(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-547197
(P2022-547197A)
(43)公表日　令和4年11月10日(2022.11.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/35 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/35		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*7/01 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/01	ＺＮＡ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ	*15/864 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全58頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-515606(P2022-515606)
(86)(22)出願日　令和2年9月9日(2020.9.9)
(85)翻訳文提出日　令和4年5月6日(2022.5.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/050027
(87)国際公開番号　WO2021/050614
(87)国際公開日　令和3年3月18日(2021.3.18)
(31)優先権主張番号　62/897,973
(32)優先日　令和1年9月9日(2019.9.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/934,996
(32)優先日　令和1年11月13日(2019.11.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　511140770
マサチューセッツ アイ アンド イヤー インファーマリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１１４， ボストン， チャールズ ストリート ２４３
(71)出願人　516106623
ザ スケペンス アイ リサーチ インスティテュート，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ０２１１４ マサチューセッツ州，ボストン，スタニフォード ストリート ２０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の生体内分布の変更に向けた、ＡＡＶとＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との間の相互作用を調節するための方法および組成物

(57)【要約】
本開示は、対象においてアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の生体内分布を変更するための組成物および方法を記載する。

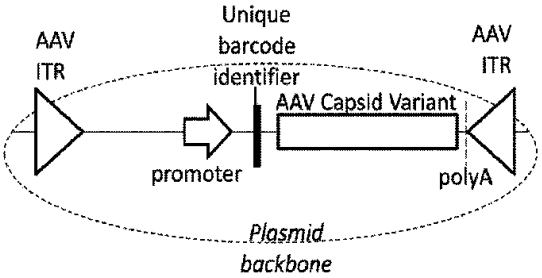


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
天然に存在しない改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質を含むウイルスであって、
前記改変ＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列と未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、前記未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列は、ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシドタンパク質（配列番号１）と前記未改変ＡＡＶカプシドタンパク質の前記アミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、配列番号１に対して番号付けされた、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６およびＶ７０８のアミノ酸の位置からなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸の位置において、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列とは相違する、ウイルス。
【請求項２】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔからなる群から選択される少なくとも１個のアミノ酸残基を含む、請求項１に記載のウイルス。
【請求項３】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔからなる群から選択される少なくとも２個のアミノ酸残基を含む、請求項１に記載のウイルス。
【請求項４】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、アミノ酸残基４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔを含む、請求項１に記載のウイルス。
【請求項５】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａからなる群から選択される少なくとも１個のアミノ酸残基を含む、請求項１に記載のウイルス。
【請求項６】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａからなる群から選択される少なくとも２個のアミノ酸残基を含む、請求項１に記載のウイルス。
【請求項７】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａを含む、請求項１に記載のウイルス。
【請求項８】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列とは、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質中の、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８のアミノ酸の位置のうちの１つまたは複数においてのみ異なり、他のアミノ酸の位置では異ならない、請求項１から７のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項９】
前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質が、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ｒｈ．１０、ｈｕ．３７、ＬＫ－０３、ＡＡＶ５、ＡＡ

ＶＰ１０、Ｈｕ６８；Ａｎｃ８０；Ａｎｃ８１；Ａｎｃ８２；Ａｎｃ８３；Ａｎｃ８４；Ａｎｃ９４；Ａｎｃ１１３；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；Ａｎｃ８０Ｌ２７；Ａｎｃ８０Ｌ５９；Ａｎｃ８０Ｌ６０；Ａｎｃ８０Ｌ６２；Ａｎｃ８０Ｌ６５；Ａｎｃ８０Ｌ３３；Ａｎｃ８０Ｌ３６；Ａｎｃ８０Ｌ４４；Ａｎｃ８０Ｌ１；Ａｎｃ１１０；Ａｎｃ８０ＤＩ；ＡＡＶ１　ｖｐ１；ＡＡＶ２　ｖｐ１；ＡＡＶ９ｖｐ１；Ａｎｃ８０；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；ＡＡＶ３；ＡＡＶ７；ＡＡＶ８；ｒｈ１０；ｈｕ３７；およびｈｕ．６８由来のＶＰ１カプシドタンパク質からなる群から選択される、請求項１から８のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１０】

前記天然に存在しない改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質が、前記改変ＡＡＶカプシドタンパク質の前記アミノ酸配列と前記未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、前記未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列と少なくとも９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１から９のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１１】

ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３のカプシドタンパク質；ならびに

組換え核酸ベクター

を含む、アセンブリ能を有する改変組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）であって、

前記ＶＰ１カプシドタンパク質は、請求項１から１０のいずれか一項に記載の改変ＶＰ１カプシドタンパク質である、改変組換えＡＡＶ。

【請求項１２】

ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３のカプシドタンパク質；ならびに

組換え核酸ベクター

を含む、アセンブリ能を有する改変組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）であって、

少なくとも前記ＶＰ１カプシドタンパク質は、改変ＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列と未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、前記未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む天然に存在しない改変ＶＰ１カプシドタンパク質であり、

前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を有する未改変ｒＡＡＶの投与後の前記未改変ｒＡＡＶの生体内分布と比較して、前記第１の哺乳動物対象への前記改変ｒＡＡＶの投与後の前記改変ｒＡＡＶの生体内分布を変更する手段を含む点で、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質とは相違し、前記未改変ｒＡＡＶは、前記手段を除いて、前記改変ｒＡＡＶのものと同一のアミノ酸配列を有するＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３のカプシドタンパク質を含む、改変組換えＡＡＶ。

【請求項１３】

第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む前記未改変ｒＡＡＶの投与後の、肝臓細胞の形質導入と比較して、前記第１の哺乳動物対象への投与後の、肝臓細胞のより高い形質導入を達成する、請求項１１または１２に記載の改変ｒＡＡＶ。

【請求項１４】

第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の、発現可能なポリペプチドの肝臓細胞における発現と比較して、前記第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、肝臓細胞におけるより高い発現を呈する、請求項１１から１３のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。

【請求項１５】
第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の肝臓細胞の形質導入と比較して、前記第１の哺乳動物対象への投与後の、肝臓細胞のより低い形質導入を達成する、請求項１１または１２に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項１６】
第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの肝臓細胞における発現と比較して、前記第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、肝臓細胞におけるより低い発現を呈する、請求項１１、１２、または１５のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項１７】
前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの前記第２の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との相互作用と比較して、前記第１の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶＲとの変更された相互作用を有する、請求項１１から１６のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項１８】
前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの前記第２の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との相互作用と比較して、前記第１の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶＲとの増加した相互作用を有する、請求項１７に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項１９】
前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの前記第２の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との相互作用と比較して、前記第１の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶＲとの低下した相互作用を有する、請求項１７に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２０】
前記第１の哺乳動物対象および前記第２の哺乳動物対象が、ヒトまたは非ヒト霊長類（ＮＨＰ）である、請求項１１から１９のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２１】
前記投与が、全身投与、例えば静脈内注入を含む、請求項１１から２０のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２２】
哺乳動物対象、例えば、ヒト対象に投与される場合、同じ投与経路によって同量で投与された前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶよりも低い肝毒性を有する、請求項１１から２１のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２３】
第１の哺乳動物対象への前記改変ｒＡＡＶの投与後の前記改変ｒＡＡＶの生体内分布を変更する手段が、ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシドタンパク質（配列番号１）と前記未改変ＡＡＶカプシドタンパク質の前記アミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、配列番号１に対して番号付けされた、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６およびＶ７０８からなる群から選択される位置で、１個または複数のアミノ酸残基に突然変異を含む、請求項１１から２２のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２４】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質が、４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔからなる群から選択される少なくとも１個のアミノ酸残基を含む、請求項２３に記載の改変ｒＡＡＶ。

【請求項２５】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質が、４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔからなる群から選択される少なくとも２個のアミノ酸残基を含む、請求項２３に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２６】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質が、アミノ酸残基４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔを含む、請求項２３に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２７】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質が、４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａからなる群から選択される少なくとも１個のアミノ酸残基を含む、請求項２３に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２８】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質が、４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａからなる群から選択される少なくとも２個のアミノ酸残基を含む、請求項２３に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項２９】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質が、アミノ酸残基４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａを含む、請求項２３に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項３０】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列とは、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質中の、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８のアミノ酸の位置のうちの１つまたは複数においてのみ異なり、他のアミノ酸の位置では異ならない、請求項２３から２９のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項３１】
前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質が、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ｒｈ．１０、ｈｕ．３７、ＬＫ－０３、ＡＡＶ５、ＡＡＶ１０、Ｈｕ６８；Ａｎｃ８０；Ａｎｃ８１；Ａｎｃ８２；Ａｎｃ８３；Ａｎｃ８４；Ａｎｃ９４；Ａｎｃ１１３；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；Ａｎｃ８０Ｌ２７；Ａｎｃ８０Ｌ５９；Ａｎｃ８０Ｌ６０；Ａｎｃ８０Ｌ６２；Ａｎｃ８０Ｌ６５；Ａｎｃ８０Ｌ３３；Ａｎｃ８０Ｌ３６；Ａｎｃ８０Ｌ４４；Ａｎｃ８０Ｌ１；Ａｎｃ１１０；Ａｎｃ８０ＤＩ；ＡＡＶ１　ｖｐ１；ＡＡＶ２　ｖｐ１；ＡＡＶ９ｖｐ１；Ａｎｃ８０；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；ＡＡＶ３；ＡＡＶ７；ＡＡＶ８；ｒｈ１０；ｈｕ３７；およびｈｕ．６８由来のＶＰ１カプシドタンパク質からなる群から選択される、請求項１１から３０のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項３２】
前記改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列が、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質の前記アミノ酸配列と少なくとも９６％同一であり、９７％同一であり、９８％同一であり、または９９％同一である、請求項１１から３１のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ。
【請求項３３】
請求項１１から３２のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶ、および
薬学的に許容される担体
を含む、医薬組成物。
【請求項３４】
請求項１から１０のいずれか一項に記載の改変ＶＰ１カプシドタンパク質、または請求項１１から３２のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶの前記ＶＰ１タンパク質をコードする、核酸分子。

【請求項３５】
請求項３４に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項３６】
請求項３４に記載の核酸分子または請求項３５に記載のベクターを含む単離された宿主細胞。
【請求項３７】
未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を有するｒＡＡＶを使用した送達と比較して、哺乳動物対象、例えば、ヒト患者の標的臓器への発現可能なポリヌクレオチドの送達を変更する方法であって、請求項１１から３２のいずれか一項に記載の改変ｒＡＡＶまたは請求項３３に記載の医薬組成物の治療有効用量を、前記ヒト患者に投与するステップを含む、方法。
【請求項３８】
前記発現可能な核酸が、導入遺伝子である、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記改変ｒＡＡＶが、第２の対応する哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の、発現可能なポリペプチドの前記標的臓器の細胞への形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器の細胞へのより高い形質導入を呈する、請求項３７または３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記改変ｒＡＡＶが、第２の対応する哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の、発現可能なポリペプチドの前記標的臓器の細胞への形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器の細胞へのより低い形質導入を呈する、請求項３７または３８に記載の方法。
【請求項４１】
前記改変ｒＡＡＶが、第２の対応する哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器以外の細胞への形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器以外の細胞へのより高い形質導入を呈する、請求項３７または３８に記載の方法。
【請求項４２】
前記改変ｒＡＡＶが、第２の対応する哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器以外の細胞への形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器以外の細胞へのより低い形質導入を呈する、請求項３７または３８に記載の方法。
【請求項４３】
前記改変ｒＡＡＶが、第２の対応する哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の、発現可能なポリペプチドの前記標的臓器の細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器の細胞におけるより高い発現を呈する、請求項３７または３８に記載の方法。
【請求項４４】
前記改変ｒＡＡＶが、第２の対応する哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の、発現可能なポリペプチドの前記標的臓器の細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器の細胞におけるより低い発現を呈する、請求項３７または３８に記載の方法。
【請求項４５】

前記改変ｒＡＡＶが、第２の対応する哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の、発現可能なポリペプチドの前記標的臓器の細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器以外の細胞におけるより高い発現を呈する、請求項３７または３８に記載の方法。

【請求項４６】

前記改変ｒＡＡＶが、第２の対応する哺乳動物対象への前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の、発現可能なポリペプチドの前記標的臓器の細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、前記組換え核酸ベクターによってコードされる前記発現可能なポリペプチドの、前記標的臓器以外の細胞におけるより低い発現を呈する、請求項３７または３８に記載の方法。

【請求項４７】

前記標的臓器が、肝臓である、請求項３７から４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４８】

前記標的臓器以外の細胞が、筋細胞である、請求項３７から４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４９】

前記未改変ＡＡＶが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ８、またはＡＡＶ９であり、送達が変更される前記標的臓器が、心臓であり；

前記未改変ＡＡＶが、ＡＡＶ２であり、送達が変更される前記標的臓器が、腎臓であり；

前記未改変ＡＡＶが、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９であり、送達が変更される前記標的臓器が、肝臓であり；

前記未改変ＡＡＶが、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ９であり、送達が変更される前記標的臓器が、肺であり；

前記未改変ＡＡＶが、ＡＡＶ８であり、送達が変更される前記標的臓器が、膵臓であり；

前記未改変ＡＡＶが、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８であり、送達が変更される前記標的臓器が、眼の光受容細胞であり；

前記未改変ＡＡＶが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８であり、送達が変更される前記標的臓器が、網膜色素上皮（ＲＰＥ）であり；

前記未改変ＡＡＶが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９であり、送達が変更される前記標的臓器が、骨格筋である、請求項３７から４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５０】

前記改変ｒＡＡＶが、哺乳動物対象、例えば、ヒト対象に投与される場合、同じ投与経路によって投与される、前記未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの同じ用量よりも低い肝毒性を有する、請求項３７から４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１】

前記哺乳動物対象が、ヒト対象または非ヒト霊長類である、請求項３７から５０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２】

請求項３７から５１のいずれか一項に記載の方法で使用するための、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、２０１９年９月９日に出願された米国仮特許出願第６２／８９７，９７３号明細書および２０１９年１１月１３日に出願された米国仮特許出願第６２／９３４，９９６号明細書の利益を主張するものであり、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組

み込まれる。
【０００２】
本開示は全体として、ウイルス、具体的にはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）に関する。
【０００３】
参照による組込み
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出された付録が含まれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。２０２０年９月９日に作成されたＰＤＦファイルはＳｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｐｐｅｎｄｉｘ．ｐｄｆと命名され、６５．９キロバイトのサイズである。
【背景技術】
【０００４】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、複製欠損が付与された場合、治療用遺伝子導入のベクターシステムとして使用することができる。ＡＡＶは、一本鎖ＤＮＡを被包するカプシドと呼ばれるタンパク質シェルで構成されている。ＤＮＡ分子が被包化を可能とする最小要件とは、ＤＮＡが一本鎖でなければならないこと、およびＡＡＶの隣接逆位末端反復（ＩＴＲ）を含む必要があること、である。カプシド構造は、正２０面体アセンブリの形態で３種の６０のタンパク質モノマーで構成される２０の面を備える球状粒子を形成する大きな多タンパク質アセンブリである。これらのモノマーはカプシドタンパク質を形成する。ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３の３種のカプシドタンパク質があり、これらは重なり合う配列を有する。ＶＰ３は最短のタンパク質であり、一次粒子構造を構成する、すなわち、正２０面体アセンブリを形成するのに必須な構成要素である。ＶＰ２は、そのＣ末端にＶＰ３を完全に包含し、Ｎ末端に伸長するより長いタンパク質である。同様に、ＶＰ１はそのＣ末端にＶＰ２およびＶＰ３を包含する。カプシドを形成するのにＶＰ１およびＶＰ２は構造的に必要ではないが、両方がＡＡＶの感染性にとって必要である。
【０００５】
一般に、カプシドは、感染性、ならびに適応免疫応答、向性、特異性、効力、および生体内分布などの宿主ベクター関連特性の１次決定因子であると考えられている。実際、これらの特性のいくつかは、天然のＡＡＶ血清型と操作されたＡＡＶ血清型とバリアントとによって異なることが知られている。今日まで、しかし、カプシドに関するこういった変化によってその特性が機能的にどのように変更するのかということについての機構上の理解はなく、したがって、その特性の制御に関して任意のレベルに向けてＡＡＶを操作する合理的基盤がない。例えば、いくつかの治療アプローチでは、全身注射を介してＡＡＶを使用して、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）などの神経筋障害の全体的な筋系を標的にする。しかし、ＡＡＶ９やｒｈ７４などのこれらのアプローチに現在使用されているベクターには全て、筋肉への標的指向化を確保するために高用量が必要であり、ベクターは一次標的として肝臓へと自然と向かう。しかし、肝臓組織はＤＭＤ病の病理に関与してはいない。
【０００６】
２０１６年、Ｊａｎ　Ｃａｒｅｔｔｅの研究グループは、ＡＡＶＲ（ＫＩＡＡ０３１９Ｌとしても知られる）と呼ばれるタンパク質を、多くのＡＡＶの必須侵入因子または受容体として特定した（Pillay et al., 2016, Nature, 530(7588):108-12）。２０１９年に、独立した２つグループが、ＡＡＶＲ受容体とインターフェースで接続する、ＡＡＶ粒子の部分（本明細書ではＡＡＶＲフットプリントと呼ばれる）に関する構造上の解決について報告した(Meyer et al., 2019, Elife, 8 pii: e44707; Zhang et al., 2019, Nat. Microbiol., 4(4):675-682)。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本開示は、ＡＡＶＲフットプリント内の特定の位置で、ある種の特定のアミノ酸への種々のＡＡＶの結合を操作、妨害、または破壊し、その結果、例えば、対象において、肝臓細胞へのＡＡＶの結合または肝臓もしくは他の細胞に形質導入するＡＡＶの能力を完全に

阻害することなく、肝臓細胞のＡＡＶの形質導入を調節することによって、例えば、それらを低下させるまたは高めることによって、対象においてＡＡＶの生体内分布を変更することができるという発見に、少なくとも部分的に、基づいている。

【０００８】

一態様では、本開示は、対象内の肝臓細胞へのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の生体内分布を調節する方法を提供する。かかる方法は、ＡＡＶの未改変ＡＡＶカプシドタンパク質を用意するステップ；ならびにＡＡＶのカプシドタンパク質におけるＱ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６またはＶ７０８の各位置（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）のうちの１つまたは複数で少なくとも１個のアミノ残基を、異なるアミノ酸残基と置き換えて、肝臓細胞に形質導入するＡＡＶの能力を完全には阻害しないがこれを変更するのに十分な様式で肝臓細胞上でのＡＡＶカプシドタンパク質とＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との間の結合を改変するステップ、を含む。

【０００９】

場合によっては、ＡＡＶによる肝臓細胞へのまたは肝臓細胞中での生体内分布が上昇する。別の場合では、ＡＡＶによる肝臓細胞へのまたは肝臓細胞中での生体内分布が低下する。

【００１０】

一部の実施形態では、少なくとも１個のアミノ酸残基を置き換えることは、ＡＡＶカプシドタンパク質をコードする核酸の突然変異誘発を含む。場合によっては、置き換えるステップにより、保存的なアミノ酸置換がもたらされる。

【００１１】

別の態様では、本開示は、対象内の肝臓細胞へのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の生体内分布を調節する方法を提供する。かかる方法は、ＡＡＶの未改変ＡＡＶカプシドタンパク質を用意するステップ；ならびにＡＡＶのカプシドタンパク質におけるＳ４４６、Ｒ４７１、またはＶ７０８の位置（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）のうちの１つまたは複数で少なくとも１個のアミノ残基を、異なるアミノ酸残基と置き換えて、肝臓細胞に形質導入するＡＡＶの能力を完全には阻害しないがこれ変更するのに十分な様式で肝臓細胞上でのＡＡＶカプシドタンパク質とＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との間の結合を改変するステップ、を含む。

【００１２】

場合によっては、肝臓細胞に形質導入するＡＡＶの能力が向上するが、一方、場合によっては、肝臓細胞に形質導入するＡＡＶの能力は低下する。

【００１３】

一部の実施形態では、置き換えられたアミノ酸残基は、Ｓ４４６Ｎ、Ｓ４４６Ｒ、Ｒ４７１Ａ、Ｒ４７１Ｓ、Ｖ７０８Ｔ、またはＶ７０８Ａ（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）のうちのいずれか１個または複数である。一部の実施形態では、少なくとも１個のアミノ酸残基を置き換えることは、ＡＡＶカプシドタンパク質をコードする核酸の突然変異誘発を含む。

【００１４】

さらに別の態様では、本開示は、位置４４６、４７１、または７０８の位置（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）からなる群から選択される位置で、少なくとも１個のアミノ酸残基の点で野生型の未改変ＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列とは相違するアミノ酸配列を有するＡＡＶカプシドタンパク質を含む、天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質を提供し、天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列は、肝臓細胞に形質導入するＡＡＶの能力を完全には阻害しないがこれ変更するのに十分な様式で、野生型ＡＡＶ配列がもたらすよりも、肝臓細胞にＡＡＶカプシドタンパク質の変更された結合をもたらす。

【００１５】

一部の実施形態では、天然に存在しないアミノ酸配列は、Ｓ４４６Ｎ、Ｓ４４６Ｒ、Ｒ４７１Ａ、Ｒ４７１Ｓ、Ｖ７０８Ｔ、またはＶ７０８Ａ（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）のうちの少なくとも１個を含む。

【００１６】

場合によっては、例えば、ＡＡＶカプシドが位置４４６にＲ、位置４７１にＡ、または位置７０８にＴを含む場合（ＡＡＶ２（配列番号１）に対して番号付けされている）、天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質の肝臓への結合は上昇する。場合によっては、例えば、ＡＡＶカプシドが位置４４６にＳ、位置４７１にＳ、または位置７０８にＡを含む場合（ＡＡＶ２（配列番号１）に対して番号付けされている）、天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質の肝臓への結合は低下する。

【００１７】

さらに別の態様では、本開示は、対象においてＡＡＶの肝臓への標的指向化を変更する方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載の天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質を含むＡＡＶを対象に投与するステップを含む。一部の実施形態では、投与は静脈内である。一部の実施形態では、投与は複数回繰り返される。

【００１８】

一態様では、本開示は、対象におけるアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の生体内分布を変更するための方法を特徴とし、上記方法は、肝臓細胞上のＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）へのＡＡＶの結合を破壊または妨害することによって、肝臓細胞へのＡＡＶの親和性または結合活性を調節するステップを含み、破壊することまたは妨害することには、２６３～２６５、２６７、２６８、２７１、３８２～３８５、４４６、４７１、５０２、５０３、５２８～５２９、５８９、７０６、および７０８の各位置（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１（図２のいちばん上の配列））に対して）のうちの１つまたは複数で少なくとも１個のアミノ酸残基が関与する。

【００１９】

一部の実装形態では、破壊することまたは妨害することは突然変異誘発を含む。ある特定の実施形態では、破壊することまたは妨害することには、ＡＡＶカプシドタンパク質の低分子結合または化学的もしくはペプチド改変が含まれる。

【００２０】

別の態様では、本開示は、２６３～２６５、２６７、２６８、２７１、３８２～３８５、４４６、４７１、５０２、５０３、５２８～５２９、５８９、７０６、および７０８の各位置（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１（図１のいちばん上の配列））に対して）からなる群から選択される位置で、少なくとも１個のアミノ酸残基の点で、野生型または未改変の配列とは相違する組換えアミノ酸配列を有するＡＡＶカプシドを含めて、天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質を特徴とし、組換えＡＡＶアミノ酸配列は、野生型ＡＡＶ配列がもたらすよりも、肝臓細胞にカプシドタンパク質の変更された親和性または結合活性をもたらす。

【００２１】

一部の実施形態では、組換えアミノ酸配列と野生型配列との間で異なる少なくとも１個のアミノ酸残基を表１に示す。

【００２２】

ある特定の実施形態では、天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質の肝臓への親和性または結合活性が上昇する。一部の実装形態では、ＡＡＶカプシドは、位置４４６にＲまたは位置７０８にＴを含む（ＡＡＶ２に対して）。

【００２３】

ある特定の実施形態では、天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質の肝臓への親和性または結合活性は低下する。ある特定の実施形態では、ＡＡＶカプシドは、位置４４６にＳまたは位置７０８にＡを含む（ＡＡＶ２に対して）。

【００２４】

別の態様では、本開示は、対象においてＡＡＶの肝臓への標的指向化を変更する方法を

特徴とし、上記方法は、本明細書に記載の天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質を含むＡＡＶを対象に投与するステップを含む。

【００２５】

さらに別の態様では、本開示は、対象においてＡＡＶの肝臓への標的指向化を変更する方法を特徴とし、上記方法は、本明細書に記載の天然に存在しないＡＡＶカプシドタンパク質を含むＡＡＶを対象に投与するステップを含む。

【００２６】

一態様では、本開示は、天然に存在しない改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質を含むウイルスを提供する。典型的には、本明細書に記載のウイルスは、改変ＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列と未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列とのアライメントを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（basic local alignment search tool）（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシドタンパク質（配列番号１）と未改変ＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、配列番号１に対して番号付けされた、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６およびＶ７０８のアミノ酸の位置からなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸の位置において、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列とは相違する。

【００２７】

一部の実施形態では、ＢＬＡＳＴＰのデフォルトパラメーターは、以下を含む：短い入力配列に対して自動的に調整されたパラメーター；期待される閾値：１０；ワードサイズ：３；クエリ－範囲における最大一致：０；行列：ＢＬＯＳＵＭ６２；ｇａｐコスト：存在１１，拡張１；組成調整（compositional adjustments）：条件付き組成スコア行列調整（conditional compositional score matrix adjustment）；およびフィルターまたはマスクなし。一部の実施形態では、ＢＬＡＳＴＮのデフォルトパラメーターは以下のとおりである：パラメーターは短い入力配列に対して自動的に調整；期待される閾値：１０；ワードサイズ：２８；クエリ－範囲における最大一致：０；マッチ／ミスマッチスコア：１，－２；ｇａｐコスト：リニア；フィルター：複雑度が低い領域；およびマスク：早見表の場合のみ。

【００２８】

一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔからなる群から選択される少なくとも１個のアミノ酸残基（例えば、少なくとも２個のアミノ酸残基）を含む。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸残基４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔを含む。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａからなる群から選択される少なくとも１個のアミノ酸残基（例えば、少なくとも２個のアミノ酸残基）を含む。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａを含む。

【００２９】

一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列とは、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質中の、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８のアミノ酸の位置のうちの１つまたは複数においてのみ異なり、他のアミノ酸の位置では異ならない。

【００３０】

一部の実施形態では、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ｒｈ．１０、ｈｕ．３７、ＬＫ－０３、ＡＡＶ５、ＡＡＶ１０、Ｈｕ６８；Ａｎｃ８０；Ａｎｃ８１；Ａｎｃ８２；Ａｎｃ８３；Ａｎｃ８４；Ａｎｃ９４；Ａｎｃ１１３；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；Ａｎｃ８０Ｌ２７；Ａｎｃ８０Ｌ５９；Ａｎｃ８０Ｌ６０；Ａｎｃ８０Ｌ６２；Ａｎｃ８０Ｌ６５；Ａｎｃ８０Ｌ３３；Ａｎｃ８０Ｌ３６；Ａｎｃ８０Ｌ４４；Ａｎｃ８０Ｌ１；Ａｎｃ１１０；Ａｎｃ８０ＤＩ；ＡＡＶ１　ｖｐ１；ＡＡＶ２　ｖｐ１；ＡＡＶ９ｖｐ１；Ａｎｃ８０；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；ＡＡＶ３；ＡＡＶ７；ＡＡＶ８；ｒｈ１０；ｈｕ３７；およびｈｕ．６８由来のＶＰ１カプシドタンパク質からなる群から選択される、

【００３１】

ある特定の実施形態では、天然に存在しない改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質は、改変ＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列と未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００３２】

別の態様では、本開示は、アセンブリ能を有する改変組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）を提供する。かかるＡＡＶは、ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３のカプシドタンパク質、ならびに組換え核酸ベクターを含み、ここで、ＶＰ１カプシドタンパク質は、本明細書に記載の改変ＶＰ１カプシドタンパク質である。

【００３３】

さらに別の態様では、本開示は、アセンブリ能を有する改変組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）を提供する。かかるＡＡＶは、ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３のカプシドタンパク質；ならびに組換え核酸ベクターを含み、ここで、少なくともＶＰ１カプシドタンパク質は、改変ＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列と未改変ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、未改変ＡＡＶＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、天然に存在しない改変ＶＰ１カプシドタンパク質であり、改変ＡＡＶカプシドタンパク質は、第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を有する未改変ｒＡＡＶの投与後の未改変ｒＡＡＶの生体内分布と比較して、第１の哺乳動物対象への改変ｒＡＡＶの投与後の改変ｒＡＡＶの生体内分布を変更する手段を含む点で、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質とは相違しており、ここで、未改変ｒＡＡＶは、前記手段を除いて、改変ｒＡＡＶのものと同一のアミノ酸配列を有するＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３のカプシドタンパク質を含む。

【００３４】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の肝臓細胞の形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、肝臓細胞のより高い形質導入を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの肝臓細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの肝臓細胞における、より高い発現を呈する。

【００３５】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の肝臓細胞の形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、肝臓細胞のより低い形質導入を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第１の哺乳動物対象と同じ種の第２の哺

乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの肝臓細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの肝臓細胞における、より低い発現を呈する。

【００３６】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの第２の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との相互作用と比較して、第１の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶＲとの変更された相互作用を有する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの第２の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との相互作用と比較して、第１の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶＲとの高まった相互作用を有する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの第２の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との相互作用と比較して、第１の哺乳動物対象の肝臓細胞上で発現したＡＡＶＲとの低下した相互作用を有する。

【００３７】

一部の実施形態では、第１の哺乳動物対象および第２の哺乳動物対象は、ヒトまたは非ヒト霊長類（ＮＨＰ）である。一部の実施形態では、投与は、全身投与、例えば静脈内注入を含む。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、哺乳動物対象、例えば、ヒト対象に投与される場合、同じ投与経路によって同量で投与された未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶよりも低い肝毒性を有する。

【００３８】

一部の実施形態では、第１の哺乳動物対象への改変ｒＡＡＶの投与後の改変ｒＡＡＶの生体内分布を変更する手段は、ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシドタンパク質（配列番号１）と未改変ＡＡＶカプシドタンパク質のアミノ酸配列とを、デフォルトのアルゴリズムパラメーターを用いた基本ローカル整列化検索ツール（ＢＬＡＳＴ）プログラムを使用してアライメントする場合、配列番号１に対して番号付けされた、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６およびＶ７０８からなる群から選択される位置で、１個または複数のアミノ酸残基に突然変異を含む。

【００３９】

一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔからなる群から選択される少なくとも１個のアミノ酸残基（例えば、少なくとも２個のアミノ酸残基）を含む。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、アミノ酸残基４４６Ｒ、４７１Ａ、および７０８Ｔを含む。

【００４０】

一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、４６４Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａからなる群から選択される少なくとも１個のアミノ酸残基（例えば、少なくとも２個のアミノ酸残基）を含む。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、アミノ酸残基４４６Ｓ、４７１Ｓ、および７０８Ａを含む。

【００４１】

一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列とは、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質中の、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８のアミノ酸の位置のうちの１つまたは複数においてのみ異なり、他のアミノ酸の位置では異ならない。

【００４２】

一部の実施形態では、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡ

ＶＰ３、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ｒｈ．１０、ｈｕ．３７、ＬＫ－０３、ＡＡＶ５、ＡＡＶ１０、Ｈｕ６８；Ａｎｃ８０；Ａｎｃ８１；Ａｎｃ８２；Ａｎｃ８３；Ａｎｃ８４；Ａｎｃ９４；Ａｎｃ１１３；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；Ａｎｃ８０Ｌ２７；Ａｎｃ８０Ｌ５９；Ａｎｃ８０Ｌ６０；Ａｎｃ８０Ｌ６２；Ａｎｃ８０Ｌ６５；Ａｎｃ８０Ｌ３３；Ａｎｃ８０Ｌ３６；Ａｎｃ８０Ｌ４４；Ａｎｃ８０Ｌ１；Ａｎｃ１１０；Ａｎｃ８０ＤＩ；ＡＡＶ１　ｖｐ１；ＡＡＶ２　ｖｐ１；ＡＡＶ９ｖｐ１；Ａｎｃ８０；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；ＡＡＶ３；ＡＡＶ７；ＡＡＶ８；ｒｈ１０；ｈｕ３７；およびｈｕ．６８由来のＶＰ１カプシドタンパク質からなる群から選択される。

【００４３】

一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列は、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも９６％同一であり、９７％同一であり、９８％同一であり、または９９％同一である。

【００４４】

さらに別の態様では、本明細書に記載の改変ｒＡＡＶ、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。一態様では、本明細書に記載の改変ＶＰ１カプシドタンパク質または本明細書に記載の改変ｒＡＡＶのＶＰ１タンパク質をコードする、核酸分子。

【００４５】

別の態様では、本明細書に記載の核酸分子を含むベクターが提供される。別の態様では、本明細書に記載の核酸分子または本明細書に記載のベクターを含む単離された宿主細胞が提供される。

【００４６】

さらに別の態様では、本開示は、例えば、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を有するｒＡＡＶを使用した送達と比較して、哺乳動物対象、例えば、ヒト患者の標的臓器への発現可能なポリヌクレオチドの送達を変更する方法を提供する。かかる方法は、本明細書に記載の治療有効用量の改変ｒＡＡＶまたは本明細書に記載の医薬組成物をヒト患者に投与するステップを含むことができる。一部の実施形態では、発現可能な核酸は導入遺伝子である。

【００４７】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第２の対応する哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞への形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞への、より高い形質導入を呈する。

【００４８】

ある特定の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第２の対応する哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞への形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞への、より低い形質導入を呈する。

【００４９】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第２の対応する哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの標的臓器以外の細胞への形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器以外の細胞への、より高い形質導入を呈する。

【００５０】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第２の対応する哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの標的臓器以外の細胞への形質導入と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベク

ターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器以外の細胞への、より低い形質導入を呈する。

【００５１】

ある特定の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第２の対応する哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞における、より高い発現を呈する。

【００５２】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第２の対応する哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞における、より低い発現を呈する。

【００５３】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第２の対応する哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器以外の細胞における、より高い発現を呈する。

【００５４】

ある特定の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、第２の対応する哺乳動物対象への未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの投与後の発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞における発現と比較して、第１の哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器以外の細胞における、より低い発現を呈する。

【００５５】

一部の実施形態では、標的臓器は肝臓である。一部の実施形態では、標的臓器以外の細胞は筋細胞である。

【００５６】

一部の実施形態では、未改変ＡＡＶはＡＡＶ１、ＡＡＶ８、またはＡＡＶ９であり、それへと送達が変更される標的臓器は心臓であり；未改変ＡＡＶはＡＡＶ２であり、それへと送達が変更される標的臓器は腎臓であり；未改変ＡＡＶはＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９であり、それへと送達が変更される標的臓器は肝臓であり；未改変ＡＡＶはＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ９であり、それへと送達が変更される標的臓器は肺であり；未改変ＡＡＶはＡＡＶ８であり、それへと送達が変更される標的臓器は膵臓であり；未改変ＡＡＶはＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８であり、それへと送達が変更される標的臓器は眼の光受容細胞であり；未改変ＡＡＶはＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８であり、それへと送達が変更される標的臓器は網膜色素上皮（ＲＰＥ）であり；未改変ＡＡＶはＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９であり、それへと送達が変更される標的臓器は骨格筋である。

【００５７】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、哺乳動物対象、例えば、ヒト対象に投与される場合、同じ投与経路によって投与される、未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶの同じ用量よりも低い肝毒性を有する。一部の実施形態では、哺乳動物対象はヒト対象または非ヒト霊長類である。

【００５８】

さらに別の態様では、本開示は、本明細書に記載の方法のいずれかで使用するための組成物を提供する。

【００５９】

一態様では、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）を投与するステップによって哺乳動物対象（例えば、ヒト患者）を処置する方法において、改善は、哺乳動物対象への投与後のｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段を有するカプシドを含む改変ｒＡＡＶの治療有効用量を投与するステップを含む。

【００６０】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、ｒＡＡＶの肝臓クリアランスを減少させる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、標的臓器の細胞の形質導入を高める。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞における発現を上昇させる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、標的臓器の細胞の形質導入を低下させる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器の細胞における発現を低下させる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、標的臓器以外の細胞の形質導入を高める。

【００６１】

ある特定の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器以外の細胞における発現を上昇させる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、標的臓器以外の細胞の形質導入を低下させる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、組換え核酸ベクターによってコードされる発現可能なポリペプチドの標的臓器以外の細胞における発現を低下させる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、改変ｒＡＡＶと哺乳動物対象の細胞上で発現したＡＡＶＲとの相互作用を変更する。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、改変ｒＡＡＶとＡＡＶＲとの相互作用を減少させる。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、改変ｒＡＡＶとＡＡＶＲとの相互作用を高める。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶよりも肝毒性が低い。

【００６２】

ある特定の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓細胞への遺伝子導入の１０分の１の減少を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、アカゲザルへの第１の投与後に肝臓細胞への遺伝子導入の１０倍の増加を達成する。

【００６３】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓細胞への遺伝子導入の１００倍の増加を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓細胞への遺伝子導入の１００分の１の低下を達成する。

【００６４】

ある特定の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓細胞への遺伝子導入の１０００倍の増加を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓細胞への遺伝子導入の１０００分の１の減少を達成する。

【００６５】

「突然変異」という用語は、未処理のもしくは天然の配列における、または核酸もしくはアミノ酸における変化または変更を指す。突然変異は天然に存在する場合もあれば、突然変異が実験室で操作されている場合もある（例えば、人工の）。

【００６６】

本明細書で使用される「未改変ＡＡＶカプシドタンパク質」という用語は、天然に存在するＡＡＶ血清型のＶＰ１、ＶＰ２、またはＶＰ３の各カプシドタンパク質、または当技術分野で利用可能なまたは既知の天然に存在しないＶＰ１、ＶＰ２、またはＶＰ３の各カプシドタンパク質を指す。天然に存在しないＶＰ１、ＶＰ２、またはＶＰ３の各カプシドタンパク質には、天然に存在するＡＡＶカプシドタンパク質の生物学的または化学的変更

または変形によって生成されたカプシドタンパク質が含まれる。したがって、未改変ＡＡＶカプシドタンパク質には、それらに限定されないが、種々のＡＡＶ血清型（例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、およびＡＡＶ９）のカプシドタンパク質またはそのバリアントが含まれる。本明細書で使用される場合、「バリアント」とは、当技術分野で利用可能または既知の指示された血清型の天然に存在するまたは人工的に創製された類縁体を指す。天然に存在しないＶＰ１、ＶＰ２、またはＶＰ３の各カプシドタンパク質には、インシリコ設計または合成によって創製された人工カプシドタンパク質がさらに含まれる。人工カプシドタンパク質には、それらに限定されないが、それらが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６０１６３号、米国特許第９６９５２２０号明細書、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０４４８１９号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３２１６６号、ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０３１８５１号、およびＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０４７５４６号に開示のＡＡＶカプシドタンパク質が含まれる。

【００６７】

代表的な未改変ＡＡＶカプシドタンパク質は、限定されないが、ＡＡＶ２（配列番号１）；ＡＡＶ１（配列番号４）；ＡＡＶ６（配列番号５）；ＡＡＶ３（配列番号６）；ＡＡＶ　ＬＫ０３（配列番号７）；ＡＡＶ７（配列番号８）；ＡＡＶ８（配列番号９）；ＡＡＶ　ｈｕ．３７（配列番号１０）；ＡＡＶ　ｒｈ．１０（配列番号１１）；ＡＡＶ９（配列番号１２）；ＡＡＶ　ｈｕ．６８（配列番号１３）；ＡＡＶ１０（配列番号１４）；ＡＡＶ５（配列番号１５）；ＡＡＶ３－３（配列番号１６）；ＡＡＶ４－４（配列番号１７）；ＡＡＶ１－Ａ（配列番号１８）；ｈｕ．４６－Ａ（配列番号１９）；ｈｕ．４８－Ａ（配列番号２０）；ｈｕ．４４－Ａ（配列番号２１）；ｈｕ．４３－Ａ（配列番号２２）、ＡＡＶ６－Ａ（配列番号２３）；ｈｕ．３４－Ｂ（配列番号２４）、ｈｕ．４７－Ｂ（配列番号２５）、ｈｕ．２９－Ｂ（配列番号２６）、ｒｈ．６３－Ｂ（配列番号２７）、ｈｕ．５６－Ｂ（配列番号２８）、ｈｕ．４５－Ｂ（配列番号２９）、ｒｈ．５７－Ｂ（配列番号３０）、ｒｈ．３５－Ｂ（配列番号３１）；ｒｈ．５８－Ｂ（配列番号３２）；ｒｈ．２８－Ｂ（配列番号３３）；ｒｈ．５１－Ｂ（配列番号３４）；ｒｈ．１９－Ｂ（配列番号３５）；ｒｈ．４９－Ｂ（配列番号３６）、ｒｈ．５２－Ｂ（配列番号３７）；ｒｈ．１３－Ｂ（配列番号３８）；ＡＡＶ２－Ｂ（配列番号３９）；ｒｈ．２０－Ｂ（配列番号４０）；ｒｈ．２４－Ｂ（配列番号４１）；ｒｈ．６４－Ｂ（配列番号４２）；ｈｕ．２７－Ｂ（配列番号４３）；ｈｕ．２１－Ｂ（配列番号４４）；ｈｕ．２２－Ｂ（配列番号４５）；ｈｕ．２３－Ｂ（配列番号４６）；ｈｕ．７－Ｃ（配列番号４７）；ｈｕ．６１－Ｃ（配列番号４８）；ｒｈ．５６－Ｃ（配列番号４９）；ｈｕ．９－Ｃ（配列番号５９）；ｈｕ．５４－Ｃ（配列番号５１）；ｈｕ．５３－Ｃ（配列番号５２）；ｈｕ．６０－Ｃ（配列番号５３）；ｈｕ．５５－Ｃ（配列番号５４）；ｈｕ．２－Ｃ（配列番号５５）；ｈｕ．１－Ｃ（配列番号５６）；ｈｕ．１８－Ｃ（配列番号５７）；ｈｕ．３－Ｃ（配列番号５８）；ｈｕ．２５－Ｃ（配列番号５９）；ｈｕ．１５－Ｃ（配列番号６０）；ｈｕ．１６－Ｃ（配列番号６１）；ｈｕ．１１－Ｃ（配列番号６２）；ｈｕ．１０－Ｃ（配列番号６３）；ｈｕ．４－Ｃ（配列番号６４）；ｒｈ．５４－Ｄ（配列番号６５）；ｒｈ．４８－Ｄ（配列番号６６）；ｒｈ．５５－Ｄ（配列番号６７）；ｒｈ．６２－Ｄ（配列番号６８）；ＡＡＶ７－Ｄ（配列番号６９）；ｒｈ．５２－Ｅ（配列番号７０）；ｒｈ．５１－Ｅ（配列番号７１）；ｈｕ．３９－Ｅ（配列番号７２）；ｒｈ．５３－Ｅ（配列番号７３）；ｈｕ．３７－Ｅ（配列番号７４）；ｒｈ．４３－Ｅ（配列番号７５）；ｒｈ．５０－Ｅ（配列番号７６）；ｒｈ．４９－Ｅ（配列番号７７）；ｒｈ．６１－Ｅ（配列番号７８）；ｈｕ．４１－Ｅ（配列番号７９）；ｒｈ．６４－Ｅ（配列番号８０）；ｈｕ．４２－Ｅ（配列番号８１）；ｒｈ．５７－Ｅ（配列番号８２）；ｒｈ．４０－Ｅ（配列番号８３）；ｈｕ．６７－Ｅ（配列番号８４）；ｈｕ．１７－Ｅ（配列番号８５）；ｈｕ．６－Ｅ（配列番号８６）；ｈｕ．６６－Ｅ（配列番号８７）；ｒｈ．３８－Ｅ（配列番号８８）；ｈｕ．３２－Ｆ（配列番号８９）；ＡＡＶ９／ｈｕ（配列番号９０）；ｈｕ．３１－Ｆ（配列番号９１）；Ａｎｃ８０（配列番号９２）；Ａｎｃ８１（配列番号９

３）；Ａｎｃ８２（配列番号９４）；Ａｎｃ８３（配列番号９５）；Ａｎｃ８４（配列番号９６）；Ａｎｃ９４（配列番号９７）；Ａｎｃ１１３（配列番号９８）；Ａｎｃ１２６（配列番号９９）；Ａｎｃ１２７（配列番号１００）；Ａｎｃ８０Ｌ２７（配列番号１０１）；Ａｎｃ８０Ｌ５９（配列番号１０２）；Ａｎｃ８０Ｌ６０（配列番号１０３）；Ａｎｃ８０Ｌ６２（配列番号１０４）；Ａｎｃ８０Ｌ６５（配列番号１０５）；Ａｎｃ８０Ｌ３３（配列番号１０６）；Ａｎｃ８０Ｌ３６（配列番号１０７）；Ａｎｃ８０Ｌ４４（配列番号１０８）；Ａｎｃ８０Ｌ１（配列番号１０９）；Ａｎｃ１１０（配列番号１１０）；およびＡｎｃ８０ＤＩ（配列番号１１１）から選択されるＡＡＶのＶＰ１、ＶＰ２またはＶＰ３の各カプシドタンパク質とすることができる。

【００６８】

本明細書で使用される「未改変ｒＡＡＶ」という用語は、未改変ＡＡＶカプシドタンパク質のみを含む組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）を指す。

【００６９】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、方法および物質の組成物が属する技術の当業者により、一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載された方法および材料と類似または等価の方法および材料が、方法および物質の組成物の実行または試験に使用することができるが、適切な方法および材料について下に記載する。加えて、材料、方法および例は、例示に過ぎず、限定することを意図しない。本明細書で述べられた全ての刊行物、特許出願、特許、および他の引用文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【００７０】

【図１】プールされたバーコード化ライブラリー内のＡＡＶバリアント用のライブラリー構築物の最小設計を示す概略図である。ＩＴＲ、逆位末端反復；ポリＡ、ポリアデニル化シグナル；ＯＲＦ、オープンリーディングフレーム。

【図２】ＡＡＶ２カプシドタンパク質配列（配列番号１）に対するＡｎｃ１２６（配列番号９９）ＶＰ１およびＡｎｃ１２７（配列番号１００）ＶＰ１のカプシドタンパク質配列のアライメントの図である。ＡＡＶＲフットプリント（ＡＡＶカプシドタンパク質配列のＡＡＶＲ結合ドメイン）と相互作用すると予測されるＡＡＶ２カプシド配列の残基は枠で囲まれている。

【図３】マウスの肝臓への標的指向化に関するＡｎｃ１２６バリアントの相対的ランクを例示するフィンガープリントプロットの図である。各Ａｎｃ１２６バリアントを、マルチプレックスＡｎｃ１２６ライブラリーのＩＶ投与後の肝臓取込みに基づいて上位から下位までランク付けした。列は、Ａｎｃ１２６内の多様性を構成する、バリエーションの９カ所の位置を示す。バリエーションの各位置は可能な２個の残基を有するが、ここでは黒色または白色として表されている。上位半分の順位または下位半分の順位いずれかにおけるその特定の残基（すなわち、黒）を有するバリアントのパーセントを、添付の表に指示する。

【図４】マウスの肝臓への標的指向化に関するＡｎｃ１２７バリアントの相対的ランクを例示するフィンガープリントプロットの図である。各Ａｎｃ１２７バリアントを、マルチプレックスＡｎｃ１２７ライブラリーのＩＶ投与後の肝臓取込みに基づいて上位から下位までランク付けした。列は、Ａｎｃ１２７内の多様性を構成する、バリエーションの１０カ所の位置を示す。バリエーションの各位置は可能な２個の残基を有するが、ここでは黒色または白色として表されている。上位半分の順位または下位半分の順位いずれかにおけるその特定の残基（すなわち、黒）を有するバリアントのパーセントを、添付の表に指示する。

【図５】マウスの肝臓への標的指向化に関するＡｎｃ１２６（５Ａ）およびＡｎｃ１２７（５Ｂ）のバリアントの相対的順位を例示するフィンガープリントプロットの図である。Ａｎｃ１２６およびＡｎｃ１２７の各バリアントを、マルチプレックスＡｎｃ１２６およびＡｎｃ１２７のライブラリーのＩＶ投与後の肝臓取込みに基づいて上位から下位までラ

ンク付けした。列は、Ａｎｃ１２６およびＡｎｃ１２７のライブラリー内の多様性を構成する、バリエーションの位置を示す。バリエーションの各位置は可能な２個の残基を有するが、ここでは黒色または白色として表されている。上位半分の順位または下位半分の順位いずれかにおけるその特定の残基（すなわち、黒）を有するバリアントのパーセントを、添付の表に指示する。

【図６】異なる２匹の非ヒト霊長類に投与された、残基２６６にグリシン（黒）またはアラニン（白）を有するＡｎｃ８０ライブラリーのフィンガープリントプロットの図である。

【図７－１】本明細書に記載の方法で使用することができるＶＰ１カプシドタンパク質（ＡＡＶ２（配列番号１）；ＡＡＶ１（配列番号４）；ＡＡＶ６（配列番号５）；ＡＡＶ３（配列番号６）；ＡＡＶ　ＬＫ０３（配列番号７）；ＡＡＶ７（配列番号８）；ＡＡＶ８（配列番号９）；ＡＡＶ　ｈｕ．３７（配列番号１０）；ＡＡＶ　ｒｈ．１０（配列番号１１）；ＡＡＶ９（配列番号１２）；ＡＡＶ　ｈｕ．６８（配列番号１３）；ＡＡＶ１０（配列番号１４）；およびＡＡＶ５（配列番号１５））のアライメントを表す図である。本明細書に記載の可変トグル残基の位置は枠で囲まれている。

【図７－２】（［図７－１］の説明と同じ。）

【図７－３】（［図７－１］の説明と同じ。）

【図８－１】本明細書に記載の方法で使用することができるＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列（ＡＡＶ５（配列番号１５）；ＡＡＶ３－３（配列番号１６）；ＡＡＶ４－４（配列番号１７）；ＡＡＶ１－Ａ（配列番号１８）；ｈｕ．４６－Ａ（配列番号１９）；ｈｕ．４８－Ａ（配列番号２０）；ｈｕ．４４－Ａ（配列番号２１）；ｈｕ．４３－Ａ（配列番号２２）、ＡＡＶ６－Ａ（配列番号２３）；ｈｕ．３４－Ｂ（配列番号２４）、ｈｕ．４７－Ｂ（配列番号２５）、ｈｕ．２９－Ｂ（配列番号２６）、ｒｈ．６３－Ｂ（配列番号２７）、ｈｕ．５６－Ｂ（配列番号２８）、ｈｕ．４５－Ｂ（配列番号２９）、ｒｈ．５７－Ｂ（配列番号３０）、ｒｈ．３５－Ｂ（配列番号３１）；ｒｈ．５８－Ｂ（配列番号３２）；ｒｈ．２８－Ｂ（配列番号３３）；ｒｈ．５１－Ｂ（配列番号３４）；ｒｈ．１９－Ｂ（配列番号３５）；ｒｈ．４９－Ｂ（配列番号３６）、ｒｈ．５２－Ｂ（配列番号３７）；ｒｈ．１３－Ｂ（配列番号３８）；ＡＡＶ２－Ｂ（配列番号３９）；ｒｈ．２０－Ｂ（配列番号４０）；ｒｈ．２４－Ｂ（配列番号４１）；ｒｈ．６４－Ｂ（配列番号４２）；ｈｕ．２７－Ｂ（配列番号４３）；ｈｕ．２１－Ｂ（配列番号４４）；ｈｕ．２２－Ｂ（配列番号４５）；ｈｕ．２３－Ｂ（配列番号４６）；ｈｕ．７－Ｃ（配列番号４７）；ｈｕ．６１－Ｃ（配列番号４８）；ｒｈ．５６－Ｃ（配列番号４９）；ｈｕ．９－Ｃ（配列番号５９）；ｈｕ．５４－Ｃ（配列番号５１）；ｈｕ．５３－Ｃ（配列番号５２）；ｈｕ．６０－Ｃ（配列番号５３）；ｈｕ．５５－Ｃ（配列番号５４）；ｈｕ．２－Ｃ（配列番号５５）；ｈｕ．１－Ｃ（配列番号５６）；ｈｕ．１８－Ｃ（配列番号５７）；ｈｕ．３－Ｃ（配列番号５８）；ｈｕ．２５－Ｃ（配列番号５９）；ｈｕ．１５－Ｃ（配列番号６０）；ｈｕ．１６－Ｃ（配列番号６１）；ｈｕ．１１－Ｃ（配列番号６２）；ｈｕ．１０－Ｃ（配列番号６３）；ｈｕ．４－Ｃ（配列番号６４）；ｒｈ．５４－Ｄ（配列番号６５）；ｒｈ．４８－Ｄ（配列番号６６）；ｒｈ．５５－Ｄ（配列番号６７）；ｒｈ．６２－Ｄ（配列番号６８）；ＡＡＶ７－Ｄ（配列番号６９）；ｒｈ．５２－Ｅ（配列番号７０）；ｒｈ．５１－Ｅ（配列番号７１）；ｈｕ．３９－Ｅ（配列番号７２）；ｒｈ．５３－Ｅ（配列番号７３）；ｈｕ．３７－Ｅ（配列番号７４）；ｒｈ．４３－Ｅ（配列番号７５）；ｒｈ．５０－Ｅ（配列番号７６）；ｒｈ．４９－Ｅ（配列番号７７）；ｒｈ．６１－Ｅ（配列番号７８）；ｈｕ．４１－Ｅ（配列番号７９）；ｒｈ．６４－Ｅ（配列番号８０）；ｈｕ．４２－Ｅ（配列番号８１）；ｒｈ．５７－Ｅ（配列番号８２）；ｒｈ．４０－Ｅ（配列番号８３）；ｈｕ．６７－Ｅ（配列番号８４）；ｈｕ．１７－Ｅ（配列番号８５）；ｈｕ．６－Ｅ（配列番号８６）；ｈｕ．６６－Ｅ（配列番号８７）；ｒｈ．３８－Ｅ（配列番号８８）；ｈｕ．３２－Ｆ（配列番号８９）；ＡＡＶ９／ｈｕ（配列番号９０）；およびｈｕ．３１－Ｆ（配列番号９１）のアライメントを表す図である。本明細書に記載の可変トグル残基の位置は枠で囲まれている。

【図８－２】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－３】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－４】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－５】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－６】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－７】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－８】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－９】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１０】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１１】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１２】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１３】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１４】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１５】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１６】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１７】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１８】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－１９】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２０】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２１】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２２】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２３】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２４】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２５】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２６】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２７】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２８】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－２９】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－３０】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図８－３１】（［図８－１］の説明と同じ。）
【図９－１】本明細書に記載の方法で使用することができるＡＡＶ　Ａｎｃカプシドタンパク質のアミノ酸配列（Ａｎｃ８０（配列番号９２）、Ａｎｃ８１（配列番号９３）、Ａｎｃ８２（配列番号９４）、Ａｎｃ８３（配列番号９５）、Ａｎｃ８４（配列番号９６）、Ａｎｃ９４（配列番号９７）、Ａｎｃ１１３（配列番号９８）、Ａｎｃ１２６（配列番号９９）、Ａｎｃ１２７（配列番号１００）、Ａｎｃ８０Ｌ２７（配列番号１０１）、Ａｎｃ８０Ｌ５９（配列番号１０２）、Ａｎｃ８０Ｌ６０（配列番号１０３）、Ａｎｃ８０Ｌ６２（配列番号１０４）、Ａｎｃ８０Ｌ６５（配列番号１０５）、Ａｎｃ８０Ｌ３３（配列番号１０６）、Ａｎｃ８０Ｌ３６（配列番号１０７）、Ａｎｃ８０Ｌ４４（配列番号１０８）；Ａｎｃ８０Ｌ１（配列番号１０９）；Ａｎｃ１１０（配列番号１１０）、Ａｎｃ８０ＤＩ（配列番号１１１）のアライメントを表す図である。　配列のうち、配列番号９２～１００は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，６９５，２２０号明細書に開示の祖先ＡＡＶカプシドライブラリーの配列である。ライブラリーは、Ａｎｃ８０（配列番号９２）、Ａｎｃ８１（配列番号９３）、Ａｎｃ８２（配列番号９４）、Ａｎｃ８３（配列番号９５）、Ａｎｃ８４（配列番号９６）、Ａｎｃ９４（配列番号９７）、Ａｎｃ１１３（配列番号９８）、Ａｎｃ１２６（配列番号９９）、Ａｎｃ１２７（配列番号１００）を含む。図９－１、９－２、９－３、および９－４は、各ライブラリーの単一メンバー配列（配列番号９２～１００）を使用して作成したが、ライブラリーの他のメンバーを用いて同じ解析およびアライメントを行って、可変トグル残基の位置を特定することができる。　本明細書に記載の可変トグル残基の位置は枠で囲まれている。トグル部位の１個または複数のアミノ酸を、本明細書に記載のように置換する、挿入す

る、および／または欠失させて、所望のＡＡＶ生体内分布を達成することができる。
【図９－２】（［図９－１］の説明と同じ。）
【図９－３】（［図９－１］の説明と同じ。）
【図９－４】（［図９－１］の説明と同じ。）
【発明を実施するための形態】
【００７１】
本開示が指示するところは、ＡＡＶとＡＡＶＲとの間の相互作用に関する様々なポイントを通して、肝臓の細胞へのおよび肝臓の細胞の中へのＡＡＶの生体内分布（例えば、ベクターの取込みおよび形質導入の量）ならびに標的細胞の導入遺伝子などの発現可能な核酸の発現を、調節する（例えば、低下または上昇させる）ことができるとともに、一方、他の臓器や筋肉などの末梢組織の細胞の形質導入を維持しまたは高めさえもすることである。本開示は、指針であって、ＡＡＶが細胞に機能的に侵入し、形質導入するように、ＡＡＶがＡＡＶ受容体と会合しこれに結合するＡＡＶの能力を維持するが、その上で、形質導入を改変するのに十分な様式で、ＡＡＶの親和性、結合活性、結合、および解離定数、および／または受容体－リガンド動態を変化させ、その結果、ｉｎ　ｖｉｖｏ投与後の体内で、肝臓およびその他の臓器および組織、例えば、筋肉組織における細胞へのＡＡＶの生体内分布を変更する、ような形で、ＡＡＶカプシドタンパク質配列を変更してＡＡＶＲ－ＡＡＶ相互作用を調節する方法に関する、指針を提供する。本開示に基づいて、ＡＡＶの配列を変更して、例えば、患者または対象内で、肝臓細胞およびその他の細胞へのＡＡＶの結合を阻害することなく、肝臓細胞のＡＡＶによる形質導入を調節することによって、ＡＡＶの生体内分布を調節することができる。
【００７２】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）
実験的または治療的目的のいずれかのための遺伝子導入は、遺伝子情報を標的細胞にシャトルするのにベクターまたはベクターシステムを必要とする。ベクターまたはベクターシステムは、遺伝子導入反応の効率、特異性、宿主応答、薬理学、および寿命の主な決定要因と考えられている。現在、遺伝子導入を行うのに最も効率的かつ効果的な方法は、複製欠損とされたウイルスに基づくベクターまたはベクターシステムの使用によるものである。遺伝子治療媒体として成功を示したベクターの一部は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）に基づいている。
【００７３】
ウイルスポリペプチドは、例えば、パッケージング宿主細胞を使用してウイルス粒子に組み立てることができる。ウイルス粒子の成分（例えば、ｒｅｐ配列、ｃａｐ配列、逆位末端反復（ＩＴＲ）配列）は、本明細書に記載の１つまたは複数のウイルスベクターを使用して、パッケージング宿主細胞に導入することができる。一度組み立てれば、肝臓を標的とするその能力についてウイルス粒子をスクリーニングすることができる。肝臓を標的とするＡＡＶの能力を決定する方法は、本明細書に記載されている（例をあげると、実施例３を参照されたい）。
【００７４】
加えて、本明細書に記載のウイルス粒子は、任意の数の他の特性または表現型（例えば、複製する能力；遺伝子導入特性；受容体結合能力；および／または集団における血清有病率）についてスクリーニングすることができる。加えて、ウイルス粒子がその受容体に結合するかどうか判定する方法は当技術分野で知られており、かかる方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで行うことができる。
【００７５】
ウイルス粒子は、所望であれば、ルーチン法を使用して精製することができる。本明細書で使用される場合、「精製された」ウイルス粒子とは、これらが作製された、それらに限定されないが、ウイルス成分（例えば、ｒｅｐ配列、ｃａｐ配列）、パッケージング宿主細胞、および部分的または不完全に組み立てられたウイルス粒子などの混合物中の成分から取り出されるウイルス粒子を指す。

【００７６】
ＡＡＶ肝臓トグル
先に、当該位置で異なる２つのアミノ酸（グリシンとアラニン）の間でトグル切替え（toggled）を行うと、マウス、非ヒト霊長類、およびヒト化肝臓を有するマウス、ならびにヒト肝細胞の共培養物において、ＡＡＶを静脈内注射した後、肝臓取込みおよび発現を定量的に変更した、ＡＡＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質内の特定の位置が特定された（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／２１７９１１号パンフレットを参照されたい）。この観察は、Ａｎｃ８０ＡＡＶバリアントライブラリーを使用して最初になされた；Ａｎｃ８０は、予測された祖先ＡＡＶ足場配列である（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第２０１５／０５４６５３号パンフレットを参照されたい）。この観察は重要であるが、なぜなら、そういった特定の残基の変化（ＧからＡ、またはＡからＧ）は、起こり得る最も保存的なアミノ酸置換のうちの１つであり、その上で、かかる保存的変化によって極めて明確な肝臓－オン／肝臓－オフのトグル切替え（toggling）がなおも付与されるからである。
【００７７】
さらなる研究によって、こういった保存されたトグルの関連性が、天然のＡＡＶバリアントであるＡＡＶ３ＢおよびＡＡＶ９を含めて、他のＡＡＶウイルスにまで拡大されたが、この場合、上記の天然のバリアントはそれぞれ「肝臓－オフ」の位置または「肝臓－オン」の位置にあったのである。この研究に基づいて、指示されたアミノ酸置換を作製することにより、各肝臓の状態を逆の状態に変換することができた（例えば、国際公開第２０１９／２１７９１１号パンフレットを参照されたい）。加えて、Ａｎｃ８０およびＡＡＶ９の肝臓トグル「オフ」バリアントに関するデータが実証したところは、肝臓への標的指向化が大幅に減少する一方で、筋肉などの非肝臓組織での取込みが定量的に保たれるか、ある特定の場合では、上昇することである。
【００７８】
本明細書に記載の「肝臓トグル」配列のうちの１つまたは複数を特定することおよび変化させること（例えば、ＡＡＶを肝臓－オンから肝臓－オフに、またはその逆に変化させるため）には、生成する構造的特徴の構成による場合があるが、配列の構成が保たれることが必要であることを、当業者であれば理解するであろう。少なくともこの理由のために、本明細書で言及される位置の番号付けは、配列番号１に示される、ＡＡＶ２　ＶＰ１タンパク質の配列に対するものである。天然に存在する例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ｒｈ．１０、ｈｕ．３７、ＬＫ－０３、ＡＡＶ５、ＡＡＶ１０、およびＨｕ６８であろうと、または、改変のもしくはバリアントの、例えばＡＡＶ　ＳｈＨ１０、およびＡＡＶ－ＤＪであろうとも、ならびにバリアントの、例えばＡｎｃ８０　ＡＡＶバリアントライブラリー（例えば、国際公開第２０１５／０５４６５３号パンフレットを参照されたい）Ａｎｃ８０；Ａｎｃ８１；Ａｎｃ８２；Ａｎｃ８３；Ａｎｃ８４；Ａｎｃ９４；Ａｎｃ１１３；Ａｎｃ１２６；Ａｎｃ１２７；Ａｎｃ８０Ｌ２７；Ａｎｃ８０Ｌ５９；Ａｎｃ８０Ｌ６０；Ａｎｃ８０Ｌ６２；Ａｎｃ８０Ｌ６５；Ａｎｃ８０Ｌ３３；Ａｎｃ８０Ｌ３６；Ａｎｃ８０Ｌ４４；Ａｎｃ８０Ｌ１；Ａｎｃ１１０；Ａｎｃ８０ＤＩであろうとも、任意のＡＡＶを未改変配列、すなわち参照配列として使用することが可能であるが、異なる参照配列が使用される場合、数値上の位置は本明細書で言及されるものから変化する場合があることが理解されよう。
【００７９】
配列の構成、または他方に対する一方の配列における１個または複数のアミノ酸の位置は、典型的には、配列アライメントアルゴリズムを使用して決定される（例えば、ワールドワイドウェブ上でｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖで利用可能なＢＬＡＳＴ（基本ローカル整列化検索ツール）プログラムに組み込まれている、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389 3402）。ＢＬＡＳＴまたは類似のアルゴリズムを使用して、２つの配列のアライメントを取り（例えば、２つの配列が例えば長さが異なっていても、「対応する」位置で残基を特定して）、その結果、モチーフまたはコンセンサス

配列を特定することができ、および／または２つ以上の配列（核酸またはアミノ酸）間のパーセント配列同一性を決定することができる。

【００８０】

本明細書で使用される場合、２つの配列を比較する場合に使用される「デフォルトパラメーター」は、２０２０年９月９日にワールドワイドウェブ上でｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖで実装されたＢＬＡＳＴアルゴリズム（Ｖｅｒｓｉｏｎ　ＢＬＡＳＴ＋　２．１０．１）を使用するデフォルトパラメーターである。タンパク質配列のアライメントを取る場合、デフォルトのパラメーターはＢＬＡＳＴＰである：パラメーターは短い入力配列に対して自動的に調整；予測される閾値：１０；ワードサイズ：３；クエリ－範囲における最大一致：０；行列：ＢＬＯＳＵＭ６２；ｇａｐコスト：存在１１，拡張１；組成調整（compositional adjustments）：条件付き組成スコア行列調整（conditional compositional score matrix adjustment）；およびフィルターまたはマスクなし。核酸配列のアライメントを取る場合、デフォルトのパラメーターはＢＬＡＳＴＮである：パラメーターは短い入力配列に対して自動的に調整；予測される閾値：１０；ワードサイズ：２８；クエリ－範囲における最大一致：０；マッチ／ミスマッチスコア：１，－２；ｇａｐコスト：リニア；フィルター：複雑度が低い領域；およびマスク：早見表の場合のみ。

【００８１】

例えば、いくつかの様々なＡＡＶ血清型由来のＶＰ１カプシドタンパク質の図７および図８に示されるアライメント、または同様に作成されたアライメントは、「パイルアップ」と呼ばれることもあるが、例えば、ＡＡＶ２またはその他の未改変ＡＡＶ配列に対するアミノ酸の位置を特定するのに使用することができる、一方法である。

【００８２】

ＡＡＶ－ＡＡＶＲの相互作用

ＡＡＶ４およびｒｈ．３２．３３以外のＡＡＶ血清型の大多数は、細胞の形質導入のためにＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）を必要とし、したがってこれに依存性であることが先に示されている（Dudek et al., 2018, J. Virol., 92(7) pii: e02213-17）。本開示では、結合（例えば、親和性および／または結合活性）を変更してこの相互作用に改変された「オフ」率をもたらすことによって、ＡＡＶＲ－ＡＡＶ相互作用を調節するために、ＡＡＶカプシドタンパク質配列に起こすことができる特定の変化について、記載する。ｉｎ　ｖｉｖｏで使用される場合、ＡＡＶカプシドタンパク質配列に対するそうした特定の変化によって、肝臓取込みの「肝臓－オン」ベクターと「肝臓－オフ」ベクターとの関係が劇的に変更されるが、このことが示唆するところは、ＡＡＶＲ－ＡＡＶ相互作用の親和性が減少すると、血中を循環し、肝臓を通過するベクターの構成中の肝臓トグルオフベクターの結合および最終的な取込みが、制限されることである。

【００８３】

本明細書に記載のデータがさらに指示するところは、非肝臓組織、特に血管系から区画化されたそうした組織（例えば、筋肉組織）において、ＡＡＶの取込みおよび形質導入は保たれており、ある特定の実施形態では、肝臓を脱標的化した（liver-de-targeted）ベクターについては高まることである。理論に拘束されることを望むものではないが、このことは、そうした非肝臓組織では、ＡＡＶＲ－ＡＡＶ結合親和性は、血行路が存在しない場合よりも形質導入への影響力が小さいからかもしれないと思われ、したがってＡＡＶはより長い持続期間、組織に近接して存在し、その結果、最終的な組織標的指向化に及ぼす結合動態の影響を低減させる。再び、理論に拘束されることを望むものではないが、ある特定の非肝臓組織で観察される、肝臓を脱標的化したＡＡＶの形質導入に関するレベル上昇は、肝臓取込みによって枯渇するＡＡＶは少ないと思われるので、生体内分布の上昇に起因すると付加的におよび／または代替的に考えられる。

【００８４】

ＡＡＶＲはほとんどの組織で多量に発現していると思われ、そのレベルはほとんどの組織にわたって比較的類似していると思われる。したがって、初期の予想に反して、ＡＡＶ

Ｒ発現が豊富であることはＡＡＶの組織向性の直接的な予兆ではなかった。代わりに、本明細書に開示のデータに基づくと、ＡＡＶ組織向性は、ＡＡＶＲへの依存性を保持するＡＡＶ配列バリアントを含めて、主として変更されたＡＡＶ配列バリアントの影響を受ける。このことによって、ＡＡＶの構造がＡＡＶＲへの結合および／またはＡＡＶＲへの結合に関与する細胞補因子の会合に影響を与えることができることが示唆されている。

【００８５】

ＡＡＶの生体内分布を改変する方法

ＡＡＶ核酸分子に変化を導入し、その結果、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列の変化を起こすことができる。例えば、突然変異誘発（例えば、部位特異的突然変異誘発、ＰＣＲ媒介突然変異誘発、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはその他の部位特異的エンドヌクレアーゼ媒介突然変異誘発）を使用して、またはかかる変化を有する核酸分子を化学的に合成することによって、核酸コード配列に変化を導入することができる。かかる核酸の変化は、１個または複数のアミノ酸残基で保存的および／または非保存的アミノ酸置換をもたらすことができる。「保存的アミノ酸置換」とは、一アミノ酸残基が類似の側鎖を有する異なるアミノ酸残基と置き換えられているものである（例えば、アミノ酸置換に関する度数分布表を提供する、Dayhoff et al.（1978, in Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(Suppl. 3):345-352）を参照されたい）。非保存的置換とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有さないアミノ酸残基と置き換えられているものである。

【００８６】

本明細書に記載のように、カプシドタンパク質中の、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６またはＶ７０８の各位置（ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）は、ＡＡＶＲへの結合に関与しており、これらの位置のいずれか１つまたは複数を、それらの当初のアミノ酸から、例えば、そういった位置にある野生型または天然に存在するアミノ酸から、またはバリアントＡＡＶ内のそういった位置に存在するアミノ酸から、変化させて、肝臓細胞に形質導入するＡＡＶの能力を変更する様式で、改変ＡＡＶカプシドタンパク質と肝臓細胞上のＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）との間の結合を改変する（しかし阻害しない）ことができ、その結果、ＡＡＶが対象または患者に投与されそしてその血行路に入ると、肝臓細胞への向性または生体内分布が変更される。したがって、改変された（例えば、天然に存在しない）ＡＡＶの向性に関して変更をもたらす様式で、示された位置で１個または複数の残基に変化を起こすが、この変化によって所与の細胞へのＡＡＶＲへのＡＡＶの結合を阻害せず、このことによって、肝臓を脱標的化したＡＡＶが体内の他の種類の細胞に結合し、形質導入することが可能となる。

【００８７】

具体的には、ＡＡＶのＶＰ１カプシドタンパク質内の少なくとも４４６、４７１、および／または７０８の位置（ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）は、それらの当初の、または野生型の配列から変化させることができる。下の実施例で実証されるように、ＡＡＶカプシドが位置４４６にＲ、位置４７１にＡ、および／または位置７０８にＴを含有する場合、肝臓細胞への生体内分布を上昇させることができるが、一方、ＡＡＶカプシドが位置４４６にＳ、位置４７１にＳ、および／または位置７０８にＡ（ＡＡＶ２（配列番号１）に対して全て番号付けされている）を含有する場合、肝臓細胞への生体内分布を低下させることができる。一部の実施形態では、ＶＰ１タンパク質は、以下の変化のうちの１個または複数を含有する：Ｓ４４６Ｎ、Ｓ４４６Ｒ、Ｒ４７１Ａ、Ｒ４７１Ｓ、Ｖ７０８Ｔ、またはＶ７０８Ａ（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）。

【００８８】

具体的には、ＡＡＶのＶＰ１カプシドタンパク質内の少なくとも４４６、４７１、および／または７０８の位置（ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）は、それらの当初の、または野生型の配列から変化させることができる。

下の実施例で実証されるように、ＡＡＶカプシドが位置４４６にＲ、位置４７１にＡ、および／または位置７０８にＴを含有する場合、肝臓細胞への生体内分布を上昇させることができるが、一方、ＡＡＶカプシドが位置４４６にＳ、位置４７１にＳ、および／または位置７０８にＡ（ＡＡＶ２（配列番号１）に対して全て番号付けされている）を含有する場合、肝臓細胞への生体内分布を低下させることができる。一部の実施形態では、ＶＰ１タンパク質は、以下の変化のうちの１個または複数を含有する：Ｓ４４６Ｎ、Ｓ４４６Ｒ、Ｒ４７１Ａ、Ｒ４７１Ｓ、Ｖ７０８Ｔ、またはＶ７０８Ａ（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）。

【００８９】

具体的には、ＡＡＶのＶＰ１カプシドタンパク質内の少なくとも２６６、２７１、および／または４４６の位置（ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）は、それらの当初の、または野生型の配列から変化させることができる。ＡＡＶカプシドが、例えば位置２６６にＡもしくはＧ、位置２７１にＨもしくはＴ、および／または位置４４６にＳ、Ｎもしくは Ｒを含有する場合（ＡＡＶ２（配列番号１）に対して全て番号付けされている）、肝臓細胞への生体内分布を変更することができる。一部の実施形態では、ＶＰ１タンパク質は、以下の変化のうちの１個または複数を含有する：Ａ２６６Ｇ、Ｈ２７１Ｔ、Ｒ４４６Ａ、またはＲ４４６Ｓ（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）。

【００９０】

具体的には、ＡＡＶのＶＰ１カプシドタンパク質内の少なくとも４７１、５８９、および／または７０８の位置（ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）は、それらの当初の、または野生型の配列から変化させることができる。ＡＡＶカプシドが、例えば位置４７１にＲ、Ａもしくは Ｓ、位置５８９にＱもしくはＡ、および／または位置７０８にＶ、Ｔもしくは Ａを含有する場合（ＡＡＶ２（配列番号１）に対して全て番号付けされている）、肝臓細胞への生体内分布を変更することができる。一部の実施形態では、ＶＰ１タンパク質は、以下の変化のうちの１個または複数を含有する：Ｒ４７１Ａ、Ｒ４７１Ｓ、Ｑ５８９Ａ、Ｖ７０８Ｔ、またはＶ７０８Ａ（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）。

【００９１】

具体的には、ＡＡＶのＶＰ１カプシドタンパク質内の少なくとも２６６、４４６、および／または５８９の位置（ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）は、それらの当初の、または野生型の配列から変化させることができる。下の実施例で実証されるように、ＡＡＶカプシドが位置２６６にＡもしくはＧ、位置４４６にＳ、Ｎもしくは Ｒ、および／または位置５８９にＱもしくはＡを含有する場合（ＡＡＶ２（配列番号１）に対して全て番号付けされている）、肝臓細胞への生体内分布を変更することができる。一部の実施形態では、ＶＰ１タンパク質は、以下の変化のうちの１個または複数を含有する：Ａ２６６Ｇ、Ｓ４４６Ｎ、Ｓ４４６Ｒ、またはＱ５８９Ｒ（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）。

【００９２】

具体的には、ＡＡＶのＶＰ１カプシドタンパク質内の少なくとも２７１、４４６、および／または４７１の位置（ＡＡＶ２　ＶＰ１カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）は、それらの当初の、または野生型の配列から変化させることができる。ＡＡＶカプシドが位置２７１にＨもしくはＴ、位置４４６にＳ、Ｎもしくは Ｒ、および／または位置４７１にＲ、Ａもしくは Ｓを含有する場合（ＡＡＶ２（配列番号１）に対して全て番号付けされている）、肝臓細胞への生体内分布を変更することができる。一部の実施形態では、ＶＰ１タンパク質は、以下の変化のうちの１個または複数を含有する：Ｈ２７１Ｔ、Ｓ４４６Ｎ、Ｓ４４６Ｒ、Ｒ４７１ＡまたはＲ４７１Ｓ（ＡＡＶ２カプシド配列（配列番号１）に対して番号付けされている）。

【００９３】

核酸は、限定されないが、化学合成、組換え核酸技術、および／またはポリメラーゼ連

鎖反応（ＰＣＲ）を含めて、任意の数の方法を使用して入手または生成することができる。一般的なＰＣＲ技法は、例えばPCR Primer：A Laboratory Manual（Dieffenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995）に記載されており、組換え核酸技法は、例えば制限酵素消化およびライゲーションを含む。例えば、Sambrook et al.（1989, Molecular Cloning; a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）を参照されたい。

【００９４】

ポリペプチドをコードする核酸分子を含有するベクターもまた、提供される。発現ベクターを含めて、ベクターは、市販されており、または、組換え技術に生成することができる。核酸分子を含有するベクターは、かかる核酸分子に作動可能に連結された、発現用の１個または複数のエレメントを有することができるとともに、さらに、選択可能マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）をコードするもの、および／またはポリペプチドの精製において使用することができるもの（例えば、６ｘＨｉｓタグ）などの配列を含むことができる。発現用のエレメントは、核酸がコードする配列の発現を方向付け調節する核酸配列を含む。発現エレメントの一例は、プロモーター配列である（例えば、ＣＭＶまたは限定されないが、ｐ５、ｐｌ９、およびｐ４０などの他の適切なウイルスプロモーター）。発現エレメントはまた、核酸分子の発現を調節する、イントロン、エンハンサー配列、応答エレメント、または誘導性エレメントのうちの１つまたは複数を含むことができる。発現エレメントは、細菌、酵母、昆虫、哺乳動物、またはウイルスの起源のものとすることができ、ベクターは、様々な起源由来の発現エレメントの組合せを含有することができる。本明細書で使用される場合、作動可能に連結されるとは、発現用のエレメントが、コード配列の発現を方向付けるまたは調節するように、ベクター中にコード配列に対して配置されていることを意味する。

【００９５】

核酸分子、例えば、ベクター（例えば、発現ベクター、ウイルスベクター）の核酸分子を、宿主細胞中に導入することができる。「宿主細胞」という用語は、核酸分子がその中に導入されている特定の細胞を指すだけではなく、かかる細胞の子孫または潜在的な子孫をも指す。適切な多くの宿主細胞が、当業者に知られており；宿主細胞は、原核細胞（例えば、大腸菌（E. coli））であっても、真核細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳動物細胞）であってもよい。代表的な宿主細胞には、限定されないが、Ａ５４９、ＷＥＨＩ、３Ｔ３、１０Ｔ１／２、ＢＨＫ、ＭＤＣＫ、ＣＯＳ　１、ＣＯＳ　７、ＢＳＣ　１、ＢＳＣ　４０、ＢＭＴ　１０、ＶＥＲＯ、ＷＩ３８、ＨｅＬａ、２９３細胞、Ｓａｏｓ、Ｃ２Ｃ１２、Ｌ細胞、ＨＴ１０８０、ＨｅｐＧ２、ならびに、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、およびハムスターを含めて、哺乳動物に由来する初代線維芽細胞、肝細胞、および筋芽細胞が含まれ得る。核酸分子を宿主細胞中に導入する方法は、当技術分野において良く知られており、限定されないが、それには、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクション、マイクロインジェクション、およびウイルス媒介性核酸導入（例えば、形質導入）が含まれる。

【００９６】

トグル部位

本開示では、ｒＡＡＶが哺乳動物対象に投与される場合、ｉｎ　ｖｉｖｏで標的指向化を変化させるように改変することができる、ＡＡＶカプシドタンパク質の特定の残基が提供される。特定の残基の改変によって、標的細胞の形質導入および／または標的細胞における導入遺伝子の発現を変更することができる。特定の残基はトグル部位と呼ばれる。

【００９７】

トグル部位は、具体的には、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６およびＶ７０８で、ＡＡＶカプシドタンパク質とＡＡＶＲとの間の相互作用に関与するアミノ酸残基を含み、ここで、アミノ酸の位置は、配列番号１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。図

７－１～７－３、図８－１～８－３１および図９－１～９－４に、種々の未改変ＡＡＶＶＰ１カプシドタンパク質のアミノ酸配列上で強調されているそれぞれのトグル部位を示す。

【００９８】

ＡＡＶの標的特異的向性は、トグル部位で１個または複数のアミノ酸を変化させることによって変更することできる。本明細書で提供の改変カプシドタンパク質（例えば、改変ＶＰ１カプシド）は、未改変のカプシドタンパク質と比較して、トグル部位、すなわちＱ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８に、１個または複数のアミノ酸の相違を含む。

【００９９】

一部の実施形態では、改変は、Ｓ４４６、Ｒ４７１およびＶ７０８からなる選択されたトグル部位で導入される。一部の実施形態では、改変はＡ２６６にはない。

【０１００】

トグル部位の改変によって、改変ｒＡＡＶの生体内分布を変更することができる。一部の実施形態では、改変によって、未改変ｒＡＡＶと比較して、標的細胞の形質導入が高まる。一部の実施形態では、改変によって、標的細胞において、未改変ｒＡＡＶと比較して、改変ｒＡＡＶにより送達される発現可能なポリヌクレオチドの発現が上昇する。一部の実施形態では、改変によって、未改変ｒＡＡＶと比較して、標的細胞の形質導入が低下する。一部の実施形態では、改変によって、標的細胞において、未改変ｒＡＡＶと比較して、改変ｒＡＡＶにより送達される発現可能なポリヌクレオチドの発現が低下する。一部の実施形態では、標的は肝臓であり、標的細胞は肝細胞である。一部の実施形態では、標的は肝臓ではない。

【０１０１】

改変ＡＡＶカプシドタンパク質

本開示の改変カプシドタンパク質は、未改変ｒＡＡＶの生体内分布と比較して、哺乳動物対象への投与後のｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段を含み、未改変ｒＡＡＶは、前記手段を除いて、改変ｒＡＡＶのものと同一のアミノ酸配列を有するＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３のカプシドタンパク質を含む。改変カプシドタンパク質を含むｒＡＡＶは、改変ｒＡＡＶと呼ばれる。

【０１０２】

本発明の手段は、局所的または全身的に投与される場合、生体内分布を変更することができる。一部の実施形態では、手段は、静脈内注入される場合に生体内分布を変更する。

【０１０３】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、哺乳動物対象の細胞上で発現される、改変ｒＡＡＶとＡＡＶＲとの相互作用を変化させる。例えば、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、改変ｒＡＡＶとＡＡＶＲとの相互作用を減少または上昇させる。一部の実施形態では、手段は、未改変ＡＡＶカプシドタンパク質とＡＡＶＲと比較して、改変ＡＡＶカプシドタンパク質とＡＡＶＲとの間の結合親和性または結合安定性を変化させる。一部の実施形態では、手段は、ＡＡＶカプシドタンパク質（ＶＰ１、ＶＰ２、またはＶＰ３の各カプシドタンパク質）とＡＡＶＲとの間の相互作用インターフェースの変化を含む。

【０１０４】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８からなる群から選択される１つまたは複数の位置で、ある特定のアミノ酸残基の存否を含み、ここで、アミノ酸の位置は、配列番号１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。一部の実施形態では、２個以上のアミノ酸を、Ｑ２６３

、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８からなる群から選択される１つまたは複数の位置で、置換する、挿入する、および／または欠失させて、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段を導入することができる。

【０１０５】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、トグル部位、すなわちＱ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８のうちの１つまたは複数で、１個または複数のアミノ酸の置換、挿入、および／または欠失を含む。アミノ酸の置換、挿入および／または欠失によって、表１Ａ、１Ｂ、１Ｃおよび表２に提供するように、異なるＡＡＶカプシドの同じトグル部位に存在する１個または複数の様々なアミノ酸残基に、１個または複数の当初のアミノ酸残基をトグル部位で、変化させることができる。例えば、Ｑ２６３トグル部位（ＡＡＶ２に対して）を、Ｑから、Ａ、Ｅ、Ｔ、またはＧのうちのいずれかに変化させることできる。ＡＡＶ１のＱ２６４トグル部位を、ＳからＧ、Ｔ、ＡまたはＶのうちのいずれかに変化させることできる。図７－１～７－３および図８－１～８－３１では、１個または複数のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を導入することができるトグル部位を枠でもって強調してある。

【０１０６】

一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、配列番号１１２～１３７に示す配列を有する。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、配列番号１１２～１３７に示す配列のうちの１つと少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または９５．５％の同一性を有する配列を有する。

【０１０７】

一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、トグル部位、すなわちＱ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８のうちの１つに１個または複数のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失を備える配列番号１～１００に示す配列のうちの１つを有し、ここで、アミノ酸の位置は、配列番号１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、選択されたトグル部位、すなわちＳ４４６、Ｒ４７１およびＶ７０８のうちの１つに１個または複数のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失を備える配列番号１～１００に示す配列のうちの１つを有し、ここで、アミノ酸の位置は、配列番号１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。

【０１０８】

【表１】

表 1A

位置	AAV2	AAV1	AAV6	AAV3	AAV LK03	AAV7	AAV8	AAV hu.37	AAV rh.10	AAV9	AAVhu.68	AAV10	AAV5
263	Q	A	A	Q	Q	E	T	T	T	T	T	T	G
264	S	S	S	S	S	T	S	S	S	S	S	S	S
265	G	T	T	G	G	A	G	G	G	G	G	G	V
266	A	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	D
267	S	S	S	S	S	T	T	T	T	S	S	T	S
268	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
271	H	H	H	H	H	T	T	T	T	A	A	T	A
382	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D	D	N	N
383	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	T
384	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E
385	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	N
446	S	N	N	N	N	A	S	S	S	S	S	S	V
471	R	S	S	S	S	A	A	S	S	A	A	S	A
502	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	F
503	T	T	T	T	T	T	T	T	T	P	P	T	A
528	D	D	D	D	D	D	D	D	D	E	E	D	L
529	D	D	D	D	D	D	D	D	D	G	G	D	Q
589	Q	D	D	A	A	A	A	G	A	Q	Q	G	A
706	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	D
708	V	A	A	V	V	T	T	T	T	N	N	T	Q

【０１０９】

【表２】

表 1B

位置	AAV2	Anc80	Anc81	Anc82	Anc83	Anc84	Anc94	Anc110	Anc113	Anc126	Anc127
263	Q	Q	Q	T	T	T	T	T	Q	Q	Q
264	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
265	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G
266	A	A	G	G	G	G	G	G	G	A	A
267	S	S	T	T	T	T	T	T	T	S	S
268	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
271	H	T	T	T	T	T	T	T	T	H	H
382	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
383	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
384	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
385	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
446	S	S	S	S	S	S	S	S	A	S	S
471	R	A	A	A	A	S	S	A	A	A	A
502	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
503	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
528	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
529	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
589	Q	A	A	A	A	A	A	Q	A	A	A
706	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
708	V	T	T	T	T	T	T	T	T	A	V

【０１１０】

【表３】

表1C

位置	AAV2	Anc80L27	Anc80L59	Anc80L60	Anc80L62	Anc80L65	Anc80L33	Anc80L36	Anc80L44	Anc80L1
263	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
264	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
265	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
266	A	G	A	G	G	G	G	G	G	A
267	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
268	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
271	H	T	T	T	T	T	T	T	T	T
382	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
383	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
384	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
385	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
446	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
471	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A
502	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
503	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
528	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
529	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
589	Q	A	A	A	A	A	A	A	A	A
706	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
708	V	T	T	T	T	T	T	T	T	T

【０１１１】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、トグル部位のうちの２カ所以上で１個または複数のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、トグル部位のうちの２カ所で１個または複数のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、トグル部位のうちの３カ所で１個または複数のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、トグル部位のうちの４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０カ所で、１個または複数のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、Ａ２６６で１個または複数のアミノ酸置換、挿入、および／または欠失、ならびにその他のトグル部位、すなわちＱ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８に、１個または複数のさらなるアミノ酸置換、挿入および／または欠失を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、Ａ２６６でアミノ酸置換を含まない。

【０１１２】

一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、選択されたトグル部位、すなわちＳ４４６、Ｒ４７１およびＶ７０８に、１個または複数のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、ｒＡＡＶ生体内分布を変更する手段は、選択されたトグル部位で２個のアミノ酸置換または３個のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、４４６Ｒ、４７１Ａおよび７０８Ｔからなる群から選択される１個、２個、または３個のアミノ酸残基を含む。一部の実施形態では、改変ＶＰ１カプシドタンパク質は、４４６Ｓ、４７１Ｓおよび７０８Ａからなる群から選択される１個、２個、または３個のアミノ酸残基を含む。

【０１１３】

一部の実施形態では、改変ＡＡＶカプシドタンパク質は、デフォルトのパラメーターを使用してアライメントする場合、改変ＡＡＶカプシドタンパク質ＶＰ１タンパク質と最大の配列同一性を有する未改変ＡＡＶカプシドタンパク質とは相違する。一部の実施形態では、改変ＡＡＶカプシドタンパク質は、トグル部位、Ｑ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ

４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６、およびＶ７０８でのみ、最大の配列同一性を備える未改変ＡＡＶカプシドタンパク質とは相違しており、ここで、アミノ酸の位置は、配列番号１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。一部の実施形態では、改変ＡＡＶカプシドタンパク質は、選択されたトグル部位、Ｓ４４６、Ｒ４７１、およびＶ７０８でのみ、最大の配列同一性を備える未改変ＡＡＶカプシドタンパク質とは相違しており、ここでアミノ酸の位置は、配列番号１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。

【０１１４】

一部の実施形態では、改変ＡＡＶカプシドタンパク質は、トグル部位およびトグル部位以外で、最大の配列同一性を備える未改変のｒＡＡＶカプシドタンパク質とは相違する。一部の実施形態では、改変ＡＡＶカプシドタンパク質は、最大の配列同一性を備える未改変ＡＡＶカプシドタンパク質と９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または９９．５％の配列同一性を有する。

【０１１５】

一態様では、本開示では、改変ＡＡＶカプシドタンパク質をコードする改変ポリヌクレオチドが提供される。改変ＡＡＶカプシドタンパク質をコードする改変ポリヌクレオチドは、未改変ＡＡＶカプシドをコード未改変ポリヌクレオチドと比較して、（７８７～７８９）、（７９０～７９２）、（７９３～７９５）、（７９６～７９８）、（７９９～８０１）、（８０２～８０４）、（８１１～８１３）、（１１４４～１１４６）、（１１５０～１１５２）、（１１５３～１１５５）、（１３３６～１３３８）、（１４１１～１４１３）、（１５０４～１５０６）、（１５０７～１５０９）、（１５８２～１５８４）、（１５８５～１５８７）、（１７６５～１７６７）、（２１１６～２１１８）、または（２１２２～２１２４）からなる群から選択される１つまたは複数の位置で、１個または複数のヌクレオチド置換、挿入または欠失を有することができ、ここで、ヌクレオチドの位置は、配列番号１４１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。ヌクレオチドの置換、挿入または欠失によってポリヌクレオチドによってコードされるカプシドタンパク質に、トグル部位、すなわちＱ２６３、Ｓ２６４、Ｇ２６５、Ａ２６６、Ｓ２６７、Ｎ２６８、Ｈ２７１、Ｎ３８２、Ｇ３８３、Ｓ３８４、Ｑ３８５、Ｓ４４６、Ｒ４７１、Ｗ５０２、Ｔ５０３、Ｄ５２８、Ｄ５２９、Ｑ５８９、Ｋ７０６およびＶ７０８、のうちの１つおよび複数で、１個または複数のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を導入することができる。

【０１１６】

一部の実施形態では、改変ポリヌクレオチドは、（７８７～７８９）、（７９０～７９２）、（７９３～７９５）、（７９６～７９８）、（７９９～８０１）、（８０２～８０４）、（８１１～８１３）、（１１４４～１１４６）、（１１５０～１１５２）、（１１５３～１１５５）、（１３３６～１３３８）、（１４１１～１４１３）、（１５０４～１５０６）、（１５０７～１５０９）、（１５８２～１５８４）、（１５８５～１５８７）、（１７６５～１７６７）、（２１１６～２１１８）、または（２１２２～２１２４）からなる群から選択される１つまたは複数の位置で１個または複数のヌクレオチド置換、挿入または欠失を備える、配列番号１３６～１４１に示す配列のうちの１つを含み、ここで、ヌクレオチドの位置は、配列番号１４１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。

【０１１７】

一態様では、本開示では、改変ＡＡＶカプシドタンパク質をコードする改変ポリヌクレオチドが提供される。改変ＡＡＶカプシドタンパク質をコードする改変ポリヌクレオチドは、未改変ＡＡＶカプシドをコードする未改変のポリヌクレオチドと比較して、（１３３６～１３３８）、（１４１１～１４１３）または（２１２２～２１２４）からなる群から選択される１つまたは複数の位置で１個または複数のヌクレオチド置換、挿入または欠失を有することができ、ここで、ヌクレオチドの位置は、配列番号１４１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。ヌクレオチドの置換、挿入または欠失によってポリヌ

クレオチドによってコードされるカプシドタンパク質に、選択されたトグル部位、すなわちＳ４４６、Ｒ４７１およびＶ７０８のうちの１つおよび複数で、１個または複数のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を導入することができる。ヌクレオチドの置換、挿入または欠失によって選択されたトグル部位、すなわちＡ２６６、Ｓ４４６、Ｒ４７１およびＶ７０８のうちの１つおよび複数で、１個または複数のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を導入することができる。

【０１１８】

一部の実施形態では、改変ポリヌクレオチドは、（１３３６～１３３８）、（１４１１～１４１３）または（２１２２～２１２４）からなる群から選択される１つまたは複数の位置で１個または複数のヌクレオチド置換、挿入または欠失を備える、配列番号１４７～１５１に示す配列のうちの１つを含み、ここで、ヌクレオチドの位置は、配列番号１４１（ＡＡＶ２　ＶＰ１）に対して番号付けされている。

【０１１９】

別の態様では、本開示では、本明細書に記載の改変ＡＡＶカプシドタンパク質をコードする改変ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。一部の実施形態では、ベクターはプラスミドである。

【０１２０】

改変組換えＡＡＶ（改変ｒＡＡＶ）

本開示ではさらに、本明細書に開示の改変ＡＡＶカプシドタンパク質（ＶＰ１、ＶＰ２またはＶＰ３の各カプシドタンパク質）および組換え核酸ベクターを含む改変ｒＡＡＶが提供される。

【０１２１】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有する未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への投与後の肝臓のより高い形質導入を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有するＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶで投与される発現可能なポリヌクレオチドの発現と比較して、哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ゲノム内の発現可能なポリヌクレオチドの肝臓における、より高い発現を達成する。

【０１２２】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有するＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への投与後の肝臓のより低い形質導入を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有するＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶで投与される発現可能なポリヌクレオチドと比較して、哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ゲノム内の発現可能なポリヌクレオチドの肝臓における、より低い発現を達成する。

【０１２３】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有する未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への投与後の肝臓以外の臓器のより高い形質導入を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有する未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶで送達される発現可能なポリヌクレオチドと比較して、組換え核酸ゲノム内の発現可能なポリヌクレオチドの肝臓以外の臓器における、より高い発現を達成する。

【０１２４】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有する未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶで送達される発現可能なポリヌクレオチドと比較して、組換え核酸ゲノム内の発現可能なポリヌクレオチドの肝臓以外の臓器のより低い形質導入を達成する。一部の実施形態では、改

変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有するＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶで投与される発現可能なポリヌクレオチドと比較して、哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ゲノム内の発現可能なポリヌクレオチドの肝臓以外の臓器における、より低い発現を達成する。

【０１２５】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有する未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象の細胞上で発現される、ＡＡＶＲとの相互作用を減少させた。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によって送達される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有する未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象の細胞上で発現される、ＡＡＶＲとのより大きな相互作用を有する。

【０１２６】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によっておよび同じ用量で投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有する未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶよりも肝毒性が低い。

【０１２７】

改変ｒＡＡＶを含む医薬組成物

一態様では、本開示は、本開示の改変ｒＡＡＶおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。改変ｒＡＡＶは、本明細書に記載の改変ＡＡＶカプシドタンパク質、および発現可能なポリヌクレオチドを含有する組換え核酸ベクターを含む。

【０１２８】

本医薬組成物を使用して、組換え核酸ベクターを哺乳動物対象内の標的に送達することができる。医薬組成物が投与される場合、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によっておよび同じ用量で投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有する未改変ＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への投与後の、標的細胞のより高い形質導入を達成することができる。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、同じ投与経路によっておよび同じ用量で投与される、改変ＶＰ１と最大の配列同一性を有するＶＰ１カプシドタンパク質を含む未改変ｒＡＡＶで投与される発現可能なポリヌクレオチドと比較して、哺乳動物対象への投与後の、組換え核酸ゲノム内の発現可能なポリヌクレオチドの標的細胞における、より高い発現を達成する。

【０１２９】

改変ｒＡＡＶの標的指向化は、ｒＡＡＶの形質導入または発現可能なポリヌクレオチドの発現を測定することにより、実験動物で試験することができる。一部の実施形態では、標的指向化は、非ヒト霊長類（ＮＨＰ）、マウス、ラット、トリ、ウサギ、モルモット、ハムスター、家畜（ブタおよびヒツジを含めて）、イヌ、またはネコにおいて測定される。

【０１３０】

改変ｒＡＡＶの標的指向化は、ｒＡＡＶの全身投与または局所投与後に測定することができる。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶの標的指向化は、ｒＡＡＶの静脈内注入後に測定される。

【０１３１】

一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変のｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に、肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において、２分の１、３分の１、４分の１、５分の１、１０分の１、２０分の１、３０分の１、４０分の１、５０分の１、１００分の１、２００分の１、５００分の１、７５０分の１、１０００分の１、または２５００分の１の減少を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、アカゲザルへの第１の投与後に、肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において、２分の１、３分の１、４分の１、５分の１、１０分の１、２０分の１、３０分の１、４０分の１、５０分の１、１００分の１、２００分の１、５００分の１、７５０分の１、１０００分の１、ま

たは２５００分の１の減少を達成する。
【０１３２】
一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において少なくとも１０倍の上昇を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、アカゲザルへの第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において少なくとも１０倍の上昇を達成する。
【０１３３】
一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において１０分の１以下の減少を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、アカゲザルへの第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において１０分の１以下の減少を達成する。
【０１３４】
一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において少なくとも１０倍の上昇を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、アカゲザルへの第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において少なくとも１０倍の上昇を達成する。
【０１３５】
一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において１００分の１以下の減少を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、アカゲザルへの第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において１００分の１以下の減少を達成する。
【０１３６】
一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において少なくとも１００倍の上昇を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、アカゲザルへの第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において少なくとも１００倍の上昇を達成する。
【０１３７】
一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において１０００分の１以下の減少を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、アカゲザルへの第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において１０００分の１以下の減少を達成する。
【０１３８】
一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、未改変ｒＡＡＶと比較して、哺乳動物対象への第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において少なくとも１０００倍の上昇を達成する。一部の実施形態では、改変ｒＡＡＶは、アカゲザルへの第１の投与後に肝臓への遺伝子導入においてまたは肝臓細胞のウイルス感染もしくは導入遺伝子発現において少なくとも１０００倍の上昇を達成する。
【０１３９】
肝臓－トグル切替えウイルスの使用方法
本明細書に記載の天然に存在しない改変ＡＡＶウイルス（例えば、この場合、ＶＰ１カプシドタンパク質配列が変化されてまたは操作されて、所望の生体内分布（例えば、肝臓－オンまたは肝臓オフ）を呈する）を、いくつかの研究応用および／または治療応用において使用することができる。例えば、肝臓－オンまたは肝臓－オフのウイルスを、遺伝子

治療向けに（例えば、遺伝子導入用のベクターまたはベクターシステムにおいて）またはワクチン接種向けに（例えば、抗原提示向け）ヒトまたは動物の医薬において使用することができる。より具体的には、肝臓－オンまたは肝臓－オフのウイルスを、肝臓細胞または非肝臓細胞の、遺伝子付加、遺伝子増強、ポリペプチド治療薬の遺伝子送達、遺伝子ワクチン接種、遺伝子サイレンシング、ゲノム編集、遺伝子治療、ＲＮＡｉ送達、ｃＤＮＡ送達、ｍＲＮＡ送達、ｍｉＲＮＡ送達、ｍｉＲＮＡスポンジング、遺伝子免疫、光遺伝学的遺伝子療法、遺伝子組換え、ＤＮＡワクチン接種、またはＤＮＡ免疫に使用することができる。

【０１４０】

カプシドタンパク質の配列が変化されてＡＡＶの生体内分布（例えば、肝臓生体内分布）を変更している天然に存在しない改変ＡＡＶに、導入遺伝子（その他のウイルス配列とシスまたはトランス配置で）を含めることができる。導入遺伝子は、例えば、レポーター遺伝子（例えば、ベータ－ラクタマーゼ、ベータ－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光ポリペプチド（ＧＦＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、またはルシフェラーゼ、または、血球凝集素やＭｙｃなどの抗原タグドメインを含む融合ポリペプチド）、または治療遺伝子（例えば、ホルモンもしくはその受容体、増殖因子もしくはその受容体、分化因子もしくはその受容体、免疫系調節因子（例えば、サイトカインおよびインターロイキン）もしくはその受容体、酵素、ＲＮＡ（例えば、阻害性ＲＮＡもしくは触媒ＲＮＡ）、または標的抗原（例えば、発癌性抗原、自己免疫性抗原）をコードする遺伝子）とすることができる。

【０１４１】

特定の導入遺伝子は、少なくとも一部は、治療される特定の疾患または欠損症に応じて選択されることになる。単に例として、遺伝子導入または遺伝子療法は、以下の処置に適用することができる：血友病、網膜色素変性症、嚢胞性線維症、レーベル先天黒内障、リソソーム蓄積症、先天性代謝異常（例えば、フェニルケトン尿症を含めて先天性アミノ酸代謝異常、プロピオン酸血症を含めて先天性有機酸代謝異常、中鎖アシルＣｏＡ脱水素酵素欠損症（ＭＣＡＤ）を含めて先天性脂肪酸代謝異常）、がん、色覚異常、錐体杆体ジストロフィー、黄斑変性症（例えば、加齢性黄斑変性症）、リポポリペプチドリパーゼ欠損症、家族性高コレステロール血症、脊髄性筋萎縮症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、アルツハイマー病、パーキンソン病、肥満、炎症性腸障害、糖尿病、うっ血性心不全、高コレステロール血症、難聴、冠動脈性心疾患、家族性腎アミロイドーシス、マルファン症候群、致死性家族性不眠症、クロイツフェルト－ヤコブ病、鎌状赤血球症、ハンチントン病、前頭側頭葉変性症、アッシャー症候群、乳糖不耐症、脂質蓄積障害（例えば、ニーマン－ピック病、Ｃ型）、バッテン病、コロイデレミア、糖原病ＩＩ型（ポンペ病）、毛細血管拡張性運動失調症（ルイ－バー症候群）、先天性甲状腺機能低下症、重症複合免疫不全症（ＳＣＩＤ）、および／または筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）。導入遺伝子は、例えば、対象（例えば、ヒト、動物（例えば、伴侶動物、家畜、絶滅危惧動物）を免疫するのに有用である免疫原とすることもできる。例えば、免疫原は生物（例えば、病原性生物）またはその免疫原性部分もしくは成分（例えば、毒素ポリペプチドまたはその副産物）から得ることができる。例として、免疫原性ポリペプチドを得ることができる病原性生物には、ウイルス（例えば、ピコルナウイルス、エンテロウイルス、オルソミクソウイルス、レオウイルス、レトロウイルス）、原核生物（例えば、肺炎球菌（Pneumococci）、ブドウ球菌属（Staphylococci）、リステリア属（Listeria）、シュードモナス属（Pseudomonas））、および真核生物（例えば、アメーバ症、マラリア、リーシュマニア症、線虫）が含まれる。本明細書に記載の方法およびかかる方法により精製される組成物は、いかなる特定の導入遺伝子によって限定されるものではないことが理解されよう。

【０１４２】

ＡＡＶの投与

肝臓－オンまたは肝臓－オフのＡＡＶベクターは、通常には生理学的に適合する担体に

懸濁されて、対象（例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物）に投与することができる。適切な担体には、様々な緩衝溶液とともに製剤化することができる生理食塩水（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、および水が含まれる。ウイルスベクターは典型的には、所望の細胞に形質導入するまたは感染させるのに十分な量で、十分なレベルの遺伝子導入および発現をもたらし、その結果過度の副作用なしで治療上の効果を可能とする十分な量で投与される。従来のおよび薬学的に許容される投与経路としては、それらに限定されないが、例えば、肝臓や肺などの器官への直接送達、経口的、鼻腔内、髄腔内、気管内、吸入による、静脈内、筋肉内、眼内、皮下、皮内、経粘膜的、またはその他の投与経路によるものが挙げられる。投与経路は、所望であれば、組み合わせることができる。

【０１４３】

対象に投与されるウイルスベクターの用量は、主に、治療される状態、ならびに対象の年齢、体重、および健康状態などの要因次第である。例えば、ヒト対象に投与されるウイルスベクターの治療有効投薬量は、一般に、約１×１０^{1}～１×１０^{12}ウイルスゲノムコピー（ＧＣ）（例えば、約１×１０^{3}～１×１０^{9}ＧＣ）の濃度を含有する溶液約０．１ｍｌ～約１０ｍｌの範囲にある。形質導入および／または導入遺伝子発現は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはタンパク質のアッセイにより、投与後の種々の時点でモニタリングすることができる。一部の例では、導入遺伝子の発現レベルをモニタリングして、投薬の頻度および／または量を決定することができる。治療目的に記載のものと同様の投薬レジメンを、免疫に利用することもできる。

【０１４４】

本明細書で使用される第２の「対応する」対象（例えば、哺乳動物対象）とは、第１の対象と同じ種（例えば、種類、および該当する場合は、品種または系統）であり、ＡＡＶ形質導入における第１の対象とは実質的に異ならない対象を指す。

【０１４５】

本発明にしたがって、当技術分野の技術の範囲内の、従来の分子生物学、微生物学、生化学的、および組換えのＤＮＡ技法を用いることができる。かかる技法は文献において十分に説明されている。本発明について、以下の実施例においてさらに説明するが、それらは、特許請求の範囲に記載される方法および組成物の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【０１４６】

[実施例１]

ＡｎｃＡＡＶカプシドライブラリー

ＡＡＶカプシドのライブラリーは、祖先配列の再構築に基づいて先に生成されていたものである（Ａｎｃ　ＡＡＶと呼ばれる）。Ａｎｃ　ＡＡＶは、ＡＡＶ系統発生の推定の祖先状態を近似する。この研究は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、およびＡＡＶ９を含めて（しかしＡＡＶ４またはＡＡＶ５は含めず）、知られている霊長類ＡＡＶの大多数の推定の系統発生に沿って祖先を再現することに基づいた。このプロセスによって、ＡＡＶカプシドタンパク質ＶＰ１に沿った各位置で２０個のアミノ酸それぞれに対して確率スコア（事後確率）を推測した。このようなアプローチは、Zinn et al.（2015, Cell Reports, 12(6):1056-68）および国際公開第２０１５／０５４６５３号パンフレットに記載されており、そのアプローチを使用してＡｎｃ１２６およびＡｎｃ１２７と呼ばれる２つのＡｎｃライブラリーを生成した。

【０１４７】

これらＡｎｃ１２６およびＡｎｃ１２７のバリアントライブラリーを、プールされたフォーマットで分子クローニングおよびＤＮＡ合成を使用して構築した、すなわち、特定のライブラリーの全てのバリアントを同じ容器内で並列合成した。このライブラリープラスミドの設計は、プラスミドがＡＡＶベクターゲノム内のウイルスカプシド配列をコードするようなものとした。加えて、これらのライブラリーの設計は、Ｉｌｌｕｍｉｎａが販売しているものなどの、ショートリードＮＧＳプラットフォームを使用した効率的で高スル

ープットの次世代シーケンシング（ＮＧＳ）を可能にする短鎖ＤＮＡ識別子またはバーコードを含む。本明細書で概説の実験では、各バーコードによって単一のＡＡＶカプシドバリアントを特定し、各カプシドバリアントを固有のバーコードによって特定した。

【０１４８】

図１に、プールされたバーコード化ライブラリー内のＡＡＶバリアント向けのライブラリー構築物の最小限の設計を例示する。ＡＡＶライブラリープラスミド構築物のエレメントは、ＡＡＶ逆位末端反復（ＩＴＲ）、１つまたは複数のプロモーターまたはポリアデニル化シグナル（ポリＡ）、これはＡＡＶ由来であってもＡＡＶと異種であってもよいが、ＡＡＶカプシドバリアントオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、およびカプシド向けのバーコード識別子である。図１に示す構築物に関するバリエーションが、例えば、発現カセットの外側であるがＩＴＲ内であるバーコード、カプシド遺伝子を駆動する一方のプロモーターおよびバーコードを含む転写物を駆動する別のプロモーター、ならびに／またはプロモーターおよびポリＡシグナル向けの種々のエレメント、の存在が可能であることが理解されよう。

【０１４９】

このプールされたプラスミドライブラリーを使用して、アデノウイルスヘルパー遺伝子プラスミド構築物およびＡＡＶＲｅｐ発現カセットを含有するプラスミドと一緒にＨＥＫ２９３細胞へとトランスフェクションすることによりウイルスベクターライブラリーを生成した。重要なことに、このトランスフェクションは、「自己パッケージング」、すなわちカプシド内の特定のカプシド向けのウイルスゲノムのパッケージング、の程度を最大にする、低プラスミド濃度条件下で実行された。次に、ウイルスライブラリーを、バーコード領域の集束配列決定を用いてＩｌｌｕｍｉｎａ　ＮＧＳを使用して、その多様性について評価した。本データによって、ウイルスライブラリー調製物のＮＧＳ試料内で特定された各バーコードのカウントが提供され、それによって、バーコード（したがってカプシドバリアント）の多様性の相対表現が得られた。バーコードのＮＧＳ配列決定によって指示されたところは、Ａｎｃ１２６ライブラリーとＡｎｃ１２７ライブラリーの両方が十分に多様性であり、配列バリエーションの関連する位置にわたって代表的であったことである。

【０１５０】

[実施例２]

ＡＡＶＲフットプリントの全体にわたる配列多様性のまとめ

図２は、以下のパラメーター：距離測度ｋｍｅｒ６＿６、クラスタリング方法　ＵＰＧＭＢ、ツリールーティング方法の擬似距離重みづけ（tree rooting method pseudo, distance weighting）ＣＬＵＳＴＡＬＷ、アンカー間隔　３２、オープンギャップペナルティー－１、を用いた、ＭＵＳＣＬＥアルゴリズム（Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput Nucleic Acids Res. 32(5):1792-1797）を使用した、ＡＡＶ２　ＶＰ１キャプシドタンパク質配列（配列番号１）に対するＡｎｃ１２６（配列番号９９）キャプシドタンパク質配列およびＡｎｃ１２７（配列番号１００）キャプシドタンパク質配列のアライメントである。ＡＡＶＲフットプリント内に位置すると予測される残基は枠で囲まれている。加えて、下の表２に、ＡＡＶ２の予測ＡＡＶＲフットプリント残基ならびにＡｎｃ８０、Ａｎｃ１２６、およびＡｎｃ１２７の対応する残基のそれぞれを提供するが、ここで、ドット（「．」）は保存されたアミノ酸を表す。選択的残基が観察された位置を表２に示すが、バリエーションに関してそういった部位はＡｎｃライブラリーにおいて多義的であったことを指示する。

【０１５１】

【表４】

表 2. AAVR-AAV 結合に関与すると予測される、AAV VP1 カプシドタンパク質上の残基および位置

位置	AAV2	Anc80	Anc126	Anc127
263	Q	.	.	.
264	S	.	.	.
265	G	.	.	.
266	A	A/G	.	.
267	S	.	.	.
268	N	.	.	.
271	H	T	.	.
382	N	.	.	.
383	G	.	.	.
384	S	.	.	.
385	Q	.	.	.
446	S	.	N/S	R/S
471	R	A	A/S	A/S
502	W	.	.	.
503	T	.	.	.
528	D	.	.	.
529	D	.	.	.
589	Q	A	A	A
706	K	.	.	.
708	V	T	T/A	.

【０１５２】

[実施例３]

肝臓取込みに関連する配列の特定

ＡＡＶ１２６およびＡＡＶ１２７のバリアントライブラリーをＣ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内経路を介して、合計６．２×１０^{10}ＧＣの用量で注射して、ライブラリー内のバリアント部位が、特に、ＡＡＶＲフットプリントに相当する、表２で特定されたバリアント部位が、肝臓向性に及ぼす影響について詮索した。注射の２８日後に動物をと殺し、組織を採取した。組織をＤＮＡ単離に供し、その後、バーコード配列が隣接するプライマーを用いたＰＣＲを使用してＤＮＡ試料を増幅した。ＰＣＲアンプリコンに第２の増幅を行って、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮＧＳインデックスを組み込んだ。続いて、これらＮＧＳ試料について、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮＧＳ機器ＭｉＳｅｑ（登録商標）またはＮｏｖａＳｅｑ（登録商標）を使用して配列決定を行った。続いて、各バリアントについてデータを解析し、その結果、肝臓のバーコードカウントと入力ウイルス調製物のバーコードカウントとの関係を使用して、入力注入ウイルスと比較した肝臓のバーコードの濃縮を表した。肝臓組織の定量的読取りを得たが、この読取りによって、それぞれのライブラリーの各メンバーの肝臓分布の程度を指示した。

【０１５３】

図３および図４は、それぞれ、Ａｎｃ１２６およびＡｎｃ１２７のメンバーの肝臓における相対的パフォーマンスデータを表し、図５Ａおよび５Ｂも同じである。ここで提供される解析は、「フィンガープリントプロット」と呼ばれるグラフの形式で、Ａｎｃ１２６またはＡｎｃ１２７のベクターライブラリーの全てのメンバーのパフォーマンスを上位から下位までのランクで例示する。加えて、列はＡｎｃ１２６またはＡｎｃ１２７のライブラリー設計内のバリエーションの部位を表す。バリエーションの各部位は多義的である、

すなわち、その位置でコードすることができる異なる２個の残基を有する。

【０１５４】

図３のデータが指示するところは、ＡＡＶ２（配列番号１）の残基７０８に対応する位置Ｐ９は、ＡＡＶＲフットプリントと重なり合い、肝臓における黒色のバリアント（７０８位にＡ）に対する白色のバリアント（位置７０８にＴ）の濃縮を実証した、本リストにおける唯一の位置であることである。黒色のバリアントは肝臓において少数しか存在せず（上位２５６のパフォーマンスバリアントのうちの３４．８％）、このことは、Ａｎｃ１２６の７０８位のＴが、肝臓への標的指向化を減少させた同じ位置のＡに対して、肝臓への標的指向化を増強したこと、を指示する。したがって、Ａ７０８バリアントは、Ｔ７０８バリアントと比較して肝臓取込みの効率が低かった。

【０１５５】

同様に、図４のデータが指示するところは、ＡＡＶ２（配列番号１）の残基４４６に対応する位置Ｐ５は、ＡＡＶＲフットプリントに当接しているとともに、肝臓における黒色のバリアント（Ｓ４４６）に対する白色のバリアント（Ｒ４４６）の濃縮を実証した本リストの２カ所の位置のうちの１つであることである。白色のバリアントは肝臓において少数しか存在せず（上位５１２のパフォーマンスバリアントのうちの２３．６％）、これは、Ａｎｃ１２７の４４６位のＲが、肝臓への標的指向化を減少させた同じ位置のＳに対して、肝臓への標的指向化を増強したこと、を指示する。

【０１５６】

図５のデータが指示するところは、Ａｎｃ１２６の位置Ｐ８およびＡｎｃ１２７の位置Ｐ７が、その両方ともＡＡＶ２（配列番号１）の残基４７１とアライメントされており、位置４７１に変化を伴う微かな効果のみを呈するが、この場合、Ａ４７１配列を有するウイルスは、Ｓ４７１配列を有するウイルスと比較して、肝臓を標的にする可能性がやや高いことである。白色のバリアント（Ａ４７１）も黒色のバリアント（Ｓ４７１）もいずれも肝臓の濃縮を強力に決定することはなかったので、保存的に変更された場合、予測されたＡＡＶＲフットプリントのうち全ての残基がＡＡＶＲ－ＡＡＶ相互作用を有意に調節するというわけではない。加えて、ＡからＳへの変化は比較的中程度の変化であり、これもまたわずかな影響をもたらすことができる。

【０１５７】

まとめると、これらのデータは、ＡＡＶ－ＡＡＶＲ結合の調節が肝臓による取込みを、ひいてはその他の組織による取込みを変更するという発見を根拠付けている。具体的には、本解析が指示するところは、ＡＡＶＲフットプリント内の４４６、４７１、および７０８の位置が、肝臓への、または肝臓から移行したＡＡＶの生体内分布に関与していると思われることである。

【０１５８】

[実施例４]

非ヒト霊長類における例示的肝臓トグルの使用

ＡＡＶＡｎｃ８０、Ａｎｃ８１、Ａｎｃ１０、およびＡｎｃ１２６の各バリアントライブラリーを、２匹の雌性アカゲザル（m. mulatta）の脳脊髄液に、7.75×10^{10} ＧＣ／ｋｇの用量で嚢内経路を介して注射して、ＣＮＳ、全身逸脱、および肝臓向性に及ぼすライブラリー内のバリアント部位の影響について詮索した。注射の７日後に動物をと殺し、組織を採取した。組織をＤＮＡ単離に供し、その後、バーコード配列が隣接するプライマーを用いたＰＣＲを使用してＤＮＡ試料を増幅した。ＰＣＲアンプリコンに第２の増幅を行って、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮＧＳインデックスを組み込んだ。これらＮＧＳ試料について、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮＧＳ機器ＭｉＳｅｑ（登録商標）またはＮｏｖａＳｅｑ（登録商標）を使用して配列決定を行った。続いて、各バリアントについてデータを解析して、肝臓のバーコードカウントと入力ウイルス調製物のバーコードカウントとの関係を使用して、入力注入ウイルスと比較した肝臓のバーコードの濃縮を表した。肝臓組織の定量的読取りを得たが、この読取りによって、それぞれのライブラリーの各メンバーの肝臓分布の程度を指示した。

【０１５９】
図６に、Ａｎｃ８０ライブラリーの肝臓での相対パフォーマンスデータを表す。ここで提供される解析は、「フィンガープリントプロット」と呼ばれるグラフの形式で、Ａｎｃ８０ベクターライブラリーの全てのメンバーのパフォーマンスを上位から下位までの順位で例示する。加えて、列は、Ａｎｃ８０ライブラリー設計内のバリエーションの部位を表す。バリエーションの各部位は多義的である、すなわち、その位置でコードすることができる異なる２個の残基を有する。
【０１６０】
図６のデータが指示するところは、ＡＡＶ２（配列番号１）の残基２６６に対応する位置Ｐ３は、ＡＡＶＲフットプリントと重なり合い、肝臓における白色のバリアント（２６６位にＡ）に対する黒色バリアント（位置２６６にＧ）の濃縮を実証した、本リストにおける唯一の位置であることである。白色のバリアントは肝臓において少数しか存在せず（上位１０２４のパフォーマンスバリアントのうちの６．７％）、これは、Ａｎｃ８０の２６６位のＧが、肝臓への標的指向化を減少させた同じ位置のＡに対して、肝臓への標的指向化を増強したこと、を指示する。したがって、Ａ２６６バリアントは、Ｇ２６６バリアントと比較して肝臓取込みの効率が低かった。
【０１６１】
まとめると、これらのデータは、ＡＡＶ－ＡＡＶＲ結合の調節が肝臓による取込みを、ひいてはその他の組織による取込みを変更するという発見を根拠付けている。具体的には、本解析が指示するところは、ＡＡＶＲフットプリント内の２６６，４４６、４７１、および７０８の位置が、肝臓への、または肝臓から移行した、ＡＡＶの生体内分布に関与していると思われることである。
【０１６２】
他の実施形態
方法および組成物についていくつかの異なる態様と併せて本明細書に記載してきたが、様々な態様の前述の記載は例示を意図したものであり、方法および組成物の範囲を限定することを意図するものではない。その他の態様、利点および改変も、以下の特許請求の範囲の範囲内である。
【０１６３】
開示されるのは、使用することができる、併せて使用することができる、調製に使用することができる方法および組成物であり、または、上記開示の方法および組成物の製品である。これらのおよびその他の材料が本明細書に開示され、これらの方法および組成物の組合せ、部分集団、相互作用、群等が開示されることが理解される。すなわち、これらの組成物および方法のそれぞれの様々な個々のおよび集合的な組合せおよび入替への具体的な参照については明示されていないかもしれないが、それぞれが本明細書で具体的に意図され記載されたものである。例えば、特定の組成物または特定の方法が開示および論議され、いくつかの組成物または方法が論議されている場合、そうでないことが具体的に示されていない限り、それらの組成物および方法のそれぞれのそしてあらゆる組合せおよび入替が具体的に想定されている。同様に、これらの任意の部分集団または組合せもまた、具体的に想定され開示されている。

【図面】

【図１】

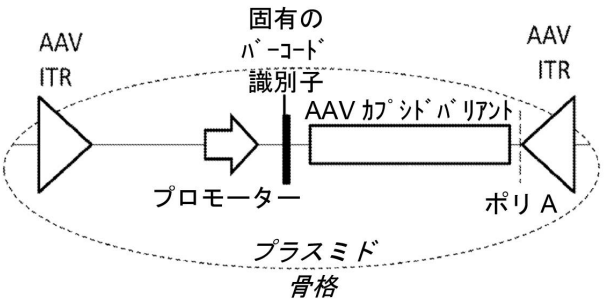


図１

【図２】

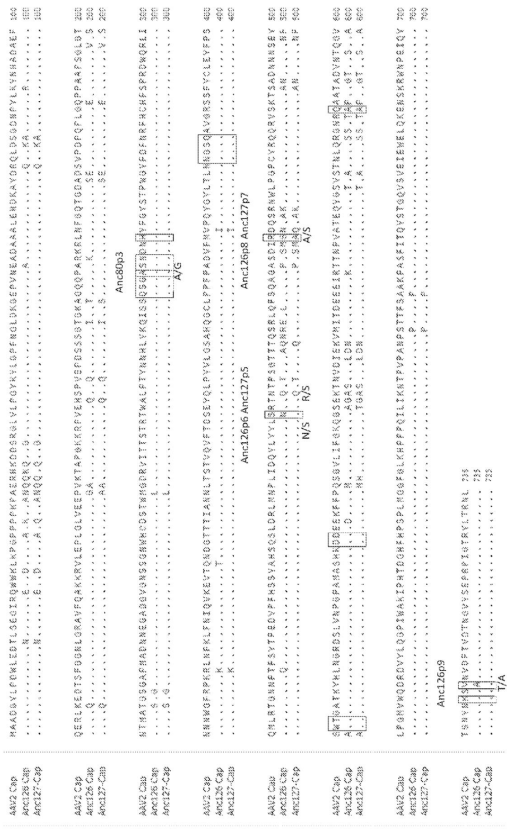
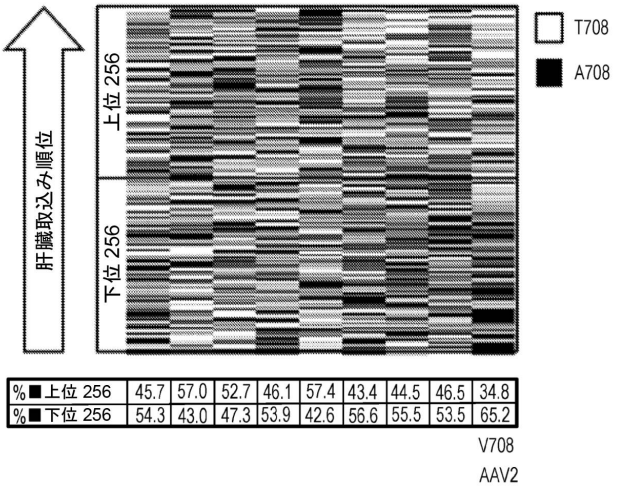


図２

【図３】

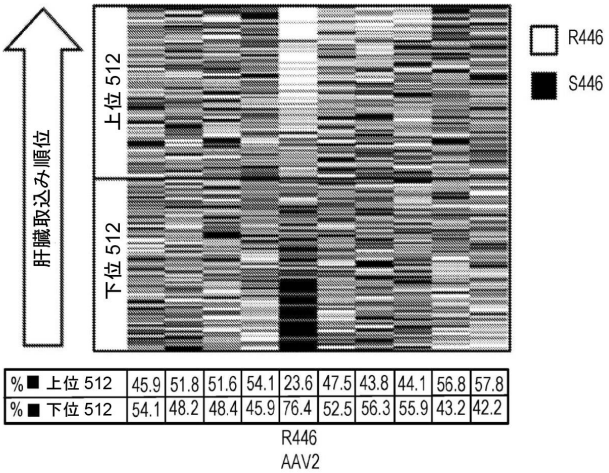


%■上位 256	45.7	57.0	52.7	46.1	57.4	43.4	44.5	46.5	34.8
%■下位 256	54.3	43.0	47.3	53.9	42.6	56.6	55.5	53.5	65.2

V708
AAV2

図３

【図４】

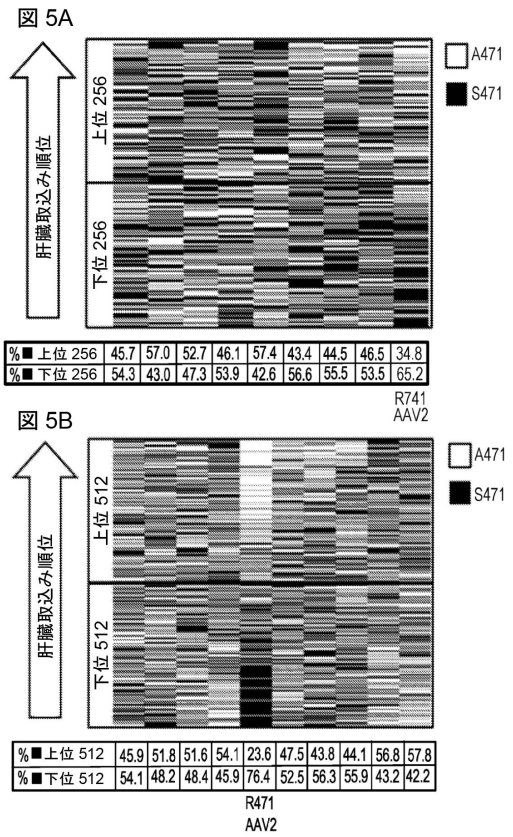


%■上位 512	45.9	51.8	51.6	54.1	23.6	47.5	43.8	44.1	56.8	57.8
%■下位 512	54.1	48.2	48.4	45.9	76.4	52.5	56.3	55.9	43.2	42.2

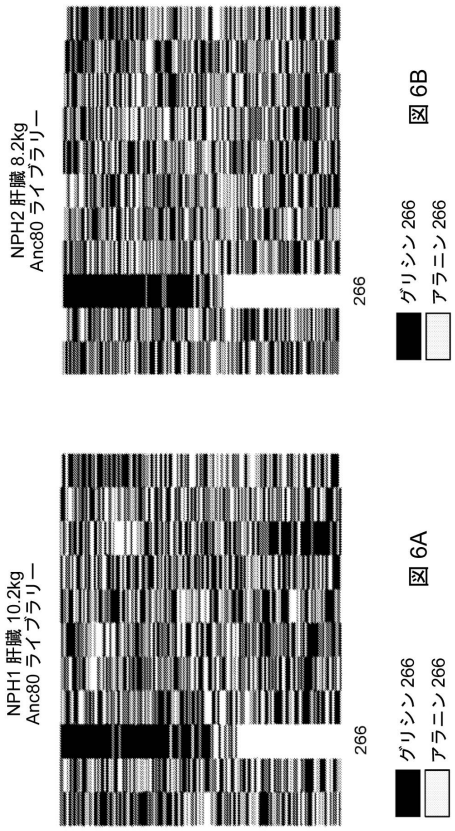
R446
AAV2

図４

【図５】



【図６】



【図７－１】

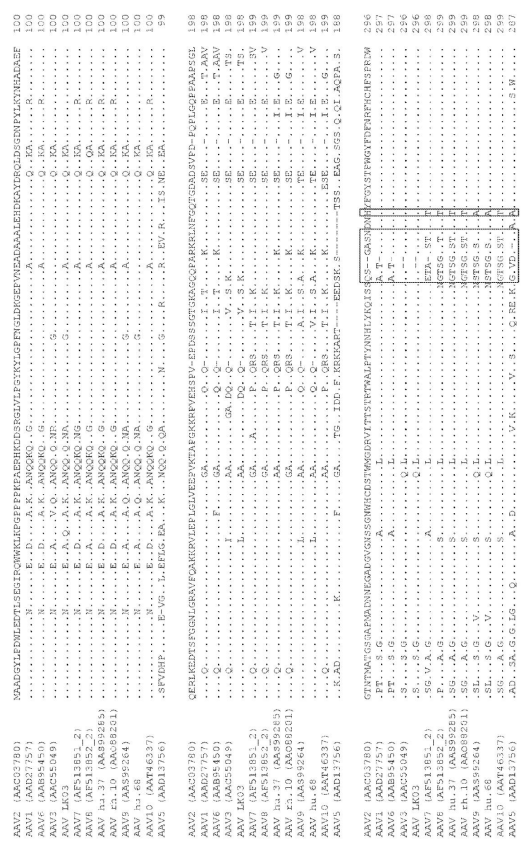


図 7-1

【図７－２】

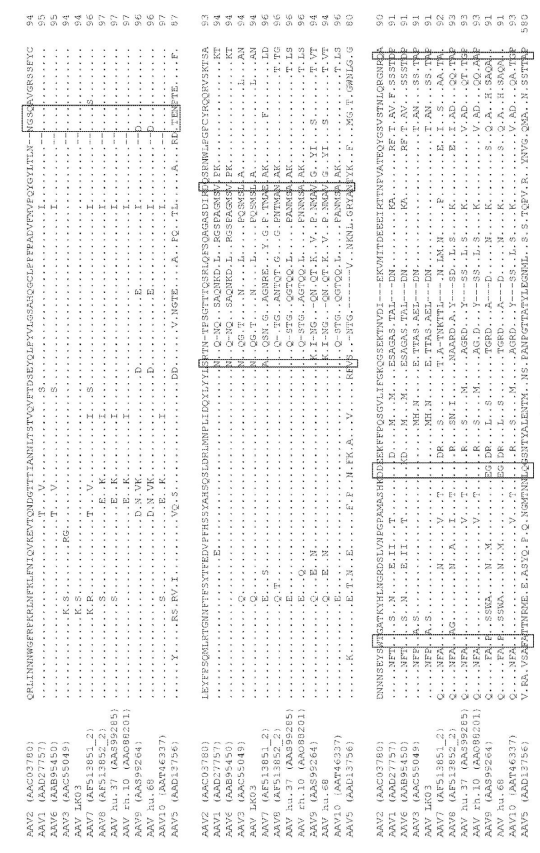


図 7-2

【図７－３】

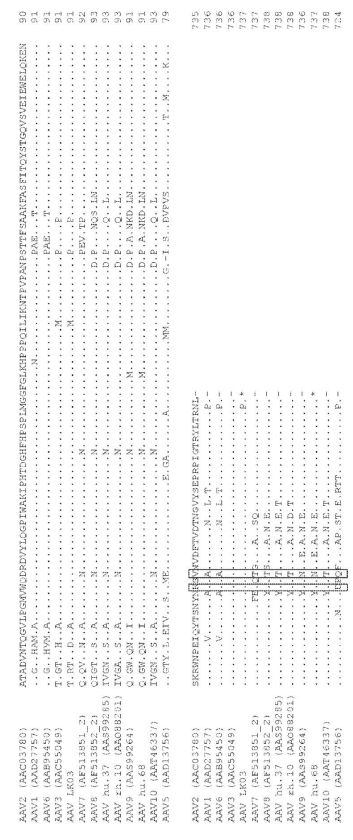


図 7-3

【図８－１】

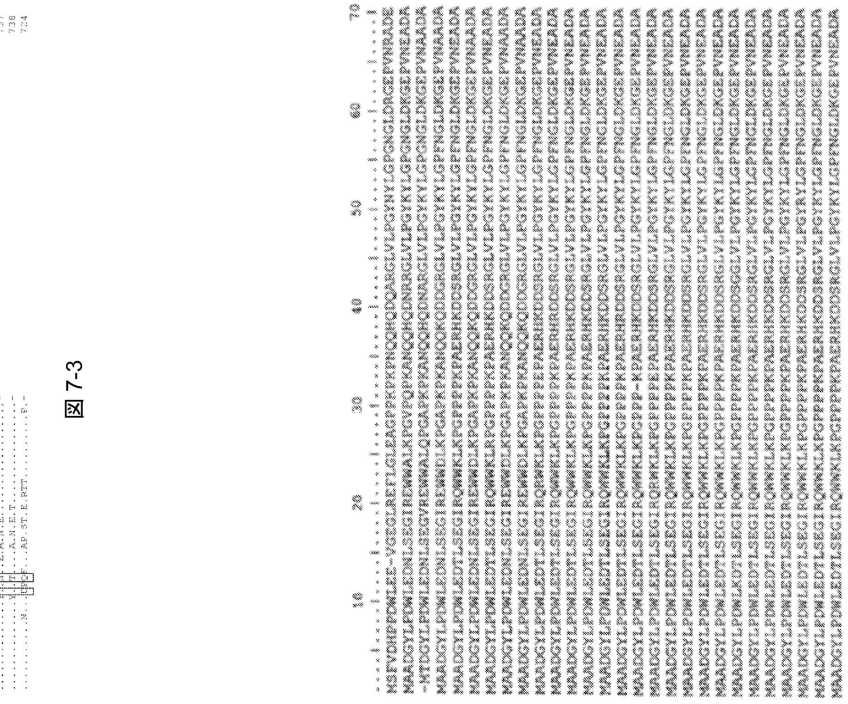


図 8-1

【図８－２】

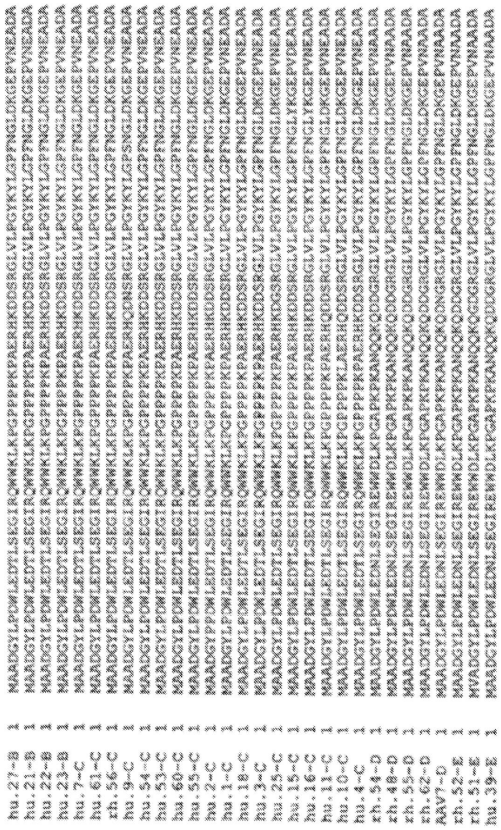


図 8-2

【図８－３】

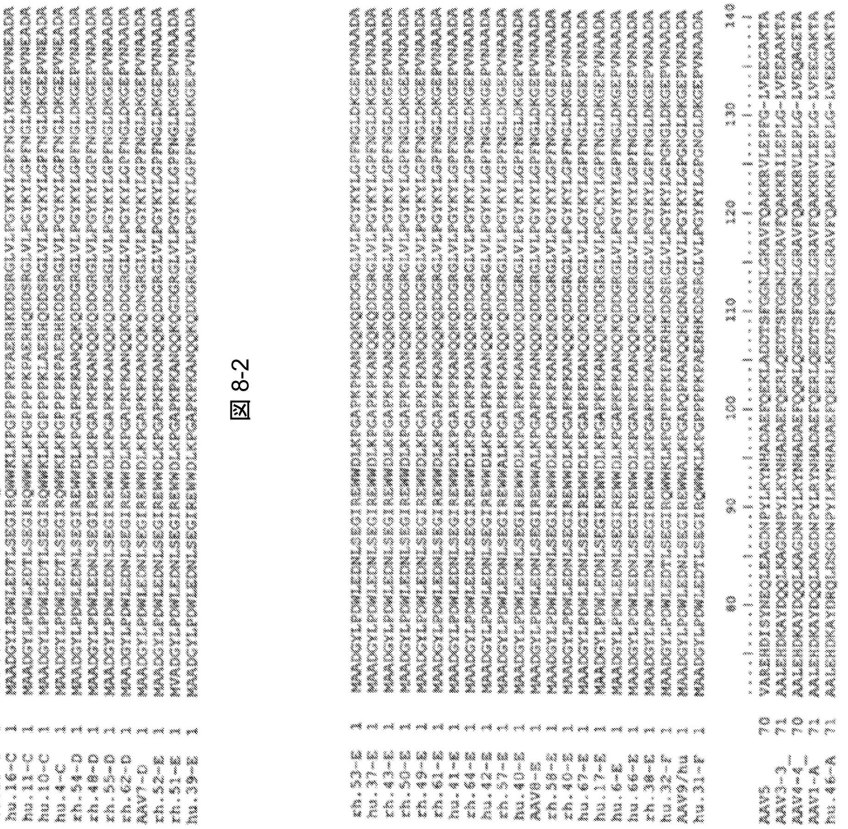


図 8-3

【図８－４】

図 8-4

【図８－５】

図 8-5

【図８－６】

図 8-6

【図８－７】

図 8-7

【図８－８】

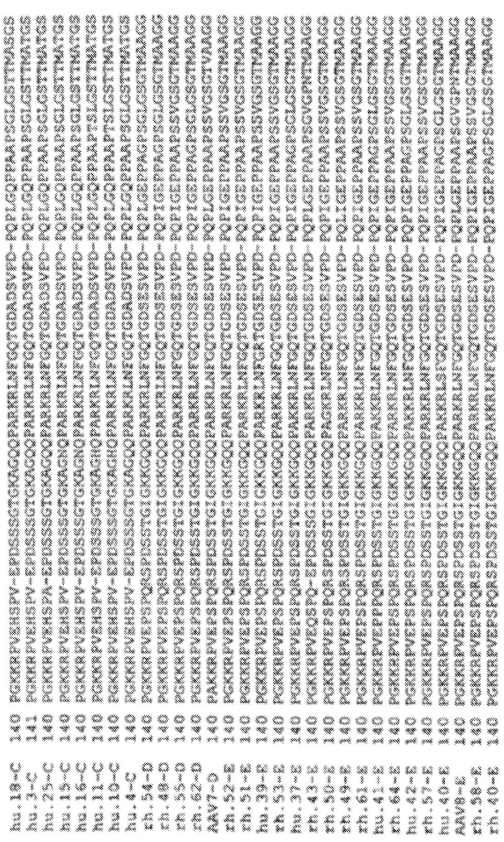


図 8-8

【図８－９】

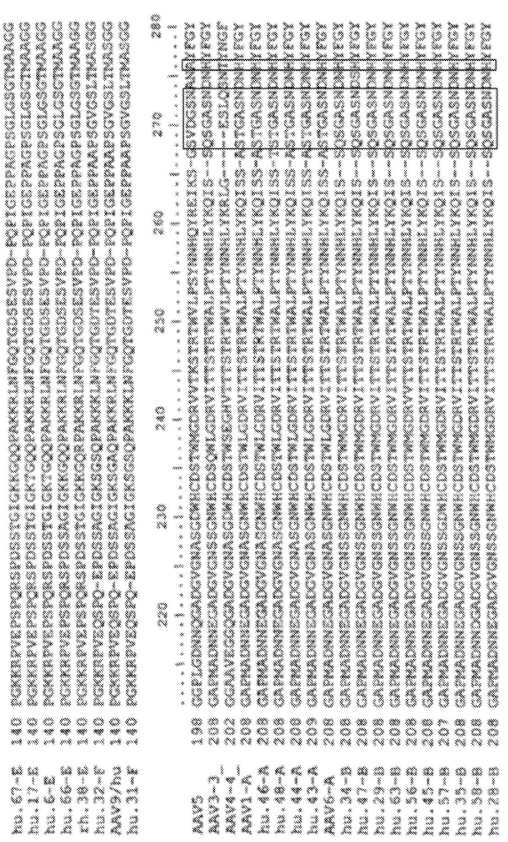


図 8-9

【図８－１０】

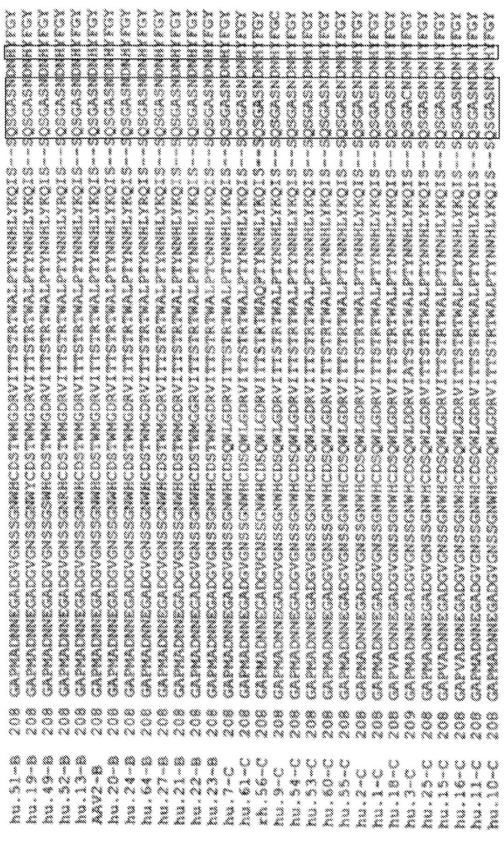


図 8-10

【図８－１１】

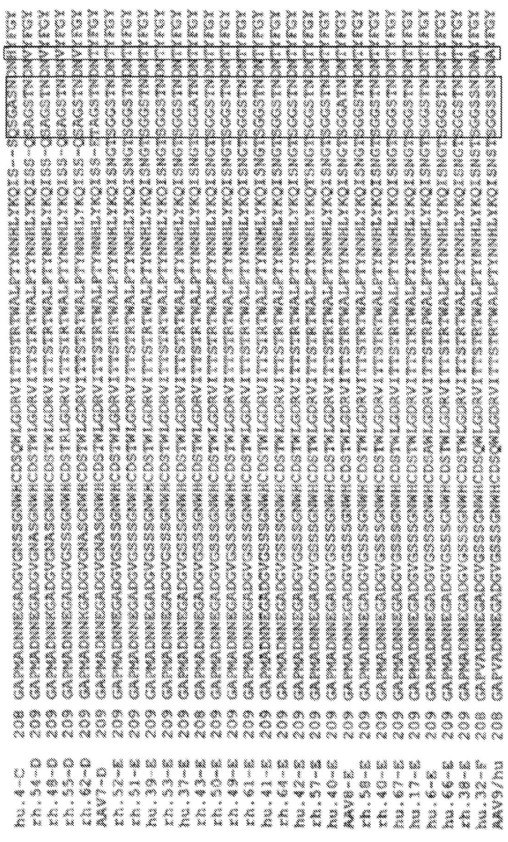


図 8-11

【図８－１２】

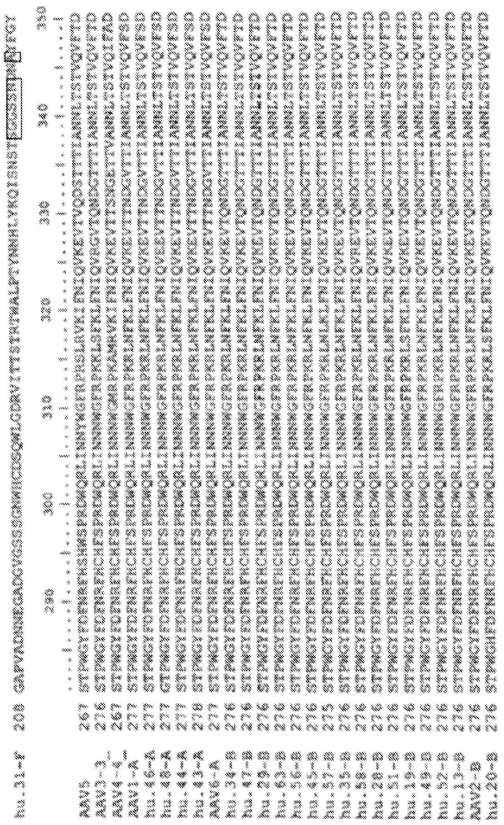


図 8-12

【図８－１３】

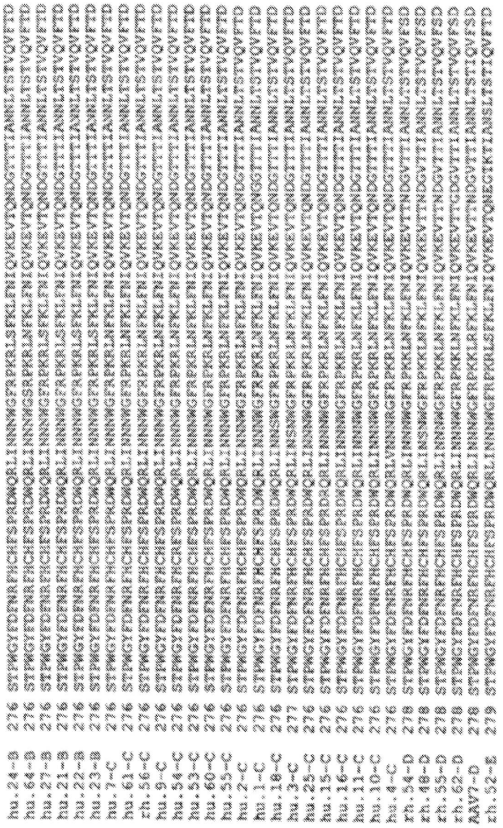


図 8-13

【図８－１４】

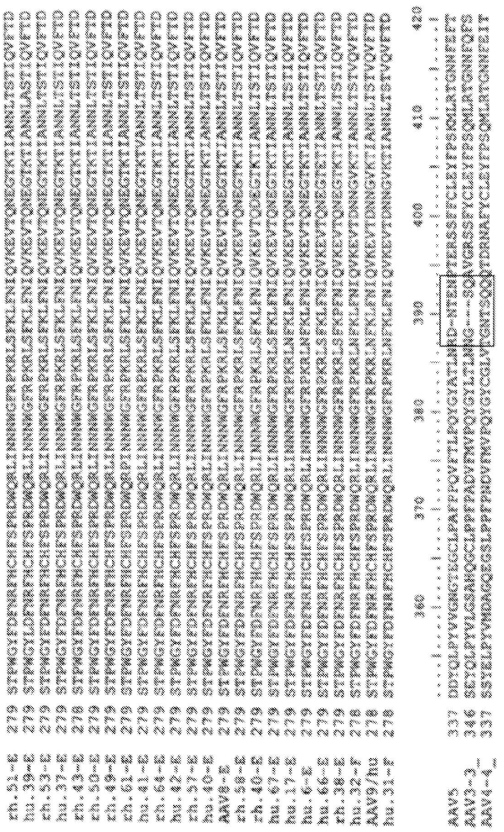


図 8-14

【図８－１５】

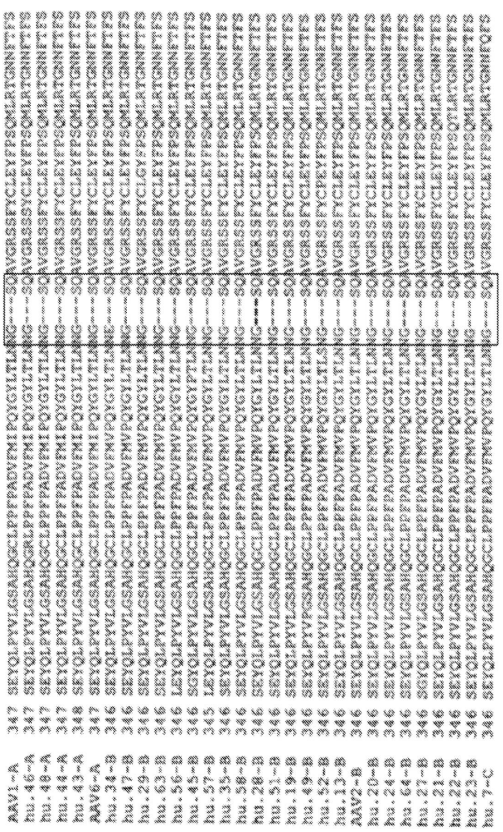


図 8-15

【図８－１６】

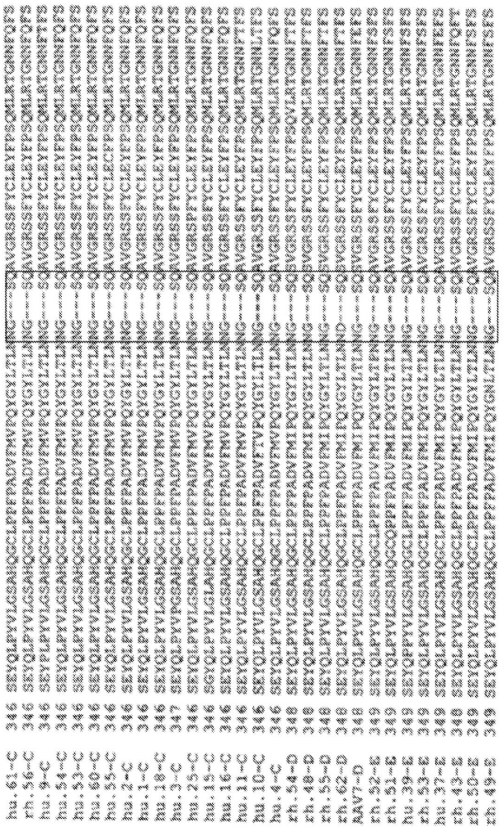


図 8-16

【図８－１７】

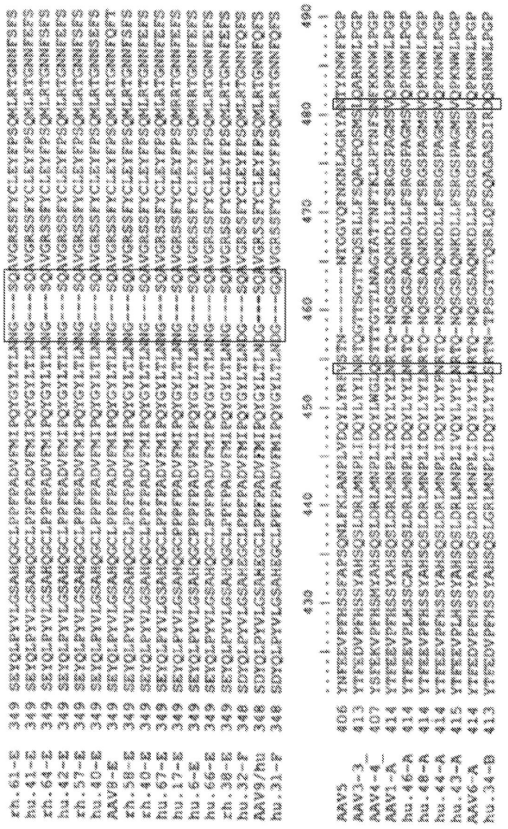


図 8-17

【図８－１８】

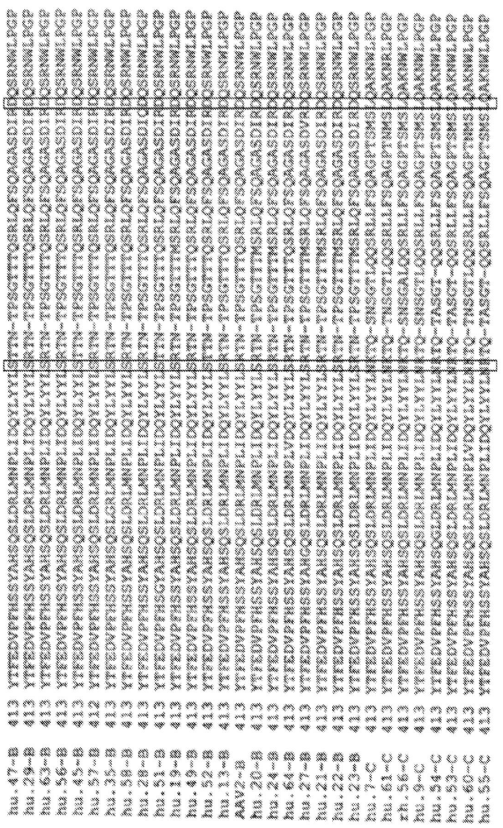


図 8-18

【図８－１９】

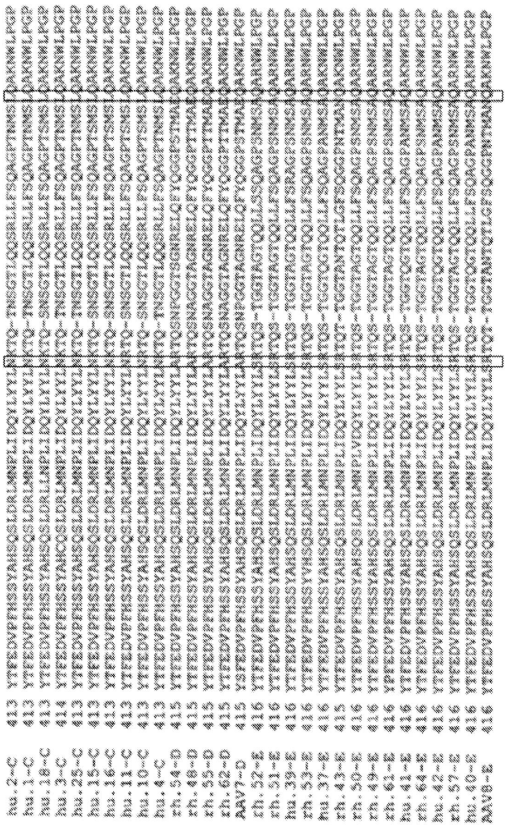


図 8-19

【図８－２０】

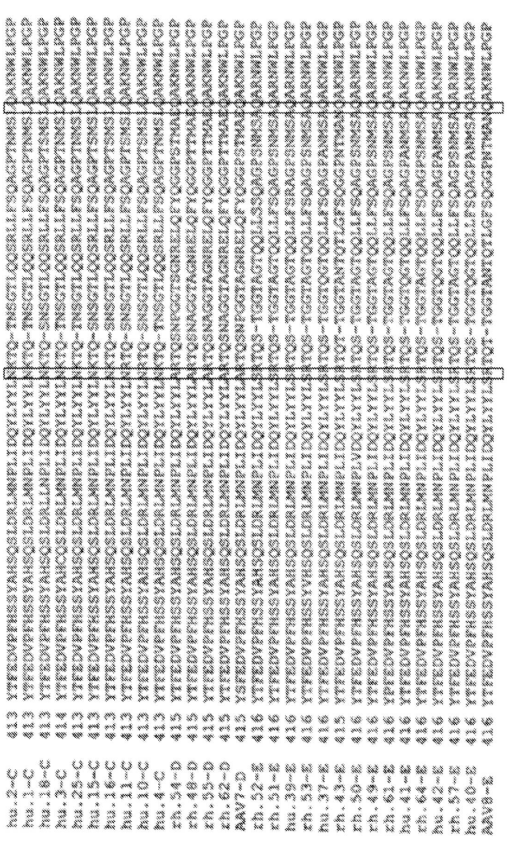


図 8-20

【図８－２１】

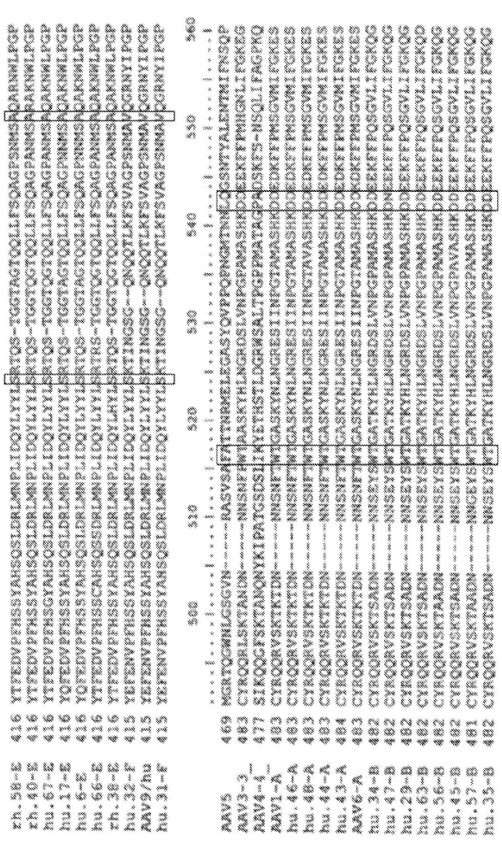


図 8-21

【図８－２２】

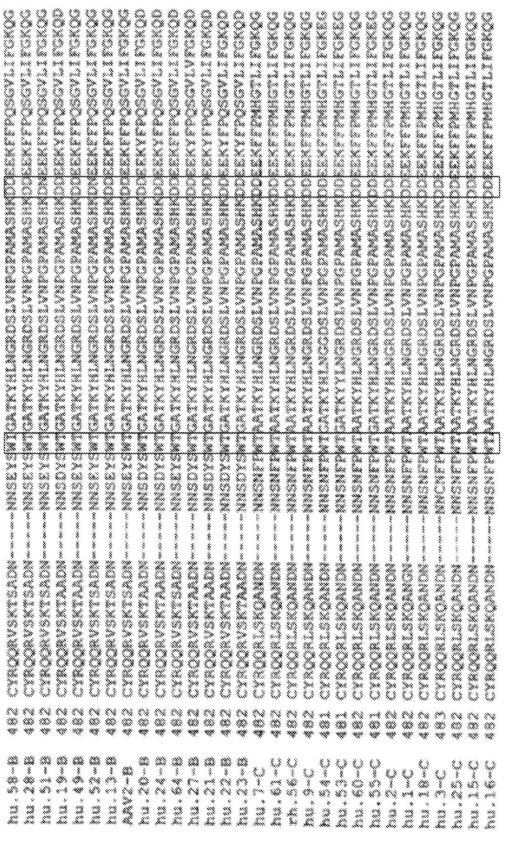


図 8-22

【図８－２３】

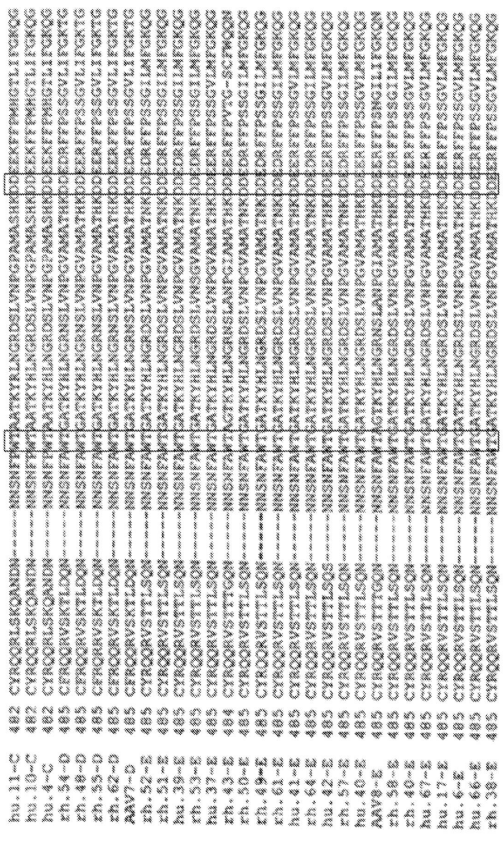


図 8-23

【図８－２４】

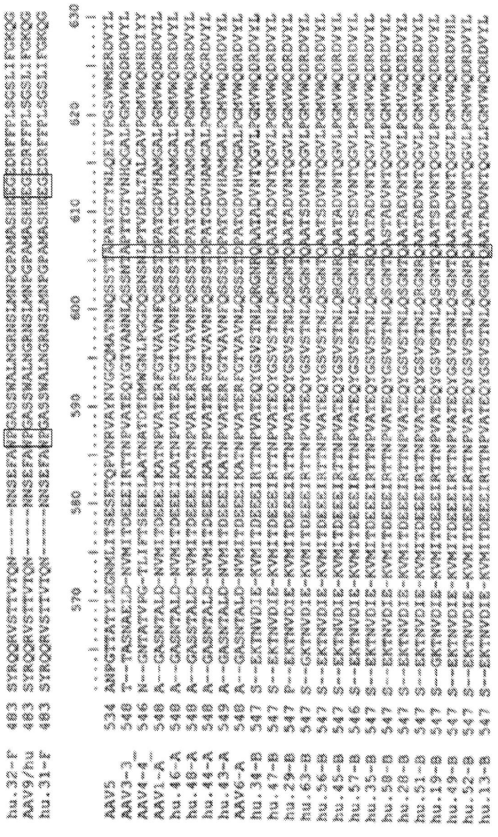


図 8-24

【図８－２５】

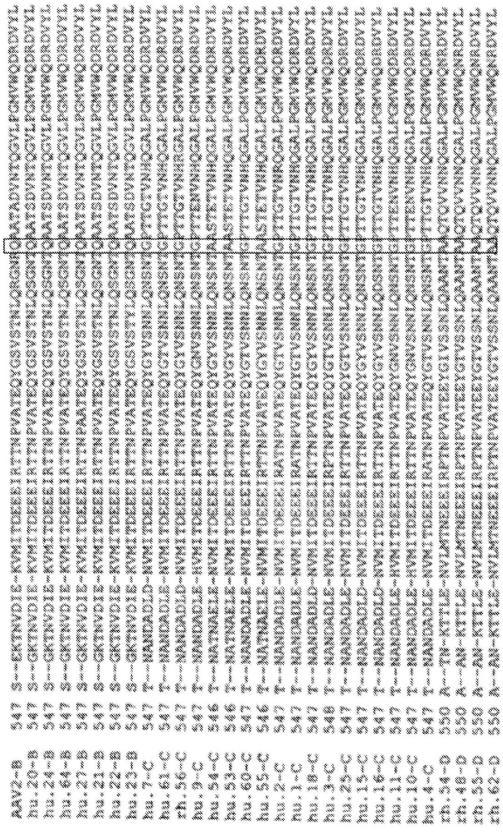


図 8-25

【図８－２６】

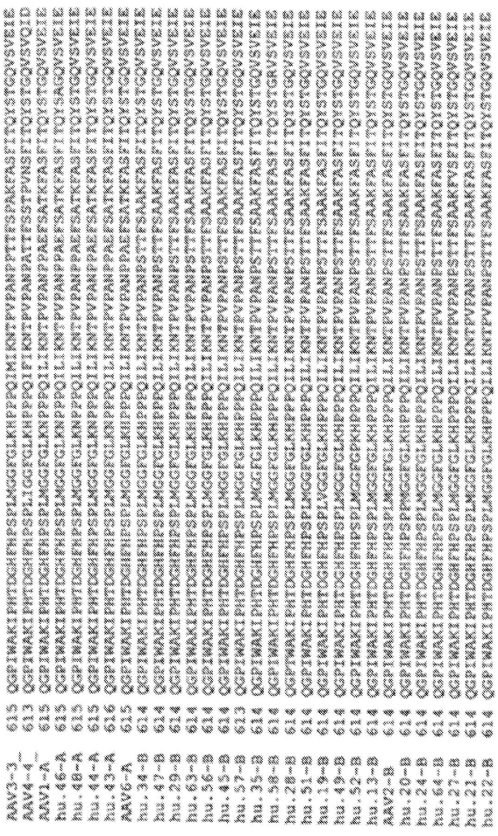


図 8-26

【図８－２７】

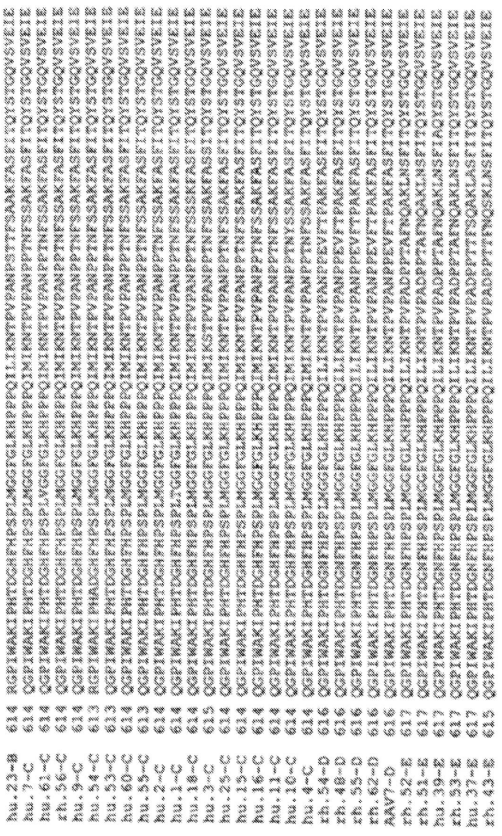


図 8-27

【図８－２８】

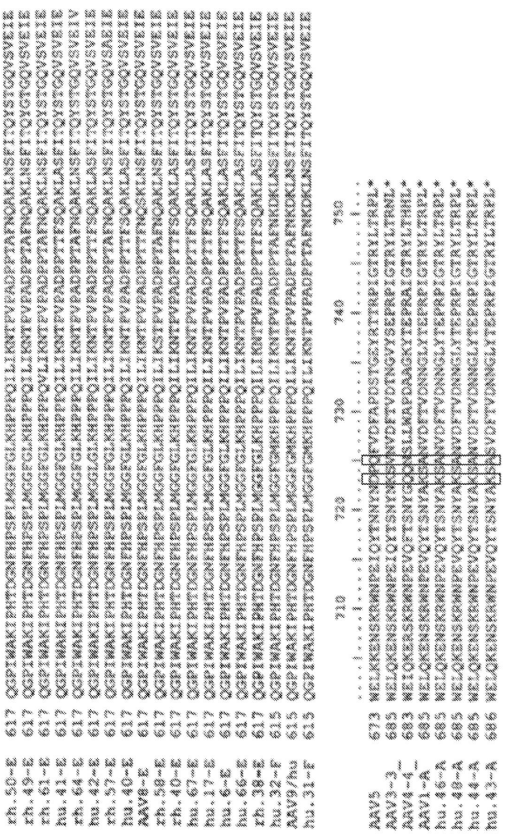


図 8-28

【図８－２９】

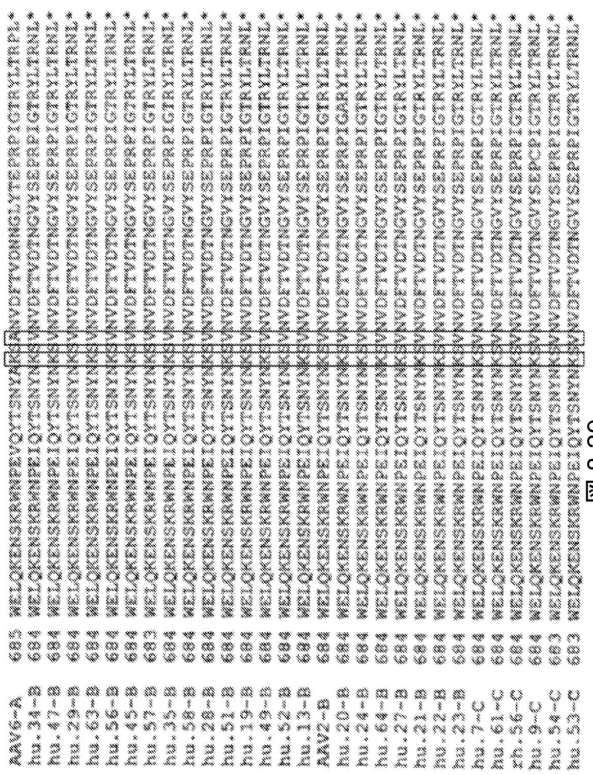


図 8-29

【図８－３０】

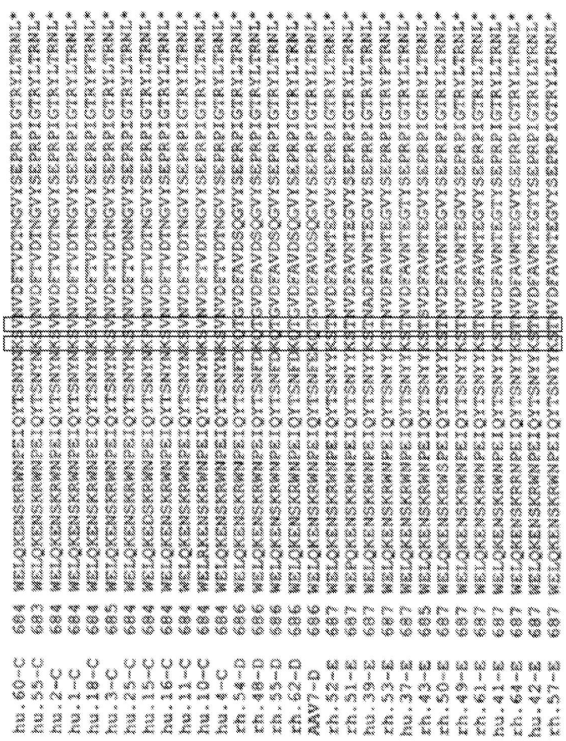


図 8-30

【図８－３１】

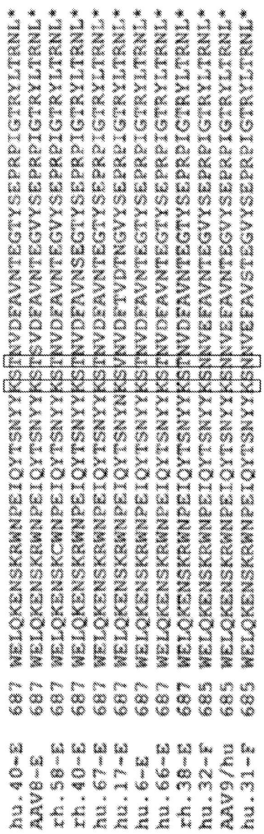


図 8-31

【図９－１】

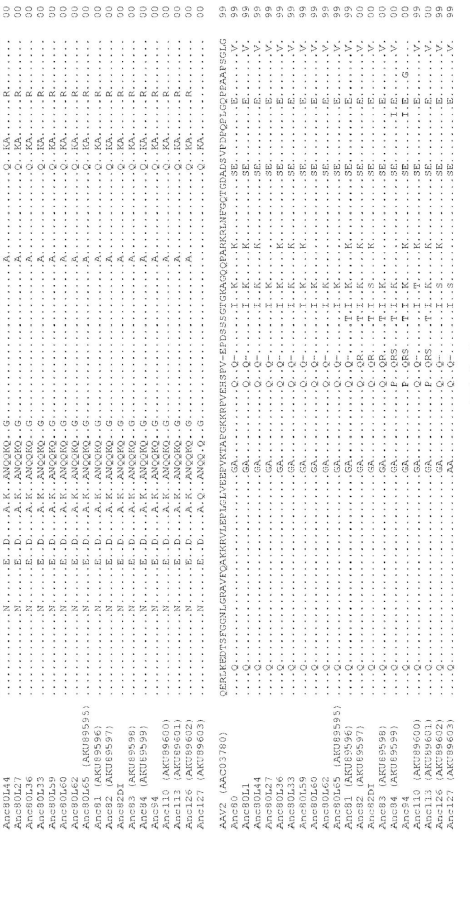


図 9-1

【図９－２】

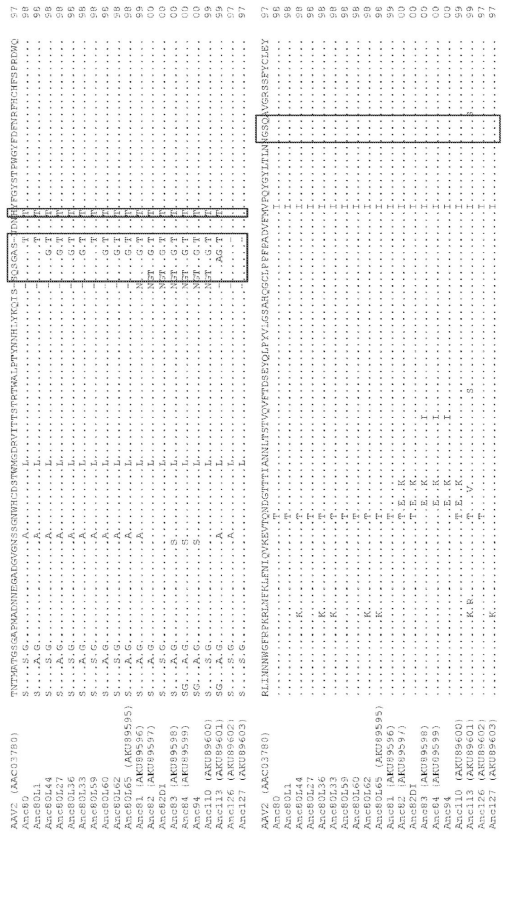


図 9-2

【図９－３】

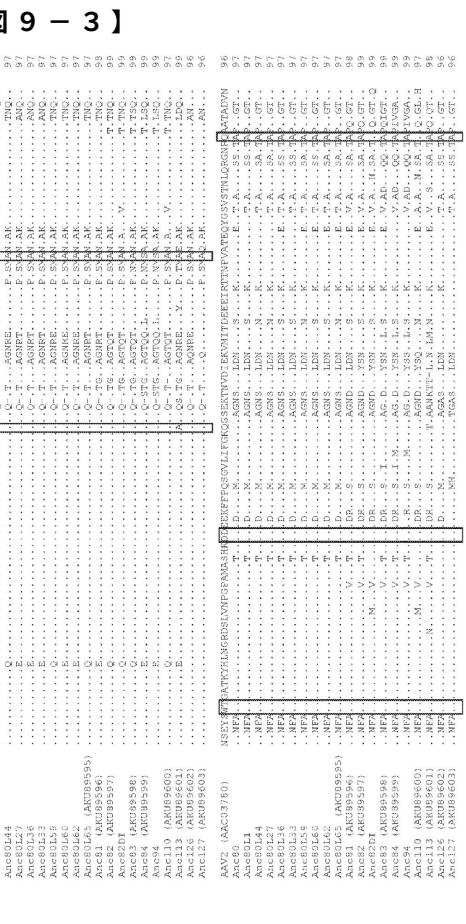


図 9-3

【図９－４】

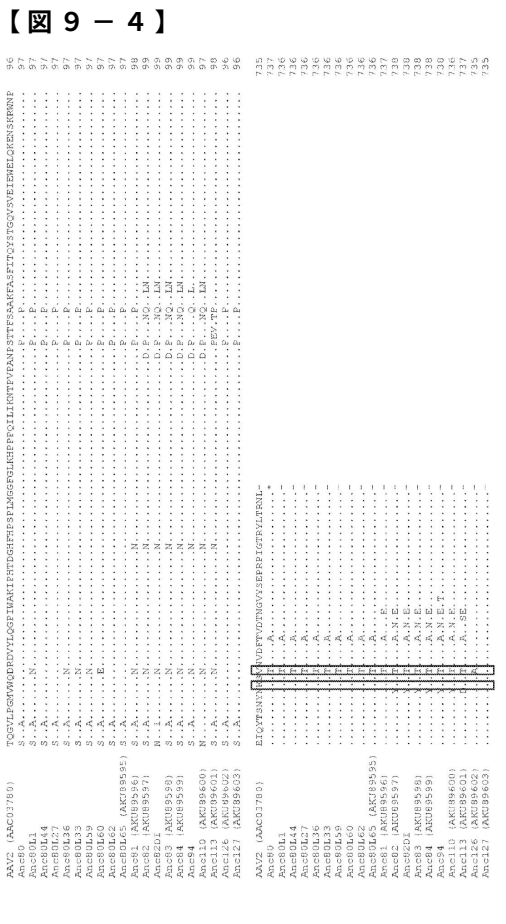


図 9-4

【配列表】
20225471970000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/050027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/86
ADD.

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)
C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/152333 A1 (UNIV NORTH CAROLINA CHAPEL HILL [US]) 23 August 2018 (2018-08-23) page 3, line 16 - line 30 page 20, line 17 - page 21, line 7 claims 85,86,91,92,119 Field of the Invention, Background of the Invention	1-11, 13-52
A	WO 2019/104279 A1 (4D MOLECULAR THERAPEUTICS INC [US]) 31 May 2019 (2019-05-31) paragraph [0071]; example 1	1-11, 13-52

☐ 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

"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	Date of mailing of the international search report
4 February 2021	13/04/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Sprinks, Matthew

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/050027

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:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/050027

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

see additional sheet

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 an 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.:

1-11, 13-52(all partially)

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/ US2020/ 050027

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-11, 13-52(all partially)

A virus comprising a modified AAV VP1 capsid protein, comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to an amino acid sequence of an unmodified AAV VP1 capsid protein with SEQ ID NO: 1, wherein the amino acid sequence of the modified VP1 capsid protein differs from the amino acid sequence of the unmodified VP 1 capsid protein at position Q263, numbered relative to AAV2 VP1 capsid protein with SEQ ID NO: 1. Said difference alters the biodistribution (tropism) of the virus.

2-20. claims: 1-11, 13-52(all partially)

As invention 1 but respectively corresponding to the other 19 modified positions recited in claim 1.

---

21. claims: 12(completely); 13-52(partially)

A virus (rAAV) comprising a non-naturally occurring, modified VP1 capsid protein comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to an amino acid sequence of an unmodified AAV VP1 capsid protein, wherein the modified VP1 capsid protein differs from the unmodified VP1 capsid protein in comprising an undisclosed means (presumably amino acid/s change/s) for altering the biodistribution (tropism) of the modified rAAV following administration of the modified rAAV to a first mammalian subject as compared to biodistribution of an unmodified rAAV following administration of the unmodified rAAV having the unmodified VP1 capsid protein to a second mammalian subject of the same type as the first mammalian subject.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/050027

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018152333 A1	23-08-2018	AU 2018221738 A1	22-08-2019
		BR 112019016769 A2	26-05-2020
		CA 3052829 A1	23-08-2018
		CN 110520536 A	29-11-2019
		EA 201991911 A1	20-02-2020
		EP 3583220 A1	25-12-2019
		JP 2020505936 A	27-02-2020
		KR 20190117571 A	16-10-2019
		SG 11201907298W A	27-09-2019
		US 2019367562 A1	05-12-2019
		WO 2018152333 A1	23-08-2018
WO 2019104279 A1	31-05-2019	AU 2018372235 A1	11-06-2020
		BR 112020010674 A2	10-11-2020
		CA 3083472 A1	31-05-2019
		CL 2020001360 A1	11-09-2020
		CN 111770999 A	13-10-2020
		EP 3717636 A1	07-10-2020
		JP 2021503914 A	15-02-2021
		KR 20200088853 A	23-07-2020
		SG 11202004545X A	29-06-2020
		US 2020282077 A1	10-09-2020
		WO 2019104279 A1	31-05-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*1/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	
Ａ６１Ｐ	*9/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｐ	*21/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00	
Ａ６１Ｐ	*27/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ	*11/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ｃ０７Ｋ	*14/015 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/015	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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

弁理士　大森 規雄

(74)代理人　100181168

弁理士　丸山 智裕

(72)発明者　ジン，エリック

アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０１９０２，リン，マニング ロード １１

(72)発明者　ティッパー，クリストファー

アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２１３８，ケンブリッジ，シングバラ アベニュ ６

(72)発明者　ヴァンデンバーグ，リュク エイチ．

アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４９３，ウェストン，インディアン ヒル ロード １４

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C087　AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA06 NA13 ZA33 ZA36 ZA59 ZA75 ZA94

4H045　AA10 AA30 CA01 DA50 EA20 FA74