアミノ酸置換集積体のアルカリ安定性評価（その6）

実施例10で調製したAAV結合性タンパク質のうち、AVR21（配列番号2）、AVR25c（配列番号28）およびAVR31（配列番号39）を用い、実施例11に記載の方法でアルカリ安定性の評価を行なった。

[0301] 結果を表15に示す。AVR31（配列番号39）は、AVR21（配列番号2）およびAVR25c（配列番号28）と比較して残存活性が高く、アルカリに対する安定性が向上していることがわかる。

[0302] [表15]

AAV結合性タンパク質		残存活性[%]		
名称	配列番号	開始時	30分後	60分後
AVR25c	28	100	16.3	1.96
AVR31	39	100	53.8	13.3
AVR21	2	100	1.53	0.694

[0303] 実施例17 AAV結合性タンパク質固定化ゲルの作製と評価

（1）分離剤用親水性ビニルポリマー（東ソー社製：トヨパール）の表面のヒドロキシ基に化学修飾を施すことでヨードアセトアミド基を導入したゲルを調製した。前記調製したゲル1.0gに、実施例10で調製したAAV結合性タンパク質として6mgのAVR29c（配列番号37）および還元

剤として終濃度0.3mMのTCEP (Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine) を加え、pH7.4、25℃の条件で3時間振盪することで反応させた。これによりAAV吸着剤である、AVR29cを固定化したゲル (AVR29c固定化ゲルと命名) を調製した。

[0304] (2) (1) で調製したAVR29c固定化ゲル2.0mLを空カラム (φ10mm×50mm、サイティバ社製) に充填し、AAV吸着剤カラムを作製した (以降、「AVR29cカラム」とも表記) 。

[0305] (3) (2) で作製したAVR29cカラムを0.15mMの塩化ナトリウムを含む20mMのトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) (以下、「平衡化液E」とも表記する) で平衡化した。

(4) 実施例5で得られたAAV8-EGFP溶液を前記カラムにアプライし、平衡化液Eで洗浄後、0.15Mの塩化ナトリウムを含む0.1Mの酢酸緩衝液 (pH2.5) 以下、「溶出液B」とも表記する) で溶出し、AAVベクターであるAAV8-EGFP溶液を得た。

[0306] 得られたクロマトグラムを図1に示す。なお図1のうち、黒矢印で示したピークがAAVベクター (AAV8-EGFP) を含む画分のピークに相当する。AAV8-EGFP溶液に含まれる夾雑物のほとんどがAVR29cカラムを素通りしていることから、溶液中に含まれるAAVベクターをAVR29cカラムで精製できることがわかる。

[0307] 実施例18 アフィニティークロマトグラフィと陰イオン交換クロマトグラフィとを組み合わせた精製 (その1)

アフィニティークロマトグラフィ精製後のAAVベクター溶液を陰イオン交換カラムにアプライし、AAVベクターのさらなる精製を試みた。

[0308] (1) 実施例17 (4) で得られたAAVベクター溶液を、20mMのトリス塩酸緩衝液 (pH9.0) (以下、溶液AEX-Aとも表記) で5倍希釈し、陰イオン交換カラムにアプライする試料を調製した。

[0309] (2) あらかじめ溶液AEX-Aで平衡化した、0.5mLのTOYOPEARL GigaCapQ-650S (分離精製用高吸着型陰イオン交換

クロマトグラフィ用担体、東ソー社製)を空カラム( $\phi 5\text{ mm} \times 50\text{ mm}$ 、サイティバ社製)に充填したカラム(以下単に、「G i g a C a p Qカラム」とも表記)に、(1)で調製した試料を $0.1\text{ mL}/\text{min}$ でアプライした。

[0310] (3)  $0.5\text{ mL}/\text{min}$ の溶液AEX-Aを10CV (Column Volume)流すことでG i g a C a p Qカラムを洗浄後、1Mの塩化コリンを含む溶液AEX-A(以下、溶液AEX-Bとも表記)が14.5%となるまでリニアグラジエントをかけ、当該状態(AEX-Bが14.5%の状態)を維持しながら60CV流すことで夾雑物を溶出させた。

[0311] (4) 溶液AEX-Bが35%となるステップグラジエントをかけ、AAVベクター(AAV8-EGFP)を溶出させた。

[0312] 得られたクロマトグラムを図2に示す。なお図2のうち、黒矢印で示したピークがAAVベクター(AAV8-EGFP)を含む画分のピークに相当する。実施例18(4)で得られたAAVベクター溶液中に残存した夾雑物は、陰イオン交換カラムで除去された(図2の白矢印のピークが当該夾雑物に相当)。以上の結果から、AAVベクターを含む溶液を、AAV結合性タンパク質固定化ゲルを用いたアフィニティクロマトグラムで精製後、陰イオン交換クロマトグラフィでさらに精製することで、当該AAVベクターの純度をさらに向上できることがわかる。

[0313] 実施例19 遺伝子を含んだAAVベクターの割合(Full率)の測定  
実施例17(4)で得られた画分(図1の黒矢印のピーク)中、ならびに実施例18(3)(図2の白矢印のピーク)および実施例18(4)(図2の黒矢印のピーク)で得られた画分中に含まれるAAVベクターのうち、遺伝子を含んだAAVベクターの割合(Full率)を以下に示す方法で測定した。

[0314] (1) 各画分を溶液AEX-Aで4倍希釈し、陰イオン交換クロマトグラフィ用カラムであるTSKgel Q-STAT(東ソー社製)にアプライした。

[0315] (2) 7分間で溶液AEX-Bが17.0%となるよう、1mL/minの流速でリニアグラジエントをかけることで、遺伝子を含まない(Empty)AAVベクターを溶出させた。

[0316] (3) 溶液AEX-Bが17.0%の状態を3分間維持後、10分間で溶液AEX-Bが45.0%となるよう、1mL/minの流速でリニアグラジエントをかけることで、遺伝子を含む(Full)AAVベクターを溶出させた。

[0317] (4) (2)で得られた画分(Empty AAVベクターが含有)、および(3)で得られた画分(Full AAVベクターが含有)それぞれの、280nm励起光に対する350nmの蛍光強度に基づくピーク面積を定量し、(2)と(3)それぞれの画分のピーク面積の和に対する、(3)の画分のピーク面積の割合を求めることで、Full AAVベクターの割合(Full率)を算出した。

[0318] Full率を計算した結果、  
実施例17(4)で得られた画分、つまりAVR29cカラムでの精製画分は12.1%であり、  
実施例18(3)で得られた画分、つまりGigaCapQカラムでの洗浄画分は8.5%であり、  
実施例18(4)で得られた画分、つまりGigaCapQカラムでの精製画分は82%であった。

以上の結果から、AAVベクターを含む溶液を、AAV吸着剤を用いたアフィニティークロマトグラフィで精製後、陰イオン交換クロマトグラフィでさらに精製することで、当該AAVベクターの純度向上に加え、Full率(つまり遺伝子を含んだAAVベクターの割合)も向上することがわかる。

[0319] 参考例3 陰イオン交換クロマトグラフィのみでのAAV精製

(1) 実施例5で得られたAAV8-EGFP溶液をTris緩衝液を用いてpH9.0に調製した。

[0320] (2) (1)でpH調製したAAV8-EGFP溶液を、実施例18(2)

) から (4) に記載の方法で G i g a C a p Q カラムによる精製を行なった。

[0321] (3) 得られた各画分 (ピーク) を T S K g e l G 6 0 0 0 P W<sub>xL</sub> (サイズ排除クロマトグラフィ用ゲル、東ソー社製) を充填したカラムで分析した。

[0322] G i g a C a p Q カラムによる精製結果 (クロマトグラム) を図 3 に、得られた各画分の T S K g e l G 6 0 0 0 P W<sub>xL</sub> での分析結果を図 4 に、それぞれ示す。なお図 4 の黒矢印が A A V ベクター (A A V 8 - E G F P) を含む画分のピークに相当する。図 3 のピーク 2 からピーク 4 で A A V ベクターに相当するピークが確認できたものの、夾雑物も多く含まれていることがわかる。以上の結果から、A A V ベクターを含む溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィのみで精製しても、高純度の A A V を得ることが困難なことがわかる。

[0323] 実施例 2 0 シグナルペプチド配列を除去した A A V 結合性タンパク質の調製

(1) A V R 2 9 c (配列番号 3 7) を発現可能なベクターを鋳型とし、配列番号 5 6 (5' - A C A T A T G T C T G C A G G C G A A A G C G A C - 3' ) および配列番号 5 7 (5' - C C T G C A G A C A T A T G T A T A T C T C C T T C - 3' ) に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドを P C R プライマーとした他は実施例 1 0 ( a - 1 ) と同様な方法で P C R を行なった。

[0324] (2) (1) で得られた P C R 産物から実施例 9 ( a - 2 ) と同様な方法で、天然型 A A V 結合性タンパク質に対して 2 9 箇所アミノ酸置換した A V R 2 9 c をコードし、かつその N 末端側にシグナル配列を有さないポリヌクレオチドを含むプラスミド (発現ベクター) p E T - A V R 2 9 c ( - ) を得た。

[0325] (3) p E T - A V R 2 9 c ( - ) のヌクレオチド配列を実施例 2 ( 8 ) と同様な方法で解析し、確認した。

[0326] ポリヒスチジンタグを付加したAVR29c(一)のアミノ酸配列を配列番号58に示す。なお配列番号58において、2番目のセリン(S)から190番目のアスパラギン酸(D)がAAV結合性タンパク質AVR29c(一)(配列番号2の25番目から213番目までの領域に相当)であり、191番目から196番目のヒスチジン(H)がタグ配列である。また配列番号58において、V317Dのアスパラギン酸は7番目に、N324Hのヒスチジンは14番目に、V326Aのアラニンは16番目に、N329Kのリジンは19番目に、A330Vのバリンは20番目に、Q334Lのロイシンは24番目に、E335Vのバリンは25番目に、T341Aのアラニンは31番目に、Y342Sのセリンは32番目に、K362Eのグルタミン酸は52番目に、I366Fのフェニルアラニンは56番目に、K371Nのアスパラギンは61番目に、F379Yのチロシンは69番目に、K380Rのアルギニンは70番目に、V381Aのアラニンは71番目に、I382Vのバリンは72番目に、G390Sのセリンは80番目に、V394Aのアラニンは84番目に、K399Eのグルタミン酸は89番目に、E401Gのグリシンは91番目に、T426Aのアラニンは116番目に、K455Rのアルギニンは145番目に、A461Pのプロリンは151番目に、K467Nのアスパラギンは157番目に、S476Rのアルギニンは166番目に、S482Tのスレオニンは172番目に、N487Dのアスパラギン酸は177番目に、N492Dのアスパラギン酸は182番目に、K497Eのグルタミン酸は187番目に、それぞれ存在する。

[0327] (4)(3)で取得したAAV結合性タンパク質AVR29c(一)(配列番号58)をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで大腸菌株BL21(DE3)を形質転換し得られた形質転換体を用いた他は、実施例4(1)から(4)と同様な方法で形質転換体を培養し、菌体を回収した。

[0328] (5)実施例10の(2)から(4)と同様な方法で回収した菌体からAVR29c(一)溶液を調製した。

[0329] (6)実施例10で調製したAVR29c、および(5)で調製したAV

R29c(-)をSDS-PAGEに供し、CBB(Coomassie Brilliant Blue)染色液(富士フィルム和光純薬社製)を用いて染色した。

[0330] 得られた結果を図5に示す。AVR29c(-)(配列番号58、レーン2)ではAVR29c+Hisタグがメインバンドとして観測されたのに対して、AVR29c(配列番号37、レーン3)ではシグナルペプチドPEIBが残存したAVR29c+Hisタグと、前記PEIBが切断されたAVR29c+Hisタグが混在しており、均質性が低いことがわかる。

[0331] 実施例21 AAV結合性タンパク質の性能評価

実施例10で調製したAVR29c(配列番号37)および実施例20(配列番号58)で調製したAVR29c(-)を用いてAAVとの結合性評価を行なった。

[0332] (1) 実施例1で調製したVLP2を実施例2(6-1)記載の方法で96穴マイクロプレート(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)のwellに固定化しブロッキングした。

[0333] (2) 実施例2(6-2)記載の洗浄緩衝液でwellを洗浄後、AVR29cまたはAVR29c(-)を含む溶液をwellに添加し、VLP2と反応させた(30℃で1時間)

(3) 反応終了後、(2)で添加した溶液と同量の溶出緩衝液(0.5Mの塩化ナトリウムを含む200mMの酢酸緩衝液(pH3.0もしくはpH2.0)、または20mMのTris塩酸緩衝液(pH7.4)を添加し、25℃で10分反応させた。

[0334] (4) 反応終了後、well内の溶液を除去し、実施例2(6-2)記載の洗浄緩衝液で洗浄後、100ng/mLに希釈したAnti-6His抗体(Bethyl Laboratories社製)を100μL/wellで添加した。

[0335] (5) 実施例2(6-4)と同様な方法で反応および吸光度測定を行なった。(3)で溶出緩衝液を添加して反応させた後のwellの吸光度を、T

Tris塩酸緩衝液を添加して反応させた後のwellの吸光度で除することで、AAV結合性タンパク質のwellへの残存率を算出した。

[0336] 測定結果を図6に示す。溶出緩衝液（酢酸緩衝液）添加後のAAV結合性タンパク質のwellへの残存率は、AVR29c（配列番号37）よりもAVR29c（-）（配列番号58）のほうが低く、AVR29c（-）のほうが、wellに固定化していたVLP2から効率的に解離していた。図5（実施例20）に示す通り、AVR29c（-）（配列番号58）はAVR29c（配列番号37）よりもAAV結合性タンパク質としての均質性が高い。そのため当該均質性の高さが、溶出緩衝液添加によるAAVの効率的解離を実現していると推測される。

[0337] 実施例22 AAV結合性タンパク質固定化ゲルの作製と性能評価

（1）実施例13（1）と同様な方法で、分離剤用親水性ビニルポリマーに実施例22で調製したAVR29c（-）を固定化したゲル（AVR29c（-）固定化ゲルと命名）を調製した。

[0338] （2）0.2 $\mu$ mコスモスピンフィルター（ナカライテスク社製）に実施例13（1）で調製したAVR29c固定化ゲル、および（1）で調製したAVR29c（-）固定化ゲルをそれぞれ10mg程度添加し、実施例5で調製したAAV8-EGFP溶液を $9.7 \times 10^{12}$ cpとなるよう添加後、25 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌することで、前記固定化ゲルにAAV8-EGFPを吸着させた。

[0339] （3）遠心分離操作により固定化ゲルからAAV8-EGFP溶液を除去後、洗浄液（0.5Mの塩化ナトリウム、0.5mMの塩化カルシウムを含む20mMのTris塩酸緩衝液（pH7.4））を100 $\mu$ L添加し、25 $^{\circ}$ Cで3分攪拌することでゲルの洗浄を行なった。

[0340] （4）遠心分離操作により固定化ゲルから（3）の洗浄液を分離して除去後、溶出液A（0.5Mの塩化ナトリウムを含む0.1Mの酢酸緩衝液（pH3.0））を100 $\mu$ L添加し、25 $^{\circ}$ Cで3分攪拌した。攪拌後、遠心分離操作により固定化ゲルから溶出液Aを分離することで固定化ゲルに吸着し

ていたAAV8の溶出を行なった。本操作はもう一度行ない、溶出した画分2回分を合わせて「画分A」とした。

[0341] (5) 溶出液B (0.5 Mの塩化ナトリウムを含む0.1 Mの酢酸 (pH 2.5)) を100  $\mu$ L添加し、25°Cで3分攪拌した。攪拌後、遠心分離操作により固定化ゲルから溶出液Bを分離することで固定化ゲルに残存していたAAV8の溶出を行なった。本操作はもう一度行ない、溶出した画分2回分を合わせて「画分B」とした。

[0342] (6) 溶出液C (0.5 Mの塩化ナトリウムを含む0.1 Mの酢酸 (pH 2.0)) を100  $\mu$ L添加し、25°Cで3分攪拌した。攪拌後、遠心分離操作により固定化ゲルから溶出液Cを分離することで固定化ゲルに残存していたAAV8の溶出を行なった。本操作はもう一度行ない、溶出した画分2回分を合わせて「画分C」とした。

[0343] (7) 超高速液体クロマトグラフNexera (島津製作所社製) にサイズ排除クロマトグラフィ用カラムTSK gel G6000PW (東ソー社製) を接続し、溶離液A (0.5 Mの塩化ナトリウム、0.01% (w/v) のTween 20 (Sigma-Aldrich社製)、0.01% (w/v) のPluronic F-68 (Sigma-Aldrich社製) を含む50 mMの酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)) で平衡化した。

[0344] (8) 既知濃度のAAV8-EGFP、ならびに(4)で取得した画分A、(5)で取得した画分B、および(6)で取得した画分Cを、それぞれ(7)で平衡化したカラムにアプライし、流速1 mL/minで送液することで、各サンプルのAAV8-EGFP由来の分離ピークを得た。分離ピークは蛍光強度 (280 nm励起/350 nm発光) で検出した。

[0345] (9) 既知濃度のAAV8-EGFPで得られた分離ピークの面積に基づき、画分A、BおよびCに含まれているAAV8濃度をそれぞれ定量した。

[0346] 得られた結果を図7に示す。AVR29c固定化ゲルでは画分C (pH 2.0) において最もAAV8濃度が高いが、AVR29c (-) 固定化ゲルでは画分B (pH 2.5) において最もAAV8濃度が高かった。図5 (実

施例20)に示す通り、固定化ゲルのリガンドとして用いているAVR29c(-)(配列番号58)はAVR29c(配列番号37)よりもAAV結合性タンパク質としての均質性が高い。そのため当該均質性の高さが、より温和な条件でのAAV溶出を実現していると推測される。

[0347] 実施例23 アフィニティクロマトグラフィと陰イオン交換クロマトグラフィとを組み合わせた精製(その2)

(1) 実施例17で作製したAVR29cカラムを500mmol/Lの塩化ナトリウムを含む20mmol/Lのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)(以下、「平衡化液D」とも表記する)で平衡化した。

[0348] (2) 実施例5で得られたAAV8-EGFP溶液をAVR29cカラムにアプライし、平衡化液Dで洗浄後、2.0mol/Lの塩化マグネシウムを含む20mmol/Lのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で溶出し、AAVベクターであるAAV8-EGFP溶液を得た。

[0349] (3) (2)で得られたAAVベクター(AAV8-EGFP)溶液を、100倍量の溶液AEX-Aで透析し、陰イオン交換カラムにアプライする試料を調製した。

[0350] (4) あらかじめ溶液AEX-Aで平衡化した、1.0mLのSkill Pak TOYOPEARL GigaCapQ-650S(分離精製用高吸着型陰イオン交換クロマトグラフィ用担体プレパックドカラム、東ソー社製、以下単に、「Skill Pak GigaCapQカラム」とも表記)に、(3)で調製したAAV8-EGFP溶液を0.1mL/minでアプライした。

[0351] (5) 0.5mL/minの溶液AEX-Aを2CV流すことでSkill Pak GigaCapQカラムを洗浄後、溶液AEX-Aおよび300mmol/Lの塩化コリンを含む20mmol/Lのトリス塩酸緩衝液(pH9.0)(以下、「溶液AEX-C」とも表記)の混合比率を調節することで溶液の導電率を変更し、カラムに吸着している夾雑物を溶出させた。具体的には、溶液AEX-Cの比率が、

(a) 49.0% (導電率: 13.3 mS/cm (ミリジーメンズ毎センチメートル))、  
(b) 48.0% (導電率: 13.0 mS/cm)、  
(c) 47.0% (導電率: 12.8 mS/cm) および  
(d) 46.5% (導電率: 12.7 mS/cm) のいずれかとなるよう混合比率を調節し、当該状態を維持しながら30CVから60CV流すことで夾雑物を溶出させた。

[0352] (6) 溶液AEX-Cが100% (導電率: 24.5 mS/cm) となるステップグラジエントをかけ、AAVベクター (AAV8-EGFP) を溶出させた。

[0353] (7) (5) および (6) で得られた溶出画分の中に含まれるFull AAVの割合を、それぞれRefeyn Two (レフェイン社製) を用いたMass Photometry法により測定した。

[0354] 得られたクロマトグラムを図8に示す。また (5) (図8の白矢印のピーク) および (6) (図8の黒矢印のピーク) で得られた溶出画分中に含まれるAAVベクターのFull率を測定した結果を表16に示す。夾雑物を溶出させる際に用いる溶出液の導電率を13.5 mS/cm以下とし、AAVベクターを溶出させる際に用いる溶出液の導電率を15.0 mS/cm以上とすると、よりFull率の高いAAVベクターを含む溶液が得られることがわかる。

[0355]

[表16]

	(a)	(b)	(c)	(d)
実施例23 (5)で用いた溶出液				
AEX-C[%]	49.0	48.0	47.0	46.5
導電率[mS/cm]	13.3	13.0	12.8	12.7
実施例23 (6)で用いた溶出液				
AEX-C[%]	100	100	100	100
導電率[mS/cm]	24.5	24.5	24.5	24.5
溶出画分中に含まれるAAVベクターのFull率[%]				
実施例23(5) (図8の白矢印)	3.5	1.5	5.7	4.4
実施例23(6) (図8の黒矢印)	59.7	76.7	74.9	76.7

[0356] 実施例24 アフィニティークロマトグラフィと陰イオン交換クロマトグラフィとを組み合わせた精製（その3）

(1) 実施例5で得られたAAV8-EGFP溶液を、実施例23(1)から(3)に記載の方法でAVR29cカラムによる精製を行ない、陰イオン交換カラムにアプライする試料（AAV8-EGFP溶液）を調製した。

[0357] (2) あらかじめ溶液AEX-Aで平衡化した、5.0mLのSkill Pak GigaCapQカラムに、(1)で調製したAAV8-EGFP溶液を0.1mL/minでアプライした。

[0358] (3) 0.5mL/minの溶液AEX-Aを2CV流すことでSkill Pak GigaCapQカラムを洗浄後、溶液AEX-Cの比率が46.0%（導電率：12.5mS/cm）となるよう混合比率を調節し、当該状態を維持しながら20CV流すことで夾雑物を溶出させた。

[0359] (4) 溶液AEX-Cが100%（導電率：24.5mS/cm）となるステップグラジエントをかけ、AAVベクター（AAV8-EGFP）を溶

出させた。

[0360] (5) (1) で得られたAAV8-EGFP溶液、ならびに(3)および(4)で得られた溶出画分の中に含まれるFull率を、それぞれRefeyn Two (レフェイン社製)を用いたMass Photometry法により測定した。

[0361] アフィニティークロマトグラフィ(AF)精製(AVR29cカラムによる精製)で得られたクロマトグラムを図9(a)に、陰イオン交換クロマトグラフィ(AEX)精製(Skippy Pak GigaCapQカラムによる精製)で得られたクロマトグラムを図9(b)に、それぞれ示す。また(1)で得られたAAV8-EGFP溶液(図9(a)の黒矢印に示すピーク、AF精製画分)、(3)(図9(b)の白矢印に示すピーク、Fr18)および(4)(図9(b)の黒矢印に示すピーク、Fr38)で得られた溶出画分中に含まれるAAVベクターのFull率を測定した結果を表17に示す。Skippy Pak GigaCapQカラムの容量を1.0mL(実施例23)から5.0mLに大型化しても、本開示の精製方法でFull率の高いAAVベクターを含む溶液が得られることがわかる。

[0362] [表17]

	Full率[%]
AF精製画分	35.1
AEX精製Fr18	0.7
AEX精製Fr38	67.8

[0363] 実施例25 陰イオン交換クロマトグラフィ精製後の感染能評価

実施例24(1)で得られたAF精製画分、実施例24(3)で得られたFr18、および実施例24(4)で得られたFr38を、それぞれ1mmol/Lの塩化マグネシウムを含むPBS(Phosphate Buffered Saline)で透析後、AAV-HT1080細胞(アジレント・テクノロジー社製)に1細胞あた

り62500粒子から $10^6$ 粒子感染させた。

- [0364] 1細胞当たりの粒子数は、サイズ排除クロマトグラフィカラム (G6000PW<sub>XL</sub>カラム) により、検量線を引くことで、調製した。
- [0365] 3日間、5%CO<sub>2</sub>中で、37℃で培養した後、細胞を回収した。溶液をピペットで数回懸濁後、Guava easyCyte (ルミネックス社製) を用いて、各細胞で発現されたEGFP由来の蛍光強度を計測した。AAV感染溶液を添加していない細胞と比較して蛍光強度が増強した細胞の割合を計測することで、前記AAV8変異体ベクターに感染した細胞の割合 (感染率) を算出した。
- [0366] 感染3日後の陽性率を比較した結果を図10に示す。
- [0367] なおX軸に示す感染量を、図10(a)では1細胞当たりの粒子数で、図10(b)では実施例10(5)で測定したFull率に基づき算出した1細胞当たりのベクターゲノム(VG)数で、それぞれ表している。図10(b)は、実施例24(3)で得られたFr18中の粒子を細胞に感染させた結果は、範囲外のため含んでいない。
- [0368] 1細胞当たりのベクターゲノム数は、qPCRにより測定した。PCR装置は、QuantStudio3リアルタイムPCRシステム (サーモフィッシャー社製)、前処理として、AAVpro Titration Kit (タカラバイオ社製) に付属の試薬を使用し、プロトコールに従ってDNaseI処理を行い、一部をPCRにて検出した。PCR試薬は、TaqPath qPCR Master Mix (サーモフィッシャー社製)、プライマーは配列番号59 (CTCCATCACTAGGGGTTC) および60 (TTGGGATTCCAGGCATGC) を使用した。プローブには、配列番号61 (TCCCTTCCCTGTCCTT) にFAMを付与したTaqManプローブを使用した。得られた溶液中のベクター濃度は、AAVpro Titration Kit (タカラバイオ社製) に付属の陽性標準から検量線を作成した。
- [0369] 陽性率は、Fr38 (黒丸)、AF精製画分 (黒三角)、Fr18 (白丸

、図7(b)では範囲外のため図示せず)の順と、実施例24(5)で測定したFull率の順に対応した結果となった。以上の結果から、本開示の精製方法において、陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着したAAVの溶出液に塩化コリンを含ませると、Full AAVを高純度かつ感染能を有した状態で精製できることがわかる。

### 産業上の利用可能性

[0370] 一態様において、本開示のアデノ随伴ウイルス(AAV)結合性タンパク質は、K1AA0319L(UniProt No. Q81ZA0)の細胞外領域ドメイン1(PKD1)およびドメイン2(PKD2)に相当する領域中の特定位置におけるアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したタンパク質である。本開示のAAV結合性タンパク質は、従来のAAV結合性タンパク質よりも耐アルカリ性が著しく向上し得る。したがって、AAV結合性タンパク質をリガンドとしたAAVの吸着剤は、アルカリ洗浄が可能であり、AAVの精製に繰返し利用可能であるため、AAVの工業的製造に有用であると考えられる。

[0371] 一態様において、本開示は、不溶性担体と当該担体に固定化したAAV結合性タンパク質とを含む吸着剤にAAVを含む試料を添加し当該AAVを前記吸着剤に吸着させる工程と、前記吸着剤に吸着したAAVを溶出液を用いて溶出させる工程と、陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に前記溶出工程で溶出したAAVを含む画分を添加し当該AAVを前記担体に吸着させる工程と、前記担体に吸着したAAVを溶出液を用いて溶出させる工程とを含む方法で、前記試料中に含まれるAAVを精製することを特徴とする。試料中に含まれるAAVベクターのうち、治療効果のある、遺伝子を含むAAVベクター(Full AAVベクター)を高純度かつ簡便に精製できるという効果を奏し得る。

## 請求の範囲

[請求項1] 以下の (i) から (i i i) のいずれかから選択される A A V 結合性タンパク質：

(i) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち 2 5 番目のセリンから 2 1 3 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該 2 5 番目から 2 1 3 番目までのアミノ酸残基において以下の (1) から (7 4) のうち少なくともいずれか 1 つのアミノ酸置換が生じ、かつ A A V 結合活性を有する A A V 結合性タンパク質；

(1) 配列番号 2 の 1 3 9 番目のスレオニンがアラニンに置換

(2) 配列番号 2 の 3 2 番目のイソロイシンがアスパラギンに置換

(3) 配列番号 2 の 3 4 番目のロイシンがグルタミンに置換

(4) 配列番号 2 の 4 1 番目のロイシンがプロリンに置換

(5) 配列番号 2 の 4 2 番目のアスパラギンがリジンまたはセリンに置換

(6) 配列番号 2 の 4 5 番目のバリンがアラニンに置換

(7) 配列番号 2 の 4 8 番目のバリンがアラニンに置換

(8) 配列番号 2 の 5 1 番目のリジンがアルギニンに置換

(9) 配列番号 2 の 5 3 番目のグルタミン酸がグリシンに置換

(1 0) 配列番号 2 の 5 6 番目のスレオニンがアラニンまたはセリンに置換

(1 1) 配列番号 2 の 5 7 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換

(1 2) 配列番号 2 の 5 8 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換

(1 3) 配列番号 2 の 6 0 番目のグルタミンがリジンに置換

(1 4) 配列番号 2 の 6 3 番目のスレオニンがアラニンに置換

(1 5) 配列番号 2 の 7 3 番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換

(1 6) 配列番号 2 の 7 8 番目のグルタミンがアルギニンに置換

(1 7) 配列番号 2 の 7 9 番目のイソロイシンがフェニルアラニンに

## 置換

- (18) 配列番号2の80番目のロイシンがプロリンに置換
- (19) 配列番号2の81番目のリジンがアルギニンに置換
- (20) 配列番号2の82番目のロイシンがセリンに置換
- (21) 配列番号2の84番目のアスパラギンがアスパラギン酸またはセリンに置換
- (22) 配列番号2の89番目のロイシンがプロリンに置換
- (23) 配列番号2の90番目のチロシンがフェニルアラニンまたはアスパラギンに置換
- (24) 配列番号2の91番目のグルタミン酸がグリシンに置換
- (25) 配列番号2の92番目のチロシンがセリンに置換
- (26) 配列番号2の94番目のアラニンがスレオニンに置換
- (27) 配列番号2の95番目のバリンがイソロイシンに置換
- (28) 配列番号2の97番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- (29) 配列番号2の102番目のヒスチジンがアルギニンに置換
- (30) 配列番号2の107番目のバリンがアラニンまたはイソロイシンに置換
- (31) 配列番号2の109番目のバリンがグルタミン酸に置換
- (32) 配列番号2の110番目のスレオニンがアラニンまたはセリンに置換
- (33) 配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換
- (34) 配列番号2の115番目のプロリンがセリンに置換
- (35) 配列番号2の125番目のバリンがアラニンに置換
- (36) 配列番号2の148番目のアスパラギン酸がアラニンに置換
- (37) 配列番号2の166番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換
- (38) 配列番号2の167番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換

## 置換

- (39) 配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換
- (40) 配列番号2の179番目のセリンがスレオニンに置換
- (41) 配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換
- (42) 配列番号2の185番目のアスパラギンがリジンに置換
- (43) 配列番号2の210番目のリジンがグルタミン酸に置換
- (44) 配列番号2の213番目のアスパラギン酸がアスパラギンに

## 置換

- (45) 配列番号2の27番目のグリシンがアスパラギン酸に置換
- (46) 配列番号2の30番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
- (47) 配列番号2の31番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (48) 配列番号2の35番目のプロリンがアラニンに置換
- (49) 配列番号2の38番目のグルタミン酸がバリンに置換
- (50) 配列番号2の60番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (51) 配列番号2の75番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置

## 換

- (52) 配列番号2の76番目のヒスチジンがプロリンに置換
- (53) 配列番号2の92番目のチロシンがアスパラギンに置換
- (54) 配列番号2の105番目のグリシンがグルタミン酸に置換
- (55) 配列番号2の111番目のバリンがアラニンに置換
- (56) 配列番号2の112番目のグルタミン酸がリジンに置換
- (57) 配列番号2の119番目のアルギニンがヒスチジンに置換
- (58) 配列番号2の128番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (59) 配列番号2の129番目のフェニルアラニンがロイシンに置

## 換

- (60) 配列番号2の134番目のロイシンがプロリンに置換
- (61) 配列番号2の146番目のセリンがグリシンに置換
- (62) 配列番号2の147番目のスレオニンがセリンに置換

- (63) 配列番号2の150番目のアスパラギン酸がバリンに置換
- (64) 配列番号2の158番目のグルタミン酸がリジンに置換
- (65) 配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換
- (66) 配列番号2の170番目のセリンがアルギニンに置換
- (67) 配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換
- (68) 配列番号2の191番目のスレオニンがイソロイシンに置換
- (69) 配列番号2の198番目のアラニンがバリンに置換
- (70) 配列番号2の199番目のスレオニンがアラニンに置換
- (71) 配列番号2の206番目のロイシンがメチオニンに置換
- (72) 配列番号2の209番目のアスパラギンがグルタミン酸に置換
- (73) 配列番号2の212番目のバリンがイソロイシンに置換
- (74) 配列番号2の213番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
- (i i) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該25番目から213番目までのアミノ酸残基において前記(1)から(74)のうち少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が生じており、さらに前記(1)から(74)に示すアミノ酸置換以外に1もしくは数個の位置での1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および付加のうち、いずれか1つ以上さらに生じ、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質；
- (i i i) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸配列において、前記(1)から(74)のうち少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が生じたアミノ酸配列全体に対して70%以上の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が残存したアミノ酸配列を含み、かつAAV結合活性を有するAAV結合性タンパク質。

[請求項2] 以下の (i v) から (v i) のいずれかから選択される、請求項 1 に記載の A A V 結合性タンパク質：

(i v) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち 25 番目のセリンから 213 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該 25 番目から 213 番目までのアミノ酸残基において以下の (1) のアミノ酸置換が少なくとも生じ、かつ A A V 結合活性を有する A A V 結合性タンパク質；

(1) 配列番号 2 の 139 番目のスレオニンがアラニンに置換

(v) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち 25 番目のセリンから 213 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該 25 番目から 213 番目までのアミノ酸残基において前記

(1) のアミノ酸置換が少なくとも生じており、さらに前記 (1) に示すアミノ酸置換以外に 1 もしくは数個の位置での 1 もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および付加のうち、いずれか 1 つ以上さらに生じ、かつ A A V 結合活性を有する A A V 結合性タンパク質；

(v i) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち 25 番目のセリンから 213 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸配列において、前記 (1) のアミノ酸置換が少なくとも生じたアミノ酸配列全体に対して 70% 以上の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記少なくともいずれか 1 つのアミノ酸置換が残存したアミノ酸配列を含み、かつ A A V 結合活性を有する A A V 結合性タンパク質。

[請求項3] 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のうち 25 番目のセリンから 213 番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該 25 番目から 213 番目までのアミノ酸残基において、以下の (A) から (P) のいずれかに示すアミノ酸置換が少なくとも生じ、かつ A A V 結合活性を有する、請求項 1 に記載の A A V 結合性タンパク質；

(A) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、かつ配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換

(B) 配列番号2の51番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、かつ配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換

(C) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、かつ配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換

(D) 配列番号2の51番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、かつ配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換

(E) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の51番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、かつ配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換

(F) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、かつ配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換

(G) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の174

番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換

(H) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換

(I) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換

(J) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、かつ配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換

(K) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の11

4番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の187番目のスレオニンがアルギニンに置換

(L) 配列番号2の27番目のグリシンがアスパラギン酸に置換し、配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、かつ配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換

(M) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の210番目のリジンがグルタミン酸に置換

(N) 配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジン

がアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、かつ配列番号2の212番目のバリンがイソロイシンに置換  
(O) 配列番号2の27番目のグリシンがアスパラギン酸に置換し、配列番号2の42番目のアスパラギンがリジンに置換し、配列番号2の79番目のイソロイシンがフェニルアラニンに置換し、配列番号2の107番目のバリンがアラニンに置換し、配列番号2の114番目のグルタミン酸がグリシンに置換し、配列番号2の139番目のスレオニンがアラニンに置換し、配列番号2の168番目のリジンがアルギニンに置換し、配列番号2の174番目のアラニンがプロリンに置換し、配列番号2の180番目のグルタミンがアスパラギンに置換し、配列番号2の210番目のリジンがグルタミン酸に置換し、かつ配列番号2の212番目のバリンがイソロイシンに置換

- [請求項4] 請求項1から3のいずれかのに記載のAAV結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項5] 請求項4に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- [請求項6] 請求項5に記載の発現ベクターで大腸菌を形質転換して得られる形質転換体。
- [請求項7] 請求項6に記載の形質転換体を培養することによりAAV結合性タンパク質を発現させる工程と、得られた培養物から発現されたAAV結合性タンパク質を回収する工程とを含む、AAV結合性タンパク質の製造方法。
- [請求項8] 不溶性担体と、当該担体に固定化した請求項1から3のいずれかに記載のAAV結合性タンパク質とを含む、AAV吸着剤。
- [請求項9] 請求項8に記載のAAV吸着剤を含むカラム。
- [請求項10] 請求項9に記載のカラムにAAVを含む溶液を添加して当該AAVを前記吸着剤に吸着させる工程と、前記吸着剤に吸着したAAVを溶出液を用いて溶出させる工程とを含む、AAVの精製または分析方法

。

[請求項11] A A Vを溶出させる工程後のA A V吸着剤をアルカリ溶液により洗浄する工程をさらに含む、請求項10に記載のA A Vの精製または分析方法。

[請求項12] 試料中に含まれるA A Vの精製方法であって、  
不溶性担体と前記不溶性担体に固定化したA A V結合性タンパク質とを含む吸着剤にA A Vを含む試料を添加し前記A A Vを前記吸着剤に吸着させる工程と、  
前記吸着剤に吸着したA A Vを溶出させる工程と、  
陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に前記溶出工程で溶出したA A Vを含む画分を添加し前記A A Vを前記陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着させる工程と、  
前記陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着したA A Vを溶出させる工程とを含む、  
精製方法。

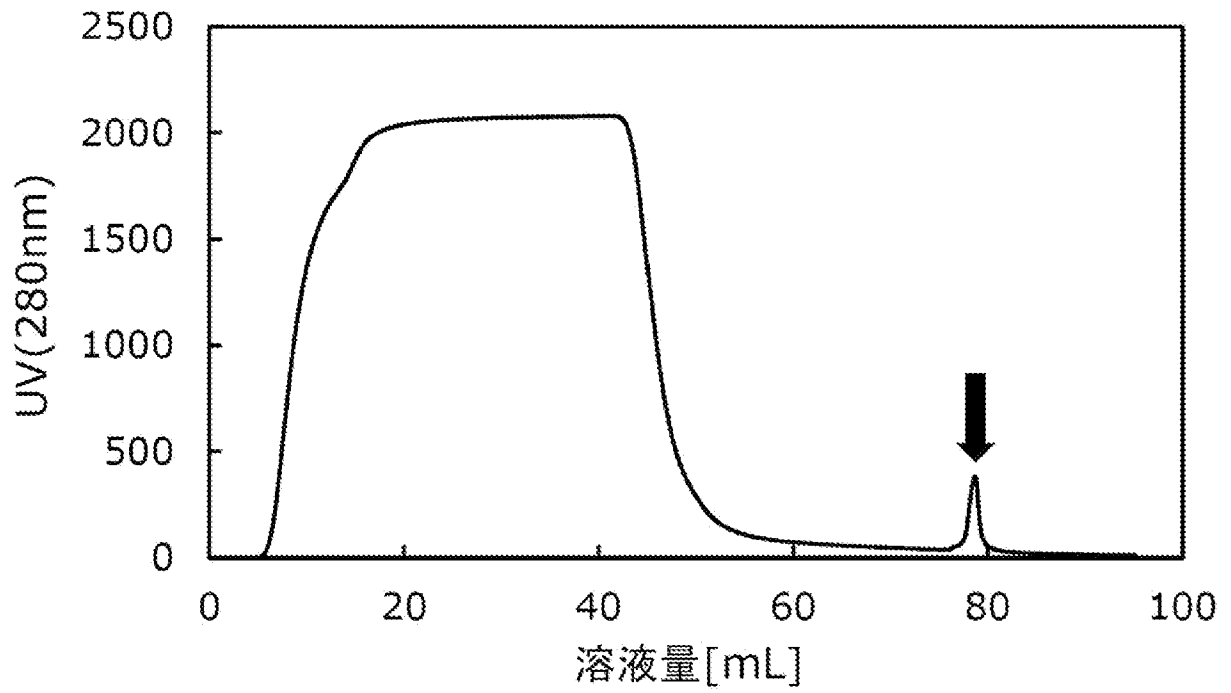
[請求項13] 試料中に含まれるA A Vの精製方法であって、  
不溶性担体と前記不溶性担体に固定化したA A V結合性タンパク質とを含む吸着剤にA A Vを含む試料を添加し前記A A Vを前記吸着剤に吸着させる工程と、  
前記吸着剤に吸着したA A Vを溶出させる工程と、  
陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に前記溶出工程で溶出したA A Vを含む画分を添加し前記A A Vを前記陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着させる工程と、  
前記陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着したA A Vを溶出させる工程とを含み、  
前記A A V結合性タンパク質が請求項1から3のいずれかに記載のA A V結合性タンパク質である、精製方法。

[請求項14] 陰イオン交換クロマトグラフィ用担体に吸着したA A Vを溶出させ

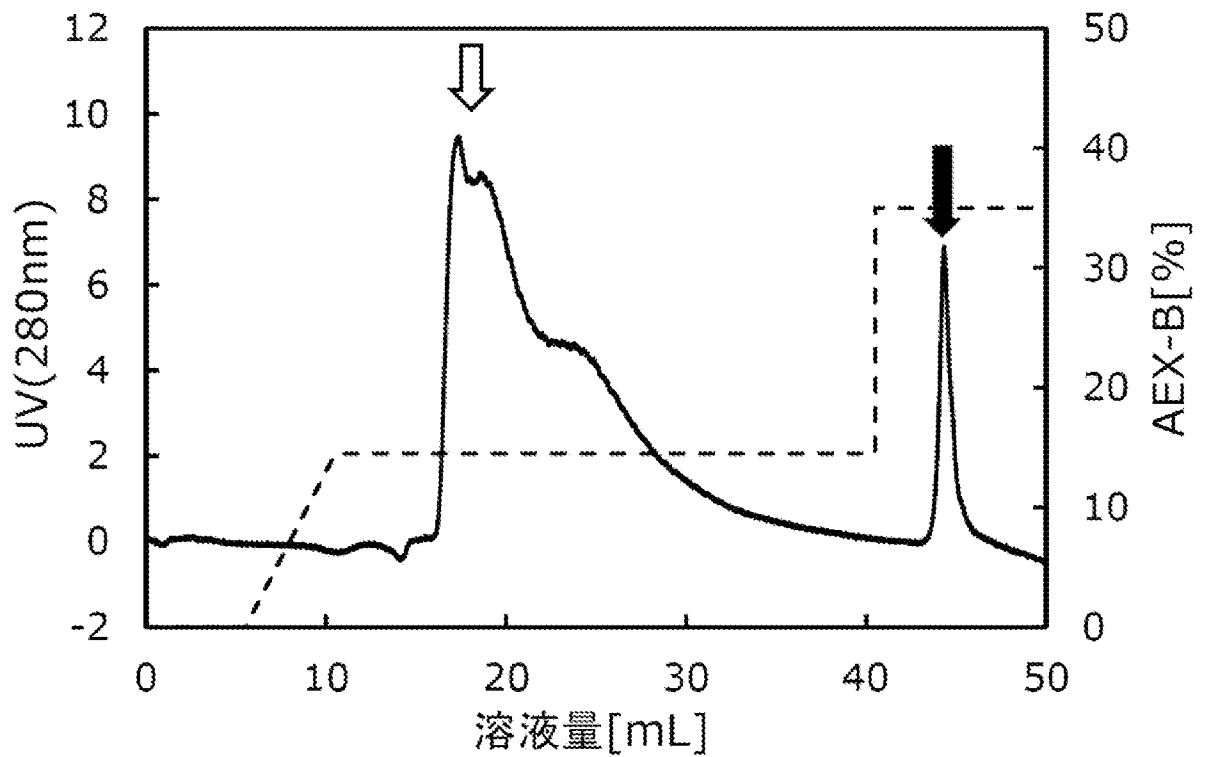
る工程が、前記担体に吸着したAAVを導電率13.5 mS/cm以下の溶出液を用いて溶出後、前記担体に残存したAAVを導電率15.0 mS/cm以上の溶出液を用いて溶出させる工程である、請求項12または13に記載の精製方法。

[請求項15] 溶出液に塩化コリンを含む、請求項14に記載の精製方法。

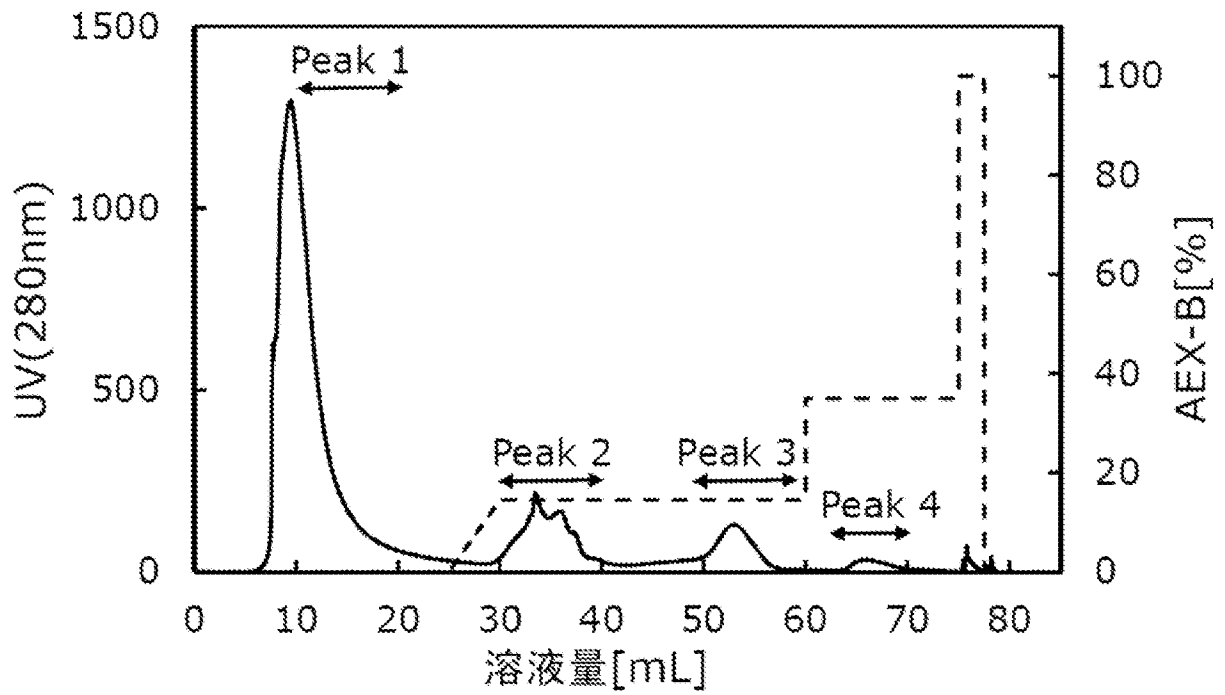
[図1]



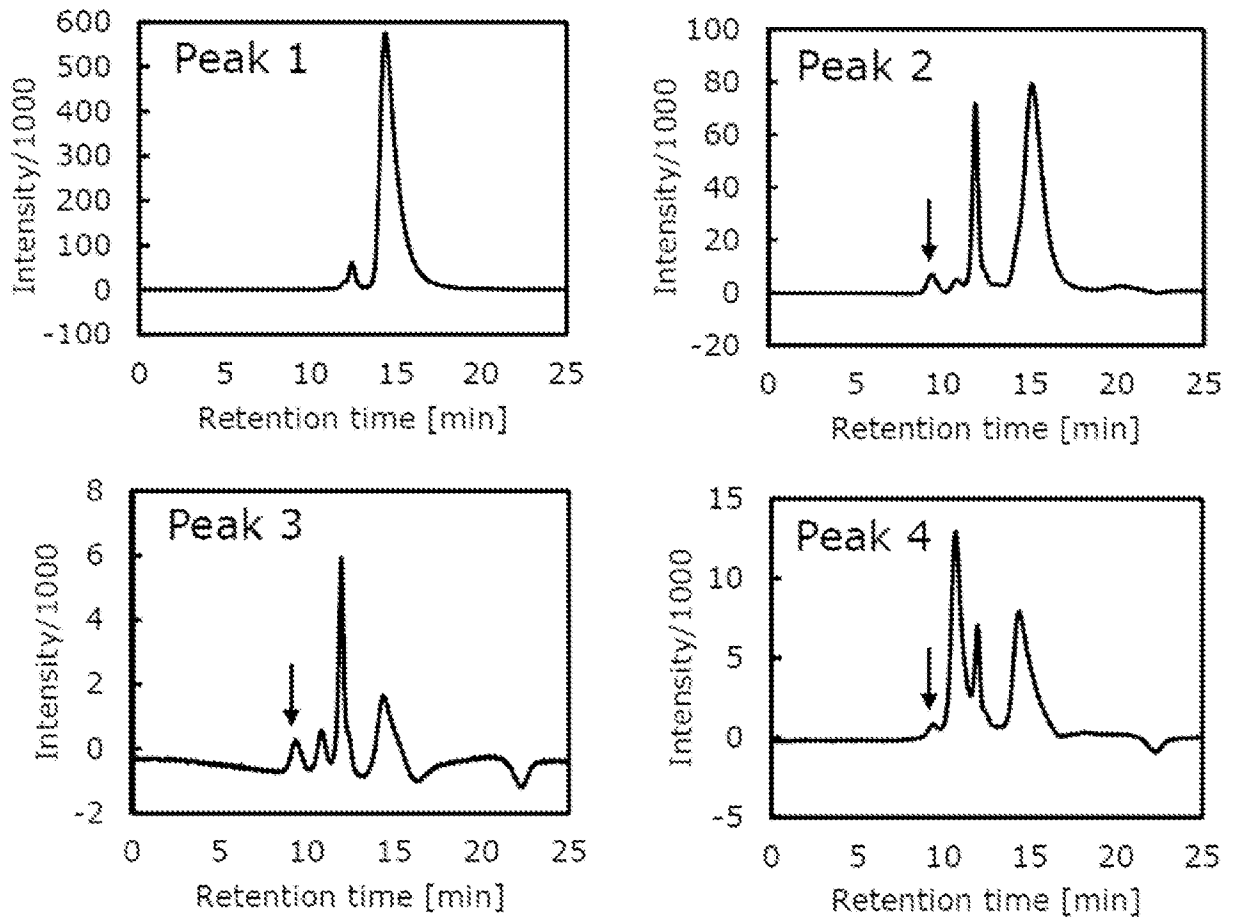
[図2]



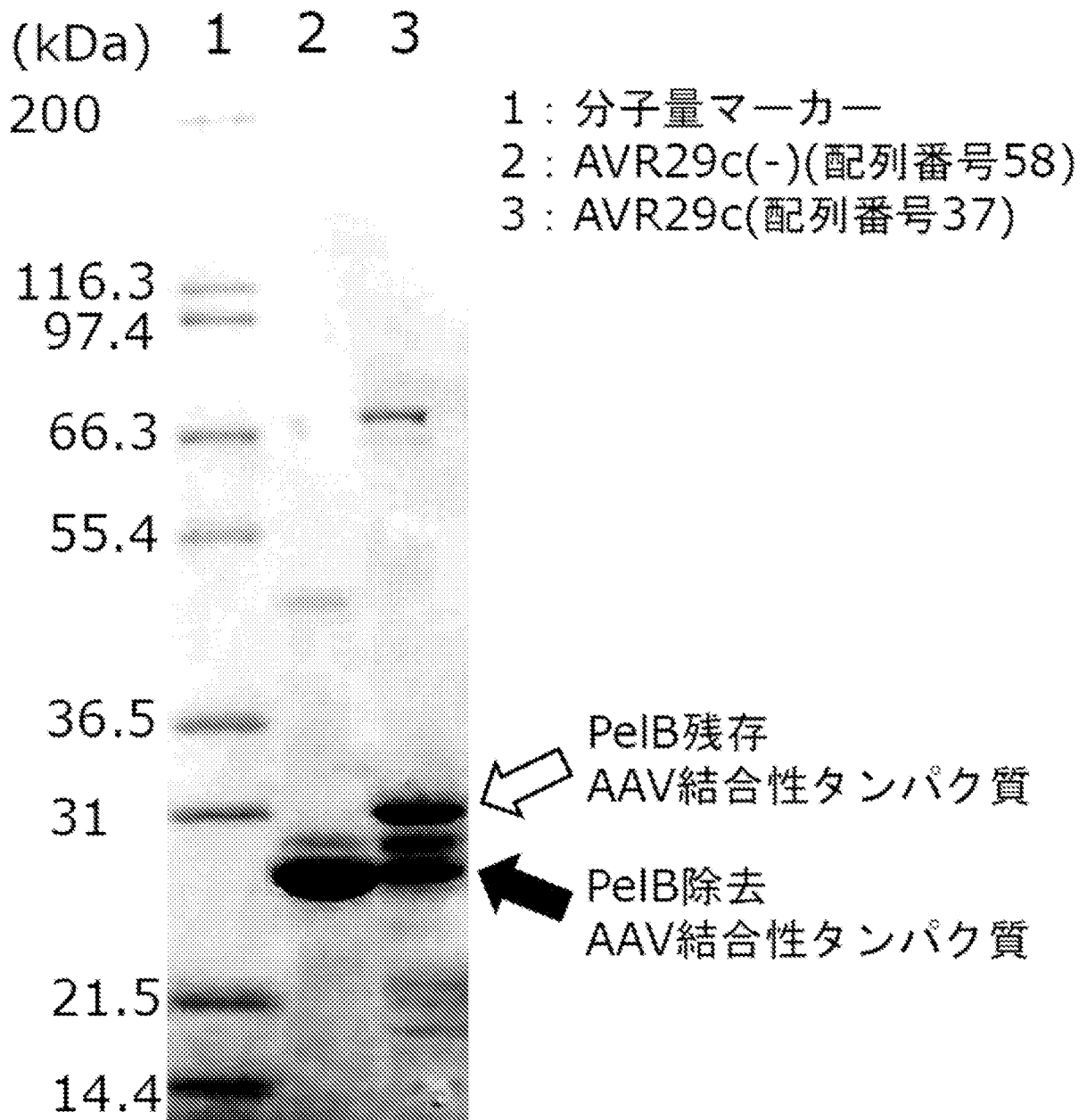
[図3]



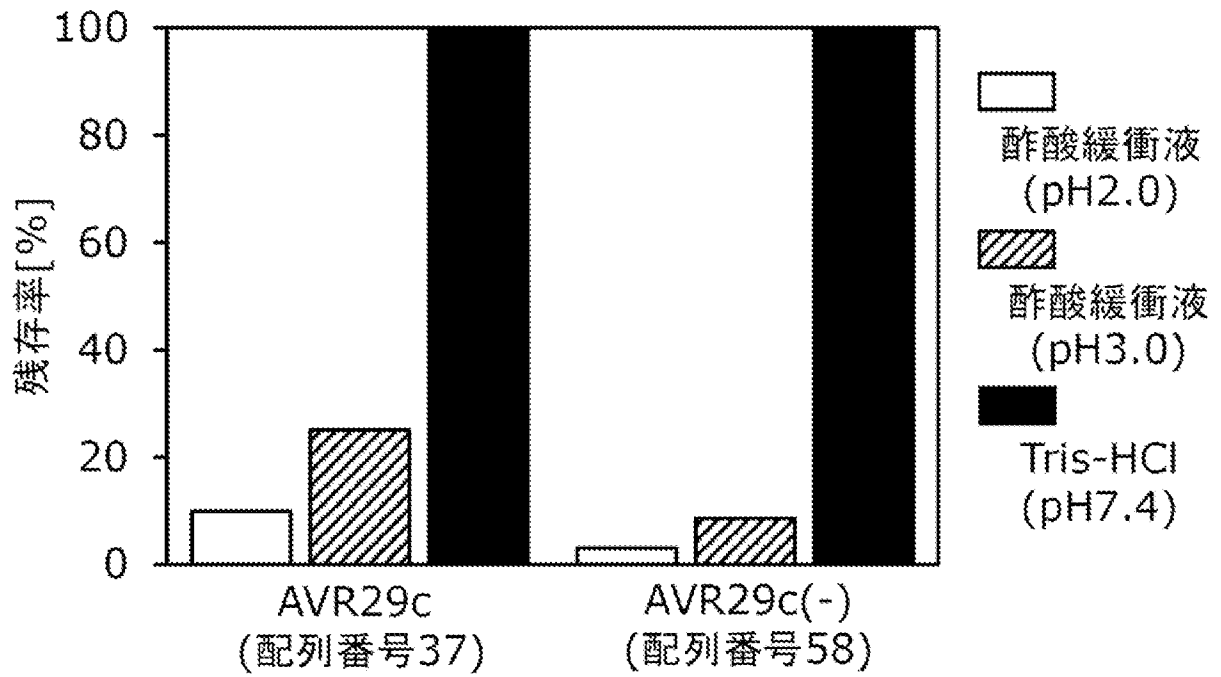
[図4]



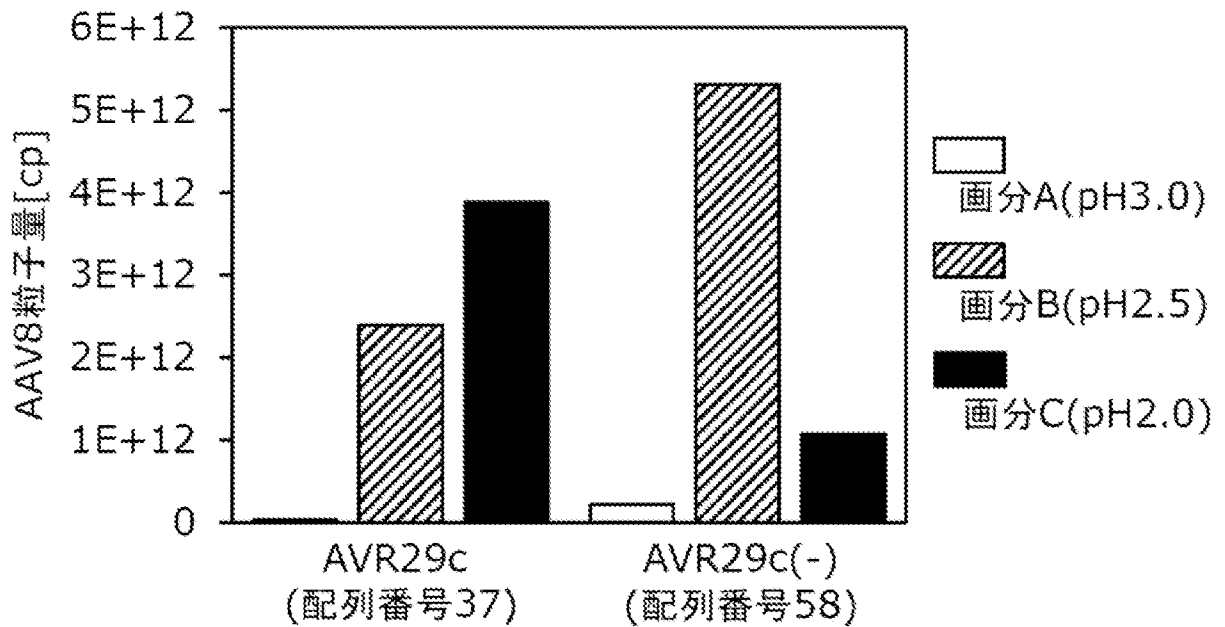
[図5]



[図6]

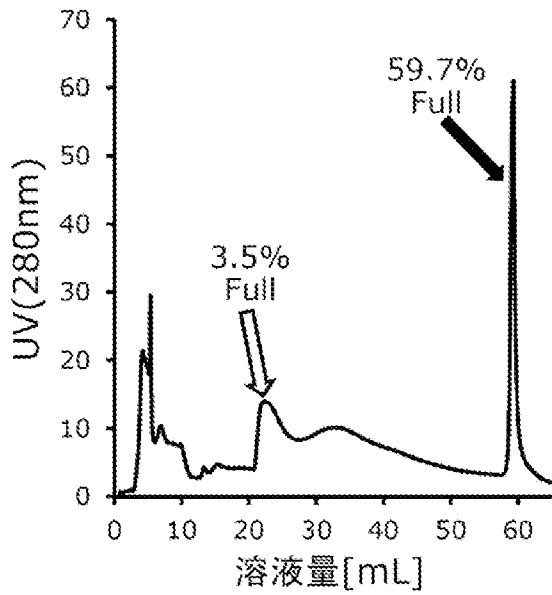


[図7]

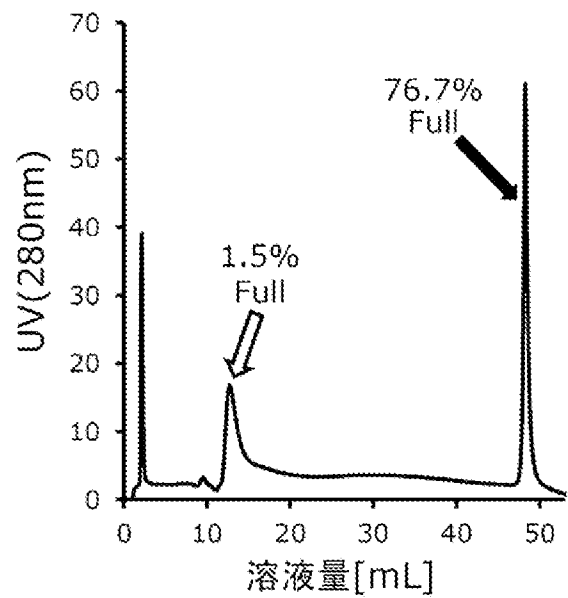


[图8]

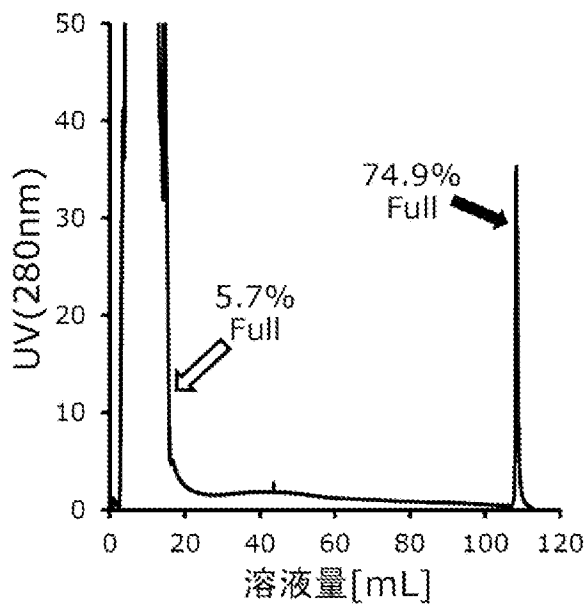
(a) 溶液AEX-C比率：49.0% → 100%



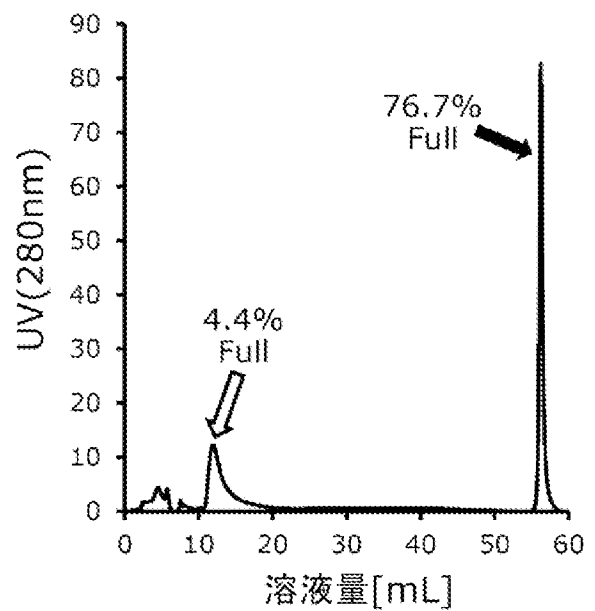
(b) 溶液AEX-C比率：48.0% → 100%



(c) 溶液AEX-C比率：47.0% → 100%

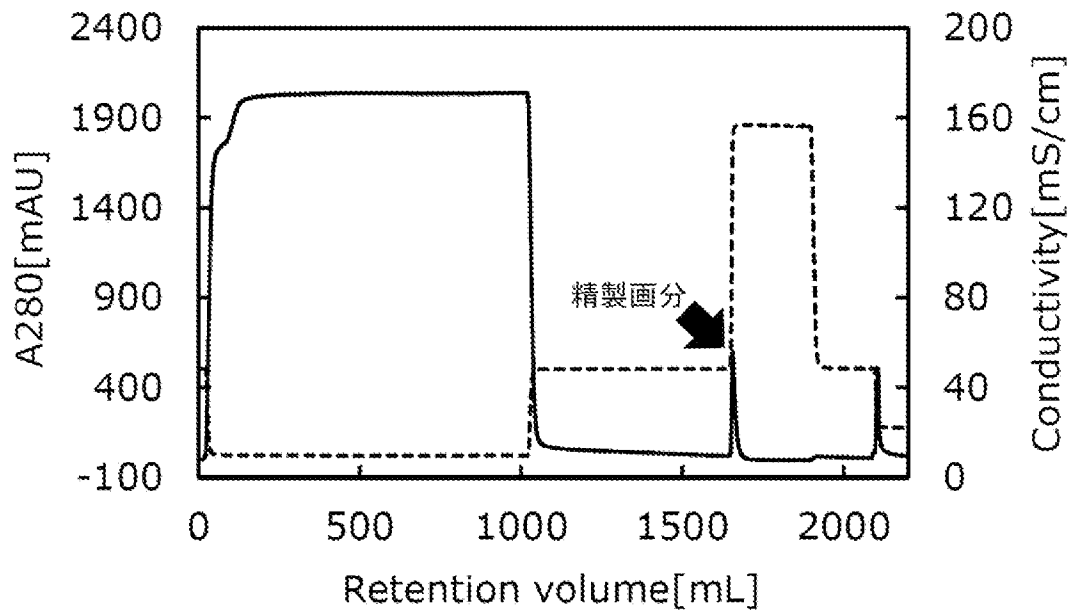


(d) 溶液AEX-C比率：46.5% → 100%

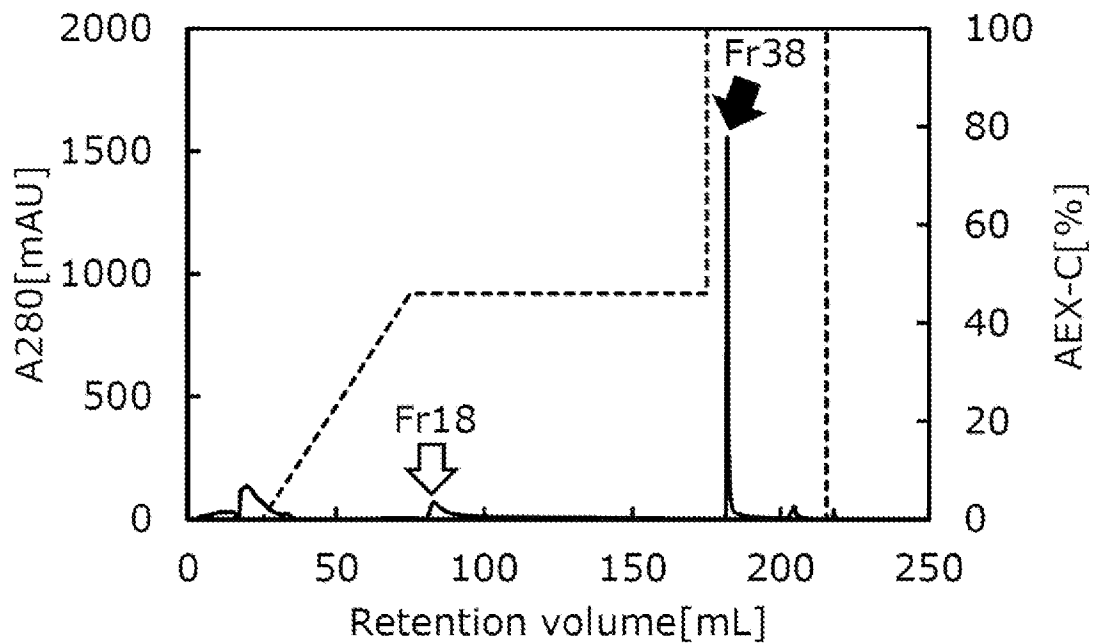


[図9]

(a) AVR29cカラム(AF精製)

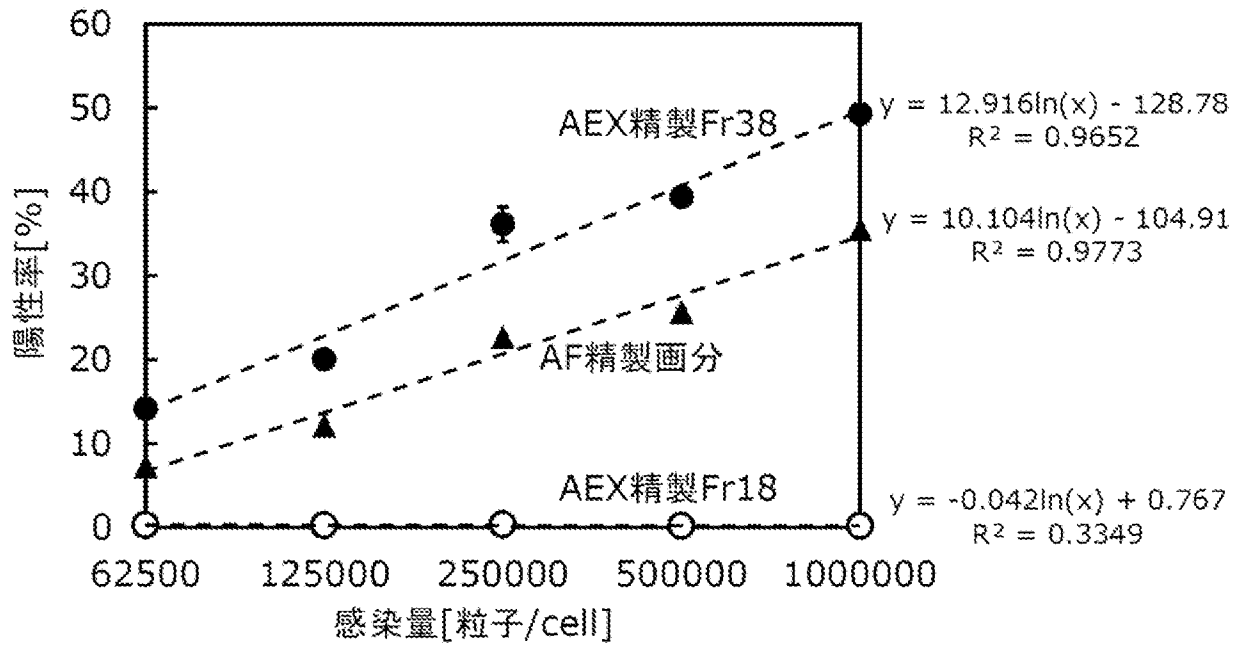


(b) SkillPak GigaCap Qカラム(AEX精製)

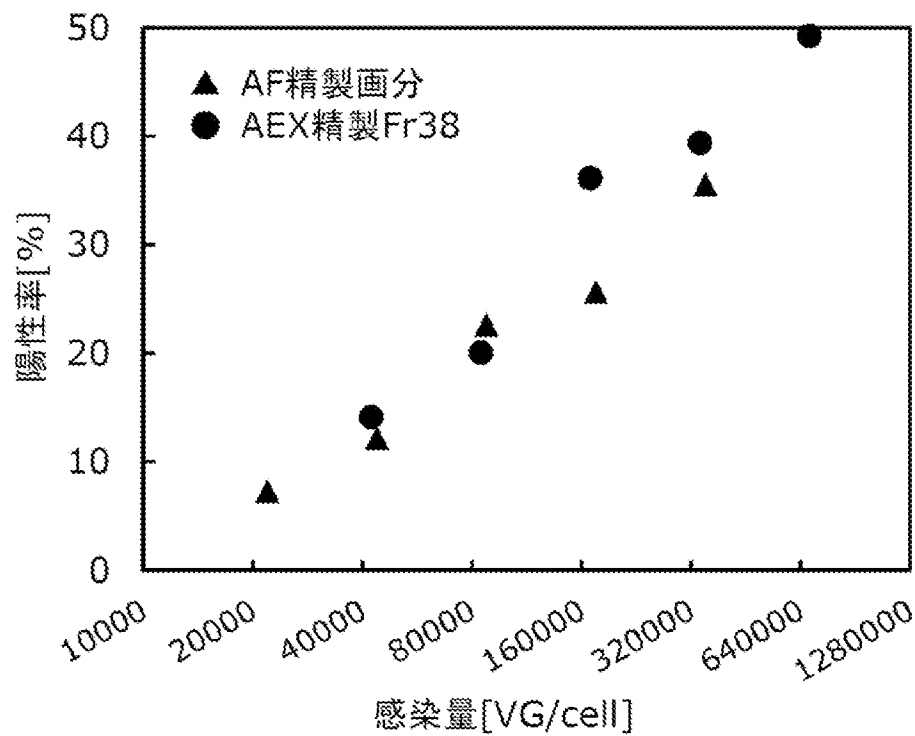


[図10]

(a) 各感染量における陽性率(一細胞当たりの粒子数)



(b) 各感染量における陽性率(一細胞当たりのベクターゲノム数)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/018896

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

*C07K 14/705*(2006.01)i; *C12N 1/21*(2006.01)i; *C12N 7/02*(2006.01)i; *C12N 15/12*(2006.01)i; *C12N 15/70*(2006.01)i;  
*C12P 21/02*(2006.01)i; *C07K 17/00*(2006.01)n  
 FI: C07K14/705 ZNA; C12N1/21; C12N7/02; C12N15/12; C12N15/70 Z; C12P21/02 C; C07K17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/705; C12N1/21; C12N7/02; C12N15/12; C12N15/70; C12P21/02; C07K17/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996  
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024  
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024  
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/106882 A1 (TOSOH CORPORATION) 03 June 2021 (2021-06-03) claims, examples 1-6, 13, 16	1, 4-11
Y		12-15
A		2-3
Y	JP 2021-526829 A (REGENXBIO INC.) 11 October 2021 (2021-10-11) claims, examples	12-15
A		1-11
Y	JP 2022-138144 A (JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD.) 22 September 2022 (2022-09-22) claims, examples	12-15
A		1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 “D” document cited by the applicant in the international application  
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search <b>17 July 2024</b>	Date of mailing of the international search report <b>30 July 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>	Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2024/018896**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2023/023541 A1 (ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.) 23 February 2023 (2023-02-23) example 10	12-15
A		1-11
P, A	WO 2023/140197 A1 (TOSOH CORPORATION) 27 July 2023 (2023-07-27) entire text, all drawings	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/018896

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(i) Number of inventions included in the claims

2

(ii) Numbers of claims classified into each invention

Invention 1: Claims 1-11 and 13 and parts of claims 14-15 pertaining to claims 1-3

Invention 2: Claim 12 and parts of claims 14-15 pertaining to claim 12

(iii) Reason for decision that the unity of invention requirement is not satisfied

The claims are classified into the following two inventions.

(Invention 1) Claims 1-11 and 13 and parts of claims 14-15 pertaining to claims 1-3

A special technical feature of "comprising at least amino acid residues from serine at position 25 to aspartic acid at position 213 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2" is found in (i) of claim 1. Therefore, the parts pertaining to (i) of claim 1 are classified as invention 1.

(ii) and (iii) of claim 1, claims 2-11 and 13 and parts of claims 14-15 pertaining to claims 1-3 are inventively linked to (i) of claim 1, and thus are classified as invention 1.

(Invention 2) Claim 12 and parts of claims 14-15 pertaining to claim 12

Claim 12 and (i) of claim 1 share the technical feature of an AAV binding protein. However, the technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosures in document 1 (the claims, etc.), and thus is not considered to be a special technical feature. Moreover, there are no other same or corresponding special technical features between claim 12 and (i) of claim 1.

Furthermore, claim 12 is not substantially identical to or similarly closely related to any parts classified as invention 1. Therefore, claim 12 cannot be classified as invention 1.

Claim 12 is therefore classified as invention 2. The parts of claims 14-15 pertaining to claim 12 are inventively linked to claim 12, and thus are classified as invention 2.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2024/018896**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
WO	2021/106882	A1	03 June 2021	US	2022/0402995	A1
					claims, examples 1-6, 13, 16	
				EP	4083059	A1
				CN	114746552	A
-----						
JP	2021-526829	A	11 October 2021	US	2021/0370199	A1
					claims, examples	
				EP	3807405	A2
				WO	2019/241535	A2
				KR	10-2021-0020100	A
				CN	112469822	A
-----						
JP	2022-138144	A	22 September 2022	US	2024/0150726	A1
					claims, examples	
				EP	4299751	A1
				WO	2022/191168	A1
				KR	10-2023-0154039	A
				CN	117280039	A
-----						
WO	2023/023541	A1	23 February 2023	EP	4387750	A1
-----						
WO	2023/140197	A1	27 July 2023	(Family: none)		
-----						

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））                  C07K 14/705(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 7/02(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i;                  C12N 15/70(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; C07K 17/00(2006.01)n                  FI: C07K14/705 ZNA; C12N1/21; C12N7/02; C12N15/12; C12N15/70 Z; C12P21/02 C; C07K17/00</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  C07K14/705; C12N1/21; C12N7/02; C12N15/12; C12N15/70; C12P21/02; C07K17/00</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2024年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年									
<p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X Y A	WO 2021/106882 A1 (東ソー株式会社) 03.06.2021 (2021 - 06 - 03) 請求の範囲、実施例 1 - 6、13、16	1,4-11 12-15 2-3								
Y A	JP 2021-526829 A (リジェネクスバイオ インコーポレイテッド) 11.10.2021 (2021 - 10 - 11) 特許請求の範囲、実施例	12-15 1-11								
Y A	JP 2022-138144 A (JCRファーマ株式会社) 22.09.2022 (2022 - 09 - 22) 特許請求の範囲、実施例	12-15 1-11								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー                  “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの                  “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献                  “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）                  “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献                  “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  “&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>										
国際調査を完了した日	17.07.2024	国際調査報告の発送日 30.07.2024								
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  藤澤 雅樹 4B 5802  電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2023/023541 A1 (ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.) 23.02.2023 (2023 - 02 - 23)	12-15
A	実施例 10	1-11
P, A	WO 2023/140197 A1 (東ソー株式会社) 27.07.2023 (2023 - 07 - 27)	1-15
	全文、全図	

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b.  国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）  
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2.  この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(i) 請求の範囲に含まれる発明の数

2

(ii) 各発明に区分した請求項の番号

発明1：請求項1-11、13、及び請求項14-15のうち請求項1-3に係る部分

発明2：請求項12、及び請求項14-15のうち請求項12に係る部分

(iii) 発明の単一性を満たさないと判断した理由

請求の範囲は、以下の2個の発明に区分される。

(発明1) 請求項1-11、13、及び請求項14-15のうち請求項1-3に係る部分

請求項1の(i)に、「配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち25番目のセリンから213番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み」という特別な技術的特徴が発見された。したがって、請求項1の(i)に係る部分を発明1に区分する。

請求項1の(ii)-(iii)、請求項2-11、13、及び請求項14-15のうち請求項1-3に係る部分は、請求項1の(i)に対して発明の連関を有しているため、発明1に区分する。

(発明2) 請求項12、及び請求項14-15のうち請求項12に係る部分

請求項12は、請求項1の(i)と、AAV結合性タンパク質という共通する技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は文献1の記載（請求の範囲等）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項12と、請求項1の(i)との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項12は、発明1に区分されたいずれの部分に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。したがって、請求項12は発明1に区分できない。

よって、請求項12を、発明2に区分する。請求項14-15のうち請求項12に係る部分は、請求項12に対して発明の連関を有しているため、発明2に区分する。

- 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
- 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
- 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/018896

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2021/106882	A1	03.06.2021	US	2022/0402995	A1	
					請求の範囲、実施例 1 – 6、13、16		
				EP	4083059	A1	
				CN	114746552	A	
-----							
JP	2021-526829	A	11.10.2021	US	2021/0370199	A1	
					特許請求の範囲、実施例		
				EP	3807405	A2	
				WO	2019/241535	A2	
				KR	10-2021-0020100	A	
				CN	112469822	A	
-----							
JP	2022-138144	A	22.09.2022	US	2024/0150726	A1	
					特許請求の範囲、実施例		
				EP	4299751	A1	
				WO	2022/191168	A1	
				KR	10-2023-0154039	A	
				CN	117280039	A	
-----							
WO	2023/023541	A1	23.02.2023	EP	4387750	A1	
-----							
WO	2023/140197	A1	27.07.2023	(ファミリーなし)			
-----							